

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Vanessa Rodrigues Pegos**

**“Estudos Estruturais e Funcionais das Enzimas SsuD e SsuE do Sistema de Transporte do Tipo ABC de alceno sulfonatos e da proteína ligadora periplasmática Pbp da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Vanessa Rodrigues Pegos e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Andréa Balan Fernandes

Campinas, 2011

<b>P349e</b>	<p>Pegos, Vanessa Rodrigues Estudos estruturais e funcionais das enzimas SsuD e SsuE do sistema transportador do tipo ABC de alceno sulfonatos e da proteína ligadora periplasmática PbP da bactéria <i>Xanthomonas axopodis</i> pv. <i>citri</i> / Vanessa Rodrigues Pegos. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadora: Andréa Balan Fernandes. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Enxofre. 2. Transportadores de cassetes de ligação de ATP. 3. Oxidorredutases. 4. <i>Xanthomonas axopodis</i> pv. <i>citri</i>. I. Fernandes, Andréa Balan. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Structural and functional studies of the enzymes SsuD and SsuE from the alkanesulphonate ABC transporter and the periplasmic binding protein (PbP) from *Xanthomonas axopodis* pv. *citri*.

**Palavras-chave em inglês:** Sulfur; ATP-Binding casset transporters; Oxidoreductases; *Xanthomonas axopodis* pv. *citri*.

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos.

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

**Banca examinadora:** Andréa Balan Fernandes, Ana Carolina Zerri Mattos, Celso Eduardo Benedetti.

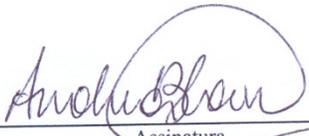
**Data da defesa:** 25/01/2011.

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

Campinas, 16 de Fevereiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

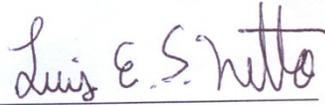
Prof(a). Dr(a) . Andréa Balan Fernandes

  
Assinatura

Profa. Dra. Celso Eduardo Benedetti

  
Assinatura

Prof(a). Dr. Luís Eduardo Soares Netto

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Adriana Franco Paes Leme

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Ana Carolina Matos Zeri

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Ao meu pai Luís Rodrigues Pegos e  
à minha mãe Marta Regina Percin Pegos.  
Por tudo que investiram em mim e por entenderem os meus esforços e ausência ...

## AGRADECIMENTOS

Caros amigos e colegas é ao som de Astor Piazzolla que escrevo para vocês.....

Durante boa parte do tempo desses dois anos eu pensei como transcreveria em palavras meu sentimento de gratidão para as pessoas que fizeram parte e fazem parte da minha vida...

Quero começar preenchendo esse singelo espaço para uma pessoa muito especial: A CHEFA, Andréa Balan. Uma mulher, um exemplo de competência, uma professora e uma orientadora. Balan, obrigada por esse tempo que passou a me orientar! Não tenho palavras para descrever a boa energia que sinto de você. Você é elementar na minha formação, sempre atenciosa, disposta para discussões, extremamente **motivadora** e onipresente! Obrigada!!

Não posso esquecer-me de deixar registrado aqui a minha enorme gratidão a minha amiguinha Carolina Santacruz Perez. Amiga e companheira de trabalho com discussões pertinentes e colocações valiosas em momentos únicos desde os tempos de iniciação científica... Amiguinha!! Adoro você!

Aos amigos que desde sempre me acompanharam nos momentos mais difíceis e sempre me escutaram e aconselharam-me:

Nadia Helena Martins: Nadita, se você soubesse a força que você já me deu!! Amiga, muito obrigada pela companhia, conselhos e discussões e paciência para escutar minhas RECLAMAÇÕES, às vezes, incessantes. VOCÊ tem a sensatez em momentos ímpares.

À Andréia Meza Navarro por todos os conselhos, conversas, auxílios e momentos impagáveis coma sua gargalhada fatal!!

À Givanil que desde o meu ingresso no LNBio sempre foi uma grande amiga!! E salve as música antigas...

À Tereza Lima que com suas colocações de humor inteligente e contagiante me faz, ao final do dia, sempre ter algo inenarrável para contar aos meus pais. Tere!! Não vou escravizar a minha irmã... risos

À Renata Rocha de Oliveira. Rê, sem comentários por TODAS às vezes que você colocou luz no fim do túnel! Por todas as discussões relevantes que já tivemos e as lições elementares que você me passou nesses três anos que convivemos diariamente... Obrigada!

Ao Júlio César da Silva que além de escutar minhas reclamações nesses últimos dois anos me ajudou em momentos conclusivos e se não cruciais!! Obrigada, Julito!! Você é 10!

À Cristiane Tambascia: Mano, QUERIDAAA, Cris ou Tambascia. Obrigada por ser companheira de **inenarráveis** momentos. A todos os jargões, risadas, discussões e idéias sensacionais! Em pensar que você estudou comigo dois anos e a gente sentava perto, mas não tínhamos contato!!!

Ao Wanderley, por ser um amigão de laboratório, de me deixar a par de toda a pirataria do mundo da tecnologia e ainda me dar um apelido peculiar: Vanusa....

À Jaqueline do LPP. Jacque, muito obrigada!!!

Não posso deixar de colocar aqui meus agradecimentos ao Professor João Alexandre por ter me incentivado a ingressar no mestrado após um ano e meio de orientação na iniciação científica. Obrigada, João!

Aos meus professores de graduação, em especial a Profa. Patrícia Melo por me ajudar em momentos ímpares seja com burocracias ou para me dar importantes notícias e confiar no meu aspirante talento! Obrigada Patrícia.

**A todos** os companheiros, funcionários, técnicos e pesquisadores do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

Ao Dr. Paulo Sérgio Oliveira e Dr. José Xavier Neto, também do LNBio.

Ao professor Luís Eduardo Soares Netto da Universidade de São Paulo (USP) e seus alunos Eduardo Hidroshi e Karen Discola pela assistência, disponibilidade de tempo, espaço, valiosas discussões e orientações experimentais que recebi.

À FAPESP pelo suporte e apoio financeiro.

Ao LNBio pela infra-estrutura.

E a minha irmã Juliana Rodrigues Pegos por fazer mini-prep. Jú, eu não tentei te escravizar como lhe disseram, risos...

**Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estivermos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.**

(Dalai Lama)

## Resumo

A captação de sulfato em *Escherichia coli* é dependente do transportador do tipo ABC (do inglês, **A**T**P** **B**inding **C**assete), SbpCysAWD, pertencente a um regulon que envolve 26 genes. Na ausência de sulfato, a bactéria induz a expressão de dois outros transportadores ABC, o de proteínas do sistema de transporte de alcanosulfonatos (SsuABCDE) e de sulfonatos alifáticos (TauABCDE), que são responsáveis pela captação, incorporação e oxidação destes compostos a sulfito e aldeído. Embora não comprovado funcionalmente, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* apresenta todos os genes envolvidos neste regulon e, neste trabalho, dando continuidade à caracterização do transportador SsuABCDE, foi realizada pela primeira vez, a caracterização estrutural e funcional das enzimas SsuD e SsuE. Análises bioquímicas associadas às análises de bioinformática e modelagem molecular, revelaram que as enzimas SsuD e SsuE constituem um sistema de dois componentes, no qual a SsuD seria a óxido-redutase responsável pela oxidação do NAD(P)H, seguida da redução da FMN. A proteína foi expressa e purificada a partir de células de *E. coli* com massa molecular de 39 kDa, e se organiza na forma de um octâmero, conforme demonstrado por experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo e ultra-centrifugação. O modelo da estrutura tridimensional da SsuD revela uma proteína com enovelamento barril-TIM, com conservação de resíduos que permitem a oligomerização e a interação com NAD(P)H, mas não com flavina. Ensaio enzimáticos mostraram que a SsuD liga NADP(Pbp) com alta afinidade (0,21  $\mu\text{M}$ ) e é capaz de oxidá-lo conforme os parâmetros cinéticos de  $K_m$ : 0.1877  $\mu\text{M}$ ;  $K_{cat}$ : 7,192  $\text{s}^{-1}$ ;  $V_{m\acute{a}x}$ : 0.7911  $\mu\text{M}/\text{min}$ ;  $K_{cat}/K_m$ :  $3,8 \times 10^7 \text{ m}^{-1}\text{S}^{-1}$ . Ainda, foram obtidos cristais da SsuD em diferentes condições as quais estão em fase de refinamento. As análises de bioinformática da SsuE sugerem que ela seja a óxido-redutase do sistema. O trabalho ainda mostra a caracterização da proteína Pbp de *X. axonopodis*, do suposto sistema de transporte de fosfonatos. A Pbp foi expressa com massa molecular de 33 kDa, e as análises espectroscópicas revelaram alterações conformacionais na estrutura secundária na presença de fosfonatos e fosfato, bem como aumentada estabilidade térmica na presença de espermidina, usada nos ensaios de cristalização. Cristais foram obtidos em diferentes condições e devem ser usados para os testes de difração. Os resultados apresentados neste trabalho revelam dados de proteínas e sistemas de *X. axonopodis* ainda não estudados e serão importantes para direcionar futuros estudos sobre a função destas na bactéria, tanto em condições laboratoriais, como em testes *in vivo*, durante infecção na planta.

Palavras chave: alcano sulfonatos; SsuD; SsuE; Óxido-redutases; Transportadores ABC; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; sistema de captação de fosfonatos;

## Abstract

Sulfur uptake in *Escherichia coli* is dependent of the ABC transporter SbpCysAWD (**ATP Binding Cassete**), which belongs to a regulon with 26 genes. In the sulfate absence, the bacteria induces the expression of two other ABC transporters, for alkanesulfonates (SsuABCDE) and aliphatic sulfonates (TauABCDE), which are responsible for the uptake and oxidation of these compounds to sulfite and aldehyde. Although its functionality has been not showed, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* has all the genes involved in this regulon, including the alkanesulfonate transporter and enzymes. In order to continue the characterization of this transport, this work shows for the first time, the structural and functional characterization of the proteins SsuD and SsuE. Biochemical analyses associated to the bioinformatics and molecular modeling tools revealed that the SsuD and SsuE form a two-components system, where SsuD is the oxidoreductase responsible for the NAD(P)H oxidation followed by the FMN reduction. The protein was expressed and purified from *E. coli* cells with a molecular mass of the 39 kDa and it is organized in a octamer, such was demonstrated by the small angle scattering X-ray and ultra-centrifugation assays. The tri-dimensional model of SsuD reveals a TIM barrel folding and conservation of residues that allow the oligomerization and NADP interaction. Enzymatic assays showed a high affinity binding of SsuD and NADP (0,21  $\mu\text{M}$ ) and that the protein was able to obtain the cinetic parameters, such as  $K_m$ : 0.1877 $\mu\text{M}^{-1}$ ;  $K_{cat}$ : 7,192  $\text{s}^{-1}$ ;  $V_{m\acute{a}x}$ : 0.7911  $\mu\text{M}/\text{min}$ ;  $K_{cat}/K_m$ : 3,8x 10<sup>-7</sup>  $\text{m}^{-1}\text{S}^{-1}$ . Indeed, SsuD crystals were obtained in different conditions. The work still shows the charactrization of the Pbp protein, from *X. axonopodis*, believed to be the fosfonate/fosfate binding protein. Pbp was expressed with a molecular mass of 33 kDa, and spectroscopic analyses revealed conformational changes at the secondary structure content in presence of fosfonates, as well as an increased thermal stability in presence of spermidine, which was used for the crystallization trials. Crystals were obtained but still not tested. All results presented in this work can bring some light to the strategies that *X. axonopodis* uses for growth and infection and they will direct our studies for laboratorial and in vivo analyses.

Key words: alkanesulfonates; SsuD; SsuE; Oxidoreductases; ABC transporters; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; uptake phosphonate system;

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 SINTOMAS DO CANCRO CÍTRICO EM FOLHAS DE LARANJA. A) ÁREAS EM AMARELO: ÁREA NECRÓTICA (STALL, *ET AL*, 1983). B) LARANJAS INFECTADAS COM *XAC* APRESENTANDO PATOLOGIAS NO TECIDO VEGETAL. FOTOGRAFIA RETIRADA DO SITE DA FUNDAÇÃO DE DEFESA DA CITRICULTURA. (WWW.FUNDECITRUS.COM.BR). ..... 25
- FIGURA 2 REPRESENTAÇÃO EM “CARTOON” DO SISTEMA ABC IMPORTADOR DE MOLIBDATO DE *ARCHAEOGLOBUS FULGIDUS* EVIDENCIANDO OS TRÊS COMPONENTES BÁSICOS: PROTEÍNA PERIPLASMÁTICA (EM VERMELHO), PROTEÍNAS DE MEMBRANA (AMARELO E AZUL) E ATPASES (VERDE E ROSA). RETIRADO DE HOLLENSTEIN *ET AL*. (2007). ..... 26
- FIGURA 3 ESQUEMA MOSTRA A INTERAÇÃO ENTRE AS SUBUNIDADES DE MEMBRANA COM OS DOMÍNIOS NBDs LIGADOS AO ATP QUE ATRAVÉS DA HIDROLISE DO ATP CONDUZ ALTERAÇÕES CONFORMACIONAL DO COMPONENTE DE MEMBRANA PERMITINDO COM QUE O SUBSTRATO SEJA TRANSLOCADO PELO CANAL TRANSMEMBRANA (LOCKER 2009). ..... 28
- FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO EM CARTOON DO MUTANTE DA PROTEÍNA PERIPLASMÁTICA LIGADORA DE MOLIBDATO DO SISTEMA DE TRANSPORTE DO TIPO ABC DE *XAC*, RESOLVIDA PELO NOSSO GRUPO (PDB: 3GZG; SANTACRUZ *ET AL*, 2006). O MOLIBDATO É REPRESENTADO EM AMARELO NO INTERIOR DA FENDA, SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA. OS DOIS DOMÍNIOS SÃO FORMADOS POR FOLHAS BETA CIRCUNDADAS POR HÉLICES-ALFA EM CADA LOBO, CARACTERIZANDO A TOPOLOGIA  $\alpha/\beta$ , PECULIAR DESTE GRUPO PROTÉICO. .... 28
- FIGURA 5 COMPARAÇÃO DE TRANSPORTADORES ABC DO TIPO IMPORTADORES COMPLETOS ENCONTRADOS ..... 30
- FIGURA 6 GENES DO REGULON CYS PRESENTE EM *ESCHERICHIA COLI* K12 (CAIXA CINZA) E O CORRESPONDENTE ENCONTRADO EM *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. CITRI. GENES CUJAS IDENTIDADES FORAM ABAIXO DE 20% FORAM MOSTRADOS COM (?). ..... 33
- FIGURA 7 REAÇÃO DE DESULFONIZAÇÃO (REDUÇÃO DO ALCANO SULFONATO A SULFITO E ALDEÍDO, REALIZADA EM *E. COLI* PELAS PROTEÍNAS SsUD E SsUE (EICHHORN *ET AL*, 1999). ATENTAR PARA O FATOS DE QUE SsUD E SsUE DE *E. COLI* APRESENTAM NOMENCLATURA TROCADA EM *XAC*. ..... 36
- FIGURA 8 FUNÇÃO DA ENZIMA SsUE (ÓXIDOREDUCTASE) EVIDENCIANDO O MECANISMO DE ORDEM. .... 36
- FIGURA 9 MECANISMO DE REAÇÃO DA ENZIMA SsUD DE *E. COLI* (MONO-OXIGENASE DEPENDENTE DE ..... 37
- FIGURA 10 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DO FUNCIONAMENTO DO SISTEMA DE ..... 41
- FIGURA 11 CARACTERIZAÇÃO DO OPERON DO SISTEMA DE TRANSPORTE DE FOSFATO DE *X. AXONOPODIS* E ..... 42
- FIGURA 12 MAPA DO VETOR DE CLONAGEM PET28A (NOVAGEN®) UTILIZADO PARA A CLONAGEM DOS GENES SsUD E SsUE DO ÔPERON DO SISTEMA TRANSPORTADOR DO TIPO ABC DE ALCANO SULFONATOS. .... 46
- FIGURA 13. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EVIDENCIANDO A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES SsUD *XAC*. 1. MARCADOR DE MASSA MOLECULAR - #SM0403 – FERMENTAS®; 2. FRAGMENTO DE PCR CODIFICANDO O GENE SsUD (1041) PB. .... 57
- FIGURA 14 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS FRAGMENTOS DE DNA PLASMIDIANO (PET28A) E DE INSERTO (GENE SsUD) APÓS A CLIVAGEM COM AS ENZIMAS DE INTERESSE. 1: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR - #SM0403 – FERMENTAS®; 2: PET28A DIGERIDO COM NDEI/ECORI (~5600 PB)- LINEARIZADO; 3: PET28A DIGERIDO COM NCOI/HINDIII; 5: SsUD (1041 PB) DIGERIDO COM NDEI/ECORI; 6: PET28A NÃO DIGERIDO USADO COMO CONTROLE DA DIGESTÃO. .... 58
- FIGURA 15. GEL DE AGAROSE 0.8% PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DO INSERTO REFERENTE AO GENE SsUD DE *XAC*: TRÊS CLONES. GEL A: LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR - #SM0403 – FERMENTAS®; LINHA 2, 3 E 4) DNA PLASMIDIAL PET28A/SsUD CLIVADO COM AS ENZIMAS DE INTERESSE PARA A LIBERAÇÃO DO INSERTO REFERENTE AO GENE SsUD, 1 KB OBTIDO. .... 58
- FIGURA 16. ANÁLISE DA EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SsUD DE *XAC* NAS CEPAS *E. COLI* BL21(DE3) EVIDENCIADA EM SDS-PAGE 13%. OBSERVE EM A AERAÇÃO EM 75% DO FRASCO CULMINA NA INSOLUBILIDADE, DIFERENTEMENTE DA AERAÇÃO DO FRASCO DE INDUÇÃO COM 50% EM B. CONDIÇÕES TESTADAS: 37°C/ 200 R.P.M/ 2 HORAS. SETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA SsUD COM 39 kDa. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431); 2: EXTRATOS CELULARES TOTAIS DE CULTURAS NÃO INDUZIDAS (TEMPO ZERO - T0); 3:

- EXTRATOS CELULARES TOTAIS DE CULTURAS INDUZIDAS (TEMPO DOIS - T<sub>2</sub>); 4: EXTRATOS CELULARES SOLÚVEIS; 5: EXTRATOS CELULARES INSOLÚVEIS. .... 59
- FIGURA 17. ANÁLISE DA EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SsUD DE XAC NAS CEPAS *E. COLI* BL21(DE3) EVIDENCIADA EM SDS-PAGE 13%. CONDIÇÕES TESTADAS: 17°C/ 200 R.P.M/ 18 HORAS E 17°C/ SEM AGITAÇÃO/18 HORAS. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431); 2 E 7: EXTRATOS CELULARES TOTAIS DE CULTURAS NÃO INDUZIDAS (TEMPO ZERO - T<sub>0</sub>); 3 E 8: EXTRATOS CELULARES TOTAIS DE CULTURAS INDUZIDAS (TEMPO DOIS - T<sub>2</sub>); 4, 5 E 9: EXTRATOS CELULARES SOLÚVEIS; 6 E 10: EXTRATOS CELULARES INSOLÚVEIS. NOTA-SE PELA CANALETA 9 QUE A PROTEÍNA SsUD NÃO É EXPRESSA NA AUSÊNCIA DE AGITAÇÃO. PRESENÇA DA PROTEÍNA CONFIRMADA, TAMBÉM, POR WESTERN BLOT..... 60
- FIGURA 18. ANÁLISE DA EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SsUD DE XAC NAS CEPAS *E. COLI* BL21(DE3) – CONTROLE EXPERIMENTAL-, *E.COLI* BL21(DE3) TRX E SI EVIDENCIADA EM SDS-PAGE 13%. CONDIÇÕES TESTADAS: 37°C/ 200 R.P.M/ 2 HORAS. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431); 2, 6 E 10: EXTRATOS CELULARES TOTAIS DE CULTURAS NÃO INDUZIDAS (TEMPO ZERO - T<sub>0</sub>); 3, 7 E 11: EXTRATOS CELULARES TOTAIS DE CULTURAS INDUZIDAS (TEMPO DOIS - T<sub>2</sub>); 4, 8 E 12: EXTRATOS CELULARES SOLÚVEIS; 5, 9 E 13: EXTRATOS CELULARES INSOLÚVEIS. AS SETAS EM PRETO INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA ALVO. .... 61
- FIGURA 19. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SsUD EM CEPA DE *E. COLI* BL21 PLYSS POR SDS-PAGE 13%. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431); 2. AMOSTRA DE EXTRATO CELULAR DE CULTURA NÃO INDUZIDA (TEMPO ZERO - T<sub>0</sub>); 3. AMOSTRA DE EXTRATO CELULAR DE CULTURA INDUZIDA (TEMPO DOIS - T<sub>2</sub>); 4. EXTRATO CELULAR SOLÚVEL E 5. EXTRATO CELULAR INSOLÚVEL. A SETA EM PRETO INDICA A LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA ALVO. .... 62
- FIGURA 20. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE A NÍQUEL (IMAC) DA PROTEÍNA SsUD DE XAC, ANALISADA POR SDS-PAGE 13%. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431). 2. FRAÇÃO DO LAVADO REFERENTE ÀS PROTEÍNAS QUE NÃO LIGARAM NA COLUNA; 3. LAVAGEM COM 15 ML DE TAMPÃO DE PURIFICAÇÃO. 4 À 15. GRADIENTE DE ELUIÇÃO COM IMIDAZOL, SENDO QUE AS 9 A 15 FORAM O ÚNICO PICO DO CROMATOGRAMA DE PURIFICAÇÃO. A ELUIÇÃO DESTES PICOS ACONTECEU COM APROXIMADAMENTE 500 mM DE IMIDAZOL. A SETA EM PRETO INDICA A LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA. .... 63
- FIGURA 21. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE A NÍQUEL (IMAC) ANALISADA POR SDS-PAGE 13%. A) SDS-PAGE REFERENTE AOS PICOS OBSERVADOS NO CROMATOGRAMA APÓS A CROMATOGRAFIA. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431). 2. EXTRATO CELULAR SOLÚVEL EJETADO DA COLUNA; 3. LAVAGEM COM 3 VOLUMES DA COLUNA ( 3 x 1ML) COM TAMPÃO DE PURIFICAÇÃO; 4,5,6,7 E 8. ELUIÇÃO DA PROTEÍNA SsUD 150 mM DE IMIDAZOL. B) ENSAIOS DE WESTERN BLOT PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DA PROTEÍNA SsUD E SEU FRAGMENTO COM 29 KDA. 1 E 2: PROTEÍNA SsUD (BLOTTING REALIZADO EM DUPLICATA) C) RESULTADO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EVIDENCIANDO O FRAGMENTO OBTIDO E O POSSÍVEL SÍTIOS DE CLIVAGEM DA PROTEÍNA SsUD (RESÍDUOS EM CINZA) NA SUA REGIÃO C-TERMINAL. A REGIÃO CLIVADA É EVIDENCIADA EM CINZA CHUMBO NO MODELO DA PROTEÍNA SsUD, E SERIA ALVO DE SERINOPRETEASES. .... 64
- FIGURA 22. ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SsUD. A) CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE A NÍQUEL (IMAC) DA PROTEÍNA SsUD DE XAC, ANALISADA POR SDS-PAGE 13%. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431). 2. FRAÇÃO DO LAVADO REFERENTE ÀS PROTEÍNAS QUE NÃO LIGARAM NA COLUNA; 3. LAVAGEM COM 15 ML DE TAMPÃO DE PURIFICAÇÃO. 4 À 7. GRADIENTE DE ELUIÇÃO COM IMIDAZOL EM 100 mM DE IMIDAZOL. B) GEL FILTRAÇÃO DA PROTEÍNA SsUD EM TAMPÃO TRIS 20 MM PH 8.0 NA COLUNA SUPERDEX 16/60 200. .... 64
- FIGURA 23. ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA SsUD DE XAC CONSTRUÍDA COM O PROGRAMA CLUSTALW2 NO FORMATO PHYLIP PELO MÉTODO NEIGHBOUR JOINING. .... 67
- FIGURA 24. RELAÇÕES DE ASSOCIAÇÃO DA SsUD COM OUTRAS PROTEÍNAS DE XAC, EVIDENCIADAS PELO PROGRAMA STRING. A) REDE DE PROTEÍNAS QUE POSSIVELMENTE APRESENTAM ALGUM TIPO DE ASSOCIAÇÃO COM A SsUD (EM VERMELHO). B) RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E SUAS FUNÇÕES PREDITAS. CONFORME MOSTRA A FIGURA, AS RELAÇÕES FORAM TODAS BASEADAS NA PRESENÇA DOS RESPECTIVOS GENES EM MESMO OPERON. .... 68
- FIGURA 25. ANÁLISE DA PRESENÇA DA SsUD DE XAC, SEUS ORTÓLOGOS E PROTEÍNAS RELACIONADAS SEGUNDO O STRING EM DIFERENTES ORGANISMOS. A SsUD É APRESENTADA EM VERMELHO E A

- ORGANIZAÇÃO GENÔMICA ENCONTRADA EM GAMAPROTEOBACTÉRIAS É EVIDENCIADA, COM AS RESPECTIVAS FUNÇÕES PREDITAS DE CADA GENE. A ÁRVORE MOSTRA OS GENES VIZINHOS NOS GENOMAS DOS ORGANISMOS. GENES CONECTADOS POR LINHAS PRETAS SÃO IMEDIATAMENTE ADJACENTES NO GENOMA. GENES COM MÚLTIPLAS CORES DE MAPA INDICAM EVENTOS DE FUSÃO. PEQUENAS SETAS REPRESENTAM GENES VIZINHOS MAS QUE NÃO APRESENTAM SIMILARIDADE RELEVANTE..... 69
- FIGURA 26. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS SsUD DE *XAC* E A ÓXIDO-REDUTASE IDENTIFICADA EM *S. TYPHIMURIUM*, USADO PARA A CONSTRUÇÃO DO MODELO DE SsUD DE *XAC* SEGUNDO O PROGRAMA MODELLER. .... 72
- FIGURA 27. A) REPRESENTAÇÃO EM CARTOON DO MODELO DA PROTEÍNA DE *XAC* (VISTA SUPERIOR), MODELADA POR HOMOLOGIA A PARTIR DA ÓXIDO-REDUTASE DE *S. TYPHIMURIUM* (PDB: 3ERP) USANDO O PROGRAMA MODELLER. A PROTEÍNA SsUD APRESENTA 8 HÉLICES-ALFA (VERMELHO) E UMA FOLHA BETA CONSTITUÍDA DE 6 FITAS (AMARELO). N E C-TERMINAIS ESTÃO ANOTADOS COMO N E C, RESPECTIVAMENTE B) SOBREPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA SsUD COM A ÓXIDO-REDUTASE DE *S. TYPHIMURIUM* EVIDENCIANDO O QUANTO À PROTEÍNA SE ADEQUA AO MOLDE USADO, COM UM BAIXO R.M.S.D..... 73
- FIGURA 28. ALINHAMENTO ESTRUTURAL BASEADO NA SOBREPOSIÇÃO DO MODELO DA PROTEÍNA SsUD DE *XAC* E A 3ERP (ÓXIDO-REDUTASE DE *S. TYPHIMURIUM*). É POSSÍVEL OBSERVAR QUE AS REGIÕES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA SÃO CONSERVADAS (CILINDRO: HÉLICES-ALFA; SETA: FOLHAS-BETA). AINDA SÃO MOSTRADOS OS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO QUE PODEM LIGAR À NAD(P)H (EM AMARELO), SEGUNDO AS ANÁLISES DAS INTERAÇÕES FEITA NA PROTEÍNA YvGN DE *B. SUBTILIS* (PDB 3D3F), TAMBÉM CONSERVADOS EM SsUD E 3ERP. .... 74
- FIGURA 29. COMPARAÇÃO DA SsUD DE *XAC* COM OUTRAS ÓXIDO-REDUTASES. (A) SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRI-DIMENSIONAIS DAS PROTEÍNAS YvGN E ALDOCETOREDUTASE DE *B. SUBTILIS* (EM AMARELO E ROSA, RESPECTIVAMENTE), ÓXIDO-REDUTASE DE *S. TYPHYMURIUM* (EM VERDE) E SsUD DE *XAC* (EM AZUL). (B) RESULTADOS DA SOBREPOSIÇÃO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA SsUD COM AS ÓXIDO-REDUTASES DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* (3ERP), YvGN (1PZ1) E ALDOCETOREDUTASE (3E3F) DE *BACILLUS SUBTILIS*. (C) ALINHAMENTO SEQUENCIAL DAS PROTEÍNAS EVIDENCIANDO A CONSERVAÇÃO DOS RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DIRETA COM O NAD(P) E NAD(P)H (VERDE) E DE CONSTITUIÇÃO DO BOLSÃO PARA FORMAÇÃO DO SÍTIO ATIVO DAS ENZIMAS (EM CINZA). EM AMARELO, SÃO MOSTRADOS RESÍDUOS ENVOLVIDOS EM OLIGOMERIZAÇÃO EM MONOOXIGENASES. .... 75
- FIGURA 30. DETALHE DA SOBREPOSIÇÃO DA POSSÍVEL REGIÃO DE INTERAÇÃO DAS ÓXIDO-REDUTASES COM O NAD(P)H (BASEADO NA ESTRUTURA DA YvGN DE *B. SUBTILIS*). A) SsUD DE *XAC* E YvGN DE *B. SUBTILIS* (PDB: 3D3F, RMSD: 2.1 Å); B) SsUD DE *XAC* E ALDO-CETO REDUTASE DE *B. SUBTILIS* (PDB:1PZ1, RMSD: 1.8 Å) E C) SsUD DE *XAC* E ÓXIDO-REDUTASE DE *S. TYPHIMURIUM* (PDB:3ERP, RMSD: 0.3 Å). OS RESÍDUOS SÃO APRESENTADOS NA FORMA DE PALITOS SENDO SALMÃO PARA SsUD DE *XAC*, AMARELO PARA YvGN, OLIVA PARA A ALDO-CETO REDUTASE DE *B. SUBTILIS* E AZUL PARA A ÓXIDO-REDUTASE DE *S. TYPHIMURIUM*. O NAD(P)H É MOSTRADO EM VERDE CLARO NO CENTRO DO BOLSÃO. OS RESÍDUOS SÃO NOMEADOS CONFORME A PRIMEIRA LETRA DA SIGLA, SENDO PRIMEIRO OS RESÍDUOS DAS ESTRUTURAS E EM SEGUNDO OS RESÍDUOS DA SsUD. RESÍDUOS CONSERVADOS SÃO MOSTRADOS EM NEGRITO. .... 76
- FIGURA 31. LOCALIZAÇÃO DO NAD(P)H NA PROTEÍNA SsUD BASEADA NA LOCALIZAÇÃO DO NAD(P)H EM ÓXIDO-REDUTASES COM SIMILARIDADE ESTRUTURAL À PROTEÍNA SsUD. (A) VISTA LATERAL DA PROTEÍNA SsUD COM O NAD(P)H SITUADO NA SUPERFÍCIE E ENTRADA DO BARRIL TIM, EM CARTOON E SUPERFÍCIE. (B) VISÃO SUPERIOR, EVIDENCIANDO A ENTRADA DO BARRIL E O POSICIONAMENTO DO NAD(P)H NA SUPERFÍCIE LATERAL. (C) COMPARAÇÃO ENTRE O POTENCIAL ELETROSTÁTICO DAS PROTEÍNAS YvGN (ESQUERDA) E A SsUD (DIREITA) EVIDENCIANDO O SÍTIO DE INTERAÇÃO DO LIGANTE POSITIVAMENTE CARREGADO..... 77
- FIGURA 32 ANÁLISE DE DOCKING MOLECULAR EVIDENCIANDO AS REGIÕES DE INTERAÇÃO ENTRE A FMN E O NAD(P)H NO MODELO DA PROTEÍNA SsUD DE *XAC*. A) REPRESENTAÇÃO EM CARTOON DA LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA SsUD DE *XAC*. OS LIGANTES NAD(P)H ( STICK VERDE) E A FMN ( STICK AZUL) ESTÃO CO-LOCALIZADOS E PRÓXIMO A ELES EM STICK ROSA ESTÁ A HISTIDINA 139, POSSÍVEL RESÍDUO RESPONSÁVEL PELO ATAQUE AO NAD(P)H PARA TRANSFERÊNCIA DOS ELÉTRONS À FMN. B) REPRESENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE DA PROTEÍNA SsUD DE *XAC*. EM AMARELO, O SÍTIO HIDROFÓBICO DO NAD(P)H E EM AZUL CLARO A FMN EXPOSTA. AMBOS OS SUBSTRATOS ESTÃO

MUITO PRÓXIMOS O QUE FACILITARIA O ATAQUE DA HIS139 AO NAD(P)H PARA A REDUÇÃO DA FMN. .....	78
FIGURA 33. ESPECTROPOLARIMETRIA EM FAR-UV E FRAÇÃO ENOVELADA DA PROTEÍNA SsUD EM PH 3,6, 5,0, 7,0, 8,0 E 10.....	80
FIGURA 34. ESPECTROPOLARIMETRIA DA PROTEÍNA SsUD NA PRESENÇA DE FMN E NAD(P)H. (A) ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR FAR-UV UTILIZANDO 0.2 MG/ML DA PROTEÍNA SsUD NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE 20µM FMN E 20 µM NAD(P)H. (B). ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA SsUD MEDIDA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS SEUS POSSÍVEIS LIGANTES. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS NAS MESMAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DESCRITAS. ....	82
FIGURA 35 ESPECTRO DE VARREDURA DA PROTEÍNA SsUD (18 µM E OS SUBSTRATOS FMN (50 µM) E NAD(P)H (200 µM) EM TAMPÃO TRIS 20 mM PH 8.0 NO ESPECTROFOTÔMETRO JASCO 510. ....	84
FIGURA 36 DECAIMENTO DE NAD(P)H (200 µM) NA PRESENÇA DE SsUD (11 µM) E FMN (20 µM) E SEM FMN. EXPERIMENTO REALIZADO NO ESPECTRO UV VISIBLE-CARY 50 BIO-VARIAN.....	85
FIGURA 37 TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA (ITC) DE SsUD COM DIFERENTES SUBSTRATOS. A) DE 500 µM DE NAD(P)H EM 40 µM SsUD; B) FMN E NAD(P)H E C) FMN.....	87
FIGURA 38. DISTRIBUIÇÃO DO COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO OBTIDO PARA PROTEÍNA SsUD DE XAC. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS COM TRIS 20 mM PH 8.0 COM 1,66 MG/ML A 20°C. A CURVA MOSTRA A MASSA MOLECULAR CORRESPONDENTE A UM OCTÂMERO. ....	89
FIGURA 39. DADOS DE SAXS DA PROTEÍNA SsUD DE XAC, MOSTRA A CURVA DE ESPALHAMENTO (o) E O AJUSTE DA CURVA EM VERMELHO PARA O CÁLCULO DA FUNÇÃO P(R). ....	90
FIGURA 40 CARACTERIZAÇÃO DA FORMA DE OLIGOMERIZAÇÃO DA ÓXIDO-REDUTASE DE <i>S. TYPHIMURIUM</i> QUE PODE SER EXTRAPOLADA PARA A ESTRUTURA DA SsUD. (A) REPRESENTAÇÃO EM CARTOON DE UMA MOLÉCULA DO TETRÂMERO EVIDENCIANDO A POSIÇÃO DAS DUAS INTERFACES, H (VERMELHO) E B (AZUL). (B) TETRÂMERO DA ÓXIDO-REDUTASE DE <i>S. TYPHIMURIUM</i> E INTERAÇÃO ENTRE AS CADEIAS (TABELA 13)(C) ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA SsUA DE XAC E ÓXIDO- REDUTASE DE <i>S. TYPHIMURIUM</i> (3ERP) EVIDENCIANDO A CONSERVAÇÃO DOS RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO TETRÂMETRO. EM VERMELHO E AZUL SÃO MOSTRADOS OS RESÍDUOS DA INTERFACE H E B, RESPECTIVAMENTE.....	92
FIGURA 41 REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DO OLIGOMÉRO DA SsUD DE XAC NO FORMATO DE UM CATAVENTO. A) MODELO DE HOMOLOGIA OBTIDO PARA A PROTEÍNA SsUD (REPRESENTAÇÃO CARTOON) SUPERPOSTO AO MODELO DE BAIXA RESOLUÇÃO DE SAXS (ESFERAS SEMI- TRANSPARENTES). REPRESENTAÇÃO EM DIFERENTES ÂNGULOS DOS TETRÂMEROS. B) OCTÂMERO DE SsUD MOSTRANDO OS DOIS BLOCOS TETRAMÉRICOS EM SUPERFÍCIE E CARTOON; C) LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS ATIVOS NO TETRÂMERO, EM RELAÇÃO AO C-TERMINAL E INTERFACES H E B; D) DETALHE DE UM MONÔMERO, EM SUPERFÍCIE E E) DETALHAMENTO DA POSIÇÃO DA FNM E NAD(P)H EM RELAÇÃO À H139.....	94
FIGURA 42 TESTES INICIAIS DE CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA SsUD. O CRISTAL EM EVIDÊNCIA (I) CRESCER EM 12 MG/ML NA CONDIÇÃO COM 0.2 M DE CLORETO DE SÓDIO; 0.1 M DE ACETATO DE SÓDIO TRI- HIDRATADO PH 4.6 E 30% (+/-) 2-METHYL 2,4 PENTANEDIOL. ....	95
FIGURA 43 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EVIDENCIANDO A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>SSUE</i> DE XAC, FRAGMENTOS DO DNA PLASMIDIANO E CLIVAGEM DO GENE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO APROPRIADAS À CLONAGEM. (A) AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>SSUE</i> . 1: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR - #SM0403 – FERMENTAS®; 2: FRAGMENTO DE PCR CODIFICANDO O GENE <i>SSUE</i> (1329 PB). (B) DIGESTÃO DO VETOR pET28A E DO GENE <i>SSUE</i> COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO. 1 E 7: MARCADORES DE MASSA MOLECULAR - #SM0403 – FERMENTAS®; 2: pET28A LINEARIZADO; 3: pET28A DIGERIDO COM <i>NcoI/HindIII</i> ; 4: FRAGMENTO DO GENE <i>SSUE</i> (1329 PB) DIGERIDO COM <i>NcoI/HindIII</i> ; 6: pET28A NÃO DIGERIDO USADO COMO CONTROLE DA DIGESTÃO.....	96
FIGURA 44 GEL DE AGAROSE 0.8% PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS INSERTO REFERENTE AO GENE <i>SSUE</i> DE XAC. 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR - #SM0403 – FERMENTAS®; 2: LIBERAÇÃO DO INSERTO REFERENTE AO GENE <i>SSUE</i> APÓS A CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL pET28A/ <i>SSUE</i> . ....	97
FIGURA 45 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SsUE (48.0 kDa) EM CEPAS DE <i>E. COLI</i> BL21(DE3) POR SDS-PAGE 13%. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431); 2. AMOSTRA DE EXTRATO CELULAR DE CULTURA NÃO INDUZIDA (TEMPO ZERO - T0); 3. AMOSTRA DE EXTRATO CELULAR DE CULTURA INDUZIDA (TEMPO DOIS - T2); 4. EXTRATO CELULAR SOLÚVEL; 5. EXTRATO CELULAR INSOLÚVEL (PRECIPITADO). A SETA EM PRETO INDICA A SUPOSTA LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA ALVO.....	98

- FIGURA 46 ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA SsuE DE *XAC* CONSTRUÍDA COM AS SEQUÊNCIAS DE ORTÓLOGOS IDENTIFICADOS PELO BLASTP. A ÁRVORE FOI CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO UTILIZANDO O PROGRAMA CLUSTALW2 NO FORMATO PHYLIP PELO MÉTODO NEIGHBOUR JOINING. 100
- FIGURA 47 ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS DA SsuE COM AS SEQUÊNCIAS DA (A) ÓXIDOREDUCTASE... 102
- FIGURA 48 A) MODELO DA SsuE DE *XAC* BASEADO NAS COORDENADAS ESTRUTURAIS DA ÓXIDOREDUCTASE DE *B. SUBTILIS* (PDB 1TVL). (B) SOBREPOSIÇÃO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS SsuE DE *XAC* (VERMELHA/VERDE/AMARELA) E DE *B. SUBTILIS* (ÓXIDOREDUCTASE) (AZUL/ROSA/ROXA). PROGRAMA MODELLER. .... 102
- FIGURA 49 CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DO MODELO DA SsuE DE *XAC* COM A ÓXIDO-REDUTASE DE *B. SUBTILIS* YTNJ, USADA COMO MOLDE. (A) SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS DO MODELO DE SsuA (CINZA) E DA PROTEÍNA DE *B. SUBTILIS* (AZUL), EVIDENCIANDO A FMN (EM VERDE) NO SÍTIO ATIVO DA PROTEÍNA. AINDA É EVIDENCIADA UMA MOLÉCULA DE GLICOSE (AMARELO), PRODUTO DA CRISTALIZAÇÃO. (B) DETALHE DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DA FMN REVELANDO A CONSERVAÇÃO DOS RESÍDUOS DA INTERAÇÃO DA FMN NA SsuE. (C) COMPARAÇÃO DO POTENCIAL ELESTROSTÁTICO DE SUPERFÍCIE DA SsuE E DA ÓXIDO-REDUTASE, EVIDENCIANDO AS CARACTERÍSTICAS DE POLARIDADE POSITIVA E NEUTRA. .... 103
- FIGURA 50 ALINHAMENTO SEQUENCIAL DAS PROTEÍNAS SsuE DE *XAC*, LAD<sub>A</sub> DE *G. THERMODENITRIFICANS* (3B9O\_GTH) E SsuD DE *E. COLI* (1M41\_ECO), EVIDENCIANDO A CONSERVAÇÃO DOS RESÍDUOS QUE FAZEM INTERAÇÃO COM A FLAVINA NA MONO-OXIGENASE LAD<sub>A</sub> (EM AMARELO)..... 105
- FIGURA 51 COMPARAÇÃO DO MODELO DA SsuE DE *XAC* COM A MONO-OXIGENASE DE *G. THERMODENITRIFICANS*, USADA COMO MOLDE. (A) SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS DO MODELO DE SsuA (CINZA) E DA PROTEÍNA LAD<sub>A</sub>, EVIDENCIANDO A FMN (EM VERDE) NO SÍTIO ATIVO DA PROTEÍNA E DETALHE DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DA FMN REVELANDO A CONSERVAÇÃO DOS RESÍDUOS DA INTERAÇÃO DA FMN NA SsuE. (B) COMPARAÇÃO DO POTENCIAL ELESTROSTÁTICO DE SUPERFÍCIE DA SsuE E DA MONO-OXIGENASE, EVIDENCIANDO AS CARACTERÍSTICAS DE POLARIDADE POSITIVA. ... 106
- FIGURA 52 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PBP (33.0 kDa) EM CEPAS DE *E. COLI* BL21(DE3) POR SDS-PAGE 13%. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (FERMENTAS - SM0431); 2. AMOSTRA DE EXTRATO CELULAR DE CULTURA NÃO INDUZIDA (TEMPO ZERO - T0); 3. AMOSTRA DE EXTRATO CELULAR DE CULTURA INDUZIDA (TEMPO DOIS - T2); 4. EXTRATO CELULAR SOLÚVEL; 5. EXTRATO CELULAR INSOLÚVEL (PRECIPITADO). A SETA EM PRETO INDICA A LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA ALVO..... 108
- FIGURA 53 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PBP POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE A NÍQUEL (IMAC), EVIDENCIADA EM ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA. 1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR (FERMENTAS – SM0431); 2) LAVADO; 3) LAVAGEM DA COLUNA COM 20 mM DE IMIDAZOL EM TAMPÃO HEPES 50 mM PH7.5, 4-5) AMOSTRAS ELUÍDAS COM 50 mM DE IMIDAZOL; AMOSTRAS DE 4 A 10 REVELAM OS PICOS DO CROMATOGRAMA SENDO AS AMOSTRAS 8, 9 E 10 ELUÍDAS COM 200 mM DE IMIDAZOL. 6-7) AMOSTRAS ELUÍDAS COM 100 mM DE IMIDAZOL E 8-10) PROTEÍNA ELUÍDA COM 200 mM DE IMIDAZOL. .... 109
- FIGURA 54 ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA PBP DE *XAC* CONSTRUÍDA A PARTIR DOS ORTÓLOGOS ENCONTRADOS SEGUNDO O BLASTP. .... 111
- FIGURA 55 MODELO DA PROTEÍNA PBP GERADO PELO PROGRAMA MODELLER A PARTIR DAS COORDENADAS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA LIGADORA DE ALCANO SULFONATOS DE *XAC*, SsuA. (A) REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PBP EM CARTOON. AS FOLHAS BETA SÃO MOSTRADAS EM AZUL CLARO, CIRCUNDADAS PELAS HÉLICES EM AZUL. O DOMÍNIO I FOI ASSIM DENOMINADO PELA PRESENÇA DA REGIÃO N-TERMINAL. (B) VISTA POSTERIOR DA PROTEÍNA PBP. A PRESENÇA DE ALÇAS QUE CONECTAM OS DOMÍNIOS GARANTEM A FLEXIBILIDADE, A ABERTURA E FECHAMENTO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO. .... 113
- FIGURA 56 MODELO DA PROTEÍNA PBP DE *XAC* GERADO PELO PROGRAMA MODELLER A PARTIR DAS COORDENADAS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA LIGADORA DE FOSFATO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, PBP. (A) REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PBP EM CARTOON. AS FOLHAS BETA SÃO MOSTRADAS EM AZUL CLARO, CIRCUNDADAS PELAS HÉLICES EM AZUL. O DOMÍNIO I FOI ASSIM DENOMINADO PELA PRESENÇA DA REGIÃO N-TERMINAL. A FIGURA EM MINIATURA ELUCIDA DE FORMA DIDÁTICA OS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA. (B) SOBREPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA PBP DE *XAC* E SEU ORTÓLOGO DE *P. AERUGINOSA*, PBP. .... 114
- FIGURA 57 IDENTIFICAÇÃO DO BOLSÃO DE INTERAÇÃO AO LIGANTE NOS MODELOS DA PBP BASEADOS NA SsuA DE *XAC* (A) E NA PBP DE *P. AERUGINOSA* (B). .... 115

FIGURA 58 ALINHAMENTO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS PBP DE <i>XAC</i> (XAC_PBP) E DE <i>P. AERUGINOSA</i> (PAE_PBP) EVIDENCIANDO OS RESÍDUOS FORMADORES DO BOLSÃO DE INTERAÇÃO (AMARELO), MAPEADOS SEGUNDO O PROGRAMA ITASSER. ....	116
FIGURA 59 ALINHAMENTO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS PBP DE <i>XAC</i> (XAC_PBP) E DE <i>P. AERUGINOSA</i> (PAE_PBP) E AS PROTEÍNAS LIGADORAS DE FOSFATO PSTS DE <i>E. COLI</i> (ECO_PST) E <i>Y. PESTIS</i> (YPE_PST). OS RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM O FOSFATO ESTÃO EVIDENCIADOS EM VERDE E OS FORMADORES DO BOLSÃO DAS PBP EM AMARELO. ....	117
FIGURA 60 POTENCIAL ELETROSTÁTICO DAS PROTEÍNAS PERIPLASMÁTICAS LIGADORAS DE FOSFATO DE <i>Y.</i> ....	119
FIGURA 61 ESTABILIDADE DA PBP DE <i>XAC</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES. A PROTEÍNA FOI DILUÍDA EM DIFERENTES TAMPÕES E ADICIONADA DO FLUORÓFORO SYBER ORANGE PARA A MEDIDA DA TEMPERATURA DE DESENOVELAMENTO MONITORADA EM UM APARELHO DE PCR. A CURVA APONTADA PELA SETA EM PRETO REFERE-SE AO AUMENTO DE ESTABILIDADE TÉRMICA NA PRESENÇA DE 10 mM DE ESPERMINA. ....	120
FIGURA 62 ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR E DESENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA PBP DE <i>XAC</i> . (A) CD DA PBP NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPERMINA. (B) DESENOVELAMENTO TÉRMICO DA PBP EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPERMINA. (C) E (D) ESPECTROS DE CD ANTES E DEPOIS DO DESENOVELAMENTO TÉRMICO NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE ESPERMINA, RESPECTIVAMENTE. ....	121
FIGURA 63 TESTES INICIAIS DE CRISTALIZAÇÃO DA PBP EM DIFERENTES CONDIÇÕES. 15 MG/ML DE PROTEÍNA FORAM USADOS NOS ENSAIOS EM TAMPÃO HEPES 50 mM EM PH7.5 NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE 10 mM DE ESPERMINA. ....	122

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RELAÇÃO DO NÚMERO DE TRANSPORTADORES DO TIPO ABC COM SISTEMAS DE TRANSPORTE GERAL ENCONTRADOS EM DIFERENTES BACTÉRIAS, INCLUINDO <i>X. AXONOPODIS</i> .....	31
TABELA 2 REAÇÃO DE DIGESTÃO DO VETOR pET28A PARA CLONAGEM.....	46
TABELA 3 SEQUÊNCIA DOS PRIMERS INICIAL E FINAL COM A EXIBIÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO ACRESCIDOS AOS GENES SUBMETIDOS À AMPLIFICAÇÃO: <i>SSUD</i> E <i>SSUE</i> .....	47
TABELA 4. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>SSUD</i> E <i>SSUE</i> DE <i>XAC</i> .....	48
TABELA 5. REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>SSUD</i> E <i>SSUE</i> .....	48
TABELA 7. LINHAGENS CELULARES TESTADAS PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA.....	61
TABELA 8. ORTÓLOGOS DA PROTEÍNA <i>SSUD</i> DE <i>XAC</i> OBTIDOS A PARTIR DO BLASTP – (NÃO REDUNDANTE, NR) CONTRA O BANCO DE DADOS GERAL.....	66
TABELA 9 PROTEÍNAS QUE APRESENTAM SIMILARIDADE ESTRUTURAL COM A <i>SSUD</i> DE <i>XAC</i> , EVIDENCIADAS A PARTIR DA SUBMISSÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS PARA BUSCA NOS PROGRAMAS BLASTP X PDB, DALI E FUGUE. ....	71
TABELA 10. ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA <i>SSUD</i> EM DIFERENTES PHs PELO ALGORITMO K2D* . ....	80
TABELA 11. COMPARATIVO DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA <i>SSUD</i> COM OUTRAS ENZIMAS DEPOSITADAS NO PDB COM A TOPOLOGIA BARRIL-TIM. ....	81
TABELA 12 ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA <i>SSUD</i> PARA CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ÓXIDO-REDUTASE E ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS PERTINENTES NAS PRESENÇA DE FMN E NAD(P) .....	83
TABELA 13. PARÂMETROS CINÉTICOS DA PROTEÍNA <i>SSUD</i> PARA FUNÇÃO DE ÓXIDO-REDUTASE. OS VALORES FORAM UTILIZADOS COM BASE NO TRABALHO DE EICHORN <i>ET AL.</i> (1999).....	86
TABELA 14. RESÍDUOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS SUBUNIDADES DA ÓXIDO-REDUTASE DE <i>S. TYPHIMURIUM</i> (3ERP) PARA FORMAÇÃO DO OLIGÔMERO. ....	91
TABELA 15 ORTÓLOGOS DA PROTEÍNA <i>SSUE</i> DE <i>XAC</i> . RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS BLASTP-NR.....	99
TABELA 16 PROTEÍNAS COM ESTRUTURA RESOLVIDA QUE POSSIVELMENTE APRESENTAM SIMILARIDADE ESTRUTURAL COM A <i>SSUE</i> DE <i>XAC</i> .....	101
TABELA 18 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DA LADÁ E DA <i>SSUE</i> QUE REALIZAM LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO COM A FMN E SUAS RESPECTIVAS DISTÂNCIAS. ....	107
TABELA 19 ALINHAMENTO SEQUENCIAL DA PROTEÍNA PBP DE <i>XAC</i> . BLASTPx NR. ....	110
TABELA 20 ESTRUTURAS DE PROTEÍNAS COM SIMILARIDADE ESTRUTURAL À PBP DE <i>XAC</i> . ....	112
TABELA 21 COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES QUE OCORREM ENTRE AS PROTEÍNAS LIGADORAS DE FOSFATO DE <i>E. COLI</i> E <i>YERSINIA PESTIS</i> E O LIGANTE. ....	116
TABELA 22 A SOBREPOSIÇÃO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS PERIPLASMÁTICA LIGADORA DE FOSFATO DE <i>E. COLI</i> (1IHx), <i>YERSINIA PESTIS</i> (2Z22) E DA PROTEÍNA LIGADORA DE FOSFONATO DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (3N5L).....	118
TABELA 23 ÁREA DE SUPERFÍCIE DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS PERIPLASMÁTICAS LIGADORAS DE FOSFATO (PstS de <i>E. COLI</i> E DE <i>Y. PESTIS</i> ) E FOSFONATO ( <i>P. AERUGINOSA</i> ).....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Å:  $10^{-10}$ m, Angstrom
- ABC: ATP-Binding Cassete
- ATP: Trifosfato de adenosina
- AUC: Ultracentrifugação analítica
- Blast: Basic local alignment tool
- Bst*: *Bacillus subtilis*
- CD: Dicroísmo circular
- DLS: Espalhamento dinâmico de Luz
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DO: Densidade óptica
- E.coli*: *Escherichia coli*
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético
- ExPASy – Expert Protein Analysis System
- FMN: Mononucleotídeo de Flavina
- FMNH<sub>2</sub>: Mononucleotídeo de Flavina reduzida
- Gth*: *Geobacillus thermodenitrificans*
- IPTG: isopropil-b-D- tiogalactosídeo
- IMAC: cromatografia de afinidade a metal imobilizado
- ITC: Titulação isotérmica calorimétrica
- kDa: kilodaltons
- K<sub>m</sub>: constante de Michaelis-Mentem
- K<sub>a</sub>: constante de associação
- K<sub>cat</sub>: constante catalítica
- KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas
- LB: Luri Broth
- mM: milimolar
- NaCl: Cloreto de Sódio
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- Paeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*
- Pb: pares de base

PbP – proteínas ligadora periplasmática

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDB:Protein Data Banking

pH: potencial hidrogeniônico

PISA: Protein interaction surface and assemblies

PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil

r.m.s.d: root mean square deviation

r.p.m.: rotações por minuto

SAXS: espalhamento de raio-X a baixo ângulo

*Sth*: *Salmonella typhimurium*

SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TAQ: DNA-polimerase de *Thermococcus*

T<sub>m</sub> – Temperatura média

Tris: Hidroximetil-aminomente

μM: micromolar

V: Volts

V<sub>max</sub>: Velocidade máxima

*Xac*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

*Ypestis*: *Yersinia pestis*

## Sumário

1. Introdução geral.....	22
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>23</b>
2.1. Relatando o problema: <i>Xac</i> e o cancro cítrico.....	23
2.2. Transportadores do tipo ABC e <i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i> .....	26
2.3.2. Transporte e Metabolismo de Enxofre .....	31
2.3.3. SsuD e SsuE: o sistema dois componentes envolvidos na dessulfonação dos alcanosulfonatos ( sulfonatos alifáticos).....	35
2.4. A proteína ligadora periplasmática Pbp: um componente do sistema transportador de fosfato ou fosfonatos.....	38
2.4.1. Proteínas ligadoras e a Pbp de <i>Xac</i> .....	38
2.4.2. Operons e regulons dependentes de fosfato e fosfonato são encontrados em procariotos.....	42
3. Objetivos.....	44
3.1. Caracterização das enzimas SsuD e SsuE do sistema de transporte do tipo ABC responsável pela captação de alcanosulfonatos em <i>Xac</i> .....	44
4. Material e Métodos .....	45
4.1. Extração de DNA genômico de <i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i> 306 ( <i>Xac</i> ).....	45
4.2. Extração e digestão do plasmídeo pET28a.....	45
4.3. Amplificação dos genes <i>ssuD</i> e <i>ssuE</i> de <i>Xac</i> e, preparo dos fragmentos para clonagem molecular.....	45
4.4. Ligação e transformação .....	48
4.5. Expressão e extração das proteínas recombinantes SsuD, SsuE e Pbp de <i>Xac</i> .....	49
4.6. Purificação das proteínas recombinantes SsuD e Pbp de <i>Xac</i> expressas em sistemas heterólogos.....	50
4.7. Modelagem por homologia das proteínas SsuD, SsuE, Pbp de <i>Xac</i> .....	51
4.8. Preparação do complexo SsuD/NAD(P)H/FMN: Docking molecular .....	52
4.9. Dicroísmo Circular (CD) e Desnaturação Térmica das Proteínas SsuD e Pbp de <i>Xac</i> .....	53
4.9. Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da proteína SsuD na presença de FMN e NAD(P)H.....	54
4.10. Ultracentrifugação analítica (AUC) e Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo .....	54
4.11. Ensaio funcional da proteína SsuD .....	55
4.12. Ensaio de Cristalização das proteínas SsuD e Pbp .....	55

4.13.	Soluções e tampões .....	56
4.14.	Eletroforese em gel de acrilamida 13% e eletroforese de DNA.....	56
5.	Resultados e Discussão .....	57
	Parte I - A proteína SsuD de <i>Xac</i> .....	57
5.1.	Amplificação e clonagem do gene <i>ssuD</i> no vetor pET28a .....	57
5.2.	Expressão e extração da proteína recombinante SsuD de <i>Xac</i> .....	59
5.3.	Purificação da proteína recombinante SsuD de <i>Xac</i> e DLS .....	62
5.4.	Análises de Bioinformática: identificação de ortólogos, homologia, e relações filogenéticas da proteína SsuD de <i>Xac</i> .....	65
5.5.	A proteína SsuD de <i>Xac</i> : uma óxido-redutase que liga a NAD(P)H .....	74
5.6.	A ligação de alta afinidade entre SsuD de <i>Xac</i> e NAD(P)H promove a estabilização da estrutura secundária da proteína .....	79
5.7.	A cinética enzimática da SsuD revela a atividade independente da presença de FMN e com elevada eficiência.....	84
5.8.	Ensaio de interação da SsuD com FMN e NAD(P)H medidos através de ensaios de titulação calorimétrica .....	87
5.9.	A SsuD em solução apresenta-se sob a forma de um octâmero.....	88
5.10.	Cristalização da proteína SsuD.....	95
	Parte II - A proteína SsuE de <i>Xac</i> .....	96
5.11.	Clonagem do gene <i>ssuE</i> no vetor pET28a.....	96
5.12.	Expressão da proteína SsuE em corpúsculos de inclusão.....	97
5.13.	Análises de bioinformática e busca de ortólogos .....	98
5.14.	Comparação da SsuE de <i>Xac</i> com as mono-oxigenases de <i>G. thermodenitrificans</i> (LadA) e de <i>E. coli</i> (SsuD).....	104
5.15.	Expressão e purificação da proteína Pbp .....	108
5.16.	Análises de bioinformática da proteína Pbp.....	109
5.17.	Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular (CD) e Desnaturação Térmica da Proteína Pbp de <i>Xac</i> .....	120
5.18.	Ensaio de cristalização da Pbp de <i>Xac</i> .....	122
6.	Conclusões.....	123
7.	Perspectivas .....	124
8.	Referências bibliográficas.....	125

## 1. Introdução geral

O presente trabalho teve como tema a caracterização estrutural e funcional das proteínas SsuD e SsuE que pertencem ao transportador de alceno sulfonatos, possível regulon de captação de enxofre em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), e da proteína ligadora periplasmática Pbp, supostamente envolvida com o transporte de fosfonatos. Este trabalho é fruto de um projeto maior, que tem como objetivo a caracterização estrutural e funcional de todos os transportadores do tipo ABC de *Xac*.

Os transportadores do tipo “ABC” (**A**TP-**B**inding **C**assete) são sistemas de transporte celular extremamente importantes, responsáveis principalmente pela importação e exportação de substâncias através da membrana, como também, regulação da transcrição e tradução, reparo de DNA, resistência à drogas, patogenicidade e ativação de respostas imunológicas (DASSA, 2000; DAVIDSON *et al* , 2008). Em geral, pelo menos 5% do genoma de bactérias corresponde aos componentes dessa família (HIGGINS, 2001), porcentagem que se mantém no gênero *Xanthomonas* (cerca de 4%), confirmando a importância destes transportadores nestas bactérias. Adicionalmente, como descrito por muitos autores (LU *et al* , 2005; NIKAIDO *et al* , 1999; e LAWSON *et al* , 1998), transportadores ABC presentes em eucariotos, também estão envolvidos no desenvolvimento de doenças genéticas como fibrose cística e no fenômeno de múltipla resistência à drogas em células cancerosas (LINTON, 2007).

Apesar do enorme interesse e da importância destas proteínas, a caracterização destes transportadores em *Xac* é ainda muito insipiente. Recentemente, nosso grupo resolveu a estrutura da proteína periplasmática ligadora de alceno sulfonatos, a SsuA, cujo gene pertence ao operon *ssuABCDE* e precede os genes que codificam a proteína de membrana SsuB e a ATPase SsuC. Juntas, estas proteínas formam o transportador completo que capta alceno sulfonatos do periplasma e o transporta para o interior da célula. Após a incorporação do alceno sulfonato, este deve ser reduzido internamente para a assimilação (dessulfonação) do enxofre através da ação das enzimas mono-oxigenase e óxido-redutase (SsuE e SsuD, respectivamente). Em continuação à caracterização estrutural do componente periplasmático, nosso grupo tem trabalhado na caracterização do sistema transportador completo expressando as proteínas de membrana e ATPase conjuntamente, e neste sentido, a adição dos componentes

citoplasmáticos é de fundamental importância. Em *Escherichia coli*, tais transportadores e os genes citoplasmáticos fazem parte de um grande regulon com mais de 20 genes (EICHHORN *et al* , 2000). Além do operon para captação de alcano sulfonatos, foram identificados no genoma de *E. coli*, transportadores para sulfato e taurina, bem como todos os genes para a transformação destes compostos e redução à enxofre. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que em *Xac*, como em *E. coli*, quase todos os ortólogos referentes aos genes do regulon estão presentes, incluindo os transportadores envolvidos no transporte de sulfato (*sbpcysBCF*), e sulfonatos alifáticos (*tauABCDE*). Embora o mecanismo de assimilação de enxofre tenha sido bem caracterizado funcionalmente em bactérias como *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, não existe nenhuma caracterização destes sistemas em *Xac*, tanto do ponto de vista estrutural como funcional.

Em virtude da dificuldade inicial de se obter as proteínas SsuD e SsuE na forma solúvel, adicionamos ao projeto mais uma proteína, também relacionada aos transportadores ABC, a proteína Pbp (identificação gênica: 21243117- Xac2383) envolvida nos sistema de captação de fosfato/fosfonatos, o qual também não foi caracterizado em *Xanthomonas*. Diferentemente do sistema de alcano sulfonatos, onde as proteínas alvo são enzimas citoplasmáticas que convertem o substrato transportado, a Pbp é a proteína periplasmática que confere a afinidade e especificidade ao sistema transportador.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Relatando o problema: *Xac* e o cancro cítrico**

*Xac* pertence ao Reino Bactéria, Filo *Proteobacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família: *Xanthomonadaceae* e gênero: *Xanthomonas*. Caracteriza-se por ser gram-negativa e com flagelo polar, aeróbica quimiotrófica estrita que possui o oxigênio (O<sub>2</sub>) como aceptor final de elétrons. Utiliza açúcares concentrados nas plantas, como glicose, sacarose, frutose, xilose e galactose como fontes de carbono (TUNG e KUO, 1999; KIM, *et al* , 2004). Suas colônias são usualmente amarelas como resultado da produção do pigmento conhecido como xantomonadina, e sua temperatura ótima de crescimento é 28 a 30°C (DAS, 2003).

*Xac* é um fitopatógeno de grande interesse porque é o agente causador do cancro cítrico. Doença originária na Ásia, mas que atualmente é endêmica em países da América do Sul como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. Existem três diferentes tipos de cancro cítrico causado por diferentes patovares e variantes de *Xanthomonas axonopodis*. Nosso interesse é estudar o patovar *citri*, responsável pela cancrose mais severa, isto é, o tipo A (DAS, 2003). Por conta da grande difusão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* nos pomares de diferentes espécies de citrus, grandes investimentos anuais são feitos na tentativa de prevenir a propagação e a descoberta da fisiopatologia do cancro cítrico. No Brasil, a mesma foi reportada primeiramente em 1957, na região de Presidente Prudente (FUNDECITRUS – [Pbp.fundecitrus.com.br](http://Pbp.fundecitrus.com.br)).

Geralmente a infecção no citrus não é algo uniforme e se manifesta com o desenvolvimento da planta e em estações climáticas mais quentes. Embora a via de entrada da bactéria na planta seja a folha, os frutos são mais susceptíveis ao cancro e nestes a doença se manifesta de forma mais severa (STALL *et al* , 1983).

A dispersão da doença e infecção de áreas pode variar muito, dependendo de condições climáticas. Na Argentina, por exemplo, algumas áreas contaminadas chegam à 30 m de diâmetro, mas já foram reportados casos de disseminação a mais de 15 km. O espalhamento regional, como no caso argentino, é caracterizado pelo movimento humano nas lavouras e uso de equipamento contaminado em pés de plantas ainda não contaminadas. Isto faz com que a *Xac* seja altamente patogênica (BRUNINGS *et al* , 2003).

A principal característica da cancrose é a hiperplasia do tecido vegetal sendo que após a invasão do estômato da planta, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* é capaz de causar pequenas lesões circulares que são como pequeninas postulas amareladas e brancas que apresentam um progressivo escurecimento (Figura 1A e B). A partir daí, as lesões se tornam rodeadas por água e pode ou não desaparecer no decorrer da patologia vegetal. Além disso, a bactéria passa a produzir polissacarídeos que embebem as lesões o que evita sua exposição no ambiente e a sua permanência no local. É sabido também, que a mesma necessita de uma ótima temperatura para a invasão no tecido vegetal e, favorecida pelas condições tropicais existente no Brasil, o que a favorece a permanência de *Xac* nas margem das lesões até o momento apropriado (BRUNINGS *et al* , 2003; GRAHAM *et al* , 2004; DAS, 2003). O fato relevante no ciclo de infecção desta bactéria endêmica é que a mesma permanece no local das infecções

antigas, facilitando a perpetuação em outras áreas enquanto ataca as novas áreas (BRUNINGS *et al* , 2003; DAS, 2003).

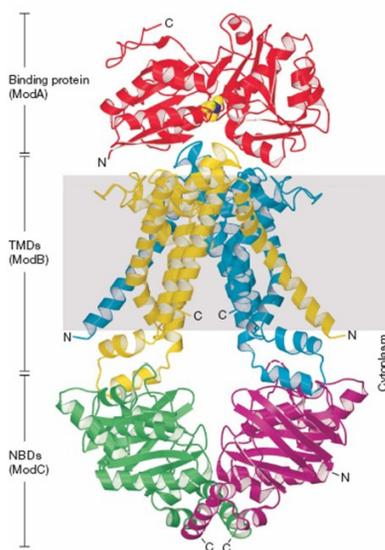
Interessados em identificar um mecanismo de controle do microrganismo através da compreensão da fisiologia da bactéria, pesquisadores brasileiros foram responsáveis pelo sequenciamento do genoma das espécies *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) (Da SILVA *et al* , 2002). O genoma de *Xac*, com 5.175.554 pares de bases, codifica um grande número de enzimas para degradação de parede celular, transporte de açúcares, fatores de virulência e sistemas de secreção. Adicionalmente foi observado que, como previsto para bactérias, 4% do genoma de *Xac* e também de *Xcc*, codificam para sistemas transportadores do tipo ABC. Apesar de filogeneticamente próximas e compartilharem mais de 80% dos genes, tais bactérias apresentam diferenças significativas em relação à especificidade e patogênese de hospedeiros (da Silva *et al* , 2002). A análise minuciosa revelou que alguns transportadores são específicos de cada espécie e a função/caracterização destes seria fundamental para a compreensão do papel dos transportadores nos mecanismos diferenciais de infecção e patogênese.



**Figura 1** Sintomas do cancro cítrico em folhas de laranja. A) Áreas em amarelo: área necrótica (STALL, *et al*, 1983). B) Laranjas infectadas com *Xac* apresentando patologias no tecido vegetal. Fotografia retirada do site da Fundação de Defesa da Citricultura. ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)).

## 2.2. Transportadores do tipo ABC e *Xanthomonas axonopodis pv. citri*

Transportadores ABC (do inglês **A**T**P**-**B**inding **C**assette) acoplam a hidrólise de ATP à captação e efluxo de solutos através da membrana celular, tanto em células eucariotas como em bactéria. Em células eucariotas esses sistemas são exportadores e associados à secreção de várias moléculas como peptídeos, lipídeos, drogas hidrofóbicas, polissacarídeos, proteínas e toxinas e ao fenômeno de múltipla resistência à drogas. Em bactéria são sistemas importadores relevantes na virulência porque participam na captação de nutrientes e na secreção de toxinas e agentes antimicrobianos (TAM e SAIER, 1993; DAVIDSON, 2008). Os nutrientes em procaríotos são de natureza diversa como oligossacarídeos, íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, metais, cátions, vitaminas, entre outros. Ainda existe uma terceira categoria, além dos importadores e exportadores, aparentemente envolvida na tradução de mRNA e reparo DNA (DAVIDSON *et al* , 2008).



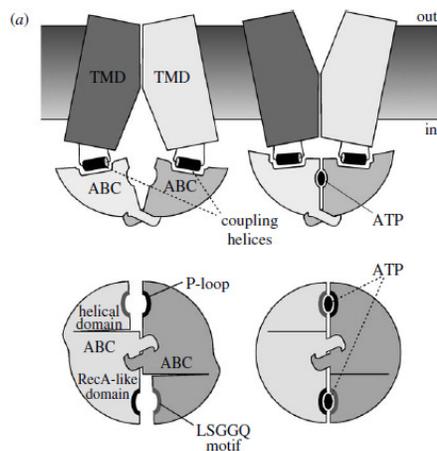
**Figura 2** Representação em “cartoon” do sistema ABC importador de molibdato de *Archaeoglobus fulgidus* evidenciando os três componentes básicos: proteína periplasmática (em vermelho), proteínas de membrana (amarelo e azul) e ATPases (verde e rosa). Retirado de HOLLENSTEIN *et al*. (2007).

Devido à sua importância e variedade de funções, este grupo de proteínas tem sido extensivamente estudado tanto do ponto de vista funcional como estrutural em uma

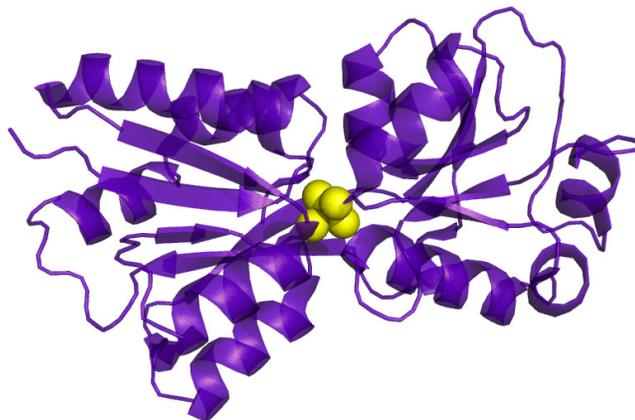
série de organismos. Até o final de 2007, foram resolvidas 91 estruturas cristalinas dos componentes de 45 transportadores ABC distintos, provenientes de diferentes tipos de bactérias. Trinta e cinco estruturas são de proteínas ligadoras (SBPs); 56 estruturas são de domínios ligadores de nucleotídeos ou ATPases (NBDs) e 21 estruturas são de transportadores inteiros de diferentes tipos de sistemas ABC (MOUSSATOVA *et al* , 2008).

Os transportadores ABC consistem de dois domínios trans-membrana (transmembrane domains, TMDs), responsáveis pela translocação do substrato, e dois domínios citoplasmáticos conhecidos como domínios ligadores de nucleotídeos (Nucleotide-binding domains, NBDs), responsáveis pela hidrólise do ATP, também conhecidos como domínios motores que guiam o transporte ativo contra um gradiente de concentração. Os NBDs contêm motivos altamente conservados denominados Walker A e Walker B, constituídos pelos aminoácidos GxxGxGKS/T (onde x refere-se a qualquer aminoácido) e  $\phi\phi\phi\phi$ D ( $\phi$  refere-se a resíduos hidrofóbicos), respectivamente. Tais motivos delimitam concavidades na qual a molécula de ATP se acomoda (DAVIDSON, 2008).

Em relação à subunidade TMDs, a conservação estrutural, sempre em forma de hélices trans-membrana, que variam em número e organização, não é refletida em sequência de aminoácidos. TMDs constituem um poro que atravessa a membrana celular (típica proteína integral de membrana) formando o caminho em que o substrato percorre para chegar ao interior da célula. Isto mostra como este canal é capaz de transportar os mais diversos tipos de substratos (HOLLENSTEIN *et al* , 2007 e KOS *et al* , 2009). Geralmente, as proteínas que formam o poro por onde o substrato é translocado podem assumir a conformação "interna" (inward) quando a permease fica aberta ao interior da célula ou "externa" (outward), quando a permease está aberta para o exterior (Figura 3). No caso de transportadores do tipo importadores, presente em procariotos, ainda existe um terceiro componente, que é a proteína periplasmática ligadora, cuja função consiste em reconhecer o substrato, capturá-lo e entregá-lo na face externa do transportador (HOLLENSTEIN *et al*, 2007) (Figura 4).



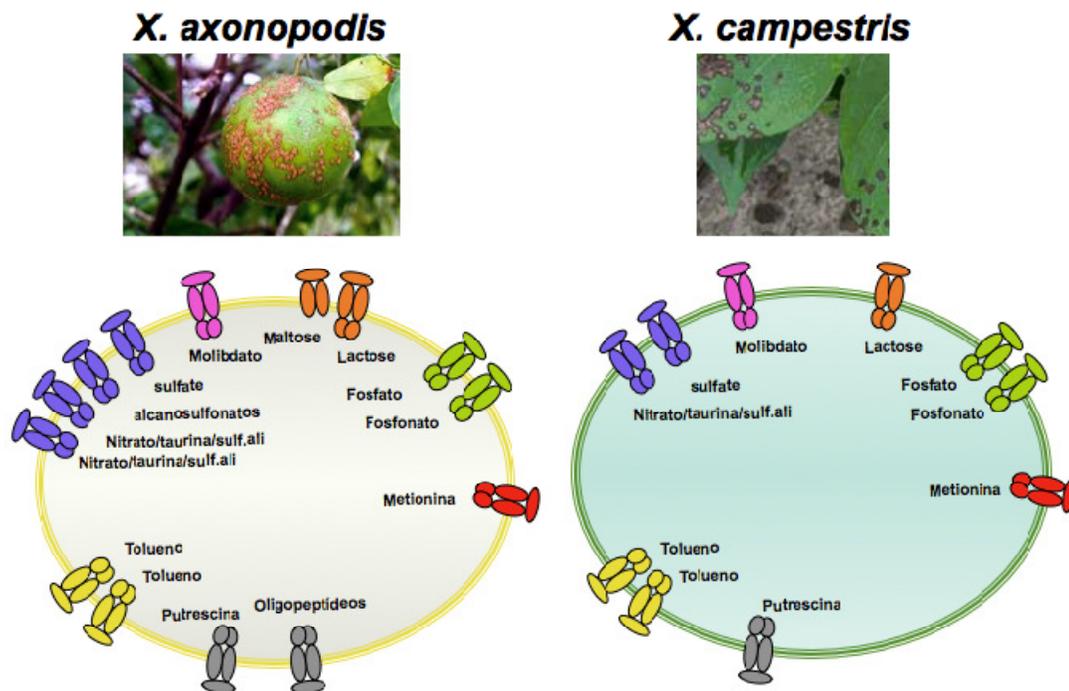
**Figura 3** Esquema mostra a interação entre as subunidades de membrana com os domínios NBDs ligados ao ATP que através da hidrólise do ATP conduz alterações conformacional do componente de membrana permitindo com que o substrato seja translocado pelo canal transmembrana (Locker 2009).



**Figura 4.** Representação em cartoon do mutante da proteína periplasmática ligadora de molibdato do sistema de transporte do tipo ABC de *Xac*, resolvida pelo nosso grupo (PDB: 3GZG; SANTACRUZ *et al*, 2006). O molibdato é representado em amarelo no interior da fenda, sítio de ligação da proteína. Os dois domínios são formados por folhas betas circundadas por hélices-alfa em cada lobo, caracterizando a topologia  $\alpha/\beta$ , peculiar deste grupo protéico.

Como citado anteriormente, após o sequenciamento do genoma das bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, foi possível identificar, através de comparações de sequências e busca de ortólogos, vários genes

codificadores de transportadores do tipo ABC. A busca em princípio, baseou-se primeiramente nas proteínas ligadoras de nucleotídeos, que apresentam domínios altamente conservados e sequência assinaturas, e a partir destas, na busca pelos componentes periplasmáticos e de membrana. Em geral, os genes que codificam tais transportadores apresentam-se em um operon regulados por um mesmo promotor, mas é possível encontrar genes que codificam para as ATPases isolado no genoma. Isto porque, tem sido mostrado que transportadores diferentes podem usar uma mesma ATPase. Segundo o sítio "Membrane Proteins" ([http://Pbp.membranetransport.org/other\\_family.php?fFID=ABC&oOID=xaxo1](http://Pbp.membranetransport.org/other_family.php?fFID=ABC&oOID=xaxo1)), em *Xanthomonas axonopodis* são descritos cerca de 24 transportadores diferentes, dos quais 12 são caracterizados como importadores (fosfato, sulfato, molibdato, tolueno, ferro, oligopeptídeos, entre outros). Os demais são considerados exportadores por não apresentarem as proteínas periplasmáticas, ou por apresentarem alta homologia com ortólogos bem caracterizados. Com o início do programa SMoIBNet para desenvolvimento de núcleos de pesquisa na área da Biologia Estrutural no Estado de São Paulo, nosso grupo focou na identificação de proteínas periplasmáticas ligadoras e a partir destas buscou os sistemas completos. A busca revelou cerca de 18 proteínas ligadoras distribuídas em diferentes sistemas de transporte que não necessariamente são conservados em *X. campestris* (Figura 5). Estas proteínas vem sendo estudadas tanto do ponto de vista estrutural como funcional pelo nosso grupo (BALAN *et al*, 2006, SANTACRUZ-PEREZ *et al*, 2006, BALAN *et al*, 2008 e SANTACRUZ-PEREZ *et al*, em preparação, MOUTRAN *et al*, 2004; MOUTRAN *et al*, 2007; BALAN *et al*, 2008). Em comum, estas proteínas mostram estruturas tri-dimensionais formadas por dois domínios que abrem e fecham formando uma fenda para a captação do ligante, bem como alterações estruturais decorrentes da interação. As proteínas pertencentes aos transportadores em *Xac* apresentam alta identidade de sequência com ortólogos de fitopatógenos (maior que 90%), incluindo *Xylella fastidiosa*, sugerindo que os dados obtidos podem ser usados como referência para tais bactérias. Por outro lado, demonstram ser distintas de outros sistemas encontrados em enterobactérias, arqueas e organismos extremófilos, o que sem dúvida, os torna interessante para o estudo e análises comparativas.



**Figura 5** Comparação de transportadores ABC do tipo importadores completos encontrados no genoma das bactérias fitopatogênicas *X. axonopodis* e *X. campestris*.

A análise comparativa do número e tipos de transportadores no genoma de diferentes bactérias, revelou que *Xanthomonas axonopodis* e *Xylella fastidiosa*, em geral, apresentam o menor número de transportadores por Mb de genoma quando comparados com *E. coli* e algumas bactérias de solo (Tabela 1). Adicionalmente, é possível verificar que dentre os transportadores dependentes de ATP, os transportadores do tipo ABC são maioria, o que mostra a importância destes sistemas.

**Tabela 1. Relação do número de transportadores do tipo ABC com sistemas de transporte geral encontrados em diferentes bactérias, incluindo *X. axonopodis*.**

	<i>E. coli</i> K12-MG1655	<i>M. luti</i> MAFF303099	<i>P. fluorescens</i> PfO-1	<i>R. metallidurans</i> CH34	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c
Genome Size(Mb):	4.6	7.59	6	6	5.17	2.66
Total Transporter Proteins:	354	433	427	533	201	78
No. of Transporters per Mb genome:	76.96	57.05	71.17	88.83	38.86	29.1
ATP-Dependent	74 (21%)	224 (52%)	123 (30%)	97 (18%)	50 (25%)	26 (33%)
The ATP-binding Cassette (ABC) Super-family	69	215	116	76	47	25

Apesar de estes números revelarem a importância de tais sistemas, poucos ou inexistentes são os estudos funcionais *in vivo* sobre tais transportadores em *Xanthomonas* que possam associá-los aos mecanismos de infecção ou patogênese. Neste sentido, nosso grupo tem buscado a caracterização de alguns componentes destes sistemas e este trabalho faz parte deste estudo.

### 2.3. O sistema de transporte do tipo ABC para captação de enxofre e derivados: o regulon *cys* encontrado em *Xac*

#### 2.3.2. Transporte e Metabolismo de Enxofre

Os sistemas de transporte ativo de nutrientes como enxofre, são essenciais para a sobrevivência de qualquer célula e dependem do correto funcionamento de proteínas que se encontram associadas à membrana citoplasmática (RECH *et al*, 1996). A assimilação do enxofre em bactérias ocorre por intermédio de diversos sistemas de transporte, inclusive os transportadores ABC. Em *E. coli*, o enxofre pode ser incorporado pelas vias de captação de taurina, sulfonatos alifáticos, sulfato e tiosulfato, pertencentes ao regulon *cys* composto por 26 genes (KERTESZ, 1999; EICHHORN *et al*, 1999, 2000, 2001 e 2002; STEC *et al*, 2006). Em geral o metabolismo de enxofre é distinto em 3 aspectos

detalhados: síntese de aminoácidos (cisteína e metionina) e coenzimas que contém enxofre ou grupos prostéticos; catabolismo e equilíbrio da quantidade de enxofre presente nas moléculas; e reciclagem de metionina (pois ela é o primeiro resíduo de aminoácido das proteínas). Além disso, a aquisição de sistemas especializados de captação de enxofre em *Xac* garante sua sobrevivência no solo (de plantações de citrus) onde a concentração de alceno sulfonatos é maior do que em outros ambientes naturais. Isso é favorável ao crescimento celular e a adaptação em ambientes adversos tendo em vista que muitos genes induzidos na carência de enxofre são dependentes da concentração do mesmo no interior celular (SEKOWSKA *et al*, 2000, KERTESZ, *et al*, 1999).

Em *E. coli*, três transportadores ABC estão envolvidos em vias de assimilação de enxofre e encontram-se em um único regulon. Aparentemente, *X. axonopodis* conserva todos os genes deste regulon, com exceção do regulador transcricional (Figura 6). O derivado de enxofre preferencial a ser transportado para dentro da célula é o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) através da proteína periplasmática Sbp que o transporta até a proteína de membrana (*cysT*). Dentro da célula ele é reduzido à sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), pela ação de proteínas codificadas pelo sistema *cys*. Outros estados de oxidação do enxofre como o tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) também podem ser encontrados (SEKOWSKA, *et al*, 2000; STEC *et al*, 2006), e o sistema de captação deste componente é o segundo a ser ativado, através da captação pela proteína ligadora periplasmática CysP, que utiliza o mesmo sistema de permeases da proteína Sbp, CysT e CysW, e a ATPase CysA. Na limitação de cisteína, sulfato ou tiosulfato, duas outras vias alternativas podem ser ativadas: a via de transporte de alceno sulfonatos ( $R-C-SO_3^-$ ) através do operon *ssu* (Sulfonate-Sulfur Utilization), seguida pela via de transporte de taurina ( $C_2H_7NO_3S$ ) pelo operon *tau* (Taurine-Sulfur Utilization) (STEC *et al*, 2006). Eichhorn e colaboradores (2000) mostraram através da obtenção de mutantes destes transportadores, que ambos formam distintos sistemas de transporte do tipo ABC para captação de alceno sulfonatos, sendo o sistema *ssu* capaz de captar e desulfonizar uma gama muito maior de substratos do que o sistema *tau*, o qual é específico para taurina. A ocorrência difundida de sulfonatos em ambientes naturais sugere que uma variedade de bactérias possa ter evoluído baseadas na capacidade de degradá-los tanto como fontes de carbono ou de enxofre, sobretudo, *Xac*, que genuinamente é um organismo encontrado em solo e plantas (KERTESZ, 1999).

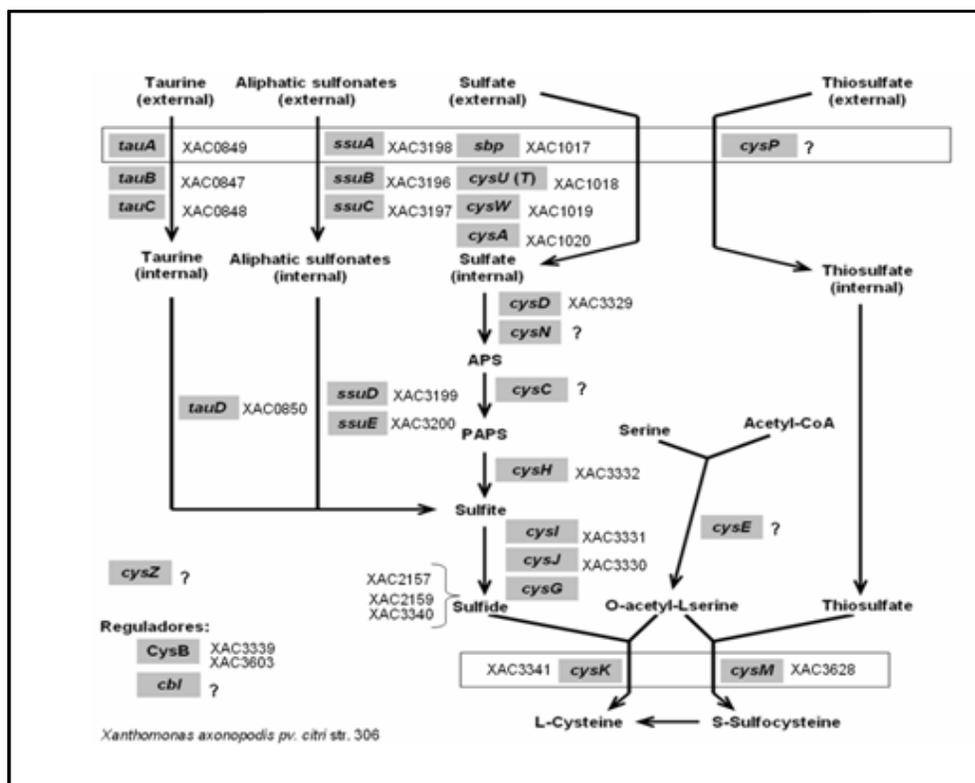


Figura 6 Genes do regulon *cys* presente em *Escherichia coli* K12 (caixa cinza) e o correspondente encontrado em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Genes cujas identidades foram abaixo de 20% foram mostrados com (?).

Muitas vezes, quando a célula bacteriana encontra-se em rigorosa depleção de moléculas e micronutrientes vitais, há o acionamento de um mecanismo conhecido como “controle rigoroso” (stringent control), onde diversos eventos metabólicos são suprimidos (incluindo a replicação do DNA, síntese de carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, peptídeo glicanos e intermediários glicolíticos) e outros são estimulados (como a síntese protéica). Assim, a célula se manifesta de forma preparada para resistir às privações nutricionais (VOET *et al*, 1995). Nessas condições é que o sistema transportador de alceno sulfonatos mostra-se importante para manter as funções vitais, priorizando o direcionamento destes componentes para a síntese de resíduos de aminoácidos que contenham enxofre, metionina e cisteína.

O produto gênico SsuA tem a função de ligante periplasmático, enquanto que as proteínas SsuB e SsuC representam proteínas ligadoras de ATP (NBDs) e as proteínas trans-membrana formadoras do poro (TMD), respectivamente. Uma vez incorporado, o alceno sulfonato também deve ser metabolizado para a obtenção de outros produtos e

enxofre. A proteína SsuD em *E. coli* é uma mono-oxigenase que catalisa a conversão de sulfonatos em aldeído e sulfito (desulfonização). Esta enzima utiliza a FMNH<sub>2</sub> (Flavina mononucleotídeo reduzida) como fonte de elétrons, a partir da atuação da SsuE, que reduz a flavina mononucleotídeo (FMN) utilizando o NAD(P)H (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (EICHHORN *et al*, 2002), numa reação acoplada.

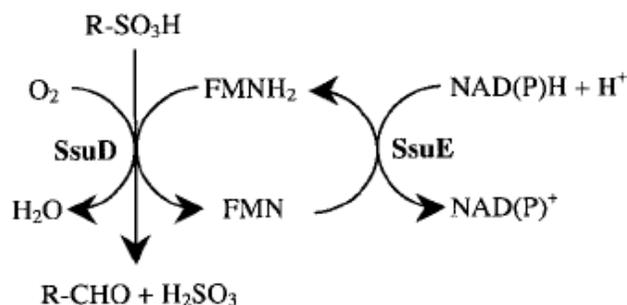
Para isso, além da importação dos alceno sulfonatos pelo sistema transportador do tipo ABC, as enzimas mono-oxigenase e óxido-redutase atuam em conjunto garantindo a incorporação do produto da reação enzimática no metabolismo. Nota-se também, que na seqüência de aminoácidos das enzimas mencionadas, resíduos de cisteína e metionina estão ausentes ou em número bem reduzido, um indício de que essas proteínas são sintetizadas em estado de carência nutricional de micronutrientes.

As proteínas do operon *ssu* são conhecidas como SSI (Starvation-Induced Proteins) e são ativadas por meio de um organizado e complexo sistema presente no regulon *cys*, que normalmente não é ativado quando a célula encontra-se em ambientes com níveis normais de enxofre e quantidades suficientes de cisteína e metionina intracelular. Dentre os componentes deste sistema do regulon *cys*, destaca-se a proteína CysB. Seu papel foi caracterizado na assimilação de sulfato inorgânico, sendo também necessário na expressão de sistemas envolvidos no transporte e metabolismo de ésteres de sulfato e em sulfonatos, tanto em bactérias entéricas quanto em *Pseudomonas*. Desta forma, ela realiza o controle do metabolismo de enxofre em larga escala (KERTESZ, 1999; PLOEG *et al*, 2001). A proteína CysB, um homodímero de 36 kDa, pertence à família do regulador transcricional do tipo LysR e que com o auxílio de moléculas co-indutoras pode atuar como indutor do promotor gênico dependente de N-acetilserina, produzida em ocasiões de baixa concentração de cisteína intracelular (KREDICH, 1996; KERTESZ, 1999). Além disso, a CysB regula a expressão dos genes *cys* responsáveis pela metabolização dos diferentes níveis de oxidação do enxofre tendo um papel de regulador global. Entretanto, para que a transcrição dos operons relacionados aos alceno sulfonatos – *tauABC* e *ssuEADCB* - ocorra, é necessário a transcrição de uma outra proteína conhecida como Cbl (CysB like protein) que irá atuar como um ativador transcricional para ambos os óperons, mas principalmente para *ssu*, onde a proteína CysB inicialmente é um repressor. Sendo a proteína Cbl um integrante do regulon *cys*, a sua transcrição é regulada positivamente pela proteína CysB, como também parte da família do regulador transcricional do tipo LysR. A identidade de seqüência entre Cbl e

CysB é de 45% (PLOEG, 2001; KERTESZ, 1999). Logo, evidencia-se o duplo papel da proteína CysB: um fator de transcrição que modula positivamente o sistema *cys* e negativamente o sistema *ssu*. Entretanto, em situações de carência, a própria CysB atuará na síntese da Cbl e do operon *ssu*. Caracterizações estruturais já foram realizadas para as proteínas Cbl, CysB, SsuD e TauD de *E. coli* (STEC *et al*, 2006; TYRREL *et al*, 1997; EICHHORN *et al*, 2002; ELKINS *et al*, 2002, respectivamente).

### **2.3.3. SsuD e SsuE: o sistema dois componentes envolvidos na dessulfonação dos alceno sulfonatos ( sulfonatos alifáticos)**

A organização dos genes responsáveis pela captação de alceno sulfonatos é estabelecida no operon *ssuEADCB*. Em todas as espécies estudadas, o operon *ssu* contém genes que codificam para o sistema de transporte do tipo ABC que promovem a captação de alceno sulfonatos dentro da célula (KERTESZ, 1999), bem como as proteínas citoplasmáticas (EICHHORN *et al*, 2000; VAN DER PLOEG *et al*, 2001). No genoma de *Xac* o gene *XAC3199* (identificação gênica: 21240774), pertence ao operon *ssuABCDE* e teve sua função anotada como codificador de uma óxido-redutase, a proteína SsuD (que em *E. coli* seria a SsuE), enzima dependente de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) que catalisa a redução de flavina. A função da proteína SsuE em *Xac* (equivalente à SsuD em *E. coli*) (gene *XAC3200*, identificação gênica: 21240774), está anotada como componente A da nitrilotriacetato mono-oxigenase, membro da família das mono-oxigenases que requerem a flavina reduzida para sua atividade (VAN DER PLOEG, 2001). Assim, baseado na caracterização de Eichhorn *et al* (1999), as proteínas mono-oxigenase e óxido-redutase formam o sistema responsável pela redução das flavinas com NAD(P)H, fornecendo elétrons para o alceno sulfonato seja oxidado a sulfito e aldeído (EICHHORN *et al*, 2000; PLOEG *et al*, 2001) (Figura 7).



**Figura 7** Reação de desulfonização (redução do alceno sulfonato a sulfito e aldeído, realizada em *E. coli* pelas proteínas SsuD e SsuE (EICHHORN *et al*, 1999). Atentar para o fato de que SsuD e SsuE de *E. coli* apresentam nomenclatura trocada em *Xac*.

Nos últimos anos alguns grupos têm reportado a caracterização dessas enzimas do ponto de vista funcional, mas poucos sobre dados estruturais. Até o presente momento são encontradas duas estruturas depositadas no PDB (Protein Data Baking) que correspondem ao componente mono-oxigenase: SsuD de *E.coli* (1M41) (EICHHORN *et al*, 2002) e LadA de *Geobacillus thermodenitrifican* (3B9O) (LI *et al*, 2008).

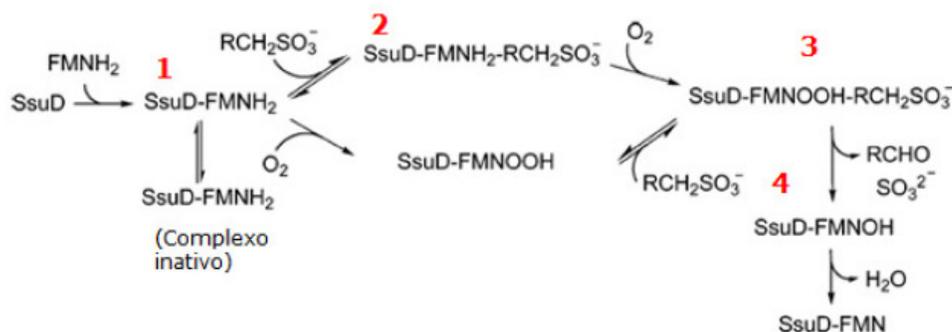
Em relação ao papel funcional da óxido-redutase, sabe-se que há um mecanismo de ordem seqüencial, onde primeiramente esta enzima liga-se ao NAD(P)H como um primeiro substrato seguida da ligação à FMN (GAO *et al*, 2007) com uma afinidade relativamente alta ( $K_d$ ): 0.015  $\mu$ M. Após a redução da FMN como substrato (FMN  $\rightarrow$  FMNH<sub>2</sub>) (GAO *et al*, 2007), esta é transferida para a mono-oxigenase, que oxida o alceno sulfonato liberando NADP e FMN (GAO *et al*, 2005) (Figura 8).



**Figura 8** Função da enzima SsuE (óxidoreductase) evidenciando o mecanismo de ordem seqüencial, primeiramente a oxidação do NAD(P)H e, posteriormente a redução da FMN e sua transferência ao componente mono-oxigenase (SsuD) (GAO *et al*, 2005). Em *Xac* a nomenclatura de SsuD e SsuE é trocada.

Abdurachim *et al* (2006) evidenciaram através dos experimentos de 'cross-linking' e cromatografia de afinidade à níquel que as enzimas SsuD e SsuE interagem formando um canal molecular com o intuito de proteger a oxidação da FMNH<sub>2</sub> em virtude da sua baixa estabilidade. Através de experimentos utilizando dicroísmo circular, também foi evidenciada a interação direta entre a mono-oxigenase e a óxido-redutase por modificação do ambiente do sítio ativo da óxido-redutase favorecendo uma interação entre ela e a FMN.

A mono-oxigenase do sistema em presença do oxigênio e da FMNH<sub>2</sub>, promove o ataque às ligações C-S do alceno sulfonato culminando na geração de aldeído e sulfito (EICHHRON *et al*, 1999; ZHAN *et al* 2008). A afinidade com que esta enzima interage com a FMNH<sub>2</sub> é de 0.32 μM e para o alceno sulfonato é de 17.5 μM. Para que ocorra a reação de dessulfonação, novamente se observa um mecanismo de ordem seqüencial, onde primeiramente, mono oxigenase se liga à FMNH<sub>2</sub>, induzindo alterações conformacionais que culminarão na interação com o alceno sulfonato. Em seguida, o intermediário da FMN: C4α-(hidro)peroxiflavina (intermediário para reações com mono-oxigenases dependentes de FMN) realiza o ataque nucleofílico ao alceno sulfonato (ligação C-S) (ZHAN *et al*, 2008) (Figura 9).



**Figura 9** Mecanismo de reação da enzima SsuD de *E. coli* (mono-oxigenase dependente de FMN) evidenciando o mecanismo de ordem sequencial: 1) primeiramente ligação à FMN com a formação de um complexo ou complexo inativo, 2) ajuste conformacional para interação com alceno sulfonato, 3) intermediário de FMN na presença de O<sub>2</sub> realiza o ataque nucleofílico ao alceno sulfonato (C-S): 4) aldeído + sulfito e SsuD+ FMN e H<sub>2</sub>O ( ZHAN *et al*, 2008).

Aparentemente, todos os genes que codificam proteínas das principais vias de captação de sulfato e sulfonatos para o interior da célula estão presentes em *Xac*, mas a funcionalidade destes sistemas ainda não foi demonstrada. Estes dados revelam a importância da caracterização das proteínas envolvidas no processo de transporte de alceno sulfonatos, bem como o estudo funcional do sistema de captação de sulfatos/sulfonatos de forma geral e específica. Neste contexto, o estudo das enzimas SsuD e SsuE servirá como ponto de partida para a caracterização completa do sistema e sua funcionalidade em *Xac*.

## **2.4. A proteína ligadora periplasmática Pbp: um componente do sistema transportador de fosfato ou fosfonatos**

### **2.4.1. Proteínas ligadoras e a Pbp de *Xac***

As proteínas ligadoras são os componentes responsáveis pela afinidade e especificidade dos sistemas transportadores tipo importadores, uma vez que capturam os substratos a serem transportados. Em bactérias gram-negativas, a proteína periplasmática é solúvel e encontra-se livre no periplasma enquanto que em bactérias gram-positivas são encontradas na forma de lipoproteínas ancoradas à face externa da membrana citoplasmática (DASSA, 2000).

As estruturas de proteínas periplasmáticas resolvidas por cristalografia, revelam que apesar da baixa identidade de sequências, estas proteínas conservam o tipo de enovelamento que é peculiar. Geralmente possuem dois domínios, conhecidos como N e C-terminal que são conectados por uma ou mais cadeias polipeptídicas. Entre estes, forma-se uma fenda onde o ligante alvo é encaixado. Os resíduos de aminoácidos presentes na região do sítio de ligação promovem interações com o ligante baseadas em ligações de hidrogênio e interações Van der Waals (DAVIDSON *et al*, 2008). Se compararmos os sítios de ligação das proteínas ligadoras de molibdato, sulfato e fosfato pode-se observar a presença de resíduos carregados cujas cargas dos ânions são neutralizadas por dipolos criados por hélices alfa do domínio N – terminal que estão situadas no sítio de ligação das proteínas periplasmáticas (PAU *et al*, 2002). Além disso, se nos basearmos na estrutura da proteína ligadora de fosfato de *E. coli*, a mesma possui

resíduos de aminoácidos de carga oposta ao ligante o que garante que o sítio de ligação seja atrativo para o ligante algo (LEDVINA *et al*, 1998).

Apesar da grande quantidade de informações sobre estas proteínas, ainda existem muitas questões alvo de estudos: i) como as proteínas ligadoras reconhecem o ligante; ii) como ocorre a interação e a termodinâmica desta; e iii) qual é a natureza das modificações conformacionais durante a captação e entrega do ligante. De modo geral, as proteínas ligadoras, quando na ausência do ligante apresentam uma abertura maior dos seus domínios, tendo um maior contato com o solvente. Diferentemente, após a interação com a molécula a ser transportada, ocorre o fechamento dos domínios para internalização do ligante na fenda, de forma a promover os contatos com a proteína, como também permitir o contato entre os domínios (DAVIDSON e CHEN, 2004; WILKISON e VERSCHUEREN, 2003; MILLER *et al*, 1983, LEVEDINA *et al*, 1998). A ModA de *Xac* (PDB:2H5Y) apresenta uma topologia  $\alpha/\beta$  que na presença do ânion tem seus lobos totalmente compactados, o que reflete em um sutil aumento de estrutura secundária e resistência à estabilidade térmica. Adicionalmente, foi demonstrado que resíduos mutados na região de entrada do sítio de ligação podem impedir a interação entre os domínios e sua capacidade de interação com o molibdato (SANTACRUZ-PEREZ *et al*, dados não publicados).

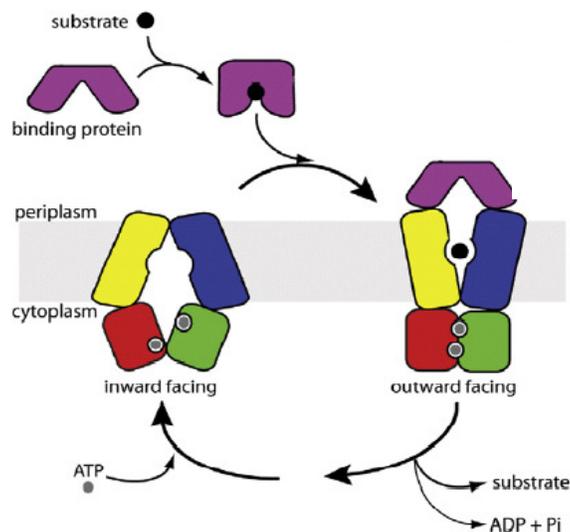
Assim, as proteínas periplasmáticas reconhecem o ligante a ser transportado com alta afinidade devido à mediação de ligações de hidrogênio. Segundo Davidson *et al* (2008), essa afinidade é variável entre 0.01 a 1  $\mu\text{M}$ , além de concentrações sub-micromolares. A abrangência mais estrutural conferida pelo trabalho de Hu *et al* (1997), expõe que interações dipolo-dipolo com o grupo amina da cadeia principal, ou com hidroxilas da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos, o tamanho do sítio de ligação, as cargas dos resíduos presentes no sítio de ligação, o volume do sítio de ligação e o estado de ionização dos íons em pH fisiológico, são os principais determinantes para a discriminação e especificidade das proteínas ligadoras entre os diferentes compostos existentes no espaço periplasmático da célula bacteriana (DAVIDSON *et al*, 2008; PAU *et al*, 2002).

Segundo Millet *et al*. (2003), existe uma relação direta entre o ângulo de abertura dos lobos e a afinidade da proteína pelo substrato alvo e que, quanto menor esse ângulo possivelmente maior seria a afinidade em termos de  $K_m$ . Sendo assim, poderíamos constatar que a afinidade do ligante é dependente não somente dos resíduos presentes

no sítio de ligação e sua interação através de forças intermoleculares, mas do equilíbrio entre abertura e fechamento dos domínios da proteína (DAVIDSON, 2008).

Ainda tem sido demonstrado que a especificidade e afinidade do ligante pelo sistema, são importantes para estimular a atividade da ATPase (KOS E FORD, 2009), as proteínas periplasmáticas além de garantirem, no caso do transportador de maltose, a atividade da ATPase é impedida na ausência do açúcar. Quando na presença do ligante, ocorrem mudanças conformacionais que permitem a proteína ligadora interagir com o mesmo, e com a permease, de forma que sinais são enviados para a hidrólise do ATP. Desde meados da década de 1990 quando emergiram as primeiras informações a respeito do sistema transportador de maltose, a grande questão foi determinar qual seria o mecanismo de comunicação entre o complexo de proteínas que permite a hidrólise do ATP somente na presença do ligante alvo ligado à proteína periplasmática.

Após muitos anos de estudo com trabalhos de diferentes grupos de pesquisa a resposta para este mecanismo dinâmico começou a emergir. Após a caracterização do sistema transportador de molibdato de *Archaeoglobus fulgidus* por Hollenstein *et al* (2007), e com os trabalhos sobre o transportador de maltose de *E. coli* desenvolvidos por Chen *et al* (2001), Davidson e Maloney (2007) e, mais recentemente, Oldham *et al* (2008), chegou-se à uma série de informações que parecem comuns aos transportadores: (i) a proteína periplasmática apresenta seus lobos fechados quando o ligante está enterrado no sítio de ligação e isso lhe confere uma compactação molecular (Figura 10 passo 1). Com isso, a menor energia livre está associada com a reorganização do transportador de membrana (TMDs), que se abre para a superfície periplasmática. De forma simultânea, a interação entre a proteína periplasmática e a TMD, é seguida de alterações conformacionais que levam ao fechamento do dímero NBD na região citoplasmática (Figura 10, passo 2). Mediante o fechamento do dímero, uma molécula de ATP é hidrolisada ao tempo que novas alterações conformacionais nas TMDs resultam na abertura dos lobos da proteína periplasmática, que passa a um estado de menor afinidade com o seu ligante de forma a liberá-lo para o transporte através da membrana (Figura 10, passo 2). Neste momento a proteína periplasmática se desliga do transportador e uma nova molécula de ATP é hidrolisada. A presença de ADP + Pi faz com que os dímeros de NBDs, instáveis, sejam separados para o início de mais um ciclo de transporte por esse sistema (Figura 10, passo 3).



**Figura 10** Representação esquemática do mecanismo do funcionamento do sistema de transporte do tipo ABC de maltose criado por Oldham e colaboradores (2008).

Nosso grupo vem trabalhando com proteínas ligadoras periplasmáticas de *Xac* com o objetivo de determinar a estrutura e função destas proteínas no que diz respeito a identificação do tipo de substrato, como de suas funções dentro da célula. A busca inicial no genoma da *Xac* por proteínas ligadoras periplasmáticas, revelou uma lista de 18 proteínas, as quais foram clonadas em vetor de expressão para avaliação da expressão em células de *E. coli*. Dentre estas, uma das proteínas que se apresentou solúvel foi a Pbp, codificada pelo gene XAC2383, cuja função foi anotada como ligadora de fosfato ou fosfonatos. A partir desta caracterização inicial, e das dificuldades iniciais em expressar a SsuD e SsuE de *Xac* na forma solúvel, esta proteína foi adicionada como alvo para estudos.

O transportador de fosfato está bem estabelecido em *X. axonopodis* e está presente em um operon composto por duas proteínas periplasmáticas (PhoX e PstS), a proteína de membrana e ATPase, e ainda, o regulador transcricional e a porina, proteína de membrana externa responsável pela entrada do elemento na bactéria (Figura 11). Por outro lado, o gene XAC2383 que codifica a Pbp, não está associado a nenhum outro gene relacionado, mas já foram descritos que diferentes proteínas ligadoras podem usar um único transportador na membrana. Um exemplo disto é a proteína ligadora de tiosulfato que utiliza o transportador de sulfato para a internalização do ligante. Ortólogos

de Pbp não foram identificados em *Xyella fastidiosa*, mas em *E. coli*, *Pseudomonas* sp., Actinobactérias e *X. campestris*, e pode ser um interessante alvo para estudos estruturais e funcionais.

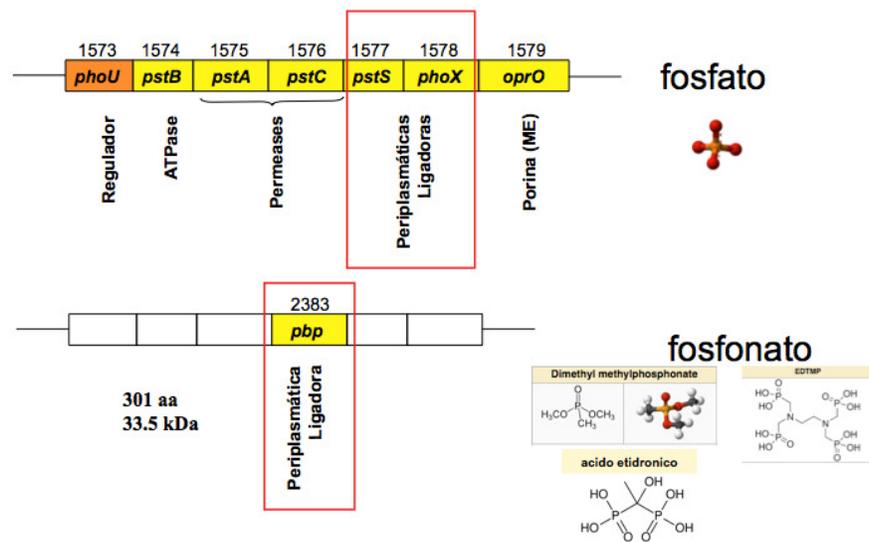


Figura 11 Caracterização do operon do sistema de transporte de fosfato de *X. axonopodis* e identificação do gene XAC2383. Os tipos de ligantes são mostradas ao lado.

#### 2.4.2. Operons e regulons dependentes de fosfato e fosfonato são encontrados em procaríotos

Fosfato e elementos fosfonados são essenciais para organismos e tem sido demonstrado que os genes envolvidos com a assimilação destes compostos encontram-se em operons e regulons, como o regulon Pho descrito de forma abrangente em *E. coli* e *Bacillus subtilis* (LAMARCHE *et al*, 2007), como também em *Mycobacterium tuberculosis* (BRAIBANT *et al*, 2000). Essa organização gênica descrita nos referidos organismos são responsáveis pela produção de proteínas do sistema transportador ABC e outras possíveis quinases e fatores de transcrição que juntos podem estar envolvidos em vias de transdução de sinal (HSIEH *et al*, 2010). Assim, a atividade dos componentes do regulon Pho pode ser evidenciada em vários fenômenos celulares que compõem circuitos regulatórios e controlam a homeostase do fosfato no ambiente celular (LAMARCHE *et al* 2007). Além disso, tais proteínas garantem a importação de fosfato por sistema de captação especializados como os transportadores ABC. Geralmente, os genes desse

regulon têm sua expressão controlada, sendo ativados em baixas concentrações de fosfato (HSIEH *et al*, 2010).

Além do regulon Pho, outros sistemas para a captação de fósforo como o cluster de genes denominado Pit para transporte de fosfato inorgânico em *E.coli* (VEEN, *et al*, 1993). Durante uma análise dos tipos de transportadores ABC já descritos no banco de genes e genomas Kegg (<http://Pbp.genome.jp/kegg/>) em *E. coli*, também foi identificado o sistema de transporte para captação de derivados de fosfato denominado PhN. Este sistema é designado para captação de fosfonato sendo o componente PhnD a proteína periplasmática do sistema (PARKER *et al*, 1994) que seria o ortólogo da Pbp de *Xac* (Xac2383).

Segundo Lamarche *et al* (2007) e Hirshberg *et al* (1998), a importância do fosfato no ambiente celular está envolvido com a patogênese, sobretudo em fenômenos de adesão e colonização de espécies enteropatogênicas (FERREIRA *et al*, 2008), formação de biofilmes, fenômenos de sensor de quorum e síntese de fatores de virulência bacterianos. Além disso, o fosfato é um importante íon envolvido na síntese de ATP como também é parte integrante de nucleotídeos carreadores de elétrons como FMN, NAD(P)H, NADH, cofator enzimático ou alostérico, elemento essencial em vias de regulação celular por transdução de sinal, e é constituinte de macromoléculas (LEHNINGER, 2010). Em virtude da sua onipresença fica claro que os sistemas celulares bacterianos podem ter desenvolvido evolutivamente redes complexas para controlar o estoque desse micronutriente e seu destino aos principais processos celulares. Com relação aos fosfonatos, sua importância é de grande relevância fisiológica tanto que podem ser encontradas em solo e ambientes celulares a exemplo do glicerol-3-fosfato. Os fosfonatos caracterizam-se por moléculas com ligações C-P e podem estar associados aos mais diversos compostos. São fosfonatos: glicerol-3-fosfato, glicose-6-fosfato, 2-aminoetilfosfonato, fosfoacetato, ácido etidrônico, dentre outros. Normalmente, por sempre estarem associadas a outras moléculas, são moléculas grandes, isto é maiores que o fosfato.

O principal interesse de estudar a proteína Pbp (XAC2383) é caracterizá-la através de análises estruturais e biofísicas para compreender sua função.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Caracterização das enzimas SsuD e SsuE do sistema de transporte do tipo ABC responsável pela captação de alceno sulfonatos em *Xac***

- Clonagem dos genes *ssuD* e *ssuE*
- Expressão e purificação das proteínas SsuD e SsuE
- Construção e análise de modelos estruturais das proteínas SsuD e SsuE
- Análises de bioinformática, para identificação de ortólogos e caracterização funcional
- Análises funcionais e estruturais através de ensaios espectroscópicos
- Experimentos de cristalização e difração de cristais

#### **3.2. Caracterização da proteína ligadora periplasmática Pbp de *Xac***

- Expressão e purificação da proteína
- Construção de um modelo da Pbp para determinação do possível sítio de interação com o ligante e caracterização comparativa
- Caracterização funcional e estrutural através de ensaios espectroscópicos
- Experimentos de cristalização e difração de cristais

## 4. Material e Métodos

A metodologia utilizada foi comum às proteínas da presente dissertação, por isso, foram agrupados em um único tópicos. Particularidades de cada um deles, serão apontadas quando pertinente.

### 4.1. Extração de DNA genômico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 (*Xac*)

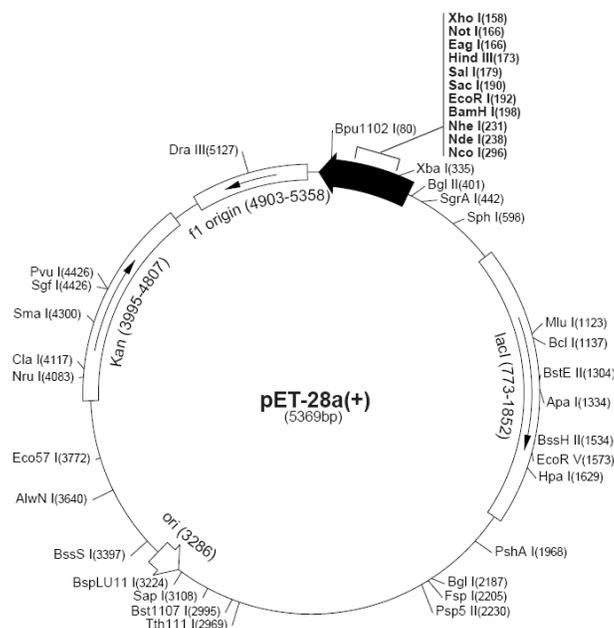
Culturas bacterianas crescidas em 3 mL de meio LB (sem NaCl e com ampicilina 100 mg/mL) sob agitação (200 r.p.m.) a 37°C durante à noite foram coletas por centrifugação a 10000 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão de extração tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, 0,5% SDS, 2% PVP), segundo o protocolo descrito por Llop, (1999). A suspensão foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 1h. Após centrifugação a 5000 x g por 5 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e adicionados 300µL de isopropanol. O material foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por mais 1h para precipitação do DNA total e centrifugado por 10 min a 13000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e após a secagem do DNA, este foi ressuspenso em 100 µL de água. Posteriormente, o DNA genômico foi purificado através do kit comercial da Quiagen® PCR purification para livrar a amostra de contaminantes.

### 4.2. Extração e digestão do plasmídeo pET28a

Células de *E.coli* DH5α contendo o plasmídeo pET28a (Figura 12) foram inoculados durante a noite na presença de canamicina (50 mg/ml). Na manhã seguinte as células foram coletadas por centrifugação 14000 r.p.m. e o DNA plasmidial foi obtido através do método de lise alcalina. Posteriormente, o mesmo foi digerido com as seguintes enzimas: 1) *NcoI* e *HindIII*; 2) *NdeI* e *EcoRI*; 3) *NdeI* e *HindIII*. O protocolo da digestão estabelecido foi igual para todas as digestões bidirecionais:

**Tabela 2** Reação de digestão do vetor pET28a para clonagem

Reagentes	volume (μL)
pET28a	4
Tampão da enzima	2
<i>Nde</i> I	1
<i>Hind</i> III	1
Água	12
Volume final	20



**Figura 12** Mapa do vetor de clonagem pET28a ( Novagen ®) utilizado para a clonagem dos genes *ssuD* e *ssuE* do operon do sistema transportador do tipo ABC de alceno sulfonatos.

#### 4.3. Amplificação dos genes *ssuD* e *ssuE* de *Xac* e, preparo dos fragmentos para clonagem molecular

Com o intuito de amplificar os genes *ssuD* (1041 pb) e *ssuE* (1329 pb), foi necessário o desenho de primers inicial e final (tabela 2) utilizando a sequência gênica

disponibilizadas no NCBI (<http://Pbp.ncbi.nlm.nih.gov>). Os primers foram desenhados para inclusão dos sítios de restrição na região inicial e final do gene, além de permitir a inclusão de uma cauda com poli-histidinas na região N-terminal do produto gênico da proteína. A amplificação dos genes *ssuD* e *ssuE* (reação exposta na tabela 3) foi obtida somente após a obtenção do DNA genômico de *Xac*. Ressalta-se que o DMSO (sulfoxido dimetil) foi utilizado na reação com o intuito de melhorar o anelamento dos primers por facilitarem a separação das fitas de DNA, pois é responsável pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.

**Tabela 3 Sequência dos primers inicial e final com a exibição dos sítios de restrição acrescidos aos genes submetidos à amplificação: *ssuD* e *ssuE***

---

Genes	Sequências	Temperatura de "Melting"
<i>ssuD</i> ( <i>NdeI</i> _EcoRI)	Foward	5'CATATgCgCTATCTCgCACA 3' TM = 56°C
	Reverse	5'gAATTCTCATTgCCAATCg3' TM = 56°C
<i>ssuE</i> ( <i>NdeI</i> _HindIII)	Foward	5'CATATgAgCgCgCCACgTC3' TM = 58°C
	Reverse	5'CCAAgCTTTCAGCgTgCgC 3' TM = 58°C

Posteriormente, a amplificação foi conferida em um gel de agarose 0.8% com a aplicação de toda a reação e realizou-se uma purificação do produto da amplificação a partir do mesmo.

**Tabela 4. Reação de Amplificação dos genes *ssuD* e *ssuE* de *Xac***

Reagentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )
DNA genômico de <i>Xac</i> 306 ( 50 ng)	1.5
Tampão DNA polimerase (1x)	5
DNTP (150 $\mu\text{M}$ )	2
Primer forward (3 pMoles)	3
Primer reverse (3 pMoles)	3
MgSO <sub>2</sub> (100 $\mu\text{M}$ )	1.5
DMSO	4
DNA polimerase: TAQ ( 5U)	1
Água V <sub>final</sub>	29
<b>Volume final</b>	<b>50</b>

**Tabela 5. Reação de digestão do produto da amplificação dos genes *ssuD* e *ssuE***

Reagente	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Reação de Amplificação	10
Tampão	2
Enzima de restrição I	1
Enzima de restrição II	1
Água	6
<b>Volume final</b>	<b>20</b>

#### 4.4. Ligaç o e transforma o

De posse do vetor pET28a e dos genes *ssuD* e *ssuE* apresentando extremidades compat veis com as enzimas de restri o de interesse, vetor e insertos foram submetidos   uma rea o de liga o para produ o do DNA recombinante. A rea o foi realizada a 17 C por 12 horas e, o esquema de rea o   exposto na tabela 5, sendo v lido para

ambos os genes. Às concentrações do vetor e gene foi estabelecida em uma proporção de 3:1 de gene : vetor.

**Tabela 6. Reação de ligação do vetor pET28a com o gene alvo à 17°C/12 horas**

Reagentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Vetor pET28a	1
Gene	3
Tampão (1x)	1
Enzima (1 U)	1
Água ( $V_{\text{final}}$ )	4
Volume final	10

Após 16 horas de incubação a reação de ligação foi utilizada para transformação por choque térmico da linhagem celular *E.coli* DH5- $\alpha$ . Posteriormente, as colônias obtidas foram inoculadas em meio LB (com canamicina 100 mg/mL) para extração plasmidial - pelo método de lise alcalina – para busca de plasmídeos quiméricos através da análise de restrição.

#### **4.5. Expressão e extração das proteínas recombinantes SsuD, SsuE e Pbp de Xac**

Os DNAs dos clones obtidos foram transformados em linhagens de *E.coli* BL21 (DE3) para a expressão das proteínas SsuD e SsuE individualmente. Inicialmente, as condições estabelecidas para a produção das mesmas foram: Meio LB com canamicina (50 mg/mL), 200 r.p.m.; fase logarítmica de crescimento: D.O. 0.5 – 0.6 ( $A_{600}$ ); indutor (IPTG – isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo): 0.1 mM. Alíquotas do frasco de indução foram coletadas no tempo zero (prévia indução- T0) e após a indução (tempo dois - T2) como controle do nível de expressão das proteínas de *E. coli*. As células foram coletadas após centrifugação diferencial 7000 r.p.m. por 25 minutos.

A extração das proteínas da fração solúvel iniciou-se pela ressuspensão do precipitado no tampão Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 500 mM, PMSF 1mM acrescido de DNase e 20 mg/mL de Lisozima. Após trinta minutos no gelo, as amostras foram

submetidas à sonicação por até 3 minutos com intervalos de 30 segundos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 20 minutos a 4°C na velocidade de 18 000 r.p.m, para separação de extratos solúveis e insolúveis. Ao extrato insolúvel, foram adicionados 2% de Triton X-100 , seguida de uma novo ciclo de sonicação nas condições anteriores. Após centrifugação por 20 minutos a 18 000 r.p.m os extratos foram adicionados em um mesmo tubo e o pellet separado e congelado. Para extração da fração solúvel da Pbp foi utilizado 50 mM de fosfato de sódio, 5% de glicerol, 100 mM NaCl e 0.5 mM de PMSF.

A análise da expressão das proteínas foi realizada através de SDS-PAGE 13%. Alíquotas do extrato solúvel e precipitado (extrato insolúvel), tempo zero (prévia indução com IPTG - T0) e, tempo dois (após a indução de 0.1 mM de IPTG - T2) foram ressuspensas em tampão de amostra 3x e aquecidas por 10 minutos a 100°C.

#### **4.6. Purificação das proteínas recombinantes SsuD e Pbp de *Xac* expressas em sistemas heterólogos**

A purificação das proteínas de modo geral foi realizada pelo método de cromatografia de afinidade à níquel. Utilizou-se coluna Hi-trap™ HP ( ge Healthcare®) de 5 mL. O aparelho AKTA-FPLC (Amersham Bioscience) equipado com monitor UPC-900, bomba P-920, válvula INV-907, misturador M-925 e fracionador FRAC-900-901 (GE). O software foi o Unicorn 4.0

Os tampões usados em cada purificação são descritos abaixo:

##### **Tampão A**

**SsuD:** 100 mM Tris pH 8.0/ 350 mM NaCl / 1 mM EDTA/ 1 mM PMSF/ 10 mM Imidazol

**SsuE:** 50 mM Tris pH 8.0/ 100 mM NaCl/ 8M Uréia

**Pbp:** 50 mM Hepes pH7.5/ 100 mM NaCl/ 1mM PMSF/ 5% Glicerol

##### **Tampão B**

O tampão B da purificação foi constituído do tampão A acrescido de 0.5 M de Imidazol.

A eluição das proteínas foi realizada na presença de tampão B em um gradiente de concentração de imidazol. A cromatografia de afinidade ao níquel foi realizada no

aparelho AKTA purifier UPC-900, com os seguintes parâmetros: 2 volumes de coluna (2 cv) de tampão A para lavagem (1 cv = 1 mL); 3 cv para equilíbrio da coluna; 25 mL de injeção da amostra; 3 cv para lavagem da alça. Cada fracionamento da eluição continha 1 mL/minuto de amostras em 20 cv de tampão B (gradiente de 0% a 100% de imidazol). Posteriormente a eluição, a coluna era lavada com 2 cv de tampão B (1M de imidazol) seguido da lavagem com 5 cv de água mili-Q e 3 cv de etanol 20%. Antes do início de cada experimento todos os tampões foram filtrados e deareados com o intuito de evitar bolhas de ar e retenção de micropartículas no interior do aparelho, e os extratos foram filtrados em filtros 0.45 $\mu$ M (Millipore).

As frações de lavado e eluídas foram analisadas e controladas através do gel SDS-PAGE a 13%. Para garantir a qualidade das amostras purificadas foi utilizada a cromatografia de filtração em gel realizada em coluna Superdex 16/60, 200.

#### **4.7. Modelagem por homologia das proteínas SsuD, SsuE, Pbp de Xac**

A construção de modelos das proteínas SsuD, SsuE e Pbp foi realizada através do programa Modeller (SALI E BLUNDELL, 1993). As coordenadas estruturais que serviram como molde para cada uma das proteínas foram escolhidas a partir dos melhores valores do BlastP contra o banco de dados de proteínas (PDB) e, conseqüentemente, aquela de proteínas com maior homologia seqüencial existente e funções similares. Para a produção dos arquivos de entrada do programa modeller, foram realizados alinhamento entre as sequências das proteínas de interesse e as proteínas usadas como molde através do programa ClustalW, seguida da análise e correção manual. Os seguintes parâmetros foram estabelecidos para o alinhamento global: Matriz Blosum62; Molécula: proteína; Gaps: 10.0.

Uma vez de posse do arquivo de alinhamento, um arquivo de entrada do programa Modeller foi construído com o nome da proteína, número de aminoácidos e resolução em ângstroms. Cada arquivo de alinhamento é mostrado na sessão de resultados juntamente com o modelo de cada proteína.

#### 4.8. Preparação do complexo SsuD/NAD(P)H/FMN: Docking molecular

Todas as estruturas dos complexos são preparadas para minimização de energia usando a função CleanAll do software YASARA onde todos os átomos de hidrogênio e outros átomos ausentes do modelo são criados. Os parâmetros do campo de força são de Yamber3. O posicionamento de NAD(P)H em SsuD foi executado através da superposição da estrutura de SsuD com a proteína Yvgn (PDB:3D3F), Identificação gênica: 936001. A estrutura de foi descartada e as coordenadas da molécula de NAD(P)H copiadas para a estrutura de SsuD. A estrutura dos complexo é submetida à minimização de energia, para eliminar contatos de van der Waals inadequados gerados pelo posicionamento do NAD(P)H em SsuD. Para tal, foram utilizados cálculos de mecânica quântica para determinar cargas pontuais semi-empíricas AM1 Mulliken (STEWART,2000). Esta etapa envolveu a otimização de geometria com o modelo de solvatação COSMO (KLAMT, 1995) . Em seguida procedeu-se com a atribuição de tipos atômicos e tipos de ligações do método AM1BCC. A melhoria das cargas AM1BCC é realizada usando cargas RESP ideais estabelecidas de fragmentos moleculares semelhantes. Por fim, fez-se a atribuição dos parâmetros de campo de força restante para cada tipo atômico usando GAFF (General AMBER Force Field). A distância de corte para o cálculo de componentes de energia relacionados com átomos não ligados foi de 8 Å. A energia do complexo SsuD-NAD(P)H foi minimizada usando “steepest descent” seguido de simulated annealing. Para o ancoramento do flavina mono nucleotídeo (FMN), a caixa de simulação de 15 Å foi posicionada com um centro definido no C4 de NAD(P)H, cobrindo uma depressão na superfície de SsuD. A varredura das conformações de menor energia de FMN ligada à SsuD foi realizada utilizando o programa Autodock (MORRIS *et al*, 2008). A parametrização de FMN foi conduzida do mesmo modo que NAD(P)H, como descrito acima. Foram executadas 50 varreduras, sendo que os melhores resultados geraram 10 agrupamentos. Para as análises restantes foram utilizadas apenas as conformações em que o tripo anel da falvina estava posicionado próximo à nicotinamida de NAD(P)H.

#### 4.9. Dicroísmo Circular (CD) e Desnaturação Térmica das Proteínas SsuD e Pbp de *Xac*

A quantificação e descrição da estrutura secundária foi realizada pela técnica de Dicroísmo circular (CD) no Espectropolarímetro JASCO-810 com o controlador de temperatura Peltier Type Control System PFD425S. Para tal, seguintes parâmetros foram estabelecidos para a coleta dos espectros: comprimento de onda: 190-260; velocidade de 50 nm/seg; intervalo entre as coletas: 0.5 nm; scanning contínuo; Bandwith: 1; Resposta: 4 segundos; 25 a 30 acumulações; temperatura constante de 20°C. As amostras foram condicionadas em cubetas de quartzo de 0.1 cm (1mm) de caminho óptico. Após a realização das acumulações, os dados foram salvos no formato .txt. O tratamento dos dados foi realizado a partir da subtração do espectro do tampão e normalização dos em elipsidade molar, de acordo com Corrêa *et al.* (2009):

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$$

onde:

- [ $\theta$ ] = elipsidade residual molar;
- $\theta$  = milidegree
- M = massa molar da proteína
- C = concentração da proteína em mg/mL
- l = caminho óptico
- n = número de resíduos de aminoácidos

Para avaliação da termoestabilidade das proteínas Pbp e SsuD, foram usados ensaios de desenovelamento térmico, monitorado no comprimento de onda de 222 nm. O aparelho utilizado foi o mesmo para o Dicroísmo Circular (Espectropolarímetro JASCO 810) no programa “Variable temperature” com os seguintes parâmetros: comprimento de onda em 222 nm, temperatura inicial de 20°C, temperatura final de 110°C, intervalo entre as coletas: 0.5°C e gradiente de temperatura de 0.5°C por minuto. A concentração de proteína utilizada foi 20  $\mu$ M em tampão Hepes 5 mM para Pbp e diferentes concentrações para SsuD. A temperatura de transição do desenovelamento ( $T_m$ ) foi assumida como a temperatura do ponto de inflexão da curva de desnaturação e, os dados foram plotados e tratados pelo programa Origin 7.5 segundo ajuste não linear para  $T_m$ , e as frações enovelada e desenovelada foram calculadas conforme proposto por Greenfield *et al* (2006).

#### **4.9. Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da proteína SsuD na presença de FMN e NAD(P)H**

Para os experimentos de ITC foi utilizado 40  $\mu\text{M}$  de proteína SsuD com titulação de 25 injeções de 500  $\mu\text{M}$  de NAD(P)H ou FMN, sendo a primeira titulação correspondente a um volume de 2  $\mu\text{L}$  (0.4  $\mu\text{M}$ ) e as demais 10  $\mu\text{L}$  (2.15  $\mu\text{M}$  a cada titulação). Ligantes e proteína foram mantidos nos mesmos tampões para reduzir possíveis erros inerentes às medidas.

Previamente ao experimento com proteína e ligante, realizou-se um branco com a titulação do tampão para averiguar trocas de calor que poderiam existir. Os experimentos foram realizados em 20°C usando o equipamento VP-ITC microcal. A constante de associação ( $k_a$ ) e parâmetros adicionais (estequiometria, entalpia e entropia) foram obtidos através do ajuste da curva pelo software Origin.

#### **4.10. Ultracentrifugação analítica (AUC) e Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo**

Os experimentos de AUC foram realizados na ultracentrífuga Beckman Optima XL-A (Beckman Coulter), em temperatura de 20°C, com o rotor AN-60Ti. O comprimento de onda utilizado para varredura foi de 280 nm a uma velocidade de 30.000 r.p.m com medidas de 12 horas. O software Sedfit foi utilizado para tratamento dos dados de velocidade de sedimentação (SCHUCK, 2000), coeficiente de sedimentação ( $s^*$ ) e demais parâmetros.

Os experimentos de raio-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, do CNPEM. A distância amostra-detector foi de 1068 mm e o comprimento de onda utilizado foi de  $\lambda=1,488 \text{ \AA}$ . Duas concentrações de amostras foram analisadas: 1,15 mg/mL e 0.82 mg/mL. O pacote ATSAS 2.4 foi utilizado para processamento dos dados o software GNO (SVERGUN D.I., 1992) para o método de construção do envelope molecular (*Ab initio*) (SVERGUN, D.I., 1999).

#### 4.11. Ensaio funcionais da proteína SsuD

Ensaio para determinação da atividade da SsuD na presença de NAD(P)H e FMN foram realizados no espectrofotômetro Varian 50 Bio- UV visible com a temperatura estável de 20°C com coletas entre 0.1 segundos. As condições experimentais foram estabelecidas baseadas nos artigos de Gao *et al* (2007), Zhan *et al* (2008) e Eichhorn *et al* (1999). As amostras foram previamente tratadas com nitrogênio para obtermos a condição de anaerobiose e temperatura foi mantida constante a 20°C. O decaimento da absorbância do NAD(P)H foi analisado a 340 nm (estado reduzido) e a alteração de FMN oxidada para reduzida através da alteração do pico correspondente a este componente de 450 nm. O volume final de cada mistura de reação foi de 0.5 mL, com as seguintes concentrações: 11 µM SsuD, 20 µM FMN, 200 µM NAD(P)H em tampão 20 mM de Fosfato de sódio pH 7.4 e 10% Glicerol. Para a montagem da reação, primeiramente, misturou-se FMN e tampão com o intuito de obter o branco. Em seguida, adicionou-se a proteína SsuD e por fim, o NAD(P)H. Antes que as medidas fosse iniciadas, aguardou-se cerca de um minuto até que ocorresse a estabilização dos reagentes em solução. Como controle, foram realizadas medidas sucessivas de NAD(P)H na ausência da proteína.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos após subtração dos brancos e as velocidades das reações foram obtidas de acordo com as equações de Michaelis-Menten, pelo software Enzyme software. A concentração de NAD(P)H foi determinada espectrofotometricamente em 340 nm baseado no coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{340} = 6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.12. Ensaio de Cristalização das proteínas SsuD e Pbp

Experimentos de cristalização foram realizados com os kits comerciais “crystal screen” da Hampton Research 1 e 2. O método escolhido foi o método de gota sentada na proporção 1:1 com a concentração de proteína acima de 10 mg/mL para Pbp e 19, 12 e 14 mg/mL para a proteína SsuD. As placas contendo o experimento foram armazenadas na temperatura constante de 17°C. As condições de cristalização mais proeminentes foram refinadas tanto na concentração de precipitantes quando no pH da solução cristalizante.

#### **4.13. Soluções e tampões**

As soluções e tampões utilizados nos experimentos foram preparados de acordo com a metodologia de Sambrook *et al* ( 1989).

#### **4.14. Eletroforese em gel de acrilamida 13% e eletroforese de DNA**

O método de análise em gel SDS-PAGE – desnaturante – foi de acordo com Laemmli (1970). A coloração foi realizada por Coomassie Blue R250 na presença de água e ácido acético para que a descoloração fosse feita por fervimento em água sobre microondas por 2 minutos.

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 0.8% com brometo de etídio em tampão TAE ( Tris-acetato-EDTA 1x) com a voltagem estabelecida de 100V em 40 minutos. O marcado de peso molecular utilizado foi Fermentas (SM403) e o tampão de aplicação (Loading dye – 6x) foi preparado no laboratório contendo glicerol, xileno cianol e azul de bromofenol.

## 5. Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados em três partes, uma para cada proteína estudada: SsuD e SsuE do sistema de transporte de alceno sulfonatos envolvido no regulon *cys*, partes I e II respectivamente, e parte 3 para a proteína Pbp, ligadora de fosfonatos.

### Parte I - A proteína SsuD de *Xac*

#### 5.1. Amplificação e clonagem do gene *ssuD* no vetor pET28a

A amplificação do gene *ssuD* (1041 pares de base - pb) a partir do DNA genômico de *Xac* foi obtida com êxito, conforme evidenciado na Figura 13. Para otimizar os ensaios de amplificação, foi realizada uma reação de PCR em gradiente de temperatura (resultados não mostrados), a qual revelou que a melhor temperatura de anelamento para obtenção do gene *ssuD* foi 57°C.

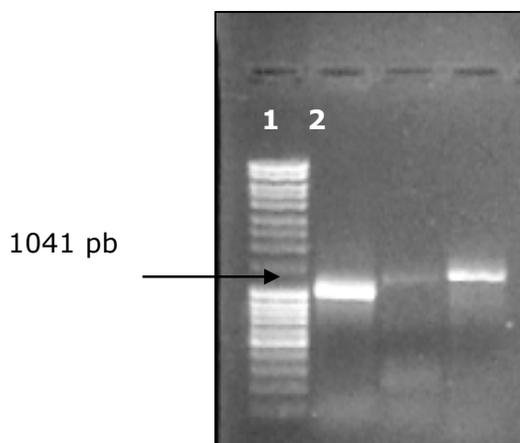
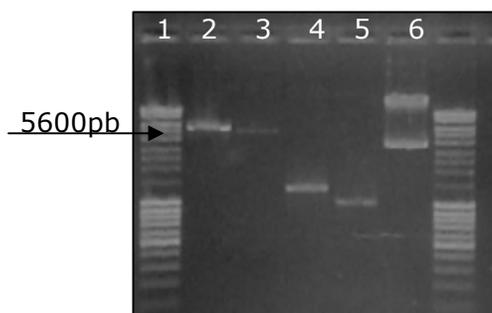


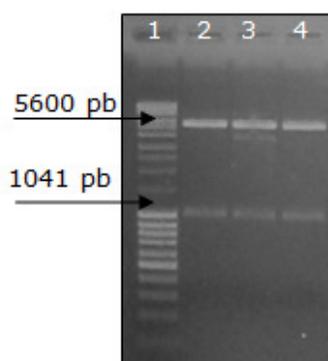
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose evidenciando a amplificação dos genes *ssuD* *Xac*. 1. Marcador de massa molecular - #SM0403 – Fermentas®; 2. fragmento de PCR codificando o gene *ssuD* (1041) pb.

Uma vez obtido o fragmento de DNA referente ao gene de interesse, este foi submetido à clivagem com enzimas de restrição para clonagem no vetor de expressão pET28a (Figura 14).



**Figura 14** Eletroforese em gel de agarose mostrando os fragmentos de DNA plasmidiano (pET28a) e de inserto (gene *ssuD*) após a clivagem com as enzimas de interesse. 1: Marcador de massa molecular - #SM0403 – Fermentas®; 2: pET28a digerido com NdeI/EcoRI (~5600 pb)- linearizado; 3: pET28a digerido com NcoI/HindIII;; 5: *ssuD* (1041 pb) digerido com NdeI/EcoRI; 6: pET28a não digerido usado como controle da digestão.

O DNA digerido foi utilizado na reação de ligação com o vetor pET28a, para a posterior transformação de células de *E.coli* DH5 $\alpha$ . Após 16 horas de incubação à 37°C, mais de trezentas colônias foram obtidas para cada transformante e grupos de dez foram analisados por restrição com enzimas, para checagem da presença do plasmídeo contendo o inserto de interesse. A cada 10 transformantes, 3 eram clones *ssuD* (Figura 15).



**Figura 15.** Gel de agarose 0.8% para confirmar a presença do inserto referente ao gene *ssuD* de *Xac*: três clones. Gel A: Linha 1: Marcador de peso molecular - #SM0403 – Fermentas®; Linha 2, 3 e 4)DNA plasmidial pET28a/*ssuD* clivado com as enzimas de interesse para a liberação do inserto referente ao gene *ssuD*, 1 kb obtido.

## 5.2. Expressão e extração da proteína recombinante SsuD de *Xac*

Após a confirmação dos clones de SsuD, o plasmídeo de interesse foi usado para transformar a linhagem celular de *E.coli* BL21 (DE3). Os primeiros ensaios de expressão em meio de cultivo LB foram realizados com testes em diferentes temperaturas e tempos de indução: 37°C (2 horas), 30°C (4 horas) (resultado não mostrado) e 17°C (18 horas) (Figura 16). Os resultados mostraram que a SsuD, embora expressa em grande quantidade, acumulou-se em corpúsculos de inclusão na forma insolúvel e uma pequena parte na fração solúvel. A proteína apresentou massa molecular compatível com a esperada, isto é, 39 kDa. Posteriormente, novos testes com variações de agitação (Figura 17) e linhagens de expressão (Figura 18) também foram realizados.

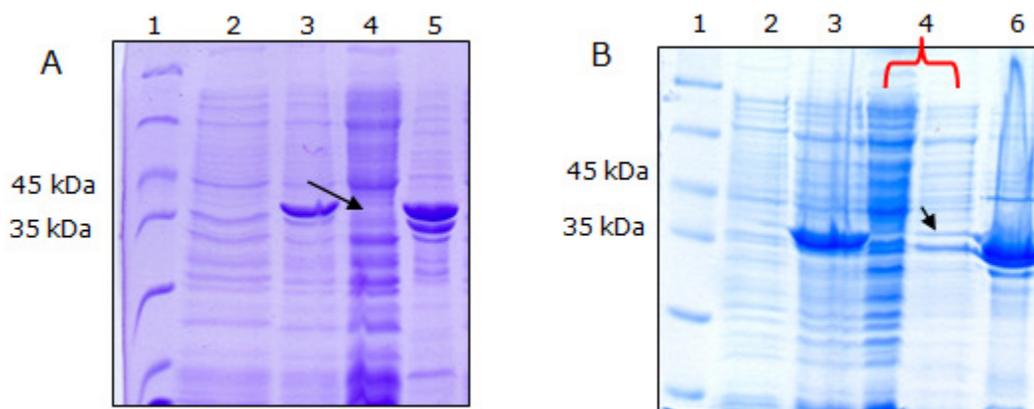
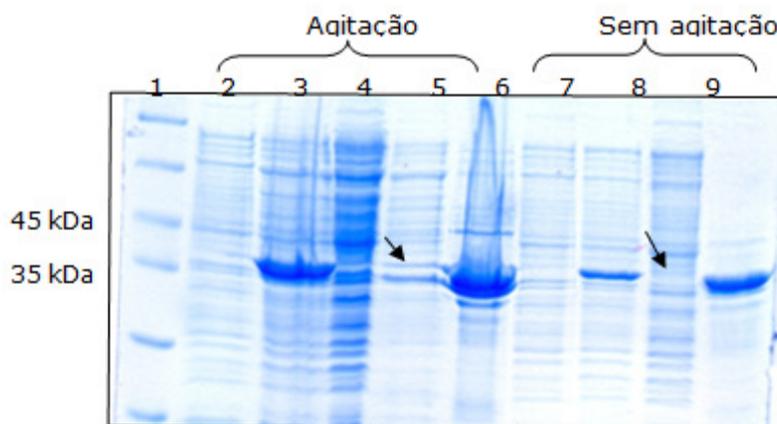


Figura 16. Análise da expressão e solubilidade da proteína recombinante SsuD de *Xac* nas cepas *E. coli* BL21(DE3) evidenciada em SDS-PAGE 13%. Observe em A aeração em 75% do frasco culmina na insolubilidade, diferentemente da aeração do frasco de indução com 50% em B. Condições testadas: 37°C/ 200 r.p.m/ 2 horas. Setas indicam a presença da proteína SsuD com 39 kDa. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431); 2: Extratos celulares totais de culturas não induzidas (Tempo zero - T0); 3: Extratos celulares totais de culturas induzidas (Tempo dois - T2); 4: Extratos celulares solúveis; 5: Extratos celulares insolúveis.



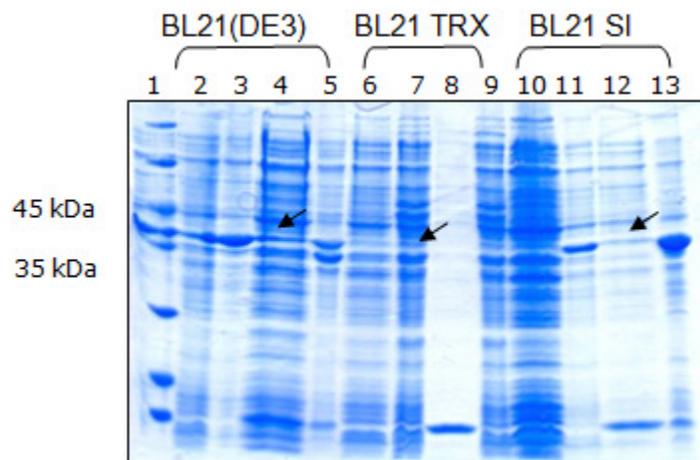
**Figura 17.** Análise da expressão e solubilidade da proteína recombinante SsuD de *Xac* nas cepas *E. coli* BL21(DE3) evidenciada em SDS-PAGE 13%. Condições testadas: 17°C/ 200 r.p.m/ 18 horas e 17°C/ sem agitação/18 horas. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431); 2 e 7: Extratos celulares totais de culturas não induzidas (Tempo zero - T0); 3 e 8: Extratos celulares totais de culturas induzidas (Tempo dois - T2); 4, 5 e 9: Extratos celulares solúveis; 6 e 10: Extratos celulares insolúveis. Nota-se pela canaleta 9 que a proteína SsuD não é expressa na ausência de agitação. Presença da proteína confirmada, também, por Western Blot.

Ensaio de expressão da proteína recombinante SsuD (39 kDa) em cepas de *E. coli* BL21(DE3), com diminuição da aeração de 75% para 50% e agitação vigorosa a 200 r.p.m., produziram uma pequena quantidade de proteína na fração solúvel. Nessas condições não foi possível notar efeito da temperatura na melhora de solubilidade da proteína expressa. A partir destes resultados, novas linhagens para expressão foram testadas com o intuito de se aumentar a solubilidade da SsuD (Tabela 7). As condições usadas nestes testes foram: 37°C – 2 horas, 200 r.p.m. e 50% de aeração no frasco. A escolha das linhagens foi baseada em suas características particulares, como a presença de duas chaperonas que são ativas a baixas temperaturas na cepa Artic Express; a presença da lisozima T7 de bacteriófago na linhagem BL21 (DE3) PLysS que atua com um repressor da RNA-polimerase, diminuindo a síntese protéica resultando em um possível aumento da solubilidade; e a cepa BL21 (DE3) SI foi utilizada devido ao controle transcricional diferenciado em decorrência do promotor *proU*.

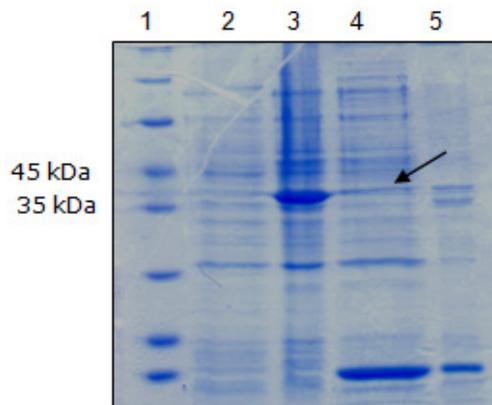
**Tabela 7. Linhagens celulares testadas para a expressão da proteína recombinante SsuD de *Xac* e sua solubilidade**

Linhagem celular	Expressão solúvel	% Proteína expressa solúvel
BL21 (DE3)	++	10%
Arctic Express	-	0%
BL21 (TRX)	***	0%
BL21 SI	++	10%
BL21 PlyS	++	10%

Legenda: ++expressão solúvel/ - expressão insolúvel/ \*\*\* não houve expressão



**Figura 18. Análise da expressão e solubilidade da proteína recombinante SsuD de *Xac* nas cepas *E. coli* BL21(DE3) – controle experimental-, *E. coli* BL21(DE3) TRX e SI evidenciada em SDS-PAGE 13%. Condições testadas: 37°C/ 200 r.p.m/ 2 horas. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431); 2, 6 e 10: Extratos celulares totais de culturas não induzidas (Tempo zero - T0); 3, 7 e 11: Extratos celulares totais de culturas induzidas (Tempo dois - T2); 4, 8 e 12: Extratos celulares solúveis; 5, 9 e 13: Extratos celulares insolúveis. As setas em preto indicam a localização da proteína alvo.**



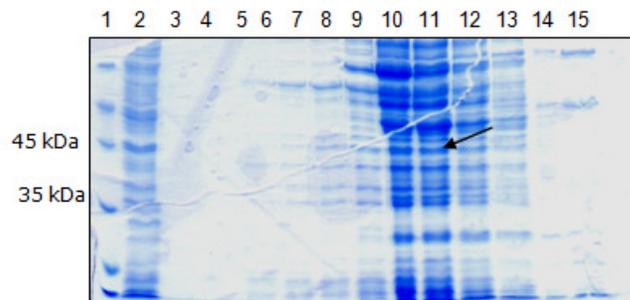
**Figura 19.** Análise da expressão da proteína SsuD em cepa de *E. coli* BL21 pLysS por SDS-PAGE 13%. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431); 2. Amostra de extrato celular de cultura não induzida (Tempo zero - T0); 3. Amostra de extrato celular de cultura induzida (Tempo dois - T2); 4. Extrato celular solúvel e 5. Extrato celular insolúvel. A seta em preto indica a localização da proteína alvo.

Os resultados comparados mostram que a solubilidade da proteína não foi significativamente aumentada em nenhuma das linhagens testadas, mas sensivelmente nas linhagens BL21 (DE3) e BL21 pLysS (Figura 19). Por mais que o extrato solúvel proveniente da linhagem *E. coli* BL21(DE3) estivesse clarificado em excesso, a linhagem TRX não expressou a proteína, como evidencia a Figura 18 (coluna 7, fração induzida T2).

### 5.3. Purificação da proteína recombinante SsuD de *Xac* e DLS

Os extratos celulares das frações solúveis da proteína SsuD de *Xac* foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade ao níquel. Os primeiros resultados da purificação foram insatisfatórios uma vez que a proteína foi eluída juntamente com uma grande quantidade de contaminantes e somente em altas concentrações de imidazol (aproximadamente 500 mM) (Figura 20). A presença dos contaminantes poderia ser explicada pela ausência de imidazol no tampão de lise da extração, de forma que a estringência seria diminuída. A utilização de uma coluna comercial de 5 ml também pode explicar a presença dos contaminantes, já que a quantidade de proteína de interesse solúvel era muito baixa. Neste caso, a alternativa foi usar uma coluna de 1mL pra redução da resina e incorporação de imidazol no tampão A

da purificação. Os resultados da purificação da proteína SsuD estão apresentados na Figura 21.



**Figura 20. Cromatografia de afinidade a níquel (IMAC) da proteína SsuD de Xac, analisada por SDS-PAGE 13%. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431). 2. Fração do lavado referente às proteínas que não ligaram na coluna; 3. Lavagem com 15 mL de tampão de purificação. 4 à 15. gradiente de eluição com Imidazol, sendo que as 9 a 15 foram o único pico do cromatograma de purificação. A eluição deste pico aconteceu com aproximadamente 500 mM de Imidazol. A seta em preto indica a localização da proteína.**

A proteína SsuD foi eluída de forma pura, mas a presença de duas bandas, uma referente a 39 kDa (proteína inteira) e outra a 29 kDa que foi confirmada após o ensaio de Western Blot, utilizando-se anticorpos anti-His6tag (Figura 21B) como degradação da SsuD. Análises de espectrometria de massas evidenciaram que a banda de 29 kDa não apresentava a região C-terminal. Análises da sequência de aminoácidos e busca por sítios de clivagem de proteases mostraram que o possível sítio de clivagem que originaria um fragmento com a massa obtida, seria o R243 alvo para o ataque de tripsina, clostripaína e proteinase K (Figura 21C). Neste caso, modificações durante a extração e purificação da proteína foram realizadas com o acréscimo de 10mM de benzamidina (inibidor de serinoproteases) no tampão de extração, já adicionado de 1 mM de PMSF e 1mM de EDTA. Outra medida foi adotar o procedimento de purificação em ambiente refrigerado (4°C). Estes procedimentos levaram à purificação da SsuD em sua forma solúvel e integral (Figura 22).

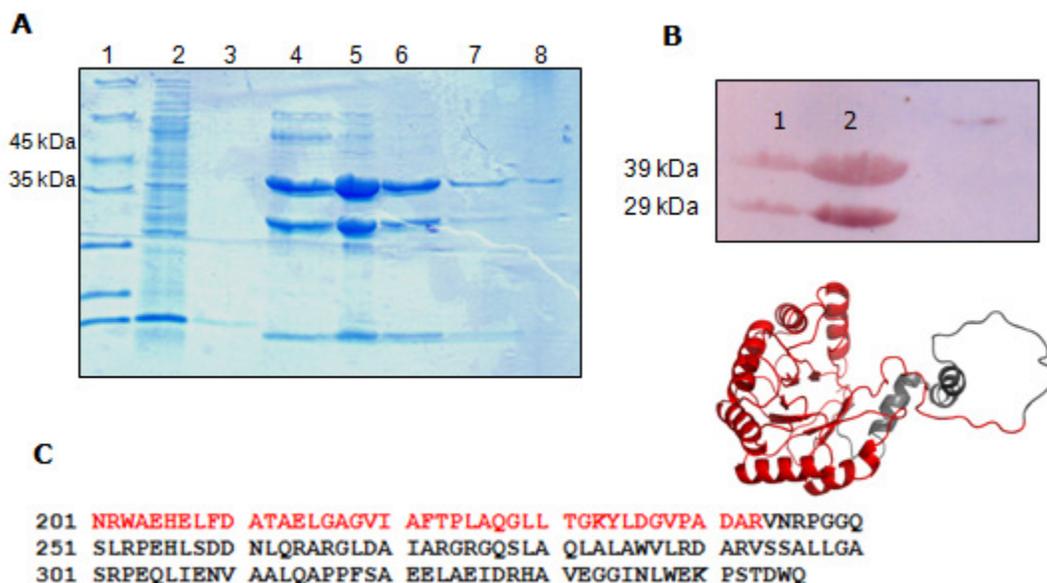


Figura 21. Cromatografia de afinidade a níquel (IMAC) analisada por SDS-PAGE 13%. A) SDS-PAGE referente aos picos observados no cromatograma após a cromatografia. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431). 2. Extrato celular solúvel ejetado da coluna; 3. Lavagem com 3 volumes da coluna (3 x 1mL) com tampão de purificação; 4,5,6,7 e 8. Eluição da proteína SsuD 150 mM de imidazol. B) Ensaio de Western Blot para confirmação da presença da proteína SsuD e seu fragmento com 29 kDa. 1 e 2: Proteína SsuD (blotting realizado em duplicata) C) Resultado da espectrometria de massas evidenciando o fragmento obtido e o possível sítio de clivagem da proteína SsuD (resíduos em cinza) na sua região C-terminal. A região clivada é evidenciada em cinza chumbo no modelo da proteína SsuD, e seria alvo de serinoproteases.

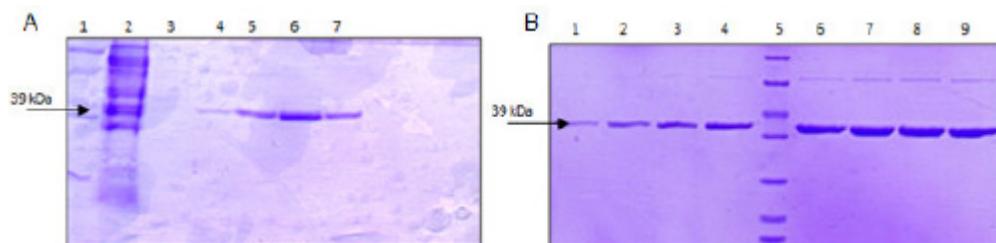


Figura 22. Etapas de purificação da proteína SsuD. A) Cromatografia de afinidade a níquel (IMAC) da proteína SsuD de *Xac*, analisada por SDS-PAGE 13%. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431). 2. Fração do lavado referente às proteínas que não ligaram na coluna; 3. Lavagem com 15 mL de tampão de purificação. 4 à 7. Gradiente de eluição com Imidazol em 100 mM de imidazol. B) Gel filtração da proteína SsuD em tampão Tris 20 mM pH 8.0 na coluna Superdex 16/60 200.

Posteriormente a purificação das proteínas por cromatografia de exclusão molecular, experimentos de DLS foram realizados para inspeção da qualidade amostral. A proteína SsuD se mostrou uma proteína monodispersa (12.3% de polidispersividade), com raio hidrodinâmico de 5.7 nm e com uma massa molecular estimada de 190 kDa, sugerindo uma organização em forma de tetrâmero. De fato, este tipo de organização tem sido evidenciada em muitas óxido-redutases cujas estruturas são disponíveis no PDB 3ERP, 1M41, 1QRQ e 3D3F.

#### **5.4. Análises de Bioinformática: identificação de ortólogos, homologia, e relações filogenéticas da proteína SsuD de *Xac***

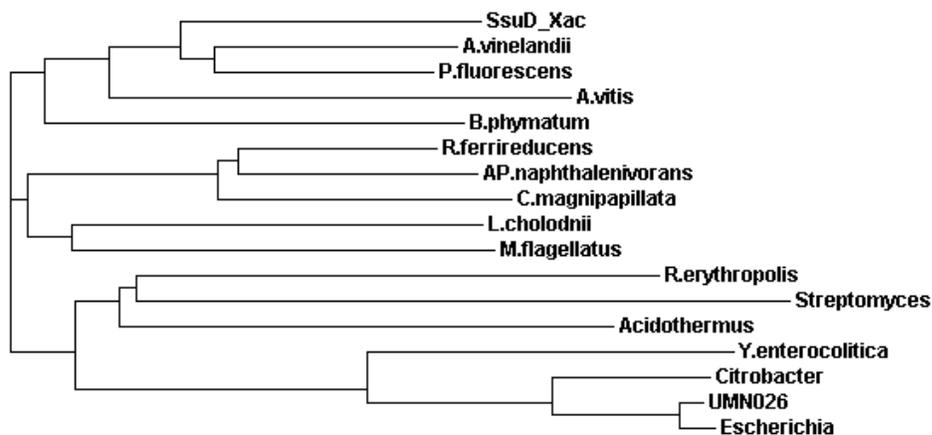
O gene *Xac3199* (*ssuD*) pertence ao óperon de captação de alcanosulfonatos *ssuABCDE*, cuja proteína ligadora periplasmática, SsuA, teve sua estrutura tridimensional resolvida pelo nosso grupo (BALAN et al, 2008). A anotação inicial dos genes deste transportador atribuía sua função ao transporte de nitrato e sulfato, mas não alceno sulfonatos, como posteriormente foi evidenciado através de experimentos espectroscópicos e pelas próprias estruturas da proteína ligadora na presença de três alceno sulfonatos diferentes. Na organização do operon de captação de alceno sulfonatos em *E. coli* os genes *ssuD* e *ssuE* codificam respectivamente as enzimas mono-oxigenase e óxido-redutase, pertencentes a um sistema denominado de dois componentes, no qual para que o alceno sulfonato seja transformado em sulfito e aldeído, é preciso a ação conjunta das duas enzimas (EICHHORN et al, 1999). A análise detalhada dos componentes do operon bem como dos genes adjacentes, e neste caso, *ssuD* e *ssuE*, revelou que os mesmos seriam os elementos responsáveis pela assimilação e incorporação do enxofre à célula. Com o objetivo de identificar ortólogos da proteína SsuD, foi realizada uma busca através do programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os resultados de maior pontuação (score) são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8. Ortólogos da proteína SsuD de *Xac* obtidos a partir do BlastP – (não redundante, NR) contra o banco de dados geral.**

Microorganismo	Função Predita	Identidade sequencial	Ambiente
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>Aurantifolii</i>	Óxido-redutase	339/346 (97%)	solo e planta
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vasculorum</i>	Óxido-redutase	330/346 (95%)	solo e planta
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i>	Óxido-redutase	327/346 (94%)	solo e planta
<i>Azotobacter vinelandii</i>	óxido-redutase aldo/ceto	292/346 (84%),	solo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	óxido-redutase	284/343 (82%)	solo
<i>Pseudomonas syringae</i>	aldo/ceto	275/342 (80%)	
<i>Agrobacterium vitis</i>	Hipotética	260/344 (75%)	solo
<i>Burkholderia phymatum</i>	óxido-redutase aldo/ceto	257/344 (74%)	Patogênica e biotecnológica
<i>Rhodofereax ferrireducens</i>	redutase aldo/ceto	257/344 (84%)	aquática
<i>Leptothrix cholondnii</i>	redutase aldo/ceto	254/346 (73%)	aquática
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	redutase aldo/ceto	252/344 (73%)	sedimentos de água doce contaminada
<i>Curvibacter magnipapillata</i>	Hipotética	247/343 (72%)	não encontrado
<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	redutase aldo/ceto	244/346 (70%)	aquática (ambientes contaminados)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	óxido-redutase - redutase aldo/ceto	238/342 (69%)	solo e aquática
<i>Yersinia enterocolitica</i>	redutase aldo/ceto	223/343 (65%)	Enterobactéria
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	redutase aldo/ceto	230/343 (67%)	água ácida e lama
<i>Citrobacter</i>	redutase aldo/ceto	228/345 (66%)	água e solo
<i>Escherichia coli</i>	redutase aldo/ceto	227/345 (65%)	Enterobactéria
<i>Streptomyces</i> sp	Óxido-redutase	222/328 (65%)	enterobactéria

Os resultados confirmam que a SsuD de *Xac* apresenta alta identidade de sequência de aminoácidos (valores entre 65 a 97%) com redutases e óxido-redutases

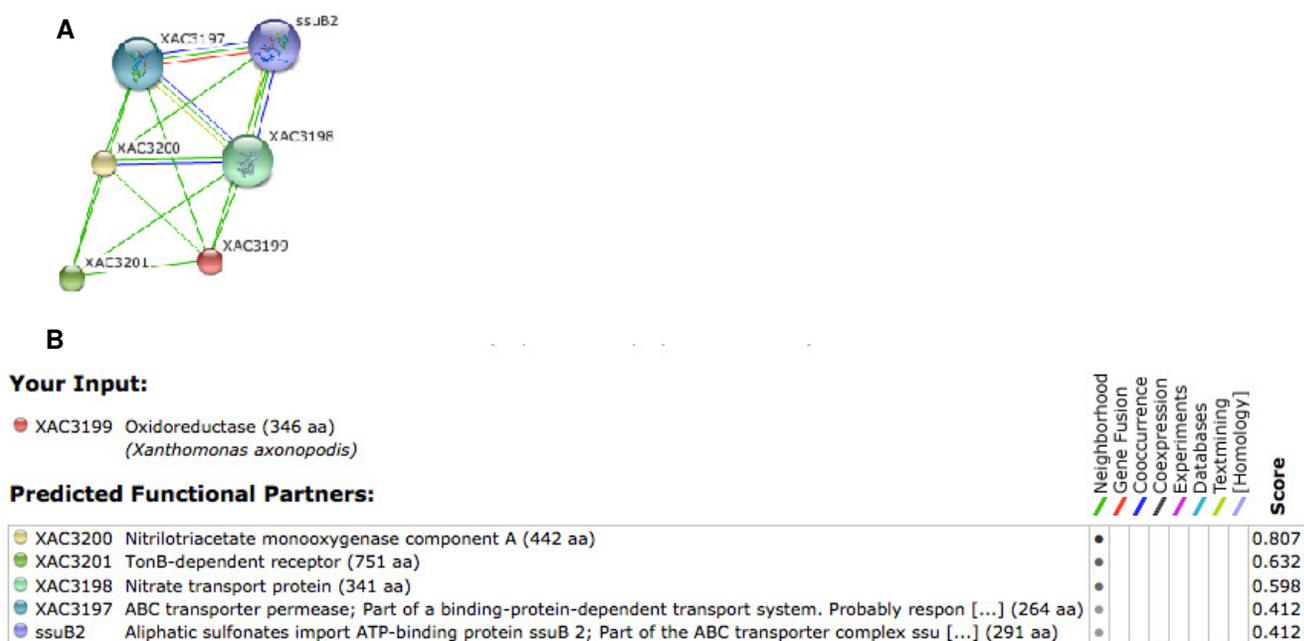
presentes em organismos de diferentes ambientes, na maioria solos e ambientes aquáticos, mas também com bactérias entéricas. Neste caso, foi observada a alteração da nomenclatura em *Xac*, onde o ortólogo de SsuD em *E. coli* seria a SsuE. De acordo com os valores de identidade e a árvore filogenética apresentada, as proteínas identificadas nos diferentes organismos estão classificadas em 3 principais ramos, sendo que a SsuD de *Xac* encontra-se evolutivamente mais próxima dos ortólogos encontrados em *A. vinelandii*, *P. fluorescens*, duas bactérias de solo (Figura 23). Outras relações são encontradas entre bactérias de solo e de ambientes aquáticos, agrupadas em um mesmo grupo ou não, sugerindo um possível mecanismo de transferência horizontal de genes, considerado bem frequente entre bactérias e já discutido em uma revisão sobre proteínas transportadoras de compostos sulfonados (KERTESZ *et al*, 2004). Por outro lado, o ramo no qual se encontra o ortólogo de *E. coli*, o mais distante da SsuD de *Xac* na filogenia, é o mais diversificado e tem a presença de ortólogos de enterobactérias, bactérias de solo e organismos extremófilos que vivem em ambientes ácidos. O fato de ortólogos de organismos filogeneticamente distantes, como extremófilos e enterobactérias, serem agrupados juntamente, mostra conservação funcional destas proteínas, e mais uma vez mostra o importante papel da transferência horizontal na aquisição de genes em bactérias.



**Figura 23. Árvore filogenética da proteína SsuD de *Xac* construída com o programa ClustalW2 no formato Phylip pelo método Neighbour Joining.**

Para análise de possíveis interações da SsuD e identificação de proteínas associadas, utilizamos o programa STRING (JENSEN *et al* , 2009). Este programa baseia-se não apenas nos diferentes bancos de dados disponíveis de genomas e

associados, mas em artigos, sendo que as informações sobre determinada proteína ou genes são associadas conjuntamente. A Figura 24 mostra o diagrama das possíveis interações diretas da SsuD (XAC3199, em vermelho) com proteínas de *Xac*, ou associações que são feitas baseadas na função predita e presença em um mesmo operon. As associações foram feitas apenas baseadas em dados de genoma, já que não existem ensaios funcionais destas proteínas ou artigos que descrevam suas funções e de proteínas relacionadas. Neste caso, conforme esperado, o programa identificou as proteínas presentes no transportador ABC, como a ATPase (SsuB2), a permease (XAC3197), e a proteína ligadora SsuA (XAC3198). Adicionalmente, foram identificadas uma porina dependente de Ton-B (XAC3201), que poderia ser a proteína de membrana externa associada ao transporte dos alceno sulfonatos, e a XAC3200, que é a mono-oxigenase SsuE (Figura 24). Estas interações genéticas, de fato, com a SsuD, mas possivelmente são expressas conjuntamente induzidas por condições específicas.



**Figura 24. Relações de associação da SsuD com outras proteínas de *Xac*, evidenciadas pelo programa STRING. A) Rede de proteínas que possivelmente apresentam algum tipo de associação com a SsuD (em vermelho). B) Relação das proteínas identificadas e suas funções previstas. Conforme mostra a figura, as relações foram todas baseadas na presença dos respectivos genes em mesmo operon.**

Os dados do STRING ainda mostram que a óxido-redutase SsuD de *Xac* é altamente conservada em grande número de bactérias e arqueas mas não em eucariotos. Adicionalmente, a presença em um operon completo apenas é evidenciada no grupo das gamaproteobactérias, conforme mostrado na Figura 25. Contudo, esta é uma representação e nem todos os organismos presentes nesta classificação apresentam o operon completo. Interessantemente, um exemplo disso é que os fitopatógenos *Xcc* e *Xyllela fastidiosa* apesar de possuírem SsuD, não apresentam outras proteínas do operon.

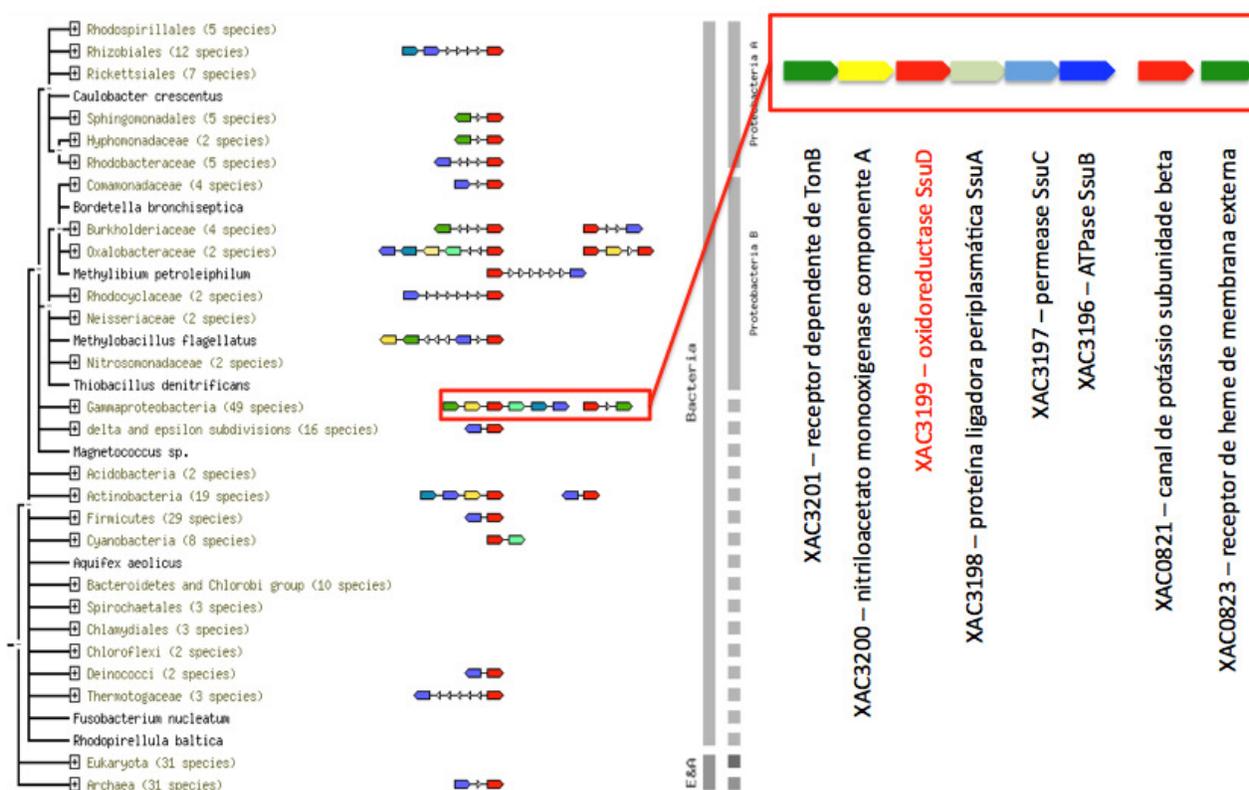


Figura 25. Análise da presença da SsuD de *Xac*, seus ortólogos e proteínas relacionadas segundo o STRING em diferentes organismos. A SsuD é apresentada em vermelho e a organização genômica encontrada em Gamaproteobactérias é evidenciada, com as respectivas funções preditas de cada gene. A árvore mostra os genes vizinhos nos genomas dos organismos. Genes conectados por linhas pretas são imediatamente adjacentes no genoma. Genes com múltiplas cores de mapa indicam eventos de fusão. Pequenas setas representam genes vizinhos mas que não apresentam similaridade relevante.

Este fato é importante e leva à especulação do papel deste operon em *Xac*. Estas bactérias, embora também fitopatógenos, apresentam mecanismos diferenciados de infecção e patogênese. Seria possível haver uma relação entre a presença do operon e a infecção? Esta pergunta deve ser respondida com análises funcionais utilizando linhagens de *Xac* mutadas para os respectivos genes, que devem ser realizadas futuramente pelo nosso grupo. Há também a possibilidade de que o operon não seja importante para a infecção ou patogênese, mas para a manutenção e sobrevivência da *Xac* no ambiente, onde a disponibilidade de sulfato pode ser baixa. Ainda assim, esta é outra especulação que deve ser testada funcionalmente através da caracterização funcional utilizando mutantes de *Xac*, análises de expressão em condições de carência de sulfato, entre outros.

Com o intuito de construirmos um modelo da SsuD que ajudasse a entender sua função, a sequência de aminoácidos da proteína foi usada para a busca de proteínas com similaridade estrutural, em três programas: o BLAST contra o PDB (banco de dados de proteínas), o programa FUGUE (SHI *et al* , 2001) e o servidor DALI. Estes programas baseiam-se em sequências e domínios de famílias protéicas conhecidas e na similaridade entre os resíduos para sugerir proteínas que possam apresentar similaridade estrutural com a proteína de interesse. Os resultados apresentados na Tabela 9, evidenciaram uma série de proteínas com estruturas tridimensionais caracterizadas por motivos barril-Tim, sendo as de maior identidade de sequências, a óxido-redutase de *Salmonella typhimurium* (código do PDB: 3ERP) e a citocromo C peroxidase de *Homo sapiens* (código do PDB: 3EXB), ambas com 58% de identidade.

Apesar da similaridade com proteínas de *H. sapiens*, canais de potássio, as coordenadas estruturais da óxido-redutase de *S. typhimurium* foram usadas para a construção de um modelo da proteína SsuD, uma vez que esta era uma proteína de bactéria, cuja função estava mais coerente com a esperada segundo a própria anotação gênica e a presença no operon. Neste sentido, foi realizado um alinhamento entre as duas sequências de aminoácidos para a preparação do arquivo de entrada do programa Modeller (Figura 26). Apesar da alta identidade de sequências o alinhamento mostrou 2 regiões presentes apenas na proteína de *Xac* que não foram modeladas.

**Tabela 9 Proteínas que apresentam similaridade estrutural com a SsuD de Xac, evidenciadas a partir da submissão da sequência de aminoácidos para busca nos programas Blastp x PDB, DALI e FUGUE.**

Função da proteína	Microorganismo	R.M.S.D	Nº de resíduos alinhados/ Total	Identidade Sequencial (%)	Referência
óxido-redutase	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.3 Å	190/327	58%	PDB: 3ERP; Singer <i>et al.</i> (a ser publicado), 2008
Citocromo C peroxidase	<i>Homo Sapiens</i>	1.5 Å	190/327	58%	PDB: 3EXB; Hays <i>et al.</i> , 2008
Canal de voltagem dependente de K <sup>+</sup>	<i>Homo Sapiens</i>	1.6 Å	116/319	36%	PDB: 1QRQ; Gulbis <i>et al.</i> 1999
Canal de voltagem dependente de K <sup>+</sup>	Mamífero	1.6 Å	116/319	36%	PDB: 2A79; Long <i>et al.</i> 2005
Subunidade beta do canal de k <sup>+</sup> em complexo com cortisol	<i>Homo Sapiens</i>	1.5 Å	116/319	36%	PDB: 3EAU. Pan <i>et al.</i> 2008
Canal de voltagem dependente de K <sup>+</sup>	<i>Homo Sapiens</i>	1.5 Å	115/319	36%	PDB: 1ZSX; Wennerstrand <i>et al.</i> (a ser publicado), 2005
Aldo- ceto redutase dependente de NADH	<i>Bacillus subtilis</i>	2.1 Å	98/317	30%	PDB: 1PYF; Ehrensberger, <i>et al.</i> 2003
Aldo-ceto redutase (NADPH dependente de FMN)	<i>Bacillus subtilis</i>	1.8 Å	98/321	27%	PDB: 1PZ1 Ehrensberger, A. E Wilson, D.K., 2003
Óxido-redutase	<i>Escherichia coli</i>	1.9 Å	71/278	24%	PDB: 1OG6 Jeudy, S., Abergel, C., Claverie, J.M. 2003
Óxido-redutase/ Aldo-ceto redutase	<i>Bacillus subtilis</i>	2.1 Å	67/307	21%	PDB: 3D3F; Zhou. <i>et al.</i> 2008
Aldo-ceto redutase	<i>Bacillus halonduras</i>	2.3 Å	94/323	29%	PDB: 1YNP/ 1YNQ; Marquardt, T. <i>et al.</i> 2008

No total, dez modelos foram construídos e submetidos às análises do PROCHECK ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES\\_3/](http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES_3/)) para averiguação da qualidade estereoquímica dos resíduos. O melhor modelo apresentou somente 1 resíduo em região não permitida, segundo a análise do gráfico de Ramachandran (dado não mostrado). Baseado na estrutura da óxido-redutase de *S. typhimurium*, o modelo da SsuD contém 12

hélices alfa e 1 folha-beta formada por 10 fitas que se organizam para formar o motivo barril-Tim (Figura 27A). As estruturas secundárias são bem organizadas e o modelo da SsuD é coerente e se adequa perfeitamente à estrutura molde. Este motivo é muito característico para proteínas que ligam NAD(P)H e FMN, bem como para oxigenases (WIERENGA, 2001).

```
>P1;3ERP
structureX:3ERP:2:A:332:A:oxidoreductase:Sty: 1.55:
-----IYQPDENRYHTMEYRRCGRSGVKLPALISLGLWHNFGDT
TRVENSRALLRQAFDLGITHFDLANNYGPPPGSAECNFRILQEDFLPWRDELIISTKAG
YTMWDGPGYGDWGS-RKYLIASLDQSLKRMGLEYYVDIFYHHRPDPETPLKETMKALDHLVR
HGKALYVGISNYPADLARQAIDILEDLGTPLIHQPKYSLFERWVEDGLLALLQEKGVGS
IAFSPLAGGQLTDRYLN-----ITADKLEKVRRLNELAARRGQKL
SQMALAWVLRNDNVTSVLIGASKPSQIEDAVGMLANRRFSAECAEID-AILEGRF----
-----*

>P1;Xac_SsuD
sequence:Xac_SsuD:1::346::oxidoreductase:Xac: :
-----MRYLAHPDRYDRIAYRRVGRSGLVLPALSLGLWHNFGDS
TPIDTQRALLRTAFDLGITHFDLANNYGPPYGSAEINFRLLREDFKPYRDELIIISTKAG
WDMWPGPYGGSSRKYLLSSLDQSLQRLGVDYVDIFYSHRFDADTPLEETAGALASAVQ
QGKALYVGISSYSAARTREIAALLRAWKVPLLIHQPAYNLFNRWAEHELFDATAELGAGV
IAFTPLAQGLLTGKYLDGVPADARVNRPGGQSLRPEHLSDDNLQRARGLDAIARGRQSL
AQLALAWVLRDARVSSALLGASRPEQLIENVAALQAPPFSAEELAEIDRHAVEGGINLWE
KPSTDWQ*
```

**Figura 26. Alinhamento de seqüências das proteínas SsuD de *Xac* e a óxido-redutase identificada em *S. typhimurium*, usado para a construção do modelo de SsuD de *Xac* segundo o programa Modeller.**

A sobreposição do modelo da SsuD ao seu molde, utilizando-se o programa CE (<http://cl.sdsc.edu/ce.html>) (Figura 27B) mostrou que a região sem comparação na estrutura da óxido-redutase de *S. typhimurium* (grande alça na estrutura), evidenciada no alinhamento, é localizada fora da folha beta, possivelmente constituindo enovelamentos externos ao barril (entre as hélice-alfa 8 e 9). Os padrões de estrutura secundária são mantidos, conforme observado no alinhamento da Figura 28.

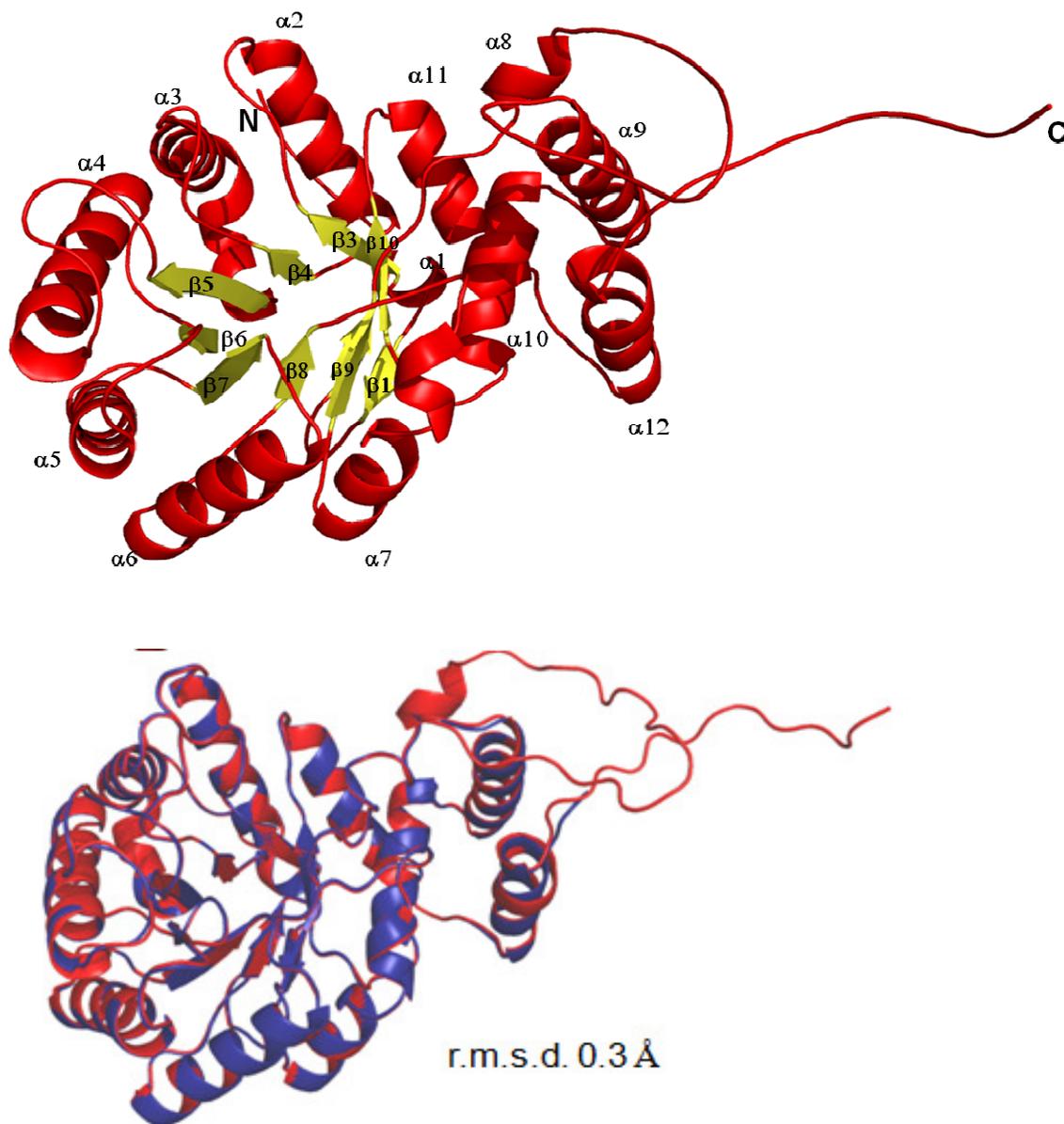
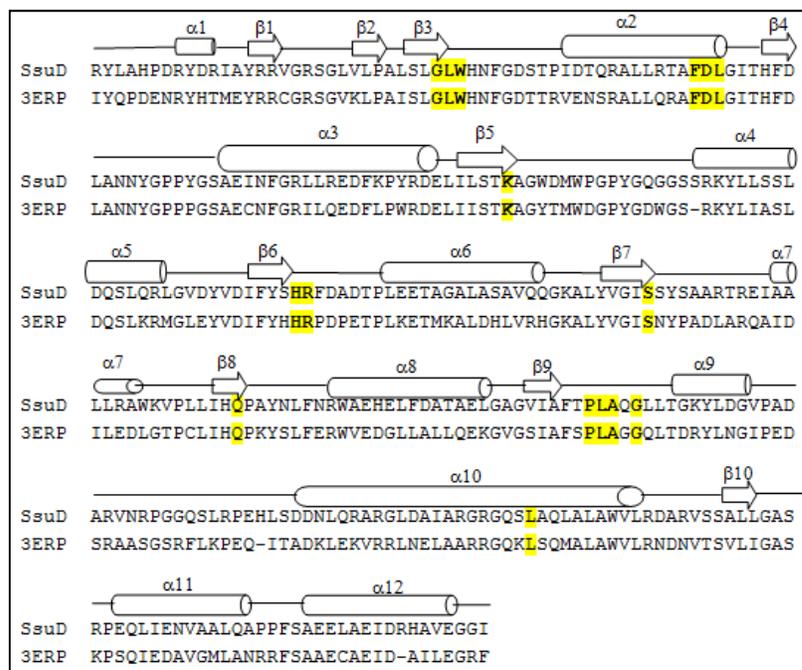


Figura 27. A) Representação em cartoon do modelo da proteína de *Xac* (vista superior), modelada por homologia a partir da óxido-redutase de *S. typhimurium* (PDB: 3ERP) usando o programa Modeller. A Proteína SsuD apresenta 8 hélices-alfa (vermelho) e uma folha beta constituída de 6 fitas (amarelo). N e C-terminais estão anotados como N e C, respectivamente B) Sobreposição estrutural da proteína SsuD com a óxido-redutase de *S. typhimurium* evidenciando o quanto à proteína se adequa ao molde usado, com um baixo r.m.s.d.



**Figura 28.** Alinhamento estrutural baseado na sobreposição do modelo da proteína SsuD de *Xac* e a 3ERP (óxido-redutase de *S. typhimurium*). É possível observar que as regiões de estrutura secundária são conservadas (cilindro: hélices-alfa; seta: folhas-beta). Ainda são mostrados os resíduos do sítio ativo que podem ligar à NAD(P)H (em amarelo), segundo as análises das interações feita na proteína YvgN de *B. subtilis* (PDB 3D3F), também conservados em SsuD e 3ERP.

### 5.5. A proteína SsuD de *Xac*: uma óxido-redutase que liga a NAD(P)H

Os resultados do alinhamento de seqüências e busca por ortólogos e proteínas com estruturas similares confirmou que a SsuD apresenta maior identidade estrutural com óxido-redutases. Após uma busca no banco de dados de proteínas foi possível identificar duas estruturas de óxido-redutases, da YvgN (código PDB 3E3F) e aldo-cetoreductase (código PDB 1PZ1) de *Bacillus subtilis*, ligadas a NAD(P)H e NADP, respectivamente. Estas proteínas foram usadas para comparações com a SsuD de *Xac* e a óxido-redutase de *S. typhimurium* (código PDB 3ERP). A primeira análise foi indentificar os resíduos envolvidos na interação com os ligantes nas proteínas YvgN e aldo-cetoreductase, seguida da sobreposição estrutural das quatro proteínas. O r.m.s.d. da SsuD de *Xac* após a superposição das estruturas e alinhamento estrutural, revela similaridade entre elas (variação de 0.3 Å a 2.1 Å, Figura 29A e B), e conservação de resíduos de interação com

o substrato (Figura 29C, em verde). Quatro dos treze resíduos de interação com o ligante são 100% conservados nas quatro proteínas, como também, é notável a conservação do bolsão, uma vez que na maioria, os resíduos comparáveis, são similares em características físico-químicas. Os dados sugerem que o modelo da SsuD se ajusta às estruturas de óxido-redutases, conforme sua função predita.

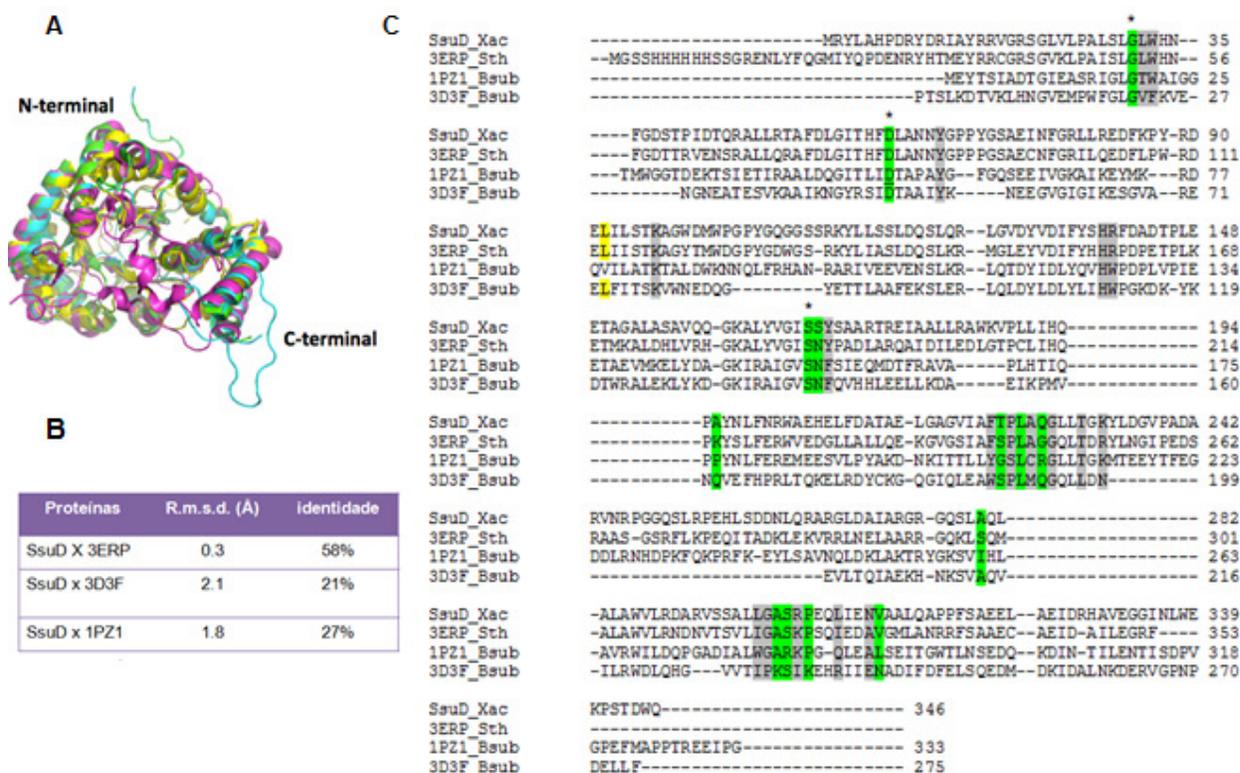
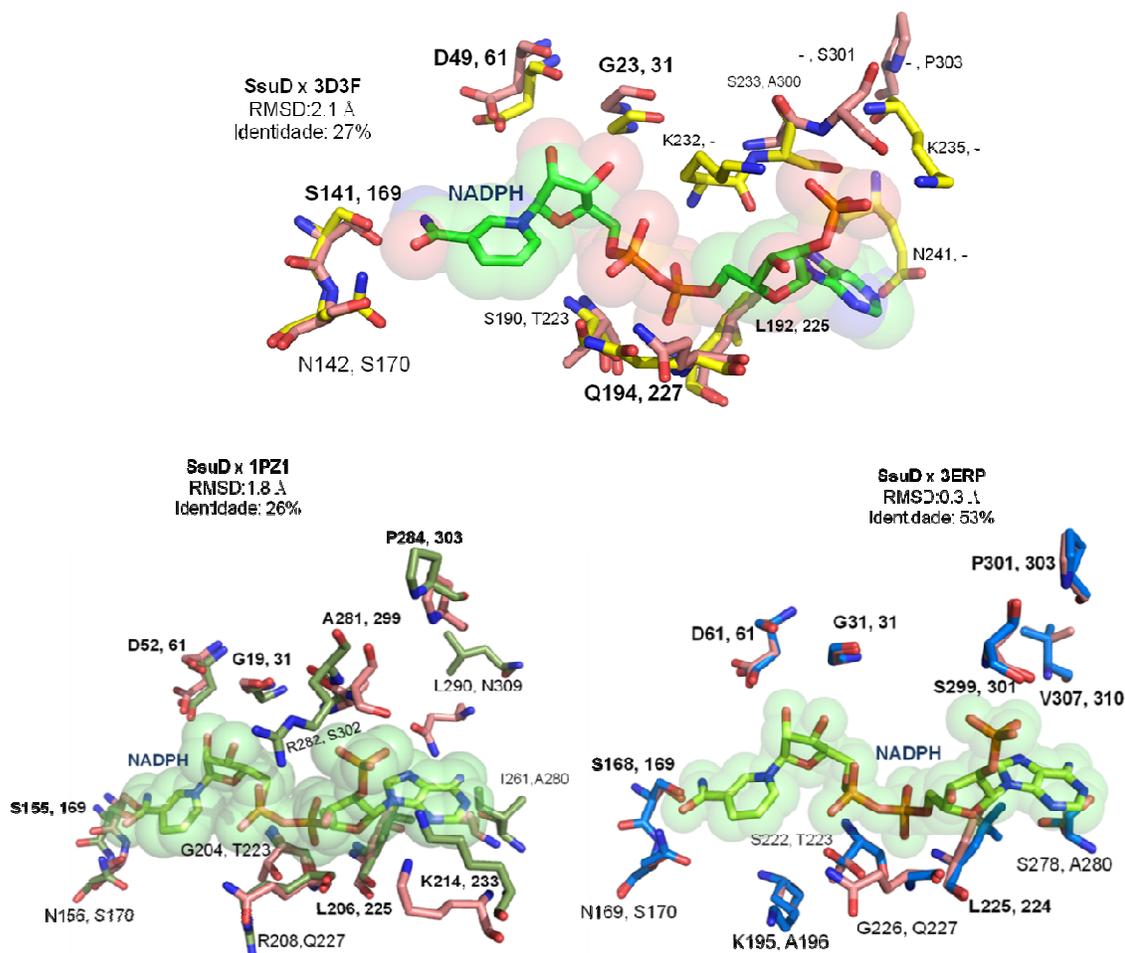


Figura 29. Comparação da SsuD de Xac com outras óxido-redutases. (A) Sobreposição das estruturas tri-dimensionais das proteínas YvGN e aldocetoreductase de *B. subtilis* (em amarelo e rosa, respectivamente), óxido-redutase de *S. typhymurium* (em verde) e SsuD de Xac (em azul). (B) Resultados da sobreposição e alinhamento de seqüências da SsuD com as óxido-redutases de *Salmonella typhimurium* (3ERP), YvGN (1PZ1) e aldo-cetoreductase (3E3F) de *Bacillus subtilis*. (C) Alinhamento sequencial das proteínas evidenciando a conservação dos resíduos envolvidos na interação direta com o NAD(P) e NAD(P)H (verde) e de constituição do bolsão para formação do sítio ativo das enzimas (em cinza). Em amarelo, são mostrados resíduos envolvidos em oligomerização em monooxigenases.

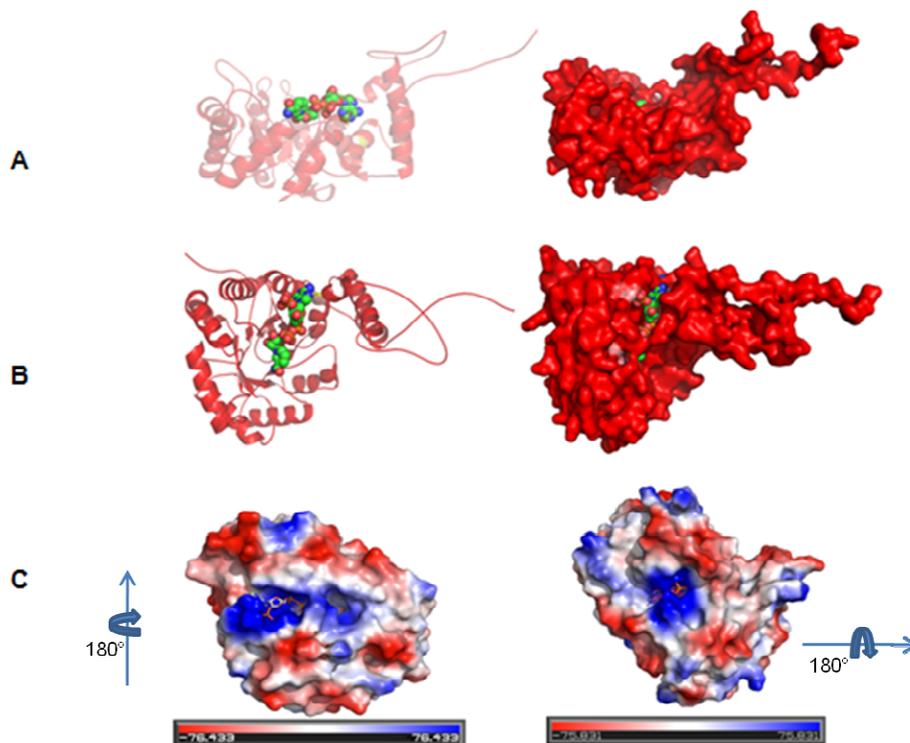


**Figura 30.** Detalhe da sobreposição da possível região de interação das óxido-redutases com o NAD(P)H (baseado na estrutura da YvgN de *B. subtilis*). A) SsuD de *Xac* e YvgN de *B. subtilis* (PDB: 3D3F, RMSD: 2.1 Å); B) SsuD de *Xac* e aldolase de *B. subtilis* (PDB: 1PZ1, RMSD: 1.8 Å) e C) SsuD de *Xac* e óxido-redutase de *S. typhimurium* (PDB: 3ERP, RMSD: 0.3 Å). Os resíduos são apresentados na forma de palitos sendo salmão para SsuD de *Xac*, amarelo para YvgN, oliva para a aldolase de *B. subtilis* e azul para a óxido-redutase de *S. typhimurium*. O NAD(P)H é mostrado em verde claro no centro do bolsão. Os resíduos são nomeados conforme a primeira letra da sigla, sendo primeiro os resíduos das estruturas e em segundo os resíduos da SsuD. Resíduos conservados são mostrados em negrito.

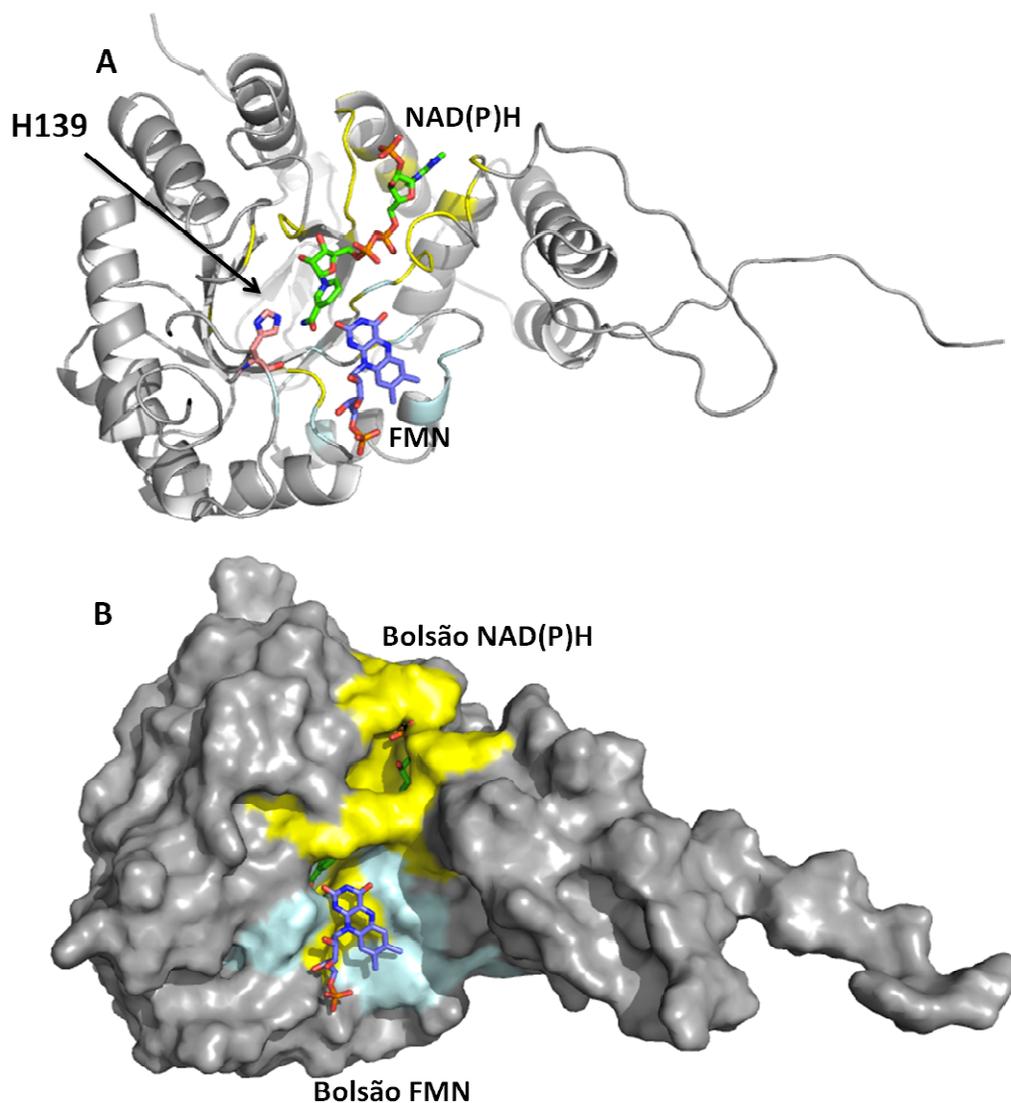
Seguindo o padrão evidenciado na comparação entre as quatro proteínas, a comparação somente entre a SsuD e a YvgN (óxido-redutase de *B. subtilis* -3D3F), revela conservação de 7 resíduos dos 13 envolvidos na ligação e muitos outros formadores do bolsão (Figura 29C). Para um melhor detalhamento da interação e desta comparação, cada uma das estruturas foi sobreposta individualmente com a SsuD de *Xac*

e os resíduos mapeados (Figura 30). Os resultados confirmam a conservação de resíduos da interação e do bolsão.

Para melhor detalhamento desta possível interação, análises de interação entre a proteína e os seus ligantes foram realizadas através de “docking”, com o auxílio do Dr. Paulo Oliveira, utilizando o programa YASARA. A sobreposição e ajuste do NAD(P)H ficou mais bem representada na comparação da SsuD com a YvgN, conforme evidenciado pela conservação de resíduos e posição dos mesmos em relação ao ligante (Figura 30), embora o r.m.s.d seja o mais divergente entre todas as proteínas comparadas. Observando as estruturas encontradas, o sítio ativo é localizado sempre na região C-terminal da cadeia polipeptídica, com carga positiva para o acomodamento do NAD(P)H (Figura 31C).



**Figura 31. Localização do NAD(P)H na proteína SsuD baseada na localização do NAD(P)H em óxido-redutases com similaridade estrutural à proteína SsuD. (A) Vista lateral da proteína SsuD com o NAD(P)H situado na superfície e entrada do barril TIM, em cartoon e superfície. (B) Visão superior, evidenciando a entrada do barril e o posicionamento do NAD(P)H na superfície lateral. (C) Comparação entre o potencial eletrostático das proteínas YvgN (esquerda) e a SsuD (direita) evidenciando o sítio de interação do ligante positivamente carregado.**



**Figura 32** Análise de docking molecular evidenciando as regiões de interação entre a FMN e o NAD(P)H no modelo da proteína SsuD de *Xac*. A) Representação em cartoon da localização da proteína SsuD de *Xac*. Os ligantes NAD(P)H (stick verde) e a FMN (stick azul) estão co-localizados e próximo a eles em stick rosa está a Histidina 139, possível resíduo responsável pelo ataque ao NAD(P)H para transferência dos elétrons à FMN. B) Representação em superfície da proteína SsuD de *Xac*. Em amarelo, o sítio hidrofóbico do NAD(P)H e em azul claro a FMN exposta. Ambos os substratos estão muito próximos o que facilitaria o ataque da His139 ao NAD(P)H para a redução da FMN.

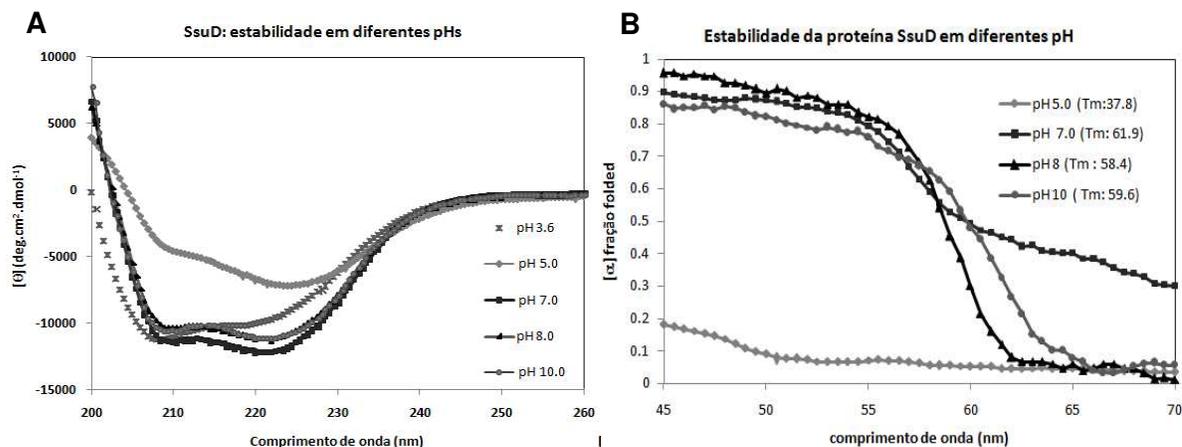
A área calculada para o bolsão da YvgN foi de 1356 Å<sup>2</sup>, e deixa o NAD(P)H praticamente escondido, de forma que a interação e transferência dos prótons para a FMN seja facilitada. Segundo o sistema dois componentes descrito primeiramente por Eichhorn e colaboradores (1999), o componente óxido-redutase deve possuir dois sítios

de ligação para que a reação de óxido-redução ocorra: um deles para NAD(P)H, possivelmente identificado nessas análises, e outro para FMN.

Após o “docking” do NAD(P)H, o programa evidenciou duas cavidades: uma que como já descrita se ajusta muito bem ao NAD(P)H (Figura 32, superfície em amarelo), e outra próxima, com superfície de aproximadamente  $800\text{\AA}^2$  e polaridade para acomodar a FMN de modo que ela possa ser devidamente reduzida (Figura 32). Foi realizado então, um segundo “docking”, agora com a FMN nesta região, seguido da minimização de energia do modelo para melhor ajuste das moléculas. O posicionamento de ambos os substratos foi evidenciado e a presença da Histidina 139 (Figura 32A, em palito salmão) poderia favorecer a transferência do próton e dos elétrons para a oxidação do NAD(P)H e redução da FMN. Ainda, o modelo revela a presença de uma Treonina conservada (Thr223) que parece estabilizar tanto o NAD(P)H quanto a FMN. Os possíveis resíduos de interação com a FMN foram identificados Arg140, Thr223, Asn201 e Trp203 (Figura 32, em superfície azul claro). Diferentemente do que é observado na cavidade do NAD(P)H, a FMN está praticamente exposta (Figura 32B).

## **5.6. A ligação de alta afinidade entre SsuD de *Xac* e NAD(P)H promove a estabilização da estrutura secundária da proteína**

Ensaio espectroscópicos da proteína SsuD foram realizados para a caracterização biofísica da sua possível atividade em diferentes condições. Os primeiros ensaios monitoraram o conteúdo de estrutura secundária e enovelamento protéico da SsuD em diferentes pH. Em pH ácido a SsuD apresenta-se altamente instável e sofre precipitação (pH 3.0 e pH 5.0), conforme demonstrado pela perda de estrutura secundária e padrão do espectro. Em pH 5.0 ocorre início da perda de conteúdo de hélices-alfa. Por outro lado, em pH neutro e básico (pH 7.0, pH 8.0 e pH 10.0) a proteína apresenta maior estabilidade e ganho de estrutura secundária (Figura 33A) com sobreposição dos espectros em FAR-UV e estimativa de conteúdo de estrutura secundária muito próximas (Tabela 10). Quando a estabilidade térmica é medida, os dados são confirmados, e os melhores resultados também são encontrados em pH 7.0 (Figura 33B).



**Figura 33. Espectropolarimetria em Far-UV e fração enovelada da proteína SsuD em pH 3.6, 5.0, 7.0, 8.0 e 10.**

Comparativamente, foi possível verificar que a SsuD de *Xac* apresenta conteúdo de estrutura secundária similar ao encontrado em óxido-redutases e mono-oxigenases com estrutura resolvida (ZHOU *et al*, 2008; EHRENSBERGER e WILSON, 2003; SINGER *et al.*, 2008) (Tabela 11), provavelmente devido à conservação do enovelamento tipo barril Tim. Estes resultados ainda sugerem um correto enovelamento da SsuD.

**Tabela 10. Estimativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína SsuD em diferentes pHs pelo algoritmo K2D\*.**

	Alfa-hélice	Folha-beta	Alças
SsuD pH 3.6	25%	15%	60%
SsuD pH 5.0	21%	30%	49%
SsuD pH 7.0	43%	16%	40%
SsuD pH 8.0	40%	8%	52%
SsuD pH 10.0	40%	10%	50%

\*<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>

**Tabela 11. Comparativo do conteúdo de estrutura secundária da proteína SsuD com outras enzimas depositadas no PDB com a topologia barril-Tim.**

Proteínas	PDB	% Hélices	% Folhas-beta	
			Folhas-beta	% Alças
SsuD – <i>Xac</i>	-	40%	8%	52%
óxido-redutase <i>S. typhimurium</i>	3ERP	40%	13%	47%
mono-oxigenase SsuD - <i>E. coli</i>	1M41	31%	17%	48%
óxido-redutase Fre - <i>E. coli</i>	1QFJ	28%	30%	42%
aldo-cetoreductase - <i>B. subtilis</i>	1PZ1	42%	14%	44%
óxido-redutase Yvgn – <i>Bacillus subtilis</i>	3D3F	43%	16%	41%
mono-oxigenase LadA- <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	3B9O	43%	17%	50%

Análises de dicroísmo circular também foram realizadas com SsuD na presença de NAD(P)H e FMN, uma vez que estes são os substratos caracterizados de óxido-redutases. Os espectros de dicroísmo circular apontam que a proteína SsuD apresentou um ganho acentuado de estrutura secundária na presença do NAD(P)H, em 222 nm, característico de ganho de hélices-alfa. Alterações conformacionais tênues foram observadas na presença de FMN e uma redução proeminente de estrutura secundária na presença de ambos (FMN+NADPH) (Figura 34A), sugerindo que a presença da FMN poderia alterar a forma de interação da SsuD com o NAD(P)H.

Esses resultados foram corroborados com os experimentos de estabilidade térmica onde a proteína SsuD apresentou um aumento na  $T_m$  de aproximadamente 6°C quando na presença de NAD(P)H. Por outro lado, as diferenças encontradas nos valores de  $T_m$  da proteína SsuD na presença de FMN e de FMN+NAD(P)H não são significativas (Figura 34B), novamente sugerindo que a presença da FMN poderia alterar a forma de interação da proteína com o NAD(P)H.

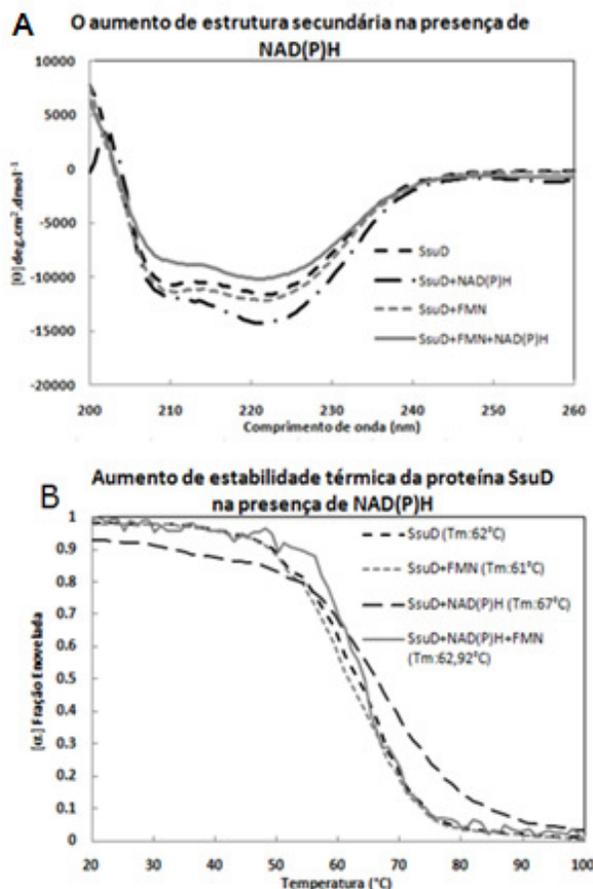


Figura 34. Espectropolarimetria da proteína SsuD na presença de FMN e NAD(P)H. (A) Espectro de dicroísmo circular FAR-UV utilizando 0.2 mg/mL da proteína SsuD na presença e ausência de 20 $\mu$ M FMN e 20  $\mu$ M NAD(P)H. (B). Estabilidade térmica da proteína SsuD medida na ausência e presença dos seus possíveis ligantes. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições experimentais descritas.

A tabela 12 expõe a quantificação dos dados de espectropolarimetria da proteína SsuD através do algoritmo K2D do servidor Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) confirmando que a proteína apresentou um ganho de 5% em hélices, 13% em folhas-beta e redução de 11% das regiões desordenadas na presença de NAD(P)H.

**Tabela 12 Estimativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína SsuD para caracterização da atividade óxido-redutase e alterações estruturais pertinentes na presença de FMN e NAD(P)**

Estimativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína SsuD na presença de NAD(P)H e FMN - K2D*			
	Alfa-hélice	Folha beta	Regiões desordenadas
SsuD	40%	10%	50%
SsuD+FMN	42%	9%	49%
SsuD+NAD(P)H	45%	23%	31%
SsuD+FMN+NAD(P)H	38%	6%	56%

\*<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>

Assim, fica evidente que na presença do NAD(P)H, a SsuD sofre uma grande reorganização estrutural como mostrado pelo ganho de estrutura secundária em forma de folha beta (10% para 23%), e diminuição das regiões desordenadas (50% para 31%), não evidente na presença de FMN (Tabela 12). Conforme o modelo e o “docking” apresentados anteriormente (Figura 32), seria possível que as regiões desordenadas próximas ao sítio de interação do NAD(P)H que incluem alguns dos resíduos importantes (Figura 32, círculo e em amarelo) fossem as que sofressem maior alteração conformacional. Como a FMN fica praticamente exposta no seu sítio, conforme mostrado no modelo, poucas seriam as alterações, e os resultados confirmam isso, uma vez que o conteúdo de estrutura secundária permanece similar ao da proteína sozinha. Por outro lado, na presença dos dois substratos, as alterações são menos significativas, sugerindo que a presença da FMN altera o potencial de interações da região.

A habilidade de a SsuD interagir com os substratos foi caracterizada através de ensaios de titulação calorimétrica isotérmica (ITC), cinética enzimática e ensaios espectroscópicos. Para medir a atividade de óxido-redutase da SsuD, ensaios enzimáticos foram realizados baseados nos artigos de Gao e colaboradores (2007) e Eichhorn *et al* (1999). Primeiramente, conforme mostra a Figura 35, foram medidos espectros das amostras de proteína, FMN e NAD(P)H evidenciando que a proteína não estava previamente ligada a nenhum dos substratos alvo. Este dado é importante porque já evidencia a diferença deste sistema com os descritos para flavoproteínas. No sistema

dois-componentes, a óxido-redutase usa a FMN como um substrato e não um cofator (KERTESZ *et al*, 1999). O gráfico mostra o espectro da SsuD de Xac, sem picos de absorção para a FMN na sua forma oxidada (450 nm) e para NAD(P)H (340 nm), usados como controles.

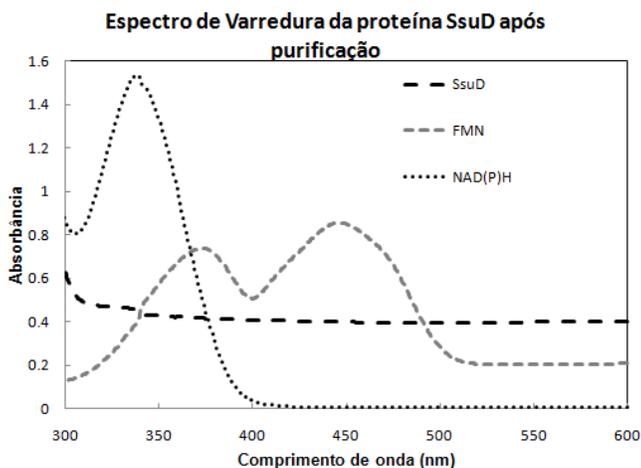
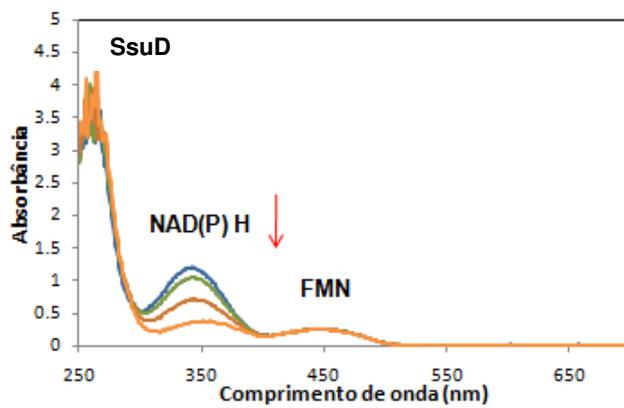


Figura 35 Espectro de varredura da proteína SsuD (18  $\mu$ M e os substratos FMN (50  $\mu$ M) e NAD(P)H (200  $\mu$ M) em tampão Tris 20 mM pH 8.0 no espectrofotômetro Jasco 510.

### 5.7. A cinética enzimática da SsuD revela a atividade independente da presença de FMN e com elevada eficiência

A análise cinética da reação de oxidação do NAD(P)H e redução da FMN realizada pela SsuD foi monitorada em espectrofotômetro UV visible (Cary 50 BioVarian). Os resultados mostram que na presença da SsuD ocorre a oxidação do NAD(P)H, conforme observado pelo decaimento da absorbância em 340 nm, mas não foi possível acompanhar o decaimento da FMN indicando sua redução ( FMN  $\rightarrow$  FMNH<sub>2</sub>) (Figura 36). Gao e colaboradores (2005) mostraram que para que a reação de óxido-redução ocorra por completo até a oxidação do alcão sulfonato à sulfito, é necessária a interação entre a óxido-redutase e a mono-oxigenase, de forma que a flavina na sua forma reduzida, altamente instável, seja protegida para que possa transferir corretamente seus prótons ao alcão sulfonato culminando na sua oxidação.

Por outro lado, a instabilidade da FMN na sua forma reduzida é bem conhecida e segundo Ghislas *et al* (1974), somente em experimentos à baixíssimas temperaturas (-200 °C), seria possível evidenciar este estado. É possível portanto, que a reação de óxido-redução ocorra mas não seja possível manter a FMN no seu estado reduzido. De fato, ainda devemos mencionar que os experimentos de Gao e colaboradores (2005) e Eichhorn e colaboradores (1999) além de serem realizados com as duas enzimas (sistema acoplado), foram realizados em condições de baixa oxigenação ou anaerobiose.



**Figura 36** Decaimento de NAD(P)H (200  $\mu$ M) na presença de SsuD (11  $\mu$ M) e FMN (20  $\mu$ M) e sem FMN. Experimento realizado no espectro UV visible-Cary 50 Bio-Varian.

Como não foi evidenciada a redução da FMN e as condições de anaerobiose não puderam ser estritamente controladas nos nossos experimentos, repetimos o ensaio sem a FMN para garantirmos que a oxidação evidenciada era, de fato, decorrente da atividade enzimática e não oxidação pela presença de condições oxidantes no tampão. Também foram analisados os parâmetros cinéticos através do decaimento de NAD(P)H em 340 nm e a aplicação da equação de Michaelis e Menten (Tabela 13). Os resultados confirmam que mesmo na ausência da FMN, ocorre o decaimento do NAD(P)H no seu estado reduzido (resultados não exibidos), o que poderia ser devido à oxigenação promovida pela presença de oxigênio nas amostras, mas também, que a proteína exerce sua atividade independente da presença da FMN. Os dados mostram que a afinidade da SsuD ao NAD(P)H é diminuída na presença da FMN, mas a enzima apresenta  $K_{cat}$  ou número de renovação maior quando em presença desta, sugerindo que a interação com as duas moléculas leva à conversão de substrato em produto de forma mais eficiente (Tabela 13). A menor afinidade também poderia ser atribuída ao fato de ambas as

moléculas apresentarem sítios de interação próximos, inclusive compartilhando resíduos envolvidos na interação. Os dados de CD mostram, que de fato, a SsuD sofre alteração conformacional e ganho de estabilidade condizente com sua interação com o NAD(P)H, independente da presença da FMN.

**Tabela 13. Parâmetros cinéticos da proteína SsuD para função de óxido-redutase. Os valores foram utilizados com base no trabalho de Eichhorn *et al.* (1999).**

Reação	$K_m$ $\mu\text{M}^{-1}$	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{S}^{-1}$ )	$V_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$K_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
SsuD+NAD(P)H+FMN	<b>0.1877</b>	<b>7.192</b>	<b>0, 7911</b>	<b><math>3.8 \times 10^{-7}</math></b>
SsuD+NAD(P)H	<b>0.15</b>	<b>5.33</b>	<b>0.58</b>	<b><math>3.5 \times 10^{-7}</math></b>
Óxido-redutase de <i>E.coli</i>	<b>0.054</b>	<b>4.33</b>	<b>0.54</b>	<b><math>7.9 \times 10^{-6}</math></b>

Quando comparado os valores obtidos para a óxido-redutase de *E. coli*, descritos por Eichhorn e colaboradores (1999), com os valores aparentes obtidos para a proteína SsuD de *Xac* na presença de FMN e NAD(P)H, observa-se que a SsuD possui uma afinidade menor ao NAD(P)H. Entretanto, a velocidade com que a SsuD realiza a catálise, isto é a eficiência catalítica ( $K_{\text{cat}}/K_m$ ) é uma ordem de grandeza maior do que para a proteína de *E. coli*. A eficiência catalítica ( $K_{\text{cat}}/K_m$ ) revela um sistema próximo da perfeição catalítica ( $3,8 \times 10^{-7}$ ) inclusive com uma ordem de grandeza maior do que o descrito no sistema de *E. coli* (EICHHORN *et al.*, 1999). Portanto, embora a enzima SsuD de *Xac* tenha uma afinidade menor pelo NAD(P)H do que a enzima de *E. coli*, a eficiência catalítica é maior, em virtude da própria afinidade reduzida.

### 5.8. Ensaio de interação da SsuD com FMN e NAD(P)H medidos através de ensaios de titulação calorimétrica

Para verificarmos se a SsuD era capaz de interagir com os substratos analisados nos ensaios de cinética enzimática, foram realizados experimentos de titulação calorimétrica (ITC). Os substratos usados foram NAD(P)H, FMN e NAD(P)H+FMN (proteína incubada previamente com 200 mM de NAD(P)H seguida da titulação de FMN) em uma concentração final de cada titulação de 2.15  $\mu$ M (volume de 10  $\mu$ L) na presença de 40  $\mu$ M de proteína SsuD, em três experimentos distintos. Os resultados na presença de NAD(P)H, provam a interação da SsuD com NAD(P)H numa reação exotérmica com um  $K_a$  de  $0,215 \times 10^{-6}$  (Figura 37A).

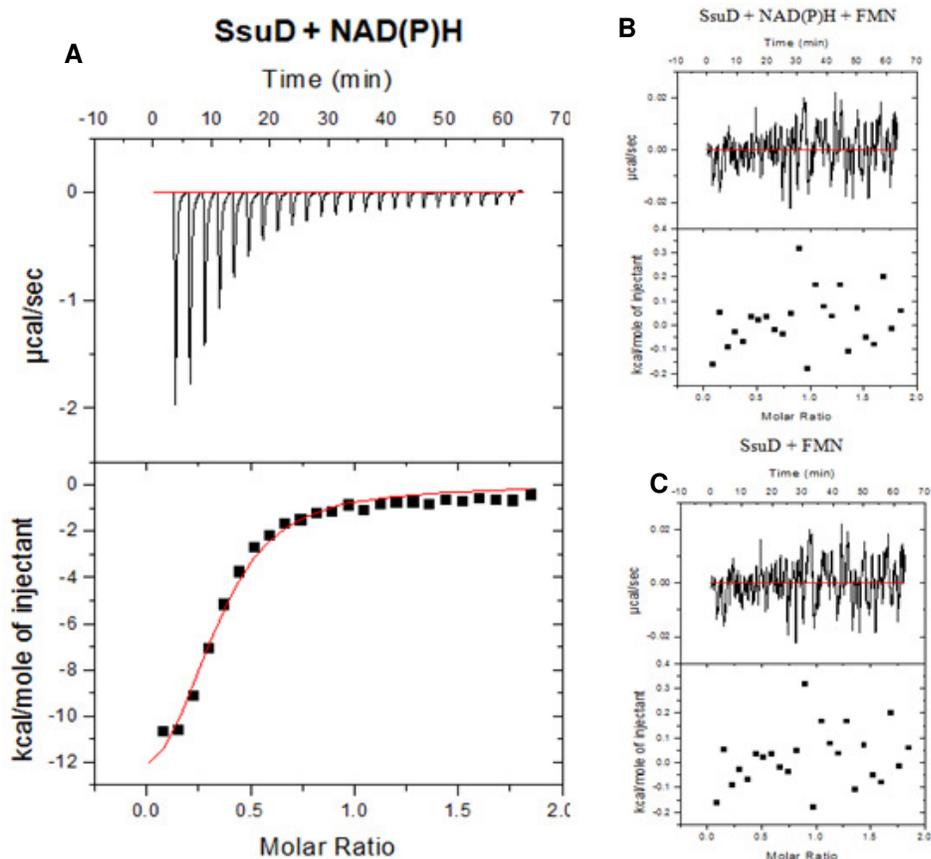


Figura 37 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) de SsuD com diferentes substratos. A) de 500  $\mu$ M de NAD(P)H em 40  $\mu$ M SsuD; B) FMN e NAD(P)H e C) FMN.

Esses valores apontam uma afinidade muito elevada para NAD(P)H quando comparado com a óxido-redutase de *Eco*: 0.29/0.3 mM (GAO *et al*, 2007).

Por outro lado, confirmando os resultados apresentados anteriormente, não houve troca de calor entre a SsuD e FMN e SsuD e NAD(P)H+FMN (Figura 37B). A estequiometria da reação foi calculada em 3:1 [NAD(P)H:SsuD], o que corrobora a hipótese lançada pelos experimentos de DLS (dados não exibidos) onde a massa molecular estimada era referente a um oligômero, possivelmente um trímero ou tetrâmero. O raio hidrodinâmico calculado também foi grande para uma proteína monomérica globular e com massa molecular de 39 kDa.

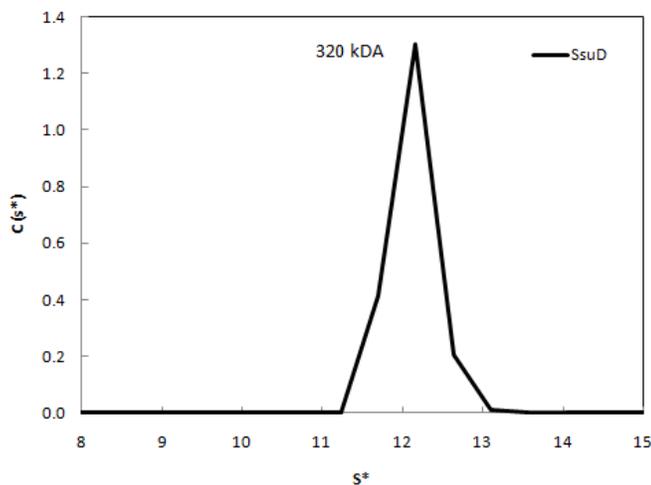
Todos juntos, os resultados mostram que a SsuD de *Xac* é uma óxido-redutase que sofre alterações conformacionais quando interage com o NAD(P)H e é capaz de causar sua oxidação. Contudo, esta oxidação deveria ser seguida da redução da FMN, o que não foi demonstrado. Segundo EICHHORN e colaboradores (1999) no sistema de dois-componentes, a reação de óxidoredução somente ocorre na presença das duas enzimas óxido-redutase e mono-oxigenase, e é observada uma alteração conformacional nas enzimas após a interação, fundamental para a transferência dos elétrons. Há ainda a especulação de que ocorre a formação de um canal para proteção da FMN no seu estado reduzido, formado pela interação entre as duas proteínas. Neste caso, é compreensível que não tenhamos observado a redução desta. Adicionalmente, os dados de modelagem molecular e “docking” mostram que a FMN fica mais exposta.

Os resultados apresentados até o momento foram a base para a realização dos experimentos de análise dos estados oligoméricos da SsuD em solução.

## **5.9. A SsuD em solução apresenta-se sob a forma de um octâmero**

Evidências experimentais preliminares oriundas do DLS, bioinformática e ITC da SsuD, assim como variações na temperatura média de desenovelamento mostraram que a proteína, embora monodispersa, indicaria um possível estado oligomérico. Para investigar tal hipótese utilizamos duas metodologias com o intuito de corroborar os resultados: a ultracentrifugação analítica (AUC) e o espalhamento de Raio-x a baixo ângulo (SAXS).

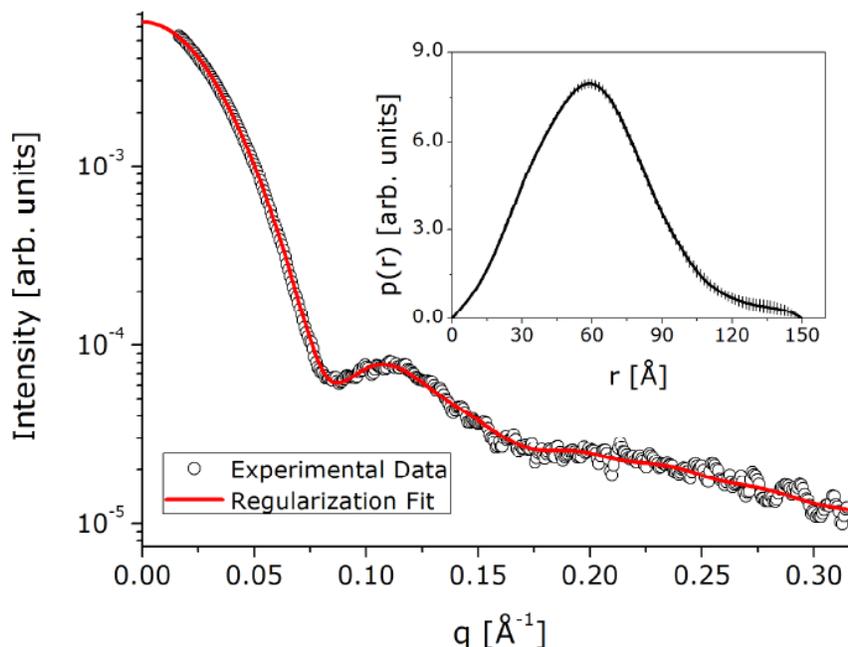
Os experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados através do método de velocidade de sedimentação (30.000 r.p.m.) com 1.66 mg/mL da proteína SsuD. Os resultados revelaram o coeficiente de distribuição de sedimentação ( $s^*$ ) compatível com a massa de um octâmero, com 320 kDa (a massa molecular da SsuD monômero é de 39 kDa), segundo a equação de Svedberg (Figura 38) e uma única espécie molecular em solução, conforme esperado, uma vez que a amostra submetida à análise era proveniente de gel-filtração. De acordo com estes resultados, a organização da proteína SsuD de *Xac* em solução é similar com o que foi previamente descrito para a estrutura cristalográfica da óxido-redutase de *S. typhimurium* (SINGER *et al.*, 2008) e para outras proteínas cujo o motivo barril-Tim é encontrado e que se organizam da mesma forma: mono-oxigenase de *E. coli* (EICHHORN *et al.*, 2002) e da LadA de *Geobacillus thermodenitrificans* (LI *et al.*, 2008).



**Figura 38. Distribuição do coeficiente de sedimentação obtido para proteína SsuD de *Xac*. Os experimentos foram realizados com Tris 20 mM pH 8.0 com 1,66 mg/mL a 20°C. A curva mostra a massa molecular correspondente a um octâmero.**

A concepção do envelope molecular correspondente ao octâmero descrito para a proteína SsuD através da ultracentrifugação analítica ocorreu através de experimentos de SAXS, que foram realizados na linha D02A-SAXS2, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – CNPEM, em Campinas-SP- Brasil. Medidas foram coletadas com 1.15 mg/mL e com 0.85 mg/mL. A curva de intensidade de espalhamento mostrada na Figura 39, é correspondente à função  $p(r)$ , cujo raio de giro obtido foi de 46.9 Å e a dimensão máxima de aproximadamente 150Å. O espalhamento experimental da Lisozima foi utilizado como referência para calcular a massa da SsuD. Os resultados apontam para um

oligômero de 8 moléculas com massa molecular de 310 kDa, isto é, oito vezes maior do que a massa do monômero (39 kDa), previamente calculada através do programa ProtParam. Estes dados corroboram os experimentos de ultracentrifugação analítica.



**Figura 39.** Dados de SAXS da proteína SsuD de *Xac*, mostra a curva de espalhamento (o) e o ajuste da curva em vermelho para o cálculo da função  $p(r)$ .

O modelo de baixa resolução foi obtido através de um método *ab initio* para a reconstrução do envelope molecular utilizando átomos fictícios. Análises do envelope molecular obtido da SsuD através de SAXS, revelaram que a proteína em solução organiza-se em dois blocos tetraméricos, o que tem sido mostrado ser um padrão comum encontrado, por exemplo, na estrutura cristalográfica da óxido-redutase de *S. typhimurium* (figura 40).

Na tentativa de compreender a formação do oligomêro e a região de interface de interação entre as subunidades, utilizamos as coordenadas estruturais da óxido-redutase de *S. typhimurium* para análises de regiões de interação no programa PISA ([http://Pbp.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://Pbp.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)). Este programa faz a predição de regiões de interação entre proteínas e calcula a probabilidade de formação de estruturas quaternárias. Os resultados do PISA são apresentados na Tabela 14 na qual todos os resíduos envolvidos nas interações são descritos. As interações entre as subunidades são

mantidas por ligações de hidrogênio e pontes salinas entre as subunidades A e B , C e D, A e C e B e D. Não foram relatados contatos entre C e B e A e D.

**Tabela 14. Resíduos de interação entre as subunidades da óxido-redutase de *S. typhimurium* (3ERP) para formação do oligômero.**

Ligações de Hidrogênio			Ligações de Hidrogênio		
Estrutura B	Distância (Å)	Estrutura D	Estrutura A	Distância (Å)	Estrutura B
TRP 103[NE1]	3.34	ASP 90[O]	THR 58[OG1]	2.93	TYR 107[OH]
TYR 107[OH]	2.94	THR 58[OG1]	ARG 17[NH2]	3.14	GLU 143[OE1]
TYR 107[OH]	2.80	LYS 24[O]	ARG 17[NH1]	3.12	THR 144[OG1]
ARG 113[N]	3.36	TYR 164[OH]	GLY 22[N]	2.78	GLU 148[OE1]
ARG 113[NE]	2.99	LEU 163[O]	TYR 164[OH]	2.74	GLU 148[OE2]
LYS 114[N]	3.15	TYR 164[OH]	ASP 90[O]	3.15	TRP 103[NE1]
LYS 114[NZ]	2.73	ASP 133[OD1]	LYS 24[O]	2.75	TYR 107[OH]
LYS 114[NZ]	2.84	LEU 92[O]	TYR 164[OH]	3.34	ARG 113[N]
GLN 122[NE2]	2.85	ASP 90[OD2]	LEU 163[O]	2.92	ARG 113[NE]
LYS 151[NZ]	3.30	GLY 186[O]	TYR 164[OH]	3.11	LYS 114[N]
THR 144[OG1]	3.04	ARG 17[NH1]	LEU 92[O]	2.82	LYS 114[NZ]
GLU 148[OE1]	2.79	GLY 22[N]	ASP 133[OD1]	2.69	LYS 114[NZ]
GLU 148[OE2]	2.76	TYR 164[OH]	ASP 90[OD2]	2.80	GLN 122[NE2]

Pontes Salinas			Pontes Salinas		
Estrutura A	Distância (Å)	Estrutura B	Estrutura A	Distância (Å)	Estrutura B
LYS 114[NZ]	2.73	ASP 133[OD1]	ARG 17[NH2]	3.14	GLU 143[OE1]
LYS 114[NZ]	3.84	ASP 133[OD2]	ASP 133[OD2]	3.84	LYS 114[NZ]
			ASP 133[OD1]	2.69	LYS 114[NZ]

Uma vez obtida esta Tabela com os dados da óxido-redutase da *S. typhimurium*, os resíduos foram identificados na sequência da proteína, previamente alinhada com a SsuD de *Xac*, e mapeados na estrutura (Figura 40). Duas regiões foram identificadas e denominadas respectivamente de Interface **H**, porque está em regiões de Hélices-alfa (região positiva), e interface **B** (região negativa), porque concentra a maioria dos resíduos no Barril TIM (Figura 40A). O alinhamento das proteínas e a comparação dos resíduos revela alta conservação nas duas interfaces e extensão do contato com área média de 859 Å<sup>2</sup> (Figura 40C) e de polaridade oposta entre as interfaces H e B.

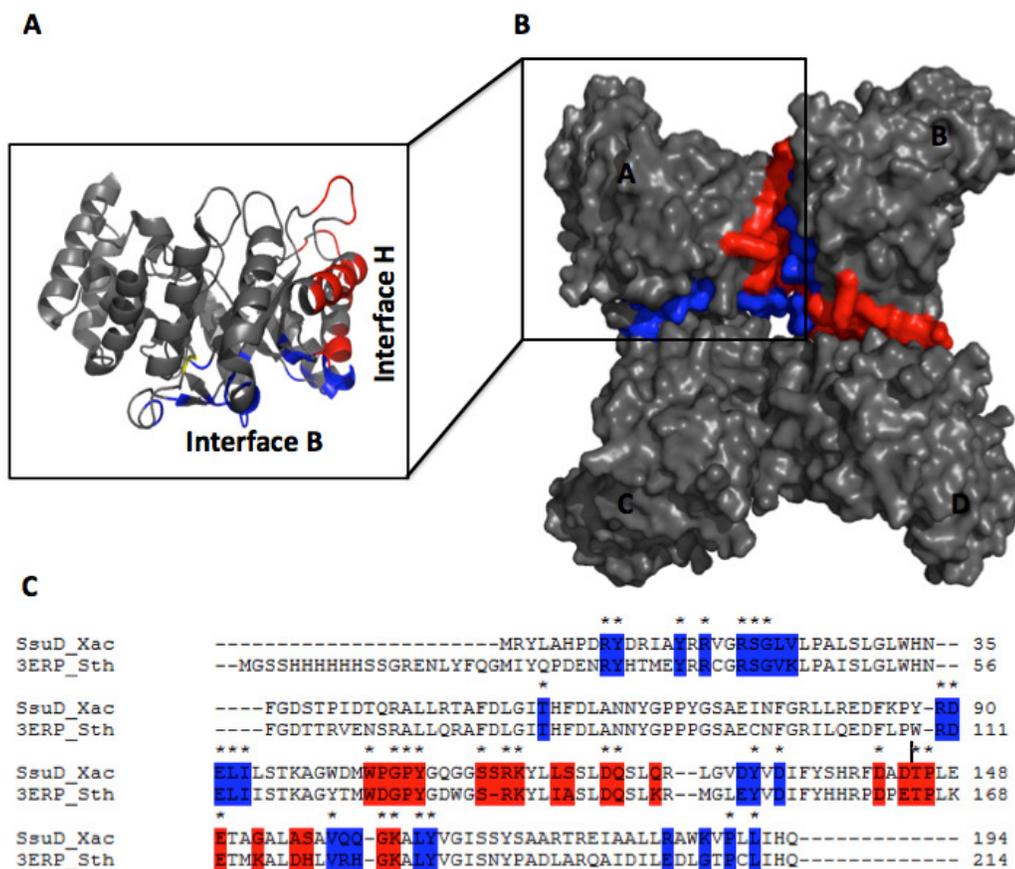


Figura 40 Caracterização da forma de oligomerização da óxido-redutase de *S. typhimurium* que pode ser extrapolada para a estrutura da SsuD. (A) Representação em cartoon de uma molécula do tetrâmero evidenciando a posição das duas interfaces, H (vermelho) e B (azul). (B) tetrâmero da óxido-redutase de *S. typhimurium* e interação entre as cadeias (tabela 13)(C) Alinhamento das sequências de aminoácidos da SsuA de *Xac* e óxido-redutase de *S. typhimurium* (3ERP) evidenciando a conservação dos resíduos envolvidos na formação do tetrâmetro. Em vermelho e azul são mostrados os resíduos da interface H e B, respectivamente.

Em virtude da similaridade estrutural e sequencial dos resíduos de interação entre as subunidades da proteína 3ERP e um estado oligomérico cristalográfico compatível com os achados em solução para a proteína SsuD de *Xac*, construiu-se um modelo da proteína SsuD baseado no octâmero da 3ERP.

A partir do modelo da proteína SsuD e com base nas coordenadas estruturais da óxido-redutase de *S. typhimurium*, foram realizadas sobreposições estruturais no Pymol para a construção do octâmero da SsuD. A estrutura obtida foi sobreposta no envelope molecular obtido por SAXS (Figura 41A). Os resultados mostram que a estrutura se ajusta perfeitamente ao envelope, confirmando seu estado oligomérico similar ao encontrado na estrutura da *S. typhimurium*. É importante ressaltar que a organização estrutural observada nestas óxido-redutases parece ser conservada mesmo em proteínas de espécies filogeneticamente distantes, provavelmente devido à conservação do motivo Barril-Tim, e manutenção de sua função. Ainda é mostrado um possível modelo do octâmero, baseado nos contatos cristalográficos da óxido-redutase de *S. typhimurium* (Figura 41B). Os dados ainda poderiam explicar os resultados do ITC que sugerem 3 moléculas de NAD(P)H para a SsuD, porém ressaltamos que somente há um sítio para o NAD(P)H em cada uma das subunidades. A figura 41C evidencia o arranjo do tetrâmero com os monômeros organizados simetricamente de forma que o sítio de interação, próximo ao C-terminal, fica sempre exposto num formado que denominamos de “catavento”. Além disso, a região de interação com o NAD(P)H e a FMN se encontram muito próximas à região H (Figura 41D e E), bem como a H139 (Figura 41E). A proximidade entre o sítio ativo e a região de interação para formação dos tetrâmeros, na verdade observados na maioria dos PDBs das proteínas que possuem esse motivo barril-Tim, pode sugerir que esta conformação seja importante para a atividade da enzima.

Outro ponto importante a ser levantado é a possível localização de interação da SsuD com a mono-oxigenase, já que Abdurachim e colaboradores (2006), ressaltam a importância da interação entre as duas enzimas, inclusive mostrando por experimentos de CD, que ocorre mudança conformacional nas proteínas após a interação. Apesar de especulação, como o sítio da FMN fica exposto entre os monômeros A e B, por exemplo, é possível que esta seja a localização. Novamente, isso é uma suposição que deve ser testada em experimentos de cross-linking após a expressão da SsuE de *Xac* na forma solúvel.

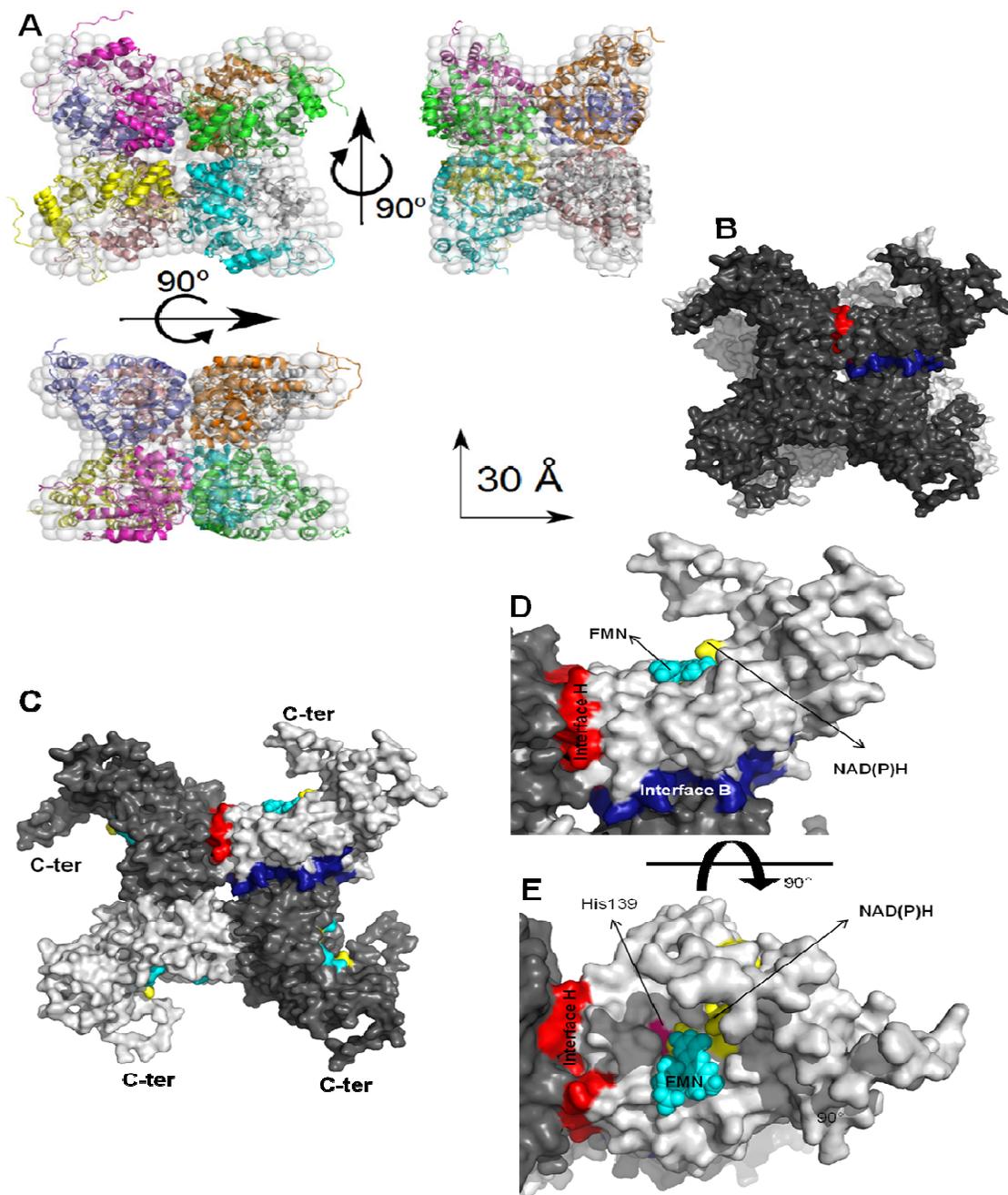
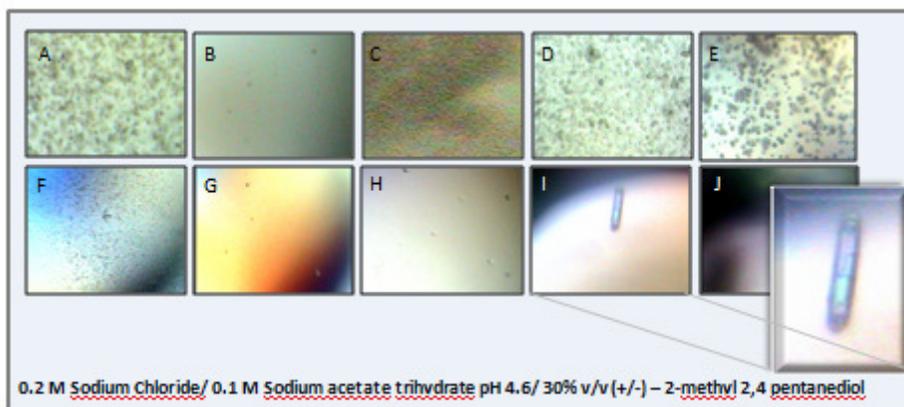


Figura 41 Representação da organização do oligômero da SsuD de *Xac* no formato de um *catavento*. A) Modelo de homologia obtido para a proteína SsuD (representação cartoon) superposto ao modelo de baixa resolução de SAXS (esferas semi-transparentes). Representação em diferentes ângulos dos tetrâmeros. B) Octômero de SsuD mostrando os dois blocos tetraméricos em superfície e cartoon; C) Localização dos sítios ativos no tetrâmero, em relação ao C-terminal e interfaces H e B; D) Detalhe de um monômero, em superfície e E) detalhamento da posição da FNM e NAD(P)H em relação à H139.

## 5.10. Cristalização da proteína SsuD

A proteína SsuD foi submetida às condições de cristalização do kit inicial da Hampton “crystal screen” 1 e 2, em duas concentrações diferentes: 12 e 19 mg/ml. A Figura 42 representa um panorama de diferentes gôtas obtido após as tentativas de cristalização. Várias condições propiciaram a formação de precipitados, micro cristais e separação de fases e estas foram submetidas aos ensaios de refinamento, variando-se a concentração de precipitante e o pH. Na maioria das condições de cristalização testadas, os melhores resultados foram obtidos na presença de HEPES pH 7.5, um alceno sulfonato, e condições de cristalização cujo pH era próximo de seu ponto isoelétrico. Condições promissoras com núcleos e micro cristais estão em fase de refinamento e cristais já formados serão submetidos a testes na linha de luz destinada à cristalografia de proteínas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Um cristal em forma de bastão, com dimensões de 20 x 200  $\mu\text{m}$  foi obtido com 0.2 M de cloreto de sódio, 0.1 M acetato de sódio tri-hidratado pH 4.6 e 30% de -2-metil 2,4 pentanodiol e está em fase de refinamento.

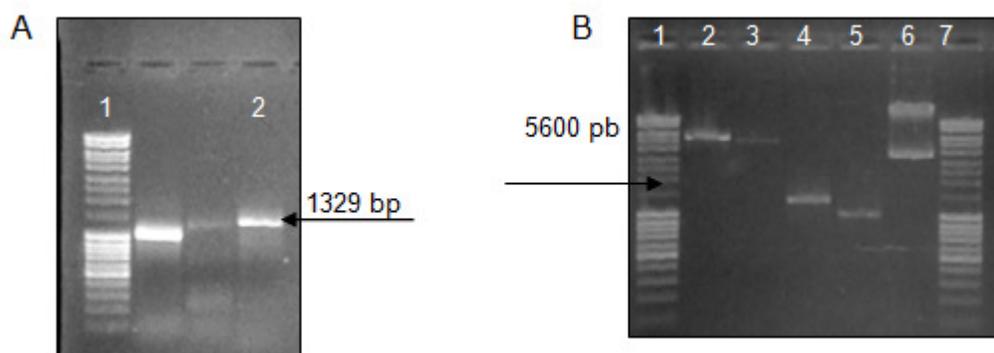


**Figura 42** Testes iniciais de cristalização da proteína SsuD. O cristal em evidência (I) cresceu em 12 mg/mL na condição com 0.2 M de Cloreto de sódio; 0.1 M de acetato de sódio tri-hidratado pH 4.6 e 30% (+/-)- 2-methyl 2,4 pentanediol.

## Parte II - A proteína SsuE de *Xac*

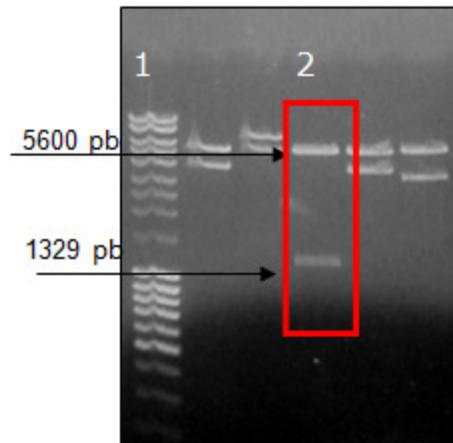
### 5.11. Clonagem do gene *ssuE* no vetor pET28a

A amplificação do gene *ssuE* (1329 pb) à partir do DNA genômico de *Xac* foi obtida com êxito, conforme evidenciado na Figura 43. Uma vez obtidos os fragmentos de DNA referentes ao gene de interesse, os mesmos foram submetidos à clivagem com enzimas de restrição para clonagem no vetor de expressão pET28a (Figura 43B).



**Figura 43** Eletroforese em gel de agarose evidenciando a amplificação do gene *ssuE* de *Xac*, fragmentos do DNA plasmidiano e clivagem do gene com enzimas de restrição apropriadas à clonagem. (A) Amplificação do gene *ssuE*. 1: marcador de massa molecular - #SM0403 – Fermentas®; 2: fragmento de PCR codificando o gene *ssuE* (1329 pb). (B) Digestão do vetor pET28a e do gene *ssuE* com enzimas de restrição. 1 e 7: Marcadores de massa molecular - #SM0403 – Fermentas®; 2: pET28a linearizado; 3: pET28a digerido com *NcoI/HindIII*; 4: fragmento do gene *ssuE* (1329 pb) digerido com *NcoI/HindIII*; 6: pET28a não digerido usado como controle da digestão.

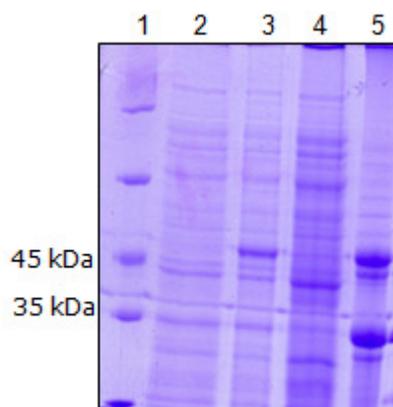
Os DNAs digeridos foram usados nas reações de ligação com o vetor pET28a, para a posterior transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Após 16 horas de incubação à 37°C, mais de trezentas colônias foram obtidas para cada transformante e grupos de dez foram analisados por restrição com enzimas, para checagem da presença do plasmídeo contendo o inserto de interesse. (Figura 44).



**Figura 44** Gel de agarose 0.8% para confirmar a presença dos inserto referente ao gene *ssuE* de *Xac*. 1: Marcador de peso molecular - #SM0403 – Fermentas®; 2: liberação do inserto referente ao gene *ssuE* após a clivagem do DNA plasmidial pET28a/*ssuE*.

### 5.12. Expressão da proteína SsuE em corpúsculos de inclusão

Para expressão da SsuE foram testadas as mesmas condições de temperatura (13°C, 20°C, 25°C, 30°C e 37°C), agitação e aeração da SsuD, porém, não foi possível obtê-la na sua forma solúvel. Os resultados da indução em células de *E. coli* BL21(DE3) são similares aos demais, apresentado na Figura 45. Neste caso, a estratégia adotada foi a extração e purificação da proteína em condições desnaturantes, com 8M de uréia. As tentativas de re-novelamento também não foram promissoras e não foi possível recuperar a SsuE (dados não mostrados).



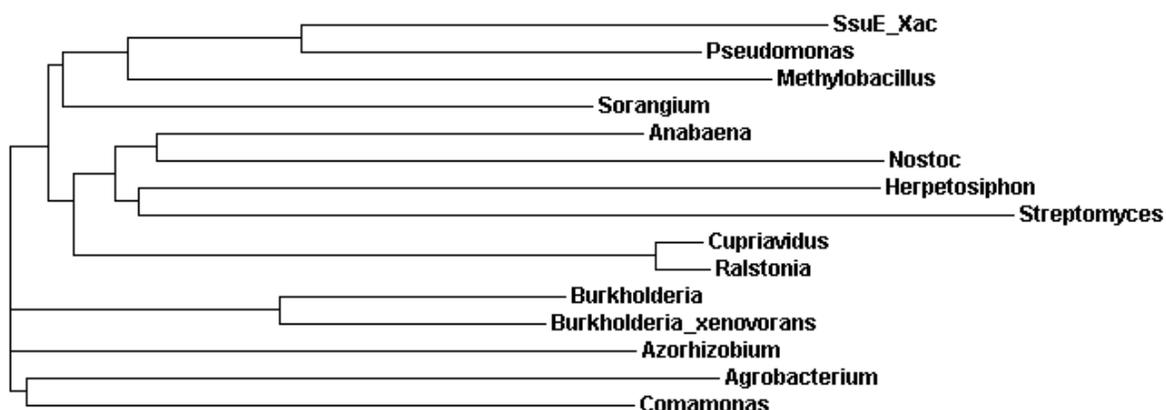
**Figura 45** Análise da expressão da proteína SsuE (48.0 kDa) em cepas de *E. coli* BL21(DE3) por SDS-PAGE 13%. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431); 2. Amostra de extrato celular de cultura não induzida (Tempo zero - T0); 3. Amostra de extrato celular de cultura induzida (Tempo dois - T2); 4. Extrato celular solúvel; 5. Extrato celular insolúvel (precipitado). A seta em preto indica a suposta localização da proteína alvo.

### 5.13. Análises de bioinformática e busca de ortólogos

A busca de ortólogos da SsuE de *Xac* utilizando o programa BLASTP mostra alta identidade de sequências com mono-oxigenases de organismos presentes essencialmente em habitats de solo e água (Tabela 15). A proteína é bem conservada e os resultados mostram valores de identidade variando de 52% (*Nostoc punctiforme*, cianobactéria) à 97%, sendo que os ortólogos de maior identidade são os encontrados em espécies do gênero *Xanthomonas*, seguido por ortólogos presentes em *Pseudomonas*, como observado para a SsuD e confirmado na análise filogenética (Figura 46). A árvore mostra ainda, que a SsuE é relacionada aos ortólogos encontrados em *Methylobacillus* e *Sorangium*. Curiosamente, as maiores divergências devem ser encontradas nos ortólogos de *Comamonas* e *Azorhizobium*, incluindo os fitopatógenos *Agrobacterium* e *Burkholderia*.

**Tabela 15 Ortólogos da proteína SsuE de *Xac*. Resultados obtidos através BlastP-NR**

Microorganismo	Função	Identidade sequencial	Habitat
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. vasculorum</i>	nitriacetate mono-oxigenase	420/442 (95%)	Solo
<i>Xanthomonas fuscans</i> <i>subs. Aurantifolii</i>	nitriacetate mono-oxigenase	429/442 (97%)	Solo
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. musacearum</i>	nitriacetate mono-oxigenase	391/411 (95%)	Solo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	mono-oxigenase	332/439 (75%)	solo e água
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	nitriacetate mono-oxigenase	329/437 (75%)	solo e água
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Mono-oxigenase	326/437 (74%)	solo e água
<i>Methylobacillus</i>	nitriacetate mono-oxigenase	276/440 (62%)	Água fitopatígeno (raiz de trigo)
<i>Burkholderia</i> <i>sp</i>	Mono oxigenase	275/441 (62%)	Solo
<i>Sorangium cellulosum</i>	Mono-oxigenase	281/440 (63%)	água e solo (cianobactéria)
<i>Anabaena variabilis</i>	Mono-oxigenase	266/445 (59%)	Biorremediação
<i>Burkholderia xenovorans</i>	Mono-oxigenase	273/440 (62%)	solo deficiente em nutrientes
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Mono-oxigenase	266/435 (61%)	Solo
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	Mono-oxigenase	280/437 (64%)	Solo
<i>Ralstonia eutropha</i>	nitriacetate Mono-oxigenase	277/436 (63%)	Solo
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Mono-oxigenase	264/441 (59%)	Fitopatígeno (indutor de crescimento)
<i>Comamonas testosteroni</i>	luciferase-like Mono-oxigenase	263/433 (60%)	Solo
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	Mono-oxigenase	248/443 (55%)	solo e água
<i>Nostoc punctiforme</i>	Mono-oxigenase	233/446 (52%)	água e solo (cianobactéria)
<i>Streptomyces</i> <i>sp</i>	Mono-oxigenase	240/445 (53%)	Solo



**Figura 46** Árvore filogenética da proteína SsuE de *Xac* construída com as seqüências de ortólogos identificados pelo BlastP. A árvore foi construída a partir do alinhamento utilizando o programa ClustalW2 no formato Phylip pelo método Neighbour Joining.

Visando identificar ortólogos ou proteínas com similaridade estrutural que pudessem ser usadas para a construção de modelos da SsuE, a seqüência de aminoácidos da proteína foi submetida ao BlastP contra o PDB (Tabela 16). Apesar de apresentar maior identidade de seqüências com mono-oxigenases, o melhor resultado foi encontrado para a óxido-redutase de *Bacillus subtilis* (código PDB: 1TVL, 39% de identidade seqüencial). Os segundo e terceiro melhores resultados, mostraram contudo, similaridade com as mono-oxigenases de *G. thermodenitrificans* (código PDB: 3B9O, 34% de identidade seqüencial) e de *E. coli* (código PDB: 1M41, 20% de identidade seqüencial) (Tabela 16). Neste caso, utilizamos as coordenadas estruturais da óxido-redutase YtnJ de *B. subtilis* (PDB: 1TVL) e da mono-oxigenase LadA de *G. thermodenitrificans* contendo a FMN ligada (código PDB: 3B9N) para construção de dois modelos. Os alinhamentos utilizados para a geração dos modelos são apresentados na Figura 47 e mostram boa cobertura das seqüências.

Dez diferentes modelos foram gerados a partir de cada estrutura molde e avaliados pelo programa PROCHECK ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES\\_3/](http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES_3/)). O modelo que apresentou a melhor qualidade estereoquímica, segundo o gráfico de Ramachandran, com nenhum resíduo em regiões não permitidas, foi escolhido para as análises.

**Tabela 16 Proteínas com estrutura resolvida que possivelmente apresentam similaridade estrutural com a SsuE de *Xac*.**

Resultado de ortólogos da proteína SsuE com a estrutura resolvida. BlastP x PDB.					
Função	Microorganismo	RMSD	N° de resíduos alinhados	Identidade sequencial	Referências
óxido-redutase	<i>Bacillus subtilis</i>	0.7	399/463	39%	PDB: 1TVL; Gormam <i>et al.</i> 2004
Mono-oxigenase	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	1.7	414/453	34%	PDB: 3B9N; Li <i>et al.</i> 2007
Mono-oxigenase	<i>Escherichia coli</i>	2	322/432	20.5%	PDB: 1M41; Eichhorn <i>et al.</i> 1999
óxido-redutase	<i>Methanopyrus Kandleri</i>	3	308/445	15%	PDB: 1EZW; Shima <i>et al.</i> 2000
Mono-oxigenase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2.9	309/436	16.5%	PDB: 217G; Ki <i>et al.</i> 2006
Desidrogenase	<i>Methanoculleus thermophilus</i>	2.9	298/435	14.4%	PDB: 1RHC; Aufhammer, <i>et al.</i> 2003
Flavoproteína	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.9	307/427	16%	PDB: 3B4Y; Bashiri <i>et al.</i> 2007
óxido-redutase	<i>Methanosarcina barkeri</i>	2.9	303/428	13.5%	PDB: 1Z69; Aufhammer <i>et al.</i> 2005
óxido-redutase	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	2.9	298/428	13.8%	PDB: 1F07; Shima <i>et al.</i> 2000

<pre>P1:1TVL structureX:1TVL:3:A:432:A:YTNJ:Bsu:2.10: ----RADFIQFGAMIHGVTGTTDGRHPDVPDPSASTNI-EFYMKKAQTAE KGLFSLFIADGLFISEKSIPLFLNR---FEPITILSALASVTKNIGLVG TFSTSFTEPFTISRQLMSLDHISGGRAGWNLVTSPOEGAARNHSHKSNLPE HTERYEIAQEHLDVVRGLWNSWEHDAFIHNKKTGQFFDQAKLHRLNHHKKG YFQVEGPLNIGRSKQGEVVFVQAGSSETGRQFAAKNADAIFTHSNLEET AFYADVKSRAADEGRDPSSVRIFFPGISPIVADTEEEAEKKYREFAELIP IENAVTEAKARNLTLREVAQEMAFPTLF-IGTPERVASLIETWFNAEA ADGF-IVGSDIPGTLDAFVEKVIPIQLERGLYRQDYRGGTLRENGLGLIP Q-----*</pre>	<pre>&gt;P1;3B9N structureX:3B9N:3:A:435:A:monooxygenase:Gth: 2.70: ----KKIHINAFEMNCVGHIAHGLWRHPENQRHRYTDLNYWTELAQLLEK GKFDALFLADVVGIVDVYRQSRDTAVREAVQIPVNDPLMLISAMAVYTKH LAFAVTFSTTYEHPYGHARRMSTLDHLTKGRIAWNVTSHLPSADKNFGI KKILEHDERYDLADEYLEVCYKLEWGSWEDNAVIRDIENNIYTDPSKVHE INHSKGYFEVPGPHLCEPSPQRTFVYIQAGMSERGREFAAKHAECVFLGG KDVEITLKFVDDIRKRAKRYGRNPDHMKMFAGICVIVGKTHDEAMEKLSN FKQYWSLEGHLAHYGGGTG-YDLSKYSNDYIGSISVGEIINN----- -----MSKLDGKWFKLSVGTPKKVADEMQYLVEEAGIDGFN LVQYVSPGTFVDFIELVVPELQKRGLYRVDYEEGTYREKLFQKGNRYRLPD DHIAARYRN-----*</pre>
<pre>P1:SsuE_Xac sequence:SsuE_Xac:1::442::SsuE:Xac: : MSAPRQ--LSLGAFLMATGHHVAAWRHPQA--SADTLVFDHYREMVRIAE AAKFDVAVFVADSLAAAGGPVAVSRMARSSLEFPLTLLSALAVVSEIRGLIA TVTTSYNEPYHVARKFASLDHLGSGRAGWNLVTSDAADEALNFRNDAHIV HAERYARAREFQOVVAGLWSDDDAFIADKAAGLHHDPARAHVLDHRGT HFQVRGPNLIARAPQGHFVLVQAGSSEPGRALAAETAEVVFTAQSSLAKA QAFYADLKGRLDQFGRPRDALKVLPGVFIVVQSQAEAEQEFQFQDLVE PAVGIALAGQEQLSIAQLGRRRAGGRGHYSLIGTPTRIADELQAWFEQ GAADGFNVLVPHLPGGLADVAHVPELQRRGVFRREYAGRTLRLDHLGLQ RTVNRFSAR*</pre>	<pre>&gt;P1;Xac_SsuE sequence:Xac_SsuE:1::464::monooxygenase:Xac: : MSAPRQLSLGAFLMATGHHVAA--WRHPQAS-ADTLVFDHYREMVRIAEA AKFDVAVFVADSLAAAGGPVAVSR-----MARSSLEFPLTLLSALAVVSEIR IGLIATVTTSYNEPYHVARKFASLDHLGSGRAGWNLVTSDAADEALNFRN DAHIVHAERYARAREFQOVVAGLWSDDDAFIADKAAGLHHDPARAHV LDHRGTHFQVRGPNLIARAPQGHFVLVQAGSSEPGRALAAETAEVVFTAQ SSLAKAQAFYADLKGRLDQFGRPRDALKVLPGVFIVVQSQAEAEQEFQ FQDLVEPAVGIALLSRMLGNFDLSAYPPDGLPLDPLPLTETGQRSRQQLFT ELAGQEQLSIAQLGRRRAGGRGHYSLIGTPTRIADELQAWFEQGAADGFN VLVPHLPGGLADVAHVPELQRRGVFRREYAGRTLRLDHLG-----LQRTV NRFSAR-----*</pre>

Figura 47 Alinhamentos das seqüências da SsuE com as seqüências da (A) óxidoreductase de *B. subtilis* (PDB: 1TVL) e da mono-oxigenase de *G. thermodenitrificans* (PDB: 3B9N) usados para construir os modelos de SsuE, com o programa Modeller.

O modelo da SsuE de *Xac* baseado na óxido-redutase YtnJ apresentou o mesmo motivo barril-Tim evidenciado para a SsuD, com uma folha beta formada por 8 fitas circundadas por hélices alfa, com r.m.s.d. de 0.6 Å, revelando a proximidade do arranjo estrutural do modelo e molde (Figura 48).

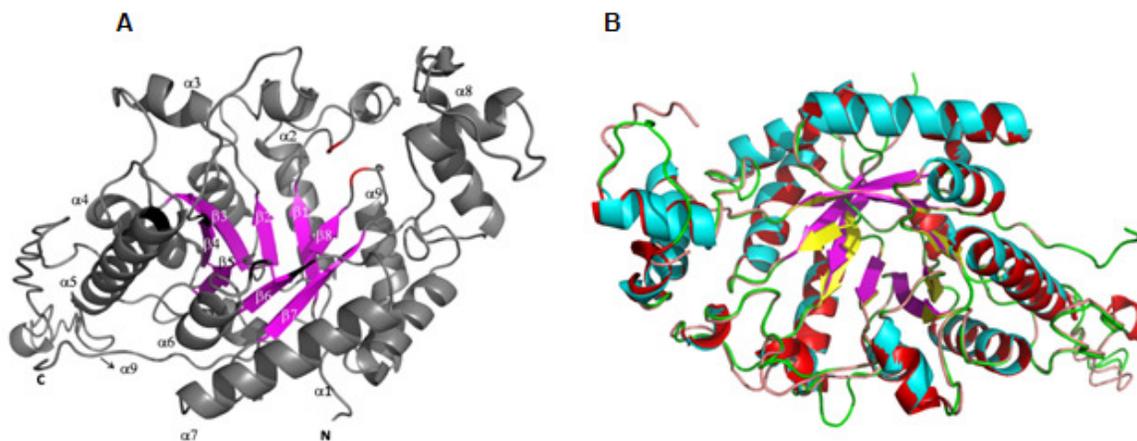
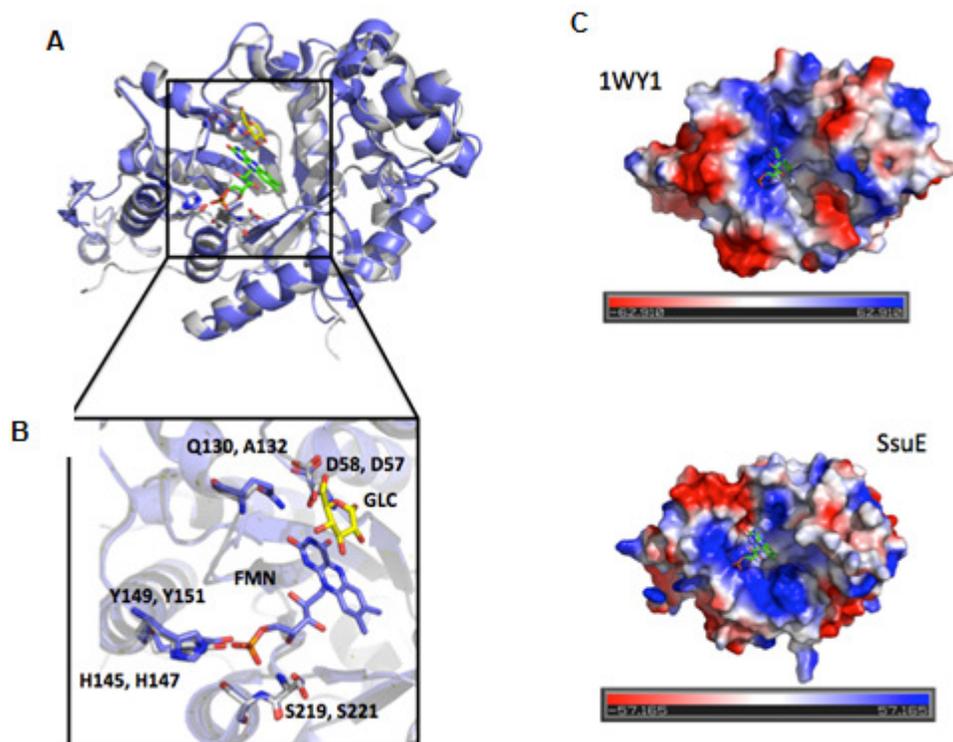


Figura 48 A) Modelo da SsuE de *Xac* baseado nas coordenadas estruturais da óxidoreductase de *B. subtilis* (PDB 1TVL). (B) Sobreposição estrutural das proteínas SsuE de *Xac* (vermelha/verde/amarela) e de *B. subtilis* (óxido-reductase) (azul/rosa/roxa). Programa Modeller.

Visando identificar se a SsuE conservava resíduos de interação com a FMN, foi realizado um alinhamento estrutural desta proteína com a YtnJ ligada à FMN (código PDB: 1WY1). A Figura 49 mostra os resultados do alinhamento, posicionamento da FMN e característica do bolsão de ligação. Como o modelo da SsuE foi baseado na YtnJ, que apresenta alta identidade de sequências, a estrutura da proteína se adequa perfeitamente ao posicionamento da FMN, numa mesma região evidenciada na proteína YnJ (Figura 49A, em verde). Dos cinco resíduos da YtnJ que interagem com a FMN, quatro são conservados na mesma região da SsuE, conforme observado na Figura 49B.



**Figura 49** Caracterização e comparação do modelo da SsuE de *Xac* com a óxido-redutase de *B. subtilis* YtnJ, usada como molde. (A) sobreposição das estruturas do modelo de SsuA (cinza) e da proteína de *B. subtilis* (azul), evidenciando a FMN (em verde) no sítio ativo da proteína. Ainda é evidenciada uma molécula de glicose (amarelo), produto da cristalização. (B) Detalhe do sítio de ligação da FMN revelando a conservação dos resíduos da interação da FMN na SsuE. (C) Comparação do potencial eletrostático de superfície da SsuE e da óxido-redutase, evidenciando as características de polaridade positiva e neutra.

A única diferença é a substituição de uma alanina em YtnJ por uma glutamina em SsuE. Para confirmar a possível interação e adequação do bolsão da SsuE à FMN, foi realizado um “docking” manual da proteína com o substrato e as distâncias das interações medidas de acordo com o programa Pymol (Tabela 17). Além de conservar os resíduos para a

interação da FMN, o sítio de interação na SsuE apresentou potencial eletrostático similar ao da proteína YtnJ (Figura 49C).

**Tabela 17 Resíduos de interação direta com a FMN na proteína SsuE *Xac* e YtnJ de *Bacillus subtilis* e as respectivas distâncias em Å das interações eletrostáticas**

Resíduos da YtnJ	Distância (Å) das interações de Hidrogênio dos resíduos da proteína YtnJ com a FMN	Resíduos da proteína SsuE de <i>Xac</i>	Distância (Å) das interações de Hidrogênio dos resíduos da proteína SsuE com a FMN
Asp58/N	3.1	Asp57/O	3.2
Asp58/O	2.9	Ala132	-
Gln130/N	2.4	His147/N-O1	3.2
His145/N	3	His147/N-O3	3.3
Tyr151/OH	2	Tyr149/OH	2
Ser220/O	3.4	Ser222/O	3.4
Ser220/N	2.6	Ser222/N	2.6
Ser219/N	2.4	Ser221/O	2.4

#### **5.14. Comparação da SsuE de *Xac* com as mono-oxigenases de *G. thermodenitrificans* (LadA) e de *E. coli* (SsuD)**

Para verificar se a SsuE de *Xac* conserva características estruturais de mono-oxigenases, um segundo modelo da proteína foi construído baseado nas coordenadas estruturais da mono-oxigenase LadA de *G. thermodenitrificans* ligada à FMN (PDB: 3B9O), a qual apresentou 34% de identidade de sequência (Tabela 16). Esta proteína foi usada como molde por apresentar a maior identidade de sequência dentre as mono-oxigenases e a presença da FMN no sítio de ligação. O modelo obtido para a SsuE apresentou boa qualidade estereoquímica, com nenhum resíduo em região não permitida (gráfico não exibido) e um bom ajuste do modelo e molde.

Baseados na estrutura da LadA (LI *et al*, 2008), os resíduos que fazem interação com a FMN foram identificados, e iluminados nas sequências alinhadas das SsuE e LadA (PDB 3B9O). Adicionalmente, como a SsuD de *E. coli* corresponde à mono-oxigenase do sistema dois componentes neste organismo, a sequência desta proteína foi adicionada para comparações (PDB 1M41) (Figura 50). A SsuE conserva cinco dos sete resíduos da LadA envolvidos na interação com a FMN (em amarelo na Figura 50). Por outro lado,

apesar da SsuD de *E. coli* ser o suposto ortólogo da SsuE de *Xac* (lembrar que ambas pertencem ao mesmo operon *ssuABCDE*) somente existe conservação de dois resíduos nesta proteína: a Y158 (segundo a proteína LadA) e a S230.

```

SsuE_Xac      FDAVFVADSLAAAGGPVASMARS-----SLFEPLTLLSALAVVSERIG 93
3B90_Gth      FDALFLADVVGIYDVYRQSRDTAVREAVQIPVNDPLMLISAMAYVTKHLA 100
1M41_Eco      YTGVLIPITGRSCED-----AWLVAAASMPVTQRLK 72

SsuE_Xac      LIATVTTSYNEPYHVARKFASLDHLSGGRAGWNLVTSDAADEALNFNDA 143
3B90_Gth      FAVTFSTTYEHPYGHARRMSTLDHLTKGRIAWNVTSHLPSADKNFGIKK 150
1M41_Eco      FLVALRPSVTSPTVAARQAATLDRLSNGRALFNLVTGSDPQELAGDG--V 120
              *

SsuE_Xac      HYVHAERYARAREFQQVVAGLWD-SWDDDAFIADKAAGLHHDPARAHVLD 192
3B90_Gth      ILEHDERYDLADEYLEVCYKLWEGSWEDNAVIRD IENNIYTDPSKVHEIN 200
1M41_Eco      FLDHSERYEASAEFTQVWRRLQ-----RETVD 148
              *

SsuE_Xac      HRGTHFQVRGPLNIARAPQG-HPVLVQAGSS EPGRALAAETAEVVFTAQS 241
3B90_Gth      HSGKYFEVPGPHLCEPSPQR-TPVIYQAGMSERGREFAAKHAE CVFLGGK 249
1M41_Eco      FNGKHIHVRGAKLLFPATIQQPYPPLYFGSSDVAQELAAEQVDLYLTWGE 198
    
```

**Figura 50** Alinhamento sequencial das proteínas SsuE de *Xac*, LadA de *G. Thermo-denitrificans* (3B90\_Gth) e SsuD de *E. coli* (1M41\_Eco), evidenciando a conservação dos resíduos que fazem interação com a flavina na mono-oxigenase LadA (em amarelo).

Da mesma forma realizada para o modelo baseado na óxido-redutase, o modelo da SsuE baseado na LadA foi comparado com a proteína para caracterização do sítio de interação e resíduos. O alinhamento estrutural da proteína e modelo mostra um ajuste perfeito, com todas as regiões da SsuE sendo cobertas pelo molde. Nesta estrutura, a FMN posiciona-se mais internamente na proteína, diferentemente do que foi mostrado nas óxido-redutases (Figura 51A). Após o “docking” manual, foi observada a posição de todos os resíduos envolvidos na interação da LadA com a FMN, mostrando a conservação posicional e sequencial de cinco dos sete, conforme observado anteriormente no alinhamento sequencial (Figura 51A e Tabela 18). Novamente, o bolsão de interação da FMN é bem positivo tanto na LadA como no modelo (Figura 51B).

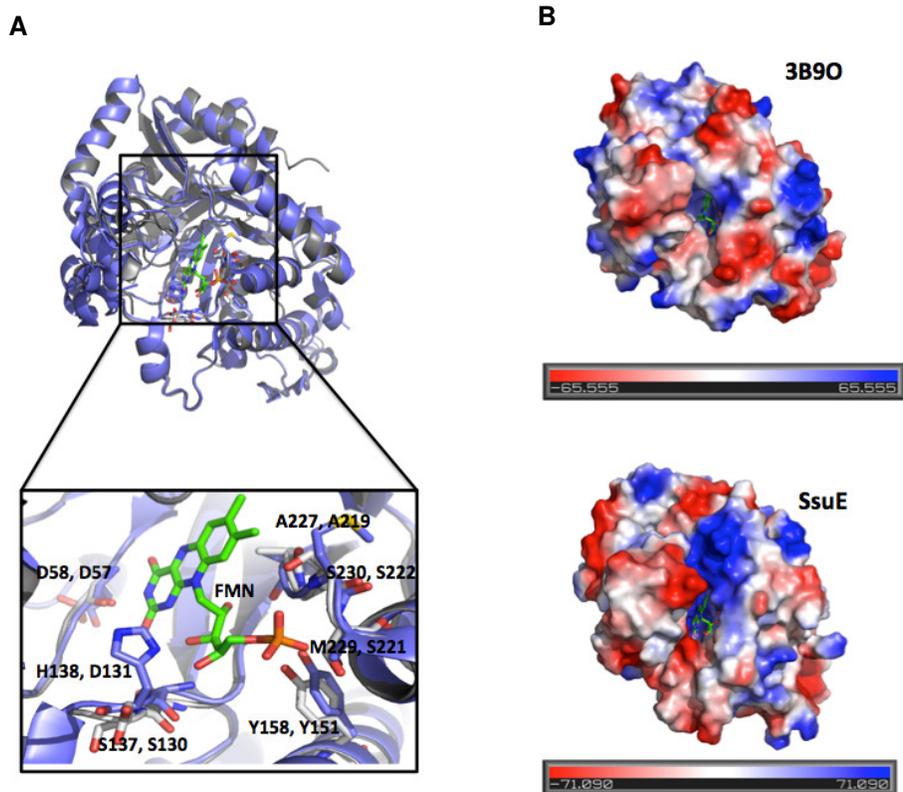


Figura 51 Comparação do modelo da SsuE de *Xac* com a mono-oxigenase de *G. thermodenitrificans*, usada como molde. (A) sobreposição das estruturas do modelo de SsuA (cinza) e da proteína LadA, evidenciando a FMN (em verde) no sítio ativo da proteína e detalhe do sítio de ligação da FMN revelando a conservação dos resíduos da interação da FMN na SsuE. (B) Comparação do potencial eletrostático de superfície da SsuE e da mono-oxigenase, evidenciando as características de polaridade positiva.

**Tabela 18 Resíduos de aminoácidos da LadA e da SsuE que realizam ligações de hidrogênio com a FMN e suas respectivas distâncias.**

Resíduos de aminoácidos de interação direta com a FMN - LadA	Distância das interações em Å	Resíduos de aminoácidos de interação direta com a FMN - SsuE	Distância das interações em Å
Asp58/O2	3.7	Asp57/N	3.7
Asp58/N	3.2	Asp57/O	3.4
Ser137/N	3.1	Ser130/N	5.2
His138/N1-O4	2.4	Asp131/O	5.3
His138/N1-O3	3	-	-
Tyr158/OH	2.6	Tyr151/O	2.6
Ala227/O	2.6	Ala217/O	3.1
Met229/N	2.5	Ser222/N	2.7
Ser230/O	2.4	-	-
Ser230/N	3	Ser221/N	2.9

Os resultados apresentados até o momento, sugerem que as proteínas SsuD e SsuE podem sim fazer parte do sistema de captação de alceno sulfonatos de *X. axonopodis*, com fortes indicações de que a SsuD de *Xac* é a óxido-redutase do sistema. Contudo, os resultados de bioinformática obtidos para a SsuE, não são suficientes para afirmar que esta proteína é o componente com atividade de mono-oxigenase. Os dois modelos construídos apresentaram características conservadas em óxido-redutases e mono-oxigenases.

### Parte III - Caracterização da proteína ligadora periplasmática Pbp, supostamente envolvida na captação de fosfatos/fosfonatos de *X. axonopodis*

#### 5.15. Expressão e purificação da proteína Pbp

As análises realizadas com a proteína Pbp de *Xac* foram incluídas neste trabalho em virtude da dificuldade inicial de obtermos as proteínas SsuD e SsuE na forma solúvel. Assim, visto que a expressão solúvel da Pbp já havia sido evidenciada em nosso laboratório, esta proteína se mostrou interessante para as análises de caracterização por ensaios espectroscópicos e de bioinformática. As condições de expressão da Pbp na sua forma solúvel foram estabelecidas em células de *E. coli* BL21(DE3) a partir do vetor pET28a. O fragmento do gene *XAC2383* (GI: 21243117) contendo a região codificadora da proteína madura, foi clonado no vetor de interesse nos sítios das enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*, de forma a expressar a proteína com cauda de histidina no N-terminal. A indução ocorreu a 37°C e 200 r.p.m. após a adição do indutor (IPTG) na concentração final de 0.1 mM. Não houve necessidade de variação nas condições de aeração. Cerca de 20% do total de Pbp expressa na célula foi encontrado na fração solúvel, conforme mostra a figura 52. A proteína apresentou a massa molecular de 33 kDa, condizente com os 301 resíduos, e *pI* teórico de 9.9, segundo o programa Protparam (GASTEIGER, *et al.*, 2005).

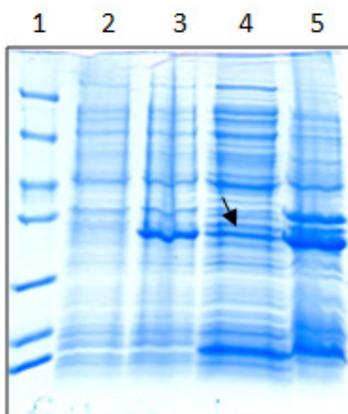
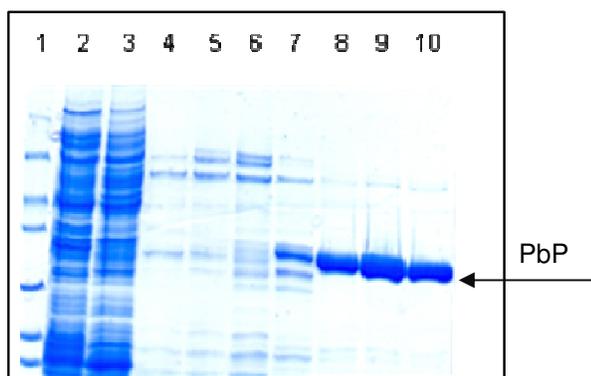


Figura 52 Análise da expressão da proteína Pbp (33.0 kDa) em cepas de *E. coli* BL21(DE3) por SDS-PAGE 13%. 1. Marcador de peso molecular comercial (Fermentas - SM0431); 2. Amostra de extrato celular de cultura não induzida (Tempo zero - T0); 3. Amostra de extrato celular de cultura induzida (Tempo dois - T2); 4. Extrato celular solúvel; 5. Extrato celular insolúvel (precipitado). A seta em preto indica a localização da proteína alvo.

Após a expressão solúvel da Pbp, seguiu-se o protocolo de purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). A eluição da proteína pura ocorreu a partir das concentrações de 200 mM de imidazol, quando em tampão HEPES 50 mM pH7.5 (Figura 53). Quando mantida nestas condições, contudo, a Pbp apresentou-se instável e com tendência à precipitação. A melhora na instabilidade e precipitação ocorreu após a substituição do tampão HEPES por tampão fosfato de sódio (dados não mostrados).



**Figura 53** Purificação da proteína Pbp por cromatografia de afinidade a níquel (IMAC), evidenciada em eletroforese em gel de acrilamida. 1) Marcador de peso molecular (Fermentas – SM0431); 2) Lavado; 3) Lavagem da coluna com 20 mM de imidazol em tampão HEPES 50 mM pH7.5, 4-5) Amostras eluídas com 50 mM de imidazol; Amostras de 4 a 10 revelam os picos do cromatograma sendo as amostras 8, 9 e 10 eluídas com 200 mM de imidazol. 6-7) amostras eluídas com 100 mM de imidazol e 8-10) proteína eluída com 200 mM de imidazol.

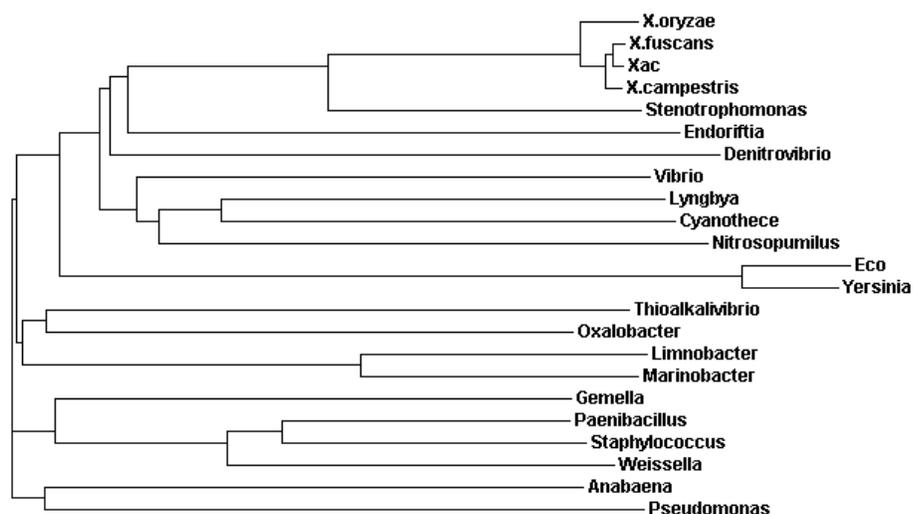
### 5.16. Análises de bioinformática da proteína Pbp

A busca de ortólogos da proteína Pbp foi realizada com o auxílio do programa BLASTP. Os ortólogos de maior identidade de seqüências foram os de outras espécies de *Xanthomonas*, e a maioria foi para proteínas que cumprem a função de ligação a fosfato (Tabela 19) em diversos organismos que, preferencialmente, habitam o solo. A árvore filogenética coloca a Pbp de *Xac* próxima à proteínas ligadoras de fosfato de *Endoriftia*, uma gammaproteobacteria responsável pela oxidação de enxofre em simbiontes, a organismos de solo que podem estar presentes em infecções oportunistas, como o *Streptophomonas* e *Denitrovibrio*. Este último tem a capacidade de reduzir nitrato à

amonía (KISS *et al*, 2010). As maiores divergências são encontradas nos ortólogos de enteropatógenos, *E. coli* e *Yersinia pestis* (Figura 54).

**Tabela 19 Alinhamento sequencial da proteína Pbp de Xac. BLASTPx NR.**

Microorganismo	Função	Identidade sequencial	Habitat
<i>Xanthomonas fuscans</i>	Proteína ligadora de fosfato	304/309 (99%)	solo e plantas
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vasculorum</i>	Proteína ligadora de fosfato	265/288 (93%)	solo e plantas
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Proteína ligadora de fosfato	290/309 (93%)	Solo
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Proteína secretada	302/309 (97%)	Solo
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Proteína ligadora de fosfato	173/288 (60%)	Clínica e ambiental
<i>Vibrio splendidus</i>	Transportador ABC acilfosfonato	86/285 (30%)	Placton
<i>Lyngbya</i> sp.	Proteína secretada	78/275 (28%)	Aquático
<i>Cyanothece</i> sp	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	70/269 (26%)	Aquático
<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato/fosfato	67/278 (24%)	Solo
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato/fosfato	67/262 (25%)	Aquático
<i>Endoriffia persephone</i>	Transportador ABC acilfosfonato	42/120 (35%)	Solo
<i>Thioalkalivibrio</i> sp	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	76/273 (27%)	Sedimento
<i>Gemella haemolysans</i>	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	66/260 (25%)	Mucosa oral e intestinal
<i>Marinobacter aquaeolei</i>	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	43/135 (31%)	Aquático
<i>Anabaena variabilis</i>	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	56/236 (23%)	Aquático
<i>Oxalobacter formigenes</i>	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	58/280 (20%)	Mucosa intestinal
<i>Paenibacillus</i> sp. <i>oral taxon</i>	Transportador ABC de fosfonato	48/203 (23%)	Mucosa oral
<i>Limnobacter</i> sp	Proteína periplasmática ligadora de fosfonato	38/159 (23%)	Marinha
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Proteína periplasmática de transportador ABC	70/326 (21%)	Planta e clínica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Transportador ABC de fosfonato	50/199 (25%)	Mucosa oral



**Figura 54** Árvore filogenética da proteína Pbp de *Xac* construída a partir dos ortólogos encontrados segundo o BLASTP.

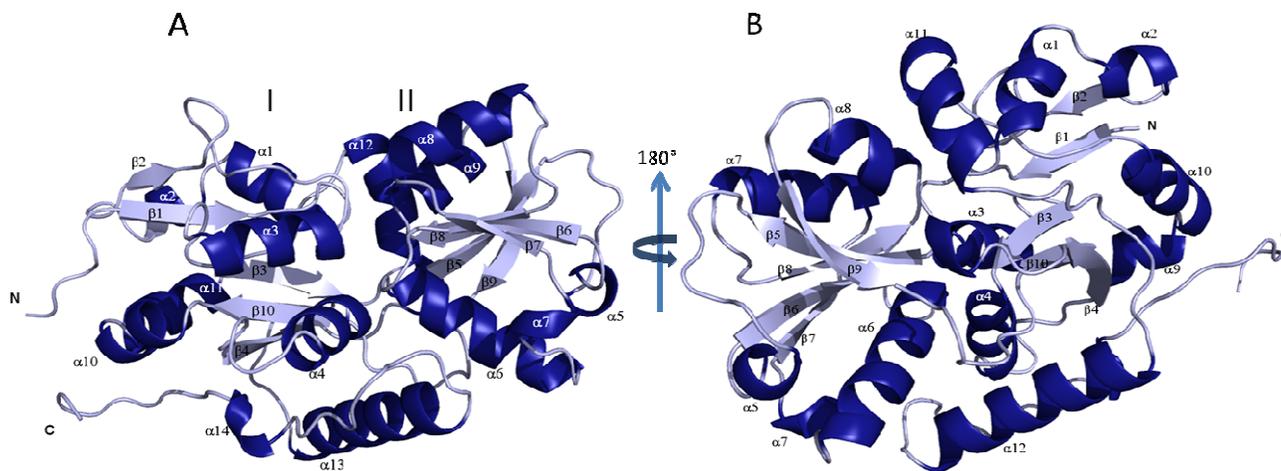
Realizamos uma busca por proteínas com similaridade estrutural para a construção de um modelo, que pudesse nos fornecer características mais específicas em relação ao bolsão de ligação, resíduos, e tipo de molécula transportada. O BlastP contra o banco de dados de proteínas revelou que a Pbp apresenta, em geral, similaridade estrutural com proteínas periplasmáticas, incluindo a SsuA de *Xac* (PDB: 3E4R), porém, com baixa identidade sequencial (23%) e 14.5% para a proteína periplasmática ligadora de fosfato de *Yersinia pestis*. Também foi identificada uma proteína ligadora de fosfonato de *Pseudomonas aeruginosa*, ligada a um ligante desconhecido na presença de etanodiol (PDB: 3N5L), que apresentou apenas 15% de identidade de sequência (Tabela 20). Esta proteína foi o alvo de melhor pontuação segundo o programa FUGUE (SHI *et al.*, 2001) e embora seja filogeneticamente distante de *Xanthomonas*, é importante ressaltar que muitas das proteínas estudadas pelo nosso grupo apresentam alta similaridade estrutural e sequencial com ortólogos do gênero *Pseudomonas*.

**Tabela 20 Estruturas de proteínas com similaridade estrutural à Pbp de *Xac*.**

Função da proteína	Microorganismo	R.M.S. D (Å)	Identidade sequencial (%)	Referência
Proteína periplasmática ligadora de Alceno sulfonatos	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	1.1	23%	PDB: 3E4R; Balan, A. <i>et al</i>
Proteína periplasmática ligadora de Alceno sulfonatos	<i>Escherichia coli</i>	1.5	15%	PDB: 2x26 Beale, J. <i>et al</i>
Proteína periplasmática ligadora de fosfonatos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.6	15%	PDB: 3N5L JCSG
Proteína periplasmática ligadora de fosfato	<i>Escherichia coli</i>	4.3	14%	PDB: 1IXH Wang, Z. <i>et al</i>
Proteína periplasmática ligadora de fosfato	<i>Yersinia pestis</i>	4.2	14.4	PDB: 2z22 Tanabe, M. <i>et al</i>
Hidrolase fosfonoacetaldeído	<i>Bacillus cereus</i>	5.1	35%	PDB: 2IOH; Lahiri, L. <i>et al</i>
Óxido-redutase	<i>Shewanella oneidensis</i>	6	28%	PDB: 2GOU; Van Den Hemel, D. <i>et al</i>
Primase-helicase (Transferase)	Enterobacteria- phage T7	7.3	23%	PDB: 1Q57; Toth, E.A. <i>et al</i>

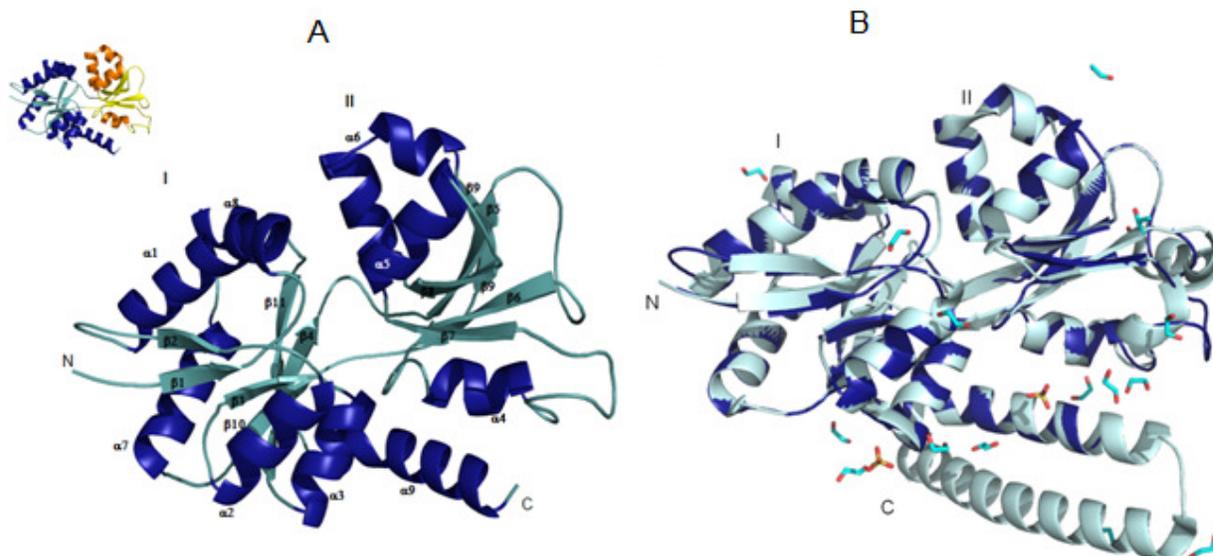
A partir destes resultados, dois modelos de Pbp de *Xac* foram construídos: um baseado na estrutura da SsuA de *Xac* (PDB: 3E4R) e outro baseado na proteína ligadora de fosfonatos de *P. aeruginosa* (PDB: 3N5L). Dos dez modelos gerados pelo programa Modeller para cada modelo, apenas um foi escolhido para as análises após os resultados de validação obtidos no Procheck. Os gráficos de Ramachandran dos modelos de Pbp baseado em SsuA e Pbp baseado em Pbp de *P. aeruginosa*, mostraram que não há resíduos em regiões não permitidas e 0.4 % nas regiões permitidas e favoráveis (dados não mostrados). A estrutura tri-dimensional do modelo da Pbp baseado na proteína SsuA de *Xac* mostrou 2 domínios, I e II, constituídos de folhas-beta formadas por 5 e 4 fitas, respectivamente, circundadas por hélices alfa, o que caracteriza o grupo de proteínas

ligadoras periplasmáticas (Figura 55). Este modelo contudo, mostra as regiões N e C-terminais completamente desenoveladas.



**Figura 55 Modelo da proteína Pbp gerado pelo programa Modeller a partir das coordenadas estruturais da proteína ligadora de alceno sulfonatos de *Xac*, SsuA. (A) Representação da estrutura tridimensional da Pbp em cartoon. As folhas beta são mostradas em azul claro, circundadas pelas hélices em azul. O domínio I foi assim denominado pela presença da região N-terminal. (B) Vista posterior da proteína Pbp. A presença de alças que conectam os domínios garantem a flexibilidade, a abertura e fechamento do sítio de ligação.**

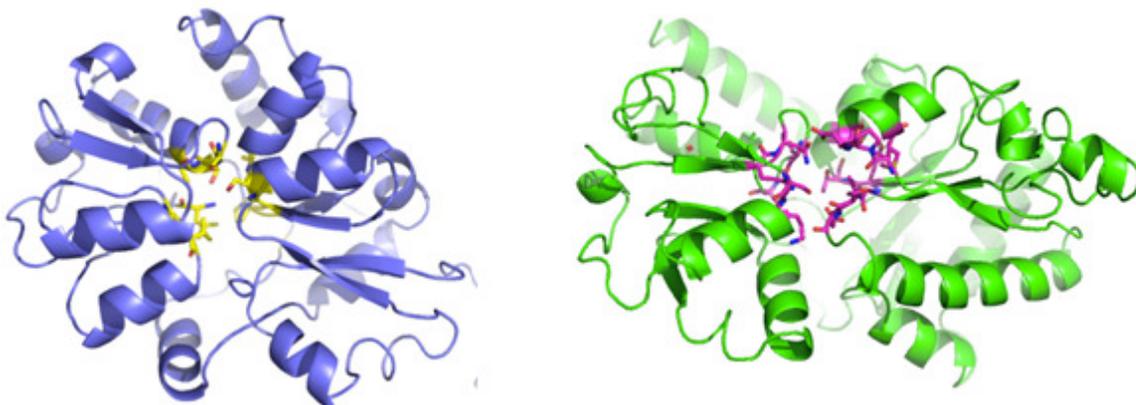
A construção do outro modelo da Pbp, baseado na estrutura da proteína ligadora de fosfonatos de *P. aeruginosa* (PDB: 3N5L), foi realizada da mesma forma com a utilização do programa Modeller. Após a construção de um alinhamento entre as duas proteínas, este foi usado para a construção do modelo. Embora a Pbp apresente identidade de seqüências muito baixa quando comparada com a proteína de *P. aeruginosa*, todos os resíduos são alinhados, evidenciando uma boa cobertura para o modelo. O modelo de melhor qualidade stereoquímica não apresentou nenhum resíduo em regiões não permitidas e 100 % em regiões permitidas (dados não mostrados), segundo o gráfico de Ramachandran. Este modelo evidenciou uma proteína similar à SsuA, com os dois domínios característicos formados por folhas beta circundadas por hélices (Figura 56). A sobreposição estrutural do modelo de Pbp e a estrutura da Pbp de *P. aeruginosa* revelou um r.m.s.d de 0.6 Å e a ausência na proteína de *Xac*, de uma hélice alfa na região C-terminal (Figura 56B). Para a construção deste modelo, a região N-terminal referente ao peptídeo sinal foi mantida e conforme observado no resultado final, esta foi corretamente modelada.



**Figura 56** Modelo da proteína Pbp de Xac gerado pelo programa Modeller a partir das coordenadas estruturais da proteína ligadora de fosfato de *Pseudomonas aeruginosa*, Pbp. (A) Representação da estrutura tridimensional da Pbp em cartoon. As folhas beta são mostradas em azul claro, circundadas pelas hélices em azul. O domínio I foi assim denominado pela presença da região N-terminal. A figura em miniatura elucida de forma didática os domínios da proteína. (B) Sobreposição estrutural da proteína Pbp de Xac e seu ortólogo de *P. aeruginosa*, Pbp.

Apesar de similares estruturalmente devido à presença dos dois domínios formados por folhas-beta e hélices alfa, a sobreposição entre os dois modelos revelou um r.m.s.d. de 16 Å (dados não mostrados). Essencialmente, este r.m.s.d. reflete as diferenças nas posições das hélices ao redor das folhas beta e do fato da proteína baseada na estrutura da SsuA estar mais fechada, ou com os domínios mais próximos, do que a proteína modelada a partir da Pbp de *Pseudomonas*, cujos domínios estão mais abertos. Neste caso, procuramos analisar se apesar das diferenças, o bolsão de ligação nas duas proteínas continha resíduos conservados que pudessem nos direcionar para sua função.

A partir das estruturas, o bolsão foi caracterizado visualmente e com o auxílio do programa ITasser os resíduos foram identificados (Figura 57). Com exceção dos resíduos 125 a 127 do modelo de baseado em SsuA (equivalentes a 152 a 154, em negrito na Figura 57), não há consenso na caracterização do bolsão.



**Figura 57** Identificação do bolsão de interação ao ligante nos modelos da Pbp baseados na SsuA de *Xac* (A) e na Pbp de *P. aeruginosa* (B).

O alinhamento entre as sequências das duas Pbps mostra que dos possíveis 18 resíduos formadores do bolsão, dez são conservados, incluindo a região que compreende os resíduos 125 a 127 (Figura 58). Estes resíduos poderiam ser os de interação com o fosfonato, que conhecidamente, em proteínas com função similar, são altamente conservados. É importante ressaltar que apesar da baixa identidade de sequências entre os dois ortólogos (15% de identidade), as regiões onde os resíduos do bolsão estão localizados são as de identidade máxima (conforme evidenciado pela presença de asteriscos abaixo dos resíduos na Figura 58). Uma vez que o modelo da Pbp baseado no seu ortólogo de *Pseudomonas* parece se ajustar melhor à função predita da proteína e à estrutura usada como molde (vide região N-terminal), adotamos este modelo como o ideal para a Pbp de *Xac* e as análises posteriores serão todas baseadas nele.

Uma vez estabelecido um modelo para a Pbp e com o objetivo de verificarmos se havia conservação do bolsão entre as proteínas ligadoras de fosfato e fosfonatos, duas estruturas de proteínas ligadoras de fosfato disponíveis no PDB: a proteína de *E. coli* PstS (PDB: 1IXH) e a proteína de *Yersinia pestis* PstS (PDB: 2Z22), foram usadas para comparações. Primeiramente fizemos uma análise das interações destas proteínas (Tabela 21), as quais se mostraram idênticas. Este dado indica que o sítio de ligação e interação para fosfato deve ser mantido para a função. Da mesma forma, os sítios de interação das proteínas ligadoras de sulfato e molibdato são extremamente conservados, mesmo entre espécies muito distante filogeneticamente (BALAN *et al.*, 2008; QUICHO e LEVDINA, 1984).

```

Xac_Pbp      MSVLRGLRWCLLIACWLIAGAGLAVTAAAAPSSVLVLRISDDPASHYEQLKPLLDYVVR 60
Pae_Pbp      -----GDQPVINFGIISTESS---QNLKSIWEPFLKD 29
              . . . * : * * * : . : : * * . : . :

Xac_Pbp      MREVGIRRGSEILMAPDARQMSSYLRRGRVDWVSETTGAAMLLEQRGSAHPLLMTERG-GL 119
Pae_Pbp      MSQQTGYQVKAFFAPDYAGIIQGMRFDKVDIAWYGNKAAAMEAVDRAHGEIFAQTVAASGA 89
              * : : : : * * * : . : * : * * . . * * * : * . . : * . *

Xac_Pbp      RDFHTLFFVRRDSPIHSLSQLRG--HTLALQN--ASSTSGYLLP-MLELLRNGIACDVLL 174
Pae_Pbp      PGYWSLLIANKDSKIDSLEDMLANAKSLTFNGGDPNSTSGYLVPGYYVFAKNNVDPVKAF 149
              . : * : : . : * * * . : . : * * : * . * * * * * * : * : . :

Xac_Pbp      SADDTPARGSAGYLMVGSKLNVAAFVHKHLIDVGALS-----NVDWDD--ERHMPPVF 225
Pae_Pbp      KRTLNSHEVNALAVANKQVDVATFNTEGMRLELTQPEKARQLKVIWKSPLIPGDPLVW 209
              . . . : . . : * * * * * * : : : . : * * * . * * :

Xac_Pbp      K-----RDFRIVHRTAPVPR--AVEMVRTGMDPAVEQLR---VLLQAASDP 268
Pae_Pbp      RNNLSDEQKNKLRDFFFKYGANAEQKKVLADLQWSKFQASDDQLLPVIRQLELQKQRTDV 269
              : * * * : : : . : . : : : : * : * : : *

Xac_Pbp      KAGPALKRFFDTTGFRPLDPTSRRLQELSAGVQRVRDHVE 309
Pae_Pbp      ANNANLGAEEKAAKLKALDEELAKLEKMAEREQKTAANAG 310
              . . * . : : * * * : : : : * . . :
    
```

Figura 58 Alinhamento entre as sequências das proteínas Pbp de *Xac* (Xac\_Pb) e de *P. aeruginosa* (Pae\_Pbp) evidenciando os resíduos formadores do bolsão de interação (amarelo), mapeados segundo o programa ITasser.

Tabela 21 Comparação das interações que ocorrem entre as proteínas ligadoras de fosfato de *E.coli* e *Yersinia pestis* e o ligante.

Pst_Eco		PstS_Ype	
Resíduos /Átomos	Distância (Å)	Resíduos /Átomos	Distância (Å)
Ala9/Pbp	2.7	Ala9/Pbp	2.7
Thr10/Pbp	1.9	Thr10/Pbp	2.6
Phe11/Pbp	3.3	Phe11/Pbp	2
Ser38/Pbp	2	Ser38/Pbp	2.8
Ser38/Pbp	1.9	Ser38/Pbp	2.7
Asp56/O	3.3	Asp56/O	3.3
Arg135/Pbp	2	Arg135/Pbp - O2	2
Ser139/Pbp	1.9	Arg135/NH - O1	3.2
Gly140/Pbp	2	Gly140/Pbp	2
Thr141/Pbp	2	Gly140/Pbp	3.3
Trh241/HG	2.7	Thr141/HG	2.7
		Thr141/N	2

Em seguida, após a análise das proteínas ligadoras de fosfato e a partir de um alinhamento sequencial entre as quatro proteínas de interesse, os resíduos previamente

caracterizados foram identificados nas sequências (Figura 59). Fica evidente que não há conservação entre os resíduos característicos de bolsões de proteínas ligadoras de fosfato (em verde) e fosfonato (em amarelo), com exceção de resíduos de Serina, Treonina e Glicina em posições definidas. Na proteína ligadora de alcão sulfonato SsuA, uma sequência de resíduos STS e G, é responsável pela coordenação do sulfato, exatamente do mesmo jeito que ocorre na interação entre a proteína ligadora de sulfato, SBP, e o sulfato. O alcão permanece estabilizado através de interações com resíduos apolares e moléculas de água. O mesmo poderia acontecer na Pbp. No bolsão desta proteína, deve haver resíduos que atraem o fosfato e são conservados como nas ligadoras de fosfato, e resíduos com características diferentes que possam acomodar os diferentes tipos estruturais de fosfonatos. A proteína de *P. aeruginosa*, embora tenha sido resolvida com muitos ligantes, não há nenhum ligante no sítio específico, entre as duas fendas, sugerindo que esta proteína esteja na sua forma aberta. Os dados sugerem fortemente que a Pbp de *Xac* não é ligadora de fosfato.

```

Ype_PstS      EASLTGAGATTEPAPVYAKWADSYQKETGNKINYQGICSSGGVKQIIANTVDFGASDAPLT 60
Eco_Pst      EASLTGAGATTEPAPVYAKWADTYQKETGNKNVNYQGICSSGGVKQIIANTVDFGASDAPLS 60
Xac_Pbp      -----APSSVLVLGRISDDPASHYEQLKPLLDVYVPR-----MREVGIRRGELMAPDARQ 51
Pae_Pbp      -----GDQPVINFGIISTESS---QNLKSIWEPFLKD---MSQQTGYQVKAFAPDYAG 48
      .  . . :      : . .      : :      : :      : . .      :
Ype_PstS      DEKLATEGLFQFPPTVIGVVVLAVNIPGIKSGELTLDGKTLGDIYLGTVKKWNPDAIVKLN 120
Eco_Pst      DEKLAQEGFLFQFPPTVIGVVVLAVNIPGLKSGELVLDGKTLGDIYLGKIKKWDEAIAKLN 120
Xac_Pbp      MSSYLRGRGRVDWVSETGAAMLEQRGSAHPLMTERGGLRDFHTLFFVRR--DSPIHSLS 110
Pae_Pbp      IIQGMRFDKVDIAWYGNKAMEAVDRAHGEIFAQTVAAAGAPGYWSLLIANKDSKIDSLE 108
      .  . . :      : . .      : . .      :      :      :      : * * . *
Ype_PstS      PGV-KLPDQNIAVVRADGSCTSFVFTSYLAKVNAEWKEKVGAGSTVNWPTGLGGKGNDG 179
Eco_Pst      PGL-KLPSQNIAVVRADGSCDSFVFTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVKWPIGLGGKGNDG 179
Xac_Pbp      --QLRGHTLALQN--ASSTSG-----YLLPMLELLRNGIACDVLLSADDTP-ARGSAG 158
Pae_Pbp      DMLANAKSLTFCNGDPNSTSG-----YLVPGYYVFAKNN-VDPVKAFKRTLNSSEHVN 160
      : . . . :      : **      : **      :      :      : . . . .
Ype_PstS      IAAFVQRLPGSIGYVEYAYAKQNN--LAYTKLISADGKP--VSPTEHSFSSAAKGVDWSK 235
Eco_Pst      IAAFVQRLPGAIGYVEYAYAKQNN--LAYTKLISADGKP--VSPTEENFANAAKGADWSK 235
Xac_Pbp      YLMVGSKLN-----VAAFVHKKHL--IDVGALSNVDWDD--ERHMPPVFKRDFRIVHRTA 208
Pae_Pbp      ALAVANKQVDVATFNTEGMERLELTQPEKARQLKVIWKSPLIPGDPLVWRNLSDEQKNK 220
      . . :      . : .      : . .      :      :      :      :
Ype_PstS      SFAQDLTNQKGDDVWPITSTTFILVHKEQKNA-----ANGTEVLKFFDWGYTHGAKQANE 290
Eco_Pst      TFAQDLTNQKGEDAWPITSTTFILIHKDQKP-----EQTEVLKFFDWAYKTGAKQAND 290
Xac_Pbp      FVPRAVEMVRTGMDPAVEQRLRVVLLQAASDP-----KAGPALKRFDTTGRPLDPTSR 263
Pae_Pbp      LRDFFFKYGANAEQKKVLADLQSKFQASDDDQLLPIRQLELFQRTDVANNANLGAEEK 280
      .      :      :      : . .      : :      : *
Ype_PstS      LDYATLPAEVVEQVRAAWKTQIKDSSGKPIF 321
Eco_Pst      LDYASLPDSVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY 321
Xac_Pbp      RRLQELSAG-VQVRDHVE----- 281
Pae_Pbp      AAKLKALDELAKLEKRMAERQKTAANAG- 310
      : : .

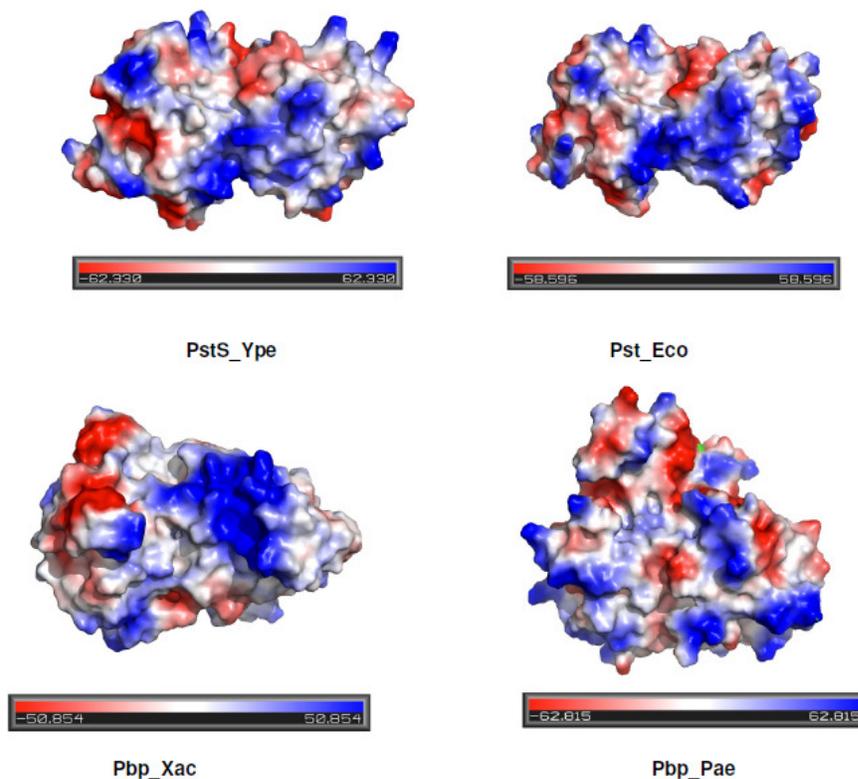
```

Figura 59 Alinhamento entre as sequências das proteínas Pbp de *Xac* (Xac\_Pbp) e de *P. aeruginosa* (Pae\_Pbp) e as proteínas ligadoras de fosfato PstS de *E. coli* (Eco\_Pst) e *Y. pestis* (Ype\_PstS). Os resíduos envolvidos na interação com o fosfato estão evidenciados em verde e os formadores do bolsão das Pbp em amarelo.

**Tabela 22 A sobreposição estrutural das proteínas periplasmática ligadora de fosfato de *E.coli* (1IHX), *Yersinia pestis* (2Z22) e da proteína ligadora de fosfonato de *Pseudomonas aeruginosa* (3N5L).**

Proteínas alinhadas	RMSD (Å)	Identidade sequencial (%)
PstS ( <i>E.coli</i> ) x Pbp ( <i>P. aeruginosa</i> )	4.2	9.3%
Pbp ( <i>E.coli</i> )x Pbp ( <i>Pbp.pestis</i> )	0.5	80.0%
Pbp ( <i>P. aeruginosa</i> ) x Pbp ( <i>Pbp.pestis</i> )	4.3	13.4%

Outra abordagem para caracterizar o bolsão de interação das proteínas e compará-los foi a análise do potencial eletrostático de superfície utilizando-se o programa Pymol. O sítio de interação do fosfato nas proteínas ligadoras deste íon fica parcialmente fechado e a presença de resíduos carregados positivamente é evidente (Figura 60). Ambas as proteínas apresentam potencial eletrostático bem semelhante, incluindo na região de interação com o íon, nitidamente bem positiva, de forma a atrair o fosfato para o sítio de ligação e favorecer a interação proteína-ligante. Em contrapartida, o bolsão das Pbp, tanto de *P. aeruginosa* como *Xac*, é caracterizado como neutro e fracamente positivo, possivelmente para poderem acomodar os variados grupos apolares presentes nos fosfonatos. A comparação entre as duas proteínas mostra ainda que a Pbp de *Xac* apresenta uma região fortemente positiva no domínio I, possivelmente envolvida com a interação com a proteína de membrana.



**Figura 60** Potencial eletrostático das proteínas periplasmáticas ligadoras de fosfato de *Y. pestis* (PstS\_Ype), *E. coli* (Pst\_Eco), Pbp de Xac (Pbp\_XAc) e de *P. aeruginosa* (Pbp\_Pae). Os círculos evidenciam a posição do ligante.

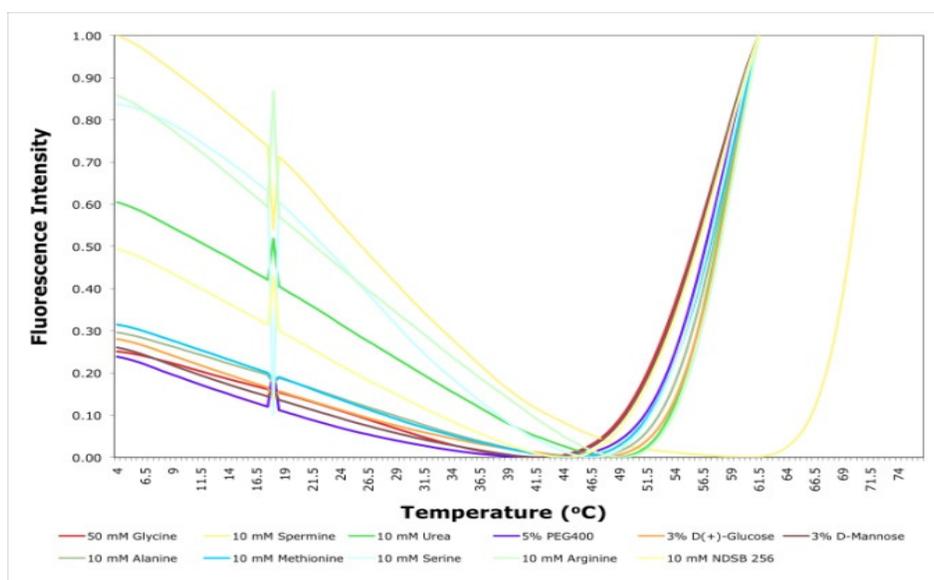
A medida da área acessível ao solvente (ASA) também mostra que o bolsão da proteína ligadora de fosfonatos é quase duas vezes maior que o bolsão das ligadoras de fosfato, mas não podemos deixar de mencionar que esta proteína está na sua forma aberta (Tabela 23). Contudo, uma vez que esta proteína pode interagir com diferentes ligantes, é realmente esperado que o seu sítio seja maior e susceptível à entrada de moléculas de água que possam estabilizar os grupos que não fosfato, dos fosfonatos.

**Tabela 23** Área de superfície dos sítios de ligação das proteínas periplasmáticas ligadoras de fosfato (PstS de *E.coli* e de *Ypestis*) e fosfonato (*P.aeruginosa*)

Proteína	Área do sítio de ligação (Å <sup>2</sup> )
Pst <i>E. coli</i>	761.221
PstS <i>Y. pestis</i>	699.357
Pbp <i>P. aeruginosa</i>	1.099.020

### 5.17. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular (CD) e Desnaturação Térmica da Proteína Pbp de *Xac*

A caracterização bioquímica da Pbp foi realizada inicialmente com experimentos de dicroísmo circular para determinar as melhores condições de armazenamento e tampões para otimizar os ensaios de cristalização. A fluorescência da proteína foi medida durante variação de temperatura após a incubação da mesma em diferentes condições. Os resultados mostraram que a presença de 20 mM de spermina aumenta a temperatura de desenovelamento da Pbp de 61°C para 66.5°C (Figura 61).



**Figura 61** Estabilidade da Pbp de *Xac* em diferentes condições. A proteína foi diluída em diferentes tampões e adicionada do fluoróforo Syber Orange para a medida da temperatura de desenovelamento monitorada em um aparelho de PCR. A curva apontada pela seta em preto refere-se ao aumento de estabilidade térmica na presença de 10 mM de spermina.

A Pbp foi expressa de forma solúvel e conforme os experimentos de dicroísmo circular, apresenta enovelamento característico das proteínas periplasmáticas e topologia  $\alpha/\beta$  de acordo com os picos negativos observados em 208 nm, 215 nm e 222 nm, e apresentou significativo ganho estrutural na presença da espermina (Figura 62A). O ganho estrutural e consequente aumento da estabilidade térmica também foi confirmado através monitoramento da elipsidade molar a 222 nm (Figura 62B). A Pbp é uma proteína termo-estável com recuperação quase que completamente do seu enovelamento e topologia característica, mesmo após ser submetida à temperatura de 110°C (Figura 62C). Contraditoriamente, embora a espermina tem um papel importante no aumento da termoestabilidade, fica evidente que a capacidade de re-enovelamento é prejudicada (Figura 62B). mas redução da sua capacidade de enovelamento (Figura 62D).

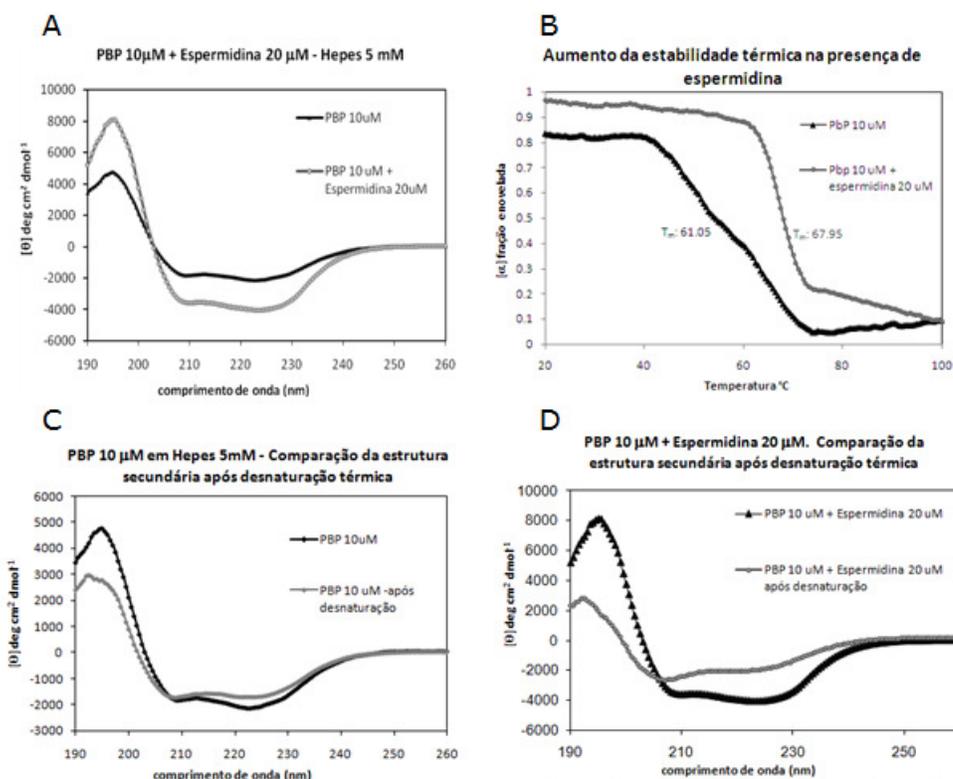


Figura 62 Espectro de Dicroísmo circular e desenvolvimento da proteína PbP de *Xac*. (A) CD da PbP na presença e ausência de espermina. (B) Desenovelamento térmico da PbP em presença e ausência de espermina. (C) e (D) Espectros de CD antes e depois do desenovelamento térmico na ausência e presença de espermina, respectivamente.

### 5.18. Ensaios de cristalização da Pbp de Xac

Após as análise preliminares de dicroísmo circular visando a determinação da melhor condição para estabilizar a proteína, foram iniciados os ensaios de cristalização da Pbp. A proteína purificada foi submetida ao método da gôta sentada utilizando a proporção de 1:1 de proteína:precipitante. A concentração inicial dos testes foi de 15 mg/mL em tampão Hepes 50 mM pH7.5, adicionados ou não de espermina. Diferentes condições foram testadas conforme apresentado na Figura 63. Os cristais da proteína Pbp cresceram em 50mM de Hepes pH 7.5 na presença de espermina. Os cristais foram testados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) mas não apresentaram difração, e neste caso, iniciamos os refinamentos das condições iniciais e busca de novas condições de cristalização.



Figura 63 Testes iniciais de cristalização da Pbp em diferentes condições. 15 mg/ml de proteína foram usados nos ensaios em tampão Hepes 50 mM em pH7.5 na presença ou ausência de 10 mM de espermina.

## 6. Conclusões

6.1. Neste trabalho, demos início à primeira caracterização de três proteínas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, pertencentes a dois diferentes sistemas de captação ainda não estudados nesta bactéria. Este passo inicial abre uma série de perspectivas para análises estruturais e caracterização do papel das mesmas para a bactéria em experimentos *in vivo*.

6.2. A caracterização mais completa foi realizada para SsuD, uma óxido-redutase do sistema de captação de alceno sulfonatos, a qual foi expressa na forma solúvel e purificada com êxito, e que quando submetida às análises funcionais, revelou habilidade para interagir e oxidar NAD(P)H;

6.3. Experimentos conjuntos de modelagem molecular, espalhamento de raios-X a baixo ângulo e ultra-centrifugação, foram usados para caracterizar a região e os resíduos de interação com NAD(P)H, bem como demonstrar a organização tetramérica funcional da proteína;

6.4. Sendo um sistema dois-componentes, e o estado da FMN reduzida extremamente instável, a caracterização completa da função da SsuD somente poderá ser realizada em experimentos com a presença da SsuE;

6.5 A proteína SsuD de *Xac* possui um estado octâmérico constituído de dois blocos tetraméricos.

6.6. A caracterização da SsuE foi prejudicada pela sua insolubilidade e instabilidade, de forma que os resultados apresentados foram focados nas análises de modelagem molecular. Embora estas análises sugiram que ela seja a mono-oxigenase do sistema estudado, sua função ainda não pode ser definida;

6.7. A Pbp de *Xac* foi a terceira proteína estudada neste trabalho e apresentou todas as características de um componente periplasmático cuja função seria a captação de fosfanatos. Experimentos voltados para a análise da estabilidade levaram à produção de cristais que embora não difrataram podem ser refinados, para a resolução da estrutura tridimensional.

## 7. Perspectivas

7.1. Otimizar os ensaios de cristalização para resolução das estruturas tridimensionais das proteínas SsuD e Pbp;

7.2. Trabalhar no desenvolvimento de um modelo estrutural do mecanismo de ação do sistema de dois-componentes;

7.3. Focar na produção da SsuE na forma solúvel para realizar os experimentos em reações com a SsuD, para a transformação de alcanosulfonatos em sulfito e aldeído;

7.4. Caracterização funcional do sistema de dois componentes de *Xac* completo;

7.3. Realizar ensaios de interação da Pbp com diferentes fosfanatos, através de experimentos de fluorescência, CD e ITC;

## 8. Referências bibliográficas

1. ABDRUCHIM, KHOLIS; ELLIS, HOLLY, R. Detection of protein-protein interactions in the alkanesulfonate monooxygenase system from *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology** v 188, n 23, p 8153-8159, 2006.
2. BALAN, A., ARAUJO, F.T., SANCHES, M. CHIRGADZE, D.Y. BLUNDELL, T.L., BARBOSA, J.A.R.G. Crystal structure of the alkanesulfonate binding protein (SsuA) from the phytopathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* bound to HEPES. PDB: 3E4R. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3E4R>.
3. BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microb. Rev.** v 24, p 449-467, 2000.
4. BRADEN, C., TOOZE, J. **Protein structure**. Ed: Garland science, 2 edição, 2000.
5. BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.Pbp., *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology** v 4, n.3, p 141-157, 2003.
6. CHEN, J., SHARMA, S., QUIOCHO, F.A., DAVIDSON, A.L. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. **PNAS**, v.98, n.4, 2001.
7. CORRÊA, D.Pbp.A; RAMOS, C.Pbp.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African journal of biochemistry research**, v 3, n 5, p 164 – 173, 2009
8. DAS, A.K. Citrus canker – A review. **J.appl. hort.** 5 (1) 52-60, 2003. DASSA, E. ABC transport. Em: Encyclopedia of microbiology. **New York: Academic Press**, v 1, 2000.
9. DASSA, E. ABC transport. In: **Encyclopedia of microbiology**. New York: Academic Press, v.1, p. 1-12, 2000.
10. DASSA, E., & BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res. Microbiol.** v.152, p.211-229, 2001.
11. DAVIDSON, A.L. Mechanism of Coupling of Transport to Hydrolysis in Bacterial ATP-Binding Cassette Transporters. **Journal of Bacteriology**, v 184, p1225–1233, 2002.
12. DAVIDSON, A.L., CHEN, J. ATP binding cassette transporters in bacteria. **Rev Biochem**, v 73, p 241-68, 2004.
13. DAVIDSON, A.L.; DASSA, E., ORELLE, C., CHEN, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and molecular biology**. v.72, n.2, p. 317-364, 2008.
14. DAVIDSON, A.L., MALONEY, P.C. ABC transporters: how small machines do a big job. **Trends in microbiology**. v.15, n.10, p. 448-455, 2007.
15. da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida Jr., N.F., Alves, L.M.C., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-

- Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreira, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite Jr., R.P., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira Jr., H.A., Rossi, A., Sena, J.A.D., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C.; Kitajima, J.P.. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-63, 2002.
16. EICHHORN E.; van der PLOEG; LEISINGER, T. Characterization os two-component Alkanesulfonate Monooxygenase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chemistry**, p 274:38, 1999.
  17. EICHHORN E.; van der PLOEG J. R., LEISINGER T. Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. **J. of Biol**, v 182, p 2687-2795, 2000.
  18. EICHHORN E.; van der PLOEG J. R. Sulfonate-sulfur metabolism and regulation I *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.**, v 176, p 1-8, 2001.
  19. EICHHORN E.; DAVEY, C.A.; SARGENT, D.F.; LEISINGER T.; RICHMOND, T.J. Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD. **J. Mol. Biol.**, v 324, p 457-468, 2002.
  20. ELKINS J. M., Ryle M.J., Clifton I.J., Hotopp J.C.D., Lloyd J.S., . Burzclaff N.I, Baldwin J.E., Hausinger R.P., Roach P.L. X-ray Crystal Structure of *Escherichia coli* Taurine/R-Ketoglutarate Dioxygenase Complexed to Ferrous Iron and Substrates. **Biochemistry** v 41, p 5185-5192, 2002.
  21. FERREIRA, M.G., SPIRA, B. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. **Microbiology**, v.154, p. 2025-2036, 2008.
  22. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, p.571-607, 2005.
  23. GAO, BELIAN; ELLIS, HOLLY,R. Mechanism of flavin reduction in the alkanesulfonate monooxygenase system. **Biochemica et Biophysic acta** , p 359-367, 2007.
  24. GAO, B. ELLIS, H.R. Altered mechanism of the alkanesulfonate FMN reductase with the monooxygenase enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.331, p.1137-1145, 2005.
  25. GRAHAM, J.H., GOTTWAKD, T.R., CUBERO, J., ACHOR, D.S., *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, v.5, n.1, p.1-15.
  26. GREENFIELD, N.J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocol**, 2006

27. HIRSHBERG, M., HENRICK, K., HAIRE, L.L., VASISHT, N., BRUNE, M., CORRIE, J.E.T. WEBB, M.R. Crystal structure of phosphate binding protein labeled with a Coumarin fluorophore, a probe for inorganic phosphate. **Biochemistry**, v.37, p.10381-10385, 1998.
28. HOLLENSTEIN, K., DAWSON, R.J.P., LOCHER, K.P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v 17, p 412-418, 2007.
29. HSIEH, YI-JU., WANNER, B.L. Global regulation by the seven-component P<sub>i</sub> signaling system. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.198-203, 2010.
30. HU, Pbp., RECH, S., GUNSALUS, R.P., REES, D.C. Crystal structure of molybdate binding protein ModA. **Nature structural biology**. v.4, n.9, p 703-703, 1997.
31. JONES, P.M., GEORGE, A.M. Mechanism of ABC transporter: a molecular dynamics simulation of well characterized nucleotide-binding subunit. 1999.
32. J.SHI, BLUNDELL T.L. MIZUGUCHI, K. Fugue: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. **J. Mol. Biol**, v.1, p.243-257, 2001.
33. KLAMT, A. Conductor-like screening model for real solvents: a new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena. **J. Phys. Chem.** v. 99, p. 2224-2235
34. KERTESZ, M.A. Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfates esters in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology**., v 24, p 135-175, 1999.
35. KIM H.-S., PARK H-J, HEU S., JUNG J.. Molecular and Functional Characterization of a Unique Sucrose Hydrolase from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 411–418, 2004.
36. KOS, V., FORD, R.C. The ATP-binding cassette family: a structural perspective. **Cell. Mol. Life Sci**, v.66, p.3111-3126, 2009.
37. KOS, V. FORD, R.C. The ATP-binding cassette family: a structural perspective. **Cell. Mol. Life Sci**. v 66, p 3111-3126, 2009.
38. LAEMMLI, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
39. LAMARCHE, M.G., WANNER, B.L., CRÉPIN, S., HAREL, JOSÉE. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiol Rev**, v.32, p.461-473, 2008.
40. LAWSON, D.M.; WILLIAMS, C.E.M.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N. Ligand size is a major determinant of specificity in periplasmic oxyanion-binding proteins: the 1.2 Å resolution crystal structures of *Azobacter vinelandii* ModA. **Structure**, n. 6, v. 12, p.1529-1539, 1998.
41. LEDVINA, P.S.; TSAI, A.L.; WANG, Z.; KOEHL, E.; QUIOCHO. F.A. **Protei sci**. v 7, p 2550–59, 1998.
42. LINTONS, K.J. Structure and function of ABC transporter. **Physiology** v 22, p 122-130, 2007, London.

43. LU, G., WESTBROOKS, J.M., DAVIDSON, A.L; CHEN, J. ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. **PNAS**, v.102, n.50, p.17969-17974, 2005.
44. MILLET, O., HUDSON, R.P., KAY, L.E. The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy. **PNAS**, v.100, n.22, p.12700-12705, 2003.
45. MOUTRAN, A.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.S.; GIORGETTI, A., TRAMONTANO, A., FERREIRA, R.C.C. Structural model and ligand interactions of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* oligopeptide-binding protein. **Genetic and Molecular Research**, v.6, n.4, p. 1169-1177, 2007.
46. MOUTRAN, A., QUAGGIO, R.B., BALAN, A., FERREIA, L.C.S., FERREIRA, R.C.C. The oligopeptide permease (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Current Microbiology**, v.48, p.354-359, 2004.
47. MORRIS G.M., GOODSELL D.S., HALLIDAY R.S., HUEY R., HART W.E., BELEW R.K. AND OLSON A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. **J.Comput. Chem.** v. 19, p.1639-1662, 1998.
48. NIKAIDO, K., AMES, G. FERRO-LUZZI. One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in na ABC transporter, the histidine permease. **The journal of biological chemistry**. v 274, n. 38, p 26727 – 26735, 1999.
49. OLDHAM, M.L.; DAVIDSON, A.L.; CHEN, J. Structural insights into ABC transporter mechanism. **Current opinion in structural biology**. V 18, p 726-733, 2008.
50. PARKER, G.F., HIGGINS, T.P., HAWKES, T., ROBSON R.L. *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti phn* Genes: Characterization and Identification of their proteins products. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.2, p.389-395, 1999.
51. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3a edição: Cold Spring Harbor Press, 2001.
52. SANTACRUZ, C.P., BALAN, A. FERREIRA, L.C., BARBOSA, J.A.R.G. Crystallization, data collection and phasing of molybdate-binding protein of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. **Structural Biology and Crystallization communications**, v.62, p.289-291, jan.2006
53. STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P. Canler, a treat to citrus in the Gulf-Coast States. **A. Phytopathological society**. p 581-585, 1983.
54. SEKOWSKA, A.; KUNG, Pbp-F.; DANCHIN, A. Sulfur Metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: Facts and fiction. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v 2, n 2, p 145-177, 2000
55. SCHUCK, P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. **Biophysical Journal**, v.78, p.1606-1619, 2000.
56. STEC E.; WITKOWSKA-ZIMNY M.; HRYNIEWICZ M.M.; NEUMANN P.; WILKINSON A.J.; BRZOZOWSKI A.M.; VERMA C.S.; ZAIM J.; WYSOCKI S.; BUJACZ G.D. Structural Basis of the Sulphate Starvation Response in E. coli: Crystal Structure and Mutational Analysis

- of the Cofactor-binding Domain of the Cbl Transcriptional Regulator. **J. Mol. Biol.**, v 364, p309–322, 2006.
57. STEWART J.J.P. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. **J.Comp.Aided Mol.Des.** v. 4, p.1-103.
58. SVERGUN, D.I. Determination of regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J. Appl. Crystallogr.** v.25, p.495-502, 1992.
59. SVERGUN, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys J.** p. 2879-2886, 1999.
60. TAM R.,JR. SAIER, M.Pbp.Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **American society for microbiology**, v57, n.2, p.320-346, 1993.
61. TUNG S.Y. & KUO T.T.. Requirement for Phosphoglucose Isomerase of *Xanthomonas campestris* in Pathogenesis of Citrus Canker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5564–5570, 1999.
62. VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. An approach to multi-copy search in molecular replacement. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v 56, p 1622-4, 2000.
63. VAN DER PLOEG, J.R.; EICHHORN.E.; LEISINGER, L. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.**, v 176, p 1-8,2001.
64. VOET, D., VOET, J.G. **Biochemistry**.Ed. Wiley, Edição: 2, 1995.
65. ZHAN, XUANZHI; RASSEL, CARPENTER A.; ELLIS, HOLLY, R. Catalytic importance of the substrate binding order for the FMNH<sub>2</sub>-Dependent alkanesulfonate monooxygenase enzyme. **Biochemistry**, v 47, p 2221-2230, 2008.
66. WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Dicroweb. **Biopolymers**, v89, p 392-400, 2008.
67. WHITMORE, L. AND WALLACE, B.A. **Nucleic Acids Research**, v 32, p 668-673, 2004.
68. WILKINSON AJ, VERSCHUEREN KHG. In **ABC Proteins: From Bacteria to Man**, ed. IB Holland, SPC Cole, K Kuchler, CF Higgins, p.187–207.London: Academic, 2003.