



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

KELLY SANTOS

Caracterização bioquímica de aminopeptidases de *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
KELLY SANTOS
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese para apresentação ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Dr. Francisco Javier Medrano Martin

Campinas – SP, 2006

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

Sa59e Santos, Kelly
Caracterização bioquímica de aminopeptidases
de *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* /
Kelly Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Francisco Javier Medrano Martin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aminopeptidases . 2. *Xylella fastidiosa*. 3.
Xanthomonas axonopodis pv *citri*. I. Martin, Francisco
Javier Medrano. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Biochemical characterization of aminopeptidases from *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Palavras-chave em inglês: Aminopeptidases; *Xylella fastidiosa*; *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Francisco Javier Medrano Martin, Ana Paula Ulian de Araújo, Ricardo Aparício, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, José Camillo Novello.

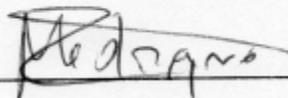
Data da defesa: 15/12/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

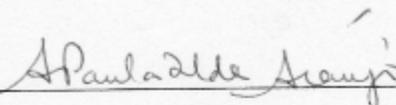
Data da defesa: 15 de dezembro de 2006.

Banca Examinadora:

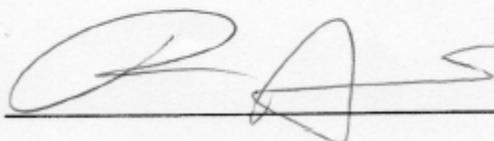
Prof. Dr. Francisco Javier Medrano Martín



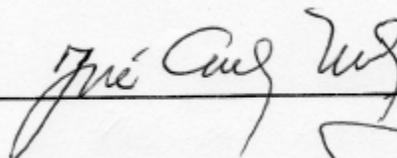
Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo



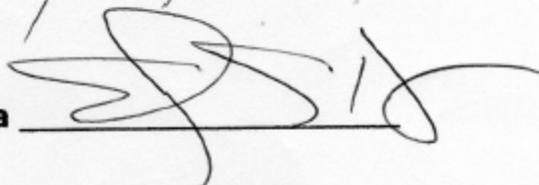
Prof. Dr. Ricardo Aparício



Prof. Dr. José Camillo Novello



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



Prof. Dr. Celso Eduardo Benedeti

Prof. Dr. Eduardo Galembeck

Profa. Dra. Ljubica Tasic

Dedicatória

Dedico esta tese as duas pessoas mais importantes da minha formação e existência...

A minha mãe Rosevalda Correia e a minha tia Sônia Maria Correia.

As palavras pra agradecer vocês seriam muitas... Pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida... Pelo que sou, pelo exemplo de vida que me deram e que me fez chegar até aqui. Meu sincero e singelo,

Muito obrigada!!

*Ofereço com muito carinho, ao meu amor,
amigo, companheiro... meu Namorado!!!*

Gustavo Henrique Neves Moreira

*“ (...) Amo-te de um calmo amor prestante
E te amo além, presente na saudade
Amo-te, enfim, com grande liberdade
Dentro da eternidade e a cada instante. ”*
Vinicius de Moraes

Agradecimientos

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por me ajudar a concluir mais uma etapa. Nestes quatro anos de doutoramento, minha vida se transformou, e uma forma de retribuir a todos que direta ou indiretamente contribuíram, me apoiando, incentivando nos momentos mais difíceis, que fizeram e fazem parte do meu amadurecimento fica aqui a minha gratidão.

Ao Dr. Francisco Javier Medrano Martin pela orientação e oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Antonio Brum pelo incentivo a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Rogério Meneghini pela oportunidade e apoio.

À coordenadora da SCPG/Biologia Funcional e Molecular/IB UNICAMP, Profa. Dr^a Helena Coutinho Franco de Oliveira, pelo incentivo, pelo exemplo de pesquisadora e competência profissional.

Aos membros e mestres da SCPG/Biologia Funcional e Molecular/IB UNICAMP, especialmente à Andréia Aparecida Vigilato pelo apoio, gentileza e amizade durante os processos burocráticos.

Aos membros da banca examinadora desta tese de doutorado: Prof^a. Ana Paula Ulian de Araújo, Prof. Dr. Ricardo Aparício, Profr. Dr. José Camillo Novello, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira pela atenção ao meu trabalho e minha formação profissional.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado.

Ao LNLS pela infra-estrutura e aos funcionários pelo suporte, que sempre foram muito solícitos quando precisei de ajuda. Especialmente à Margarida M. S. Abreu de Lima (Bibliotecária), Elaine C. M. Matiazzo (Recursos Humanos), Edmilson C. da Silva (Contabilidade), Eduardo J. Ortolan e José Fernando G. A. Lapa (Contabilidade) e tantos outros.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos pelas valorosas sugestões, apoio e ensinamentos em biofísica molecular.

À Dr^a Eneida de Paula, ao Dr. Hiroshi Aoyama e a Dr^a Ljubica Tasic pelas sugestões e considerações muito pertinentes no exame de qualificação.

A Dr^a Ljubica Tasic, Profr. Dr. Eduardo Galembeck e ao Prof. Dr. Celso Benedetti por aceitarem participar da banca examinadora como suplentes.

Aos meus amigos de grupo, especialmente a Amanda, Andréia, Rafael, Fábio, Vera, Juliana O., pela parceria, convivência e por tornarem o dia-a-dia mais agradável. Sentirei falta de vocês.

Aos outros amigos que conquistei neste período, pelas incansáveis conversas de bancada, corredores, almoços muito divertidos e discussões científicas muito proveitosas, pelo constante apoio, incentivo e pela amizade que espero que as fronteiras não separem: Andrés, Dr. Dario, Dr. Júlio, Dr. Rui, Alexandre, Thiago, Daniel, Dr^a. Letícia, Dr^a Flavia, Dr^a Flavia Nery, Sandra, Thais, Patrícia, Paty, Juliana, Beatriz, Marcos, Leandro, Daniel, Daniel (BFM), Givanil, Zildene, Isis, Tereza, Veruska e Eugência. Vocês fizeram parte de momentos inesquecíveis que sem os quais seria muito difícil chegar até aqui.

A Adriana, ao Leandro ("bestinha") e ao Tiaguinho pela amizade e suporte técnico durante as longas jornadas de purificações. Obrigada por terem tornado minhas purificação momentos de reflexão... Por me ensinarem a conversar com o FPLC.

Especialmente a Dr^a Flavia Raquel G. Carneiro, Sandra Mara Naressi Scapin e ao Dr. Júlio César Borges pela amizade, cumplicidade, companheirismo, por terem lido minha tese e pelas valiosas sugestões dadas. Obrigada meus queridos, vocês moram no meu coração. Espero um dia poder retribuir tal gesto.

Aos amigos da república 510, por tudo que aprendi com nossa convivência, e claro especialmente ao nosso "presidente" José Andrés Yunes pelas ricas sugestões ao ler minha tese, e por ser esta pessoa tão espontânea de dizer sempre o que pensa. Fica aqui minha admiração e gratidão. Ao Fabinho Papes pelo exemplo a ser seguido e claro pelos maravilhosos e inesquecíveis churrascos. Volte logo amigo. Ao amigão Zezinho que sempre tem uma palavra de consolo, um ombro amigo ainda que distante, sempre jogou uma gracinha para me alegrar. Ao Nicolinha que sempre acreditou em mim mais do que eu mesma. Obrigada meus queridos, amo vocês meus irmãos.

A minha mãe, pelo apoio incondicional, exemplo de vida, amizade e por suportar minhas ausências. Ao Luis "bomdrasto" que com seu jeitinho cuida de

minha mãe e claro por ter me adotado como filha e me dado uma outra irmã, a Maria. A tia Sônia, minha segunda mãe, minha amiga, companheira exemplo de bondade. Ao meu amado vovô Osni Correia, que sempre torce por mim. A Franciele, ao Adilson, e especialmente minha querida e saudosa vovó que sempre olha por todos nós do céu. Enfim, jamais poderia ter nascido em outra família. Amo vocês.

Ao meu namorado Gustavo por ter ficado do meu lado durante os altos e baixos, vitórias e derrotas e pelo suporte de informática. E especialmente à sua maravilhosa família que me acolheu desde o primeiro instante, me apoiando, me paparicando, ajudando a suprir a minha carência pela distância da minha família. Sinto-me muito honrada pela acolhida. Especialmente á minha sogra Dona Benedita (Ditinha) e ao meu sogrinho Sr. José Carlos, que são exemplos de amor e união, e claro, por terem educado tão bem o meu futuro marido.

*“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois
cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.*

*Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas
não vai só, nem nos deixa só: leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.”*

Antonie de Saint - Exupery

Muito obrigada a todos.

*“ (...) Evoluir é tirar lição das dores
Dos espinhos, retirar as flores
E do erro, máximo de ensino (...) ”*

Índice

AGRADECIMENTOS	XIII
ÍNDICE.....	XXI
LISTA DE FIGURAS.....	XXV
LISTA DE TABELAS	XXVII
LISTA DE ABREVIACÕES	XXIX
ABSTRACT.....	XXXV
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS PEPTIDASES.....	3
1.2. A NOMENCLATURA DE SCHECHTER E BERGER	4
1.3. IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA	5
1.4. AMINOPEPTIDASES	5
1.5. MECANISMO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA DAS AMINOPEPTIDASES	6
1.6. ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO.....	7
1.7. PAPEL FISIOLÓGICO DAS AMINOPEPTIDASES BACTERIANAS	9
1.8. DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS	9
1.9. MATURAÇÃO DE PROTEÍNAS	9
1.10. OUTRAS FUNÇÕES	10
1.11. PROLINA IMINOPEPTIDASE	11
1.12. <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> E <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>CITRI</i>	15
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. MATERIAIS	25
3.1.1. LINHAGENS BACTERIANAS.....	25
3.1.2. OLIGONUCLEOTÍDEOS E VETORES.....	26
3.1.5. MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO BACTERIANO	26
3.1.6. SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (MINI-PREP)	27
3.1.7. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE.....	27
3.1.8. TAMPÕES USADOS PARA AS ANÁLISES DE ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS EM DIFERENTES PHS.....	28
3.2. MÉTODOS	29
3.2.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	29
3.2.2. PCR DE COLÔNIA.....	30
3.2.3. ELETROFORESE.....	30
3.2.4. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL	31
3.2.5. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	32
3.2.6. LIGAÇÃO	32
3.2.7. TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO - BL21 (DE3) PLYSS	32
3.2.8. CLONAGEM	32
3.2.9. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS.....	33
3.2.10. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	34
3.2.11. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	35
3.2.12. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
3.2.13. ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	38
3.2.14. FLUORESCÊNCIA	40

3.2.15. TRATAMENTO DOS DADOS	40
3.2.16. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS).....	41
3.2.17. ENSAIOS CRISTALOGRAFICOS COM A PROTEÍNA Xf1510.....	41
4. RESULTADOS	45
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Xf1510	45
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Xac2987	71
5. DISCUSSÃO	97
5.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	97
5.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	98
5.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	102
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
8. ANEXOS.....	125
8.1. ARTIGO	125
8.2. CURRICULUM VITAE.....	130
8.3. ENOVELAMENTO E AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS	134
8.4. INFORMAÇÕES ESTRUTURAIS E ESPECTROSCÓPICAS	136
8.4.1. FLUORESCÊNCIA	136
8.4.2. DICROÍSMO CIRCULAR	138

Lista de Figuras

FIGURA 1. - CLASSIFICAÇÃO DAS PEPTIDASES.	3
FIGURA 2. - NOMENCLATURA DE SCHECHTER E BERGER (SCHECHTER E BERGER, 1967).	4
FIGURA 3. - MONÔMERO DA ESTRUTURA DE PIPXAC.....	13
FIGURA 4. - DETALHE DO DOMÍNIO SUPERIOR DO MONÔMERO DA PIP DE <i>X. CAMPESTRIS</i>	14
FIGURA 5. - SDS-PAGE 15 % PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Xf1510 EM <i>E. COLI</i>	46
FIGURA 6. - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESTABILIDADE DA PROTEÍNA Xf1510	49
FIGURA 7. - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA Xf1510	50
FIGURA 8. - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA Xf1510.....	53
FIGURA 9. - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DA Xf1510 COM DUAS PROLINA IMINOPEPTIDASES.....	55
FIGURA 10. - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Xf1510 E DA PIP-XAC.	56
FIGURA 11. - EFEITO DO pH NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Xf1510.....	58
FIGURA 12. - EFEITO DO pH SOBRE O SINAL DE CD DA PROTEÍNA Xf1510.	58
FIGURA 13. - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Xf1510 FRENTE À VARIAÇÃO DE pH.....	59
FIGURA 14. - ESPECTROS DE DENATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA Xf1510 ACOMPANHADA POR CD.	61
FIGURA 15. - DENATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA Xf1510	62
FIGURA 16. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA Xf1510 COM GdNHCL EM pH 7,0 A 25 °C MEDIDOS POR FLUORESCÊNCIA COM EXCITAÇÃO A 295 NM.	64
FIGURA 17. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA Xf1510 COM URÉIA EM pH 7,0 ACOMPANHADA POR FLUORESCÊNCIA A 25 °C COM EXCITAÇÃO A 295 NM.....	65
FIGURA 18. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA Xf1510 COM GdNHCL EM pH 9,0 MEDIDA POR FLUORESCÊNCIA COM EXCITAÇÃO A 295NM A 25 °C.....	66
FIGURA 19. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA Xf1510 COM URÉIA EM pH 9,0 MEDIDA POR FLUORESCÊNCIA A 25 °C COM EXCITAÇÃO A 295 NM.....	67
FIGURA 20. - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ DA PROTEÍNA Xf1510.....	68
FIGURA 21. - CRISTAIS DE Xf1510 DE <i>X. FASTIDIOSA</i>	70
FIGURA 22. - SDS-PAGE 15 % - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE XAc2987 EM <i>E. COLI</i>	72
FIGURA 23. - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA XAc2987.....	74
FIGURA 24. - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESTABILIDADE DA PROTEÍNA XAc2987.....	75
FIGURA 25. - DICROÍSMO CIRCULAR PROTEÍNA XAc2987	80
FIGURA 26. -ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA XAc2987 E ALGUMAS PROLINA IMINOPEPTIDASES.....	82
FIGURA 27. - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA XAc2987.....	83
FIGURA 28. - EFEITO DO pH NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA XAc2987	85
FIGURA 29. - EFEITO DO pH SOBRE O SINAL DE CD DA XAc2987	85
FIGURA 30. - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA XAc2987 EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH.	86
FIGURA 31. - DENATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA XAc2987 ACOMPANHADA POR CD.	88
FIGURA 32. - DENATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA XAc2987	89
FIGURA 33. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA XAc2987 COM GdNHCL EM pH 7,0 ACOMPANHADA POR FLUORESCÊNCIA A 25 °C COM EXCITAÇÃO A 295 NM.....	91
FIGURA 34. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA XAc2987 COM URÉIA EM pH 7,0 ACOMPANHADA POR FLUORESCÊNCIA A 25 °C COM EXCITAÇÃO A 295 NM.....	92
FIGURA 35. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA XAc2987 COM GdNHCL EM pH 9,0 ACOMPANHADA POR FLUORESCÊNCIA A 25 °C COM EXCITAÇÃO A 295 NM.	93
FIGURA 36. - DENATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA XAc2987 COM URÉIA EM pH 9,0 ACOMPANHADA POR FLUORESCÊNCIA A 25 °C COM EXCITAÇÃO A 295 NM.....	93
FIGURA 37. - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ DA PROTEÍNA XAc2987	94
FIGURA 38. - DIAGRAMA DE JABLONSKI	137
FIGURA 39. - FIGURA ILUSTRATIVA DE ESPECTROS DE POLI-LISINA EM TRÊS CONFORMAÇÕES	139

Lista de Tabelas

TABELA 1. - GENES ESCOLHIDOS PARA O PROJETO DE DOUTORADO.....	21
TABELA 2. - LINHAGENS UTILIZADAS PARA A CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E SEUS RESPECTIVOS GENÓTIPOS.....	25
TABELA 3. - SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	26
TABELA 4. - RELAÇÃO DE TAMPÕES E RESPECTIVOS PHS USADOS NOS EXPERIMENTOS DE DEPENDÊNCIA DO PH.	28
TABELA 5. - ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DA PROTEÍNA XF1510.....	47
TABELA 6. - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA HIDRÓLISE DE L-PROLINA E L-ALANINA- <i>p</i> -NITROANILIDA PELA PROTEÍNA XF1510.	48
TABELA 7. - EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA XF1510.....	51
TABELA 8. - EFEITO DE ÍONS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA XF1510.	52
TABELA 9. - ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA XF15107 EM DIFERENTES PHS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE FUSÃO.	62
TABELA 10. - CONDIÇÕES DE CRISTALIZAÇÃO NAS QUAIS OBTIVEMOS CRISTAIS DA PROTEÍNA XF1510.....	69
TABELA 11. - ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DA PROTEÍNA XAC2987.....	73
TABELA 12. - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA HIDRÓLISE DIFERENTES SUBSTRATOS <i>p</i> -NA PELA PROTEÍNA XAC2987.	76
TABELA 13. - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS β NA PELA PROTEÍNA XAC2987.....	77
TABELA 14. - EFEITO DA AÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA XAC2987.....	78
TABELA 15. - EFEITO DE METAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA XAC2987.....	79
TABELA 16. - ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA XAC2987 EM DIFERENTES PHS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE FUSÃO.	89

Lista de Abreviações

ϵ	Coeficiente de extinção molar;
λ	Comprimento de onda;
$[\theta]$	Elipticidade;
APS	Persulfato de amônio;
ATP	Adenosina 5'-tri-fosfato;
BLAST	(<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) ferramenta de procura por alinhamento básico local. Este programa compara seqüências de nucleotídeos (BLASTn) ou de aminoácidos (BLASTp);
DLS	Espalhamento dinâmico de luz;
DMSO	Dimetil sulfoxido;
DO	Densidade óptica;
DNA	Ácido desoxirribonucléico;
DTT	Ditiotreitol;
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético;
EGTA	Ácido etilenoglicoltetraacetato;
FPLC	Cromatografia líquida de proteínas por pressão (<i>Flow Protein Liquid Chromatography</i>);
Gnd-HCl	Cloridrato de guanidina;
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo;
LB	Meio de cultura Luria Bertani;
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron;
/	Comprimento do caminho ótico;
MRW	Peso médio do resíduo;
NCBI	(National Center for Biotechnology Information): site que integra vários recursos de biotecnologia;
Ni-NTA	Ácido níquel-nitrilotriacético;

ORF	(Open Reading Frame): Janela Aberta de Leitura; é a seqüência de nucleotídeos que codifica os aminoácidos de uma proteína;
Overnight	Período de aproximadamente 16 horas;
pb ou bp	Pares de bases;
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase;
PDB	<i>Protein Data Bank</i> ;
PEG	Polietilenoglicol;
pH	Potencial hidrogeniônico;
PSORT	(Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acids Sequences): programa de computador que prevê a localização celular de proteínas;
pv.	(pathovar): indica a espécie de planta que a variante da bactéria infecta. No caso pv. <i>citri</i> ataca plantas cítricas;
Rg	Raio de giro;
SDS	Dodecil-sulfato de sódio;
SDS-PAGE	(sodium dodecyl-sulphate poliacrilamide gel electrophoresis) eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio;
TB	Meio de cultura Terrific Broth;
Tm	Temperatura média de transição;
Tween 20	Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano;
U	Unidade enzimática de restrição (1U); definida como a quantidade de enzima necessária para clivar completamente 1µg de DNA do bacteriófago λ, em 1 hora, na temperatura ótima de atividade da enzima (em geral 37°C);
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i> ;
Xf	<i>Xylella fastidiosa</i> ;
EMR	Elipticidade molar residual.

Resumo

Aminopectidases realizam a clivagem de resíduos de aminoácidos de peptídios e proteínas. Elas estão presentes em todos os organismos e desempenham importantes papéis em processamento de alimentos, maturação de proteínas pela eliminação do resíduo de metionina N-terminal, patogenicidade e muitos outros processos celulares. Neste trabalho foi realizada a clonagem, expressão, purificação e caracterização de uma prolina iminopectidase de *Xylella fastidiosa* (Xf1510) e de uma aminopectidase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac2987). Estes dois genes foram anotados como prováveis prolina iminopectidases. Ambos foram clonados em vetor de expressão pET15b, expressados em *Escherichia coli*, e purificados na fração solúvel em um passo por cromatografia a metal imobilizado (IMAC). Ensaio de atividade enzimática confirmaram que a Xf1510 é uma prolina iminopectidase, e que a Xac2987 é uma aminopectidase de amplo espectro e não uma prolina iminopectidase como foi anotada no banco de dados, sendo capaz de catalisar a remoção de diferentes aminoácidos de substratos sintéticos. Os espectros de dicroísmo circular das enzimas mostram que ambas podem ser incluídas na família das α/β hidrolases e que estão enoveladas. A proteína Xf1510 apresenta maior atividade na faixa de pH entre 7,5 e 8,5. A temperatura ótima para hidrólise de prolina foi 45°C. O pH ótimo para a atividade enzimática da proteína Xac2987 foi encontrado na faixa de pH de 6,5 e 7,5; sendo o pH ótimo 6,6. Neste pH a temperatura ótima para a hidrólise de alanina foi encontrada à 40°C. Estudos estruturais com relação ao pH e estabilidade térmica das proteínas foram acompanhados por dicroísmo circular. Estudos de desnaturação térmica e química indicam que as proteínas Xf1510 e Xac2987 apresentam estados intermediários antes de atingirem o desenovelamento máximo.

Abstract

Aminopeptidases release the N-terminal amino acid residue from polypeptides and proteins. They are present in all organisms and play several important roles in food processing, maturation of proteins by elimination of the N-terminal methionine, pathogenicity and many other cellular processes. We report here, the cloning, expression, purification and characterization of a proline iminopeptidase from *X. fastidiosa* (Xf1510) and a broad specificity aminopeptidase from *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac2987). These two genes have been annotated as putative proline iminopeptidase. Both genes were cloned into the pET15b expression vector, expressed in *Escherichia coli*, and purified to apparent homogeneity in one step by IMAC. The protein was expressed in the soluble fraction and could be purified in one step by IMAC. Enzymatic assays confirmed Xf1510 as a PIP, and Xac2987 as a broad spectrum aminopeptidase, being able to catalyze the removal of different synthetic substrates. The circular dichroism spectrum allowed us to classify the proteins as part of the α/β hydrolyses family. Structural studies with pH dependence and thermal stability were preformatted by circular dichroism. The Xf1510 protein presents greater activity in the range of pH between 7,5 and 8,5. The optimum temperature for prolina hydrolysis was 45°C. The pH optimum for the enzymatic activity of the Xac2987 protein was found in the range of pH of 6,5 and 7,5; being pH optimum 6,6. In this pH the temperature for alanine hydrolysis was found to 40°C. Structural studies with regard to pH and thermal stability of proteins had been followed by circular dichroism. Studies of thermal and chemical denaturation indicate that the proteins Xf1510 and Xac2987 present intermediate states before reaching the maximum unfolding.



Introdução



1. Introdução

As enzimas proteolíticas, também chamadas proteases, proteinases ou peptidases, pertencem ao grupo das hidrolases as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteinases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e peptídeos, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (Whitaker, 1994). Estes tipos de enzimas estão presentes em todos os organismos onde realizam uma grande variedade de funções.

1.1. Classificação das peptidases

As peptidases podem classificar-se segundo vários critérios. De acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, dividem-se em endopeptidases, quando clivam ligações peptídicas no interior das proteínas, e exopeptidases, quando clivam ligações peptídicas nos extremos das proteínas. Estas últimas dividem-se por sua vez em aminopeptidases, que liberam resíduos amino-terminais, e carboxipeptidases, que liberam resíduos carboxi-terminais (Figura 1).

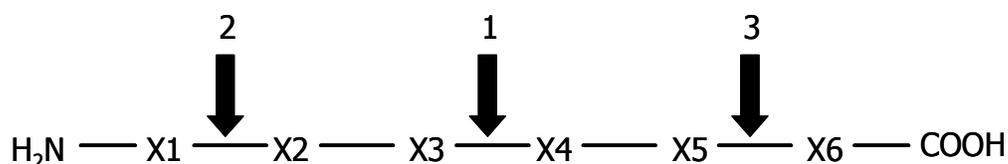


Figura 1. - Classificação das peptidases. Endopeptidases clivam ligações peptídicas no interior do polipeptídeo (1). Exopeptidases clivam resíduos na extremidade N-terminal (2) ou na extremidade C-terminal (3) de peptídeos, sendo denominadas de aminopeptidases ou carboxipeptidases, respectivamente.

Um outro critério muito usado corresponde ao resíduo catalítico que as diferentes peptidases utilizam na quebra da ligação peptídica. Segundo este critério estas enzimas dividem-se em serino-peptidases, cisteíno-peptidases, aspartato-peptidases, treonina-peptidases e metalo-peptidases. Além destes

também existe um grupo de peptidases cujo mecanismo catalítico é ainda desconhecido que são chamadas hipotéticas.

1.2. A nomenclatura de Schechter e Berger

Outra maneira de classificar as peptidases é segundo a nomenclatura introduzida por Schechter e Berger em 1967, que descreve a interação do substrato com a protease. Atualmente têm sido bem utilizada na literatura. Neste sistema, considera-se por convenção, os resíduos de aminoácidos de um polipeptídeo ligado ao sítio ativo da enzima. Por convenção, estes subsítios na protease são chamados S (para subsítios) e os aminoácidos do substrato são chamados de P (para peptídeos). Os resíduos de aminoácidos do N-terminal da região da ligação são numerados por P3, P2, P1 e aqueles resíduos do C-terminal são chamados: P3', P2' e P1'. Os resíduos P1 ou P1' são aqueles resíduos localizados próximos à região de corte da ligação. Os resíduos ao redor da clivagem podem ser numerados até P8. Os subtipos na protease que complementam a ligação ao substrato podem ser S3, S2 e S1 e os subtipos do N-terminal podem ser S3', S2' e S1'.

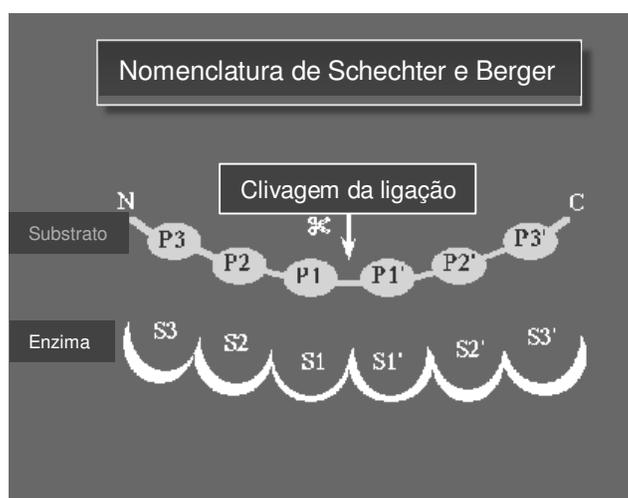


Figura 2. - Nomenclatura de Schechter e Berger (Schechter e Berger, 1967).

1.3. Importância biotecnológica

As enzimas proteolíticas são de grande valor comercial, e são amplamente utilizadas nas indústrias de biotecnologia. Na indústria de alimentos são usadas nos processos de fermentação e produção de alimentos, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja (Workman *et al.*, 1986). Também são usadas na clarificação de sucos através da hidrólise das proteínas solúveis neles contidas em altas concentrações, as quais provocam turbidez e formação de sedimentos indesejáveis durante a estocagem (Dawes *et al.*, 1994). Na indústria de panificação, são utilizadas para a produção da massa macia, com o resultado da hidrólise do glúten. Na fabricação de queijos as proteinases são empregadas para maturação e desenvolvimento da textura e do sabor, pela acumulação lenta de peptídeos de sabor amargo gerados pela ação dessas enzimas (endopeptidases) na beta-caseína do leite (Visser, 1993; Poolman *et al.*, 1995). Na indústria de carnes, as proteinases são utilizadas para tenderização e condicionamento, com o emprego das tio-proteases (Donaghy & Mackay, 1993) e para o melhoramento de alimentos para animais (Lyons, 1988). Outro emprego importante das proteinases é a utilização da termolisina produzida pelo *Bacillus thermoproteolyticus* para a produção de aspartame, um dipeptídeo usado como adoçante (Lu & Chang, 1996). Ao lado das indústrias de alimentos, as proteinases são amplamente empregadas em detergentes, na produção de papel (Steele & Stowers, 1991; Ludlow & Clark, 1991; Donaghy & Mackay, 1993; Manonmani & Richard Joseph, 1993; Phadatare *et al.*, 1993; Bhosale *et al.*, 1995), na indústria de couros (George *et al.*, 1995) e na produção de cervejas para hidrólise das proteínas responsáveis pela sua turvação (Bilinski *et al.*, 1987 e 1988; Donaghy & Mackay, 1993; Ogrydziak, 1993).

1.4. Aminopeptidases

Aminopeptidases são exopeptidases que catalisam a clivagem de aminoácidos da extremidade N-terminal de proteínas ou peptídeos. Estas enzimas estão presentes em todas as células de procariotos e eucariotos. Sua atividade é

muito elevada, o que pode indicar sua importância no metabolismo de organismos vivos. Aminopeptidases compreendem um numeroso e diferenciado grupo de peptidases. De acordo com a classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular de enzimas, as peptidases, incluindo aminopeptidases, são divididas em famílias de acordo com homologia da seqüência primária e a seqüência de grupos funcionais participantes da catálise, e dentro de clãs de acordo com a similaridade da estrutura quaternária e a seqüência de aminoácidos ao redor do sítio ativo (Rawlings & Barrett, 1993). Além disso, especificidade ao substrato, mecanismo de catálise, sensibilidade a bestatina, localização subcelular e pH ótimo são geralmente usados na literatura como parâmetros de classificação. A divisão de bactérias é feita usando-se letras exemplo: A, N, C e P baseado nas propriedades moleculares e catalíticas. Algumas aminopeptidases são bastante específicas, sendo o nome formado dependendo da especificidade ao substrato, por exemplo: metionina aminopeptidase ou arginina aminopeptidase (Taylor, 1993; Gonzales e Robert-Baudouy, 1996).

1.5. Mecanismo de catálise enzimática das aminopeptidases

Devido ao mecanismo de catálise e à estrutura do sítio ativo, aminopeptidases podem ser subdivididas dentro de três principais grupos catalíticos em: metalo-aminopeptidases, cisteíno-aminopeptidases e serino-aminopeptidases.

Metallo-aminopeptidases formam o mais numeroso dos três grupos, compreendendo 60% dessas enzimas. Este grupo tem sua atividade inibida por compostos quelantes de metal tais como EDTA, bestatina e amastatina. A ligação de metal ocorre com mais freqüência a dois resíduos de histidina e a um resíduo de ácido glutâmico. A catálise requer, à parte de metais ligantes, no mínimo um aminoácido, geralmente ácido glutâmico, arginina ou lisina. O mecanismo da ação catalítica dessas enzimas ainda não é totalmente esclarecido.

Cisteíno-aminopeptidases contém grupos SH de cisteína e mais freqüentemente resíduos de histidina, asparagina e ácido glutâmico no sítio ativo.

Em contraste com as metalo-aminopeptidases, elas não contêm um íon como co-fator na sua estrutura. As reações acontecem com um ataque do enxofre no grupo sulfidril da carbonila na ligação peptídica. Estas enzimas são inibidas por iodoacetamida, iodoacetato e *p*-cloromercuriobenzoato (pCMB). A atividade é diminuída por alguns inibidores de serina tais como: TLCK, TPCK, leupeptina e antipaina. Ativadores deste grupo são: cisteína, ditioneitol (DTT) e alguns agentes quelantes como EDTA. Este grupo de enzimas é muito melhor entendido do que as metal-dependentes.

Serino-aminopeptidase é o grupo menos numeroso dentre as aminopeptidases sendo representado por subtilisina e tripsina (Rawlings & Barrett, 1994). Inibidores de serino-aminopeptidase são diisopropil fluorofosfato (DFP) e fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF). Serino-aminopeptidases são também inibidas por cetonas, mas estes não são inibidores específicos de serino-aminopeptidases, uma vez que inibem também cisteíno-aminopeptidases. Dentre as serino-aminopeptidases estão as prolina aminopeptidases, também chamadas de prolina iminopeptidases (PIP), contendo a tríade catalítica composta por uma serina, uma histidina e um ácido aspártico no sítio ativo (Kitazono *et al.*, 1994; Morel *et al.*, 1999) e as D-aminopeptidases que apresentam quatro resíduos no sítio ativo (três de serina e um de lisina). A lisina desempenha o papel de receptor de prótons durante o ataque nucleofílico do grupo hidroxil-serina na carbonila da ligação peptídica (Asano, 1998; Fanuel *et al.*, 1999; Asano e Lubbehusen 2000; Komeda *et al.*, 2003).

1.6. Especificidade ao substrato

De acordo com a especificidade ao substrato as aminopeptidases podem ser subdivididas em dois grupos: pouco específicas e as que são muito específicas. Aminopeptidases pouco específicas são capazes de catalisar a quebra de diferentes resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal, enquanto que as estreitamente específicas são capazes de catalisar a clivagem a somente um tipo de resíduo de aminoácido. As aminopeptidases são enzimas estereo-específicas

hidrolisando na maioria das vezes, formas de L-aminoácidos da extremidade NH₂ dos substratos. A exceção é a D-aminopeptidase de *O. anthropi* que realiza a quebra de resíduo N-terminais de glicina, D-alanina e D-serina (Asano, 1998; Funuel *et al.*, 1999).

Aminopeptidases que apresentam maior especificidade ao substrato, são divididas em seis grupos de acordo com o resíduo clivado:

- ✓ **Metionina aminopeptidases** são chamadas de aminopeptidases M. Estas são enzimas que preferem substratos que contenham na extremidade N-terminal da cadeia peptídica uma metionina. Aminopeptidases M de *E. coli* e *Bacillus subtilis* foram bem caracterizadas (Nakamura *et al.*, 1990; Roderick e Matthews, 1993).
- ✓ **Aspartato aminopeptidase A** também chamada de glutamil aminopeptidase. Enzimas deste grupo apresentam especificidade por resíduo de ácido aspártico (Exterkate e de Veer, 1987; Bacon *et al.*, 1994).
- ✓ **Pirolidone carboxil peptidases** (pirase) preferem substratos contendo ácido piroglutâmico com o qual forma espontaneamente ciclização intracelular de ácido glutâmico (Doolittle, 1970).
- ✓ **Arginina aminopeptidases** têm preferência por substratos que apresentam resíduo de arginina. Estas proteases foram isoladas de *Streptococcus* e *E. coli* (Ishino *et al.*, 1987; Foderus *et al.* 1990; Godstein *et al.*, 2002; Jobin e Grenier, 2003).
- ✓ **Aminopeptidases P** clivam prolina da posição P1' do substrato. Aminopeptidases P foram obtidas de *Streptomyces lividans* e *Salmonella typhimurium* (McHugh e Miller, 1974; Butler *et al.*, 1993; Butler *et al.*, 1994; McDonnel *et al.*, 1997).
- ✓ **Prolina aminopeptidases ou prolina iminopeptidase (PIP)**. Estas enzimas são muito específicas e apresentam preferência por substratos que contenham uma prolina na posição amino-terminal. Exemplos de PIPs são: as aminopeptidases de *E. coli*, da bactéria do gênero *Lactobacillus* e *Artrobacter nicotianae* (Kunji *et al.*, 1996; Smacchi *et al.*, 1999).

A especificidade destas aminopeptidase não é somente determinada pela presença de um único resíduo de aminoácido na última posição no N-terminal, mas também nas posições seguintes. Prolina iminopeptidases hidrolisam ligações peptídicas em substratos contendo prolina na posição N-terminal em condições onde nem lisina, nem fenilalanina sejam o próximo resíduo de aminoácido na cadeia polipeptídica (Yoshimoto *et al.*, 1983).

1.7. Papel fisiológico das aminopeptidases bacterianas

Bactérias mostram diversas atividades aminopeptidásicas distribuídas no citoplasma, nas membranas interna e externa e associadas com a parede celular.

1.8. Degradação de proteínas e peptídeos

Estas enzimas desempenham um papel importante na nutrição e aquisição de aminoácidos essenciais para as bactérias. Além disso, a liberação de aminoácidos de proteínas e pequenos peptídeos têm um papel predominante na utilização de fontes de nitrogênio.

As proteínas intracelulares são constantemente renovadas durante o ciclo de crescimento e existe um equilíbrio dinâmico entre a síntese e o catabolismo de proteínas (reciclagem protéica). As aminopeptidases estão envolvidas nos estágios finais da degradação das proteínas em aminoácidos livres. Este fenômeno foi observado em diferentes condições fisiológicas, fase exponencial e estacionária de crescimento, assim como em condições limitantes de fontes de carbono (Yen *et al.*, 1980 a,b). As mesmas enzimas também estão envolvidas nos estágios finais da degradação de proteínas anormais (Miller *et al.*, 1974).

1.9. Maturação de proteínas

Aminopeptidases foram relacionadas com a maturação de precursores de proteínas (Miller *et al.*, 1974; Miller *et al.*, 1975). A metionina aminopeptidase é responsável pela eliminação da metionina N-terminal de cadeias polipeptídicas recém sintetizadas (Roderick *et al.*, 1993; Ben-Bassat *et al.*, 1987). Esta

aminopeptidase mostra uma especificidade restrita para metionina na posição P1, mas a clivagem é função determinada pelo aminoácido adjacente ao resíduo de metionina (P1'). Como resultado, algumas proteínas maduras possuem um resíduo de metionina no extremo N-terminal, enquanto outras teriam perdido este resíduo (Miller *et al.*, 1987). A presença ou ausência do resíduo de metionina pode determinar a meia-vida das proteínas em função da regra do N-terminal. A ausência desta aminopeptidase ou presença de mutações nela é letal para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Miller *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989).

1.10. Outras funções

Além das funções relatadas anteriormente elas também foram relacionadas com alguns outros processos celulares. A peptidase PepA de *E. coli* é um fator acessório necessário para a estabilidade de plasmídeos ColE1 de alto número de cópias (Stirling *et al.* 1989). Estes plasmídeos têm tendência a formar multímeros *in vivo* como resultado de recombinação homóloga. Uma mutação na aminopeptidase PepA que aboli a atividade enzimática não altera a função da proteína no processo de recombinação e é provável que a PepA desempenhe um papel estrutural neste processo independente da atividade aminopeptidásica (MacCulloch *et al.* 1994).

Um outro exemplo de uma aminopeptidase com uma possível função adicional é a D-aminopeptidase de *Ochrobactrum anthropi*. Esta enzima cliva especificamente D-aminoácidos, e sua seqüência peptídica mostram uma forte similaridade com as proteínas DD-carboxipeptidases, enzimas envolvidas na biossíntese de peptidoglicana. Isto sugere um possível papel destas D-aminopeptidases na síntese e ou degradação de peptidoglicana (Asano *et al.* 1992).

Algumas aminopeptidases parecem estar envolvidas no mecanismo de ativação ou no transporte de antibióticos para o interior das células. As aminopeptidases PepN e PepA de *E. coli* e de *S. typhimurium* são responsáveis pela ativação do antibiótico albomicina (Braun *et al.*, 1983). A aminopeptidase Xc

de *Xanthomonas citri* está envolvida no transporte do antibiótico ascamicina através da membrana citoplasmática (Osada *et al.*, 1986). Portanto, as aminopeptidases aumentam a sensibilidade das bactérias a alguns antibióticos. Possivelmente, os organismos secretores de antibióticos aproveitam a presença das aminopeptidases nas bactérias alvos com o objetivo de suprimir seu crescimento. Outras possíveis funções das aminopeptidases são: a degradação de peptídeos tóxicos, inativação de proteínas ou de peptídeos fisiologicamente importantes (Lazdunski, 1989; Miller, 1975).

1.11. Prolina iminopeptidase

A atividade prolina iminopeptidase (PIP, EC 3.4.11.5) foi descrita pela primeira vez por Sarid *et al.*, 1959. Estas enzimas catalisam a quebra de resíduos de prolina da extremidade amino terminal de pequenos peptídeos. PIP, como muitas outras aminopeptidases, estão envolvidas na degradação de peptídeos liberando aminoácidos que são importantes para o metabolismo celular. Estas enzimas mostram um alto grau de similaridade na seqüência e compartilham uma série de características como a especificidade de substrato e o peso molecular, portanto podem agrupar-se nesta família.

Diferentes origens destas enzimas foram descritas em diferentes organismos, sugerindo sua ampla distribuição na natureza. Alguns grupos caracterizaram PIP de bactérias *Aeromonas sobria* (Kitazono *et al.*, 1994), *Bacillus coagulans* (Kitazono *et al.*, 1992), *Eikenella corrodens* (Gully e Rogers, 2001), *Flavobacterium meningosepticum* (Kitazono *et al.*, 1996), *Hafnia alvei* (Kitazono *et al.*, 1996), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Atlan *et al.*, 1994), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Klein *et al.*, 1994), *Neisseria gonorrhoeae* (Albertson e Koomey, 1993), *Propionibacterium shermanii* (Leenhouts *et al.*, 1998), *Serratia marcescens* (Kabashima *et al.*, 1997), *Thermoplasma acidophilum* (Tamura *et al.*, 1996), *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Alonso *et al.*, 1996, Sudo *et al.*, 1996), e *Aspergillus niger* (Basten *et al.*, 2005). A atividade enzimática da prolina iminopeptidase também está presente em vertebrados, mas parece ser uma

proteína diferente associada com atividade de uma leucina aminopeptidase (Matsushima *et al.*, 1991).

Estas PIPs clonadas foram caracterizadas com relação a sua especificidade, inibição por metais e por inibidores de específicos de peptidases (serino-, cisteína-, ou metalo-peptidase) e suas propriedades cinéticas.

Proteases de bactérias fitopatogênicas influenciam na interação patógeno-planta, o que sugere que elas desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças (Dow *et al.*, 1993). Deficiência de proteases mutantes de *X. campestris* pathovars induz somente sintomas moderados em bactérias e consideravelmente reduzidos em plantas (Dow *et al.*, 1993).

A estrutura tridimensional de duas PIPs foram resolvidas, *S. marcescens* (Yoshimoto *et al.*, 1999) e *X. campestris* pv. *citri* (Medrano *et al.*, 1998). Com a anotação dos genomas da *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, verificamos que vários quadros de leitura aberta foram anotados como proteínas hipotéticas ou simplesmente peptidases que mostram homologia com proteínas conhecidas. Estas enzimas mostram um alto grau de similaridade na seqüência e compartilham uma série de características como a especificidade de substrato e o peso molecular, por esta razão podem ter sido agrupadas na família denominada PIP. *X. fastidiosa* possui um gene que codifica a proteína Xf1510, que apresenta alta similaridade de seqüência (91%) com a proteína de *X. campestris*, e outros com baixa similaridade comparados com as seqüências das PIPs de *X. campestris* (PIP_{Xac}) e da PIP de *S. marcescens*, dois genes foram anotados como possíveis prolina iminopeptidases no genoma de *X. axonopodis*. O que justifica nosso interesse em caracterizar estas proteínas bioquimicamente e, além disso, fizemos a caracterização estruturalmente usando técnicas de biofísica molecular, nunca antes descritas para estas proteínas, tais como: Dicroísmo circular (CD), fluorescência, espalhamento dinâmico de luz (DLS). Informações complementares sobre as técnicas encontram-se em anexo item 8.3.

Medrano *et al.*, 1998, resolveram a estrutura tridimensional da *X. campestris* usando cristalografia, com uma resolução de 2,7 Å. A proteína é enovelada em dois domínios compactos (Figura 3). O maior deles apresenta a topologia de enovelamento de proteínas da família α/β hidrolases, com a parte central composta por oito folhas- β flanqueados por duas α -hélices e na extremidade N-terminal, em um lado por onze resíduos e por quatro hélices no outro lado. O domínio menor é localizado no topo do domínio maior e é constituído por seis hélices. O sítio ativo, esta localizado no final do bolsão na interface entre os dois domínios, incluindo a tríade catalítica de uma serina 110, aspártico 266 e histidina 294. A proteína Xf1510 apresenta a tríade catalítica comum a estas proteínas mais uma razão para nosso interesse em caracterizar esta proteína.

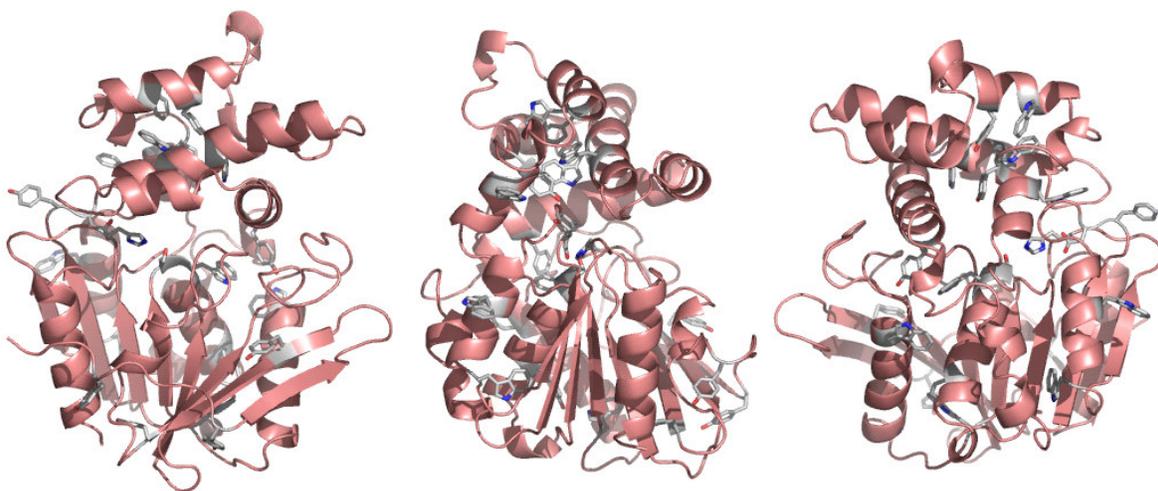


Figura 3. - Monômero da estrutura de PIPXac gerada pelo programa PYMOL (DeLano, WL 2003) em diferentes ângulos. The PyMOL Reference Manual is Copyright © 1998-2003 DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, U.S.A. All Rights Reserved.

A Xf1510 apresenta 313 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 37 kDa baseando-se na sua seqüência de aminoácidos e o pI teórico = 5,95, coeficiente de extinção medido a 280 nm = $1,96 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e a composição de aminoácidos esta listada abaixo: em cores estão destacados os triptofanos e tirosinas. Fizemos comparação de seqüência da Xf1510 e PIPXac com base na similaridade de seqüência e por modelagem (dados não mostrados) e

estas proteínas apresentam dois domínios sendo um menor e superior, como pode ser visualizado na (figura 3) onde temos o monômero da proteína PIPXac visualizada em diferentes ângulos para visualização da disposição dos dois domínios. Na figura 4, em detalhe, temos a representação do domínio superior da PIPXac onde esta proteína apresenta um cluster de resíduos de triptofanos que estão protegidos e voltados para o interior da proteína. O que nos levou a caracterizar a proteína Xf1510 bioquimicamente e estruturalmente usando técnicas de biofísica molecular, como dicroísmo circular, fluorescência, espalhamento dinâmico de luz, uma vez que antes deste trabalho não encontramos publicados dados com este tipo de informação com proteínas similares.

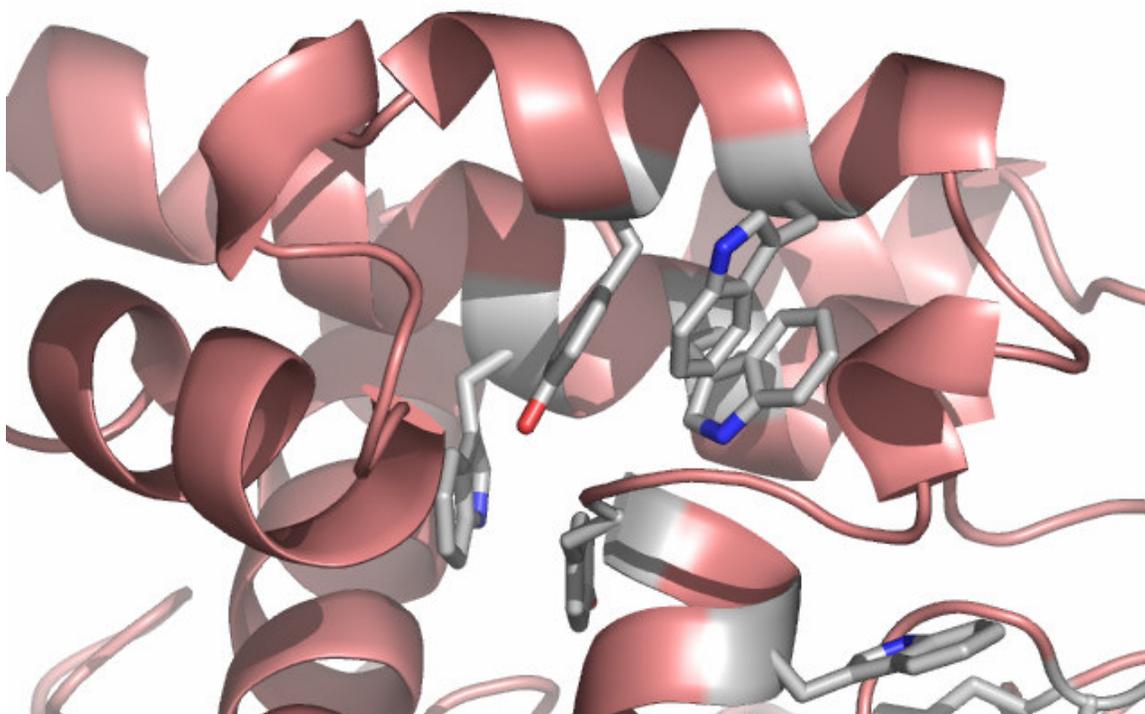


Figura 4. - Detalhe do domínio superior do monômero da PIP de *X. campestris*. Representação da disposição dos triptofanos presentes no domínio superior da PIPXac.

Composição de aminoácidos da Xf1510

Ala	(A)	29	9.3%
Arg	(R)	21	6.7%
Asn	(N)	13	4.2%
Asp	(D)	19	6,1%
Cys	(C)	6	1.9%
Gln	(Q)	12	3.8%
Glu	(E)	18	5.8%
Gly	(G)	22	7.0%
His	(H)	16	5.1%
Ala	(A)	29	9.3%
Arg	(R)	21	6.7%
Ile	(I)	16	5.1%
Leu	(L)	28	8.9%
Lys	(K)	7	2.2%
Met	(M)	4	1.3%
Phe	(F)	16	5.1%
Pro	(P)	17	5.4%
Ser	(S)	13	4.2%
Thr	(T)	16	5.1%
Trp	(W)	10	3.2%
Tyr	(Y)	10	3.2%
Val	(V)	20	6.4%

A fluorescência é um importante método para o estudo da conformação de proteínas por que esta técnica reflete a exposição dos anéis dos triptofanos e da cadeia lateral das tirosinas quando expostos ao solvente (Eftink, 1994; Eftink e Shastry, 1997). A análise experimental das curvas das intensidades de fluorescência nos comprimentos de onda 350 nm e 339 nm foram consideradas para determinar a fração de F_u nas diferentes concentrações de desnaturante: GndHCl e uréia para as proteínas Xf1510 e Xac2987.

1.12. *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram-negativa, patogênica que se encontra no xilema das plantas infectadas, causando entre outras doenças a clorose variegada em citros (CVC), também conhecida como amarelinho (Chang *et al.*, 1993) e a doença de Pierce na videira (PD) sendo também encontrada em plantas de alfafa, amêndoa, no café, olmo, sicômoro, carvalho, amoreira, oleando,

pêssego e ameixa (Puscell & Hopkins, 1996), o que resulta em séria perda econômica na agricultura mundial por infectar uma variedade de plantas. No Brasil, a CVC foi primeiramente encontrada nos estados de São Paulo e Minas Gerais em 1987, e desde então é responsável por grandes perdas econômicas. Esta bactéria é transmitida para um novo hospedeiro durante a extração da seiva destas plantas por insetos vetores e a infecção se espalha até colonizar o xilema. As bactérias atacam as paredes dos vasos, formando colônias como um biofilme, que obstrui os vasos de xilema da planta, bloqueando o transporte de água e causando estresse hídrico (Tyson *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 2001).

No Brasil e ao redor do mundo *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causa cancro cítrico em plantas de citros com um grande impacto econômico. Outros relatos demonstram que espécies de *Xanthomonas* atacam outras plantações como, arroz, algodão, feijão e uva.

Os genomas completos da *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) e da *X. axonopodis* (Da Silva *et al.*, 2002), foram seqüenciados. Em ambos os genomas encontram-se anotadas diversas peptidases baseadas na homologia com seqüências de proteínas de outros organismos. Algumas destas peptidases que foram anotadas como aminopeptidases apresentam homologia com proteínas cuja atividade enzimática foi definida em estudos bioquímicos e estruturais, embora outros quadros de leitura aberta (ORFs) anotados também como aminopeptidases (Cahan *et al.*, 2001) apresentam homologia com proteínas cuja função só foi definida por estudos bioinformáticos (similaridade de seqüência).

Em ambos os genomas encontram-se anotadas diversas peptidases baseadas na homologia com seqüências de proteínas de outros organismos. Algumas destas peptidases que foram anotadas como aminopeptidases apresentam homologia com proteínas cuja atividade enzimática foi definida em estudos bioquímicos e estruturais, embora outros quadros de leitura aberta (ORFs) anotados também como aminopeptidases apresentam homologia com proteínas cuja função só foi definida por estudos bioinformáticos (similaridade de seqüência).

Neste estudo, nós expressamos as proteínas codificadas pelos genes Xf1510 de *X. fastidiosa* e Xac2987 de *X. axonopodis* pv. *citri* em *Echerichia coli* em fusão com cauda de seis histidinas. Nós fizemos estudos de atividade enzimática, cinética enzimática, caracterização estrutural por dicroísmo circular, fluorescência, espalhamento dinâmico de luz e análise das seqüências.



Objetivos

2. Objetivos

O objetivo desta tese de doutorado foi caracterizar bioquimicamente e estruturalmente genes anotados como prováveis aminopeptidases no genoma das bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis*.

2.1. Objetivos específicos:

- 1.- Clonar genes de possíveis aminopeptidases das bactérias *X. fastidiosa* e *X. axonopodis* (Tabela 1).
- 2.- Expressar e purificar as proteínas codificadas pelos genes escolhidos.
- 3.- Caracterizar estruturalmente as proteínas.

Tabela 1. - Genes escolhidos para o projeto de doutorado.

	<i>Xylella</i>	<i>Xanthomonas</i>
	<i>fastidiosa</i>	<i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Prolina iminopeptidase	Xf1510	
Aminopeptidase		Xac2987

3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

As endonucleases de restrição, T4 DNA ligase, Taq DNA polimerase, nucleotídeos, marcadores de massa molecular de DNA e de proteína foram obtidos do fabricante Fermentas (São Paulo, Brasil). Os oligonucleotídeos iniciadores para a PCR foram obtidos da empresa Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brasil). Os kits para purificação do produto de PCR (QIAquick PCR purification kit), para minipreparação dos plasmídeos (QIAprep spin miniprep kit) e o de extração de gel de agarose (QIAquick gel extraction kit) foram obtidos do fabricante Qiagen (Hilden, Germany). As colunas de cromatografia de afinidade (Hi-Trap chelating) foram obtidas comercialmente do fabricante Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Todos os demais reagentes químicos foram obtidos da empresa Sigma (St. Louis, USA) e/ou Fermentas (São Paulo, Brasil).

3.1.1. Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas, para clonagem e para expressão das proteínas Xf1510 e Xac2987, e seus respectivos genótipos estão listados na tabela 2.

Tabela 2. - Linhagens utilizadas para a clonagem e expressão das proteínas e seus respectivos genótipos.

Linhagens de <i>E. coli</i>	Genótipos
DH5α	supE44 Δ lacU169(Φ 80 lacZ Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
BL21 (DE3) pLysS	[<i>E. coli</i> B F <i>ompT hsdSβ(rβ⁻mβ⁻) gal dcm</i> λ (DE3) pLysS(Cm ^R)]

3.1.2. Oligonucleotídeos e vetores

3.1.3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das seqüências gênicas-alvo dos organismos de interesse. Para facilitar a clonagem nos vetores de expressão, algumas bases foram adicionadas nas extremidades 5' de cada oligo, para criar sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Tabela 3).

Tabela 3. - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores. *

ORFs	Número de pares de bases	Sítios de restrição para clonagem	Direto (F) (nome / seqüência)	Reverso (R) (nome / seqüência)
Xf1510	936	<i>NdeI/XhoI</i>	Xf1510F 5' <u>CATATG</u> CGTACGCTGTATCCTGAG 3'	Xf1510R 5' <u>CTCGAG</u> TCAGACGAAGGAGTCCGTTGC 3'
Xac2987	936	<i>NdeI/XhoI</i>	Xac2987F 5' <u>CATATG</u> CAGTGCACCGAGGGTTAC 3'	Xac2987R 5' <u>CTCGAG</u> TCAAACAGCGGATTGGCCAG 3'

* Os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *XhoI* estão destacados em vermelho.

3.1.4. Vetores

Os plasmídeos utilizados foram:

- ✓ pGEM-T- Easy (Promega)
- ✓ pET-15b (Novagen)

3.1.5. Meios de cultura para crescimento bacteriano

- ✓ LB: 0,5% triptona, 1% extrato de levedura, 0,5% NaCl. *
- ✓ Terrific Broth (TB): 1,2% triptona; 2,4% extrato de leveduras, 0,4% glicerol, 1% de tampão fosfato (0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4). *

* 1,5% de ágar para meio sólido.

3.1.6. Soluções para extração de DNA plasmidial (Mini-prep)

TEG (Solução I) - 50 mM; glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0.

Solução II - 0,2 N NaOH; 1% SDS.

Solução III – 3 M acetato potássio.

3.1.7. Soluções para eletroforese

3.1.7.1. Eletroforese de DNA - gel de agarose

Gel (1%): 1 mg/mL de agarose dissolvida em tampão 45 mM Tris-Acetato (TAE) contendo 1 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) pH 8,0. Os géis foram acrescidos de 0,5 µg/mL Brometo de Etídio, para marcação das bandas de DNA. Para determinar o número de pares de bases presente nas amostras de DNA, usamos marcador de peso molecular de DNA do fabricante fermentas.

3.1.7.2. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE*)

*SDS-PAGE do inglês "sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis"

✓ *Gel de resolução (15 %)*: 2,50 mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida (30:08 %), 1,88 mL de tampão (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 0,57 mL de água MilliQ e 25 µL de solução de SDS 20 %. Os catalisadores da polimerização foram 25 µL de persulfato de amônio (APS) 10 %, e 4 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED).

✓ *Gel de empacotamento (5%)*: 3,84 mL de água; 0,83 mL da solução de acrilamida/bis-acrilamida (30:0,8 %); 0,25 mL de tampão (1,5 M Tris-HCl pH 6,8); 25 µL de SDS 20 %; 50 µL de APS (10 %) e 4 µL de TEMED.

✓ *Tampão de amostra para eletroforese*: 62 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol; 2 % (p/v) SDS; 0,001 % (p/v) azul de bromofenol e 10 % glicerol.

✓ *Tampão de corrida*: Tris-Glicina (25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1 % (p/v)

SDS).

✓ *Corante para SDS-PAGE*: 25 % (v/v) etanol: 10 % (v/v) ácido acético: qs. água e 0,25 % *Comassie Brilliant Blue R* (Bio-Rad).

✓ *Descorante para SDS-PAGE*: 7,5 % ácido acético; 25 % etanol; qs. água.

3.1.8. Tampões usados para as análises de atividade das proteínas em diferentes pHs

Os experimentos para análise da dependência de pH foram realizados com os tampões listados na tabela 4. Todos os tampões foram preparados no dia dos experimentos na concentração final de 10 mM. As proteínas foram incubadas nos respectivos tampões por 15 minutos antes de procedermos com os experimentos.

Tabela 4. - Relação de tampões e respectivos pHs usados nos experimentos de dependência do pH.

Tampão	pH
Acetato de Sódio	4,0-5,6
Citrato de Sódio	5,2-5,8
Cacodilato de Sódio	6,0-7,0
MES-Na	5,5-6,5
Bis-Tris-HCl	6,0
Tris-HCl	7,5 e 8,0
Bis-Tris-Propane-HCl	7,1-9,5
AMPSO-Na	8,6 e 9,0
CAPSO-Na	8,5
CABS-Na	10,0-11,0

3.2. Métodos

3.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As seqüências gênicas foram obtidas nos bancos de dados da *Xylella fastidiosa* (<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf>) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (http://cancer.lbi.ic.unicamp.br/cgi-bin/xanthomonas/citri/gene_editor/edit.pl).

A reação de PCR foi feita utilizando-se 1,25 mM MgCl₂; 0,25 mM dNTP's; 0,75 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,001% Tween 20; 0,5 Unidades *Taq Polymerase* (Fermentas), 10 pmol de cada oligo direto (F) e reverso (R) e 10 ng a 20 ng de DNA genômico da bactéria (Sedido pela Profa. Anete Pereira de Souza (DGE e CBMEG - UNICAMP)). A reação foi realizada em um termociclador *Gene Amp PCR System 9700* - Applied Biosystem.

O programa utilizado foi constituído de 30 ciclos de amplificações em seis etapas:

1^a. Etapa - desnaturação inicial do DNA molde em uma temperatura de 95°C por 5 minutos;

2^a. Etapa – desenovelamento do DNA molde por 1 minuto a 95 °C;

3^a. Etapa – hibridização dos oligonucleotídeos por 1 minuto a 65 °C;

4^a. Etapa – extensão (polimerização) do DNA, em temperatura de 72 °C por 1 minuto;

5^a. Etapa - amplificação do DNA realizado pela repetição dos passos 2 – 4 por 30 vezes;

6^a. Etapa - polimerização final em temperatura de 72°C por 7 minutos.

A última etapa foi o armazenamento da reação à 4°C por um tempo indefinido.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1 % e purificados utilizando o kit QIAquick gel extraction kit da Qiagen (Hilden, Germany) conforme instrução do fabricante.

3.2.2. PCR de colônia

As colônias de bactérias transformadas com vetores recombinantes contendo a seqüência das proteínas de interesse foram inicialmente selecionadas em meio sólido TB contendo o antibiótico e a seguir, confirmados pela técnica de PCR de colônia. Para isso, as colônias de bactérias foram ressuspendidas, uma a uma, em 100 µL de água, e aquecidas a 95°C por 5 min antes de prosseguir com os ciclos de amplificação. A reação foi feita conforme descrito no item anterior.

3.2.3. Eletroforese

3.2.3.1. Eletroforese em géis de Agarose

Após a reação de PCR, os produtos amplificados, foram analisados em géis de agarose. Os géis foram acrescidos de 0,5 µg/mL Brometo de Etídio, para visualização dos fragmentos. Adicionou-se às amostras solução contendo 0,09% Bromophenol Blue, 0,09 Xylene Cyanol FF, 60% Glycerol, 60mM EDTA (Fermentas). O tampão usado para a eletroforese foi o TAE 1X.

O DNA foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1 %. Após a aplicação do DNA no gel, este foi submetido a uma corrente elétrica de 75 mA, por aproximadamente duas horas. A determinação da concentração de DNA foi feita através de medida de absorção a 260 nm em um espectrofotômetro DU 640 (Beckman Coulter), usando uma cubeta de quartzo de um cm de caminho óptico.

3.2.3.2. Eletroforese de proteína (SDS-PAGE)

Alíquotas das frações solúveis dos lisados bacterianos e das frações purificadas em coluna de afinidade a níquel foram analisadas em géis de SDS-PAGE (15 %) de acordo com o método descrito por Laemmli *et al.* (1970).

As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com tampão de amostra para SDS-PAGE e desnaturadas por cinco minutos a 95 °C antes de serem carregadas nos géis. A seguir, as amostras foram aplicadas no gel de empacotamento e as proteínas separadas no gel de resolução. A eletroforese foi

realizada a temperatura ambiente em um aparato *Mini-Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad) a 70 mA por aproximadamente duas horas. A seguir, os géis foram corados em uma solução corante descrita no item 3.1.7.2 e a remoção do excesso de corante foi realizada usando-se uma solução descorante sob agitação leve (item 3.1.7.2) até a visualização nítida das bandas das proteínas. Para estimar o a massa molecular da banda correspondente à proteína induzida, utilizou-se marcador de massa molecular de proteínas conhecidas como padrão.

3.2.4. Extração de DNA plasmideal

A extração do DNA plasmideal foi adaptada do método de lise alcalina (Le Gouill *et al.* 1994). Uma colônia isolada de bactéria foi crescida durante 16 horas (37°C, 200 rpm) em meio TB, contendo antibiótico conforme a marca de resistência do plasmídeo codificador da proteína de interesse. A qual, após crescimento, retirou-se uma alíquota adicionou-se 80% glicerol, para manutenção de estoque a -80°C. O restante das células foi coletado por centrifugação a 4°C. As células foram a seguir solubilizadas em TEG: 50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA e submetidas à lise através da adição de uma solução, recém preparada contendo: 0,2 N NaOH, 1% SDS. A seguir adicionou-se clorofórmio 100% v/v, para solubilização de fosfolipídeos e proteínas hidrofóbicas, agitaram-se os tubos por inversão e incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto. Adicionou-se a solução (3 M potássio e 5 M acetato, pH 5,5), para diminuir o pH e para favorecer a precipitação de proteínas. Recolheu-se então a fase aquosa, a um novo frasco e adicionou-se duas vezes o volume da amostra, de etanol absoluto gelado, para precipitação dos plasmídeos, misturou-se a amostra por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 13000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Após total evaporação do álcool, o DNA plasmideal foi solubilizado em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 e adicionou-se 10 µg/mL RNase (Bovine Pâncreas 81,4 units/mg – USB) para eliminar RNA.

3.2.5. Digestão com Enzimas de restrição

Após a amplificação dos genes, os produtos de amplificação por PCR e os vetores foram digeridos com as endonucleases de restrição específicas para as clonagens (*NdeI* e *XhoI*), de acordo com a metodologia descrita em Sambrook *et al.* (1989).

3.2.6. Ligação

As ligações dos fragmentos de DNA aos vetores de clonagem previamente digeridos e purificados foram realizadas utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Fermentas), de acordo com a metodologia descrita em Ausubel *et al.*, 1995.

Os plasmídeos recombinantes obtidos foram utilizados na transformação de bactérias competentes.

3.2.7. Transformação por Choque térmico - BL21 (DE3) pLysS

O preparo de células competentes foi feito segundo o método do CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 1989).

As bactérias competentes *E. coli DH5 α* ou BL21 (DE3) pLysS foram transformadas com os vetores de expressão pET15b contendo os genes das proteínas-alvo. Adicionamos 30 ng do vetor de expressão contendo o inserto, a 50 μL de células competentes e incubamos em gelo por 30 min. Após este período, a amostra foi aquecida em banho à 42 °C por 2 min e novamente incubada em gelo durante três a cinco min. Adicionou-se 450 μL de meio LB às células e incubou-se à 37 °C por 50 min. Passado este tempo, as células foram plaqueadas em meio TB sólido contendo os antibióticos ampicilina + cloranfenicol para seleção dos clones positivos dos insertos.

3.2.8. Clonagem

Os genes anotados como prováveis prolina iminopeptidases Xf1510 de *Xylella fastidiosa* e Xac2987 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram

amplificados por PCR a partir de DNA genômico purificado usando os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3), que foram desenhados com base na seqüência de cada gene. As extremidades dos oligonucleotídeos continham seqüências reconhecidas por endonucleases de restrição, com a finalidade de produzir seqüências coesivas para uma maior eficiência de clonagem nos vetores de expressão.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T-Easy (Promega) resultando nos plasmídeos pGEM-Xf1510 e pGEM-Xac2987. Os genes foram digeridos do plasmídeo pGEM-Xf1510 e pGEM-Xac2987, com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I e foram subclonados no vetor pET15b (NOVAGEN) resultando nos plasmídeos pET15b-Xf1510 e pET15b-Xac2987. Os produtos de PCR e os plasmídeos foram purificados usando kits da Qiagen conforme instruções do fabricante.

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foi usada para replicação dos plasmídeos recombinantes. O vetor pET15b em fusão é desenhado para expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* em fusão a uma cauda de seis histidinas em sua extremidade amino-terminal para facilitar a purificação das proteínas. Células da linhagem BL21(DE3) pLysS de *E. coli* foram transformadas com os plasmídeos pET15b-Xf1510 e pET15bXac2987 para expressão das proteínas. A seqüência correta dos genes clonados nos vetores foi verificada por seqüenciamento de DNA.

3.2.9. Expressão das proteínas

As células foram crescidas em meio Terrific broth (Sambrook *et al.*, 1989) contendo ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (68 μ g/mL) a 30°C, com agitação constante (200 rpm), por 16 horas. Uma alíquota de 5 mL dessa pré-cultura de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo recombinante pET15b-Xf1510 e pET15b-Xac2987 foi usado para inocular 500 mL do mesmo meio. As células foram então cultivadas nas mesmas condições e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de lactose na concentração final de 10 mM por 16 horas a 30°C sob agitação constante (200 rpm). As células foram coletadas

por centrifugação a 6000 x g a 4°C por 20 minutos. E, a seguir, solubilizadas em 5 mL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl a pH 8,0 contendo 1 % de Triton X-100 (v/v)). A expressão das proteínas foi analisada por gel de eletroforese (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) e a para visualização e análise das mesmas usou-se o corante *Comassie brilliant blue* R-250 (Fairbanks *et al.*, 1971).

3.2.10. Purificação das proteínas

As proteínas fusionadas a uma cauda de seis histidinas foram purificadas pelo método de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), utilizando-se uma coluna *Hi-Trap Chelating* (Amersham Pharmacia Biotech) carregada com níquel (Ni²⁺). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 30 segundos, 40 % amplitude), em um sonicador *Sonics Vibra-cell*. Para precipitação dos ácidos nucleicos, adicionou-se ao lisado 2% de sulfato de estreptomicina (p/v) e incubou-se a 4°C, durante 30 min, sob agitação. O material insolúvel foi eliminado por centrifugação (40000 g por 1 hora a 4°C). O extrato solúvel foi aplicado na coluna pré-equilibrada com tampão A (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol), a coluna foi lavada com tampão A para eliminar a fração não-ligada e para a eluição da proteína e foi feito um gradiente em degraus em diferentes concentrações de imidazol (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM) acrescidos ao tampão A e a proteína Xf1510 e Xac2987 foram eluídas com 200 mM de imidazol. As frações da purificação foram coletadas e analisadas através de géis de SDS-PAGE.

Após a etapa de purificação, as proteínas foram submetidas à diálise para mudança de pH e/ou de concentração de sal/sais nas amostras. A diálise foi conduzida a 4°C e o tampão utilizado continha 10 mM AMPSSO pH 9,0. Após a diálise, a amostra foi concentrada por diálise reversa usando-se PEG 20000 como concentrador.

3.2.11. Determinação da concentração de proteína

A concentração das proteínas foi determinada espectroscopicamente usando-se através da medida da absorção a 280 nm em um equipamento DU 640 (Beckman Coulter), usando uma cubeta de quartzo de um cm de caminho óptico. Para estimativa da concentração das proteínas foi usado o coeficiente de extinção (ϵ) de $1,96 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a proteína Xf1510 e de $1,73 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a proteína Xac2987 calculados com base na composição de aminoácidos das proteínas (Gill & von Hippel, 1989) obtidos pelo programa ProtParam acessível através da interface web (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Os valores de $\epsilon(\lambda)$ calculados foram utilizados na equação de Beer-Lambert para determinar a concentração das proteínas:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Onde: A - leitura da absorbância a 280 nm; ϵ é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); l - caminho óptico em centímetros (cm) e C - concentração em mol/L.

A concentração final de proteína foi calculada a partir do coeficiente de extinção (ϵ).

3.2.12. Atividade enzimática

3.2.12.1. Amino acil *p*-nitroanilida e β -Naftilamida

A atividade enzimática da prolina iminopeptidase Xf1510 e da aminopeptidase Xac2987 foram medidas como descrito previamente por (Yoshimoto *et al.*, 1983; Alonso e Garcia, 1996) usando aminoacil-*p*-nitroanilida (aa-*p*NA) ou aminoacil- β -naftilamida (aa- β NA) como substrato dissolvidos em água ou em dimetil-sulfoxido, de acordo com o requerido. A reação foi constituída de uma solução de proteína na qual o substrato foi adicionado na concentração final de 2 mM. Após 10 minutos, a reação foi parada pela adição de 30% de ácido acético glacial. As reações foram medidas usando-se um espectrofotômetro, no caso do substrato *p*NA ou utilizando-se um fluorímetro quando o aa- β NA era utilizado como substrato (Gasparello-Clemente *et al.*, 2002). Os experimentos da

proteína Xf1510 foram realizados com 0,1 M Bis-Tris-Propane pH 7,5 à 25 °C e da proteína Xac2987 foram realizados com 0,1 M Bis-Tris pH 6,6 à 25 °C. Para controle negativo do teste foram realizadas reações em paralelo, adicionando-se às proteínas a mesma concentração de dimetil sulfóxido utilizada experimentalmente, porém na ausência de substrato.

A absorbância das reações de *p*-nitroanilida foram medidas a 410 nm, e o coeficiente de extinção molar da *p*-nitroanilida usado foi de 8800 M⁻¹ cm⁻¹ (Miyakawa *et al.*, 1991) e a fluorescência do β-naftilamida foi medida a uma excitação de 338 nm e emissão à 405 nm, com largura de banda para a excitação e a emissão de 8 e 16 nm, respectivamente. As medidas de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro (Aminco Bowman series 2 spectrofluorometer). A célula de fluorescência usada (1 x 0,4 cm) foi montada em um banho termostato e todos os dados foram coletados à temperatura constante de 25°C.

3.2.12.2. Especificidade ao substrato

A atividade enzimática foi medida frente a vários aminoácidos *p*-nitroanilida (L-prolina-*p*NA, L-leucina-*p*NA, L-arginina-*p*NA, L-lisina-*p*NA, L-alanina-*p*NA) e β-naftilamida (L-glicina-βNA, L-metionina-βNA, L-fenilalanina-βNA, L-triptofano-βNA, L-tirosina-βNA, L-histidina-βNA). A reação com os substratos *p*NA foi realizada seguindo a reação padrão com os substratos βNA por fluorescência, conforme descrito anteriormente e os substratos *p*NA por absorção.

3.2.12.3. Determinação do pH ótimo e estabilidade frente à variação de pH

A estabilidade de prolina iminopeptidase Xf1510 e da aminopeptidase Xac2987 em relação ao pH foi examinada por incubação da enzima por 15 minutos a 25°C em cada um dos diferentes valores de pH variando de 3 a 11. E após este período de incubação, a reação padrão foi iniciada conforme descrito anteriormente. Para a determinação do pH ótimo da enzima, nas condições aqui descritas, a atividade foi medida a diferentes valores de pH usando tampões

apropriados na concentração final de 0,1 M. Os tampões usados foram apresentados anteriormente em Materiais.

3.2.12.4. Determinação da temperatura ótima e estabilidade

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado a diferentes temperaturas variando de 10 a 65 °C seguindo a reação padrão descrita anteriormente. Às maiores atividades obtidas atribuiu-se o valor de 100%.

A termoestabilidade da enzima foi determinada medindo-se a sua atividade residual após a incubação por 15 minutos em diferentes temperaturas. A atividade obtida a 25 °C foi considerada como 100%.

3.2.12.5. Cinética enzimática

Os parâmetros de cinética foram determinados a partir da reação composta da mistura de 950 µL de tampão Bis-Tris-Propane 0,1 M pH 7,5, 1 µg proteína, o variando-se a concentrações de substrato de 0,5 a 8 mM. A atividade foi medida a 30°C. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro Beckman DU 640 usando uma cubeta de quartzo de um cm de caminho óptico, e foram lidas em 410 nm.

Os valores de K_m e V_{max} da enzima purificada para os diferentes substratos foram determinados pela constante de Michaelis-Menten. Os valores de k_{cat} foram calculados pela equação $V_{max} = k_{cat} \times [E]_t$, onde $[E]_t$ é a concentração total protease na reação.

Com a enzima Xac2987 os parâmetros usados foram os mesmos usados para a Xf1510, porém, como esta enzima catalisa a remoção de resíduos de alanina, prolina, leucina, metionina, glicina do N-terminal de peptídeos, além de histidina, triptofano, tirosina, inclusive arginina, embora com menor especificidade, os parâmetros cinéticos foram medidos com todos estes aminoácidos. Os resultados destes experimentos foram medidos por fluorescência, conforme descrito acima.

3.2.12.6. Efeito de inibidores e íons

Os estudos de inibição da atividade enzimática foram executados usando-se os tampões 10 mM de Bis-Tris-Propane pH 7,5 para a proteína Xf1510 e Bis-Tris pH 6,6 para a proteína Xac2987.

A atividade enzimática frente aos diferentes inibidores e íons foi medida após incubação da enzima com cada um dos inibidores e íons durante 15 minutos. A reação padrão foi iniciada e a atividade medida em espectrofotômetro a 410 nm. Os substratos usados foram prolina-*p*NA para a proteína XF1510 e alanina-*p*-Na para a proteína Xac2987. Foram realizados experimentos controles para eliminar a influência do DMSO nas reações em que este foi usado como solvente.

3.2.13. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro JASCO J-810, com a temperatura controlada através de um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier type control system* PFD 425S, JASCO) e um banho termostato.

Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (190 - 250 nm) foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, a uma concentração de 0,15 mg/mL de proteína e os espectros de UV próximo (250-340 nm) foram obtidos com uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e com 0,5 mg/mL de proteína. A proteína Xf1510 estava armazenada em tampão 10 mM Bis-Tris-Propane pH 7,5 e a proteína Xac2987 em tampão 10 mM Bis-Tris pH 6,6. Foram acumulados 5 curvas consecutivas e a média dos espectros foi armazenada.

Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos pela contribuição do tampão utilizado e as elipticidades observadas foram convertidas em elipticidade molar por resíduo $[\theta]$, de acordo com a equação abaixo, e considerando-se um valor médio do peso molecular do resíduo como sendo de 112 Da para a Xf1510, e de 110 Da para a Xac2987.

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{10 \times d \times c}$$

Onde λ = comprimento de onda em nanômetros; θ_{obs} = a elipticidade medida em graus; MRW = peso médio do resíduo; d = caminho óptico em centímetros; c = concentração da proteína em g/mL (Adler *et al.*, 1973).

A estimativa da quantidade de estrutura secundária presente nas proteínas foi feita a partir dos seus espectros de UV-distante usando-se o programa CDNN Deconvolution (Bohm *et al.*, 1992).

Os programas utilizados para registro e o tratamento dos dados foram Spectra manager (JASCO) e Origin versão 7.0 (Microcal).

3.2.13.1. Estabilidade térmica das proteínas

Os experimentos de estabilidade térmica foram acompanhados pelo monitoramento do sinal de CD em 208 e 222nm. Nestes experimentos, as proteínas foram diluídas para a concentração de 0,2 mg/mL. Os experimentos de desnaturação das proteínas foram realizados na faixa de pH variando de 3,0 a 11,0. Os tampões e respectivos pH usados estão listados na tabela 7. A variação da temperatura foi programada para ocorrer de 10 a 95°C, a velocidade de 1°C/min, regulada por um controlador de temperatura NESLAB RTE Series (NESLAB) acoplado a um sistema do tipo *Peltier*. As medidas de CD foram feitas em espectropolarímetro J-810 (JASCO) com cubetas de 0,1 cm de caminho óptico. Embora o desenovelamento térmico observado para as proteínas Xf1510 e Xac2987 não seja reversível, o que restringe uma análise termodinâmica, os valores de T_m foram estimados e utilizados como um parâmetro inicial de comparação das estabilidades destas proteínas.

3.2.13.2. Desnaturação química e tratamento dos dados

Os perfis de desnaturação química induzidos por cloreto de guanidina (GdnHCl) e uréia, foram monitorados por emissão de fluorescência dos triptofanos. Estes parâmetros foram utilizados para as comparações de estabilidade apresentada pelas duas proteínas Xf1510 e Xac2987.

3.2.14. Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram coletados utilizando-se fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (Slm-Aminco) com temperatura mantida a 25°C mantida através de um banho termostaticado. Para registro dos dados foi utilizado o programa: SLMAB2 (Slm-Aminco) e as figuras foram feitas utilizando-se o programa Origin versão 7.0 (Microcal). Os espectros de fluorescência foram obtidos excitando-se as amostras em comprimento de onda a 280 e 295 nm, utilizando-se fendas de excitação de 8 mm e emissão de 16 mm, no intervalo de 300 a 420 nm. Utilizou-se cubetas de quartzo (1 x 0,4 cm) e 0,1 mg/mL de proteína. O tampão era composto 10 mM AMPPO pH 9,0 e na condição pH 7,0 utilizou-se o tampão 10 mM Bis-Tris pH 7,0. Os espectros de emissão de fluorescência das amostras de proteína foram corrigidos com a subtração dos espectros de emissão dos tampões utilizados ("branco") e os gráficos foram feitos utilizando-se o programa ORIGIN 7,0. Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão foram obtidos analisando-se espectros de emissão de fluorescência.

3.2.15. Tratamento dos dados

A análise dos dados foi feita utilizando os aplicativos Microcal Origin versão 7,0 e o Microsoft Excel para organização e execução das funções utilizadas. A proteína em solução foi aquecida lentamente e as mudanças de sinal, foram observadas, por uma sonda, CD ou fluorescência. Em baixas temperaturas onde a forma predominante é N (nativa), S_N , a elipticidade da molécula nativa, aumenta lenta e linearmente com a temperatura seguindo a seguinte função linear: $S_N = aT + d$. Em temperaturas elevadas, onde D (desenovelada) é predominante, $S_D = cT +$

b. A fração f_{aparente} pode ser calculada de acordo com a seguinte equação (Jelesarov & Lu, 2001):

$$f_{\text{aparente}} = \frac{S - S_N}{S_D - S_N} = \frac{S - (aT + b)}{(cT + d) - (aT + b)}$$

Os cálculos de T_m foram feitos a partir do ajuste da curva f_{aparente} em função da temperatura, com uma função sigmóide no programa Microcal Origin versão 7.0.

3.2.16. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz foram realizados em um equipamento DynaPro-99-E-15 (Protein Solutions). Todas as medidas foram realizadas a 25°C.

Utilizou-se uma concentração de 1 mg/mL de proteína, os tampões usados foram 10 mM Tris-HCl pH 7,5 e em 10 mM AMPPO pH 9,0. Foram realizadas 500 medições, para obtermos uma boa estatística dos resultados. Os dados foram tratados com o programa Dynamics V6 fornecido pelo fabricante do aparelho.

3.2.17. Ensaios Cristalográficos com a proteína Xf1510

Para determinação da estrutura cristalográfica da proteína em estudo, o método utilizado, foi o de matriz esparsa, previamente descrito por Jankarik e Kim (1991) e McPherson (1976).

Os ensaios de cristalização foram feitos utilizando o método de difusão de vapor a 20 °C. Devido à natureza empírica do processo de cristalização, a obtenção de monocristais para estudos estruturais através de difração de raios-X passa pelo teste de diversas soluções com diferentes tampões, agentes precipitantes, sais, entre outros. Os kits comerciais de cristalização utilizados nos ensaios cristalográficos estão listados abaixo.

- ❖ Crystal Screen (Hampton Research)

❖ JBScreen (Jena Bioscience)

A concentração inicial da proteína foi de 10,6 mg/mL em 10 mM Tris-HCl pH 7,5. As gotas foram preparadas misturando-se 1,5 µL da proteína em solução e 1,5 µL da solução do reservatório.



Resultados



4. Resultados

4.1. Caracterização da proteína Xf1510

O gene Xf1510 de *X. fastidiosa* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico. O produto da PCR gerou um fragmento de 936 pb, correspondente ao tamanho do gene. O fragmento advindo da reação de PCR foi clonado em vetor pGEM-T-Easy resultando no plasmídeo pGEM-Xf1510. A seguir, a seqüência do gene Xf1510 foi verificada por seqüenciamento de DNA. O gene foi liberado do plasmídeo por digestão com as endonucleases de restrição *Nde*I e *Xho*I e foi sub-clonado no vetor pET15b, previamente digerido com as mesmas enzimas, resultando no plasmídeo pET15b-Xf1510.

O vetor recombinante, depois de confirmado por PCR de colônia e seqüenciamento de DNA, foi transformado em células de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pLysS. Os clones positivos foram selecionados plaqueando-se as células em meio de cultura contendo ampicilina (marca da seleção do plasmídeo pET15b-Xf1510) e cloranfenicol (marca de seleção do pLysS).

4.1.1. Expressão e purificação da proteína Xf1510

A proteína solúvel têm uma massa molecular aparente de 37 kDa, que corresponde com a massa molecular calculada da Xf1510 mais a cauda de histidina fusionada na extremidade amino-terminal. A proteína foi expressa em *E. coli* em grandes quantidades na fração solúvel. Após purificação por IMAC cerca de 50 mg de enzima purificada foi obtida de um litro de cultura. A proteína apresentou grande pureza superior a 95 %, como pode ser visualizado no gel de SDS-PAGE (Figura 5).

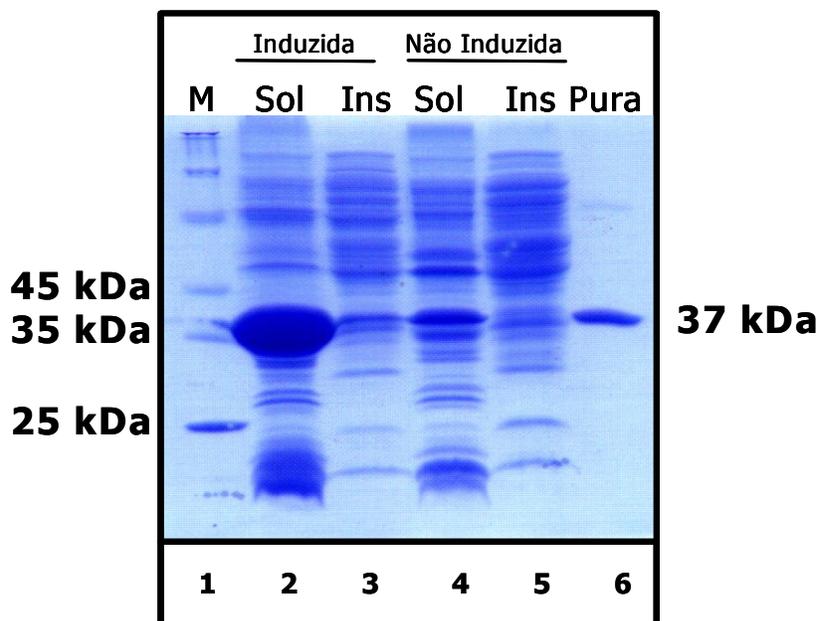


Figura 5. - SDS-PAGE 15 % para análise da expressão e da purificação da proteína recombinante Xf1510 em *E. coli*. 1.- Marcador de peso molecular; 2.- Fração solúvel das células carregando o vetor pET15b-Xf1510 após indução com lactose; 3.- Fração insolúvel de células carregando o vetor pET15b-Xf1510 após indução com lactose; 4.- Fração solúvel de células carregando o vetor pET15b-Xf1510 antes da indução com lactose; 5.- Fração insolúvel carregando o vetor pET15b-Xf1510 antes da indução com lactose; 6.- Proteína purificada, eluída da coluna de afinidade a Ni com 200 mM de imidazol. A massa molecular de 37 kDa foi calculada a partir da seqüência de aminoácidos da proteína.

4.1.2. Atividade enzimática

4.1.2.1. Especificidade ao substrato

A tabela 5 mostra a caracterização da especificidade ao substrato da Xf1510. A proteína é capaz de agir sobre substratos sintéticos, removendo aminoácidos da extremidade N-terminal. A melhor atividade foi obtida com L-Pro- ρ NA e L-Ala- ρ NA, mas enzima foi capaz também de remover L-Gly- ρ NA e mostrou atividade residual com L-Ser- ρ NA, L-Ile- ρ NA e L-Met- ρ NA. A enzima não apresentou atividade significativa em relação aos demais aminoácidos na condição experimental utilizada em nossos experimentos.

Tabela 5. - Especificidade ao substrato da proteína Xf1510.

<i>Substrato</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>
L-prolina- <i>p</i> NA/ β NA	100
L-alanina- <i>p</i> NA	121
L-glicina- <i>p</i> NA	30,2
L-serina- β NA	4,4
L- isoleucina- β NA	4,4
L-metionina- <i>p</i> NA	2,1
L-triptofano- β NA	0,3
L-tirosina- β NA	0,2
L-lisina- <i>p</i> NA	0,0
L-leucina- <i>p</i> NA	0,0
L-arginina- <i>p</i> NA	0,0
L-valina- <i>p</i> NA	0,0
L-fenilalanina- <i>p</i> NA*	0,0

* A solubilidade de L-fenilalanina-*p*NA é menor que 7,7 mM. A atividade da Xf1510 foi medida com a fenilalanina em suspensão (Byun *et al.*, 2001).

4.1.2.2. Cinética enzimática da proteína Xf1510

Os parâmetros cinéticos da enzima Xf1510 foram determinados usando substratos sintéticos *p*-nitroanilida (*p*-NA), derivados dos amino ácidos prolina e alanina. Estes parâmetros são mostrados na tabela 6. O valor da K_m foi 2,6 mM para L-Pro-*p*NA e 8,0 para L-Ala-*p*NA. Os valores de k_{cat} foram 6,3 s⁻¹ e 15,7 s⁻¹ para L-Pro-*p*NA e L-Ala-*p*NA, respectivamente. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da enzima em relação a estes dois substratos foi muito similar: 2,4 e 2,0 s⁻¹ para L-Pro-*p*NA e L-Ala-*p*NA, respectivamente. Estes dados indicam que embora a Xf1510

apresente um valor de K_m maior em relação à alanina, este efeito é compensado por um maior valor da constante catalítica e, dessa forma, a enzima catalisa ambos os substratos com a mesma eficiência.

Tabela 6. - Parâmetros cinéticos para hidrólise de L-prolina e L-alanina-*p*-nitroanilida pela proteína Xf1510.

Substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
L-prolina- <i>p</i> -nitroanilida	2,6 ± 0,5	6,3	2,4
L-alanina- <i>p</i> -nitroanilida	8,0 ± 0,2	15,7	2,0

4.1.2.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática da proteína Xf1510

A figura 6 (linha preta) representa o efeito da temperatura na atividade da Xf1510. A enzima é mais ativa em temperaturas entre 40 e 50 °C decrescendo rapidamente acima destas temperaturas, não mostrando nenhuma atividade acima de 65 °C.

4.1.2.4. Efeito da temperatura na estabilidade da proteína Xf1510

A termoestabilidade da enzima foi determinada medindo a sua atividade residual após incubação da mesma em diferentes temperaturas por 15 minutos (Figura 6 – linha vermelha). A seguir a reação foi realizada conforme descrito anteriormente. A enzima manteve-se estável até 40 °C, mas perdeu estabilidade a temperaturas maiores que 45 °C. A atividade obtida a 25 °C foi considerada como 100%.

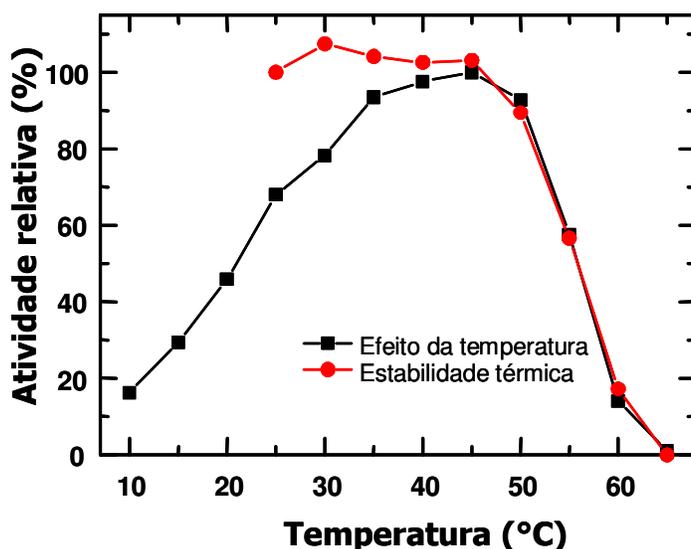


Figura 6. - Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade da proteína Xf1510. O efeito da temperatura na atividade da enzima (linha preta) foi determinado a diferentes temperaturas variando de 10 a 65 °C seguindo a reação padrão descrita em materiais e métodos. As maiores atividades obtidas foram a 100%. A termoestabilidade da enzima (linha vermelha) foi determinada medindo a sua atividade residual após a incubação por 15 minutos em diferentes temperaturas. A atividade obtida a 25 °C foi considerada como 100%.

4.1.2.5. Efeito do pH na atividade enzimática da proteína Xf1510

O pH ótimo da enzima foi encontrado entre pH 7,5 e 8,0 usando L-Pro-pNA (Figura 7). Nenhuma atividade foi detectada abaixo de pH 5,0 ou acima de pH 9,5. O procedimento de purificação foi realizado a pH 7,5 e quando a proteína foi submetida à diálise para eliminar o imidazol e o NaCl presente nos tampões de purificação a proteína tendia a precipitar. A única maneira de mantermos a proteína em solução para continuar a diálise foi manter a proteína em pH 9,0 sem nenhuma concentração de sal. A proteína foi mantida em solução a este pH e quando diluída em pH ótimo a proteína manteve-se ativa.

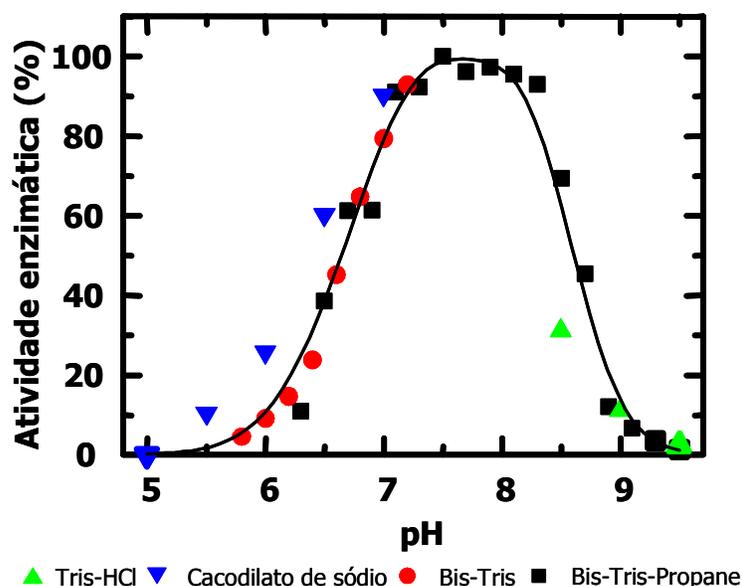


Figura 7. - Efeito do pH na atividade enzimática da proteína Xf1510. A atividade foi medida usando prolina-p-nitroanilida como substrato. A maior atividade obtida foi considerada como 100 %. Os tampões usados: Tris-HCl, Cacodilato de sódio bis-tris e bis-Tris-propane.

4.1.2.6. Efeito de inibidores de proteases na atividade enzimática da proteína Xf1510

O efeito de inibidores na atividade da PIP Xf1510 é mostrado na tabela 7. A atividade enzimática foi bruscamente reduzida por inibidores de serino-peptidases (PMSF e banzamidina). A presença de agentes quelantes de metais (EDTA, EGTA), que são inibidores de metalopeptidases, não teve efeito significativo na atividade da enzima, mostrando que sua atividade não depende da presença de metais e nem de grupos SH. Já a adição de agente redutor como DTT não teve efeito nem mesmo em uma concentração de 10 mM, porém β -mercaptoetanol mostrou uma pequena inibição.

A sensibilidade da PIP Xf1510 para os inibidores de serino-proteases confirma o esperado, de acordo com a tríade catalítica formada por um aspártico, uma serina e uma histidina, cuja distribuição entre as famílias de serino-proteases tem sido bastante relatada na literatura (Kitazono *et al.*, 1994).

Tabela 7. - Efeito de inibidores de proteases na atividade enzimática da proteína Xf1510.

<i>Inibidores</i>	<i>Concentração Final</i>	<i>Atividade residual (%)</i>
Controle		100
PMSF	0,5 mM	65,5
	1,0 mM	48,7
	10 mM	0,0
Benzamidina	0,5 mM	68,9
	1,0 mM	3,7
EDTA	10 mM	95,8
EGTA	10 mM	98,6
DTT	10 mM	99,2
β -Mercaptoetanol	10 mM	83,3

Abreviações: PMSF = Fluoreto de fenil metil sulfonil
 EDTA = Etileno diamino tetraacetato
 EGTA = Etileno glicol tetraacetato

4.1.2.7. Efeito de íons na atividade enzimática da Xf1510

Metais pesados inibem a atividade enzimática da Xf1510 (tabela 8). Níquel não inibiu a atividade da enzima em baixa concentração, 1 mM, porém é capaz de inibir a enzima em concentrações de 10 mM. A concentração de 0,5 mM de Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} e Hg^{2+} foi suficiente para inibir quase que completamente a atividade enzimática. Segundo Kazan *et al.* (2005) a adição de CaCl_2 ocorre interferência na atividade da serino-protease de *Bacillus clausii* GMBAE 42 (Kazan *et al.*, 2005), porém na PIP de *X. fastidiosa* isto não ocorreu porém esta interferência do cálcio não causou nenhum efeito na Xf1510.

Tabela 8. - Efeito de íons na atividade enzimática da Xf1510.

<i>Íons</i>	<i>Concentração final</i>	<i>Atividade residual (%)</i>
Controle		100
NaCl ₂	10 mM	95,0
Na ₂ SO ₄	10 mM	95,1
MgCl ₂	10 mM	102
MgSO ₄	10 mM	102
CaCl ₂	10 mM	108
NiSO ₄	1 mM	105
	10 mM	2,9
ZnSO ₄	0,5 mM	5,0
CuCl ₂	0,5 mM	0,0
CoCl ₂	0,5 mM	3,8
CdCl ₂	0,5 mM	3,8
FeCl ₃	0,5 mM	4,6
HgCl ₂	0,5 mM	0,0

4.1.3. Dicroísmo circular

A figura 8 mostra o espectro de CD da Xf1510. O espectro de CD da Xf1510 na região de UV distante (Figura 8A), apresenta dois mínimos, um a 208 nm e outro em 222 nm, e um máximo relativo à 195 nm, característicos de proteínas cuja estrutura secundária é predominantemente formada por α -hélice (Woody, 1994; Kelly e Price, 1997).

Na região do UV-próximo (figura 8B) a Xf1510 apresenta dois mínimos relativos, o primeiro mínimo por volta de 294 nm e o segundo por volta de 287,5 nm, separados por um máximo a 290,5 nm; a comprimentos de onda abaixo de

280 nm esta proteína apresenta algumas estruturas finas, comuns de tirosinas e fenilalaninas presentes na proteína (Woody, 1994).

O conteúdo de estrutura secundária da Xf1510 estimado a partir dos espectros de UV-distante, usando o programa CDNN (Bohm *et al.*, 1992) foi de 30,8 % de α -hélices, 19,6% folhas β (antiparalela + paralela), 17,2% alças, e 35,3% estrutura desordenada.

O espectro de CD UV distante da proteína Xf1510 (Figura 8A) é comum a proteínas que possuem estrutura secundária predominantemente formada por α -hélice similar a outras prolina iminopeptidases caracterizadas previamente, o que poderia incluí-la na família das α/β hidrolases.

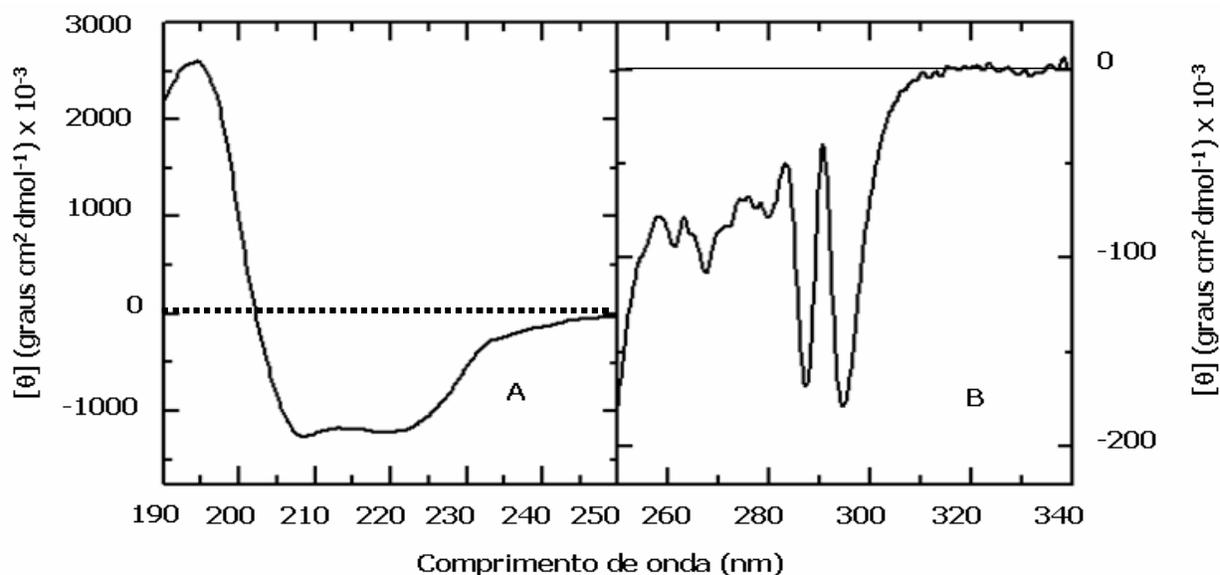


Figura 8. - Espectro de Dicroísmo circular da proteína Xf1510. A - UV distante. A proteína foi diluída a concentração de 0,2 mg/mL em 10 mM Bis-Tris-Propane pH 7,5. B- UV-próximo. No espectro de UV-próximo a proteína foi concentrada a 1mg/mL em 10 mM Bis-Tris-Propano pH 7,5.

4.1.4. Alinhamento de seqüência da proteína Xf1510

Após o seqüenciamento completo do genoma da *X. fastidiosa*, um gene foi anotado como provável prolina iminopeptidase, o gene Xf1510. O alinhamento de seqüência da Xf1510 com duas prolina iminopeptidases cujas estruturas tridimensionais já foram depositadas nos banco de dados, está representado na figura 9. A Xf1510 apresenta 81% de identidade e 91% de similaridade com a PIP de *Xantomonas* e com a PIP de *Serratia* apresenta 56% de identidade e 71% de similaridade. Esta proteína apresenta em seu sítio ativo a tríade catalítica conservada como nas outras duas prolina iminopeptidases, composta por uma serina, uma histidina e um aspártico (em destaque na figura 9). Além disso, estas enzimas apresentam uma cisteína (cisteína 261) próxima ao aspártico da tríade catalítica, o que pode ser uma possível explicação para o efeito de alguns íons na atividade da enzima, e além disso, inicialmente acreditava-se que estas proteínas fossem na verdade cisteíno-aminopeptidases e não serino-aminopeptidases. Porém, com estudos de mutação sítio-dirigido, retirando-se esta cisteína a proteína manteve a atividade e foi inibida por inibidores de serino-proteases.

4.1.5. Predição da estrutura secundária da proteína Xf1510

A predição da estrutura secundária da Xf1510, baseada na sua seqüência de aminoácidos, realizado com o programa PSIPRED (McGuffin *et al.*, 1999), mostrou que esta proteína possui predominância de estrutura em alfa-hélice e um padrão de estrutura secundária característico ao grupo de proteínas pertencente à família das α/β hidrolases. A figura 10 mostra as representações da predição de estrutura secundária da Xf1510 em comparação com a PIP de *X. campestris* que já foi resolvida (Medrano *et al.*, 1998), mostrando claramente que estas duas proteínas são extremamente semelhantes apresentam o mesmo padrão de enovelamento.

<i>X_fastidiosa</i>	1	- - -	MRTLYPEVTPFEHGILCVDDNHRLYYEQCGNPHGKPVVILHGGPGSGCNDKMRRFHDPDKYRI
<i>X_axonopodis</i>	1	- - -	MRTLYPEITPYQQGSLKVDDRHTLYFEQCGNPHGKPVVMLHGGPGGGCNDKMRRFHDPDKYRI
<i>S_marcescens</i>	1	MEQLRG	LYPPLAAYDSGLDTGDGHR IYWELSGNPNGKPAVFIHGGPGGGISPHHRQLFDPERYKV
<i>X_fastidiosa</i>	64	VLFDQRGAGRSTPHANL	TNNTTWDLVADIEKLRVALGITRWQVFGGSSWGSTLALAYAQTHPEQTTE
<i>X_axonopodis</i>	64	VLFDQRGSGRSTPHADL	VDNTTWDLVADIERLRTHLGVDRWQVFGGSSWGSTLALAYAQTHPQQVTE
<i>S_marcescens</i>	67	LLFDQRGCGRSRPHASL	DNNTTWHLVADIERLREMGVEQWL VFGGSSWGSTLALAYAQTHPERVSE
<i>X_fastidiosa</i>	130	LVLRGIFMLRRWEL	EFYQEGASHLFPDAWDRIAVIPPVERHDLISAFHRRLTSEDEATRLAAAI
<i>X_axonopodis</i>	130	LVLRGIFLLRRFEL	EFYQEGASRLFPDAWEHYLNAIPPVERADLMSAFHRRLTSDDEATRLAAAI
<i>S_marcescens</i>	133	MVLRGIFTLRKQRL	HWYYQDGASRFEPKWERVLSILSDDERKDVIAAYRQRLTSA DPQVQLEAAI
<i>X_fastidiosa</i>	196	AWSLWEGATSCLYMDQDF	IASHENPHFALAFARIENHYFVNGGFFEVENQLLRDAQRIANIPGVIV
<i>X_axonopodis</i>	196	AWSVWEGATSF	LHVDEDFVTGHEDAHFALAFARIENHYFVNGGFFEVEDQLLRDAHRIADIPGVIV
<i>S_marcescens</i>	199	LWSVWEGETVTLLPSRES	ASFGED-DFALAFARIENHYFTHLGFLESDDQLLRNVPLIRHIPAVIV
<i>X_fastidiosa</i>	262	HGRYD	VCPLQNAWDLHKVWPKASLKITPGASHSAFEPQNI DALVCATDSFV - -
<i>X_axonopodis</i>	262	HGRYD	VCPLQSAWDLHKAWPKAQLQISPASHS AFEPENVDALVRATDGFA - -
<i>S_marcescens</i>	264	HGRYD	HACQVQNAWDLAKAWPEAELHIVEGASHSYDEPGILHQLMIATDRFAGK

Figura 9. - Alinhamento de seqüência da Xf1510 com duas prolina iminopeptidases. Alinhamento de seqüência da Xf1510 com duas proteínas que também pertencem ao grupo de prolina iminopeptidases e cujas estruturas cristalográficas já foram publicadas. *Xylella fastidiosa* (Xf1510), *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Medrano et al., 1998), *Serratia marcescens* (Yoshimoto et al., 1999). Em destaque a tríade catalítica composta por uma histidina, uma serina e um aspático. <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>

4.1.6. Efeito do pH na estrutura secundária da Xf1510

Os espectros representados na figura 11 mostram claramente a mudança de conformação sofrida pela proteína conforme a variação do pH, havendo uma região crítica na qual o pH interfere na conformação da proteína. Para facilitar a visualização da transição colocamos três espectros representando pHs onde a proteína é estável e pHs onde a proteína sofre alterações em sua estrutura (Figura 11). Em pH 4,0 e 9,0 o espectro da proteína é muito semelhante, sendo o sinal de CD mais intenso a pH 9,0, nos mínimos. Já o máximo a 195 nm é mais intenso em pH 4,0. A proteína nestes pHs apresenta dois mínimos um deles a 208 nm e outro a 222 nm, e o máximo a 195 nm bem definidos. Já em pH 6,0 a proteína sofre alterações em sua conformação, e o sinal de CD na altura do mínimo a 208 nm vai sendo deslocado, enquanto que o outro mínimo a 222 nm não apresenta uma alteração tão visível quanto a perda que observamos à 208 nm. Já o sinal máximo a 195 nm, apesar de não ter sido deslocado, não apresenta um sinal tão acentuado como observado nos pH 4,0 e 9,0. A proteína sofre uma alteração em sua conformação estrutural na faixa de pH que vai de 5,0 a 8,0 e para evidenciar esta mudança conformacional, fizemos a razão entre os dois mínimos 222 nm/208 nm (Figura 12). Esta sensibilidade da proteína a estes pHs explica a dificuldade que tínhamos em manter a proteína em solução após a purificação. Nós purificamos a proteína a pH 7,5 e a seguir fazíamos também a diálise no mesmo pH, porém a proteína precipitava, ainda que com a adição de cloreto de sódio ou agentes redutores, como DTT. A partir dos resultados destes experimentos mudamos o pH da diálise para pH 9,0 uma vez que neste pH foi possível manter a proteína estável em solução.

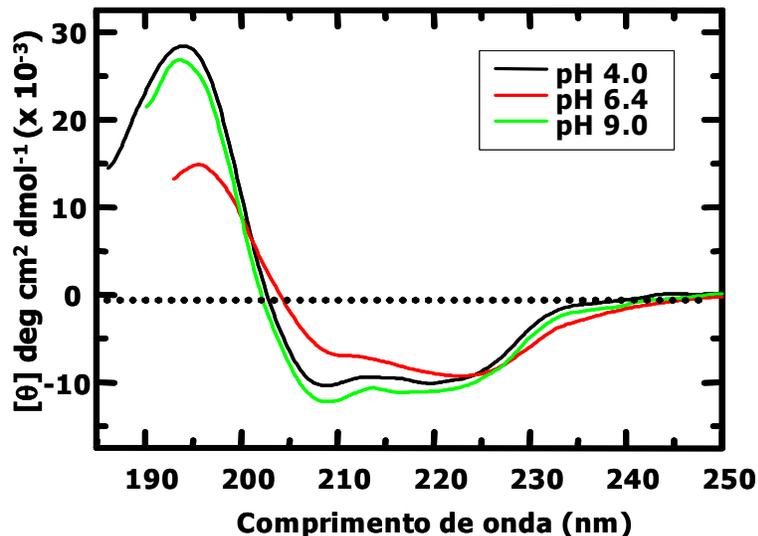


Figura 11. - Efeito do pH na estrutura secundária da proteína Xf1510. Espectros de CD UV-distante da proteína nos pH 4,0; 4,4 e 9,0.

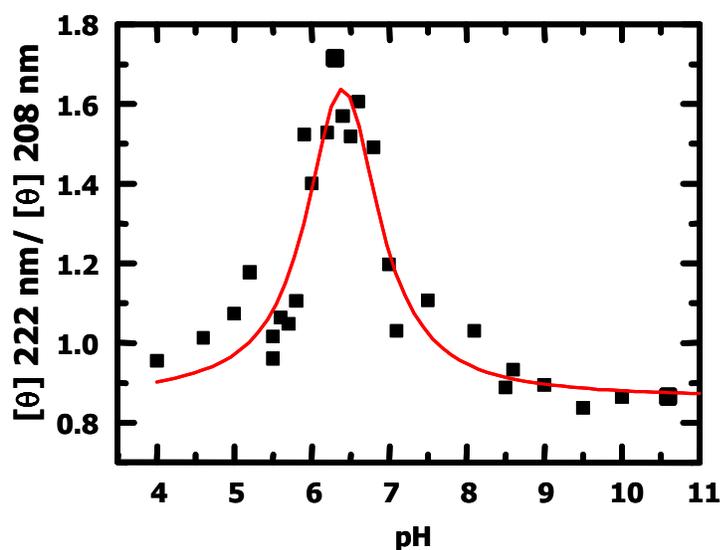


Figura 12. - Efeito do pH sobre o sinal de CD da proteína Xf1510. Os espectros de CD foram realizados a 208 e 222 nm variando o pH na faixa de 4 a 11.

Os dados de CD UV distante foram analisados pelo programa CDNN em todos os pHs (Figura 13). A proteína na faixa de pH de 5,0 a 8,0 apresenta em seu conteúdo maior predominância de estrutura desordenada, o conteúdo de α -hélice

é menor e o conteúdo de folhas β aparece em maior proporção, quando comparado ao conteúdo encontrado nos pHs fora desta faixa. Tanto abaixo quanto acima desta faixa, a proteína apresenta maior conteúdo de estrutura em α -hélice. Porém, o conteúdo de estrutura em folha β difere, sendo que abaixo do pH 5,0 a proporção é menor em relação ao conteúdo desta conformação em pHs superiores a pH 8,0.

Esta proteína tem grande conteúdo de α -hélices e um modelo de elementos de estrutura secundária muito similar ao de aminopeptidases pertencentes à família das α/β hidrolases o que pode nos indicar que esta proteína seja parte desta família.

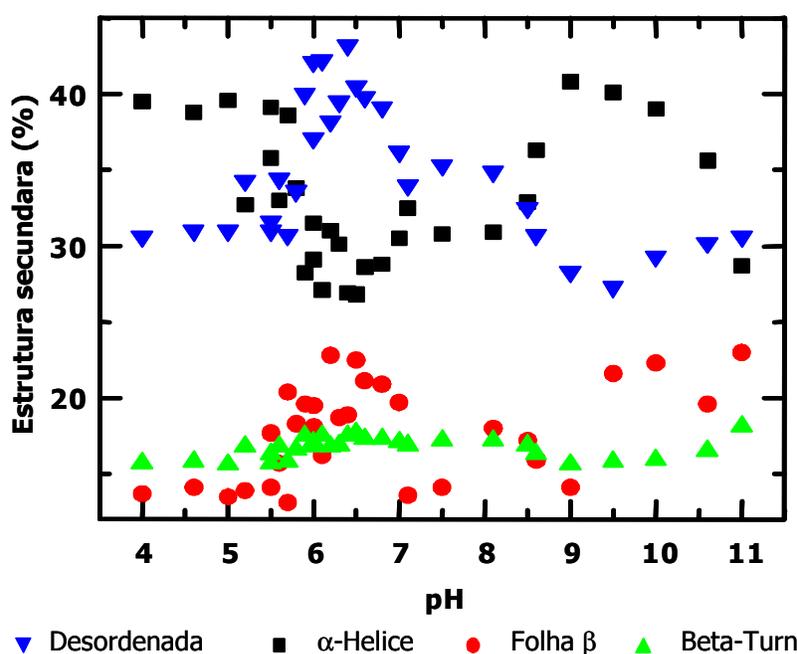


Figura 13. - Estrutura secundária da proteína Xf1510 frente à variação de pH.

4.1.7. Desnaturação térmica

Os experimentos de desnaturação térmica da enzima Xf1510 foram realizados de 10 à 80°C, acompanhados por dicroísmo circular em tampão Bis-tris-propano nos pH 7,1; 7,5; 8,1; 8,5 (Figura 14).

A análise do perfil dos espectros de desnaturação térmica nos pH 7,1 e 7,5 mostram que a proteína Xf1510 perde parte da estrutura secundária, e a partir de 50°C, a proteína agrega e em seguida precipita (Figura 14). Ao final destes experimentos foi observado forte precipitado na cubeta. Em pH 8,0 (Figura 14), verificamos que houve uma perda gradativa da estrutura, a proteína agregou, porém não encontramos precipitação como encontrado nos pH 7,1 e 7,5. Já em pH 8,5, na mesma figura, a proteína manteve-se estável, perdendo parte da estrutura secundária a partir de temperaturas elevadas, mas não foi observado precipitação da proteína. Estes dados nos mostraram que diferença no pH afeta a estrutura da proteína.

De maneira análoga ao efeito do pH observado sobre a conformação da proteína, também existe um efeito semelhante do pH sobre a desnaturação térmica. Na figura 15 representamos um perfil típico do desenovelamento da proteína Xf1510 em pH 9,5 onde a proteína é mais estável e não precipita ao final do experimento. Abaixo de pH 5,0 e acima de 8,0 a proteína desenovela e permanece em solução, mas não podemos afirmar que esta proteína apresenta apenas dois estados. Os cálculos da temperatura de fusão foram feitos usando-se o programa Origin, através do ajuste de uma curva sigmoidal. A Xf1510 é bastante sensível em temperaturas superiores a 55 °C, a proteína precipita pelo efeito da temperatura, e quando associado ao efeito do pH, na faixa de 5,0 a 8,0 principalmente a desnaturação foi realizada até 55 °C.

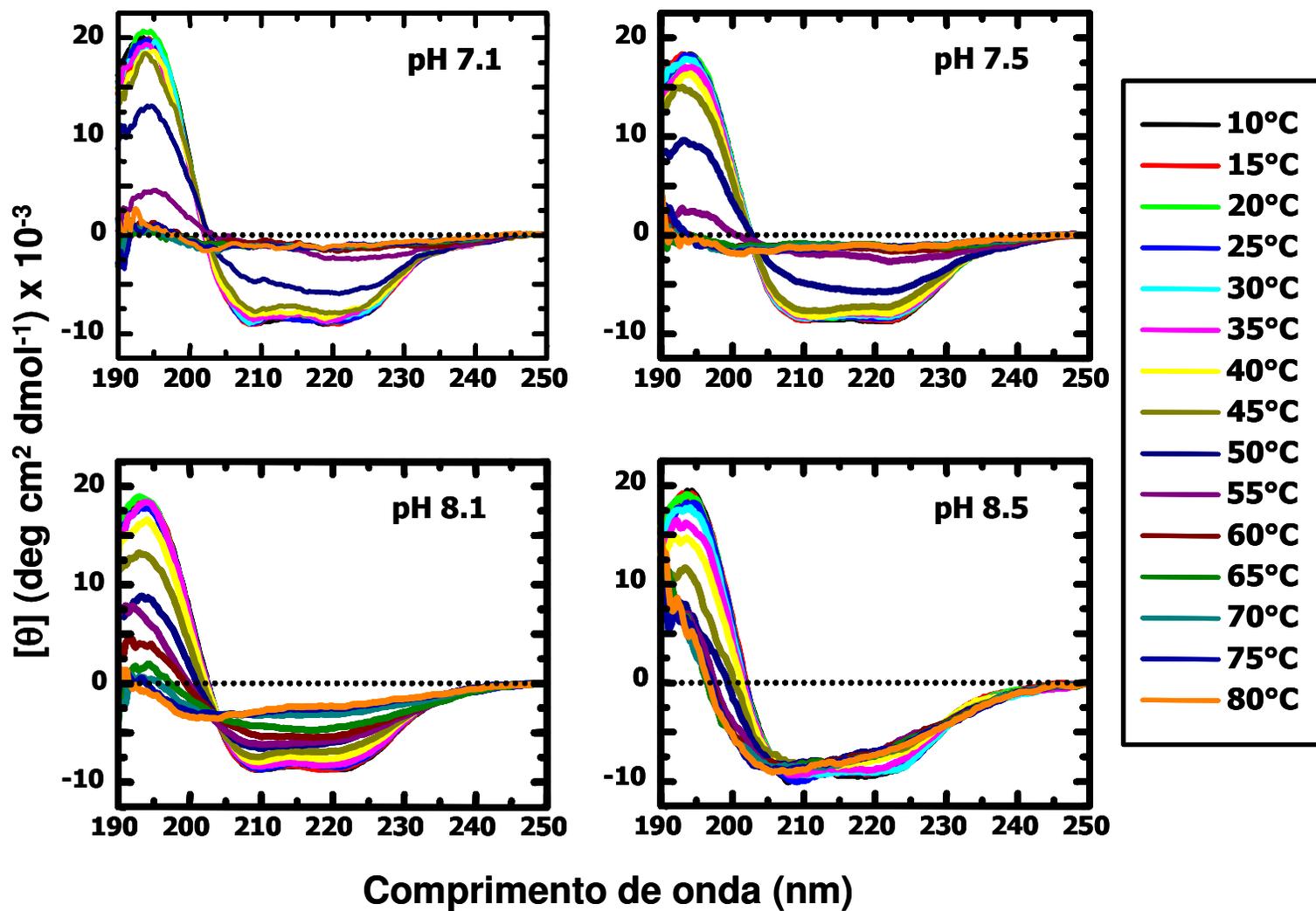


Figura 14. - Espectros de desnaturação térmica da proteína Xf1510 acompanhada por CD. A proteína foi diluída a uma concentração final de 0,2 mg/mL nos diferentes pHs e a seguir a desnaturação foi iniciada varando a temperatura de 10 a 95 °C, em intervalos de 5 °C. Os espectros de CD representam a média de 4 acumulações em cada temperatura nos pHs 7,1; 7,5; 8,1 e 8,5.

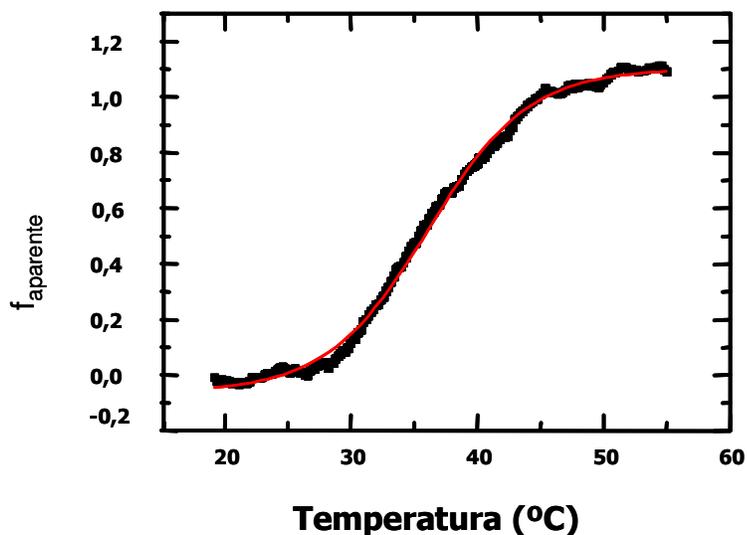


Figura 15. - Desnaturalização térmica da proteína Xf1510. Desnaturalização térmica acompanhada por CD em tampão CABS pH 10,6.

Tabela 9. – Estabilidade térmica da proteína Xf15107 em diferentes pHs e suas respectivas temperaturas de fusão.

<i>Tampão (pH)</i>	<i>T_m (°C)</i>
Acetato de Sódio pH 4,0	50,1 ± 0,1
Acetato de Sódio pH 4,6	32,6 ± 0,1
Citrato de Sódio pH 5,0	61,1 ± 0,1
Bis-Tris-Propane pH 8,1	64,2 ± 0,1
Bis-Tris-Propane pH 8,5	44,5 ± 0,3
AMPSO pH 9,0	35,0 ± 0,1
AMPSO pH 9,5	36,1 ± 0,1
CABS pH 10,0	40,1 ± 0,1
CABS pH 10,6	28,9 ± 0,1

4.1.8. Desnaturação Química

4.1.8.1. Desnaturação química da Xf1510 induzida por GdnHCl em pH 7,0

A figura 16 representa as curvas de desnaturação química induzida por GdnHCl em pH 7,0 com excitação no comprimento de onda de 295 nm e acompanhado por fluorescência. A estrutura primária da Xf1510 possui 10 resíduos de triptofanos e analisou-se os espectros de emissão de fluorescência do ensaio de desnaturação química induzida por guanidina em pH 7,0 em dois diferentes comprimentos de onda de excitação: 280 e 295 nm. Como o perfil dos espectros não apresentou diferenças, apenas os dados de excitação a 295 nm são mostrados e discutidos. A presença de guanidina induz mudanças na conformação da enzima, que precipita imediatamente em baixas concentrações de GdnHCl (0,3 – 2,1 M) reduzindo bruscamente a intensidade de fluorescência, não detectada em 350 nm (figura 16B). Acima de 2,4 M as intensidades de fluorescência aumentam para 3,4 (U.A.), ocorrendo maior exposição dos triptofanos, e a seguir tem uma queda na intensidade e por volta de 5 M de guanidina (2,4 U.A.) a proteína esta totalmente desenovelada. Acompanhando o gráfico onde colocamos os comprimentos de onda no máximo de emissão da proteína Xf1510 nas diferentes concentrações de guanidina (figura 16A), vemos que os dados obtidos confirmam a ação da guanidina na estrutura da Xf1510, ocorrendo logo no início (região onde ocorreu a precipitação mostrada na figura 16B) uma alteração que pode ser efeito da guanidina no ambiente da rede de água do bolsão de solvatação, que afeta tanto a estrutura da proteína que a maior parte da proteína em solução precipita. Esta alteração conformacional pode nos indicar também que existe uma transição nesta região. A partir de 2 M parece existir outra mudança conformacional onde a proteína desnatura gradativamente até a atingir o máximo por volta de 350 nm onde os triptofanos estão completamente expostos ao solvente.

Estes experimentos mostram que a proteína Xf1510 é bastante sensível ao desnaturante guanidina e, além disso, vemos que esta proteína possivelmente apresenta mais de dois estados, ou seja, deve haver intermediários na via de desenovelamento, o que dificulta o tratamento dos dados, sendo necessário o uso de técnicas mais refinadas para acompanharmos estas mudanças na conformação da proteína.

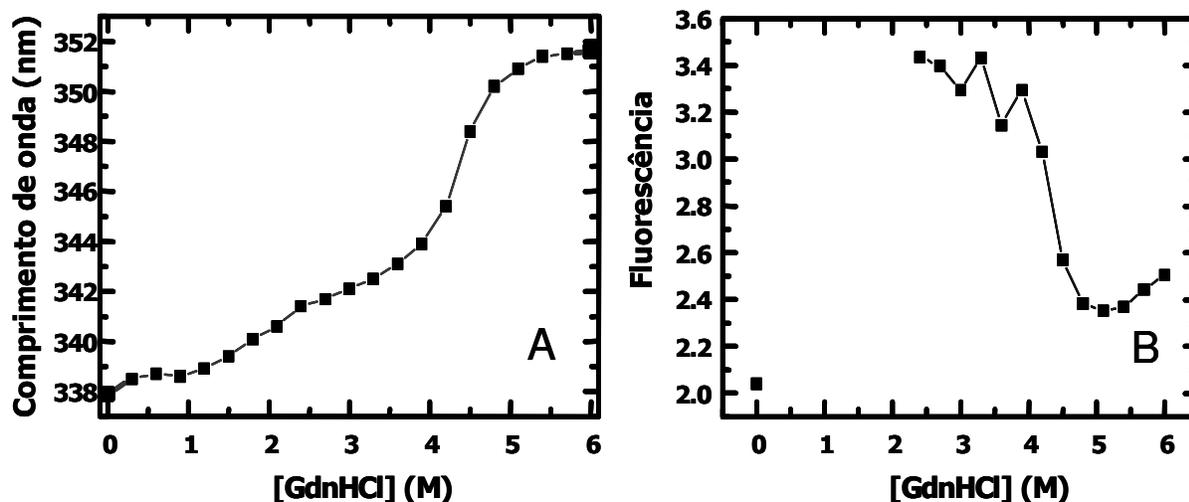


Figura 16. - Desnaturação química da proteína Xf1510 com GdnHCl em pH 7,0 a 25 °C medidos por fluorescência com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xf1510 em diferentes concentrações de GdnHCl; B) Intensidade de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para facilitar a interpretação dos gráficos.

4.1.8.2. Desnaturação química da proteína Xf1510 com uréia em pH 7,0

A figura 17 representa os experimentos de desnaturação química da Xf1510 usando como agente desnaturante uréia em pH 7,0. Os experimentos foram acompanhados por fluorescência, com excitação a 295 nm. Em presença de uréia, a proteína Xf1510 não precipitou, efeito ocorrido nos experimentos realizados na desnaturação química com o desnaturante guanidina. A concentração de uréia necessária para causar o mesmo efeito que a guanidina na estrutura da Xf1510 foi aproximadamente duas vezes maior (figura 17A). Na concentração de 4 M de uréia, podemos visualizar uma possível transição por volta em 341 nm, que

acreditamos que coincida com o encontrado no desenovelamento induzido por guanidina, porém, na concentração de 2 M. A proteína Xf1510 não foi totalmente desnaturada nem mesmo com 8M de uréia, pois seu máximo de fluorescência nesta concentração foi de 345 nm, enquanto que em guanidina 6 M foi de 352 nm (Figura 17A).

Estes dados demonstram novamente que a proteína Xf1510 provavelmente apresenta mais de dois estados, ou seja, devem existir estados intermediários entre a proteína nativa e desenovelada.

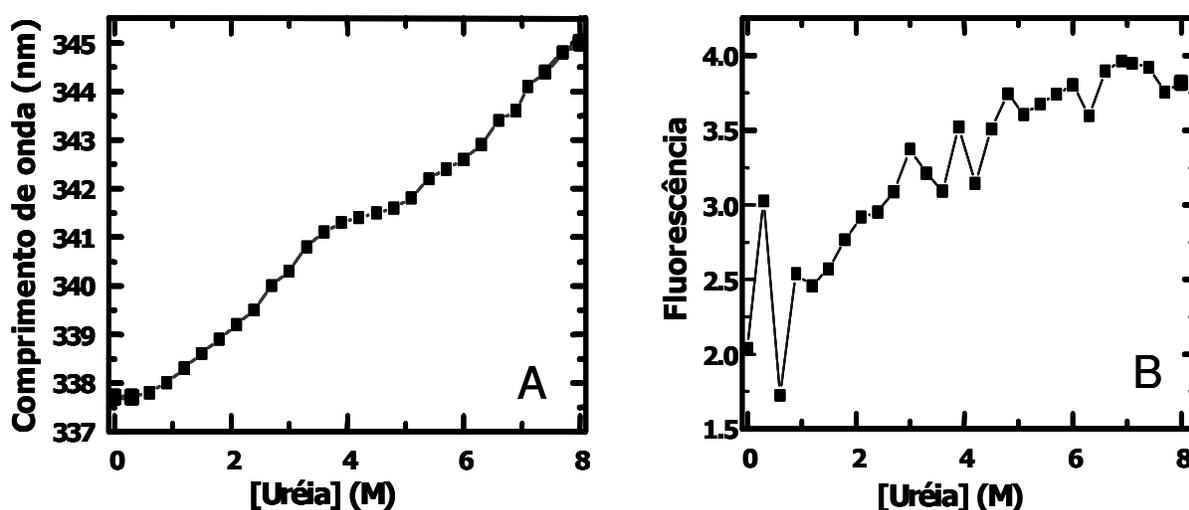


Figura 17. - Desnaturação química da proteína Xf1510 com uréia em pH 7,0 acompanhada por fluorescência a 25 °C com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xf1510 em diferentes concentrações de Uréia; B) Intensidade de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para facilitar a interpretação dos gráficos.

4.1.9. Desnaturação química da Xf1510 induzida por GdnHCl em pH 9,0

A figura 18 representa a desnaturação química induzida por guanidina em pH 9,0 uma vez que a proteína apresentou-se mais estável neste pH. Os resultados obtidos foram similares aos correspondentes em pH 7,0. A proteína iniciou seu desenovelamento em 1 M de guanidina e sofreu sua segunda transição a partir de 4 M de guanidina (Figura 18A).

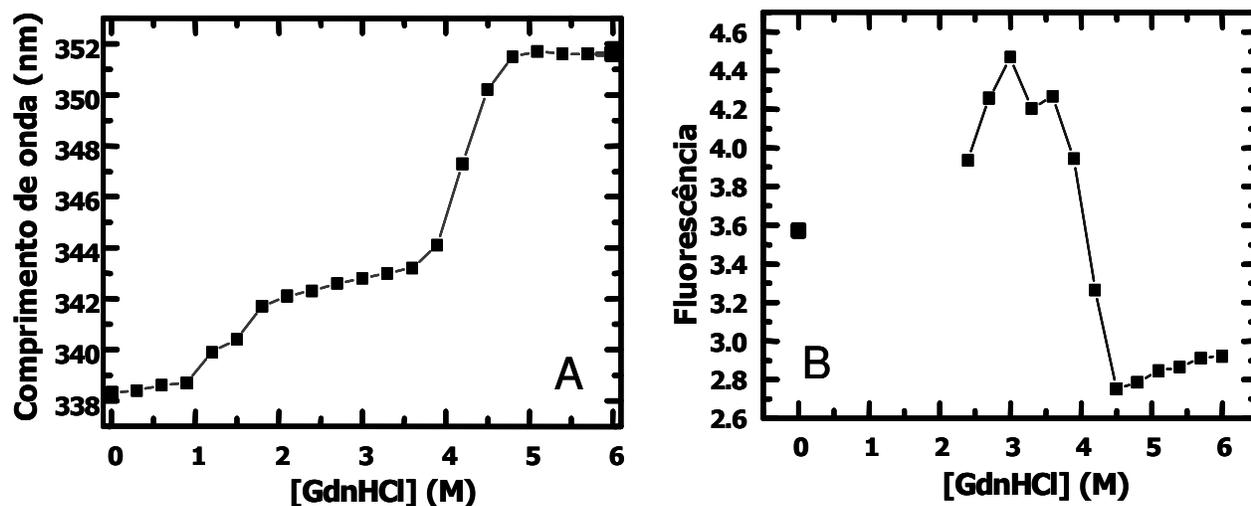


Figura 18. - Desnaturação química da proteína Xf1510 com GdnHCl em pH 9,0 medida por fluorescência com excitação a 295nm a 25 °C. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xf1510 em diferentes concentrações de GdnHCl; B) Intensidade de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para facilitar a interpretação dos gráficos.

Os experimentos de desnaturação química com uréia em pH 9,0 (Figura 19) também foram semelhantes aos experimentos em pH 7,0 (Figura 17). Mesmo em 8 M de uréia, a proteína não foi totalmente desenovelada. Em ambos pHs a segunda transição parece iniciar a partir de 7 M de uréia.

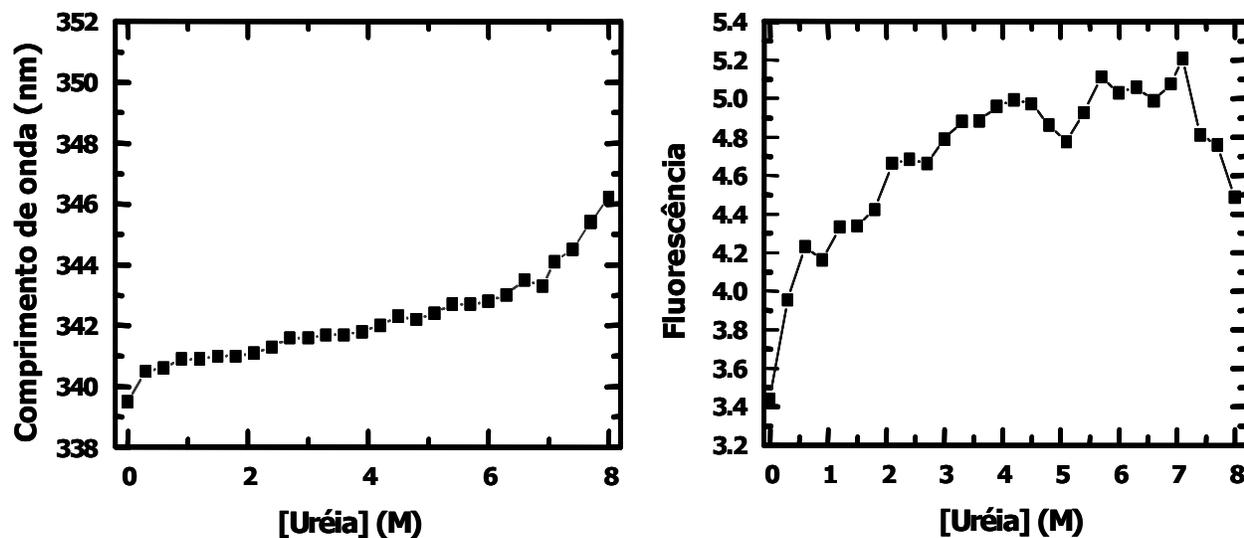


Figura 19. - Desnaturação química da proteína Xf1510 com uréia em pH 9,0 medida por fluorescência a 25 °C com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xf1510 em diferentes concentrações de Uréia. B) Intensidades de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para facilitar a interpretação dos gráficos.

4.1.10. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A massa molecular da Xf1510 em solução foi determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em dois pHs (7,0 e 9,0). Os valores obtidos para o raio de giro hidrodinâmico foi de 3,8 nm em ambos os pH, e este valor corresponde a massa molecular de 78 kDa. Esta massa molecular está de acordo com a existência de dímeros em solução; a massa molecular calculada para o monômero a partir da seqüência de aminoácidos é de 37,9 kDa (Figura 20).

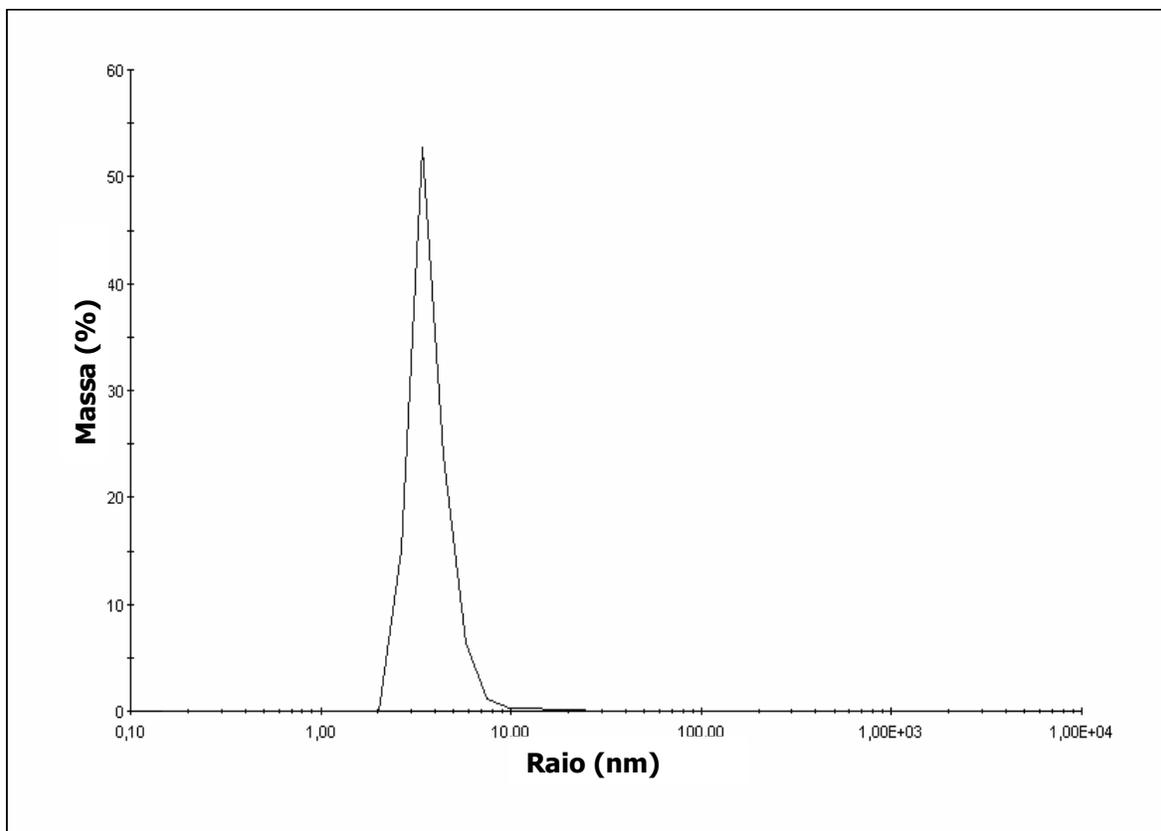


Figura 20. - Espalhamento dinâmico de luz da proteína Xf1510.

4.1.11. Ensaio de cristalização

Obtivemos pequenos cristais da pip XF1510 utilizando o método de difusão de vapor à 20 °C (Figura 21). Os cristais foram obtidos em diferentes condições citadas na tabela 10, contendo polietilenoglicol (PEG), HEPES pH 7,5; MPD, Acetado de magnésio, sulfato de amônia, citrato de sódio, iso-propanol, Na HEPES, reagentes usados como agentes precipitantes. Como haviam muitos cristais e muito pequenos, fizemos um refinamento de uma das condições que obtivemos cristais listadas na tabela 10. A partir da condição de 10 % PEG 6000; 0,1M HEPES pH 7,5; 5 % MPD, variamos a concentração de PEG 6000 de 2 a 10 %; de tampão HEPES do pH 6 a 7,5 e de MPD variando-se a concentração de 0 a 5%. Ao final dos experimentos de refinamento obtivemos formação de cristais sem faces definidas, e ainda permaneceram pequenos não atingindo tamanho necessário

para experimentos de difração. Ainda assim, selecionamos alguns de maior dimensão e levamos a linha de cristalografia do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron para experimentos de difração de raios-X, porém os cristais não difrataram.

Tabela 10. - Condições de cristalização nas quais obtivemos cristais da proteína XF1510.

0 % PEG 6000; 0,1M HEPES pH 7,5; 5 % MPD;
30 % PEG 400; 0,1M Na MES pH 6,5; 0,1 M acetato de sódio;
20 % PEG 3000; 0,1 M HEPES pH 7.5, 0,2 M acetato de sódio;
12 % PEG 4000, 0,1 M Na HEPES pH 7,5; 0,1 M acetato de sódio;
10 % PEG 4000; 5 % Iso-Propanol; 0,1 M Na HEPES pH 7,5;
20 % PEG 4000; 5 % Iso-Propanol; 0,1 M citrato de sódio;
10 % PEG 8000; 0,1 M Na HEPES pH 7,5; 0,2 M acetato de cálcio;
10 % PEG 8000; 0,05 M acetato de magnésio; 0,1 M acetato de sódio;
10 % PEG 8000; 0,2 M Mg acetato de magnésio;
10 % PEG 8000; 10 % etilenoglicol; 0,1 M Na HEPES pH 7,5;
15 % PEG 8000; 0,05 M sulfato de amônia; 0,1 M citrato de sódio;
1,0 M sulfato de amônia; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5.

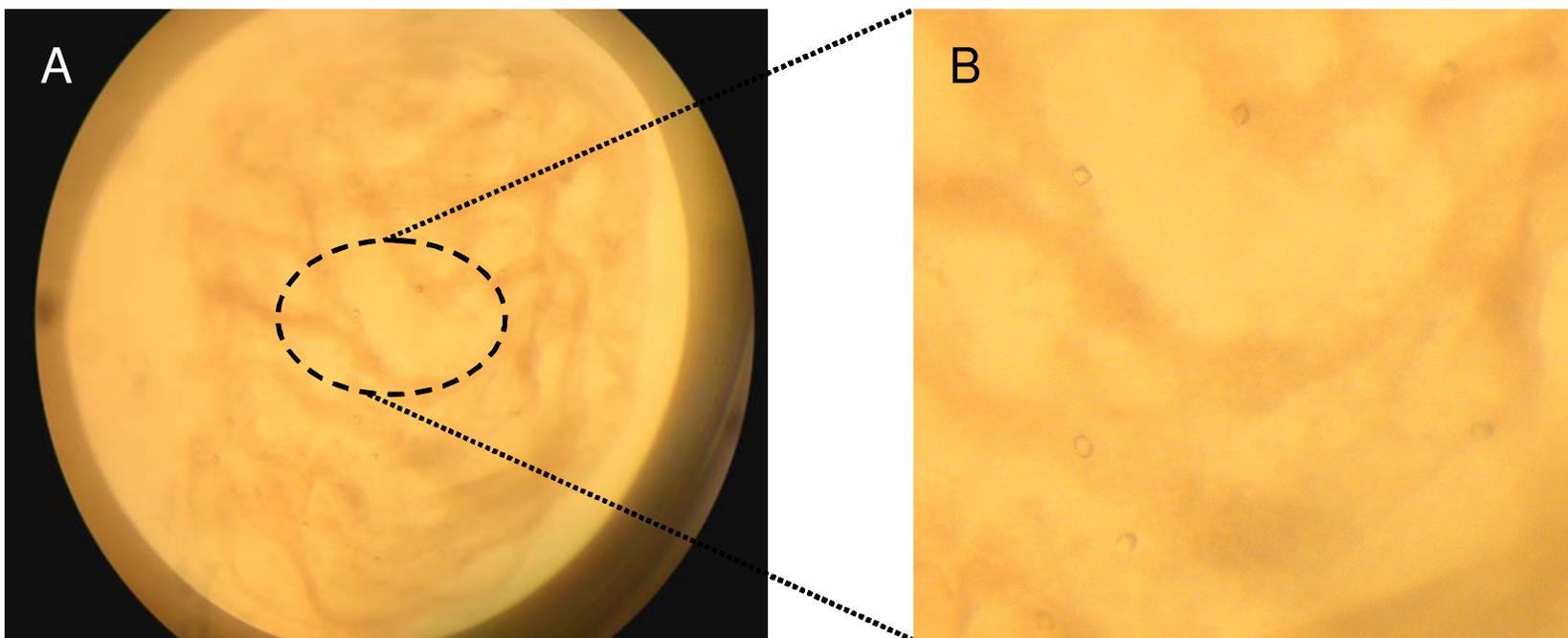


Figura 21. - Cristais de XF1510 de *X. fastidiosa*. Os cristais foram obtidos em diferentes condições contendo agentes precipitantes, porém não apresentavam dimensões adequadas aos experimentos de difração. A: foto retirada de uma gota contendo vários cristais da proteína Xf1510; B: Detalhe dos cristais.

4.2. Caracterização da proteína Xac2987

4.2.1. Clonagem

O gene *Xac2987* de *X. axonopodis* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico usando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na seqüência do gene. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para gerar produtos com uma seqüência extra coesiva com o vetor (seqüência sublinhada) para eficiência na clonagem e purificação. Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T-Easy (Promega) resultando no plasmídeo pGEM-Xac2987. O gene foi digerido do plasmídeos pGEM-Xac2987 com as endonucleases *Nde*I e *Xho*I e clonado no vetor pET15b resultando no plasmídeo pET15b-Xac2987. Diferentes temperaturas e diversas linhagens de *E. coli* foram testadas para transformação e expressão da proteína, porém obtivemos melhores resultados com a linhagem pLysS. A confirmação da presença do inserto foi realizada por PCR de colônia, e os clones positivos confirmados por digestão e eletroforese em gel de agarose. A seguir, a expressão dos clones que continham a proteína foi induzida com 10 mM de lactose, em 1 litro do mesmo meio de cultura.

4.2.2. Purificação da proteína Xac2987

Para a purificação da proteína *Xac2987*, utilizamos os mesmos protocolos usados para a *Xf1510*. A eluição foi feita por gradientes em degrau com concentrações crescentes de imidazol. A proteína foi eluída em uma concentração de 150 mM de Imidazol. Após a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), as frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE. A enzima purificada migra como uma única banda com tamanho de 36 kDa, valor esperado quando somado a cauda de seis histidinas (Figura 22).

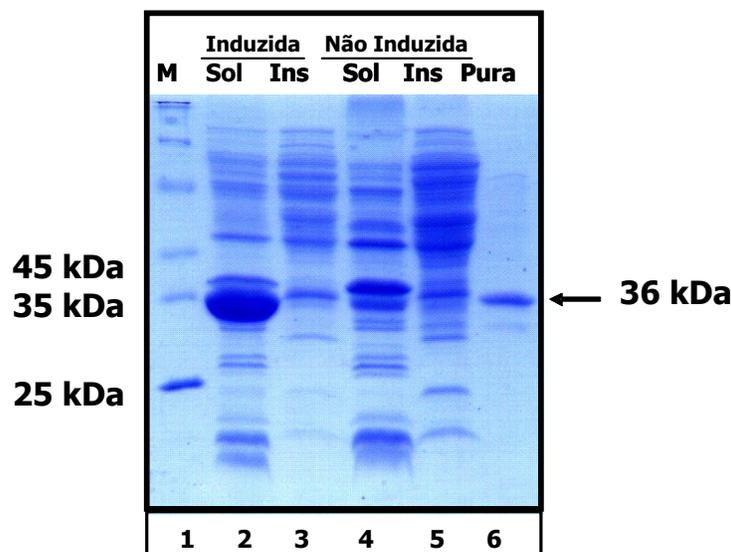


Figura 22. - SDS-PAGE 15 % - Expressão da proteína recombinante Xac2987 em *E. coli*. 1.- Marcador de peso molecular; 2.- Fração solúvel das células carregando o vetor pET15b- Xac2987 após indução com lactose; 3.- Fração insolúvel de células carregando o vetor pET15b-Xac2987 após indução com lactose; 4.- Fração solúvel de células carregando o vetor pET15b-Xac2987 antes da indução com lactose; 5.- Fração insolúvel carregando o vetor pET15b-Xac2987 antes da indução com lactose; 6.- Proteína purificada, eluída da coluna com 150 mM de imidazol. A massa molecular de 36 kDa foi calculada a partir da seqüência de aminoácidos da proteína.

4.2.3. Atividade enzimática

4.2.3.1. Especificidade ao substrato da proteína Xac2987

A especificidade ao substrato na atividade catalítica da enzima Xac2987 foi medida com vários substratos sintéticos aminoacil *p*-nitroanilida e β -naftilamida, para a remoção de aminoácidos da extremidade N-terminal, conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados da especificidade ao substrato da Xac2987 estão na tabela 11. A melhor atividade da Xac2987 foi obtida na hidrólise de prolina, seguida por serina, glicina e alanina com atividade superior a 50%. Esta enzima é capaz também de hidrolisar histidina, tirosina, triptofano, lisina e metionina com atividade entre 10 e 50 %. Além disso, a enzima mostrou atividade residual, menor que 10 %, com leucina, valina, fenilalanina e arginina.

Tabela 11. - Especificidade ao substrato da proteína Xac2987.

Substrato	Atividade Relativa (%)
L-prolina- <i>p</i> NA / L-prolina- β NA	100
L-serina- β NA	64,1
L-Glicina- <i>p</i> NA	58,5
L-alanina- <i>p</i> NA	55,4
L-histidina- β NA	31,6
L-tirosina- β NA	30,3
L-triptofano- β NA	15,6
L-lisina- <i>p</i> NA	13,0
L-metionina- <i>p</i> NA	11,5
L-leucina- <i>p</i> NA	8,2
L-valina- <i>p</i> NA	5,3
L-isoleucina- β NA	4,6
L-fenilalanina- <i>p</i> NA *	1,1
L-arginina- <i>p</i> NA	0,05

* A solubilidade de L-fenilalanina-*p*NA é menor que 7,7 mM. A atividade da Xf1510 foi medida com a fenilalanina em suspensão (Byun *et al.*, 2001).

4.2.3.2. Efeito do pH na atividade enzimática da proteína Xac2987

O efeito do pH na atividade de Xac2987 foi medido em diferentes tampões com diferentes valores de pH, variando de pH 4 a 11 (Tabela 4). L-alanina-*p*NA foi usado como substrato (Figura 23). A enzima atinge o máximo de atividade entre pH 5,5 a 7,5 sendo o pH ótimo encontrado igual a 6,6 e neste pH prosseguimos todos os experimentos de atividade enzimática.

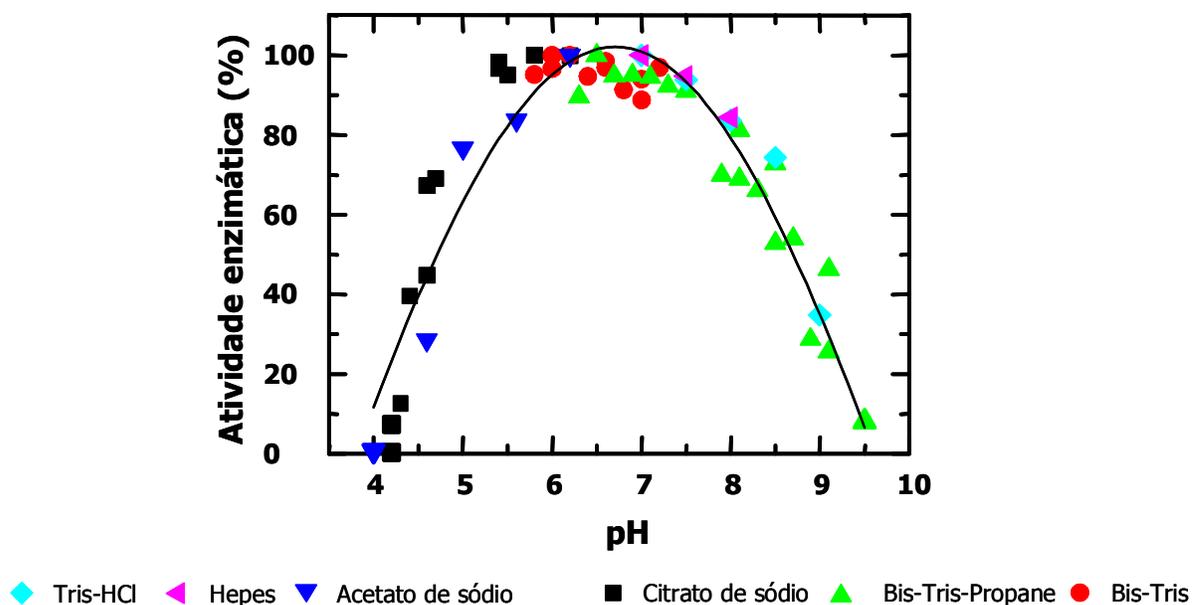


Figura 23. - Efeito do pH na atividade enzimática da proteína Xac2987. A enzima foi incubada 15 minutos nos diferentes pHs e a seguir a reação foi realizada à 25°C, usando L-alanina-*p*-nitroanilida como substrato. As maiores atividades obtidas foram consideradas como 100%.

4.2.3.3. Temperatura ótima da atividade enzimática da proteína Xac2987

A temperatura na qual a enzima atingiu o máximo de atividade foi no intervalo de 25 a 35 °C na hidrólise de L-alanina-*p*-NA, em um experimento abrangendo uma variação de temperatura de 20° a 65°C, linha preta (Figura 24, linha preta).

4.2.3.4. Efeito da temperatura na estabilidade da proteína Xac2987

O efeito da temperatura na estabilidade da proteína Xac2987 esta representado na figura 24 (linha vermelha). A enzima apresenta-se bastante estável e com atividade superior a 80% até atingir a atividade máxima na temperatura ótima. A partir de 35°C a atividade decresce bruscamente. Em temperaturas acima de 50°C a enzima não apresenta atividade.

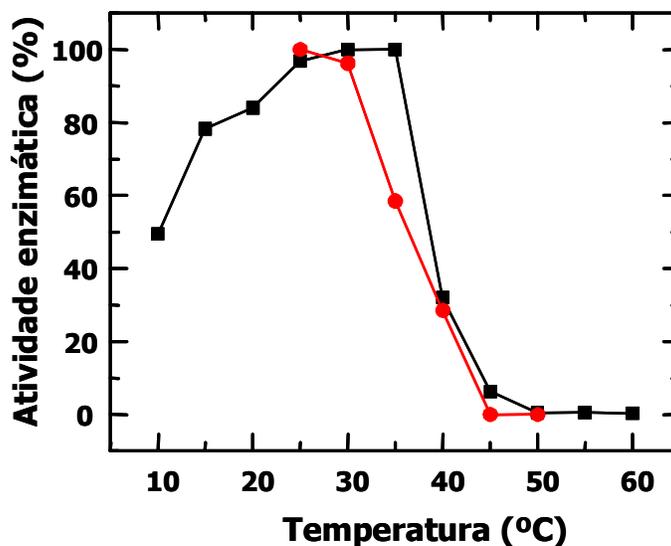


Figura 24. - Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade da proteína Xac2987. O efeito da temperatura na atividade enzimática da Xac2987 (linha preta) foi determinado a diferentes temperaturas de variando de 10 a 65 °C, seguindo a reação padrão. As maiores atividades foram consideradas como 100%. A estabilidade térmica da enzima (linha vermelha) foi determinada após incubação por 15 minutos a cada temperatura. A atividade obtida a 25°C foi considerada como 100 %. O substrato usado foi L-alanina-*p*NA.

4.2.3.5. Cinética enzimática da proteína Xac2987

Os parâmetros cinéticos para hidrólise dos diferentes substratos *p*-NA e β -naftilamida da proteína Xac2987 estão listados nas tabelas 12 e 13, respectivamente. Os maiores valores de K_m da Xac2987 foram obtidos com L-alanina-*p*-NA, L-prolina-*p*-NA e L-glicina-*p*-NA. A K_m de L-Pro-*p*-NA foi de 115 μM e a enzima foi capaz de hidrolisar 335 L-Pro-*p*-NA por segundo. Usando L-Ala-*p*-NA como substrato, a velocidade foi de 155 seg^{-1} , aproximadamente duas vezes menor do que para a L-Pro-*p*-NA. Porém a constante catalítica da Xac2987 para a L-Ala-*p*-NA foi maior que para a L-Pro-*p*-NA (tabela 12), indicando que a Xac2987 hidrolisa com maior eficiência L-Ala-*p*-NA do que L-Pro-*p*-NA e L-Gly-*p*-NA. Já os valores das constantes enzimáticas da Xac2987 para os substratos β -naftilamida (tabela 13) foram menores do que aqueles apresentados para os substratos *p*-NA. A maior constante catalítica mostrada pela enzima frente a estes substratos foi da ordem de 0,60 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ com L-prolina- β NA. Porém não é possível uma comparação entre estes dados, pois foram usados métodos diferentes para os cálculos dos

parâmetros cinéticos. E como os parâmetros cinéticos para p -NA são medido por absorção e os parâmetros β -NA são medidos por fluorescência não podemos comparar os resultados para afirmar se a proteína apresenta maior ou menor eficiência na catalise destes substratos. Unicamente podemos verificar que a eficiência catalítica da Xac2987 é maior com L-prolina- p NA ($2,91 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) quando comparada com o valor obtido com L-prolina- β NA ($0,60 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). O que pode sugerir que a Xac2987 seja mais eficiente na catálise de substratos p NA.

Tabela 12. - Parâmetros cinéticos para hidrólise diferentes substratos p -NA pela proteína Xac2987.

Substrato	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_m(\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
L-prolina- p NA	115 ± 11	335	2,91
L-glicina- p NA	158 ± 12	170	1,08
L-alanina- p NA	$49,0 \pm 0,6$	155	3,17
L-metionina- p NA	247 ± 19	27,8	0,11
L-fenilalanina- p NA	$25,2 \pm 1,6$	18,8	0,75
L-lisina- p NA	233 ± 16	13,4	0,06
L-valina- p NA	$14,0 \pm 1,9$	11,7	0,87
L-leucina- p NA	$8,2 \pm 0,8$	9,5	1,16
L-arginina- p NA	207 ± 32	0,085	0,0004

Tabela 13. - Parâmetros cinéticos para hidrólise de substratos β NA pela proteína Xac2987.

Substrato	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (μ M $^{-1}$ s $^{-1}$)
L-prolina- β NA	4,48 \pm 0,67	2,78	0,60
L-serina- β NA	9,49 \pm 1,42	0,57	0,06
L-isoleucina- β NA	0,32 \pm 0,05	0,20	0,60
L-triptofano- β NA	7,27 \pm 1,83	0,62	0,08
L-tirosina- β NA	16,24 \pm 2,20	0,91	0,05
L-histidina- β NA	5,70 \pm 0,97	0,97	0,17

4.2.3.6. Efeito de inibidores de proteases na atividade enzimática da proteína Xac2987

O efeito dos inibidores de proteases na atividade da Xac2987 foi testado por incubação de cada composto químico com a enzima a pH 6,6 por 15 minutos antes de iniciar a reação. O efeito de inibidores na atividade da Xac2987 é mostrado na tabela 14. A proteína é inibida por PMSF e benzamidina que são inibidores de serino-protease. A presença de quelantes de metal como EDTA e EGTA não alteram a atividade enzimática indicando que esta proteína não é uma metaloprotease. DTT e β -mercaptoetanol também não alteram a atividade da enzima. Estes resultados incluem a Xac2987 no grupo das serino-proteases, o que também já era esperado baseado na conservação da tríade catalítica na seqüência da proteína.

Tabela 14. – Efeito da ação de inibidores de proteases na atividade enzimática da proteína Xac2987.

<i>Inibidor</i>	<i>Concentração final</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>
Controle		100
PMSF	0,5 mM	56,1
	1,0 mM	39,3
	10 mM	33,5
Benzamidine	0,5 mM	54,6
	1,0 mM	3,3
EDTA	10 mM	111
EGTA	10 mM	115
DTT	10 mM	103
β -mercaptoetanol	10 mM	94,2

Abreviações: PMSF = Fluoreto de fenil metil sulfonil
 EDTA = Etileno diamino tetraacetato
 EGTA = Etileno glicol tetraacetato

4.2.3.7. Efeito de íons na atividade enzimática da proteína Xac2987

O efeito de íons na atividade enzimática da proteína Xac2987 é mostrado na tabela 15. A proteína não sofre alteração na atividade em presença íons como NaCl_2 , NaSO_4 , MgCl_2 , MgSO_4 e CaCl_2 . Em contrapartida, 0,1 mM de HgCl_2 já é suficiente para inibir drasticamente a enzima. Outros compostos em pequenas concentrações também inibem a atividade da enzima, como por exemplo: 0,5 mM CdCl_2 e 0,5 mM CuCl_2 . A adição de 0,5 mM ZnCl_2 faz com que a atividade seja reduzida para 36%. Compostos adicionados em concentrações maiores (10 mM) como FeCl_3 , CoCl_2 e NiSO_4 inibem a proteína 74%; 2% e 28% respectivamente. A presença de metais pesados inibe a atividade da Xac2987, mostrando que esta enzima não é uma proteína metal dependente.

Tabela 15. – Efeito de metais na atividade enzimática da proteína Xac2987.

Íon	Concentração final	Atividade relativa (%)
Controle		100
NaCl ₂	10 mM	95,0
Na ₂ SO ₄	10 mM	95,1
MgCl ₂	0,5 mM	102
MgSO ₄	0,5 mM	102
CaCl ₂	0,5 mM	108
NiSO ₄	1 mM	94
	10 mM	28
ZnSO ₄	0,5 mM	36
CuCl ₂	0,5 mM	3
CoCl ₂	0,5 mM	91
	10 mM	2
CdCl ₂	0,5 mM	1
FeCl ₃	0,5 mM	98
	10 mM	74
HgCl ₂	0,1 mM	0

4.2.4. Dicroísmo circular

4.2.4.1. Dicroísmo Circular (CD) da proteína Xac2987

O espectro de CD (UV distante), figura 25 A, apresenta sinal característico de proteína com presença de mistura de α -hélices e folhas β , com dois mínimos,

um por volta 209 e um ombro a 216 nm e um máximo por volta de 192 nm, incluindo a proteína Xac2987 também na família das proteínas α/β hidrolases.

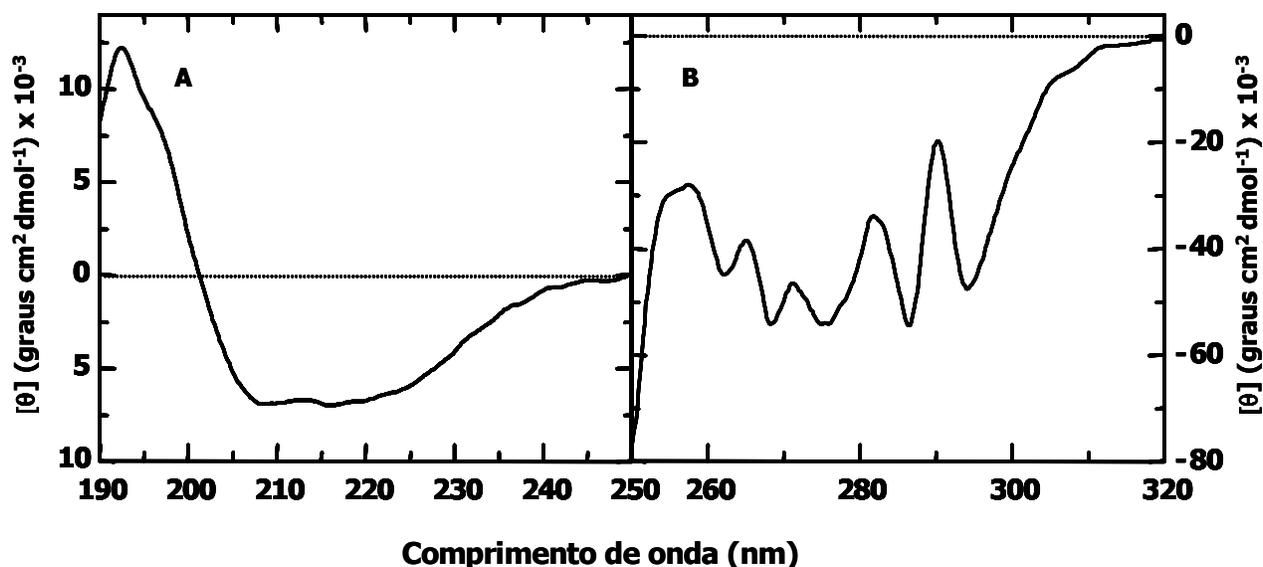


Figura 25. - Dicroísmo circular proteína Xac2987. A) Espectro de dicroísmo circular UV-distante de Xac2987. B) UV-próximo de Xac2987. A concentração da proteína a 1mg/mL em 10 mM Tris-HCl pH 7,5.

Na região do UV-próximo (figura 25B) a proteína mostrou cinco mínimos relativos a 294,2; 286,5; 275,4; 268,4 e 262,2 nm e cinco máximos relativos a 290,2; 281,8; 271,2; 262,2 e 257,6 nm. O conteúdo de estrutura secundária da Xac2987, estimado a partir do espectro de UV-distante usando o programa CDNN (Bohm *et al.*, 1992), foi: 18,6 % α -hélices, 37,1 % folhas- β (antiparalelas + paralelas), 18,6% voltas e 28,2% de formas não ordenadas.

4.2.4.2. Alinhamento de seqüência da proteína Xac2987 com algumas PIPs cujas estruturas cristalográficas já são conhecidas

A Xac2987 foi anotada no banco de dados como pertencente à família de prolina iminopeptidases, devido a similaridade de seqüência com muitas proteínas também anotadas como prováveis PIPs. Porém, com base em nossos resultados, acreditamos que estas anotações estejam equivocadas, uma vez que nossos dados indicam que a Xac2987 é uma aminopeptidase de amplo espectro, sugerindo que

algumas destas proteínas também possam ter sido anotadas erroneamente. A figura 26, representa o alinhamento de seqüência da Xac2987 com mais três proteínas, comprovadamente pertencentes à família das PIPs, constatamos a existência de diferenças estruturais que excluem a Xac2987 deste grupo de proteínas. Mas esta proteína também apresenta os resíduos da tríade catalítica na mesma posição que as PIPs, o que pode incluir a mesma na família da serino-proteases, como é o caso da Xf1510.

4.2.4.3. Predição de estrutura secundária da proteína Xac2987 de *X. axonopodis* pv. *citri*

Fazendo-se uma comparação de seqüência da Xac2987 em um banco de dados de proteínas com domínio conservado (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) e também no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) encontramos que esta proteína apresenta enovelamento similar ao da família das α/β hidrolases.

A predição da estrutura secundária desta proteína, baseada em sua seqüência de aminoácidos e realizada com o programa PSIPRED (McGuffin *et al.*, 1999), comparando-se com a proteína PIP-Xac, mostrou que a Xac2987 possui um grande conteúdo de α -hélices e um padrão de estrutura secundária similar ao de muitas aminopeptidases pertencentes a família das α/β hidrolases (Figura 27).

4.2.4.4. Mudanças conformacionais induzidas pelo pH na proteína Xac2987

O efeito de pH na estrutura da proteína Xac2987 foi acompanhado por CD na faixa de pH de 3 a 11. A proteína apresenta mudanças conformacionais na faixa de pH 4,5 a 7,5. Selecionamos quatro espectros da proteína nos pH 4,0; 6,4; 6,6 e 9,0, para demonstrarmos esta mudança estrutural apresentada pela proteína nesta faixa de pH (Figura 28). A proteína apresenta uma conformação muito semelhante em pH 4,0 e 9,0. Embora a pH 9,0 o sinal de CD seja mais intenso os mínimos e o máximo mantêm-se na mesma posição. Na faixa de pHs de 4,5 a 7,5 o espectro de CD sofre uma mudança, reduzindo a intensidade da banda a 208 nm, que chega a desaparecer (Figura 28). Este efeito do pH sobre esta proteína foi mais evidente do que em relação a Xf1510 quando desenhamos a razão de elipticidade a 222 e 208 nm (Figura 29).

A proteína Xac2987, assim como a Xf1510, é instável em solução e precipita após a diálise para eliminar o imidazol e o cloreto de sódio que foram usados na purificação. Esta proteína também permanece estável em solução a um pH de 9,0 e portanto ela também foi mantida neste pH para armazenamento.

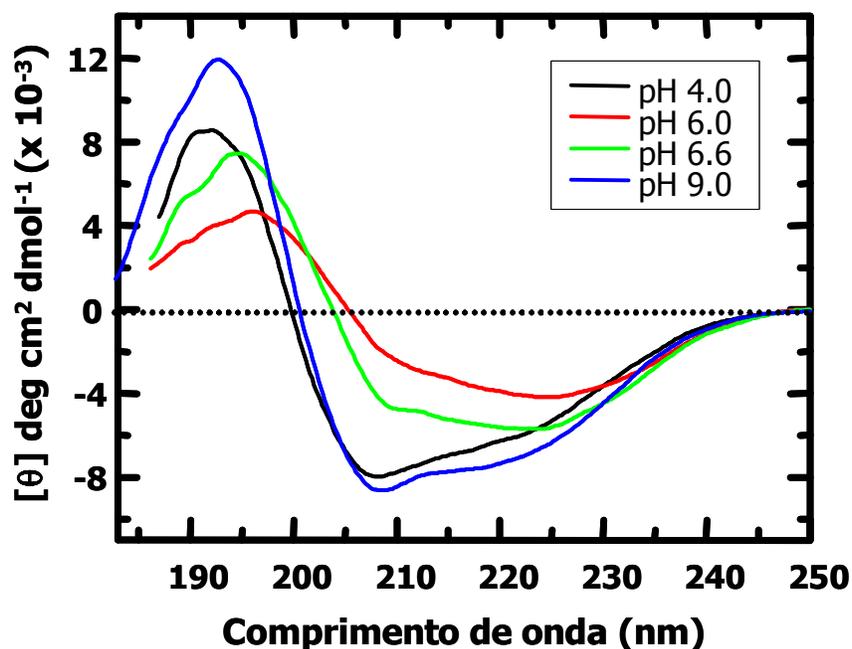


Figura 28. - Efeito do pH na estrutura da proteína Xac2987. Os espectros foram coletados de na faixa de pH de 3 a 11, porém aqui representamos apenas aqueles que representam à mudança na estrutura secundária da proteína.

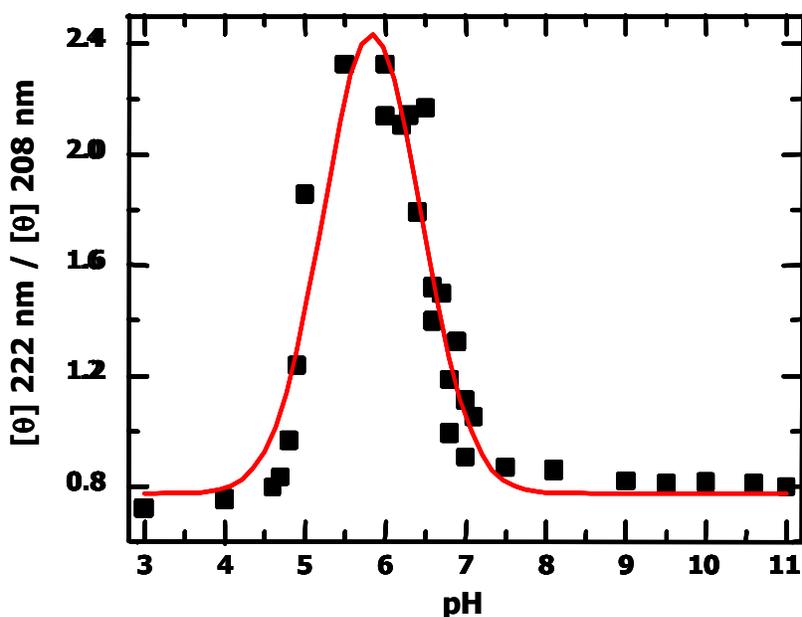


Figura 29. - Efeito do pH sobre o sinal de CD da Xac2987. Os espectros de CD foram realizados a 222 e 208nm, de 10 a 95°C, na faixa de pH de 3 a 11.

A figura 30 mostra o efeito do pH sobre o conteúdo em estrutura secundária da proteína Xac2987. Em pHs menores de 4,5 o conteúdo de α -hélice é

levemente menor que à pHs acima de 7,5 e o conteúdo de folha- β é significativamente maior, enquanto que o conteúdo de voltas- β e de estrutura desordenada não sofre nenhuma mudança significativa. Na faixa de pH de 4,5 a 7,5 ocorrem as maiores mudanças na conformação da proteína. A maior mudança é um aumento de aproximadamente 8 % em estrutura desordenada com uma redução gradual de folha- β e um leve aumento de α -hélice.

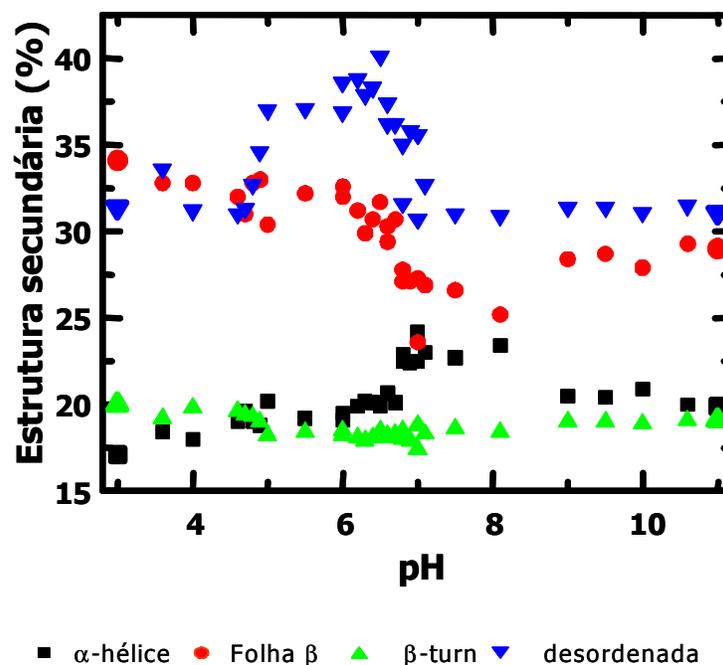


Figura 30. - Estrutura secundária da proteína Xac2987 em função da variação do pH.

4.2.5. Desnaturação térmica da proteína Xac2987

4.2.5.1. Dicroísmo circular

Os experimentos de desnaturação térmica da enzima Xac2987 foram realizados entre temperaturas de 10 a 95 °C e acompanhados por dicroísmo circular nos seguintes valores de pH: 6,0; 6,6; 8,5; 9,1 (Figuras 31). A análise do perfil dos espectros de desnaturação térmica nos pH 6,0 e 6,6 representam claramente que a proteína perde estrutura secundária, e à medida que a temperatura aumenta, a proteína sofre agregação e precipitação. Ao final destes

experimentos foi observado precipitado branco na cubeta. Em pH 8,5 verificamos que houve uma perda gradativa da estrutura, a proteína sofreu agregação, porém não encontramos precipitados esbranquiçados na cubeta como encontrado nos pH 6,0 e 6,6. Já em pH 9,1 a proteína manteve-se estável, até mesmo sob elevadas temperaturas perdendo parte da estrutura secundária, o que foi visível no máximo a 192 nm, cuja região sofreu uma perda na intensidade do sinal de CD, e que também ao redor do mínimo a 208 nm. A proteína Xac2987 também apresentou o mesmo comportamento que a Xf1510 frente ao efeito do pH, porém nesta enzima o efeito é maior na faixa de pH de 5,5 a 7,0 onde ela precipitou, ao começar a desnaturar, mostrando instabilidade nesta faixa de pH. Em pHs inferiores a 4,5 e superiores a 7,5 a proteína permaneceu em solução após a desnaturação. A Xac2987 precipita tão logo seja diluída em pH 6,0 e 6,6 o que pode ser evidenciado pela redução do seu sinal de CD de -10 mDeg para -5 mDeg, considerando-se o sinal de CD em pH 8,5 e 9,1 com o espectro obtido em pH 6,0 e 6,6.

Na figura 32, representamos um gráfico com o perfil característico obtido em pH 9,5 no qual a proteína esta em solução e mais estável. Com base nos espectros de CD-UV-distantes os valores das T_m foram calculados e estão dispostos na tabela 16. Estes valores para a proteína Xac2987 não apresentaram uma variação significativa, podendo existir uma pequena tendência à maior estabilidade em pHs mais baixos, o que mostra que a proteína comporta-se de forma muito parecida em pHs inferiores a 4,5 e superiores a 7,5 como já foi evidenciado anteriormente. A desnaturação térmica da Xac2987 foi irreversível, pois a proteína sofreu agregação seguida de precipitação quando aquecida até 90 °C.

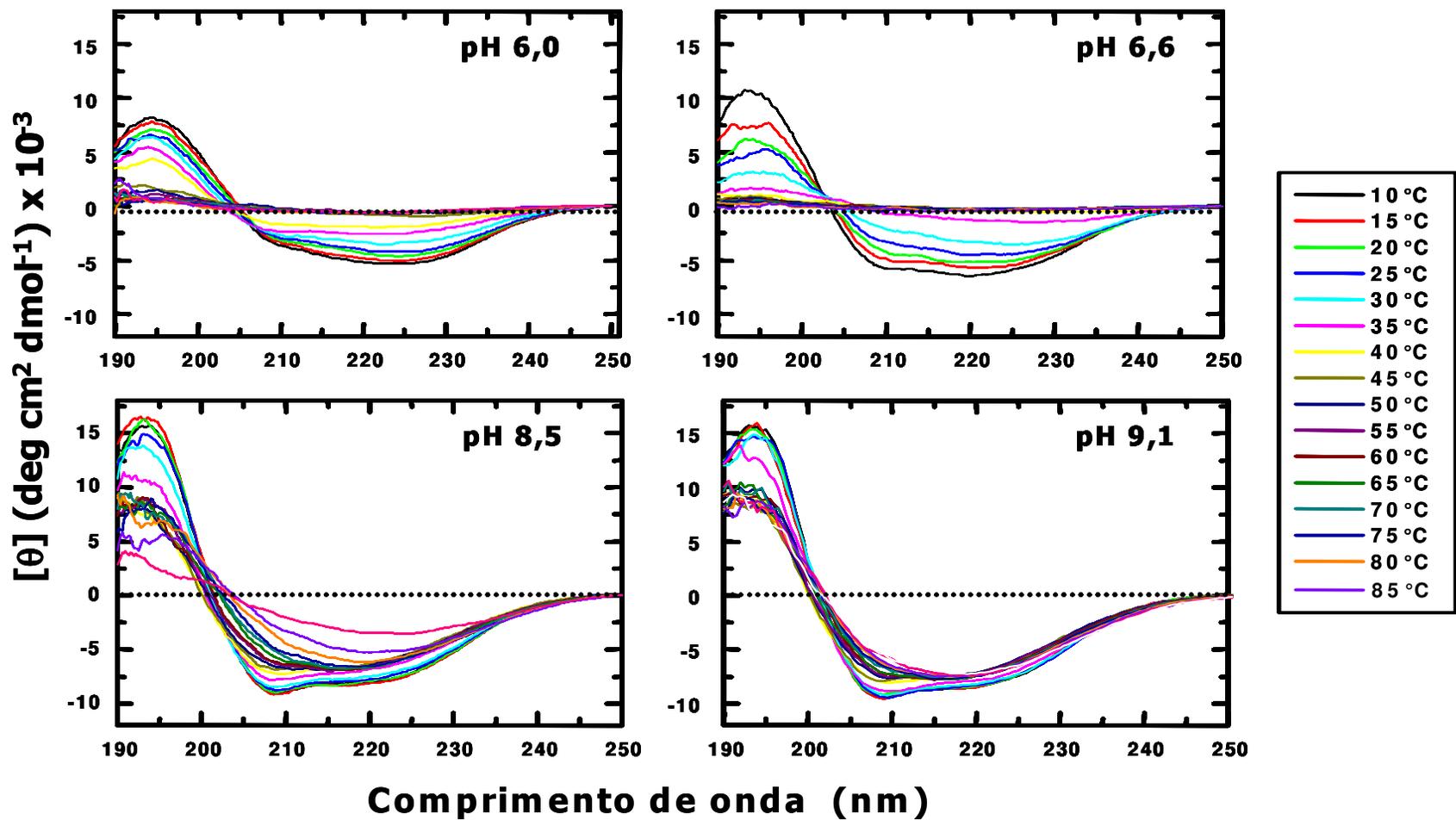


Figura 31. – Desnaturação térmica da proteína Xac2987 acompanhada por CD. A proteína foi diluída a uma concentração final de 0,2 mg/mL nos diferentes pHs e a seguir a desnaturação foi iniciada varando a temperatura de 10 a 95 °C, em intervalos de 5 °C. Os espectros de CD representam a média de 4 acumulações em cada temperatura.

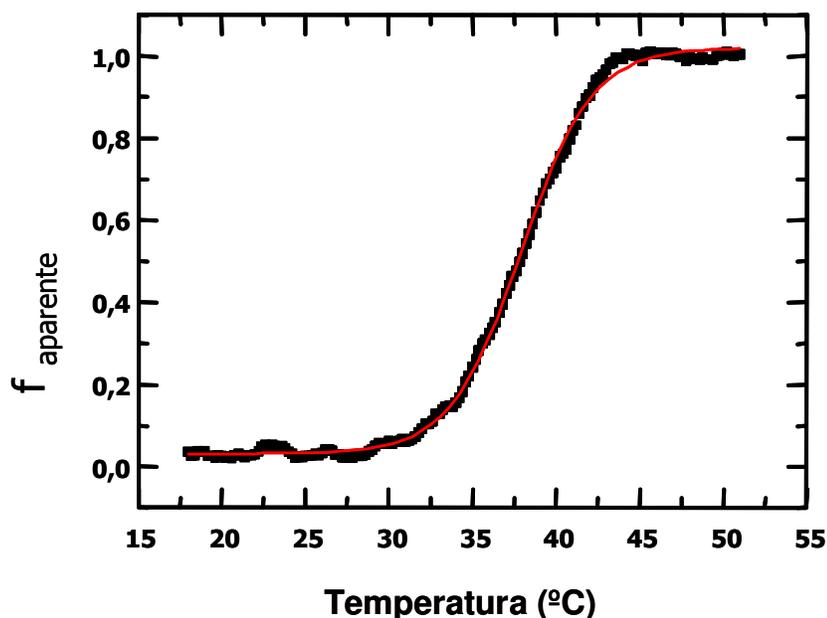


Figura 32. - Desnaturação térmica da proteína Xac2987. A desnaturação foi monitorada por CD no λ de 222 nm. As T_m s foram calculadas nos diferentes pHs listados abaixo, com suas respectivas temperaturas de fusão. Nesta figura representamos um gráfico de desnaturação da Xac2987 em pH 4,0 no qual a proteína apresenta maior estabilidade.

Tabela 16. - Estabilidade térmica da proteína Xac2987 em diferentes pHs e suas respectivas temperaturas de fusão.

<i>Tampão (pH)</i>	<i>T_m (°C)</i>
Acetato de Sódio 4,0	43,0 \pm 0,1
Bis-Tris-Propane pH 8,1	41,1 \pm 0,1
Bis-Tris-Propane pH 8,5	39,8 \pm 0,1
AMPSO pH 9,0	38,5 \pm 0,1
Bis-Tris-Propane pH 9,1	38,1 \pm 0,1
AMPSO pH 9,5	37,9 \pm 0,1
Acetato de Sódio pH 10,0	39,8 \pm 0,1
CABS pH 10,6	38,3 \pm 0,1
CABS pH 11,0	37,3 \pm 0,1

4.2.6. Desnaturação química

4.2.6.1. Desnaturação química da proteína Xac2987 induzida por GdnHCl em pH 7,0

A figura 33 representa as intensidades de fluorescência resultantes da desnaturação química induzida por GdnHCl em pH 7,0, com excitação a 295 nm.

A estrutura primária da Xac2987 possui oito resíduos de triptofanos e 11 resíduos de tirosina. A análise dos espectros de emissão de fluorescência induzida por guanidina em pH 7,0 foi feita com excitação a 280 nm e 295nm, porém como o perfil dos espectros não apresentou diferenças, mostramos e discutimos apenas os dados de excitação a 295 nm. O mesmo efeito que ocorreu com a Xf1510 quando adicionamos GdnHCl, foi observado para a Xac2987, ou seja, a proteína precipitou com baixas concentrações de GdnHCl (0,3 – 2,1), sofrendo redução na drástica na intensidade de fluorescência que não pôde ser detectada a 350 nm (figura 33B). Mas por outro lado, a intensidade de fluorescência da Xac2987 a partir de 2,4 M diminui gradativamente e a proteína começa a ser desenovelada por volta de 3,5 M de guanidina (3,0 U.A.).

Analisando-se o gráfico representando os comprimentos de onda no máximo de emissão da proteína Xac2987 nas diferentes concentrações de guanidina (figura 33A), podemos observar que a proteína começa a desenovelar a partir de 1,5 a 2M de guanidina e a proteína já está totalmente desenovelada na presença de 3,9 M, atingindo um platô a 350 nm.

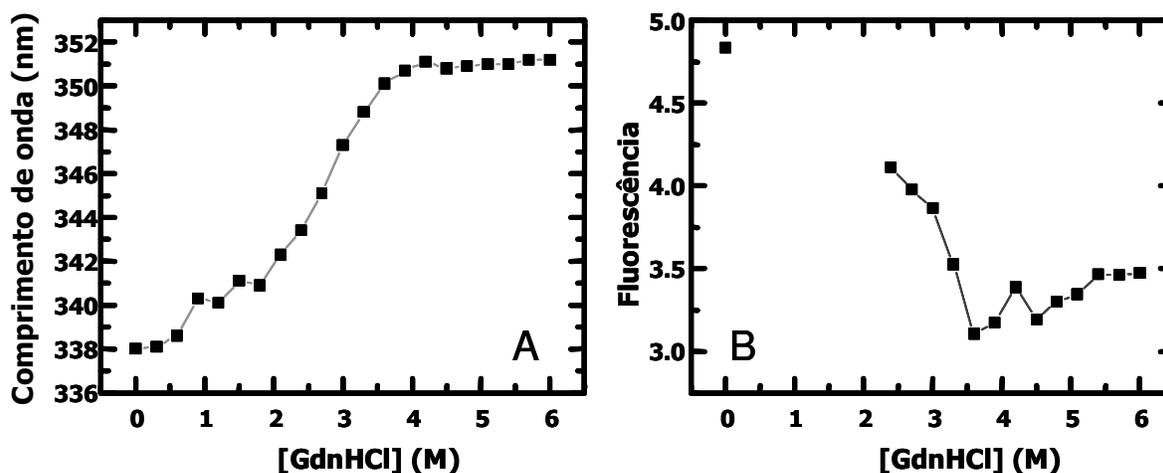


Figura 33. - Desnaturação química da proteína Xac2987 com GdnHCl em pH 7,0 acompanhada por fluorescência a 25 °C com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xac2987 em diferentes concentrações de GdnHCl; B) Intensidades de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor.

4.2.6.2. Desnaturação química da proteína Xac2987 induzida por uréia em pH 7,0

A figura 34 representa os experimentos de desnaturação química da proteína Xac2987 usando como agente desnaturante uréia em pH 7,0. Os experimentos foram acompanhados por fluorescência, com excitação a 295 nm. A proteína Xac2987 não precipitou devido à presença de uréia, nem mesmo em baixas concentrações, diferentemente ao que foi observado com guanidina.

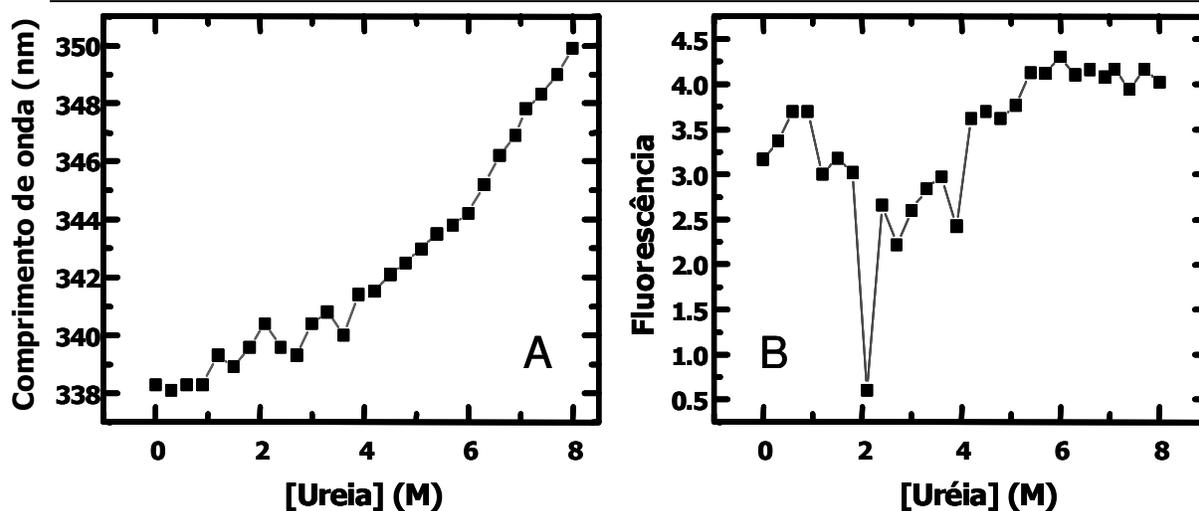


Figura 34. - Desnaturação química da proteína Xac2987 com uréia em pH 7,0 acompanhada por fluorescência a 25 °C com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xac2987 em diferentes concentrações de Uréia. B) Intensidades de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor.

4.2.6.3. Desnaturação química da proteína Xac2987 em pH 9,0.

A figura 35 representa a desnaturação química induzida por guanidina em pH 9,0. A Xac2987 também foi mais estável neste pH. Os resultados obtidos foram similares aos referentes a pH 7,0, porém a Xac2987 atingiu o estado desenovelado com 3,5 M de guanidina. A proteína iniciou seu desenovelamento em 0,3 M de guanidina e a seguir, com 2 M de guanidina, ocorreu um aumento no máximo de fluorescência, o que pode ser o resultado de uma alteração na sua conformação, levando a uma transição.

A figura 36 mostra o desenovelamento químico da proteína Xac2987 induzido por uréia em pH 9,0. Nesta condição, a proteína começa o desenovelamento gradualmente ocorrendo alteração na conformação a partir de 4,2 M de uréia, o que pode corresponder a uma transição da proteína, ou a um estado intermediário, chegando a atingir o estado desenovelado a partir de 6,8 M de uréia. Os experimentos de desnaturação química com uréia em pH 9,0 (Figura 36) também foram semelhantes aos experimentos em pH 7,0 (Figura 34). Diferentemente da Xf1510, o desenovelamento da Xac2987 parece ter sido completo em soluções de 8 M de uréia.

Nos experimentos realizados com o desnaturante uréia em pH 7,0 (Figura 34A) a proteína Xac2987 parece não ter atingido o platô do desenovelamento na concentração de 8M de uréia. Porém nos experimentos realizados com o mesmo desnaturante em pH 9,0 a proteína parece já estar desenovelada por volta de 7 M e em 8M de uréia, esta atinge 350 nm (Figura 36A).

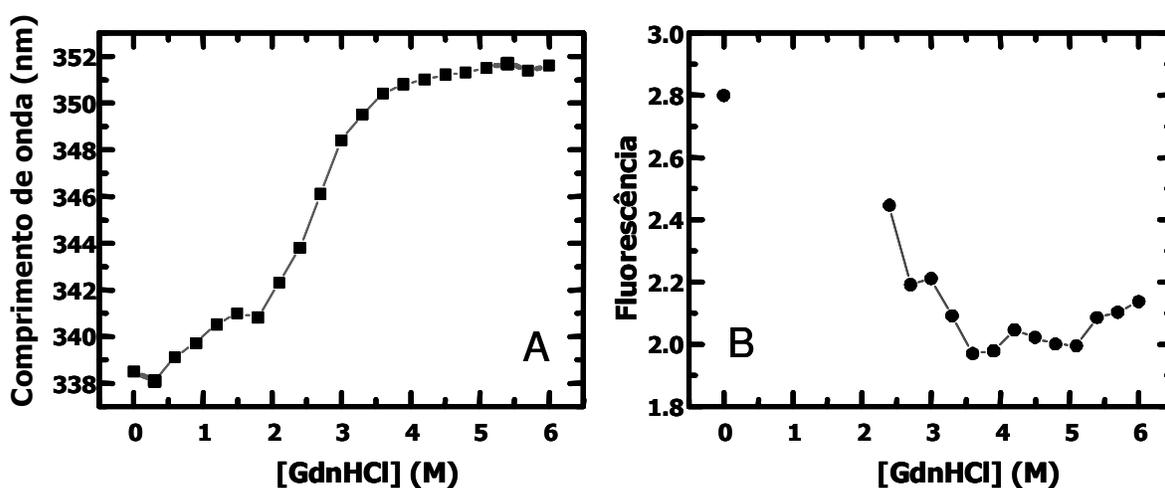


Figura 35. - Desnaturação química da proteína Xac2987 com GdnHCl em pH 9,0 acompanhada por fluorescência a 25 °C com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xac2987 em diferentes concentrações de GdnHCl B) Intensidades de fluorescência da Xac2987 a 350 nm. As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor.

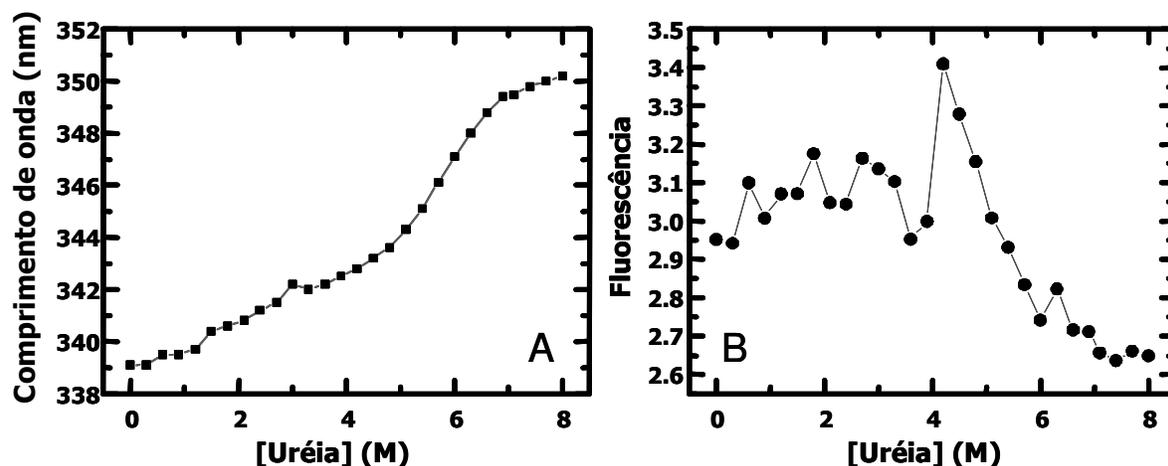


Figura 36. - Desnaturação química da proteína Xac2987 com uréia em pH 9,0 acompanhada por fluorescência a 25 °C com excitação a 295 nm. A) Comprimento de onda no máximo de emissão da proteína Xac2987 em diferentes concentrações de Uréia; B) Intensidades de fluorescência a 350 nm. As linhas servem apenas para guiar os olhos do leitor.

4.2.7. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Experimentos de DLS foram realizados para determinar o estado de oligomerização da proteína (Figura 37). A maior parte da proteína apresenta raio de giro hidrodinâmico de 5,1 nm, correspondendo a massa molecular de 149 kDa. Estes dados nos indicam a presença de um tetrâmero em solução. Este estado de agregação pode explicar a nossa dificuldade em remover a cauda de histidina fusionada na extremidade N-terminal da proteína. Uma pequena fração (5 %) da proteína apresentou um raio de giro hidrodinâmico de 11,6 nm, correspondendo a uma massa molecular média de 1042 kDa.

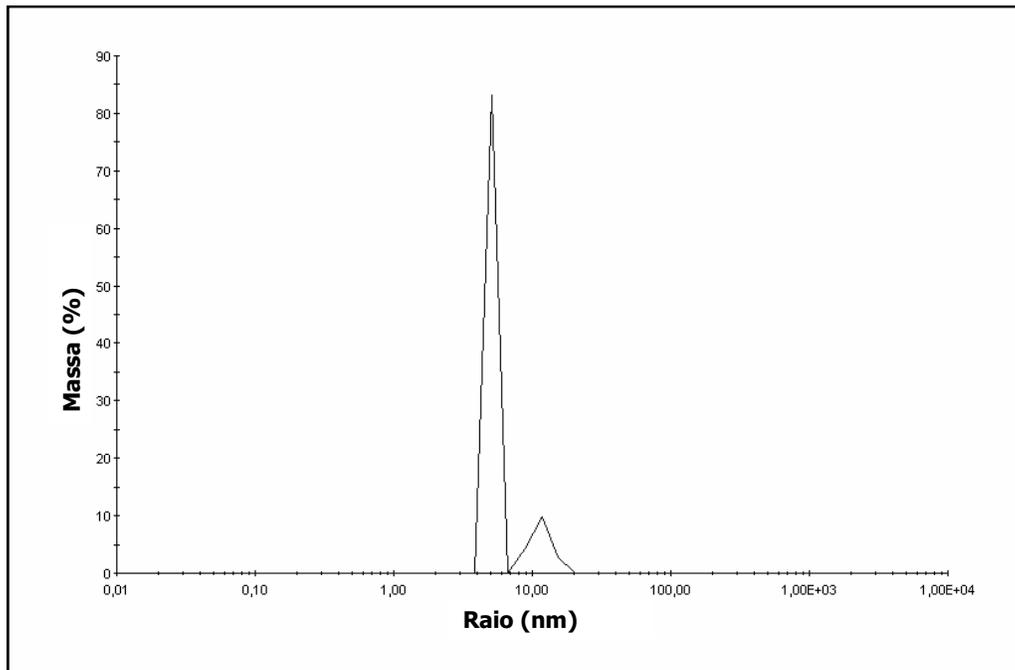


Figura 37. – Espalhamento dinâmico de luz da proteína Xac2987



Discussão



5. Discussão

Aminopectidases catalisam a clivagem de resíduos de aminoácidos de polipeptídios e proteínas. Elas estão presentes em todos os organismos e desempenham importantes papéis em processamento de alimentos, maturação de proteínas pela eliminação do resíduo de metionina N-terminal (Moerschell *et al.*, 1990), patogenicidade e muitos outros processos celulares. Neste trabalho foi realizada a clonagem, expressão, purificação e estudos estruturais de uma prolina iminopectidase de *Xylella fastidiosa* (Xf1510) e de uma aminopectidase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac2987).

5.1. Expressão e purificação

Para facilitar a purificação das proteínas, os genes foram clonados em vetor de expressão pET15b o qual produziu as proteínas em fusão com uma cauda de seis histidinas, na porção N-terminal das mesmas. A seguir, a seqüência foi confirmada por seqüenciamento de DNA. Diferentes linhagens de *E. coli* foram testadas, porém foi com a BL21 (DE3) pLysS que obtivemos os melhores resultados para ambas as proteínas. A Xf1510 e a Xac2987 foram super-expressas em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS induzidas por 10 mM lactose na concentração final. As proteínas foram expressas na fração solúvel e purificadas em uma etapa por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) com alto rendimento. Cerca de 50 mg de cada proteína foi obtido de um litro de cultura. A Xf1510 e a Xac2987 foram purificadas com pureza superior a 95%, como foi demonstrado por SDS-PAGE.

As proteínas Xf1510 e a Xac2987 na fração solúvel apresentam uma massa molecular aparente de 37 e 36 kDa respectivamente, o que corresponde à massa molecular calculada com a cauda de histidinas fusionada na extremidade N-terminal das proteínas. Inicialmente tentamos remover a cauda de histidina com trombina e outras proteases, mas não obtivemos sucesso. Nossos ensaios de

atividade enzimática de ambas as proteínas foram realizados com a cauda de histidinas.

5.2. Atividade enzimática

Nossos resultados comprovaram que a Xf1510 é uma prolina iminopeptidase, sendo capaz promover a remoção de resíduos de prolina e alanina com maior eficiência em relação aos outros substratos sintéticos, como a glicina que apresenta atividade por volta de 30%. A Xf1510 apresenta atividade enzimática residual com serina e isoleucina. Por outro lado, a atividade testada com outros aminoácidos foi extremamente baixa ou não detectada nas condições experimentais testadas. Estes resultados sugerem que a proteína Xf1510 foi anotada corretamente no banco de dados como uma prolina iminopeptidase.

O gene codifica uma proteína de 313 aminoácidos, o alinhamento de seqüência com a prolina iminopeptidase de *X. campestris* (XcPIP) (Medrano *et al.*, 1998) e *S. marcescens* (SmPIP) (Yoshimoto *et al.*, 1999), cujas estruturas tridimensionais já foram resolvidas por cristalografia de raio-X, mostrou alta similaridade de seqüência entre a Xf1510 e estas proteínas, 91% e 71%, respectivamente. Todos os resíduos do sítio ativo são conservados, mostrando que a Xf1510 é também uma serino-protease, dados confirmados pela inibição da atividade da enzima com PMSF e benzamidina, que são inibidores de serino-proteases.

Esta informação sugere que existem dois grupos distintos de prolina iminopeptidases baseado no estado de oligomerização destas enzimas e a especificidade ao substrato (Kitazono *et al.*, 1992): um grupo formado por monômeros de baixa massa molecular, com cerca de 30 kDa, e alta especificidade por prolina e um segundo grupo caracterizado por especificidade menor, sendo também capazes de catalisar a eliminação de resíduos de hidroxiprolina da extremidade N-terminal e com maior massa molecular presente em solução como oligômeros. PIP de *B. coagulans* (Kitazono *et al.*, 1992), *B. megaterium* (Yoshimoto *et al.*, 1983), *N.gonorrhoeae* (Albertson *et al.*, 1993), *L.delbrueckii* (Klein *et*

al.,1994), *S. marcescens* (Kabashima *et al.*,1997), *Corynebacterium variabilis* (Gobbetti *et al.*, 2001) *E. corrodens* (Gully & Rogers, 2001) e *F. meningosepticum* (Kitazono *et al.*, 1996) foram descritas como monômeros; PIP de *Propionibacterium freudenreichii* (Stephaniak, 2000), *Streptomyces plicatus* (Ehrenfreund *et al.*, 1992) e *Grifola frondosa* (Hiwatashi *et al.*, 2004) foram descritas como dímeros; PIP de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Atlan *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 1995) como trímero; PIP de *A. sóbria* (Kitazono *et al.*, 1994), *H. alvei* (Kitazono *et al.*, 1996), *T. denticola* (Makinen *et al.*, 1996) e *X. campestris* (Alonso & Garcia, 1996) foram descritas como tetrâmeros e de *Aspergillus niger* (Basten *et al.*, 2005) e *Debaromyces hansenii* (Bolumar *et al.*, 2003) como hexâmeros. Todos estes dados foram obtidos usando filtração em gel. Nossos dados, porém foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS), e indicam que a proteína Xf1510 em solução é um dímero em dois valores distintos de pH. Devido a alta similaridade de seqüência com a XcPIP esperávamos que a Xf1510 fosse também se comportar como um tetrâmero. Quando comparamos com SmPIP, também com alta similaridade de seqüência, esperaríamos a presença de um monômero, mas contrariamente a esta similaridade a Xf1510 se comporta como um dímero em solução. Uma investigação minuciosa com técnicas mais precisas, como espalhamento de raio-X de baixo ângulo ou ultracentrifugação analítica, faz-se necessário para obtermos respostas mais precisas do estado de oligomerização deste tipo de proteína.

A especificidade ao substrato foi determinada com substratos sintéticos. A Xf1510 foi capaz de eliminar prolina, alanina e com menor eficiência glicina. Apesar de termos a estrutura tridimensional da proteína, nossos resultados baseados na similaridade de seqüência da Xf1510 com a PIP-Xac (Medrano *et al.*, 1998) podemos supor que o bolsão de ligação para o resíduo N-terminal que será clivado deve ser pequeno e capaz de acomodar resíduos com pequenas cadeias laterais, principalmente hidrofóbicos. Resíduos com cadeias laterais grandes e mais hidrofóbicas não se encaixam muito bem no sítio ativo, como pode ser visto pela baixa atividade mostrada com serina, isoleucina e metionina.

A sensibilidade da PIP Xf1510 para os inibidores de serino-proteases confirma o esperado, baseado na comparação de seqüência, e de acordo com a tríade catalítica formada por um aspártico, uma serina e uma histidina, cuja distribuição entre as famílias de serino-proteases tem sido bastante relatada na literatura (Kitazono *et al.*, 1994). Kazan *et al.* (2005), demonstraram que a adição de CaCl_2 resulta em uma pequena interferência na atividade da serino-protease de *Bacillus clausii* GMBAE 42 (Kazan *et al.*, 2005), porém na PIP de *X. fastidiosa* isto não ocorreu. Dados da literatura com outras proteases vêm de encontro aos nossos resultados em relação ao efeito inibitório de HgCl_2 , ou seja, a adição deste composto em pequenas concentrações já é suficiente para inibir completamente a atividade da enzima (Fujimura *et al.*, 1985; Rahman *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Banerjee *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2003; Oberoi *et al.*, 2001;). Por outro lado, outros trabalhos demonstram que proteases alcalinas são estimuladas na presença de Ca, Mg e Mn (Takami *et al.*, 1989; Rahman *et al.*, 1994; Ferrero *et al.*, 1996; Banerjee *et al.*, 1999; Towatana *et al.*, 1999; Oberoi *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Adinarayana *et al.*, 2003, Bege *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003) efeito não observado em nossa pesquisa. A adição de Zn e Mg não causou efeito significativo na serino-protease de *Bacillus clausii* GMBAE 42 (Kazan *et al.*, 2005). O efeito inibitório de Zn foi também encontrado na PIP de *Propionibacterium acnes*, porém, em maiores concentrações do composto (Fujimura *et al.*, 1985). Em contra partida, no caso da PIP Xf1510 a presença de 0,5 mM ZnCl_2 inibiu completamente a atividade da enzima. A Xf1510 apresenta maior atividade enzimática na faixa de pH entre 7,5 e 8,5 sendo o pH ótimo 7,5. A temperatura ótima para hidrólise de prolina da Xf1510 foi 45°C.

A maior parte das peptidases prolina-específicas mostram atividade por alanina. PIP de *B. coagulans* mostrou uma atividade 10 vezes pior para ligação Ala-X do que por Pro-X (Kitazono *et al.*, 1992), PIP de *S. marcescens* (Kabashima *et al.*, 1997) apresenta metade da atividade por alanina.

A proteína Xac2987 é mais ativa na hidrólise de prolina e com mais 50% de atividade na remoção de serina, glicina e alanina, abaixo de 40% de atividade

histidina e tirosina, e alguma atividade residual com leucina, valina, isoleucina, fenilalanina e arginina. Estes resultados mostram que a proteína não foi anotada corretamente no banco de dados. Esta proteína foi como sendo uma prolina iminopeptidase, baseado na similaridade de seqüência. A atividade detectada com proteínas recombinantes mostrou que esta proteína catalisa a remoção de diferentes aminoácidos a partir de substratos sintéticos. A melhor atividade foi obtida com resíduos menores prolina, glicina, serina e alanina. A seguir uma maior eficiência na atividade foi detectada com aminoácidos carregados (como histidina e lisina) e aromáticos (como tirosina e triptofano), do com aqueles que apresentam resíduos hidrofóbicos como metionina, leucina, valina, isoleucina e fenilalanina. Atividade residual foi observada na remoção de resíduos de arginina. Estes resultados sugerem que o sítio ativo desta aminopeptidase pode ser suficientemente grande para acomodar grandes cadeias laterais, o que nos leva a descartar que a Xac2987 seja uma prolina iminopeptidase, uma vez que as PIPs, que são enzimas muito específicas e apresentam um sítio catalítico pequeno, são capazes de acomodar somente pequenos resíduos (Medrano *et al.*, 1998; Yoshimoto *et al.*, 1999).

O alinhamento de seqüência da Xac2987 com três prolina iminopeptidases, cuja estrutura tridimensional já é conhecida, mostrou baixa similaridade. Uma busca pelo BLAST (Altschul *et al.*, 1997), através do NCBI, mostrou que Xac2987 tem alta similaridade com grande número de genes anotados como prováveis prolina iminopeptidases, o que pode ter levado a anotação desta proteína como uma prolina iminopeptidase. Baseados em nossos resultados nós podemos sugerir que outros genes anotados como prolina iminopeptidase que apresentam alta similaridade com a seqüência da Xac2987 sejam, na realidade, aminopeptidases de amplo espectro. Estes genes são de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Rhizobium etli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Streptomyces haslstedii* e *P. fluorescens*.

A Xac2987 também é inibida por PMSF e benzamidina, como dito anteriormente, são inibidores de serino-proteases. A presença de quelantes de metal não altera a atividade enzimática indicando que esta proteína não é uma metaloprotease. Estes dados incluem também a Xac2987 como pertencente a família das serino-proteases, como descrito para Xf1510, o que também já esperávamos com base na seqüência e a similaridade da tríade catalítica entre as duas proteínas. O pH onde Xac2987 obteve maior atividade foi encontrado entre 6,5 e 7,5 sendo o pH 6,6 o ideal. Neste pH a temperatura ótima para a hidrólise de alanina foi encontrada à 40°C.

Os valores das constantes cinéticas k_{cat} encontrados para a Xf1510 foram duas vezes menores com prolina. Conseqüentemente, nos levaria a supor que a PIP Xf1510 hidrolisa melhor alanina que prolina. Porém, os valores de k_{cat}/K_m são praticamente os mesmos e levando-se em consideração que usamos substratos sintéticos, estes dados podem não revelar o que realmente ocorre *in vivo* com estas enzimas. Os valores de K_m encontrados na literatura para os substratos *p*-NA variaram de 0,25 a 0,32 (Yoshimoto *et al.*, 1983; Fuke *et al.*, 1993). O valor da K_m com o substrato prolina-*p*NA foi duas vezes menor do que o valor da K_m de L-alanina-*p*NA e L-prolina- β -naftilamida varia de 10 a 152 μ M (Waters *et al.*, 1983; Yoshimoto *et al.*, 1983).

5.3. Caracterização estrutural

O espectro de CD da Xf1510 (UV distante) apresenta dois mínimos, 208 nm e outro em 222 nm, e um máximo a 195 nm característicos de proteínas com estrutura secundária em que a estrutura em α -hélice é predominante. Estes resultados mostram que essa proteína possui estrutura muito similar a outras prolina-iminopeptidases caracterizadas previamente.

Uma comparação de seqüência da Xac2987 e da Xf1510 com o banco de dados de domínios conservados (Marchler-Bauer e Bryant, 2004), também no site NCBI, mostraram que estas proteínas têm grande conteúdo de α -hélices e um

modelo de elementos de estrutura secundária muito similar de aminopeptidases pertencentes à família das α/β hidrolases. Esta família de proteínas é caracterizada por sua conservada estrutura tridimensional e compreendem diversos tipos de hidrolases com diferentes funções (Ollis *et al.*, 1992).

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária por dicroísmo circular da Xac2987 não está muito de acordo com a predição de estrutura secundária ou com o fato destas proteínas não pertencerem à família das α/β hidrolases. Essa diferença se deve à observação de dois mínimos que não estão centrados em 208 e 222 nm, característica típica de conteúdo de estrutura secundária de proteínas ricas em α -hélices. Poderíamos usar como justificativa, o fato de que a estimativa do conteúdo de estrutura secundária apresenta muitos problemas, principalmente a hipótese de que outros elementos possam contribuir para as mudanças no espectro. A contribuição de outros elementos, nos espectros, tais como aminoácidos aromáticos e pontes dissulfeto, que apresentam uma contribuição de sinal significativa ao redor de 230-250 nm e podem deslocar o mínimo típico a 222 nm. Além disso, α -hélices, folhas- β e estrutura desordenada (random coil), podem vir a contribuir para este tipo de interferência na análise (Kelly & Prince, 1997).

Estudos estruturais com relação ao pH e estabilidade térmica das proteínas foram acompanhados por dicroísmo circular. As proteínas apresentam mudanças conformacionais em determinadas faixas de pH distintas para cada uma delas. A Xf1510 sofre alterações na estrutura na faixa de pH entre 5,0 e 8,0 e a Xac2987 as mudanças ocorrem entre pH 4,5 e 7,5. Nestes pHs as proteínas foram muito instáveis e precipitaram assim que se iniciou o processo de desnaturação devido ao efeito da temperatura, enquanto que fora destas faixas de pH as proteínas desnaturaram, mas não precipitaram sob elevadas temperaturas. O espectro de dicroísmo circular de ambas as proteínas, mostram que estas proteínas podem ser classificadas como pertencentes à família das α/β hidrolases.

Neste trabalho realizamos também a análise experimental do desenovelamento em pH 7,0 e pH 9,0 induzido por uréia e guanidina monitorando as intensidades de fluorescência. Verificamos em nossos experimentos o mesmo

efeito para o desenovelamento químico de ambas as proteínas em pH 7,0 e pH 9,0. O objetivo de se estudar a estabilidade e a via de enovelamento de proteínas é compreender as regras e as forças envolvidas neste processo (Ramos, 2004). Proteínas são desnaturadas sob muitas condições, exibem diferentes estados parcialmente enovelados que são pobremente entendidos. As proteínas podem ser desnaturadas por calor, extremos de pH, certos solventes orgânicos miscíveis, como o álcool ou acetona, e por alguns solutos como uréia e cloreto de guanidina ou detergentes. A estabilidade protéica é um balanço entre as interações intramoleculares de grupos funcionais com o solvente do ambiente. A adição de co-solventes na solução protéica pode modificar esse balanço.

A adição do desnaturante GdnHCl em concentrações inferiores a 2,4 M fez com que as proteínas Xf1510 e a Xac2987 precipitassem imediatamente diminuindo bruscamente as intensidades de fluorescência. Por volta de 3,5 M de guanidina, considerando-se o máximo comprimento de onda, a Xac2987 sofreu desenovelamento. O que não ocorreu com a proteína Xf1510, pois foi necessária uma maior concentração de guanidina (5M) para a proteína ser totalmente desenovelada. Em presença de uréia a proteína Xf1510 não precipitou como ocorreu nos experimentos usando a guanidina como desnaturante. A concentração de uréia necessária para causar o mesmo efeito que a guanidina causou em pH 7,0 na estrutura desta proteína foi aproximadamente duas vezes maior, e ainda assim não foi completamente desenovelada.

A proteína Xac2987, ao contrário da Xf1510, apresentou menor estabilidade frente à uréia, pois 8M deste agente desnaturante foi suficiente para induzir a mudança do máximo de fluorescência para 350 nm. Para a proteína Xf1510, a mesma concentração de uréia parece não ter ocorrido o mesmo efeito: o máximo de intensidade de fluorescência da Xf1510 nesta concentração de uréia (8M) foi de 345 nm e a proteína não parece estar completamente desenovelada. Estes dados sugerem que estas proteínas possuem diferentes estabilidades frente à desnaturantes químicos, além de especificidade enzimática distintas.

Com os experimentos de desenovelamento químico da proteína Xac2987 e da Xf1510 induzidos por uréia e guanidina indicam que possivelmente existam estados intermediários na via de desenovelamento químico dessas proteínas. Para confirmação, torna-se necessário estudo com outras técnicas mais minuciosas para acompanharmos as mudanças conformacionais das mesmas, caso existam, para que possamos fazer o tratamento termodinâmico dos dados destas proteínas adequadamente.

Paralelamente aos ensaios de atividade e estudos estruturais por técnicas espectroscópicas (absorção UV-VIS e dicroísmo circular e fluorescência), para estudos comparativos e modificações estruturais sofridas devido a mudanças nas condições físico-químicas do solvente. Foram realizados ensaios de cristalização. Obtivemos pequenos cristais da proteína Xf1510, em diferentes condições testadas a partir de kits comerciais. Foi feito refinamento variando-se as condições dos agentes precipitantes, porém não obtivemos sucesso. Os cristais não apresentaram tamanho suficiente aos experimentos de difração de raio X. Ainda assim, selecionamos alguns de maiores dimensões e levamos na linha de raio-X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, mas nenhum cristal difratou e portanto não foi possível resolvermos a estrutura. Apesar de sabemos da dificuldade em obtenção de cristais de proteínas pela natureza empírica da técnica, no caso da Xf1510 acreditamos que a presença da cauda de poli-histidina possa ter sido uma possível explicação ao fato dos cristais não terem atingido tamanho adequado aos experimentos de difração de raios-X. Fizemos ensaios de proteólise limitada com diferentes proteases, para a retirada da cauda de histidinas, porém a proteína foi totalmente digerida não sendo possível retirá-la.

Os dados obtidos até o momento representam uma caracterização parcial das proteínas por meio do uso de algumas técnicas espectroscópicas. Para um melhor entendimento das características estruturais destas proteínas e sua relação com a atividade enzimática é necessário o uso de outras técnicas que nos fornecem informações complementares as já obtidas, como por exemplo:

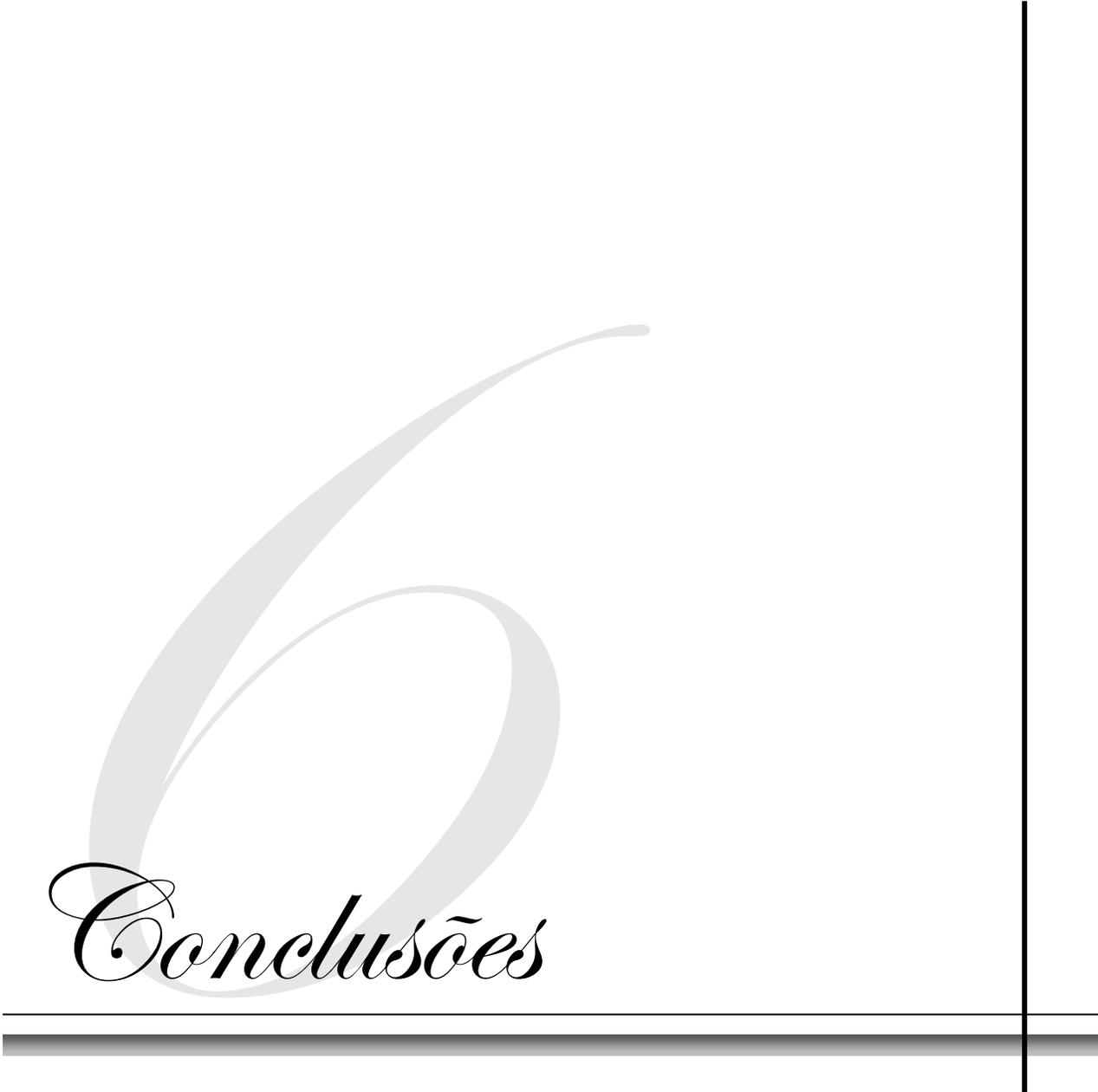
- Espalhamento de raio-X de baixo ângulo;

- Ultracentrifugação analítica;
- Calorimetria;
- Expressar as proteínas em outro vetor sem a adição da cauda de poli-histidinas,

Estas técnicas sugeridas poderão complementar os experimentos realizados e aqui apresentados para a melhor caracterização estrutural e biofísica com relação ao comportamento deste tipo de proteínas, se é particular a elas ou se comum a todas as aminopeptidases, das quais não existe nenhuma caracterização na literatura. Também poderão ajudar no entendimento de numerosos processos celulares de suma importância, nos quais estas proteínas participam.



Conclusões



6. Conclusões

- As proteínas Xf1510 e Xac2987 apresentaram espectro de CD característico de proteínas que apresentam estrutura secundária predominante em α -hélice;
- Nós demonstramos neste estudo que as proteínas Xf1510 e Xac2987 pertencem à família das α/β -hidrolases;
- Os dados de atividade enzimática, CD e fluorescência demonstraram que proteínas recombinantes Xf1510 e Xac2987 foram produzidas na forma enovelada;
- Os ensaios enzimáticos na presença de inibidores de proteases e íons incluem ambas as proteínas como pertencentes à família das serino-proteases;
- Os dados de atividade enzimática demonstram que a Xf1510 é uma prolina iminopeptidase;
- Os dados de atividade enzimática mostram que a Xac2987 é uma aminopeptidase de amplo espectro, e não uma prolina iminopeptidase, como foi anotada no banco de dados.



Referências
Bibliográficas



7. Referências Bibliográficas

- Adinarayana, K.; Ellaiah, P.; Prasad, D.S. (2003). *APPS Pharm Sci Technol.* **4**:1-9
- Adler, A. J.; Greenfield, N. J. and Fasman, G. D. (1973). *Methods Enzymol.* **27**, 675-735.
- Albertson, N. H. and Koomey, M. (1993). Molecular cloning and characterization of a proline iminopeptidase gene from *Neisseria gonorrhoeae*, *Mol. Microbiol.* **9** 1203-1211.
- Alonso, J. and García, J.L. (1996). Proline iminopeptidase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Microbiology* **142** 2951-2957.
- Altschul S.F.; T.L. Madden, A.A.; Schäffer, J.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Miller, D.J. (1997). Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 3389-3402.
- Asano, Y.; Kato, Y.; Yamada, A. and Kondo, K. (1992) *Biochemistry* **31**, 2316-2328.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingstone, R.E.; Moore, D.D.; Seidmen, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. (eds) (1995): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Atlan, D.; Gilbert, C.; Blanc, C.; Portalier, R. (1994). Cloning, sequencing and characterization of the *pepIP* gene encoding a proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397, *Microbiology* **140** 527-535.
- Banerjee, U.C.; Sani, K.R.; Azmi, W.; Soni, R. (1999). *Process Biochem* **35**:213-219.
- Basten, D.E.J.W.; Moers, A.P.H.A.; van Ooyen, A.J.J.; Schaap, P.J. (2005). Characterization of *Aspergillus niger* prolyl aminopeptidase. *Mol. Gen. Genomics* **272** 673-679.
- Beg, K.Q. and Gupta, R. (2003). *Enzyme Microb Technol* **32**:294-304.
- Ben-Bassat, M.; Bauer, K.; Chang, S. Y.; Myambo, K.; Boosman, A. and Chang, S. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 751-757.

- Bohm, G.; Murh, R.; Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5** 191-195.
- Bolumar, T.; Sanz, Y.; Aristoy, M.C.; Toldra, F. (2003). Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** 227-232.
- Bhosale, S.H.; Rao, M.B.; Deshpandande, V.V. and Srinivasan, M.C. (1995). *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 136 – 13.
- Bilinski, C.A.; Russel, J. and Stewart, G.G. (1987). *Applied and Environmental Microbiology* **53** :(3) 495 – 499.
- Braun, V.; Günthner, K.; Hantke, K. and Zimmermann, L. (1983). *J. Bacteriol.* **156**, 308-315.
- Byun, T.; Tang, M.; Sloma, A.; Brown, K.M.; Marumoto, C.; Fujii, M. and Blinkovsky, M. (2001). Aminopeptidase from *Sphingomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* **276** (21), 17902-17907.
- Cahan, R.; Axelrad, I.; Safrin, M.; Ohman, D. E. and Kessler, E. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 43645-43652.
- Chaffotte, A.F. Guillou, Y. and Goldberg, M.E. (1992). *Biochemistry* **31**, 9694-9702.
- Dawes, H., Struebi, P., and Keene, J. (1994). *Journal of Food Science* **59**: (4) 858 – 861.
- da Silva, A. C. J. A.; Ferro, F. C.; Reinach, C. S.; Farah, L. R.; Furlan, R. B.; Quaggio, C. B.; Monteiro-Vitorello, M. A.; Van Sluys, N. F.; Almeida, L. M.; Alves, A. M.; do Amaral, M. C.; Bertolini, L. E.; Camargo, G.; Camarotte, F.; Cannavan, J.; Cardozo, F.; Chambergo, L. P.; Ciapina, R. M.; Cicarelli, L. L.; Coutinho, J. R.; Cursino-Santos, H.; El-Dorry, J. B.; Faria, A. J.; Ferreira, R. C.; Ferreira, M. I.; Ferro, E. F.; Formighieri, M. C.; Franco, C. C.; Greggio, A.; Gruber, A. M.; Katsuyama, L. T.; Kishi, R. P.; Leite, E. G.; Lemos, M. V.; Lemos, E. C.; Locali, M. A.; Machado, A. M.; Madeira, N. M.; Martinez-Rossi, E. C.; Martins, J.; Meidanis, C. F.; Menck, C. V.; Miyaki, D. H.; Moon, L. M.; Moreira, M. T.; Novo, V. K.; Okura, M. C.; Oliveira, V. R.; Oliveira, H. A.; Pereira, A.;

- Rossi, J. A.; Sena, C.; Silva, R. F.; de Souza, L. A.; Spinola, M. A.; Takita, R. E.; Tamura, E. C.; Teixeira, R. I.; Tezza, M.; Trindade dos Santos, D.; Truffi, S. M.; Tsai, F. F.; White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459-463.
- Donaghy, J. A. and Mackay, A. M. (1993). *Journal of Applied Bacteriology* **74**: 662 – 666.
- Dow, J.M.; Fan M.J.; Newman M.A.; Daniels, M.J. (1993). Differential expression of conserved protease genes in crucifer-attacking pathovars of *Xanthomonas campestris*, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3996-4003.
- Ehrenfreund, P.; Mollay, C.; Kreil, G. (1992). Purification and properties of an iminopeptidase from culture media of *Streptomyces plicatus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184** 1250-1255.
- Fairbanks, G.; Steck, T.L.; Wallach, D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10** 2606-2617.
- Ferrero, M.A.; Castro, G.R.; Abate C.M.; Bagion, M.D.; Simeriz, F. (1996). *Appl Microbiol Biotechnol* 45:327-332.
- Fuke, Y. and Matsuoka G. (1993). The purification and characterization of prolyl aminopeptidase from *Penicillium camemberti*. *J. Dairy Sci.* **76** 2478-2484.
- Fujimura, S.; Nakamura, T.; Pulverer, G. (1985). Purification and properties of a proline iminopeptidase from *Propionibacterium acnes*. *Zbl. Bakt. Hyg.* A260 175-183.
- Gasparello-Clemente, E. and Silveira, P.F. (2002). Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. *Toxicon* **40** 1617-1626.
- George, S.; Raju, V.; Krishnan, M. R.V.; Subramanian, T. V. and Jayaraman, K. (1995). *Process Biochemistry* **30**: (5) 457 – 462.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182** 319-326.

- Gobbetti, M.; Smacchi, E.; Semeraro M.; Fox, P.F.; Lanciotti, R.; Cogan, T. (2001). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Corynebacterium variabilis* NCDO 2101, *J. Appl. Microbiol.* 90 449-456.
- Gonzales, T. and Robert-Baudouy, J. (1996). Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 18 319-344.
- Gilbert, C.; Atlan, D.; Blanc, C.; Portalier, R. (1994). Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: purification and characterization. *Microbiology* **140** 537-542.
- Gully, N.J. and Rogers, A.H. (2001). The characterization of a (nutritionally important) proline iminopeptidase from *Eikenella corrodens*. *Oral Microbiol. Immunol.* **16** 370-375.
- Hopkins, D.L. and Purcell, A.H. (2002). *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* **86** 1056-1066.
- Hiwatashi, K.; Hori, K.; Takahashi, K.; Kagaya, A.; Inoue, S.; Sugiyama, T.; Takahashi, S. (2004). Purification and characterization of a novel prolyl aminopeptidase from Maitake (*Grifola frondosa*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68** 1395-1397.
- Huang, Q.; Peng, Y.; Li, X.; Wang, H.; Zhang, Y. (2003). *Curr Microbiol* 46:169-173.
- Jankarik, J. & Kim, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallisation of proteins, *J. Appl. Cryst.* 24, 4092-411.
- Jelesarov, I. and Lu, M. (2001). Thermodynamics of trimer-of-hairpins formation by the SIV gp41 envelope protein. *J.Mol.Biol.* **307**: 637-56.
- Kabashima, T.; Kitazono, A.; Kitano, A.; Ito, K.; Yoshimoto, T. (1997). Prolyl aminopeptidase from *Serratia marcescens*: Cloning of the enzyme gene and crystallization of the expressed enzyme. *J. Biochem.* **122** 601-605.
- Kazan, D.; Denizci, A.A.; Öner, M.N.K. and Erarslan, A. (2005). *J Ind Microbiol Biotechnol.*
- Kelly, S.M. and Price, N.C. (1997). *Biochimica et Biophysica Acta.* **1338**, 161-185.

- Kitazono, A.; Kitano, A.; Kabashima, T.; Ito, K.; Yoshimoto, T. (1996). Prolyl aminopeptidase is also present in Enterobacteriaceae: cloning and sequencing of the *Hafnia alvei* enzyme-gene and characterization of the expressed enzyme. *J. Biochem.* **119** 468-474.
- Kitazono, A.; Kitano, A.; Tsuru, D.; Yoshimoto, T. (1994). Isolation and characterization of the prolyl aminopeptidase gene (pap) from *Aeromonas sobria*: comparison with the *Bacillus coagulans* enzyme. *J. Biochem.* **116** 818-825.
- Kitazono A.; Yoshimoto, T.; Tsuru, D. (1992). Cloning, sequencing, and high expression of the proline iminopeptidase gene from *Bacillus coagulans*. *J. Bacteriol.* **174** 7919-7925.
- Klein, J.R.; Schmidt, U.; Plapp, R. (1994). Cloning, heterologous expression, and sequencing of a novel proline iminopeptidase gene, *pepI*, from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 7290. *Microbiology* **140** 1133-1139.
- Kobayashi, T.; Hakamada, Y.; Hitomi, K.; Koike, K.; Ito, S. (1996). *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 63-71.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- Lazdunski, A. (1989). *FEMS Microbiol. Rev.* 63, 265-276.
- Le Gouill, C. *et al.*, (1994). *Anal. Biochem.* 219: 164.
- Leenhouts, K.; Bolhuis, A.J.; Boot, I.; Deutz, M.; Toonen, G.; Venema, J.; Kok, A.; Ledebøer. (1998). Cloning, expression and chromosomal stabilization of the *Propionibacterium shermanii* proline iminopeptidase gene (pip) for food-grade application in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 4736-4742.
- Ludlow, J. M. and Clark, D. S. (1991). *Critical Reviews in Biotechnology* **10**: (4) 321 - 345.
- Lyons, T. P. (1988). *Critical Reviews in Biotechnology* 8: (2) 99 – 110.
- Machado, M.A.; Souza, A.A.; Coletta-Filho, H.D.; Kuramae, E.E.; Takita, M.A. (2001). Genome and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, *Mol. Biol. Today* **2** 33-43.

- MacCulloch, R.; Burke, M.E. and Sherratt, D.J. (1994). *Mol. Microbiol.* **12**, 241-251.
- Makinen, K.K.; Chen, C.Y.; Makinen, P.L. (1996). Proline iminopeptidase from the outer cell envelope of the human oral spirochete *Treponema denticola* ATCC 35405, *Infect. Immunity* **64** 702-708.
- Manonmani, H. K. and Joseph, R. (1993). *Enzyme and Microbial Technology* **15**: 624 - 628.
- Marchler-Bauer, A. and Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32**: 327-331.
- Matsushima, M.; Takahashi, T.; Ichinose M.; Miki K.; Kurokawa K.; Takahashi K. (1991). Prolyl aminopeptidase from pig intestinal mucosa and human liver: Purification, characterization and possible identity with leucyl aminopeptidase, *Biomed. Res.* **12** 323-333.
- Miyakawa, H.; Kobayashi, S.; Shimamura, S.; Tomita, M. (1991). Purification and characterization of an x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* LUB-147, *J. Dairy Sci.* **74** 2375-2381.
- McPherson, A. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**, 6300-6306.
- Medrano, F.J.; Alonso, J.; García, J.L.; Romero A.; Bode, W.; Gomis-Rüth, F.X. (1998). Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a prototype for the prolyl oligopeptidase family, *EMBO J.* **17** 1-9.
- Miller, C.G. and Mac Kinnon, K. (1974). *J. Bacteriol.* **147**, 925-930.
- Miller, C.G. (1975). *Annu. Rev. Microbiol.* **29**, 485-504.
- Miller, C.G.; Strauch, K.L.; Kukral, A.M.; Miller, J.L.; Wingfield, P.T.; Mazzei, G.J.; Werlen, R.C.; Graber, P. and Movva, N.R. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2718-2722.
- Miller, C.G.; Kukral, A.M.; Miller, J.L. and Movva, N.R. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 5215-5217.
- Miyakawa H. S.; Kobayashi, S.; Shimamura, M.; Tomita. (1991). Purification and characterization of an x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* LUB-147, *J. Dairy Sci.* **74** 2375-2381.

- Moerschell, R.P.; Y. Hosokawa, S.; Tsunasawa, F.; Sherman. (1990). The specificities of yeast methionine aminopeptidase and acetylation of amino-terminal methionine in vivo. *J. Biol. Chem.* **265** 19638-19643.
- Oberoi, R.; Beg, Q.K.; Puri, S.; Saxena, R.K.; Gupta, R. (2001). *World J Microbiol Biotechnol* 17:493-497.
- Ogrydziak, D. M. (1993). *Critical Reviews in Biotechnology* 13: 1 -55.
- Ollis D.L.; E. Cheah, M.; Cygler, B.; Dijkstra, F.; Frolow, S.M.; Franken, M.; Harel, S.J.; Remington, I.; Silman, J.; Schrag, J.L.; Sussman, K.H.G.; Verschueren, A. Goldman. (1992). The α/β hydrolase fold, *Protein Eng.* 5 197-211.
- Osada, H. and Isono, K. (1986). *Biochem. J.* 233, 459-463.
- Pace, C. N. Em *Methods in Enzymology*; Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N. (1986). Eds.; Academic: New York, cap. 14.
- Pace, C. N.; Shirley, B. A.; Thompson, J. A. (1989). In *Protein structure: a practical approach*; Creighton, T. E., ed.; IRL: Oxford, , cap. 13.
- Phadatare, S.U.; Deshpandande, V.V. and Srinivasan, M. C.(1993). *Enzyme and Microbial Technology.* 15: 72 – 76.
- Poolman, B.; Kunji, E.R.S.; Hagting, A.; Juillard, V. and Konings, W.N. (1995). *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 79: 65S - 75S.
- Privalov, P. L.; Gill, S. J.. (1988). *Adv. Prot. Chem.*, **39**, 191.
- Privalov, P.L. (1996). Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.*, **258**, 707-725.
- Ptitsyn, O.B. (1991). How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Lett*, 285, 176-181.
- Rahman, R.N.Z.; Razak, C.N.; Ampon, K.; Basri, M.; Yunus W.M.Z.W.; Salleh, A.B. (1994). *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 822-827.
- Ramos, C. H. I. (2004). Protein folding: the second half of the genetic code. *J. Biosci.* Uberlândia, Especial p. 39-52.
- Roderick, S.L., and Matthews, B.W. (1993). *Biochemistry* 32, 3907-3912.
- Ruddon, R.W. and Bedows, E. (1997). Assisted protein folding. *J.biol. Chem.*, **272**, 3125-128.

- Sambrook, J.; Fritsch E.F.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarid, S.; Berger, A.; Katchalski, E. (1959). Proline iminopeptidase, *J. Biol. Chem.* **234** 1740-1744.
- Schellman, J. A. (2002). *Biophys. Chem.*, **96**, 91.
- Simpson, A.G.F., Reinach, F.C.; Arruda, P. *et al.* (2000) *Nature* **406**, 151-159.
- Smacchi, E.; Gobetti, M.; Lanciotti, R.; Fox, P.F. (1999). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *FEMS Microbiol. Lett.* 178 191-197.
- Steele, D. B. and Stowers, M. K. (1991) *Annual Review of Microbiology* 45: 89 – 106.
- Stephaniak, L. (2000) Isolation and characterization of proline iminopeptidase from *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614. *Nahrung* **2** 102-106.
- Stirling, C.J., Colloms, S.D.; Collins, J.F.; Szatmari, G. and Sherratt, D.J. (1989) *EMBO J.* **8**, 1623-1627.
- Schechter, I and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **27**, 157-162.
- Sudo, T.; Shinohara, K.; Dohmae, N.; Takio, K.; Usami, R.; Horikoshi, K.; Osada, H. (1996). Isolation and characterization of the gene encoding an aminopeptidase involved in the selective toxicity of ascamycin toward *Xanthomonas campestris* pv. citri. *Biochem. J.* **319** 99-102.
- Takami, H.; Akiba, T.; Horikoshi, K. (1989) *Appl Microbiol Biotechnol.* **30**:120-124.
- Tamura, T.; Tamura, N.F.; Lottspeich, W.; Baumeister (1996). Tricorn protease (TRI) interacting factor 1 from *Thermoplasma acidophilum* is a proline iminopeptidase, *FEBS Lett.* **398** 101-105.
- Takagi, T. and Ito, N. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **257**, 1-10.
- Tyson, G.E.; Stojanovic, B.J.; Kuklinski, R.F.; Divittorio, T.J.; Sullivan, M.L. (1985). Scanning electron-microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. *Phytopathol.* **75** 264-269.

- Visser, S. (1993) *Journal of Dairy Science* 76: (1) 329 – 350.
- Waters, S.P. and Dalling M.J. (1983). Purification and characterization of an iminopeptidase from the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant. Physiol.* 73 1048-1054.
- Weber, G. (1992). **In** Protein Interactions, eds. Chapman & Hall (New York & London).
- Whitaker, J. R. (1994). Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2º Ed, New York: Marcel Dekker, Inc., 625pp Cap.: Indroduction to the hydrolases, p.387-389.
- Woody, R.W. Circular dichroism of peptides and proteins, in: K. Nakanishi, N. Berova, R.W. Woody (Eds.), Circular Dichroism: Principles and Applications, VCH Publishers, New York, 1994, pp. 473-488.
- Workman, W. E.; McLinden, J. H. and Dean D. H. (1986) *Critical Reviews in Biotechnology* 3: (3) 199 – 234.
- Yen, C.; Green, L. and Miller, C.G. (1980a) *J. Mol. Biol.* 143, 21-33.
- Yen, C.; Green, L. and Miller, C.G. (1980b) *J. Mol. Biol.* 143, 35-48.
- Yoshimoto, T.; Saeki, T; Tsuru, D. (1983) Proline iminopeptidase from *Bacillus megaterium*: purification and characterization. *J. Biochem.* **93** 469-477.
- Yoshimoto, T.; Kabashima, T.; Uchikawa, K.; Inoue, T.; Tanaka, N.; Nakamura, K.T.; Tsuru, M.; Ito, K. (1999). Crystal structure of prolyl aminopeptidase from *Serratia marcescens*. *J. Biochem.* 126 559-565.

A large, light gray, stylized number '8' is positioned in the lower-left quadrant of the page. It has a thick, rounded stroke and a classic looped design.

Anexos



8. Anexos

8.1. Artigo

YPREP 2927	ARTICLE IN PRESS	No. of Pages 5; Model 5+
24 October 2006	Diak Usad	Aranganathan (CE) / Vijayakumar (TE)
	Available online at www.sciencedirect.com	
ELSEVIER	Protein Expression and Purification xxx (2006) xxx–xxx	Protein Expression & Purification
		www.elsevier.com/locate/yprep

1 Expression, purification, and characterization of an aminopeptidase 2 (Xac2987) with broad specificity from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

3 Kelly Santos, Francisco J. Medrano *

4 *Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Caixa Postal 6192, CEP 13084-971 Campinas, Brazil*

5 Received 18 July 2006, and in revised form 28 September 2006

7 Abstract

8 We report here, the cloning, expression, and purification of a broad specificity aminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. citri
9 in fusion with a hexa-histidine tag at the N-terminal portion of the protein to facilitate purification. The protein was expressed in the sol-
10 uble fraction and could be purified in one step by IMAC, yielding approximately 50 mg pure protein per liter of cells. We show that the
11 protein is folded and presents aminopeptidase activity against synthetic substrates. Also, we present the characterization of its specificity,
12 showing that the protein was, indeed, able to catalyze the removal of N-terminal residues from synthetic substrates.
13 © 2006 Published by Elsevier Inc.

14 **Keywords:** Aminopeptidase; *Xanthomonas axonopodis*; Xac2987

15 Aminopeptidases catalyze the cleavage of amino acids
16 from the amino terminus of peptide and proteins. Accord-
17 ing to their substrate specificity bacterial aminopeptidases
18 may be divided into two subgroups. Aminopeptidases of
19 broad specificity, capable of releasing several different
20 amino acids at the N-terminal position; and aminopepti-
21 dases of narrow specificity, cleaving only a single type of
22 residue. They are essential in many aspect of cellular metabo-
23 lism, as nutrition, protein maturation [1], degradation of
24 nonhormonal [2] and hormonal peptides, and determina-
25 tion of protein stability [3].

26 Aminopeptidases form an abundant enzyme family in
27 microorganisms [4], and multiple aminopeptidases are
28 found in most sequenced microbial genomes. For most
29 aminopeptidases found by computer search, their substrate
30 specificities have not been determined. Attempts to deduce
31 substrate specificity on the basis of sequence similarity are
32 hampered by the lack of clear sequence signatures that cor-
33 relate with experimentally determined function.

34 In this study, we have expressed the protein encoded by
35 the gene *Xac2987* in *Escherichia coli* as a recombinant form

in fusion with a histidine tag. We have examined the sub- 36
strate specificity of this protein and performed a prelimi- 37
nary structural characterization by circular dichroism and 38
analysis of its sequence. 39

Materials and methods 40

Materials 41

42 Restriction endonucleases, T4 DNA ligase, *Taq* DNA
43 polymerase nucleotides, DNA and protein molecular-mass
44 markers were from Fermentas (São Paulo, Brazil). Oligonu-
45 cleotide primers for PCR were obtained from Invitrogen
46 Life Technologies (São Paulo, Brazil). The QIAquick PCR
47 purification kit, QIAprep spin miniprep kit and the QIA-
48 quick gel extraction kit were from Qiagen (Hilden,
49 Germany). Hi-Trap chelating columns were from Amer-
50 sham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). All other
51 chemicals were of analytical grade.

Cloning 52

53 The *Xac2987* gene from *X. axonopodis* was amplified by
54 PCR from purified genomic DNA using the oligonucleotide

* Corresponding author. Fax: +55 19 35121004.
E-mail address: javier@lgeibi.unicamp.br (F.J. Medrano).

- 55 primers 5'-CATATGCAGTGCACCGAGGGTTAC-3'
56 and 5'-CTCGAGTCAAACAGCGCGATTGGCCAG-3'
57 based on the sequence of the gene. The primers were
58 designed to generate products with vector cohesive over-
59 hangs (underlined), for efficient cloning onto expression
60 vectors. The PCR product was cloned into the pGEM-T-
61 Easy vector (Promega) resulting in the plasmid pGEM-
62 Xac2987. The gene was digested out from the plasmid
63 pGEM-Xac2987 with the restriction endonucleases *NdeI*
64 and *XhoI* and cloned into the pET15b vector (NOVAGEN)
65 resulting in the plasmid pET-Xac2987H. PCR products
66 and plasmids were purified using the Qiagen kits according
67 to the manufacturer instructions. *E. coli* DH5 α was used
68 for the propagation of recombinant plasmids. This vector is
69 designed for the heterologous protein expression in *E. coli*
70 producing a protein with a tag of six histidines at the amino
71 terminus to facilitate the purification of the protein. *E. coli*
72 BL21 (DE3) pLysS cells were transformed with the plasmid
73 pET-Xac2987H and used for protein expression. The correct
74 sequence of the gene cloned into the vectors was verified
75 by DNA sequencing.
- 76 **Expression**
- 77 The cells were grown in Terrific Broth medium [5] con-
78 taining ampicillin (50 μ g/ml) and chloramphenicol (68 μ g/
79 ml) at 30 °C, 200 rpm, for 16 h. An aliquot of 5 ml of an
80 overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3) pLysS strain con-
81 taining the recombinant pET-Xac2987H plasmid was used
82 to inoculate 500 ml of the same medium, maintained at the
83 same conditions until the OD₆₀₀ reached 0.6. Expression of
84 recombinant protein was induced by the addition of lactose
85 to a final concentration of 10 mM and cultivated for 16 h at
86 30 °C. Cells were harvested by centrifugation at 6000g and
87 4 °C for 10 minutes. They were resuspended in 5 ml lysis
88 buffer (10 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0 containing 1%
89 Triton X-100 (v/v)). Protein expression was analyzed using
90 gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli [6]
91 and stained with Coomassie brilliant blue R-250 [7].
- 92 **Purification**
- 93 The recombinant protein carrying a 6 \times His tag was
94 purified by immobilized metal affinity chromatography
95 (IMAC) using a Hi-Trap chelating column loaded with
96 Ni²⁺ as the affinity metal. The cells were broken using a
97 sonifier (Sonics Vibra-cell) at 40% maximum intensity
98 (3 \times 30 s). Streptomycin sulfate, 2% (w/v), was added to the
99 cell extract and incubated for 30 min at 4 °C with continu-
100 ous stirring to precipitate the nucleic acids. Insoluble mater-
101 ial was removed by centrifugation at 30,000g for 1 h at
102 4 °C. The soluble extract was loaded into the column pre-
103 equilibrated with buffer A (10 mM Tris-HCl at pH 8.0 con-
104 taining 0.5 M NaCl and 5 mM imidazole), the column was
105 washed until no protein came out of it, additional washes
106 with 50, 100, and 150 mM imidazole in buffer A were per-
107 formed, and the Xac2987 protein was eluted with 200 mM
imidazole. Purity of the protein was analyzed by SDS-
PAGE.
- Protein determination**
- The protein concentration was determined using the
absorption at 280 nm using an extinction coefficient of
1.731 g⁻¹ cm⁻¹ calculated on the basis of its amino acid
composition [8]. There was no significant difference
between the absorption of the protein in 10 mM Tris-HCl
buffer at pH 8.0 in the absence or in the presence of 6 M
guanidine hydrochloride. Therefore, the absorption of the
protein was measured, routinely, in the absence of the dena-
turant.
- Enzymatic activity**
- Aminopeptidase activity was assayed as previously
described [9,10] using aminoacyl-*p*-nitroanilide (aa-*p*NA)¹
or aminoacyl- β -naphthylamide (aa- β NA) as substrates dis-
solved in water or dimethyl sulfoxide, as required. The reac-
tion mixture consisted in a solution of protein to which a
concentration of 2 mM of the substrate was added, after
10 min the reaction was stopped by the addition of acetic
acid (30%, final concentration). The reaction was followed
spectrophotometrically when using aa-*p*NA substrates and
fluorometrically when using aa- β NA [11]. All experiments
were carried out in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at
25 °C. Appropriate controls were measured with the addi-
tion of dimethyl sulfoxide for those substrates that were
dissolved in it. The absorbance of the *p*-nitroanilide in the
reaction mixture was measured at 410 nm, and the fluores-
cence of the β -naphthylamide was measured with excitation
and emission wavelengths of 338 and 405 nm, respectively.
Fluorescence measurements were carried out in an Aminco
Bowman series 2 spectrofluorometer. Excitation and emis-
sion bandwidths were 8 and 16 nm, respectively. The fluo-
rescence cell (1 \times 0.5 cm) was mounted on a thermostated
holder. All fluorescence measurements were collected at a
constant temperature of 25 °C. A molar extinction coeffi-
cient of 8800 M⁻¹ cm⁻¹ was used for *p*-nitroanilide [12].
- Circular dichroism spectroscopy**
- Circular dichroism measurements were carried out on
a JASCO J-810 spectropolarimeter, equipped with a Pel-
tier-type temperature controller and a thermostated cell
holder, interfaced with a thermostatic bath. The far-UV
spectrum was recorded in a 0.1-cm path length quartz cell
at a protein concentration of 0.15 mg ml⁻¹, and near-UV
spectrum was recorded in a 1-cm path length quartz cell at
a protein concentration of 0.5 mg ml⁻¹. The protein was in
10 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5. Five consecutive scans

¹ Abbreviations used: *p*NA, *p*-nitroanilide; aa-*p*NA, aminoacyl-*p*-nitroanilide; aa- β NA, aminoacyl- β -naphthylamide.

155 were accumulated and the average spectra stored. The
156 data were corrected for the baseline contribution of the
157 buffer and the observed ellipticities were converted into
158 the mean residue ellipticities (θ) based on a mean molecu-
159 lar mass per residue of 110 Da. Secondary structure was
160 estimated from fitted far-UV CD spectra using the
161 CDNN software package [13].

162 *Dynamic light scattering*

163 Dynamic light scattering experiments were carried out
164 using a DynaPro instrument from Protein Solutions. The
165 measurements were carried out at 25 °C. A solution of pro-
166 tein with a concentration of 1 mgmL⁻¹ in 10 mM Tris–HCl
167 buffer at pH 7.5 was used. The software provided by the
168 manufacturer was used to calculate the hydrodynamic
169 parameters of the protein.

170 **Results and discussion**

171 *Expression and purification*

172 The gene *Xac2987* has been annotated as a proline imi-
173 nopeptidase. One of the aims of this study was to obtain
174 and characterize the protein *Xac2987* for structural and
175 functional studies. To facilitate the purification of the pro-
176 tein, the gene was cloned into the pET15b expression vector
177 that produced the protein in fusion with a histidine tag in
178 the N-terminal part of the protein. The sequence was con-
179 firmed by DNA sequencing.

180 The *Xac2987*-His6 was overproduced in *E. coli* BL21
181 (DE3) pLysS after induction with 10 mM lactose. Under
182 these conditions the protein was expressed in high quanti-
183 ties in the soluble fraction (Fig. 1). After one-step purifica-
184 tion by IMAC about 50 mg of purified enzyme was
185 obtained from 1 liter of culture. Protein purity was over
186 95%, as can be seen by SDS–PAGE (Fig. 1).

187 The soluble protein has an apparent molecular mass of
188 about 37 kDa, which corresponds closely to the calculated
189 molecular mass of *Xac2987* plus the N-terminal fusion
190 containing the histidine tag. Initial tries to remove the his-
191 tidine tag with thrombin have been unsuccessful, further
192 experiments are being carried out to eliminate the fusion
193 tag.

194 *Enzymatic activity*

195 Table 1 shows the characterization of the specificity of
196 the *Xac2987*. The protein is able to act on synthetic sub-
197 strates removing the N-terminal amino acid. The best activ-
198 ity was obtained with L-Pro-*p*NA and L-Pro- β NA, followed
199 by L-Ser- β NA, L-Gly-*p*NA, and L-Ala-*p*NA, with more than
200 50% activity. It was able to act on L-His- β NA, L-Tyr- β NA,
201 L-Trp- β NA, L-Lys-*p*NA, and L-Met-*p*NA with an activity
202 between 10% and 50%. It showed residual activity, below
203 10%, on L-Leu-*p*NA, L-Val-*p*NA, L-Ile- β NA, L-Phe-*p*NA,
204 and L-Arg-*p*NA.

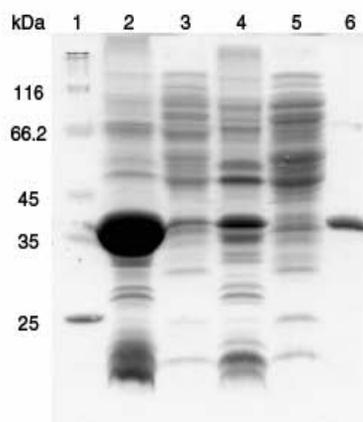


Fig. 1. Analyses of the expression of recombinant *Xac2987* in *E. coli* by SDS–PAGE (15%). Lane 1, molecular weight markers; lane 2, soluble fraction of cells carrying the vector pET-*Xac2987*H after lactose induction; lane 3, insoluble fraction of cells carrying the vector pET-*Xac2987*H after lactose induction; lane 4, soluble fraction of cells carrying the vector pET-*Xac2987*H before lactose induction; lane 5, insoluble fraction of cells carrying the vector pET-*Xac2987*H before lactose induction; and lane 6, purified protein, eluted from the column with 200 mM imidazole.

Table 1
Substrate specificity of *Xac2987*

Substrate	Relative activity (%)
L-Pro- <i>p</i> NA/L-Pro- β NA	100
L-Ser- β NA	64.1
L-Gly- <i>p</i> NA	58.5
L-Ala- <i>p</i> NA	55.4
L-His- β NA	31.6
L-Tyr- β NA	30.3
L-Trp- β NA	15.6
L-Lys- <i>p</i> NA	13.0
L-Met- <i>p</i> NA	11.5
L-Leu- <i>p</i> NA	8.2
L-Val- <i>p</i> NA	5.3
L-Ile- β NA	4.6
L-Phe- <i>p</i> NA	1.1
L-Arg- <i>p</i> NA	0.05

205 These results show that the protein was not properly
206 annotated. This protein was annotated as a proline imi-
207 nopeptidase, based on sequence similarity. The activity
208 detected with the recombinant protein shows that this is
209 a broad specificity aminopeptidase able to catalyze the
210 removal of several amino acids from synthetic sub-
211 strates. The best activity was obtained with small resi-
212 dues, Pro, Gly, Ser, and Ala. The next best residues are
213 charged and aromatic, His, Tyr, Trp, and Lys, then we
214 have hydrophobic residues, Met, Leu, Val, Ile, and Phe,
215 followed by the long-charged Arg. This might indicate
216 that the active site of this aminopeptidase should be big
217 enough to accommodate large lateral chains, as opposed
218 to the more specific proline iminopeptidase with a small
219 active-site cavity able to accommodate only small resi-
220 dues [14,15].

Please cite this article in press as: K. Santos, F.J. Medrano, Expression, purification, and characterization of an aminopeptidase (*Xac2987*) with broad specificity from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, Protein Expr. Purif. (2006), doi:10.1016/j.pep.2006.10.001



Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of Xac2987 and some proline iminopeptidases: *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (XacPIP), *Xylolla fastidiosa* (XfPIP), *Serratia marcescens* (Sm), and Xac2987 from *X. axonopodis* pv. citri (Xac2987). Residues highlighted in gray represent conserved residues.

221 A sequence alignment of Xac2987 with the two proline
 222 iminopeptidases whose three dimensional structure is
 223 known shows a low similarity (Fig. 2). A BLAST search
 224 [16], carried out at the NCBI, showed Xac2987 having high
 225 similarity with a number of putative gene products annotated
 226 as proline iminopeptidases. This has lead to the
 227 wrong annotation of Xac2987. Based on our results we are
 228 proposing that all the genes annotated as proline amino-
 229 peptidases presenting high similarity with Xac2987 are in
 230 reality broad range aminopeptidases. These genes are in
 231 the putative proline iminopeptidases from *Xanthomonas cam-*
 232 *pestris* pv. vesicatoria, *X. campestris* pv. campestris, *Xantho-*
 233 *monas oryzae* pv. oryzae, *Pseudomonas syringae* pv. tomato,
 234 *Rhizobium etli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*,
 235 *Streptomyces hastedit* and *Pseudomonas fluorescens*.

236 *Structural characterization*

237 Fig. 3 shows the CD spectrum of Xac2987. The far-UV
 238 region (Fig. 3A) presents one relative minimum at 209 and
 239 another shallow minimum centered on 216nm, and a rela-
 240 tive maximum at 192nm. The near-UV region (Fig. 3B)
 241 presents five relative minima at 294.2, 286.5, 275.4, 268.4,
 242 and 262.2nm, and five relative maxima at 290.2, 281.8,
 243 271.2, 262.2, and 257.6nm. The content of the secondary
 244 structure of Xac2987 estimated from the far-UV spectrum,
 245 using the CDNN program [13], was: 18.6% α -helices, 37.1%
 246 β -sheets (antiparallel plus parallel), 18.6% turns, and 28.2%
 247 non-ordered forms.

248 A comparison of the sequence of Xac2987 with the con-
 249 served domain database [17], also at the NCBI site, shows

this protein having an α/β hydrolase fold. This family of pro-
 250 teins is characterized by its conserved three-dimensional
 251 structure and comprises several types of hydrolases with
 252 different functions [18].

253 A prediction of the secondary structure of the protein,
 254 based on the sequence information, carried out with PSI-
 255 PRED [19] showed Xac2987 as having a high content of α -
 256 helix and a pattern of secondary structure elements very
 257 similar to the aminopeptidases belonging to the α/β hydro-
 258 lase family of proteins (Fig. 4).

259 The estimation of the secondary structure content by cir-
 260 cular dichroism does not agree very well with the prediction
 261 of the secondary structure or with the fact that it might
 262 belong to the α/β hydrolase family of proteins. This difference
 263 comes from the fact that the two minima centered on 208
 264 and 222nm typical of α -helical content are not present on the
 265 CD spectra of this protein. The estimation of the secondary
 266 structure contents of a protein from its far-UV CD spectrum
 267 present many problems, arising mainly from the assumption
 268 of a limited number of elements contributing to the spectrum.
 269 The overlooking of the contribution of other elements than
 270 the α -helices, β -sheets, and random coil contributes to the big
 271 error coming from this type of procedure. Elements such as
 272 aromatic amino acids and disulphide bridges present a sig-
 273 nificant contribution to the 230–250nm region and might
 274 displace the typical minimum at 222 nm.

275 Dynamic light experiments were carried out to
 276 determine the oligomeric state of the protein. The majority
 277 of the protein presented a radius of gyration of 5.1 nm cor-
 278 responding to a molecular weight of 149kDa. This data
 279 indicates the presence in solution of a tetramer. This
 280

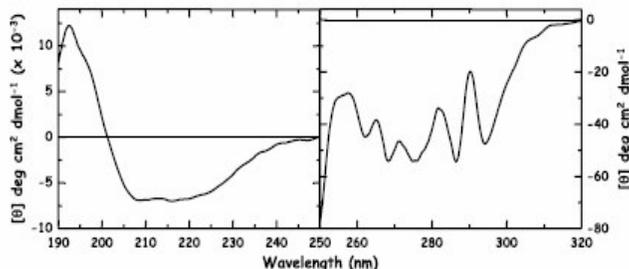


Fig. 3. Circular dichroism spectrum of Xac2987. (A) Far-UV region and (B) near-UV region.

Please cite this article in press as: K. Santos, F.J. Medrano, Expression, purification, and characterization of an aminopeptidase (Xac2987) with broad specificity from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, Protein Expr. Purif. (2006), doi:10.1016/j.pep.2006.10.001

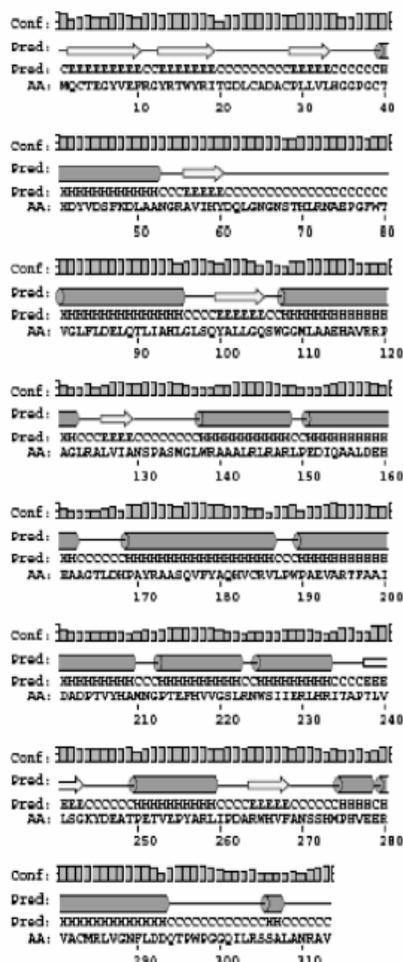


Fig. 4. Secondary structure prediction of the protein Xac2987. Cylinders represent α -helices and arrows represent β -strands. The prediction was performed with the program PSIPRED.

281 aggregation state might explain why we have been unable
 282 to remove the fusion tag. A small fraction of the protein
 283 (5%) presented a radius of gyration of 11.6 nm correspond-
 284 ing to an average molecular weight of 1042 kDa.

285 Conclusion

286 The *Xac2987* gene was cloned in an expression vector
 287 fused with a histidine tag to facilitate its purification; the
 288 recombinant Xac2987-His6 was overexpressed in *E. coli* in
 289 soluble form and with activity, demonstrating that the
 290 Xac2987 was properly folded. We demonstrated in this
 291 study that this protein belongs to the α/β hydrolase family
 292 of proteins and that it is a broad specificity aminopeptidase,
 293 and not a proline iminopeptidase, as originally annotated
 294 in the data bank. This method provides sufficient material

of high purity for further more detailed functional and
 structural characterization of the Xac2987 protein.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de
 Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 01/
 07545-5, Rede de Biologia Molecular Estrutural-SMOLB-
 Net and 98/16260-0, CBME-CEPID), Brazil. K. Santos
 received a Ph.D. fellowship from FAPESP.

References

- [1] R.P. Moerschell, Y. Hosokawa, S. Tsunasaawa, F. Sherman, The speci-
 ficities of yeast methionine aminopeptidase and acetylation of amino-
 terminal methionine in vivo, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 19638–19643.
- [2] V. Botbol, O.A. Scomic, Measurement of instant rates of protein deg-
 radation in the livers of intact mice by the accumulation of bestatin-
 induced peptides, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 2151–2157.
- [3] A. Bachmair, D. Finley, A. Varshavsky, In vivo half-life of a protein is
 a function of its amino-terminal residue, *Science* 234 (1986) 179–186.
- [4] T. Gonzales, J. Robert-Baudouy, Bacterial aminopeptidases: prop-
 erties and functions, *FEMS Microbiol. Rev.* 18 (1996) 319–344.
- [5] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning a Labora-
 tory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
 Spring Harbor, New York, 1989.
- [6] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of
 the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [7] G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F. Wallach, Electrophoretic analysis of
 the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Bio-
 chemistry* 10 (1971) 2606–2617.
- [8] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients
 from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- [9] T. Yoshimoto, T. Saeki, D. Tsuru, Proline iminopeptidase from *Bacil-
 lus megaterium*: purification and characterization, *J. Biochem.* 93
 (1983) 469–477.
- [10] J. Alonso, J.L. Garcia, Proline iminopeptidase gene from *Xanthom-
 onas campestris* pv. citri, *Microbiology* 142 (1996) 2951–2957.
- [11] E. Gasparello-Clemente, P.F. Silveira, Fluorometric assay using naph-
 thylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities,
Toxicon 40 (2002) 1617–1626.
- [12] H. Miyakawa, S. Kobayashi, S. Shimamura, M. Tomita, Purification
 and characterization of an x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from
Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus LUB-147, *J. Dairy Sci.* 74
 (1991) 2375–2381.
- [13] G. Bohm, R. Murh, R. Jaenicke, Quantitative analysis of protein far UV cir-
 cular dichroism spectra by neural networks, *Protein Eng.* 5 (1992) 191–195.
- [14] F.J. Medrano, J. Alonso, J.L. Garcia, A. Romero, W. Bode, F.X.
 Gomis-Rüth, Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas
 campestris* pv. citri: a prototype for the prolyl oligopeptidase family,
EMBO J. 17 (1998) 1–9.
- [15] T. Yoshimoto, T. Kabashima, K. Uchikawa, T. Inoue, N. Tanaka,
 K.T. Nakamura, M. Tsuru, K. Ito, Crystal structure of prolyl amino-
 peptidase from *Serratia marcescens*, *J. Biochem.* 126 (1999) 559–565.
- [16] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W.
 Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new genera-
 tion of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25
 (1997) 3389–3402.
- [17] A. Marchler-Bauer, S.H. Bryant, CD-Search: protein domain annota-
 tions on the fly, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 327–331.
- [18] D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken,
 M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J.L. Sussman, K.H.G.
 Verschuere, A. Goldman, The α/β hydrolase fold, *Protein Eng.* 5
 (1992) 197–211.
- [19] D.T. Jones, Protein secondary structure prediction based on position-
 specific scoring matrices, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 195–202.

Please cite this article in press as: K. Santos, F.J. Medrano, Expression, purification, and characterization of an aminopeptidase (Xac2987) with broad specificity from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, *Protein Expr. Purif.* (2006), doi:10.1016/j.pep.2006.10.001

8.2. Curriculum Vitae

Kelly Santos

Genética, Biologia Molecular e Bioquímica

Qualificações

- ✓ 07 anos de atuação na área de biologia molecular e bioquímica.
- ✓ Experiência com expressão e purificação de proteínas recombinantes em bactérias.
- ✓ Caracterização funcional de proteínas dos fitopatógenos *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa* (2002/2006).
- ✓ Domínio de diversas técnicas de bioquímica e biologia molecular entre elas extração de DNA plasmidial, purificação de DNA plasmidial, PCR, seqüenciamento automático de DNA, eletroforese em gel de agarose e SDS-PAGE, Western-blot, clonagem, expressão de proteínas recombinantes em sistemas procariotos (*E. coli*) purificação de proteínas recombinantes, caracterização de estrutura secundária por técnicas espectroscópicas como dicroísmo circular, fluorímetro, espectrofotômetro, cristalografia de proteínas.
- ✓ Disponibilidade para viagens.

Formação

Doutora em Biologia Funcional e Molecular 2003-2006

Instituto de Biologia – IB - UNICAMP

“Estudos de Relação Estrutura-Função de Aminopeptidases de *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.”

Mestre em Ciências Biomédicas 2000-2002

Faculdade de Ciências Médicas - FCM - UNICAMP

“Frequência das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR em pacientes portadoras da Síndrome de Turner”

Bacharel em Ciências Biológicas 1993-1997

Centro de Ciências biológicas - CCB - UFSC

Monografia: “Estudo de diferenciação celular de *Trypanosoma rangeli* em diferentes meios de cultura”.

Trajetória Profissional

Centro de Engenharia Genética - CBMEG-UNICAMP 1998-2000

Contratada pela empresa FUNDECITRUS para técnico nível superior, projeto Genoma *Xylella fastidiosa*.

Estágios e bolsas

- ✓ Estágio no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel.
- ✓ Estágio no Laboratório de citogenética (Molusca Pulmonata) do Departamento de Citogenética da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Paulo R. P. Hofmann
- ✓ Bolsista do Programa Especial de Treinamento PET - CAPES – Biologia.
- ✓ Bolsista de Mestrado – no programa CAPES.
- ✓ Atualmente bolsista de doutorado FAPESP.

Publicações em Periódicos

3- Santos, K.; Medrano, F.J. (2006). Expression, purification, and characterization of an aminopeptidase (Xac2987) with broad specificity from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Protein Expr. Purif.* (2006), doi: 10.1016/j.pep. 2006.10.001

2- SANTOS, K., LEMOS-MARINI, S.H.V.; BAPTISTA, M.T.M.; Pinto Jr., W and Bertuzzo, C.S. (2006). Frequency of 677C -> T and 1298A -> C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Turner syndrome individuals. *Genet. Mol. Biol.* **29**: 41-44.

1- Koerich, L. B.; Emmanuelle-Machado, P.; Santos, K.; Grisard, E. C.; Steindel, M. (2002) Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. *Parasitol Res* 88: 21-25.

Artigos em Preparação

1- Santos, K and Medrano, F.J. Cloning, expression, purification and characterization of a prolyl iminopeptidase from the phytopathogen *Xylella fastidiosa* (2006).

Publicações e participação em Congressos Nacionais e Internacionais

15- Santos, K. & Medrano, F.J. "Structural characterization of a proline iminopeptidase from *Xylella fastidiosa*". XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq (2005).

14- Santos, K. and Medrano, F.J. "Structural characterization of two putative proline iminopeptidases from *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas axonopodis* pv. citri" XV Reunião Anual de Usuários - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (2005).

13- Participação na 17ª. Reunião da Sociedade Brasileira de Cristalografia, LNLS (2005).

12- Santos, K. & Medrano, F.J. "Structural characterization of two putative proline iminopeptidases from *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas axonopodis* pv. citri". 1st Latin American Protein Society Meeting (2004).

11- Santos, K. & Medrano, F.J. "Structural characterization of a proline iminopeptidase from *Xylella fastidiosa*". Simpósio Satélite de Biologia Molecular Estrutural - Fundação Instituto Leloir (2004).

10- Santos, K. & Medrano, F.J. "Molecular cloning, purification and structural characterization of a proline iminopeptidase from *Xylella fastidiosa*". XIV Reunião Anual de Usuários do LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (2004).

9- Santos, K. & Medrano, F.J. "Cloning, expression and purification of proline iminopeptidase from *Xylella fastidiosa* and two putative proline iminopeptidases from *Xanthomonas axonopodis*". XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq (2003).

8- Participação na XII Reunião Anual de Usuários do LNLS, realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (2003).

7- Participação no Inter-American Workshop on the Use of Synchrotron Radiation: Applications to Macromolecules and Biological Systems. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (2002).

6- Santos, K., Guerra, A.T.M., Marino, S.H., Baptista, M.T., Pinto Jr. W. & Bertuzzo, C.S. Deficiência da MTHFR em portadoras de Síndrome de Turner. 47º Congresso Nacional de Genética (2001).

5- Bonadia, L.C., Police, E.L., Santos, K., Bertuzzo, C.S. Uso de polimorfismo de restrição no diagnóstico pré-natal de Talassemia Beta. 34º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 5º Congresso do Mercosul e 4º Congresso de Gestão Laboratorial (2001).

4- Kelly Santos, K., Guerra, A.T.M., Marino, S.H.V.L., Baptista, M.T.M., Pinto, Jr W., Carmen S. Bertuzzo. Deficiência da MTHFR em portadoras de Síndrome de Turner. 35º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (2001).

3- Kelly Santos, K., Guerra, A.T.M., Marino, S.H.V.L., Baptista, M.T.M., Pinto, Jr W., Carmen S. Bertuzzo. Deficiência da MTHFR em portadoras de Síndrome de Turner. 13º Congresso Brasileiro de Genética Clínica (2001).

2- Santos, K., Pinto JR W. & Bertuzzo, C.S. Deficiência da MTHFR em Portadores de Síndrome de Turner. 46º Congresso Nacional de Genética, Sociedade Brasileira de Genética (2000).

1- Santos, K. & Steindel, M. Crescimento e Metaciclo gênese do *Trypanosoma rangeli* em diferentes meios de cultura (Resultados Preliminares), 1998. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia - Universidade Federal de Pernambuco (1998).

Cursos

Curso Latinoamericano de Cristalografia de Macromoléculas realizado na Fundação Instituto Leloir - Buenos Aires (2004).

"Técnicas de Engenharia Genética", Instituto de Biologia - UNICAMP.

"Temas atuais em Mutagênese". Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Curso Metodologias Para Isolamento e Identificação Química de Compostos Ativos de Plantas Medicinais, Interação Química – Farmacologia. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.

"Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS" Universidade Regional de Blumenau - UDESC.

"Produção de Clones pela Transferência Nuclear." Realizando durante o 47º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia-SP.

8.3. Enovelamento e agregação de proteínas

As proteínas são polímeros formados por uma seqüência definida de aminoácidos. Entretanto, esta seqüência unidimensional de aminoácidos necessita sofrer arranjos dobrando-se sobre si mesma para que, ao final, forme-se uma proteína com uma estrutura tridimensional definida dotada de função biológica.

A atividade biológica das proteínas está relacionada com a estrutura nativa que a mesma é capaz de obter em solução. No entanto, o conhecimento do mecanismo molecular responsável pelo processo de enovelamento de proteínas ainda permanece como um dos maiores desafios para a biologia estrutural. Esta estrutura única enovelada é mantida por um somatório de interações fracas (pontes de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas), porém altamente específicas que se estabelecem entre diferentes regiões da proteína. Estas interações fracas conferem grande versatilidade às proteínas. O que permite que a proteína desempenhe uma única função, daí a grande importância da fidelidade dos processos de transcrição e tradução. As mutações, neste contexto, acabam por gerar uma proteína com seqüência alterada que, por conseguinte poderá apresentar uma conformação distinta da conformação nativa podendo abolir ou alterar uma determinada função.

Embora muito já se conheça sobre os mecanismos que permitem que uma proteína adote espontaneamente sua estrutura tridimensional definitiva (Weber, 1992), muito ainda há para ser desvendado, principalmente depois da observação de que diversas patologias amiloidogênicas parecem envolver proteínas que adotam uma conformação não nativa, embora suas seqüências de aminoácidos não apresentem nenhuma alteração (Kim e Baldwin, 1990).

O enovelamento protéico é influenciado por várias propriedades físico-químicas como: energia livre, temperatura, força iônica, acidez, concentração de proteínas, pontes dissulfeto, glicosilação, entre outros (Ruddon & Bedows, 1997). Algumas proteínas podem interagir umas com as outras quando expostas em condições não adequadas, como em solução em alta concentração ou em

condições desnaturantes (como o choque térmico), através de regiões hidrofóbicas expostas podem formar agregados protéicos que tendem a precipitar *in vivo* e *in vitro* (Jaenicke *et al.*, 1987; Beissinger & Buchner, 1998)

As falhas no enovelamento protéico, resultando na agregação, além de apresentarem um problema para o estudo de proteínas *in vitro* também podem estar relacionadas com algumas doenças humanas, tais como: mal de Alzheimer, mal de Parkinson, doença de Creutzfeld-Jacob (prion), fibrose cística, doença de Huntington, deficiência de α_1 -antitripsina, alguns tipos de câncer, entre outras (Ruddon & Bedows, 1997; Beisseinger & Buchner, 1998; Chai *et al.*, 1999; Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

A estabilidade de proteínas pode ser medida diretamente usando-se métodos de calorimetria, e indiretamente por mudanças na energia de Gibbs estimadas pelas curvas de transição da proteína nativa para o estado desenovelado (Privalov, 1979; Pace, 1990). Em muitos casos o desenovelamento de uma proteína é um processo cooperativo, no qual somente o estado nativo (N) e o desenovelado (D) estão em equilíbrio (Kumar *et al.*, 2003). As mudanças conformacionais destes dois estados são geralmente observadas por pequenas proteínas com somente um domínio. No processo de desenovelamento todas as moléculas podem ser consideradas como se estivessem em um desses dois estados estruturais ou podem adotar um estado intermediário entre eles. Muitas proteínas, em condições de baixa concentração de desnaturantes, podem adotar esta forma estrutural intermediária geralmente mais semelhante com o estado nativo do que com o estado desenovelado (Ptitsyn e Uversky, 1994). A elucidação da natureza destas transições e da existência ou não de um estado intermediário é um pré-requisito para a análise cinética e termodinâmica do processo de enovelamento de uma proteína (Arnold e Ulbrich-Hofmann, 1997).

8.4. Informações estruturais e espectroscópicas

As proteínas apresentam várias propriedades biofísicas que podem ser analisadas através da interação com ondas eletromagnéticas, liberação ou absorção de calor e também pela interação da proteína com o meio solúvel no qual ela se encontra. Para a realização deste trabalho foram avaliadas algumas propriedades biofísicas das proteínas em solução, para a caracterização da relação estrutura-função das proteínas Xf1510 e Xac2987.

8.4.1. Fluorescência

A fluorescência é uma técnica espectroscópica baseada em um fenômeno quântico no qual um elétron de um determinado cromóforo, após absorver uma determinada quantidade de energia, atinge um estado excitado e, ao retornar ao seu estado basal, emite parte da energia absorvida na forma de luz. O restante da energia absorvida pelo cromóforo pode ser perdido no retorno dos elétrons excitados em outros processos que a emissão de radiação eletromagnética como: calor ou processos químicos e vibracionais. Desta forma, a quantidade de energia emitida na forma de ondas eletromagnéticas é relativamente inferior à energia absorvida (energia de excitação) e o λ da luz emitida é maior do que aquele da luz absorvida. Naturalmente, existem três aminoácidos susceptíveis ao processo de fluorescência: principalmente triptofano, tirosina e em menor escala fenilalanina. Através do estudo das características de fluorescência desses aminoácidos, é possível obter informações a respeito da ocorrência de mudanças estruturais das proteínas relacionadas à atividade que exercem nos organismos vivos (Eftink, 1994; Eftink e Shastry, 1997).

O aminoácido triptofano é sensível ao ambiente no qual ele se encontra, apresentando diferentes características de fluorescência que são dependentes do grau de exposição ao meio hidrofílico ou hidrofóbico. Assim, aliado ao seu alto rendimento quântico, sua baixa frequência em proteínas e possibilidade de excitação específica, a técnica de fluorescência do triptofano tornou-se uma das

mais utilizadas em biofísica molecular, principalmente em estudos relacionados a mudanças conformacionais de proteínas.

O diagrama de Jablonski (Figura 3) mostra os processos de absorção e relaxação de um átomo ou molécula. A absorção de radiação eletromagnética no UV ou visível induz uma transição eletrônica do estado fundamental, S_0 , até algum nível vibracional dos estados eletrônicos excitados, S_1 ou S_2 . Este fenômeno ocorre em um intervalo de tempo da ordem de 10^{-15} s. Os estados eletrônicos fundamentais, primeiro e segundo estados excitados são representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Em cada nível de energia eletrônico existe uma série de níveis de energia vibracionais.

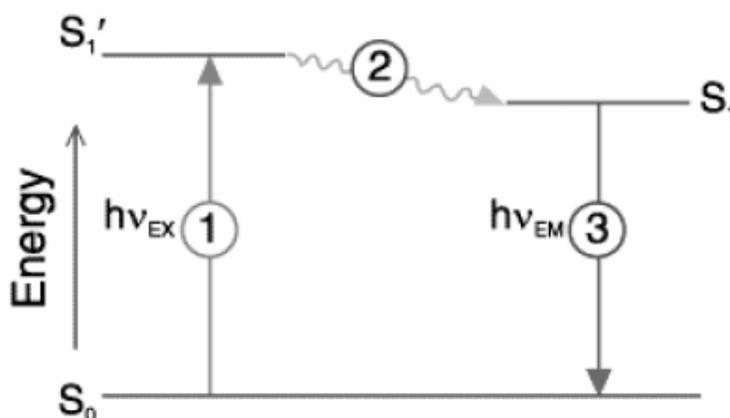


Figura 38. - Diagrama de Jablonski. Estágio 1 – (excitação): um fóton de energia $h\nu_{EX}$ é proporcionado por uma força externa criando um estado eletrônico excitado (S_1'). Estágio 2 – (Tempo de vida do estado excitado): O estado excitado existe por um tempo finito (tipicamente 1-10 nanosegundos). Durante este tempo, o fluoróforo entra em uma mudança conformacional e também sujeito a uma série de possibilidades de interações com moléculas do meio. Este processo tem duas importantes consequências. Primeiro, a energia de S_1' é parcialmente dissipada a um estágio relaxado (S_1) do qual a emissão de fluorescência é originada. Segundo, nem todas as moléculas inicialmente excitadas por absorção (Estágio 1) retornam para o estado S_0 pela emissão de fluorescência. Outros processos tal como um choque químico (quenching) para apagar fluorescência, entre outros, também podem afetar o estágio S_1 . Estágio 3 - (emissão de fluorescência): um fóton de energia $h\nu_{EM}$ é emitido retornando o fluoróforo para S_0 . Devido à energia de dissipação durante o tempo de vida do estado excitado, a energia do fóton é menor, e conseqüentemente de maior comprimento de onda, que a excitação do fóton $h\nu_{EX}$. A diferença na energia ou no comprimento de onda representado por $h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$ é calculado por mudança de Stokes. A mudança de Stokes é fundamental para a sensibilidade da técnica de fluorescência por que permite que a emissão dos fótons seja detectada em baixa concentração, a partir da excitação do fóton (Jelesarov and Bosshard, 2004 – Lecture Course in Protein Biophysics).

8.4.2. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é um fenômeno que ocorre quando a luz circularmente polarizada interage com um cromóforo opticamente ativo (assimétrico) (Revisão Kelly e Prince, 1997). Moléculas opticamente ativas interagem com a luz polarizada e provocam alteração na polarização da luz incidente. O CD é a diferença de absorção, A , da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita: $CD = A_E - A_D$.

O dicroísmo circular (CD) é particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, macromoléculas, sejam elas de origem biológica ou não, como proteínas, carboidratos, entre outros compostos, que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de dicroísmo circular. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente.

A técnica de CD detecta exatamente a alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, após a luz passar pela amostra (Equação abaixo). A informação obtida pelo CD é a elipticidade $[\theta]$.

$$\theta = 2,303(A_E - A_D) \frac{180}{4\pi}$$

Onde: A_E e A_D são, respectivamente, absorbância da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita.

A forma do espectro de CD de proteína depende do seu conteúdo de estrutura secundária (Figura 4). Isto permite que as proporções de α -hélices, estruturas em folha β , alças (turns) e estrutura desordenada (random coil) sejam determinadas. Os ângulos específicos ϕ e ψ do Carbono- α da cadeia polipeptídica são responsáveis pelos espectros de CD característicos das estruturas secundárias.

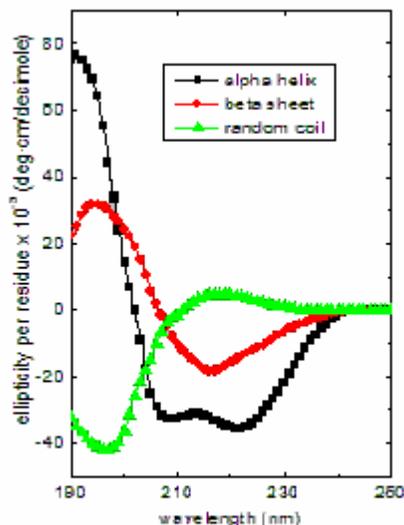


Figura 39. - Figura ilustrativa de espectros de poli-lisina em três conformações. Preto – alfa-hélice; vermelho – folhas β e verde – desestruturada (random coil). Retirado de - (Jelesarov e Bosshard, 2004 – Lecture Course in Protein Biophysics).

Existe uma característica especial da ligação peptídica, que é o fato de que os átomos que a compõem podem interagir com os átomos de outras ligações peptídicas, contribuindo para forçar a proteína a assumir uma estrutura peculiar, não aleatória. Essa forma de estruturação da cadeia protéica origina a chamada "estrutura secundária" da proteína, que pode então assumir arranjos helicoidais em determinados trechos de sua seqüência de aminoácidos. Estudos cristalográficos e de RMN, comprovam que proteínas, de fato, apresentam regiões com arranjos helicoidais, intercaladas com regiões menos estruturadas. Essas formas regulares de arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada, fazendo, por exemplo, com que uma luz com polarização circular no sentido horário (direita) seja absorvida diferentemente do que uma luz com polarização no sentido anti-horário (esquerda). A espectroscopia de dicroísmo circular mede justamente essa diferença de absorção de radiação com polarização circular e permite verificar se estão ocorrendo arranjos helicoidais dentro de uma molécula de proteína. A propósito, cabe dizer que essa observação pode ser feita também em macromoléculas como os ácidos nucléicos.

Através do uso do CD, é possível saber, por exemplo, se mudanças de temperatura, ou de pH, ou a presença de outras moléculas no solvente são capazes de modificar a estrutura secundária da proteína, e se essas modificações de estrutura afetam a atividade biológica da macromolécula. Esta técnica também é aplicada nos estudos sobre o dobramento e a desnaturação de proteínas, e na pesquisa, tanto teórica como experimental, sobre os mecanismos pelo qual uma macromolécula tão grande adota um único arranjo estrutural tão particular e compatível com sua atividade em organismos vivos.

8.4.2.1. Informação sobre estrutura secundária de proteínas por dicroísmo circular

Uma das utilidades do uso da técnica de CD é que vários aspectos de estrutura de proteínas podem ser medidos. Estudo de UV-distante (tipicamente 240 – 190nm) pode ser usado para acessar quantitativamente o conteúdo total de estrutura secundária de uma proteína. Nesta região, o grupo que absorve principalmente são as ligações peptídicas. Existe uma fraca, mas ampla transição $n \rightarrow \pi^*$ centrada ao redor de 210 nm e uma intensa transição $\pi \rightarrow \pi^*$ ao redor de 190 nm. No UV próximo, a cadeia lateral de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) absorve na região de 250 a 290 nm; a estrutura terciária enovelada de cadeias polipeptídicas pode ocupar a região dessas cadeias laterais em ambientes quirais, assim dando uma elevação no espectro do CD que pode caracterizar o modelo da estrutura nativa. Em modelo contendo pontes de dissulfeto, o ângulo diédrico dessas ligações pode frequentemente ser deduzido no espectro de CD na região de 240-290 nm (Revisão Kelly e Prince, 1997). No caso de proteínas ricas em pontes de dissulfeto, a análise pode ser dificultada por causa da sobreposição dos sinais das pontes dissulfeto com o sinal das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos (Takagi e Ito, 1972; Adler *et al.*, 1973; Kozen *et al.*, 1981; Woody, 1995; Chaffotte *et al.*, 1992). Finalmente, componentes que não fazem parte da proteína, ou cofatores, como as flavinas, pirodoxal 5' fosfato, entre outros, podem absorver em regiões do espectro bem separadas daqueles

aminoácidos e ligações peptídicas. O sinal de CD nessas regiões pode ser usado para fornecer informações detalhadas do ambiente desses cromóforos (Kelly e Prince, 1997).

8.4.2.2. CD UV-distante de proteínas (dicroísmo de ligações peptídicas)

Há muitos anos sabe-se as diferentes formas de estrutura secundária encontradas em peptídeos e proteínas exibidas nos espectros CD UV-distante. A tarefa de acompanhar no espectro e deduzir a contribuição das diferentes formas estruturais por técnicas espectroscópicas, reflete o sinal da média entre uma população de moléculas. O fato de dizer que uma proteína tem 50% de alfa-hélice, não pode determinar quais resíduos específicos são envolvidos na conformação helicoidal.

8.4.2.3. Informação sobre estrutura terciária de proteínas por dicroísmo circular

O espectro de CD na região do UV-próximo (250-350nm) pode ser sensível a certos aspectos da estrutura terciária. Nestes comprimentos de onda os cromóforos são os aminoácidos aromáticos e as pontes dissulfeto, e os sinais de CD que eles produzem são sensíveis por toda a estrutura terciária da proteína. Sinais na região de 250-270 nm são atribuídos aos resíduos de fenilalanina, sinais de 270-290 nm são atribuídos a tirosinas, e aqueles de 280-300 nm são atribuídos aos triptofanos. Pontes de dissulfeto aumentam o sinal em toda a região do UV-próximo.

Se uma proteína mantém estrutura secundária, mas não tem estrutura terciária definida, o sinal na região do UV-próximo será próximo de zero. Por outro lado, a presença de sinal nesta região é um bom indício de que a proteína foi enovelada corretamente.