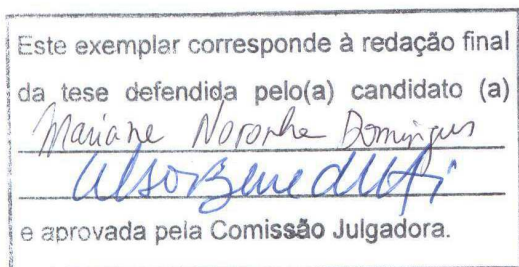


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIANE NORONHA DOMINGUES

**“Caracterização de proteínas de *Citrus sinensis* que interagem com a
proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico”**



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

Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benediti

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D713c

Domingues, Mariane Noronha

Caracterização de proteínas de *Citrus sinensis* que interagem com a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico / Mariane Noronha Domingues. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citros. 2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 3. Cancro cítrico. 4. Proteína PthA. 5. Relação planta-patógeno. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Characterization of *Citrus sinensis* proteins that interact with the PthA effector protein, inducer of citrus canker.

Palavras-chave em inglês: Citrus; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Citrus canker; PthA protein; Plant-pathogen relationships.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Celso Eduardo Benedetti, Mirian Perez Maluf, Ricardo Harakava, Márcio José da Silva, Jörg Kobarg.

Data da defesa: 24/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 24 de fevereiro de 2011

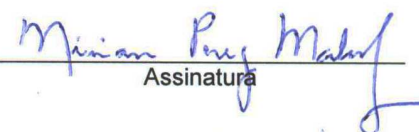
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti
(Orientador)



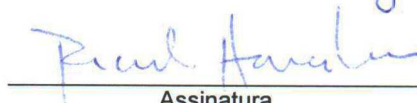
Assinatura

Profa. Dra. Mirian Perez Maluf



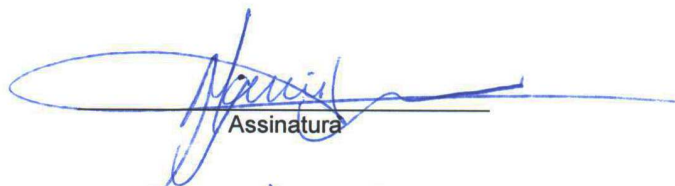
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Harakava



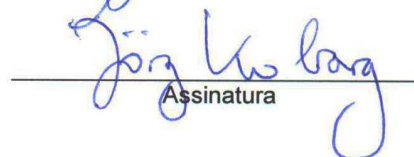
Assinatura

Prof. Dr. Márcio José da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg



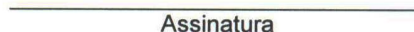
Assinatura

Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza



Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



Assinatura

Profa. Dra. Aline Maria da Silva



Assinatura

*“ Não basta saber, é preciso também aplicar;
não basta querer, é preciso também agir.”
(Goethe)*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Vera Lucia Ribeiro Noronha Domingues e José Antonio Noronha Domingues, que não mediram esforços na minha formação e à minha família, pelo carinho e apoio incondicional, suportando a distância e sempre me incentivando a buscar meus sonhos. A vocês, dedico esta tese.

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti, pela orientação sempre disponível, oportunidade, confiança e incentivo para a concretização deste trabalho.

Aos professores doutores Carlos Francisco Sampaio Bonafé, Gonçalo Guimarães Pereira e Márcio José da Silva, pelas valiosas sugestões oferecidas durante o exame de qualificação.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro (processo nº 06/60074-4), que permitiu o desenvolvimento deste estudo, bem como meu aprimoramento profissional.

Aos meus colegas de laboratório, Adriana Santos Soprano, Aline Lima de Oliveira, André Luiz Araújo Pereira, Bruna Medéia Campos, Maria Luiza Peixoto de Oliveira, Natália Troiani Perez, Rosicler Lázaro Barbosa, Raul Andrés Cernadas, Tatiana Brasil, Tiago Antonio de Souza e às técnicas Veruska Mazon Soares e Lílian Ellen Pino pela amizade, pelos conselhos e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Prof Dr. Shaker Chuck Farah e Dra. Cássia Docena pela realização do ensaio inicial de duplo-híbrido em leveduras.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Centro Nacional de Pesquisas em Ciências e Materiais (CNPEM), por toda a infra-estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Área de Bioquímica, da Universidade Estadual de Campinas e oficial administrativo da Secretaria de Pós-Graduação do mesmo programa, por toda a atenção dispensada durante o transcorrer deste doutorado.

A todas as minhas amigas, em especial, Anna Isabel Bautista, Ana Paula Rogieri, Fernanda Egydio, Francieli Ruiz, Marcela Freitas e Patrícia Oliveira por estarem presentes nos melhores momentos de minha vida, mesmo que distantes. Sei que sempre poderei contar com vocês.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, bem como na realização desta conquista.

E, principalmente a Deus, meu alicerce, meu sustento diário e pelas constantes graças alcançadas ao longo da minha vida.

Mariane Noronha Domingues

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Interação Planta-Patógeno e Mecanismos de Defesa em Plantas	1
1.2. O cancro cítrico e <i>Xanthomonas citri</i>	4
1.3. A Proteína Efetora PthA de <i>X. citri</i>	7
1.4. Proteínas de <i>Citrus sinensis</i> alvos de PthA	12
1.4.1. α -importina (α -imp)	12
1.4.2. Ciclofilina (Cyp)	13
1.4.3. TDX (<i>Tetratricopeptide domain-containing thioredoxin</i>)	18
1.4.4. <i>Ubiquitin Conjugating Enzyme</i> (Ubc13) e a forma variante Uev	21
1.5. Controle de reparo no DNA	24
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Ensaios de Duplo Híbrido em Leveduras	29
3.1.1. Transformação de leveduras competentes de <i>S. cerevisiae</i>	30
3.1.2. Teste de ativação dos genes repórteres <i>in vivo</i>	30
3.2. Clonagem, Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em <i>E. coli</i>	31
3.2.1. Domínios TPR e TRX de TDX	31
3.2.2. Ubc13 de <i>Citrus sinensis</i>	32
3.2.3. PthAs em pET28a	33
3.2.4. 6xHis-Cyp e 6xHis-Uev	33
3.2.5. Expressão e Purificação de Formas Truncadas de PthAs de <i>Xac</i>	34
3.3. Ensaios de GST Pull-Down	34
3.4. Ensaio de Atividade PPIásica de Ciclofilina	35
3.5. Expressão Transiente em <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
3.5.1. Clonagem das proteínas em vetor binário	37
3.5.2. Transformação em cepas competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.5.3. Agroinfiltração em <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.6. Experimentos de Fluorescência GFP e DsRed	38
3.7. Clonagem, Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em <i>S. cerevisiae</i>	39
3.7.1. Clonagens em vetor para expressão de proteínas em <i>S. cerevisiae</i>	39
3.7.2. Transformação das construções pYEX 4T-1 em leveduras	40
3.7.3. Expressão e Purificação	41
3.8. Ensaios de Complementação do Fenótipo de Cepas Mutantes	42
3.9. Localização de PthAs em Leveduras	43
3.10. Expressão Transiente Mediada por <i>Agrobacterium</i> em Citros	43
3.11. PthAs X Mecanismos de Reparo no DNA	44
3.12. Tentativas de Co-Imunoprecipitação de PthA em <i>C. sinensis</i>	44
3.13. Obtenção de Proteínas Recombinantes para Produção de Anticorpos	45
3.14. Tentativas de Co-Imunoprecipitação de PthA de <i>Xac</i> por proteínas de <i>C. sinensis</i>	46
3.15. Western Blot	46
3.16. Preparação de Amostras para SAXS (<i>Small Angle X-ray Scattering</i>)	47
3.16.1. Expressão e Purificação de PthA-RD2	47

3.16.2. DLS (<i>Dynamic Light Scattering</i>)	48
3.16.3. Coleta de dados de SAXS	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1. Interação Proteína-Proteína <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	50
4.2. Ensaio de Atividade PPIásica de Ciclofilina	63
4.3. HR em <i>Nicotiana benthamiana</i> mediada por PthAs	65
4.4. Localização de PthAs em células de <i>Nicotiana benthamiana</i>	66
4.5. Localização de Proteínas de Citros Fusionadas com DsRed	69
4.6. Complementação do Fenótipo de Cepas Mutantes com Ubc13 e Uev de Citros	70
4.7. Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em <i>S. cerevisiae</i>	71
4.8. Ubiquitinação em <i>C. sinensis</i>	74
4.9. PthAs X Mecanismos de Reparo no DNA	75
4.10. Localização de PthAs em Leveduras	76
4.11. Co-Imunoprecipitação de PthA em <i>C. sinensis</i>	78
4.12. Obtenção de Proteínas Recombinantes para Produção de Anticorpos	80
4.13. Complementação do Fenótipo de Cepas Mutantes com Cyp de Citros	83
4.14. Co-Imunoprecipitação de PthA de <i>Xac</i> por Cyp de <i>C. sinensis</i>	86
4.15. Preparação de Amostras para SAXS	88
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
7. ANEXO I – Artigo publicado como primeira autoria	102
8. ANEXO II – Artigo publicado em colaboração	119

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Esquema ilustrando o exemplo de dois tipos de interação planta-patógeno adaptado de Büttner & Bonas, 2002.....	2
Figura 2: A percepção da infecção por patógenos.....	3
Figura 3: Sintomas do cancro cítrico em folhas, frutos e ramos.....	6
Figura 4: Representação esquemática da variante 4 de PthA da cepa 306 de <i>X. citri</i>	8
Figura 5: Esquema do mecanismo de ação proposto para efetores tipo III.....	10
Figura 6: Representação esquemática dos domínios conservados presentes na sequência da proteína α -importina de citros.....	12
Figura 7: Esquema representando o papel desempenhado por PPlases.....	13
Figura 8: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Cyp de <i>Citrus sinensis</i> com CypA humana (<i>Hs_CypA</i>).....	14
Figura 9: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Cyp de <i>C. sinensis</i> com a proteína AtROC1.....	16
Figura 10: Seqüência de aminoácidos da proteína PthA4 de <i>Xanthomonas citri</i>	16
Figura 11: Comparação da seqüência de aminoácidos de Cyp de <i>C. sinensis</i> com uma análise genômica para a conservação de seqüência da CypA.....	17
Figura 12: Comparação da estrutura geral da Hip humana (<i>Hs Hip</i>) com proteínas Hip de planta.....	18
Figura 13: Representação esquemática mostrando os domínios TPR e TRX da TDX de <i>C. sinensis</i>	19
Figura 14: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da TDX de <i>C. sinensis</i> com as proteínas Hip-2 de <i>A. thaliana</i> e Hip de <i>Vitis labrusca</i>	20
Figura 15: Alinhamentos de seqüências de aminoácidos dos motivos TPR e TRX da TDX de <i>C. sinensis</i>	20
Figura 16: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Uev de <i>C. sinensis</i> com as proteínas AtUev1C e AtUev1D.....	23
Figura 17: Mecanismo de ação proposto para a proteína Ess1 na transcrição.....	26
Figura 18: Representação esquemática das quatro variantes de PthAs da cepa 306 de <i>Xanthomonas citri</i>	51
Figura 19: Representação esquemática das construções das quatro variantes de PthAs de <i>Xac</i> utilizadas nos ensaios <i>in vivo</i> de duplo-híbrido em leveduras.....	51

Figura 20: Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das 4 variantes de PthA com as proteínas α -imp, Cyp, TDX, Uev e os domínios TPR e TRX da TDX como presas.....	53
Figura 21: Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das variantes 1 e 4 de PthA com as proteínas α -imp, TDX, Cyp, Uev e os domínios TPR e TRX da TDX como presas.....	54
Figura 22: Géis de poliacrilamida 10% e Western blots, com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST, representando as interações de PthA2 e PthA4.....	55
Figura 23: Ensaios de duplo-híbrido mostrando a interação entre TDX, Cyp e Uev.....	56
Figura 24: Representação esquemática da proteína Ubc13 de <i>C. sinensis</i> e Alinhamento de seqüências de aminoácidos com as proteínas HsUbc13 e ScUbc13.....	57
Figura 25: Ensaios de duplo-híbrido e GST pull-down da proteína Ubc13 de citros com as presas Uev, Cyp, TDX e com as 4 variantes de PthA.....	58
Figura 26: Truncagens de PthAs utilizados nos ensaios <i>in vivo</i> de duplo-híbrido em leveduras e nos ensaios <i>in vitro</i> de GST pull-down.....	57
Figura 27: Ensaios de duplo-híbrido das interações de 6xHis-PthA-RD2, 6xHis-PthA 5.5rep + CT, 6xHis-PhA-LRR e ensaios de pull-down do mapeamento da região de interação de PthA com as proteínas de citros α -imp, TDX, Cyp, TPR, TRX, Uev e Ubc13.....	60
Figura 28: Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das variantes de PthAs entre si para verificar a formação de homo e heterodímeros.....	62
Figura 29: Purificação por afinidade em resina de GST de GST-Cyp e do controle GST e Gráfico representando o ensaio de atividade enzimática PPIase pareado com α -quimiotripsina GST-Cyp de citros.....	63
Figura 30: Gráficos representando ensaios de atividade enzimática PPIase pareado com α -quimiotripsina para Cyp de citros na presença do inibidor CsA e da proteína PthA2 de <i>Xac</i>	64
Figura 31: Western blots com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST representando ensaios <i>in vitro</i> de pull-down da isca GST-Cyp na presença de 6xHis-PthA2 e CsA.....	65
Figura 32: HR em folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> PthAs e controle GUS em pBI121.....	66
Figura 33: Fluorescência em <i>Nicotiana benthamiana</i> representando a localização das variantes de PthA no núcleo.....	68
Figura 34: Fluorescência em <i>Nicotiana benthamiana</i> representando a localização das proteínas Cyp e Uev no núcleo de células epidérmicas.....	69
Figura 35: Proteínas de <i>C. sinensis</i> Ubc13 e Uev complementam funcionalmente mutantes de levedura Δ ubc13 e Δ mms2/uev1a, respectivamente.....	70

Figura 36: Expressão e indução por CuSO ₄ em sistema de levedura nas cepas SUB62 e mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ de proteínas clonadas em pYEX 4T-1.....	71
Figura 37: Blots referentes a Expressão e Indução por CuSO ₄ em sistema de levedura nas cepas SUB62 e mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ de proteínas clonadas em pYEX 4T-1.....	72
Figura 38: Tentativas de Purificação em sistema de levedura na cepa SUB62 de proteínas PthAs clonadas em pYEX 4T-1.....	72
Figura 39: Blots referentes a Purificação em sistema de levedura das proteínas PthA2 e PthA4 clonadas em pYEX 4T-1 na cepa selvagem SUB62 (WT) e nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$	73
Figura 40: Gel de poliacrilamida 8% representando a Extração de proteínas de epicótilos de <i>Citrus</i> `Hamlin` transformados com pBI121-PthA2, pBI121-PthA4 ou controle pBI121-GUS.....	74
Figura 41: Blots referentes à Expressão Transiente de PthA2, PthA4 e controle GUS via transformação por <i>Agrobacterium</i> em epicótilos de <i>Citrus</i> `Hamlin`.....	75
Figura 42: Cepa selvagem de levedura SUB62 e SUB62 expressando separadamente PthAs 2 e 4, crescidas em um gradiente de MMS.....	76
Figura 43: Imagens de Microscopia de Fluorescência representando PthA2-GFP e PthA4-GFP expressos nas cepas de levedura SUB62 e nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$	77
Figura 44: Géis de poliacrilamida 10% representando a Extração de proteínas de folhas de <i>Citrus</i> `Hamlin`.....	78
Figura 45: Géis de poliacrilamida 10% representando os Ensaio de Co-Imunoprecipitação em folhas de laranja doce infiltradas com suspensão de <i>Xac</i>	79
Figura 46: Ensaio de Co-Imunoprecipitação em folhas de laranja doce infiltradas com suspensão de <i>Xac</i>	79
Figura 47: Géis de poliacrilamida 13% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de níquel da proteína Cyp com cauda de Histidina.....	80
Figura 48: Géis de poliacrilamida 13% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de níquel da proteína Uev com cauda de Histidina.....	81
Figura 49: Géis de poliacrilamida 10% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de GST da proteína Ubc13 em pGEX4T-1.....	82
Figura 50: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Cyp de <i>C.sinensis</i> com a proteína ScCPR1.....	83
Figura 51: Ensaio de complementação da cepa mutante de levedura 33513 ($\Delta cpr1/\Delta cpr1$) com a proteína Cyp de <i>C. sinensis</i>	84

Figura 52: Ensaios de complementação da cepa mutante de levedura H164R ($\Delta ess1$) com a proteína Cyp de <i>C. sinensis</i>	85
Figura 53: Blots marcados com os anticorpos Anti-Cyp, Anti-Uev e Anti-Ubc13 para verificar se os anticorpos produzidos reconhecem as correspondentes proteínas endógenas em leveduras e em citros.....	86
Figura 54: Lisados celulares de epicótilos de citros expressando transientemente PthA2 imumoprecipitados com Anti-Cyp.....	87
Figura 55: Géis de poliacrilamida 10% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de níquel da proteína PthA-RD2 em pET28a.....	88
Figura 56: Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE representando as amostras utilizadas na coleta de dados de SAXS e gráfico do DLS para a amostra que resultou no melhor conjunto de dados para coleta de SAXS.....	89

LISTA DE ABREVIACÕES

α -imp – α -importina

ε – coeficiente de absorvidade molar

AD – domínio ácido de ativação transcricional

Ade – adenina

Amp^R – resistência ao antibiótico ampicilina

ARM – repetições do tipo armadillo/beta-catenina

avr – genes de avirulência do patógeno

bHLH – fator básico *helix-loop-helix*

BSA – albumina de soro bovino

CHIP – proteína contendo a região C-terminal de Hip

CLD – domínio *Cyclophilin-like*

5.5rep + CT2 – truncagem das últimas 5,5 repetições do domínio central mais a região C-terminal de PthA2

CIAP – *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*

CTD – C-terminal da subunidade maior da RNA polimerase II

CT2 – região C-terminal de PthA2

CsA – ciclosporina A

Cyp – ciclofilina

CypA – ciclofilina A

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

DsRed – proteína fluorescente vermelha isolada de *Discosoma sp.*

DTT – ditioneitol

E1 – enzima de ativação de ubiquitina

E2 – enzima de conjugação a ubiquitina, também conhecida como Ubc

E3 – ubiquitina ligase

E4 – enzima de elongação de cadeias de poliubiquitinas

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ETI – imunidade desencadeada por efetores do tipo III

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

GFP – proteína fluorescente verde

GST – glutathione-S-transferase

GUS – gene da beta-glucoronidase

Hip – *Hsp70-interacting protein*

His – histidina

HR – resposta de hipersensibilidade

hrp – *hypersensitive response and pathogenicity genes*

IBB – domínio auto-inibitório

IPTG – isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

I(q) – função da intensidade de espalhamento

Kana – kanamicina

kDa – kiloDalton

K63 – processo de ubiquitinação em que os resíduos de ubiquitina são unidos através do resíduo 63 de lisina

Leu – leucina

LRR – repetições ricas em leucina

MAMPs – *Microbial Pathogen-Associated Molecular Patterns*

mAU – unidade logarítmica usada para medir a densidade óptica

MMS – *methyl methanesulfonate*

NB-LRR – proteínas contendo domínios de ligação a nucleotídeo e repetições ricas em leucina

NBS – sítio de ligação a nucleotídeo

NLSs – sinais de localização nuclear

OD – densidade óptica

ORF – *Open reading frame*

PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

pb – par de base

PBS – tampão salino de fosfato

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR – reação em cadeia da DNA polimerase

pI – ponto isoelétrico

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride*

pOAD – vetor do duplo-híbrido que contém domínio de ativação de GAL4

pOBD – vetor do duplo-híbrido que contém domínio de ligação de GAL4

pol II – RNA polimerase II

poli-Ub – cadeias de poli-ubiquitina

PPIase – peptidil-prolil-*cis-trans*-isomerase

PPR – domínio de repetições de pentatricopeptídeos

PRRs – *Pathogen Recognition Receptors*

PTI – imunidade desencadeada por PAMPs

PVDF – difluoreto de polivinila

R – genes específicos de resistência da planta

RD1 – domínio central de PthA1 com 16,5 repetições de 34 aminoácidos

RD2 – domínio central de PthA2 com 15,5 repetições de 34 aminoácidos

RD3 – domínio central de PthA1 com 15,5 repetições de 34 aminoácidos

RD4 – domínio central de PthA2 com 17,5 repetições de 34 aminoácidos

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS – espécies reativas de oxigênio

rpm – rotações por minuto

SAXS – Espalhamento de raios X a baixos ângulos

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de duodecil-sulfato de sódio

Suc-AAPF-pNA – *N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide*

TAL – *Transcription Activator-like*

TBS-T – tampão salino Tris contendo Tween 20

TDX – proteína com 2 domínios – tetratricopetídeo e tiorredoxina

TPR – domínio de repetições de tetratricopeptídeos

3-AT – 3-amino-1,2,4-triazol

T3S – sistema de secreção de proteínas do tipo III

Trp – triptofano

TRX – domínio tiorredoxina

UPA – genes up-regulados por AvrBs3

Ub – ubiquitina

Ubc13 – enzima de conjugação a ubiquitina

Uev – enzima de conjugação a ubiquitina variante

Ura – uracila

Xaa – *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*

Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

X-Gal – *bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside*

RESUMO

O cancro cítrico, causado pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), constitui uma doença que afeta a maioria das espécies do gênero *Citrus* ocorrendo praticamente em todos os continentes e se destaca como uma ameaça à citricultura brasileira. A bactéria utiliza a proteína efetora do tipo III PthA para modular a transcrição na planta hospedeira e promover o desenvolvimento dos sintomas da doença. PthA pertence a família AvrBs3/PthA e contém um domínio central de repetições de 34 aminoácidos que media interações proteína-proteína e proteína-DNA. Elucidar como a PthA ativa a transcrição é de grande importância para o esclarecimento do seu modo de ação e da patogenicidade de *Xac*. Este trabalho teve como principal objetivo confirmar *in vivo* e *in vitro* interações entre PthA de *Xac* e proteínas de laranja doce selecionadas num *screening* de duplo-híbrido em leveduras. Além da interação com a proteína α -importina, conhecida por mediar a importação nuclear de AvrBs3, são descritas neste trabalho interações de PthA com proteínas de citros envolvidas no enovelamento e ubiquitinação do tipo K63. PthAs 2 e 3 interagem preferencialmente com uma ciclofilina (Cyp) de citros e com TDX, uma proteína que contém um domínio tetratricopeptídeo (TPR) e um domínio tiorredoxina (TRX). Constatou-se que PthAs 2 e 3, e não 1 e 4, interagem com um complexo de conjugação a ubiquitina formado por Ubc13 e uma enzima de conjugação a ubiquitina variante (Uev) requerido para o processo de ubiquitinação K63 e no reparo de DNA lesionado. Cyp, TDX e Uev interagem entre si e as proteínas Cyp e Uev estão localizadas no núcleo de células de planta, assim como as variantes de PthA de *Xac*. Além disso, Ubc13 e Uev complementam o fenótipo de reparo no DNA de cepas de leveduras mutantes, indicando que estão envolvidas em processos de ubiquitinação K63 e reparo no DNA. Como PthA2 afetou o crescimento de cepas de levedura na presença de um agente alquilante do DNA, sugere-se que PthA2 inibe ubiquitinação K63 requerida em vias de reparo aos danos no DNA, e não é alvo deste processo como acreditava-se inicialmente. A proteína Cyp de citros também foi capaz de complementar o fenótipo de leveduras mutantes na maquinaria transcrricional, de tal forma que PthAs poderiam aumentar as taxas de transcrição através da modulação da atividade de um complexo proteico associado com controle da transcrição.

ABSTRACT

Citrus canker, caused by the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), is a disease that affect most species of the genus *Citrus* occurring in virtually every continent, and stands as a threat to the Brazilian citrus industry. The bacterium uses a type III effector protein PthA to modulate transcription in the host plant and promote the development of disease symptoms. PthA proteins belong to the AvrBs3/PthA family and carry a domain comprising tandem repeats of 34 amino acids that mediates protein-protein and protein-DNA interactions. Elucidate how PthA activates transcription is of great importance for the elucidation of its mode of action and pathogenicity of *Xac*. This study aimed to confirm *in vivo* and *in vitro* interactions between *Xac* protein PthA and sweet orange proteins in a yeast two-hybrid screening. Here, in addition to the interaction with the α -importin protein, known to mediate the nuclear import of AvrBs3, we described new interactions of PthAs with citrus proteins involved in folding and K63-linked ubiquitination. PthAs 2 and 3 preferentially interact with a citrus cyclophilin (Cyp) and with TDX, a tetratricopeptide domain-containing thioredoxin. It was found that PthAs 2 and 3, but not 1 and 4, interact with the ubiquitin-conjugating enzyme complex formed by Ubc13 and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev), required for K63-linked ubiquitination and DNA repair. We show that Cyp, TDX and Uev interact with each other, and that Cyp and Uev localize to the nucleus of plant cells. Furthermore, the citrus Ubc13 and Uev proteins complement the DNA repair phenotype of the yeast mutants, strongly indicating that they are also involved in K63-linked ubiquitination and DNA repair. How PthA2 affected the growth of yeast cells in the presence of a DNA damage agent, suggests that PthA2 inhibits K63-linked ubiquitination required for DNA repair, and is not the target of this process as it was believed initially. The citrus protein Cyp was also able to complement the phenotype of yeast mutants in the transcriptional machinery, such that PthAs could increase the rates of transcription by modulating the activity of a protein complex associated with control of transcription.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interação Planta-Patógeno e Mecanismos de Defesa em Plantas

As interações planta-patógeno podem ser de dois tipos: compatíveis e incompatíveis (**Figura 1**). A interação entre os genes de avirulência do patógeno (*avr*) e os genes específicos de resistência da planta (*R*), como num modelo receptor-ligante, pode ativar uma resposta de hipersensibilidade (HR), caracterizada por rápida morte celular no local da infecção a fim de conter o avanço do patógeno (Lam et al., 2001; Büttner & Bonas, 2006), sendo esta interação patógeno-planta caracterizada como incompatível. Por outro lado, se qualquer um dos genes *avr* ou *R* estiver ausente ou inativo a doença se instala, caracterizando uma interação patógeno-planta compatível (Marois et al., 2002).

No caso das interações compatíveis, a bactéria patogênica deve ser capaz de se aderir na superfície da planta, invadir o espaço intercelular do tecido hospedeiro, adquirir nutrientes e neutralizar as respostas de defesa da planta. O sucesso da infecção de plantas hospedeiras geralmente depende de sistemas de secreção na bactéria, que secretam proteínas no meio extracelular ou transportam proteínas e/ou DNA diretamente dentro do citosol da célula hospedeira, processo este referido como translocação. Proteínas que são translocadas para dentro da célula hospedeira são designadas de proteínas efetoras (Büttner & Bonas, 2010). *Xanthomonas* spp. possuem pelo menos seis tipos de sistemas de secreção de proteínas, tipos I a VI, os quais diferem significativamente em sua composição e função e no reconhecimento dos substratos secretados (Gerlach & Hensel, 2007; Boch & Bonas, 2010).

Um dos fatores chave de patogenicidade da maioria das bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas e animais é o sistema de secreção do tipo III (T3S) (Ghosh, 2004), codificado por genes também conhecidos como *hrp* (*h*ypersensitive *r*esponse and *p*athogenicity) (Lahaye & Bonas, 2001; Marois et al., 2002; Alfano & Collmer, 2004; Boch & Bonas, 2010). Os genes *hrp* são assim designados por serem essenciais para a patogenicidade ou indução das reações de defesa, que geralmente incluem HR, em plantas susceptíveis e resistentes, respectivamente (He et al., 2004). A imunidade desencadeada pelo efector é freqüentemente associada com HR, e proteínas efetoras que elicitam HR em plantas resistentes são designadas como proteínas *Avr* (Jones & Dangl, 2006), apesar de atuarem como fatores de virulência para benefício do patógeno em plantas susceptíveis (Mudgett, 2005; Grant et al., 2006).

Dentro da célula hospedeira, as proteínas efetoras modulam as atividades celulares alterando a expressão de genes ou suprimindo as respostas de defesa basal da planta para o benefício do patógeno (Gürlebeck et al., 2006; Büttner & Bonas, 2010). A importância do sistema T3S na interação patógeno-planta se deve ao fato de que defeitos neste sistema freqüentemente causam

perda completa da patogenicidade bacteriana (He et al., 2004). Muitos patógenos usam diferentes sistemas de secreção de proteínas em combinação para assegurar uma eficiente multiplicação bacteriana e progressão da doença (Preston et al., 2005; Büttner & Bonas, 2010).

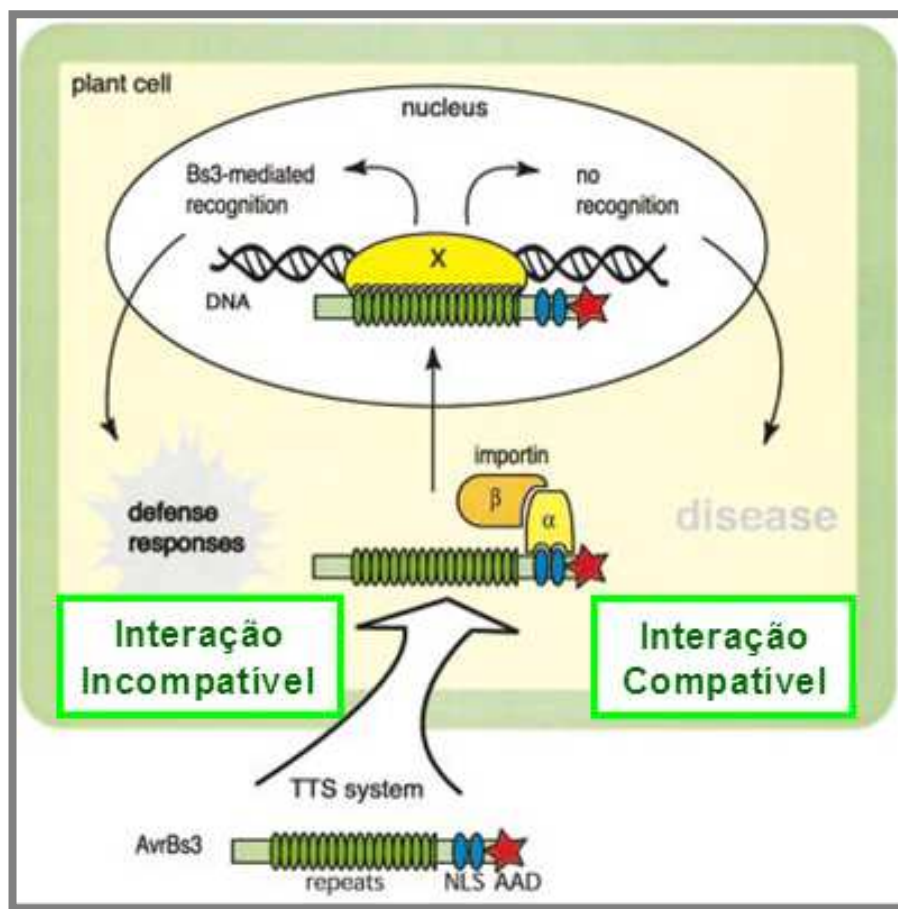


Figura 1: Esquema ilustrando o exemplo de dois tipos de interação planta-patógeno adaptado de Büttner & Bonas, 2002. Modelo proposto para o mecanismo molecular das atividades de avirulência e virulência da proteína efectora AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. A esquerda pode-se visualizar um tipo de interação incompatível, visto que há reconhecimento de genes de avirulência do patógeno (*avr*) e genes específicos de resistência da planta (*R*), ocorrendo assim uma ativação da resposta de defesa da planta com o intuito de conter o avanço do patógeno. A direita nota-se que não há esse reconhecimento entre *avr* e *R* e a doença então se instala, caracterizando uma interação compatível de uma planta susceptível a esta doença.

Existem dois ramos no sistema imune de plantas, sendo que um deles utiliza receptores de reconhecimento transmembrana (PRRs), os quais respondem lentamente, evoluindo para MAMPs ou PAMPs (*Microbial- ou Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (**Figura 2**). Este segundo ramo conhecido como PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) atua largamente dentro da célula da planta, usando

proteínas polimórficas do tipo NB-LRR (contendo domínios de ligação a nucleotídeo e repetições ricas em leucina), codificadas por genes *R* (Jones & Dangl, 2006). Patógenos adaptados podem com sucesso suprimir a imunidade desencadeada por PAMPs, com o auxílio de moléculas efetoras, causando a doença no hospedeiro. Entretanto, certos cultivares de plantas reconhecem a ação de efetores de cepas de patógenos específicos e geram uma resposta de defesa potenciada, conhecida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*), que resulta em rápida morte celular para prevenir o avanço do patógeno (Göhre & Robatzek, 2008).

Evidências experimentais sugerem que efetores individuais neutralizam a resposta imune inata de plantas que é desencadeada após o reconhecimento de PAMPs, tais como flagelina, produtos de degradação de parede celular ou lipopolissacarídeos. A supressão exercida por efetores do tipo III sobre a imunidade desencadeada por PAMPs poderia ser o principal requerimento para o sucesso do estabelecimento e multiplicação da bactéria no tecido da planta (Büttner & Bonas, 2010).

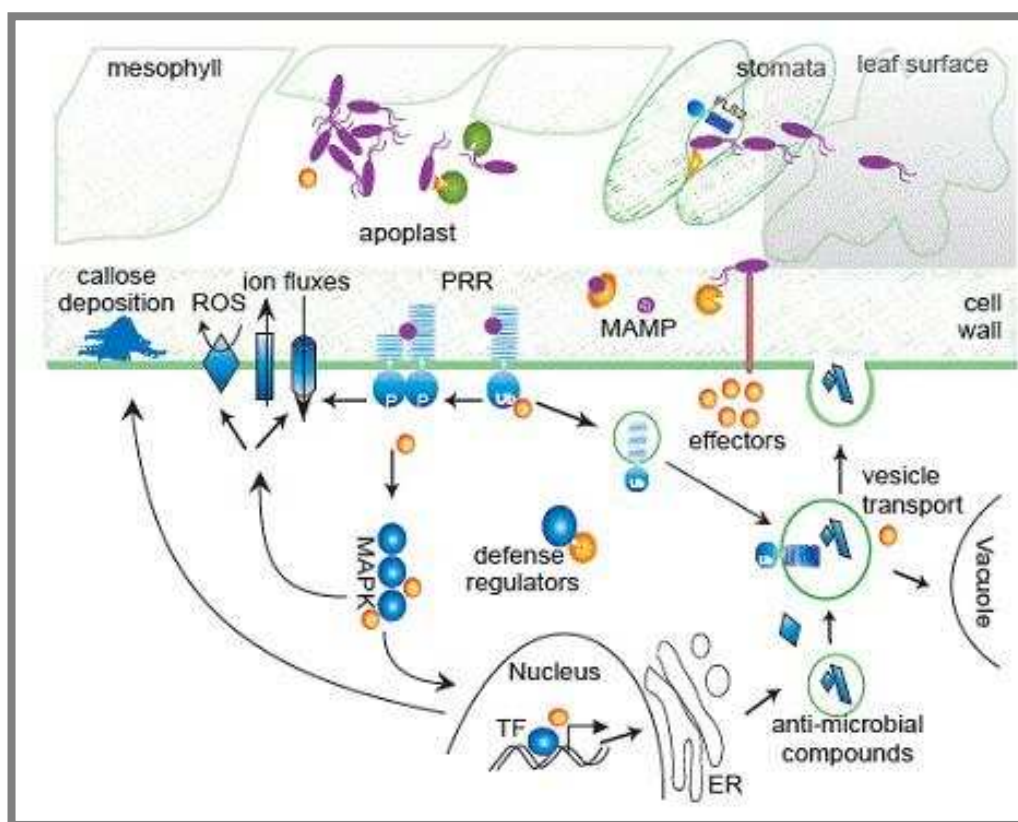


Figura 2: A percepção da infecção por patógenos induz uma resposta ativa de defesa na planta conhecida como imunidade desencadeada por PAMPs (PTI), que envolve respostas fisiológicas, morfológicas e genéticas como fluxo de íons, produção de ROS, fechamento de estômatos e expressão de genes de defesa. Adaptado de Göhre & Robatzek, 2008.

1.2. O cancro cítrico e *Xanthomonas citri*

A citricultura no Brasil é uma das mais importantes atividades agroindustriais, movimenta bilhões de reais por ano e gera uma grande quantidade de empregos diretos e indiretos, sendo o país considerado líder mundial na produção de citros (Neves et al., 2006). O estado de São Paulo é a região produtora mais expressiva, possuindo 212 milhões de árvores de laranja doce que produzem 13,4 bilhões de toneladas para a indústria de suco, representando 63% da produção mundial de suco de laranja (Bové & Ayres, 2007). Contudo, várias doenças ameaçam a produção de citros, como é o caso do *greening* e do cancro cítrico.

O cancro cítrico é uma importante e séria ameaça à citricultura, por ser uma doença de fácil disseminação, não haver cura e não existirem variedades comerciais de citros resistentes à bactéria causadora. No Estado de São Paulo, atual detentor da maior produção de citros no país, a doença tem sido controlada principalmente através de um programa de erradicação das plantas contaminadas (Barbosa-Mendes et al., 2009). Estima-se que mais de 30 milhões de reais sejam gastos anualmente com o controle e erradicação de pomares infectados.

Porém, uma recente alteração na legislação Estadual, torna o cancro cítrico novamente uma ameaça para os citricultores paulistas. Esta preocupação com o retorno do cancro cítrico no Estado de São Paulo se dá sobretudo em função da nova resolução Estadual de julho de 2009, que isenta o citricultor da necessidade de erradicar o talhão caso a contaminação ultrapasse o limiar de 0,5% de plantas infectadas. Segundo especialistas e dados apresentados na 32ª Semana da Citricultura, realizada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis - junho de 2010, o número de plantas com sintomas do cancro em propriedades paulistas já supera em duas vezes a média dos últimos oito anos, um forte indício de que o relaxamento nas inspeções e no programa de erradicação terá um efeito extremamente negativo no combate à doença. Essa nova medida pode até mesmo levar os agricultores a abandonarem a produção de citros em favor de outras práticas agrícolas.

Nenhuma variedade ou espécie de uso comercial para produção de cítricos é completamente resistente a doença, mas há uma variação quanto à susceptibilidade ao cancro cítrico (em ordem crescente de susceptibilidade: Poncan, Mexerica do rio, Lima ácida Tahiti, Laranja 'Pêra', Laranja 'Valência', Laranja 'Natal', Tangor 'Murcote', Limão 'Cravo', Laranja 'Hamlin', Laranja 'Baianinha', Limão 'Siciliano', Limão 'Galego' e Pomelo) (Fundecitrus, 2008).

Atualmente são aceitas três formas de cancro cítrico causadas por patovares variantes da bactéria *Xanthomonas axonopodis* (Das, 2003). A diferenciação dessas formas é baseada principalmente na distribuição geográfica e na gama de hospedeiros que o patógeno pode infectar. O cancro cítrico é causado por dois grupos de linhagens de bactérias fitopatogênicas Gram-negativas do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (grupo Asiático) e *Xanthomonas axonopodis* pv.

aurantifolii (grupo da América do Sul). Os dois grupos causam sintomas idênticos, sugerindo um mecanismo comum de patogenicidade, porém atingem hospedeiros diferentes (Brunings & Gabriel, 2003).

A cancrose A causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é a mais relevante do ponto de vista sócio-econômico, pois é a forma mais agressiva, de ampla ocorrência e que afeta praticamente todas as variedades de citros comerciais (Brunings & Gabriel, 2003; Schubert & Sun, 2003; Barbosa-Mendes et al., 2009). Os tipos B e C são causados pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa*) que infecta preferencialmente o limão verdadeiro (*Citrus limon*) na cancrose B e somente o limão Galego (*Citrus aurantifolia*) na cancrose C. Há ainda a cancrose E, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (Graham & Gottwald, 1991) e uma variante atípica da cancrose A denominada “star” (Gottwald et al., 2002).

O cancro cítrico é caracterizado pela formação de lesões circulares (*water soaked*) e hiperplasia (divisões mitóticas excessivas), um sintoma diagnóstico essencial da doença; em níveis elevados causa desfolhação e caimento prematuro dos frutos (Gottwald et al., 2002) (**Figura 3A**). Os sintomas do cancro em folhas e frutos podem ser obtidos por inoculações artificiais (Das, 2003).

Xac penetra no hospedeiro através dos estômatos ou pequenos ferimentos na epiderme das folhas, frutos e ramos, de forma que a disseminação local também ocorre através de podas com ferramentas contaminadas e pode ser facilitada por insetos herbívoros, como é o caso da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), a qual gera galerias nas folhas (Belasque Jr. et al., 2001). A bactéria cresce abundantemente no espaço intercelular; grandes pústulas são formadas nas folhas, caules e frutos; o patógeno induz a hipertrofia (aumento no tamanho celular) e hiperplasia (divisão celular aumentada) (Swarup et al., 1991; Duan et al., 1999; Brunings & Gabriel, 2003). Após proliferação, a epiderme é rompida e a bactéria é liberada para a superfície da planta, podendo iniciar um novo ciclo de infecção (**Figura 3B**).

O gênero *Xanthomonas* consiste em um importante grupo de bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas que pertencem a subdivisão *Gamma* de *Proteobacteria*. As espécies de *Xanthomonas* possuem tipicamente formato de bastão com um único flagelo polar, são obrigatoriamente aeróbicas e crescem numa temperatura ótima de 25 a 30°C. As colônias bacterianas possuem normalmente coloração amarelada devido a presença de um pigmento ligado a membrana conhecido como xantomonadina, que poderia proteger a bactéria de danos fotobiológicos (Rajagopal et al., 1997; Büttner & Bonas, 2010). A bactéria permanece como uma epífita na superfície da planta antes de penetrar via aberturas naturais tais como hidatódios, estômatos ou ferimentos (Büttner & Bonas, 2010).

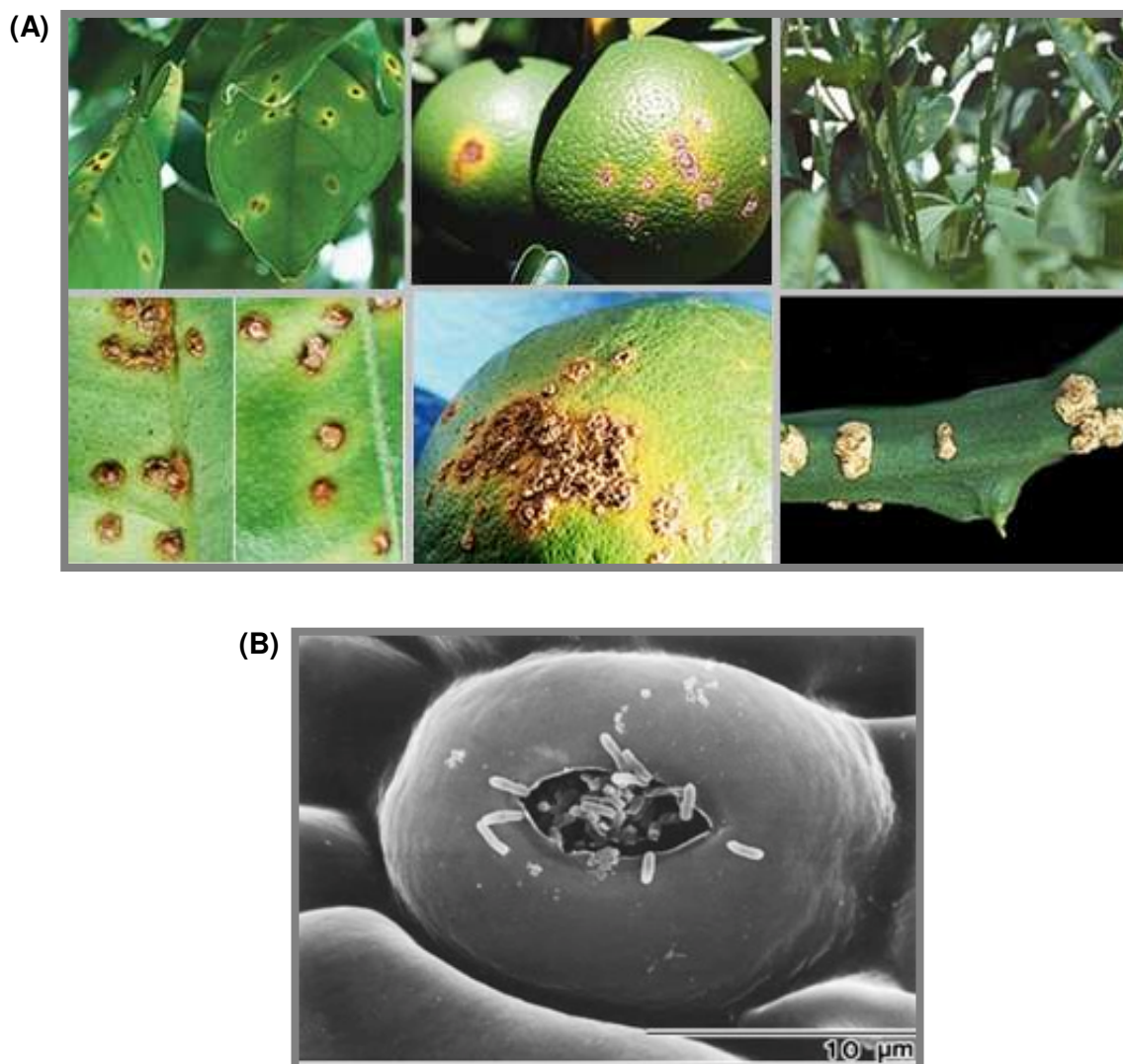


Figura 3: (A) Sintomas do cancro cítrico em folhas, frutos e ramos. Fonte: Fundecitrus; (B) Microscopia eletrônica mostrando bactérias *Xac* sendo liberadas através de uma abertura estomatal na superfície da planta. Extraído de Graham et al., 2004.

Estudos têm mostrado que a infecção por *Xac* altera a transcrição de um grande número de genes hospedeiros associados com expansão e divisão celular, incluindo genes envolvidos na biogênese de ribossomos, remodelamento de parede celular, transporte de vesículas, síntese e mobilização de auxinas e giberelinas (Cernadas et al., 2008). Ainda, verificou-se que ambas auxina e giberelina, principais hormônios vegetais que controlam crescimento e expansão celular em plantas, são necessárias para que o cancro cítrico ocorra (Cernadas & Benedetti, 2009). Entretanto, observou-se que os hormônios auxina e giberelina sozinhos ou em combinação não possuem um aparente efeito

no crescimento ou divisão celular em citros, sugerindo que outro fator é requerido para o desenvolvimento do cancro (Cernadas & Benedetti, 2009). Este fator adicional seria a proteína efetora PthA de *Xac*, que é suficiente para promover hipertrofia celular quando transientemente expressa em folhas de *Citrus* (Duan et al., 1999). Isso é consistente com o fato de que a expressão da proteína PthA em *Citrus* provoca mudanças transcricionais que se sobrepõem com aquelas desencadeadas pela infecção por *Xac* associadas com a ação de auxina e giberelina (A. Pereira & C. Benedetti, dados não publicados).

1.3. A Proteína Efetora PthA de *X. citri*

O gene *pthA* de *Xac* foi um dos primeiros genes da família AvrBs3 para o qual se demonstrou um fenótipo no hospedeiro. A proteína PthA é o fator principal de indução de hipertrofia celular e hiperplasia (Swarup et al., 1991; Swarup et al., 1992; Duan et al., 1999), sendo reconhecido como o principal determinante da patogenicidade de *Xac* (Al-Saadi et al., 2007). A expressão transitória de PthA em plantas não hospedeiras como feijão, tabaco e algodão levam à formação de uma reação do tipo HR (Duan et al., 1999). Se *Xac* falha em injetar PthA dentro da célula hospedeira, a bactéria simplesmente não se multiplica bem em citros (Brunings & Gabriel, 2003).

A linhagem de *Xac* 306 (da Silva et al., 2002) contém quatro membros da família AvrBs3/PthA denominados PthAs1-4, os quais possuem alta identidade entre si e diferem essencialmente no número de repetições do domínio central e por resíduos polimórficos encontrados dentro das unidades repetitivas. PthA4 apresenta 17,5 repetições, PthA1 contém uma repetição a menos que PthA4, enquanto PthAs 2 e 3 apresentam duas repetições a menos (da Silva et al., 2002; Brunings & Gabriel, 2003).

PthAs são 95-97% idênticos a AvrBs3, que consiste na proteína efetora de *Xanthomonas* melhor caracterizada. Membros desta família, conhecidos atualmente como efetores TAL (*Transcription Activator-like*), são translocados pelo sistema de secreção do tipo III para o núcleo das células hospedeiras, e funcionam como efetores ativadores da transcrição no hospedeiro (Yang et al, 2006; Kay et al., 2007; Römer et al., 2007; Sugio et al., 2007; Boch et al., 2009; Kay & Bonas, 2009, Boch & Bonas, 2010).

A característica principal responsável pela maioria das diferenças dos membros desta família é a presença de um domínio central, de 33-34 aminoácidos, quase idênticos e arranjados em tandem (Gürlebeck et al., 2006) (**Figura 4**). Esta região central tem sido mostrada importante (mas não exclusiva) para a especificidade da patogenicidade/avirulência (Swarup et al., 1992; Yang et al., 1994; Yang & Gabriel, 1995; Kay & Bonas, 2009), que seria definida pelo número e ordem das

repetições (Schornack et al., 2006); e pode estar envolvida em interações proteína-proteína (Yang & Gabriel, 1995; Gürlebeck et al., 2005, 2006). A maioria das proteínas codificadas por genes *R* apresenta um domínio contendo repetições ricas em leucina (*Leucine Rich Repeats*, LRR), os quais são normalmente associados à mediação de interações proteína-proteína, e sítios de ligação a nucleotídeos (*Nucleotide Binding Site*, NBS) (Meyers et al., 2003; Schornack et al., 2006). Porém, mais marcante é a região repetitiva que media o reconhecimento do DNA e o polimorfismo de aminoácidos encontrado dentro das unidades repetitivas que determina a especificidade na sequência de DNA dos efetores TAL (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009).

Outra característica desta família é a presença de sinais de localização nuclear funcionais (NLSs) e um domínio ácido de ativação transcricional (AD) na região C-terminal (Lahaye & Bonas, 2001; Szurek et al., 2002). A região N-terminal contém sinais de translocação e secreção, sendo necessária para o reconhecimento e transporte da proteína pelo T3S, mas não requerida para atividade de AvrBs3 na planta (Szurek et al., 2001, 2002); a região C-terminal, que é essencial para ativação da expressão gênica na célula hospedeira (Swarup et al., 1992; Yang & Gabriel, 1995; Büttner & Bonas, 2002; Marois et al., 2002). Análises genéticas de efetores como AvrBs3 revelaram que na maioria dos casos as atividades conhecidas de virulência e avirulência na célula hospedeira dependem de NLSs e AD (Gürlebeck et al., 2006).

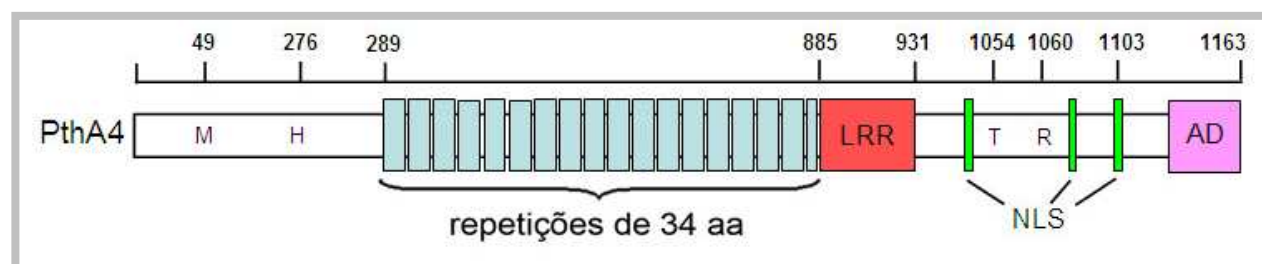


Figura 4 : Representação esquemática da variante 4 de PthA da cepa 306 de *X. citri*. Os números indicam a posição dos aminoácidos na sequência e as letras, as variações dos resíduos fora da região central repetitiva. LRR = *Leucine Rich Repeat*; NLS = *Nuclear Localization Signal*; AD = *Activation Domain*.

AvrBs3 é transportado para dentro da célula hospedeira e se localiza no núcleo de plantas susceptíveis e resistentes, mas induz diferentes reações na planta (hipertrofia das células do mesófilo ou HR, respectivamente) (Gürlebeck et al., 2006, Kay & Bonas, 2009). Este transporte citoplasma-núcleo é mediado via interação com a proteína α -importina. Estudos sucessivos com AvrBs3 mostraram que NLSs são cruciais para sua interação com α -importina; e o fato de que NLSs

de membros da família AvrBs3 são conservados, então confirmou a suspeita de que proteínas como AvrBs3 recrutam a maquinaria de importação nuclear do hospedeiro para alcançar o núcleo (Schornack et al., 2006). Antes da importação nuclear, AvrBs3 se dimeriza no citoplasma de maneira dependente do domínio central repetitivo, de tal forma que a dimerização é necessária para disparar HR na planta (Gürlebeck et al., 2005, 2006) (**Figura 5**).

No núcleo, AvrBs3 reconhece promotores de plantas e ativa a transcrição de um fator *basic helix-loop-helix* (bHLH) envolvido em hipertrofia celular em plantas susceptíveis, enquanto transativa seu cognato gene de resistência Bs3 em plantas resistentes, desencadeando uma resposta de hipersensibilidade (Kay et al., 2007; Römer et al., 2007). Este fator de transcrição bHLH é codificado pelo gene *UPA20* (*UPA – up-regulated by AvrBs3*) e análises de sequências das regiões promotoras de *UPA20* e de outros genes *UPA* revelaram um motivo conservado (*UPA box*), no qual AvrBs3 se liga (Kay et al., 2007, 2009; Römer et al., 2007, 2009). A ligação ao DNA de AvrBs3 é determinada por dois aminoácidos hipervariáveis na região central que confere a especificidade de ligação para pares de bases do *UPA box* (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009; Boch & Bonas, 2010). Descobriu-se também que AvrBs3 é capaz de regular a expressão de mais de uma dezena de genes na planta hospedeira (Kay et al., 2009). Com base nesta observação, provavelmente, outros homólogos e não apenas AvrBs3 se ligam e ativam promotores de seus genes *R* cognatos (Römer et al., 2007). Por outro lado, nós mostramos que o domínio repetitivo de PthAs é crítico nas interações proteína-proteína (Domingues et al., 2010). Portanto, está se tornando claro que o domínio central repetitivo de tais efetores tem um caráter duplo, possibilitando assim contatos proteína-proteína e proteína-DNA com alvos do hospedeiro.

Em um trabalho recente proporcionamos o primeiro dado estrutural experimental de um domínio repetitivo de PthA (Murakami et al., 2010). A estrutura de RMN de um peptídeo correspondente a 1,5 repetições do domínio central e o envelope de SAXS do domínio central inteiro de PthA2 com 15,5 repetições (RD2) corroboraram o modelo teórico que prediz uma estrutura de superhélice TPR (*tetratricopeptide repeat*) para o domínio central. Estudos espectroscópicos mostraram que RD2 passa por rearranjos conformacionais de uma maneira dependente do pH e na presença de DNA. Mostramos também que as unidades repetitivas de RD2 são similares ao PPR (*pentatricopeptide repeat*), um motivo de 35 aminoácidos que é estruturalmente relacionado a TPR, possui atividade de ligação a ácidos nucleicos e está envolvido na maquinaria transcricional e traducional, desempenhando papéis na estabilização de mRNA e edição de RNA (Williams-Carrier et al., 2008; Pfalz et al., 2009).

Dada a semelhança entre as respostas induzidas pelos membros da família AvrBs3/PthA nas células hospedeiras e a identidade entre as duas proteínas é esperado que PthA também funcione como um fator de transcrição em citros ativando ou desligando a transcrição de genes relacionados

ao desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico. De fato, foi constatado em nossa equipe com análises de microarray de epicótilos de laranja doce transformados transientemente com PthA, que um grande número de genes implicados no desenvolvimento do cancro são ativados por PthAs (Pereira & Benedetti, dados não publicados).

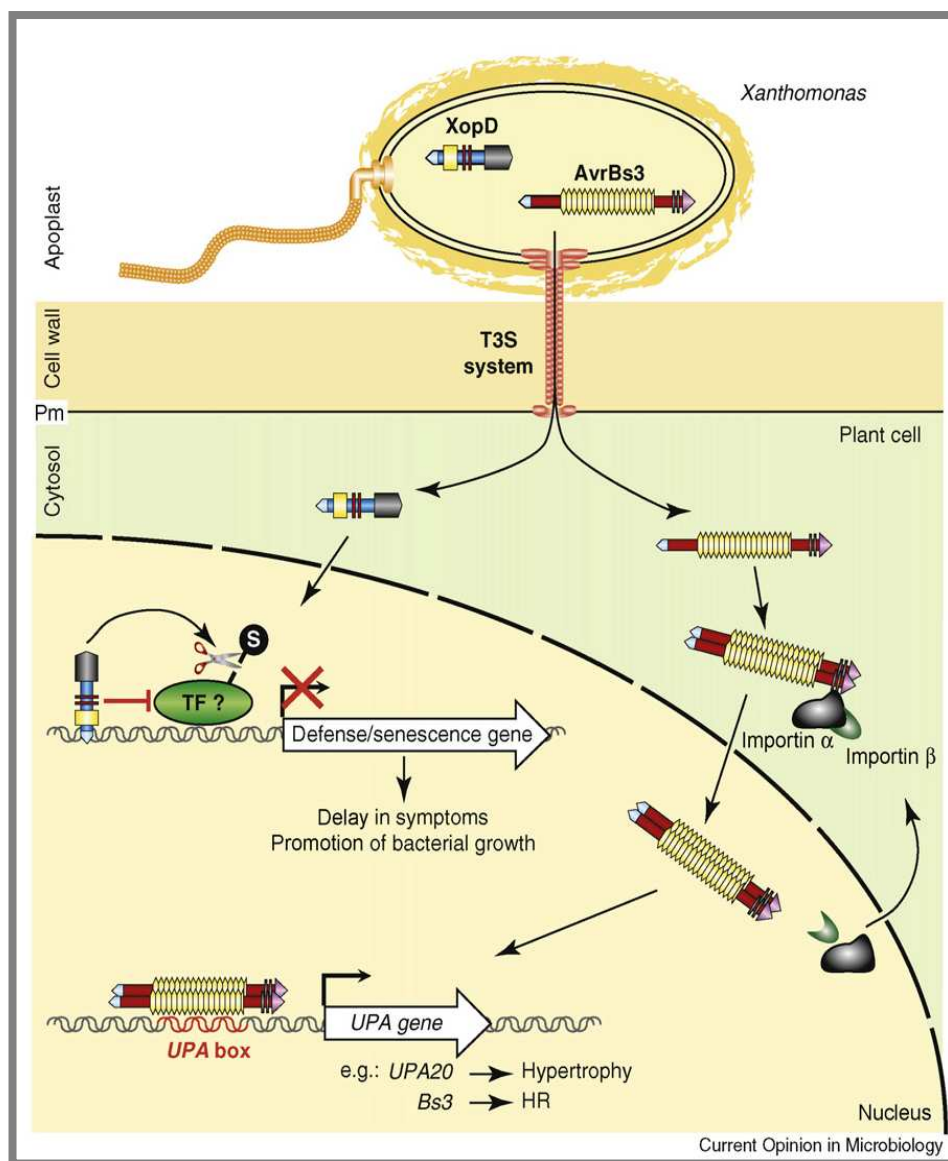


Figura 5: Esquema do mecanismo de ação proposto para efetores tipo III. AvrBs3 dimeriza no citoplasma da célula da planta e interage com α -importina via seus sinais de localização nuclear (NLSs). Este complexo proteico é ligado pela β -importina que media a importação nuclear. Nesta ilustração AvrBs3 se liga a uma sequência específica no DNA, *UPA box*, e ativa a transcrição de mais de 10 genes *UPA*. *UPA20*, um dos genes induzidos, é um regulador chave de hipertrofia celular em plantas. Nas plantas resistentes, a ativação de Bs3 causa HR. Pm – membrana plasmática. Retirado de Kay & Bonas, 2009.

Embora esses estudos salientem a importância das proteínas efetoras, como a PthA, na resposta sensitiva e patogenicidade em plantas, suas diversas funções ainda não estão bem esclarecidas. A caracterização de novas interações com proteínas efetoras contribuirá para uma melhor compreensão de como a patogenicidade da PthA atua dentro da planta e também para detectar possíveis novas funções desta proteína.

Neste contexto, os alunos Raul Andres Cernadas e Cássia Docena em colaboração com o grupo do Prof.Dr. Shaker Chuck Farah da USP-SP realizaram um ensaio inicial de duplo-híbrido em leveduras com uma biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis* e as iscas PthA2 e PthA4 (que diferem no número de repetições do domínio central). Neste experimento foram isolados vários clones positivos e, dentre eles selecionamos alguns alvos, que poderiam estar envolvidos em um possível complexo proteico de enovelamento e/ou ativação de PthAs. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi confirmar e caracterizar interações (*in vivo* e *in vitro*) entre proteínas de laranja doce e PthAs de *Xanthomonas*.

A seguir são descritas as proteínas de citros alvos de PthA de *Xac* (identificadas no ensaio inicial de duplo-híbrido mencionado acima) que estão envolvidas neste estudo.

1.4. Proteínas de *Citrus sinensis* alvos de PthA

1.4.1. α -importina (α -imp)

O heterodímero de importina α/β media a importação nuclear de proteínas nucleares que contém clássicos sinais de localização nuclear (NLSs; Hicks & Raikhel, 1995; Jans & Hubner, 1996; Gorlich, 1997; Smith & Raikhel, 1998). A subunidade α do heterodímero se liga especificamente a NLSs no citoplasma, entretanto a subunidade β interage com o complexo poro nuclear ou outros adaptadores para mediar a entrada no núcleo durante o processo de importação (Gorlich, 1997; Smith & Raikhel, 1998).

A proteína α -importina de *C. sinensis* (código GenBank número GQ475487) envolvida neste trabalho contém na sua porção N-terminal um domínio auto-inibitório (IBB) seguido por 3 repetições, de aproximadamente 40 aminoácidos cada, do tipo armadillo/beta-catenina (ARM), que tem sido implicados na mediação de interações proteína-proteína (**Figura 6**). Porém, nenhuma característica comum entre as proteínas alvo reconhecidas pelas repetições ARM tem sido identificadas (Hatzfeld, 1999). A proteína α -importina isolada de citros possui 87% de identidade com a proteína α -importina de *Capsicum annuum*, a qual interage com AvrBs3 e media sua importação nuclear.



Figura 6: Representação esquemática dos domínios conservados presentes na sequência da proteína α -importina de citros.

1.4.2. Ciclofilina (Cyp)

As Ciclofilinas (Cyp - EC nº 5.1.2.8) constituem uma família de proteínas ubíquas presentes em todos os compartimentos subcelulares (Galat, 1999). Esta família de proteínas contém um domínio de aproximadamente 109 aminoácidos conhecido como CLD (*Cyclophilin-like domain*) e possuem atividade peptidil-prolil-*cis-trans*-isomerase (PPIase) (**Figura 7**), a qual catalisa, estabiliza e acelera a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas precedentes de resíduos de prolina, durante o enovelamento e reunião de proteínas multidomínios (Wang & Heitman, 2005). Além de atuarem como chaperones, também estão envolvidas em vias regulatórias de transdução de sinais, resposta ao estresse, desenvolvimento de plantas, afetam reações de *splicing* de RNA (Laxa et al., 2007) e algumas PPIases podem também estar envolvidas na tradução e transcrição de genes (Galat, 1993).

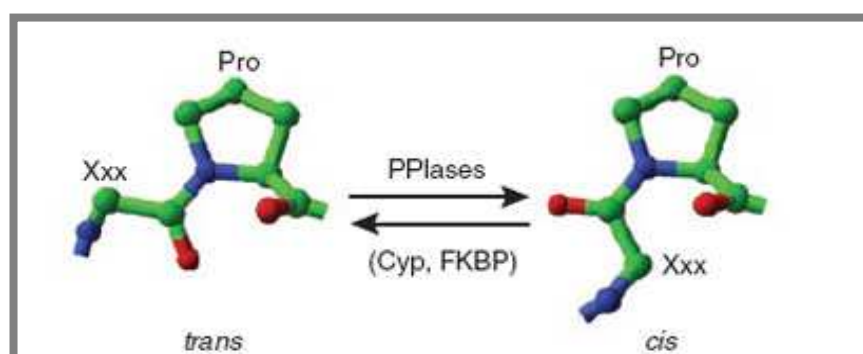


Figura 7: Esquema representando o papel desempenhado por PPIases na isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas precedentes de resíduos de prolina. Os isômeros *cis* e *trans* podem ser funcionalmente distintos. Extraído de Lu et al., 2007.

A expressão de ciclofilinas em plantas é induzida em várias situações de estresse, como infecção por patógenos, estresse hídrico, choque térmico e em resposta a etileno, ácido salicílico, ácido abscísico, ácido jasmônico, entre outros fatores (Romano et al., 2004).

Tais proteínas são coletivamente conhecidas como imunofilinas, a qual também inclui as proteínas de ligação a FK-506 e as parvulinas. Esta família de proteínas é encontrada em todas as células de todos os organismos estudados, em ambos procariotos e eucariotos; são conservadas ao longo da evolução; humanos tem um total de 16 ciclofilinas, *Arabidopsis* acima de 29 e *Saccharomyces* 8. O primeiro membro da família das ciclofilinas a ser identificado em mamíferos, ciclofilina A (CypA), é o principal alvo celular e, então, media a ação da droga imunossupressora ciclosporina A. CypA forma

um complexo ternário com ciclosporina A (CsA) e uma fosfatase específica serina/treonina ativada por cálcio-calmodulina (calcineurina); a formação deste complexo inibe a atividade fosfatase e a função biológica da calcineurina (Wang & Heitman, 2005), o que resulta na inibição de células T pelo bloqueio da expressão de muitos genes imunossupressores (Gullerova et al., 2006). A **Figura 8** mostra o alinhamento da Cyp de *Citrus sinensis* (código GenBank número GQ853548) com CypA humana, sendo que ambas possuem um único domínio CLD.

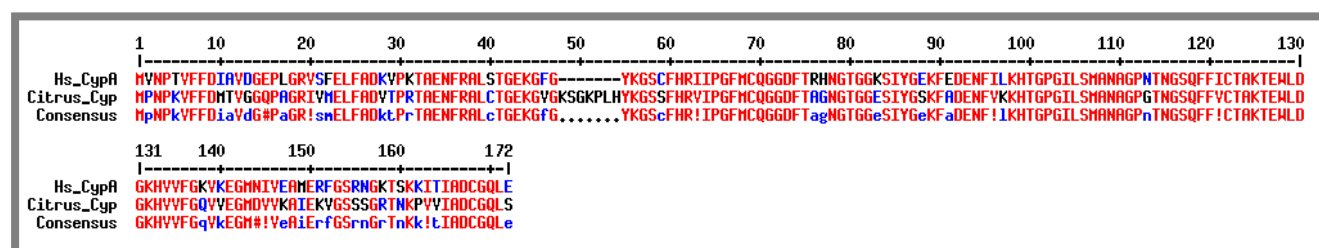


Figura 8: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Cyp de *Citrus sinensis* com CypA humana (*Hs_CypA*). Alinhamento realizado com o programa *MultAlin* (Corpet, 1988). Resíduos altamente conservados são representados com alto consenso (em vermelho) e aparecem com letra maiúscula na linha inferior – consenso. Resíduos que são fracamente conservados são representados com baixo consenso (em azul) e com letra minúscula na linha inferior. Demais resíduos são representados como neutros (em preto) e posições sem resíduos conservados são representadas como um ponto na linha consenso. Os símbolos a seguir referem-se às combinações: ! – IV; % - FY; # - NDQE.

Notavelmente, tem sido mostrado que efetores de patogenicidade de bactérias são ativados por ciclofilinas do hospedeiro. Em particular, Coaker et al. (2005) identificaram uma ciclofilina de *Arabidopsis* (ROC1) que contém um único domínio PPlase e funciona como um ativador eucariótico da proteína de avirulência AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae*. AvrRpt2, uma proteína efetora de 28 kDa, é translocada para o interior da planta durante a infecção via T3S. Após entrada na célula hospedeira, ROC1 se liga a domínios GPxL de AvrRpt2 e o enovela apropriadamente, através da isomerização peptidil-prolil-*cis-trans*. Essa modificação ativa AvrRpt2, a qual se torna uma protease capaz de se auto-processar e clivar seu amino-terminal de 71 aminoácidos. Estes primeiros 71 aminoácidos de AvrRpt2 codificam um sinal para entrada na célula da planta via T3S, enquanto o restante da seqüência (72-255) codifica o domínio efetor (Coaker et al., 2006).

Espectros de RMN e análises de gel filtração sugerem que AvrRpt2 pode ser estruturado e ativado somente quando ROC1 ou outra ciclofilina está ligada, mantendo assim um ou mais resíduos de prolina no estado de isomerização apropriado. Mudanças conformacionais dependentes de prolina podem controlar a atividade de AvrRpt2, dessa forma a ciclofilina pode servir como um

‘modificador molecular’, visto que na sua ausência, resíduos de prolina do motivo GPxL de AvrRpt2 estão principalmente na conformação *trans* e AvrRpt2 encontra-se num estado inativo. Com a ciclofilina ligada esses resíduos de prolina podem mais livremente adquirir a conformação *cis*, resultando na ativação de AvrRpt2 (Coaker et al., 2006).

Dados sugerem que as ciclofilinas e vias celulares relacionadas a ciclofilinas são freqüentemente exploradas por patógenos, visto que VirD2 de *Agrobacterium* interage com ciclofilinas da planta hospedeira (no caso *Arabidopsis thaliana*). VirD2 e VirE2 podem interagir com a maquinaria celular da planta, tais como transporte intracelular ou o aparato de integração/recombinação/reparo do DNA para facilitar a transferência e integração do T-DNA. Neste contexto, a atividade PPlase das Cyps poderia auxiliar no enovelamento de VirD2 em uma conformação diferente dentro da célula da planta; e é possível também que a ligação a Cyp seja requerida para manter VirD2 em um estado funcional e competente para transferência do T-DNA. Essa interação VirD2-Cyp é interrompida *in vitro* por CsA, como mostrado para CypA humana. Assim sendo, estes achados sugerem fortemente que uma ou mais Cyps da planta hospedeira desempenham um papel na transferência do complexo T de *Agrobacterium* (Deng et al., 1998).

A ativação e o enovelamento de efetores bacterianos por fatores eucarióticos pode ser um mecanismo comum, durante a patogênese, para outras moléculas efetoras do tipo III. Estas moléculas poderiam ter evoluído para um mecanismo de ativação do efector dentro do seu hospedeiro, devido à necessidade de estarem na forma não-enovelada ou parcialmente enovelada para entrada na célula hospedeira via T3S (Coaker et al., 2005, 2006). Portanto, é bastante provável que um mecanismo semelhante ocorra para PthAs e outras proteínas *Avrs* de *Xanthomonas*.

Foi descrito também que quando oxidadas, com ou sem formação de pontes dissulfeto, Cyps estariam inativas, como foi demonstrado por Gourlay et al. (2007), sugerindo que Cyps poderiam sofrer regulação redox por tioredoxinas (TRX), como já comprovado em *Arabidopsis thaliana*, na qual uma ciclofilina do cloroplasto é alvo de regulação redox por uma TRX, sendo que Cyp oxidada foi reduzida *in vitro* por TRX (Motohashi et al., 2003; Gourlay et al., 2007).

A ciclofilina de *C. sinensis* possui 90% de identidade com ROC1 de *Arabidopsis* (AtROC1) (**Figura 9**). Embora a ciclofilina isolada não contenha um motivo TPR, a presença de ciclofilinas em complexos de chaperones é bastante relevante, pois indica que a ciclofilina e a TDX (será descrita no tópico abaixo) de citros podem fazer parte de um mesmo complexo protéico envolvendo Hsp70/Hsp90 e considerando que a proteína efetora PthA é rica em resíduos de prolina no domínio central (**Figura 10**), a atividade PPlase da ciclofilina poderia ser responsável por uma modificação pós-traducional (isomerização *cis-trans*) necessária para ativação de PthA.

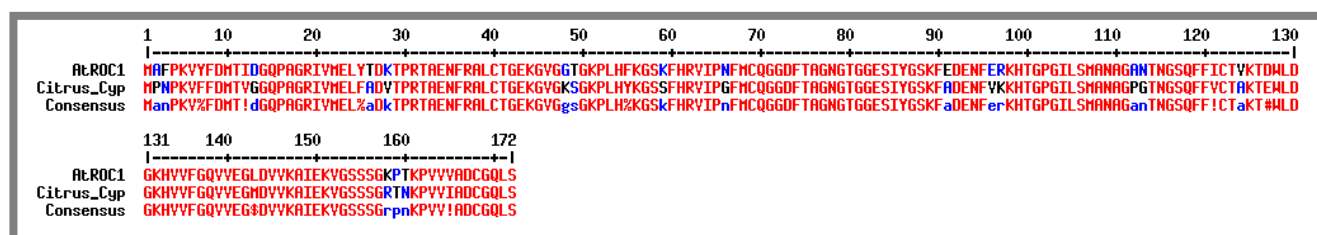


Figura 9: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Cyp de *C. sinensis* com a proteína AtROC1 mostrando a alta identidade de seqüência entre elas. Alinhamento realizado com o programa *MultAlin* (Corpet, 1988).

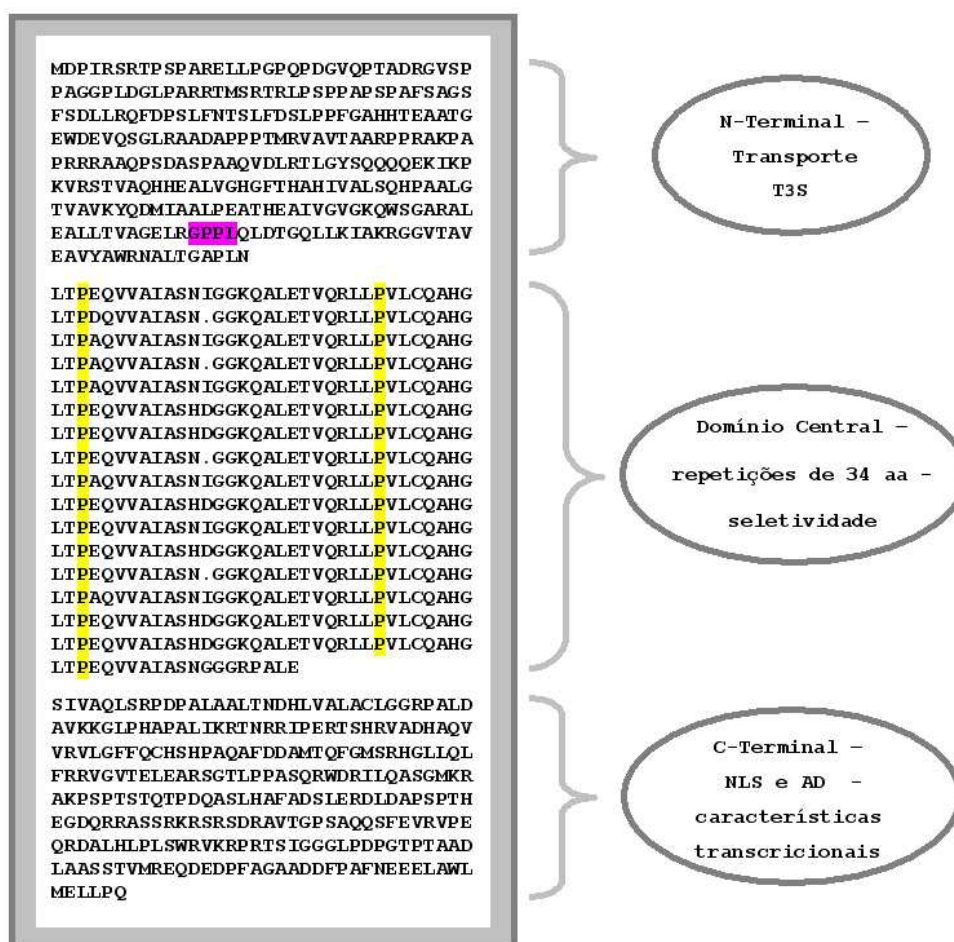


Figura 10: Sequência de aminoácidos da proteína PthA4 de *Xanthomonas citri*. Em rosa está salientado um possível sítio alvo de Cyp (GPPL), uma vez que o sítio alvo consenso de AtROC1 é GPxL, como descrito no texto acima. Apesar deste possível alvo não estar localizado no domínio central de PthA, em amarelo está destacada a presença de prolinas conservadas no domínio central da proteína.

Agarwal (2006) descreve uma análise genômica visando demonstrar a conservação de seqüências da CypA. A análise completa foi realizada para 50 seqüências de bactérias a humanos, porém foram listadas apenas 10 seqüências representativas, sendo que dos 165 resíduos da CypA, 17 foram conservados em todas as PPlases analisadas; além destes, 8 resíduos foram fortemente e 5 fracamente conservados. Ao adicionarmos nesta lista a seqüência da Cyp de *C. sinensis* envolvida neste trabalho, podemos notar que esta proteína apresenta o mesmo padrão de conservação de seqüência característico da família (Figura 11).

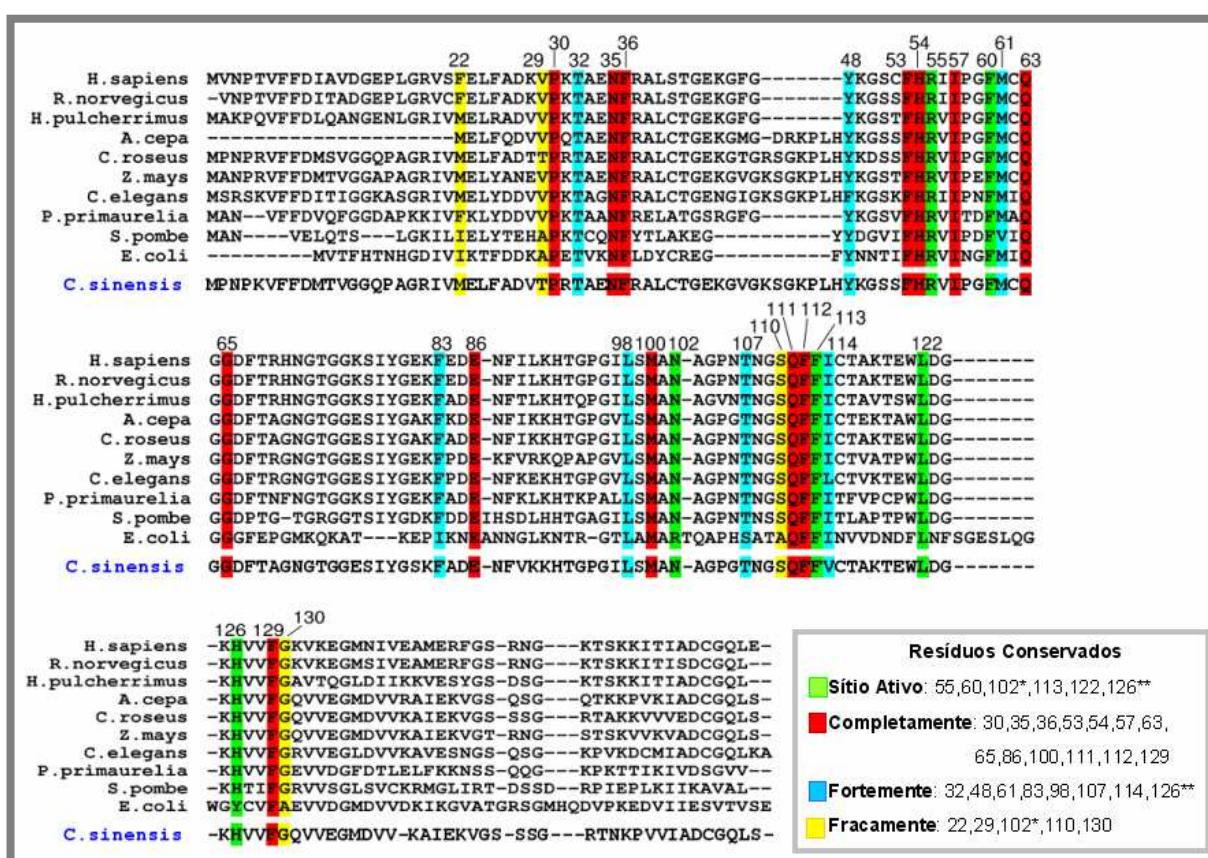


Figura 11: Comparação da seqüência de aminoácidos de Cyp de *C. sinensis* com uma análise genômica para a conservação de seqüência da CypA. Em verde estão os resíduos do sítio ativo; em vermelho, os completamente conservados; em azul, os fortemente conservados e em amarelo, os fracamente conservados, com exceção dos resíduos: 102 do sítio ativo que é fracamente conservado e o 126, fortemente conservado.

1.4.3. TDX (*Tetratricopeptide domain-containing thioredoxin*)

Hip (*Hsp70-interacting protein*) é uma co-chaperone que regula a atividade da família de chaperones Hsp70. As Hsp70 são proteínas ubíquas que desempenham importantes papéis na síntese de proteínas, enovelamento e transporte, além de atuarem em vias de transdução de sinal em cooperação com outras chaperones e co-chaperones. Em plantas, membros da família Hsp70 têm sido identificados na maioria dos compartimentos subcelulares, incluindo citosol, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria, cloroplastos e peroxissomos (Boston et al., 1996; Corpas & Trelease, 1997; Miernyk, 1999). Hip funciona para mediar e diferenciar as ações das Hsp70 entre diversas vias e compartimentos celulares; e estudos recentes indicam uma complexidade intrigante de interações co-chaperones regulando as Hsp70 em eucariotos (Cheung & Smith, 2000; Kimmins & Macrae, 2000).

Interações da Hip com Hsp70 e outras co-chaperones têm sido amplamente estudadas em animais, mas não em plantas. Análises de sequência do genoma de *Arabidopsis thaliana* revelaram dois genes codificando proteínas Hip e um segundo consistindo de uma quimera Hip-tiorredoxina. AtHip-1 é 42% idêntica a Hip humana, contém os mesmos domínios funcionais caracterizados em Hip de mamíferos, incluindo um domínio N-terminal envolvido na dimerização, um domínio ácido, três motivos TPR (*Tetratricopeptide Repeat*), uma série de repetições degeneradas GGMP e uma região C-terminal similar as proteínas Sti1/Hop/p60. AtHip-2 consiste de um domínio semelhante a Hip truncado que é 46% idêntico a Hip humana, seguido por um domínio C-terminal relacionado a tiorredoxina. AtHip-2 possui 63% de identidade com uma outra Hip-tiorredoxina recentemente identificada em *Vitis labrusca* (Grape Hip) (**Figura 12**). Os dois ortólogos de Hip são expressos em *Arabidopsis* e numa variedade de outras plantas (Webb et al., 2001).

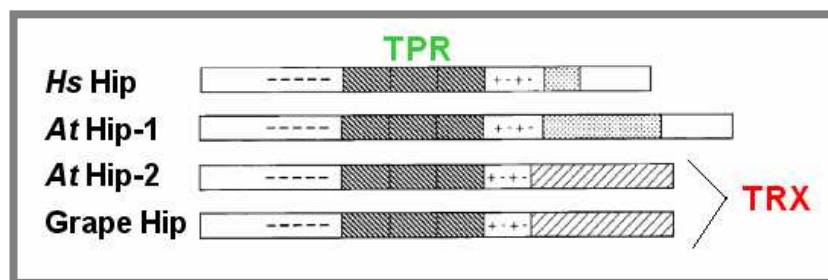


Figura 12: Comparação da estrutura geral da Hip humana (*Hs Hip*) com proteínas Hip de planta. Todas contém um N-terminal conservado, um domínio ácido, três TPRs e uma região altamente conservada. Apenas AtHip-2 e Hip de *Vitis labrusca* possuem um domínio tiorredoxina no C-terminal. Extraído de Webb et al., 2001.

Posteriormente, Vignols e colaboradores (2003) descreveram um novo gene de *Arabidopsis thaliana* que codifica uma proteína de 42 kDa composta por 2 domínios. Esta proteína (*AtTDX*) é uma redutase dissulfeto composta por três motivos TPR (característico de Hip) no seu N-terminal e contém um domínio tiorredoxina (TRX) no C- terminal. O motivo TPR é conhecido por mediar interações proteína-proteína com chaperones e o domínio TRX, contém duas cisteínas reativas conservadas (*Cys-X-X-Cys*), característica de domínio catalítico de redutases dissulfeto que mediam a redução de pontes dissulfeto das proteínas alvo. Apesar de caracterizada esta proteína, a função biológica das TDX ainda é pouco conhecida e nenhum fenótipo foi associado à ausência desta proteína em plantas mutantes. A proteína TDX que foi isolada de *Citrus sinensis* (código GenBank número GQ853549) apresenta o mesmo padrão organizacional de domínios (**Figura 13**). Tendo por base a função dos domínios TPR e TRX, a proteína de citros seria capaz de induzir mudanças conformacionais em proteínas alvo, alterando o estado redox e teria um importante papel no enovelamento e estabilização destes alvos.

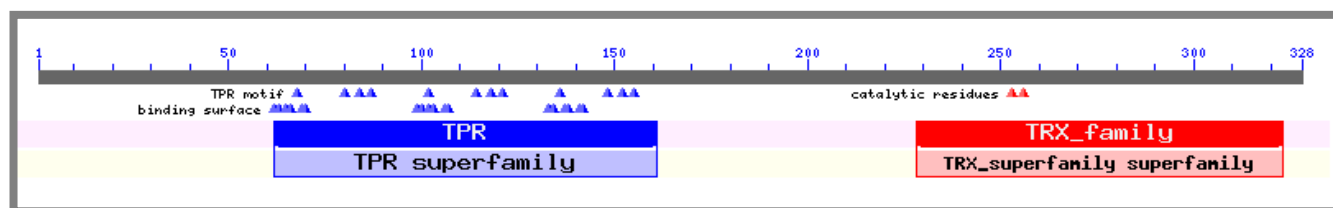


Figura 13: Representação esquemática mostrando os domínios TPR e TRX da TDX de *C. sinensis*. O domínio TPR poderia mediar interações proteína-proteína como co-chaperone molecular e o domínio TRX, poderia estar envolvido na alteração do estado redox de proteínas alvo.

A proteína TDX de citros (**Figura 14**) possui cerca de 70% de identidade com as proteínas *AtHip-2* e *Hip* de *Vitis labrusca*. Estas duas proteínas apresentam domínio TRX similar ao de tiorredoxinas citosólicas e diferem de outros ortólogos de Hip na localização e função celular *in vivo*, sendo responsáveis por mediar a regulação redox através de oxidação e redução de grupos sulfidril (Webb et al., 2001); e assim as tiorredoxinas, de forma geral, podem modificar a conformação de uma grande variedade de proteínas em resposta a alterações do estado redox celular (Meyer et al., 2008). TRXs regulam a atividade de muitos fatores de transcrição, tais como NF- κ B em mamíferos (Berndt et al., 2008); tem uma relação direta com chaperones como mostrada pela associação dos domínios TPR e TRX e por interagirem também com ciclofilinas (Motohashi et al., 2003; Gourlay et al., 2007). Na **Figura 15A** pode-se verificar o alto grau de conservação de sequência dos três motivos TPR de

vários organismos e na **Figura 15B**, a conservação do domínio TRX com outras tioredoxinas de plantas.

Considerando a alta similaridade da TDX de citros com as proteínas descritas acima e que PthA contém resíduos de cisteína conservados no seu domínio central, sugere-se que uma interação com o complexo TDX/Hsp70/Hsp90 poderia ser necessária para a estabilização e o correto enovelamento de PthA.

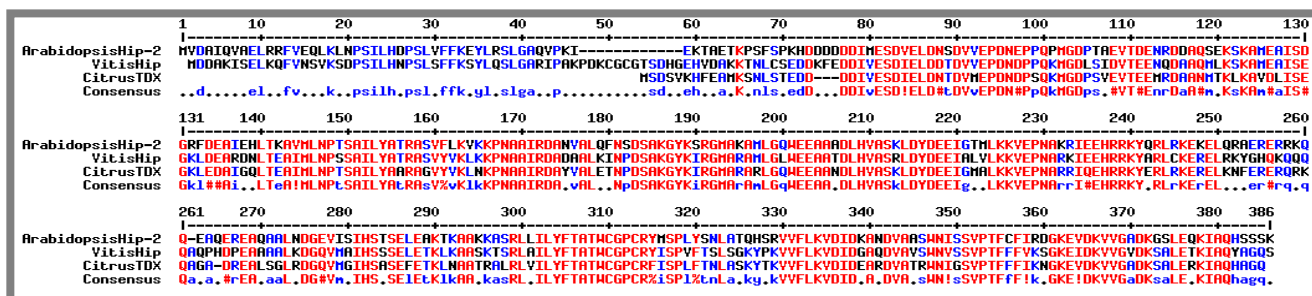


Figura 14: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da TDX de *C. sinensis* com as proteínas Hip-2 de *A. thaliana* e Hip de *Vitis labrusca*. Alinhamento realizado com o programa *MultAlin* (Corpet, 1988).

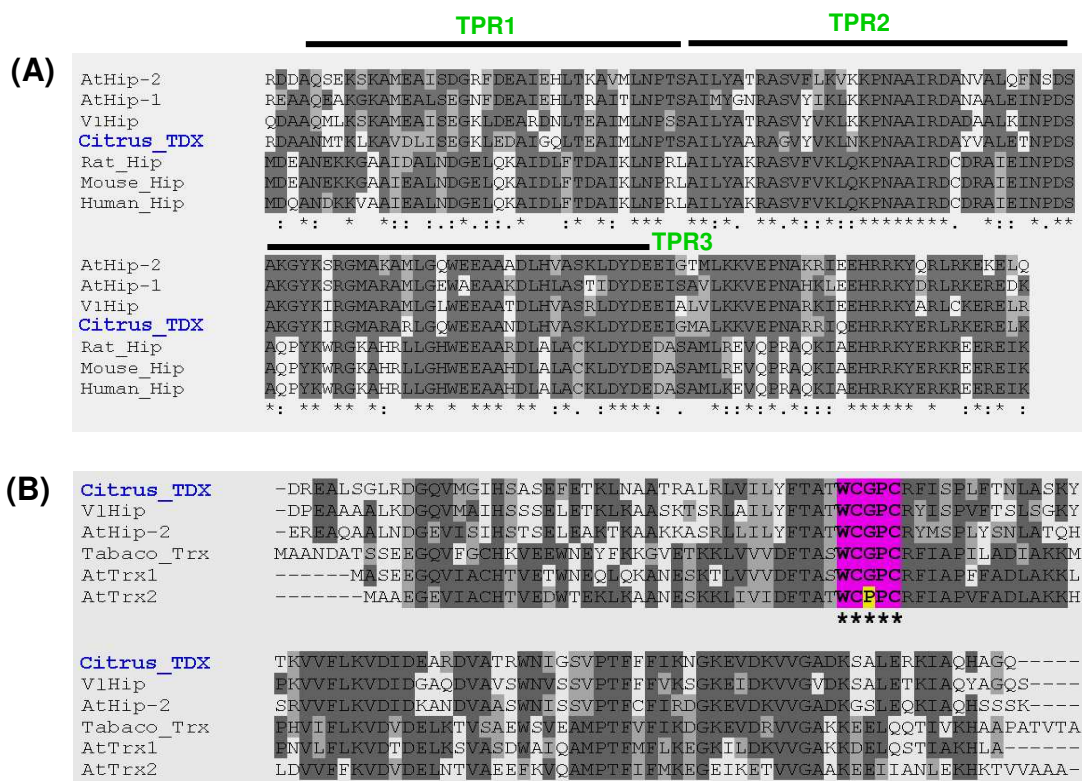


Figura 15: (A) Alinhamento de seqüências de aminoácidos dos três motivos TPR da TDX de *C. sinensis* com Hip humana, de animais e plantas. (B) Alinhamento de seqüências do domínio TRX da TDX de *Citrus* com outros Trxs de plantas proximamente relacionados. Os asteriscos indicam os resíduos do sítio ativo de TRX.

1.4.4. *Ubiquitin Conjugating Enzyme (Ubc13) e a forma variante Uev*

A ubiquitinação é um mecanismo de modificação pós-traducional de proteínas fundamental em todos os organismos eucarióticos. Este processo controla muitos aspectos críticos do metabolismo celular, tais como progressão do ciclo celular, regulação transcricional, reparo de DNA, transdução ou reconhecimento de sinais e resistência a patógenos (Angot et al., 2007).

A ligação do substrato a ubiquitina (Ub) é catalisada pela ação sequencial de três classes de enzimas: E1 (enzima de ativação de Ub), E2 (enzima de conjugação a Ub, também conhecida como Ubc) e E3 (Ub ligase). A Ub é inicialmente ativada por E1 de uma maneira dependente de ATP, e é transferida para uma E2 que com auxílio de uma E3, liga especificamente a Ub a proteína-alvo formando uma ligação isopeptídica entre o C-terminal da Ub e o grupo amino primário da proteína-alvo (Andersen et al., 2005a). Em alguns casos, o processo de ubiquitinação para nesse ponto (Monoubiquitinação – pode desencadear alteração da localização e/ou atividade da proteína-alvo), entretanto, muitas proteínas ubiquitinadas passam por vários ciclos de ubiquitinação, de tal forma que outras Ubs são conjugadas no resíduo de Lys (K) até a última Ub da cadeia em crescimento. Algumas proteínas alvo requerem a ação de um fator de elongação da cadeia de Ub, E4, para se tornarem eficientemente poliubiquitinadas (Andersen et al., 2005a; Welchman et al., 2005).

As cadeias de poli-Ub, de forma geral, são unidas umas as outras através do resíduo K48 e, neste caso, as proteínas poliubiquitinadas são marcadas para degradação pelo proteassoma, entretanto, cadeias unidas por resíduos K63 são conhecidas pela modificação e ativação da atividade e transporte protéicos, de uma maneira não-proteolítica (Angot et al., 2007; Pelzer et al., 2009). Diferentes E2 parecem ser responsáveis pelas diferentes topologias da cadeia de poli-Ub (K48 e K63) e as E3, eventualmente, controlam a especificidade do substrato pelo recrutamento da proteína alvo (Zhang et al., 2005; Angot et al., 2007).

Ubc13 é a única enzima E2 conhecida capaz de catalisar reações de poli-Ub K63. Esta proteína tem um domínio catalítico conservado da família das Ubcs e um resíduo de cisteína no sítio ativo para conjugação a Ub (Hofmann & Pickart, 1999). Entretanto, a proteína Ubc13 para catalisar reações de poli-Ub K63, requer como co-fator uma E2 variante, Uev (*Ubc E2 variant*), a qual possui sequência de aminoácidos similar a Ubc, mas ausência de um resíduo de cisteína essencial no sítio ativo, o que a torna cataliticamente inativa, porém pode interagir fisicamente com Ubc13 para mediar a poliubiquitinação K63 (Mckenna et al., 2001; Syed et al., 2006; Wen et al., 2006). Foi constatado que a Uev é capaz de interagir de forma não-covalente com Ub, de tal modo que oriente a Ub para facilitar a formação da cadeia poli-Ub K63 (Mckenna et al., 2003a).

Cadeias de poli-Ub K63, diferentemente das cadeias K48, existem em uma conformação mais aberta, a qual permite a exposição de superfícies hidrofóbicas que poderiam servir como uma

interface para ligação de outras proteínas. Com isso, é proposto uma função para as cadeias poli-Ub K63 mediando interações proteína-proteína (Geetha et al., 2005).

Todos os mamíferos analisados até o momento apresentam pelo menos dois membros da família Uev. As células humanas, por exemplo, contém homólogos MMS2 de leveduras, *HsMMS2* e *UEV1/CROC1* (Xiao et al., 1998). Estas duas proteínas compartilham mais de 90% de identidade de sequência e ambas são capazes de formar um complexo estável com Ubc13, porém estão envolvidas em funções celulares distintas (Andersen et al., 2005b). Enquanto o complexo Ubc13-*HsMMS2* está envolvido na resposta ao dano no DNA (Hoege et al., 2002), o complexo Ubc13-Uev1 está envolvido na ativação da via de sinalização NF- κ B, em resposta a estresse do meio, incluindo infecções virais e bacterianas (Zhou et al., 2004). Notavelmente, a função de resposta ao dano no DNA é essencial para prevenir instabilidade genômica e o câncer, entretanto, a ativação constitutiva NF- κ B é anti-apoptótica e tem sido relacionada a vários tipos de câncer (Lin & Karin, 2003).

Dado que ambas Uev1 e MMS2 são capazes de formar um complexo estável com Ubc13 e que suas funções biológicas são distintas, as diferenças estruturais entre essas proteínas seriam responsáveis por seus papéis funcionalmente distintos na sinalização intracelular (Pelzer et al., 2009).

Análises estruturais têm mostrado que a formação do heterodímero Ubc13-Uev é na razão de 1:1, e que MMS2 e Uev1A estão distribuídas tanto no citoplasma quanto no núcleo (Mckenna et al., 2001; Moraes et al., 2001; Vandemark et al., 2001). Então, Uev1A pode prontamente competir com MMS2 para prevenir a formação de complexo com Ubc13 no núcleo, assim, é sugerido que Uev1A compete com MMS2 no núcleo pela ligação a Ubc13 e atua como um fator antagonístico (Andersen et al., 2005b). Estudos em células de mamíferos, leveduras e em *Arabidopsis* suportam a noção de que a tolerância ao dano no DNA livre de erro, promovido pela poliubiquitinação K63 via Ubc13-Uev é uma função evolutivamente conservada ao longo dos eucariotos (Wen et al., 2008).

Wen e colaboradores (2008) reportaram a caracterização de 4 genes Uev1 em *A. thaliana*. Todas as 4 proteínas Uev (Uev1A, Uev1B, Uev1C e Uev1D) podem formar um complexo estável com *AtUbc13* e com Ubc13 humana e de levedura para promover poliubiquitinação K63 mediada por Ubc13. Porém apenas as proteínas Uev1C e Uev1D estariam envolvidas na resposta ao dano no DNA, e a Uev de *Citrus sinensis* (código GenBank número GQ455410) compartilha uma alta identidade de sequência com estas duas proteínas de *Arabidopsis* (**Figura 16**).

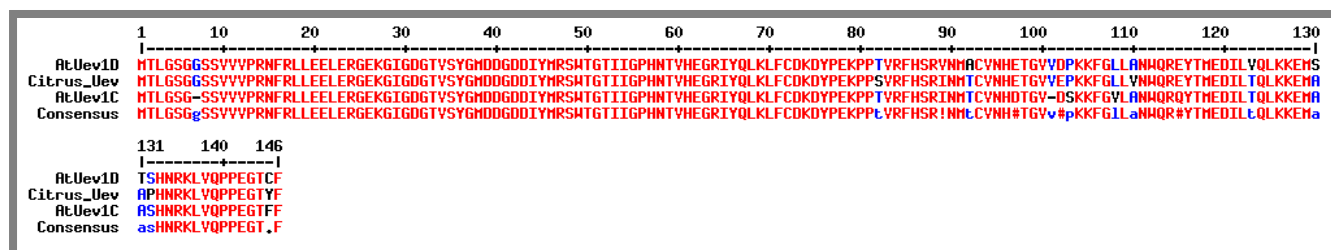


Figura 16: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Uev de *C. sinensis* com as proteínas AtUev1C e AtUev1D mostrando a alta identidade de seqüência entre elas. Alinhamento realizado com o programa MultAlin (Corpet, 1988).

Descobertas recentes sugerem que a ubiquitinação pode também desempenhar um importante papel na resistência a doenças em plantas. Muitas E3 têm sido identificadas como reguladores de defesa e podem ser componentes essenciais na resistência (Devoto et al., 2003). De acordo com Goritschnig et al. (2007) a via de ubiquitinação é essencial para ativação de algumas, mas não de todas as respostas de resistência mediadas por proteínas *R*. Assim, a ubiquitinação poderia ser uma estratégia do patógeno para eliminar proteínas do hospedeiro envolvidas na defesa basal com o intuito de facilitar a infecção. Tem sido recentemente mostrado que AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* possui atividade E3 e inibe HR em plantas de tomate resistentes (Janjusevic et al., 2006), dessa forma, patógenos seriam capazes de explorar a maquinaria de ubiquitinação do hospedeiro para suprimir respostas de defesa basal. A ubiquitinação além de atuar negativamente, suprimindo respostas de defesa quando explorada pelo ataque de patógeno, pode atuar também positivamente, promovendo respostas de defesa na planta, de tal forma que o balanço destes aspectos positivos e negativos pode determinar o resultado da interação planta-patógeno (Goritschnig et al., 2007).

Tem sido demonstrado também que a ubiquitinação controla a expressão e atividade de inúmeras proteínas eucarióticas. Um alvo frequente da maquinaria de modificação por Ub são fatores de transcrição. Embora a ubiquitinação geralmente module suas funções por induzir degradação dependente de proteassoma, estudos anteriores e recentes indicam que este processo também regule o transporte citoplasma-núcleo de reguladores transcricionais (Shcherbik & Haines et al., 2004). A translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B é indiretamente controlado por ubiquitinação (Geetha et al., 2005). Um papel direto é observado na ubiquitinação do fator de transcrição de mamífero, NRIF, que pode induzir sua translocação nuclear, uma vez que o ataque da Ub promove sua ligação a importina-11, facilitando assim sua translocação para o núcleo (Plafker et al., 2004).

Além disso, foi determinada a estrutura de uma proteína denominada CHIP (C-terminal da *Hsp70-interacting protein*), a qual contém um domínio *U-box* no C-terminal e um domínio TPR no N-terminal,

que media sua interação com chaperones Hsp70/90, facilitando assim a ubiquitinação de proteínas clientes ligadas a estas chaperones (Murata et al., 2003; Zhang et al., 2005). Separando os domínios TPR e *U-box* há uma região central rica em resíduos carregados e também contém dois possíveis sinais de localização nuclear (McDonough & Patterson, 2003). Verificou-se que CHIP se liga a um complexo ubiquitina E2 - Ubc13-Uev1a e catalisa a síntese de cadeias de poliubiquitina unidas por resíduos K63 da ubiquitina, sendo que essa poliubiquitinação pode atuar como modificação covalente regulatória em muitas funções não proteolíticas, incluindo reparo de DNA, ativação de proteínas quinases, transporte e síntese de proteínas (Sun & Chen, 2004; Zhang et al., 2005). Esta função ubiquitina E3 ligase de CHIP sugere um papel no controle pós-traducional pela poliubiquitinação regulatória de proteínas clientes (Murata et al. 2001; Zhang et al., 2005). Recentemente, foi descrito que CHIP pode interagir também com UbcH5 mediando a formação de cadeias poli-Ub K48 e que neste caso, CHIP passa por um processo de autoubiquitinação, o que não ocorre quando CHIP interage com Ubc13-Uev. A interação de CHIP com estas diferentes E2 provavelmente resulta em diferentes tipos de poliubiquitinação e diferentes funções biológicas. Como UbcH5 e Ubc13 são similares em seqüência e estrutura, não está claro se e como CHIP distingue entre essas duas E2 (Xu et al., 2008).

1.5. Controle de reparo no DNA

A integridade da informação genética é constantemente ameaçada por dano no DNA, não somente porque dano no DNA resulta na transmissão de mutações genéticas hereditárias, mas também porque pode resultar em alterações imediatas no perfil de expressão gênica de uma célula. Além disso, a interrupção rápida e irreversível da RNA polimerase II (pol II) pode se dar nos sítios de dano no DNA. Considerável progresso tem sido obtido, nos últimos anos, na compreensão de mecanismos através dos quais as células eucarióticas respondem ao dano no DNA em genes ativos. O reparo preferencial do DNA em genes que estão sendo transcritos ocorre por uma via de reparo pareada com a transcrição. Esta via é um tipo de reparo de excisão de nucleotídeos que emprega a transcrição da pol II como um sensor de dano no DNA e direciona a maquinaria de reparo para sítios aberrantes no genoma (Daulny & Tansey, 2009).

A regulação correta da transcrição gênica depende de mecanismos que regulam a formação e dinâmica de grandes complexos protéicos durante vários estágios do processo de transcrição. Um dos mais proeminentes desses mecanismos é a modificação pós-traducional. A ubiquitinação é uma modificação que tem recebido atenção nos últimos anos, como tem se tornado evidente que modificação da transcrição de proteínas por ubiquitina desempenha um papel em diversos aspectos da regulação gênica. De acordo com Daulny e colaboradores (2008) tem sido proposto que a

ubiquitinação ou a ubiquitinação e degradação são um sinal positivo para ativação da transcrição e pode ser importante para uma fina regulação da atividade gênica. Há também exemplos de ubiquitinação causando a perda de interação proteína-proteína, mas estes casos tipicamente requerem chaperones dependentes de ubiquitina para reconhecer substratos ubiquitinados e remodelar as interações por hidrólise dependente de ATP.

Recentemente, algumas proteínas foram encontradas ubiquitinadas após irradiação ou tratamento com agentes que causam dano no DNA. Dentre estas proteínas estão PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), as histonas H2A e sua variante H2AX, dentre outras. Pelo menos no caso de PCNA e H2AX, as versões ubiquitinadas se acumulam no sítio de dano e são importantes no recrutamento de proteínas *downstream* para solucionar a situação. Os marcadores de ubiquitina no sítio de dano são baseados em cadeias de mono-ubiquitina ou cadeias de ubiquitina K63 e as proteínas *downstream* tem que reconhecer essas modificações além do background de proteínas ubiquitinadas constitutivamente com todos os tipos de ligação (Hofmann, 2009).

As quebras no DNA fita dupla são as mais deletérias entre muitos tipos de lesões no DNA. Em resposta a essas quebras, as células iniciam um complexo de resposta que minimiza seus impactos deletérios sobre a fisiologia celular. Panier e Durocher (2009) discutem o descobrimento de um sistema de ubiquitinação regulatório que modifica a cromatina localizada nas áreas do DNA lesionadas. Esta via está sob o controle de RNF8 e RNF168, duas ubiquitinas E3 ligases que cooperam com Ubc13 e orquestram o recrutamento de proteínas de resposta ao dano no DNA por catalisarem a ubiquitinação de histonas do tipo H2A e a formação de cadeias de ubiquitina K63 na cromatina danificada. Assim, a ubiquitinação de H2A e H2AX catalisada por RNF8 poderia servir como sítios de ancoragem para a maquinaria de reparo de DNA durante a transdução de sinal de dano no DNA (Zhou et al., 2009). Porém não está claro se Ubc13 atua juntamente com uma ubiquitina E2 variante (Uev) MMS2 ou UEV1, surgindo a possibilidade da Ubc13 interagir de uma forma não-canônica com Uev para promover a via RNF8-RNF168 (Huen et al., 2008).

Ao contrário do que se acreditava anteriormente, estudos recentes têm demonstrado que a ubiquitinação K63 também atua como um sinal para degradação do alvo pelo proteassoma 26S, assim como cadeias de ubiquitina K48. Rps5, uma ubiquitina E3 ligase, pode atacar exclusivamente cadeias de ubiquitina K63, conduzindo o substrato à degradação proteassomal (Saeki et al., 2009). Estes estudos estão de acordo com trabalho descrito por Kajiro e colaboradores (2009) que por análises proteômicas identificaram o co-ativador transcricional SRC-3, uma proteína oncogênica, como um alvo direto para ubiquitinação e degradação por CHIP, uma vez que CHIP é conhecida por degradar várias proteínas que contribuem para progressão de tumores. Estes achados nos levam a hipótese de que se existe um complexo semelhante a CHIP em *Citrus* e a inibição deste complexo por PthAs poderia favorecer o desenvolvimento do cancro cítrico.

O C-terminal da subunidade maior da pol II (CTD) desempenha um papel crítico na coordenação de múltiplos eventos no processamento e transcrição de pré-mRNA, incluindo remodelamento de cromatina e reparo de dano no DNA (Meinhart et al., 2005; Xu & Manley, 2007). CTD é composto por 26-52 hepta repetições com a seqüência consenso YSPTSPS. Essas repetições são extensivamente fosforiladas na pol II ativamente engajada na elongação da transcrição (Morris & Greenleaf, 2000). Dentre as proteínas que se ligam a CTD e regulam a função pol II estão Ess1 e Rsp5 (Wu et al., 2001). Ess1p, uma peptidil-prolil isomerase (PPIase) essencial de levedura, tem sido mostrada se ligar a CTD de pol II fosforilada via seus domínios WW, e enquanto, estes domínios mediam a interação de Ess1p com seus substratos, o domínio PPIase catalisa a atividade enzimática. Ess1 se liga a CTD e desempenha um papel positivo na transcrição por gerar isômeros conformacionais da CTD (**Figura 17**) (Wu et al., 2000). Rsp5p e sua proteína homóloga humana, Nedd4, são ubiquitinas E3 ligases que se ligam a CTD, resultando na sua ubiquitinação, seguida por degradação, e com isso, tem sido sugerido que exerçam um efeito negativo sobre a transcrição da pol II (Jeong et al., 2005).

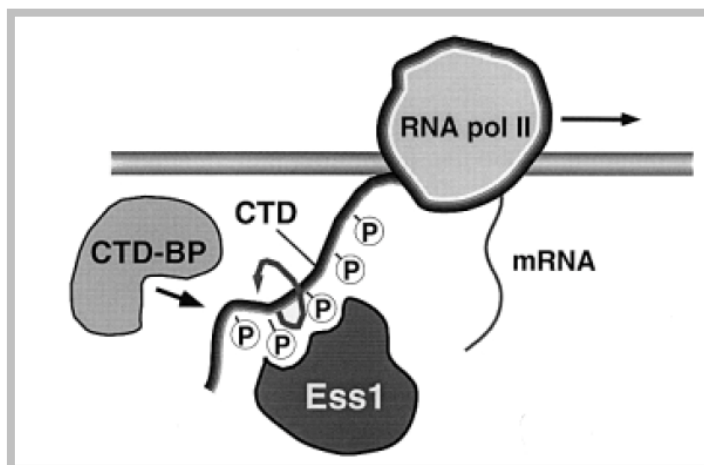


Figura 17: Mecanismo de ação proposto para a proteína Ess1 na transcrição. Ess1 se liga a CTD da RNA pol II fosforilada, catalisa sua isomerização, atuando como um fator regulatório na iniciação, alongamento e terminação do processo transcricional. Neste modelo, Ess1 coordena os passos sequenciais da transcrição alterando a estrutura tridimensional do CTD e a afinidade das interações de proteínas de ligação a CTD (CTD-BP). Esquema retirado de Wu et al., 2000.

Além disso, Rsp5 de levedura e várias E2, dentre elas Ubc13, se mostraram tolerantes a diversos tipos de stress (Hiraishi et al., 2006). Ess1 e Rsp5 competem diretamente pela ligação a CTD e atuam de forma oposta sobre a função da pol II para controlar o nível de pol II disponível para transcrição (Wu et al., 2001; Krishnamurthy et al., 2009). Enquanto Ess1 se liga a CTD na forma

fosforilada (Morris et al., 1999), Rsp5 se liga à forma não fosforilada via um ou mais de seus domínios WW (Wang et al., 1999).

A Cyp de citros assemelha-se ainda à proteína CypA de levedura a qual diminui silenciamento gênico (Arévalo-Rodríguez et al., 2000; Arévalo-Rodríguez & Heitman, 2005) e interage com Ess1 que afeta o remodelamento da cromatina e a transcrição basal através da isomerização de resíduos de prolina do CTD da RNA polimerase II (Hani et al., 1999; Wu et al., 2000; Krishnamurthy et al., 2009). Seguindo a mesma linha, foi recentemente descrito por Gullerova e colaboradores (2006) o papel de uma ciclofilina de planta na regulação da atividade de pol II e processamento de pré-mRNA através de modulação no estado de fosforilação de CTD.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi confirmar e caracterizar interações (através de ensaios de ligação *in vivo* e *in vitro*) entre proteínas de laranja doce e as variantes PthAs de *Xac* (que diferem no número de repetições do domínio central), tendo por base vários clones positivos que foram selecionados num *screening* inicial de duplo-híbrido com biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*. Dentre as proteínas de laranja doce isoladas nesta etapa inicial, destacam-se neste trabalho, componentes de um complexo de proteínas de citros implicado no enovelamento protéico e reparo de DNA. Além disso, foram combinados experimentos de complementação de fenótipo de cepas mutantes e ensaios de localização celular visando uma melhor caracterização de tais interações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Algumas das construções que foram utilizadas nesse trabalho já estavam disponíveis em nosso laboratório, entre elas, pOBD-PthAs- Δ N, pET28a-6xHis-PthAs (*His-tag* N-terminal), pET28a-6xHis-PthA-5.5rep+CT2 (uma forma truncada contendo uma parte do domínio central com 5,5 repetições de 34 aa, seguido da região C-terminal) e pET28a-6xHis-PthA-CT2 (C-terminal íntegro contendo as regiões NLS e AD). Os vetores pOBD e pOAD (Uetz et al., 2000) foram utilizados na clonagem dos genes escolhidos, como isca e presa, respectivamente, nos ensaios de duplo híbrido em leveduras.

A clonagem dos *pthAs* de *Xac* em pOBD (em fusão com domínio de ligação de GAL4) foi realizada no sítio restrição *NotI*/*NotI* partindo das construções em vetor pET28a. Nestas construções uma parte do N-terminal foi removida, uma vez que esta região deletada não é necessária para o desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico. Foram também realizadas subclonagens dos *pthAs* para o vetor pOAD (em fusão com domínio de ativação de GAL4) para ensaios de homo e heterodimerização *in vivo* de PthAs.

Além destas, foi produzida também a seguinte construção pOBD-PthA-RD2, obtida pela subclonagem do plasmídeo pET28a-PthA-RD2 nos sítios de restrição *NdeI*/*NotI* para o vetor pOBD, previamente digerido com as mesmas enzimas.

Ao iniciar o projeto, outros membros do grupo já haviam preparado as seguintes construções em pOAD: pOAD- α -importina (controle positivo), pOAD-Cyp, pOAD-TDX e pOAD-Uev. No caso da proteína α -importina, os primeiros 80 resíduos correspondentes ao domínio auto-inibitório na região N-terminal foram removidos da sequência (Harreman et al., 2003). Nos ensaios de interação das proteínas de citros entre si foi feita a subclonagem do plasmídeo pOAD-Cyp nos sítios de restrição *NdeI*/*NotI* para o vetor pOBD. Todas as construções foram confirmadas por seqüenciamento de DNA.

3.1. Ensaios de Duplo Híbrido em Leveduras

As construções em pOBD e pOAD citadas acima foram separadamente transformadas em cepas de *E. coli* DH5 α por choque térmico, plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB – composto por 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio) seletivo com 100 μ g/mL de Amp (pOBD e pOAD – ambos possuem resistência a ampicilina) e crescidas em estufa a 37°C por 16 horas. Os clones foram crescidos em meio líquido seletivo LB Amp a 37°C por 14-16 horas. As células foram em seguida coletadas e os plasmídeos purificados utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), de acordo com protocolo do fabricante. Este mesmo procedimento foi realizado também para os plasmídeos pOBD e pOAD sem nenhum inserto, ou seja, vazios, os quais foram utilizados como controles para confirmar as interações. Estas construções pOBD-isca e pOAD-

presa foram então utilizadas para transformação de leveduras competentes nos ensaios de duplo híbrido.

3.1.1. Transformação de leveduras competentes de *S. cerevisiae*

Para confirmação das interações por ensaios de duplo híbrido foi utilizada a linhagem PJ69-4a (ou α) de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa, *trp1*-901, *leu2*-3,112, *ura3*-52, *his3*-200, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *LYS2* : : *GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2*, *met2* : : *GAL7-lacZ* (James & Craig et al., 1996). Para transformação desta linhagem de leveduras foi utilizado o protocolo de Transformação de Leveduras pelo método polietileno glicol/ DNA carreador fita simples/ acetato de lítio (PEG/ ssDNA/ LiAc) descrito por Gietz & Woods (2002). A cepa de levedura PJ69-4a foi previamente plaqueada em meio YPD sólido (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de D-glicose; 2% de Bacto-ágar) e crescida por 2 dias em estufa 30°C. Foram preparados inóculos contendo a levedura selvagem em meio YPD líquido incubados por 16 horas a 30°C/200 rpm. As células foram centrifugadas por 30 segundos a 14.000 rpm. Aos *pellets* foi adicionado um mix de transformação contendo 240 μ L PEG 3350 50% w/v; 36 μ L LiAc 1M; 50 μ L ssDNA de esperma de salmão (2 mg/mL) fervido por 5 minutos e resfriado em banho de gelo; 5 μ L de plasmídeo pOBD-isca (obtido através de *miniprep* como descrito acima) e água para completar um volume final de 360 μ L. As células foram ressuspensas, submetidas a choque térmico no banho a 42°C por 2 horas e novamente centrifugadas. Os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de água e então amostras de 100 μ L foram plaqueadas em meio SC +Ade +His +Leu –Trp (0,66% base nitrogenada sem aminoácidos; 2% glicose; 0,008% adenina; 0,008% histidina; 0,008% leucina; 2% Bacto-ágar) e incubadas em estufa 30°C por 4 dias. Foram crescidos inóculos a partir desta placa contendo pOBD-isca e então transformados novamente como descrito acima, mas agora adicionando os plasmídeos pOAD-presa (mesma quantidade e também obtidos por *miniprep*). Estes duplo-transformantes foram então crescidos em meio SC +Ade +His – Leu –Trp e incubados em estufa a 30°C por 4 dias.

3.1.2. Teste de ativação dos genes repórteres *in vivo*

A cepa de levedura utilizada contém três promotores (GAL1, GAL2 e GAL7) para seleção dos repórteres *HIS3*, *ADE2* e *lacZ*, artifício que tem se mostrado eficiente na redução de falsos-positivos. A partir das placas de transformação contendo ambos os plasmídeos (pOBD-isca + pOAD-presa) 16 clones de cada condição foram repicados para um meio mais seletivo agora sem histidina (marcador auxotrófico *HIS3*) e crescidos em estufa a 30°C por 3 a 4 dias. Em seguida, os clones obtidos foram repicados para um outro meio ainda mais seletivo que o anterior, sem os aminoácidos histidina e adenina (marcadores auxotróficos *HIS3* e *ADE2*), e com ou sem 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) nas

concentrações de 0, 3 e 5 mM. Este composto é utilizado para reduzir a ativação basal de *HIS3* quando são observadas interações fracas entre as proteínas de fusão, por ser capaz de inibir competitivamente o produto do gene *HIS3*. As placas foram incubadas em estufa 30°C por 3 a 4 dias. Estes procedimentos foram repetidos para cada clone isolado sob três condições: pOBD-isca + pOAD-presca, pOBD-vazio + pOAD-presca, pOBD-isca + pOAD-vazio. Sendo que as duas últimas condições citadas funcionaram como controles.

3.2. Clonagem, Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em *E. coli*

3.2.1. Domínios TPR e TRX de TDX

Com o intuito de mapear a região de interação de TDX com as proteínas PthA, Cyp e Uev; os domínios TPR e TRX da TDX foram subclonados nos vetores pOAD e pOBD para ensaios *in vivo* de duplo-híbrido e nos vetores pGEX-4T-1 ou pGEX-4T-2 (GE Healthcare) e pET28a (Novagen) para ensaios *in vitro* de pull-down.

Na subclonagem do domínio TPR (306 pb) em pET28a, esta região foi removida do plasmídeo pET28a-TDX nos sítios de restrição *NdeI/EcoRI* e ligada no vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. Já o domínio TRX (315 pb) foi removido do mesmo plasmídeo, porém nos sítios de restrição *EcoRI/NotI* e ligado no vetor pGEX-4T-2 digerido com as mesmas enzimas de restrição. Posteriormente, foi feita uma outra construção para ser expressa em *E. coli* e utilizada nos ensaios de pull-down. O domínio TPR foi subclonado do plasmídeo seqüenciado pOAD-TPR (construção descrita abaixo) nos sítios de restrição *Sall/NotI* para o vetor pGEX-4T-1 digerido nos mesmos sítios de restrição. Após digestão com estas enzimas, vetor e inserto foram extraídos do gel de agarose (1%), purificados com Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligados com T4 DNA ligase (Fermentas) sob incubação no banho a 16°C por 14 a 16 horas. Esta ligação foi então transformada em células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico, plaqueada em meio LB seletivo com 50 μ g/mL Kana (pET28a - resistência a kanamicina) ou 100 μ g/mL Amp (pGEX-4T-1 e pGEX-4T-2 – resistência a ampicilina) e incubadas em estufa 37°C por 16 horas. Para verificar clones transformantes, alguns deles foram crescidos em meio líquido seletivo e os plasmídeos purificados por *miniprep* e digeridos nos sítios de restrição apropriados citados acima. Os plasmídeos que liberaram o inserto esperado foram confirmados por seqüenciamento de DNA. Após a confirmação da clonagem os plasmídeos foram usados para transformar células competentes de *E. coli* para expressão, BL21(DE3), por eletroporação.

Para os ensaios de duplo-híbrido, o domínio TPR foi removido do plasmídeo seqüenciado TPR-pET28a nos sítios de restrição *NdeI/NotI* e subclonado nos vetores pOAD e pOBD digeridos com as mesmas enzimas. Já em relação ao domínio TRX, foi feita uma digestão do plasmídeo pOAD-TDX

com *EcoRI* e uma banda correspondente ao vetor pOAD + domínio TRX (banda TPR liberada) foi purificada de gel de agarose 1% e ligado com T4 DNA ligase na presença da enzima *Klenow* exo- (Fermentas) para preencher as pontas. Esta enzima possui atividade de polimerase 5'=>3', mas não possui atividade de exonuclease 3'=>5' e 5'=>3' da DNA Polimerase I e assim, é responsável pela adição de um ou mais nucleotídeos extra em uma ponta 3' *blunt*. Clones transformantes, neste último caso, foram selecionados por PCR de colônia utilizando os primers pOADF e o reverso da TDX (TDX *NotI* - 3'- GCG GCC GCA TTA TTC AGG AGT GG -5'). Através de seqüenciamento de DNA, foram selecionados clones positivos na PCR de colônia que estavam no *frame* de leitura corretos.

As construções pGEX-4T-1-TPR, pET28a-TPR e pGEX-4T-2-TRX foram então expressas em 100 mL de meio LB Amp (100 µg/mL - para pGEX) e meio LB Kana (50 µg/mL - para pET28a) em diferentes temperaturas: 25, 30 e 37°C (a fim de testar se a temperatura influenciaria na solubilidade da proteína) sob agitação constante de 200 rpm. As culturas foram crescidas até atingirem a fase logarítmica - OD (*optical density*) a 600 nm entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância e a síntese das proteínas recombinantes foi induzida por 2 horas com adição de 0,4 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo).

Foram realizados testes para verificar a solubilidade e se estas proteínas fusionadas a cauda de Histidina ou GST apresentavam afinidade por resina de níquel (Ni-NTA Agarose - Qiagen) e resina “*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*”, respectivamente. Para lisar as células, equilibrar e lavar a resina foi utilizado tampão PBS 1X pH 7,4; 1 mM DTT. As células foram lisadas com 4 mL de tampão e 1 mg/mL de lisozima a 4°C por 30 minutos. As suspensões foram sonicadas (10 a 15 pulsos de 20 segundos) e centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 45 minutos. A fração solúvel lisada (1 mL) foi incubada com 50 µL de resina sob leve agitação a 4°C por 2 horas. Após o período de incubação, a resina foi recuperada por centrifugação 1.000 x g por 1 minuto e lavada com PBS (50 volumes de coluna). A proteína ligada à resina foi eluída com tampão de amostra SDS-PAGE, sendo fervida a 95°C por 15 minutos. A indução, a solubilidade e a purificação foram avaliadas por gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE e coloração com o corante *Coomassie blue*.

3.2.2. Ubc13 de *Citrus sinensis*

A ORF foi amplificada a partir de biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis* (disponível em nosso laboratório), com os primers Ubc13F (*SalI/NcoI*: 5'- GTC GAC CCA TGG CGA ACA GTA ATC TCC CTC GAC G -3') e Ubc13R (*NotI*: 3'- GCG GCC GCC ATG TCA TCA AGC ACC ACT GGC -5'), contendo os sítios de restrição em destaque para facilitar a clonagem nos vetores do duplo-híbrido e nos vetores de expressão. Com o objetivo de amplificar esta ORF foi feita uma reação de PCR utilizando-se 200 ng de cDNA de *C. sinensis*, 20 pmoles de cada primer Ubc13F e Ubc13R; 0,25 mM de dNTPs; 1 mM de MgCl₂ e *Taq platinum* (1 U/µL), para um volume final de reação de 20 µL. Foram realizados 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 40 segundos e 2 minutos a 72°C.

Uma única banda foi amplificada com tamanho por volta de 500 pb e corresponderia a Ubc13 que possui 462 pb. Esta banda foi extraída do gel de agarose (1%), purificada como descrito no item 3.2.1 e ligada em vetor pGEM-T Easy (Promega) por 1 hora na temperatura ambiente. A ligação foi então transformada em células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico e plaqueada em meio LB seletivo com 100 μ g/mL Amp (pGEM-T – resistência a Amp), 40 μ g/mL de X-Gal e 0,4 mM de IPTG. Os clones transformantes foram selecionados por digestão com *Sall/NotI* e *NcoI/NotI*. O inserto *Sall/NotI* foi subclonado em pGEX-4T-1 e o *NcoI/NotI* foi subclonado nos vetores pOAD, pOBD e pET28a. Os clones foram confirmados por seqüenciamento de DNA.

Os plasmídeos pET28a-Ubc13 e pGEX-4T-1-Ubc13 foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21(DE3) por eletroporação. Foram realizados testes de expressão a 25, 30 e 37°C e indução com IPTG por 2 a 3 horas, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item acima. Todas as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE.

3.2.3. PthAs em pET28a

PthAs de *Xac* expressos em pET28a foram purificadas por afinidade em resina de níquel. Foram utilizados os seguintes tampões: A (de lise) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT; B (de lavagem) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 15 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT e C (de eluição) - 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5 mM DTT. A lise das células foi feita com 15 mL de tampão A e 1 mg/mL de lisozima a 4°C por 30 minutos. As suspensões foram sonicadas (20 pulsos de 10 segundos, ou até clarificação do extrato, amplitude 40%) e centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 1 hora. O extrato solúvel lisado e filtrado (0,45 μ m) foi aplicado em coluna de gravidade contendo 600 μ L de resina pré-equilibrada com tampão A e fluxo de 0,3 mL/min. Foram feitas 3 lavagens com 2 volumes de coluna cada (tampão B) e 6 eluições com 1 volume de coluna cada (tampão C). A indução, a solubilidade e as frações eluídas foram analisadas por gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE.

3.2.4. 6xHis-Cyp e 6xHis-Uev

As proteínas Cyp e Uev de citros transformadas em BL21(DE3) foram expressas em diferentes temperaturas, crescidas até OD 0,6 e induzidas com 0,4 mM de IPTG por 2 a 3 horas. As amostras foram lisadas, sonicadas e purificadas por cromatografia de afinidade em resina NiNTA como descrito no item acima. Para os ensaios de atividade enzimática de Cyp, a cauda de Histidina foi clivada com Trombina por 16 horas a 16°C. A indução, a solubilidade e as frações eluídas foram analisadas por gel de poliacrilamida (12 ou 13%) SDS-PAGE.

3.2.5. Expressão e Purificação de Formas Truncadas de PthAs de Xac

As construções pET28a-PthA-RD2, pET28a-PthA 5.5rep+CT2 e pET28a-PthA-CT2 foram transformadas em células competentes de *E. coli* DH5a por choque térmico e, em seguida, BL21(DE3) por eletroporação, para expressão. Estas proteínas foram expressas e induzidas como descrito no item 3.2.1.

As purificações foram feitas por afinidade em resina de cobalto Talon (*Talon Metal Affinity Resin - Clontech*) ou resina níquel (Ni-NTA). Foram utilizados os seguintes tampões: AB (de lise, equilíbrio e lavagem) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 15 mM imidazol; 5% glicerol; 1 mM PMSF, 0,5% Nonidet-P40 e C (de eluição) – contendo 200 mM imidazol. A lise das células foi feita com 20 mL de tampão AB, 1 mg/mL de lisozima, 0,5% de NP-40 (Nonidet) e 10 µg/mL de RNase a 4°C por 30 minutos. As suspensões foram sonicadas (10 a 25 pulsos de 20 segundos, ou até clarificação do extrato, amplitude 40%) e filtradas em gase (para remover DNA genômico) antes de serem centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 1 hora. Os extratos solúveis lisados e filtrados foram incubados com DNase (0,5 µg/mL) e 2 mM de MgCl₂ e aplicados em coluna contendo 1 mL de resina equilibrada com tampão AB. Foram feitas 5 lavagens com 5 volumes de coluna com o mesmo tampão e de 6 a 10 eluições com 1 volume de coluna cada (tampão C). Nas amostras eluídas foi adicionado DTT para concentração final de 1 mM. A expressão e purificação destas construções foram analisadas por gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE.

3.3. Ensaios de GST Pull-Down

As proteínas recombinantes (α -importina, Cyp, TDX e seus domínios TPR e TRX, Uev e Ubc13) expressas em fusão com GST, foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (PBS 1X pH 7,4 ; 1 mM de DTT), lisadas e as frações solúveis obtidas foram incubadas separadamente com 50 µL de resina “*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*” (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com tampão de ligação (mesmo de lise), por 1 hora e 30 minutos sob leve agitação a 4°C. Após o período de incubação, a resina foi lavada com tampão de ligação (30 volumes de coluna), para remoção de amostra não ligada. Em seguida, esta resina foi incubada com 1 mL pET28a-PthA2, pET28a-PthA4, pET28a-PthA-RD2, pET28a-PthA5.5rep+CT2 ou pET28a-PthA-CT2 previamente expressas e purificadas por afinidade em resina NiNTA como já descrito anteriormente. A incubação foi realizada por 2 horas sob leve agitação a 4°C. As amostras foram centrifugadas e a resina lavada com tampão de ligação (40 volumes de coluna). As proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de amostra SDS-PAGE sendo fervidas por 15 minutos a 95°C e fracionadas em gel de poliacrilamida 10% para coloração com corante *Coomassie blue* e visualização por Western blot com os anticorpos

Anti-PthA e Anti-GST, como será descrito no item 3.15. Como controle foi realizado o mesmo procedimento para a proteína GST sozinha presa à resina e incubada separadamente com as mesmas proteínas purificadas mencionadas acima.

O ensaio de interação entre GST-Cyp e 6xHis-PthA2 foi realizado também na presença do inibidor de ciclofilinas, CsA. 100 μ M da proteína purificada (6xHis-PthA2) foi incubada com 200 μ M de CsA. GST imobilizada na resina foi utilizada como controle.

Foram realizados também ensaios para testar a interação das proteínas TDX, Cyp e Uev entre elas. Para tal, frações solúveis lisadas de GST-TDX e GST-Cyp foram imobilizadas em resina. Em seguida, as resinas contendo GST-TDX imobilizada foram incubadas com as seguintes proteínas purificadas: 6xHis-Uev, 6xHis-Cyp e uma combinação de 6xHis-Uev + 6xHis-Cyp. Já a resina contendo GST-Cyp imobilizada foi incubada com 6xHis-Uev purificada. Como controle foi realizado o mesmo procedimento para a proteína GST sozinha presa à resina. As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 10 e 13% para coloração com corante *Coomassie blue* e visualização por Western blot, com os anticorpos Anti-6xHis (Sigma) e Anti-GST (Sigma).

O mesmo procedimento foi empregado para testar a interação da proteína Uev com a proteína Ubc13 isolada da biblioteca de cDNA de citros. Para tal, fração solúvel lisada de Ubc13 fusionada a GST foi imobilizada em resina. Em seguida, a resina contendo esta proteína imobilizada foi incubada com 6xHis-Uev purificada por afinidade como descrito no item 3.2.4. Foram seguidas as mesmas etapas descritas no início deste item. Como controle foi realizado o mesmo procedimento para o extrato solúvel de GST presa à resina e incubada com 6xHis-Uev purificada. As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 10 e 12% e visualizadas por Western blot, com os anticorpos Anti-6xHis e Anti-GST.

3.4. Ensaio de Atividade PPlásica de Ciclofilina

As proteínas da família das ciclofilinas são conhecidas por possuírem atividade de peptidil-prolil *cis-trans* isomerase (PPlase), a qual catalisa a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas precedentes de resíduos de prolina (Gullerova et al., 2006). Estas enzimas aceleram a taxa de enovelamento *in vitro* e tem habilidade de se ligar a proteínas, além de atuarem como chaperones (Galat, 1993). As ligações peptídicas podem adotar duas conformações, *cis* ou *trans*. Em todas as ligações peptídicas amida, os isômeros *trans* são favorecidos. Entretanto, as características estruturais do iminoácido prolina capacitam ambas as conformações *cis* e *trans*. As ligações peptidil-prolil *cis* estão presentes em pequena porcentagem em proteínas não-enoveladas (Coaker et al., 2006). A isomerização de ligações de *cis* para *trans* ocorre espontaneamente, porém numa taxa muito lenta (Romano et al., 2004). E como este é um passo limitante no enovelamento proteico, a importância destas enzimas é salientada pelo fato de que mais de 90% das ligações prolil imídicas

estão na conformação *trans* (Stewart et al., 1990). A isomerização espontânea de ligações peptídil-prolil requer energia livre e é um processo lento, particularmente em temperaturas mais baixas, e isto constitui o passo limitante no enovelamento. As ciclofilinas estabilizam o estado de transição *cis-trans* e aceleram a isomerização, um processo que é considerado importante não só no enovelamento proteico, mas também durante a reunião de proteínas multidomínios (Wang & Heitman, 2005).

A atividade de PPlase da Cyp de citros foi determinada através de um ensaio enzimático pareado com a α -quimiotripsina, de acordo com Kofron et al., 1991, com algumas modificações. Neste ensaio foi utilizado um substrato cromogênico da α -quimiotripsina, N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide (Suc-AAPF-pNA) (Sigma-Aldrich) ressuspendido em TFE (Trifluoroetanol) contendo 470 mM de LiCl, para maximizar a quantidade de peptídeo presente como isômero *cis*. A atividade foi medida pelo aumento na absorbância no comprimento de onda de 390 nm devido a liberação do p-nitroaniline pela clivagem proteolítica do substrato Suc-AAPF-pNA. O ensaio foi realizado com a temperatura controlada em 10°C. A solução aquosa do substrato foi preparada imediatamente antes do uso e mantida no gelo durante o procedimento.

Para este experimento a proteína recombinante Cyp foi expressa em *E.coli*, purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel e a cauda de Histidina clivada com Trombina, como descrito no item 3.2.4. Cyp também foi incubada na presença de 15 nM de 6xHis-PthA2 purificada ou com Ciclosporina A (CsA) nas concentrações de 30 e 300 nM ou ainda com o controle negativo BSA (Bovine-Serum Albumine) purificada.

Ambas as proteínas purificadas foram dialisadas para o tampão da reação enzimática: 50 mM HEPES pH 8,0; 100 mM NaCl, utilizando membrana de 12-14.000 Da. As amostras foram mantidas sob leve agitação a 4°C por 16 a 18 horas.

A concentração das proteínas foi determinada por técnicas espectroscópicas, através da absorção no comprimento de onda de 280 nm. Após a subtração do branco (tampão da diálise), as leituras foram utilizadas para estimar a concentração das proteínas pela equação de Beer-Lambert: $A = \epsilon \times l \times C$, onde A é a leitura de absorbância; ϵ , coeficiente de absortividade molar; l , comprimento do caminho ótico em centímetros e C , concentração em mol/L. Os valores de ϵ foram calculados pelo programa ProtParam Tool (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) de acordo com Gill & Von Hippel (1989).

As reações foram feitas em triplicata utilizando diferentes concentrações da proteína em questão variando de 0 nM (branco) a 1 μ M, sendo o volume final da reação de 1 mL. A proteína, nas suas diferentes concentrações, juntamente com o tampão da reação foram colocados em cubeta de quartzo, com comprimento óptico de 1 cm, dentro do espectro e a temperatura deixada estabilizar em 10°C durante 5 minutos. Em seguida, proteína e tampão foram incubados com 1 mg da protease α -

quimiotripsina e imediatamente após, com 100 μ M do substrato Suc-AAPF-pNA. A catálise então se inicia logo após adição do substrato e a absorbância a 390 nm foi monitorada, em espectrofotômetro UV/visível, de 5 em 5 segundos durante 5 minutos. Após definida a melhor concentração de Cyp para visualização da curva de atividade foram procedidos os ensaios na presença da proteína 6xHis-PthA2 purificada, do inibidor CsA ou do controle BSA purificada.

Foram então obtidas médias entre as triplicatas de cada procedimento e os valores, plotados em gráficos da absorbância no comprimento de onda de 390 nm em função do tempo em segundos.

3.5. Expressão Transiente em *Nicotiana benthamiana*

As sementes de *Nicotiana benthamiana* (cedidas por Dr. Robert Sablowski do John Innes Centre – Norwich - UK) foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (10%) por 10 minutos e lavadas em água estéril antes de serem transferidas para placas de meio de cultura MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) contendo 10 g/L de sacarose e 3 g/L de phytigel. As sementes foram germinadas em uma sala com temperatura controlada de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 8 horas de escuro e 16 horas de luz. Após a germinação, as plântulas foram periodicamente transferidas para um novo meio de cultura a fim de obterem bom desenvolvimento. E, então, transferidas para solo autoclavado, contendo duas partes de substrato para uma parte de vermiculita e mantidas nas mesmas condições de crescimento.

3.5.1. Clonagem das proteínas em vetor binário

Há duas estratégias para a transferência de genes via *Agrobacterium tumefaciens*: o sistema de vetor cointegrado e o sistema do vetor binário, que é o mais utilizado atualmente. Em todos os experimentos de expressão transiente utilizaram-se as cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 e EHA105, contendo o vetor binário pBI121 (Clontech).

As seguintes construções utilizadas já estavam disponíveis em nosso laboratório: pBI121-PthA2, pBI121-PthA3 e como controle pBI121-GUS.

A construção pBI121-PthA4 foi feita a partir da subclonagem do plasmídeo pET29a-PthA4 nos sítios de restrição *Xba*I/*Xho*I e ligado no pBI121 previamente digerido com *Xba*I/*Sac*I utilizando um adaptador *Xho*I/*Sac*I (5'- TCG AAG CT -3'). A confirmação desta construção foi realizada por seqüenciamento de DNA com primers *forward* 35S (5'- CCT TCG CAA GAC CCT TCC TC -3'), PthA RD *forward* (5'- CGG GAT CCC CCA TGA ACC TGA CCC -3') e PthA RD *reverse* (3'- GAG CTC GAG ATT ACT GGG CAA CAA TGC T -5').

3.5.2. Transformação em cepas competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

As construções em pBI121 depois de confirmadas por seqüenciamento foram utilizadas para transformar células competentes de *A. tumefaciens* LBA4404 e EHA105 por eletroporação. Estas

culturas foram crescidas por 48 horas em estufa a 28°C, em meio YEP sólido (10 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl e 10 g/L de Bacto-ágar) com os antibióticos adequados à seleção: 50 µg/mL de kana (resistência no T-DNA) e para as cepas em questão; 100 µg/mL de rifampicina e 25 µg/mL de estreptomicina (resistência cromossomal). A fim de se fazer uma triagem dos transformantes, colônias isoladas de *A. tumefaciens* que cresceram em meio YEP seletivo foram submetidas à PCR de colônia com oligonucleotídeos específicos.

3.5.3. Agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana*

A transformação via *Agrobacterium* foi realizada na superfície adaxial das folhas em plantas com 5 semanas de idade aclimatadas em sala climatizada. Culturas transformadas em *A. tumefaciens* contendo o cassete de expressão foram crescidas no meio líquido YEP seletivo até atingirem OD a 600 nm entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância a 28°C sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida, foram coletadas por centrifugação (2.500 x g por 5 minutos) e ressuspensas em tampão de infiltração (MES pH 5,6; 2 mM Na₂HPO₄; 0,5% de glicose; 100 µM de acetoseringona). Estas suspensões foram então infiltradas, com o auxílio de seringas de 1 mL sem agulha, em folhas de *Nicotiana benthamiana* usando-se de quatro a seis pontos de inoculação por folha; e estas plantas, mantidas em sala com temperatura controlada e continuamente observadas quanto à manifestação de sintomas.

3.6. Experimentos de Fluorescência GFP e DsRed

O gene GFP codifica a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*), composta por 238 aminoácidos que é intrinsecamente fluorescente, isto é, não necessita de substrato ou cofatores, e emite uma luz verde quando exposta à irradiação ultravioleta (Chalfie et al., 1994). GFP não provoca interferência nas atividades celulares, o seu ensaio é simples e sua atividade pode ser detectada por vários métodos, inclusive usando microscopia de fluorescência, microscopia confocal ou medindo intensidade de fluorescência em células individualmente (Welsh et al., 1997); sendo estável em condições de ensaio (Cubitt et al., 1995). A GFP possui várias propriedades favoráveis a seu uso como repórter, incluindo localização citoplasmática, baixa toxicidade e fácil visualização e quantificação (Chalfie et al., 1994). O gene repórter GFP pode ser utilizado em uma grande variedade de aplicações biológicas. Estudos mostraram o uso de GFP na quantificação da expressão gênica, na marcação de células, na localização de proteínas e no monitoramento da transferência gênica (Welsh et al., 1997).

As seguintes construções utilizadas já estavam disponíveis em nosso laboratório: pBI121-PthA1-GFP, pBI121-PthA2-GFP, pBI121-PthA3-GFP e como controle pBI121-GFP.

A construção pBI121-PthA4-GFP foi preparada a partir da subclonagem do plasmídeo pET29a-PthA4 digerido com *SacI/NotI* (vetor + PthA4 linearizado). Este fragmento foi ligado a EGFP N1,

obtido por meio da digestão do vetor pEGFP N1 (Clontech) com *SacI/NotI*. Em seguida, esta construção pET29a-PthA4-GFP foi submetida a uma outra subclonagem através da digestão com as enzimas *XbaI/XhoI* para o vetor pBI121 com o adaptador *XhoI/SacI*, como procedido para a construção pBI121-PthA4, descrito no item 3.5.1.

Como controle para a DsRed foi produzido um plasmídeo contendo o gene repórter DsRed no vetor binário pBI121. Para tal, a DsRed foi removida do vetor pDsRed-Monomer-C1 (Clontech) nos sítios de restrição *NcoI/SacI* e subclonada no pUC-pBI121-GFP (2x35S - cedido pelo Prof.Dr. Ivan de Godoy Maia da UNESP - Botucatu). O *casset* desta construção pUC-pBI121-DsRed foi removido com *HindIII/SacI* e subclonado no vetor pBI121. Esta construção controle pBI121-DsRed foi então utilizada para a clonagem das proteínas TDX, Cyp, Uev e Ubc13. As quatro proteínas foram removidas do pOAD com as enzimas *Sall/NotI* e subclonadas em pET28a. E na seqüência, removidas deste vetor nos sítios de restrição *Sall/XhoI* e ligadas no vetor pBI121-DsRed linearizado com *XhoI* (sítio *XhoI* no final da seqüência da DsRed). Clones transformantes foram selecionados por PCR de colônia com primers *forward* da DsRed (5'- GGA CAT CAC CAA CCA CAA CG -3') e *reverse* de cada proteína em questão (TDX *NotI*, Cyp *NotI*, Uev *NotI* e Ubc13 *NotI*). A confirmação dos clones foi feita por seqüenciamento com primer *forward* da DsRed e por digestão com enzimas de restrição específicas para cada construção (Cyp – digestão com *SacI* e Uev – com *HindIII/BamHI*).

Estes plasmídeos foram transformados em cepas competentes de *A. tumefaciens* conforme descrição do item 3.5.2 e então, infiltradas em *N. benthamiana* como no item 3.5.3. A localização destas proteínas foi visualizada utilizando microscopia de fluorescência. Para marcação de núcleos foi empregado o corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole – Sigma-Aldrich). Este composto foi diluído em tampão PBS 1X pH 7,4 para concentração final de 600 nM e deixado em contato com a superfície foliar a ser analisada por 10 a 15 minutos no escuro antes da observação.

3.7. Clonagem, Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em *S. cerevisiae*

3.7.1. Clonagens em vetor para expressão de proteínas em *S. cerevisiae*

As proteínas de citos Uev em vetor pGEX-4T-1 e Ubc13 em vetor pGEM-T foram subclonadas para o vetor pYEX 4T-1 (Clontech) nos sítios de restrição *Sall* e *NotI*. As proteínas PthA2 e PthA4 de *Xac* em vetor pOBD foram digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e, então, subclonadas no vetor pYEX 4T-1 previamente digerido com as mesmas enzimas. Desta forma, os PthAs foram expressos sem a porção inicial da região N-terminal correspondente a aproximadamente 100 aminoácidos. O vetor pYEX 4T-1 expressa os genes clonados sob o controle do promotor *CUP1*, que é induzível por Cu^{+2} e contém uma cauda de GST. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras freqüentemente possuem antigenicidade e atividade funcional das proteínas nativas, sendo esta a

principal vantagem deste sistema comparado aos sistemas de expressão em *E.coli*. Este vetor possui um gene de resistência a Ampicilina (Amp^R) em *E.coli* e em leveduras marcadores de seleção *leu2-d* (um gene *LEU2* truncado, mas com promotor funcional) e *URA3*. As variantes 2 e 4 do PthA em fusão com GFP também foram clonadas neste vetor para expressão em leveduras. A construção pET29a-PthA4-GFP foi então digerida nos sítios de restrição *Xba*I/*Sac*I e o vetor pET29a-GFP, liberado desta digestão, foi purificado e ligado com o inserto PthA2 proveniente do plasmídeo pET28a-PthA2 digerido com as mesmas enzimas de restrição. Para obter PthA4-GFP em pYEX 4T-1, o plasmídeo pET29a-PthA4-GFP foi linearizado no sítio *Not*I e ligado no vetor de interesse linearizado também com *Not*I e desfosforilado. Para a desfosforilação, o vetor purificado foi incubado com tampão de desfosforilação, água e CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) em banho 37°C durante 1 hora e 30 minutos. O plasmídeo desfosforilado foi obtido utilizando Kit de Purificação de PCR (Qiagen). Após digestão com estas enzimas, vetor e inserto foram extraídos do gel de agarose (1%), purificados com Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligados com T4 DNA ligase (Fermentas) sob incubação no banho a 16°C por 14 a 16 horas. Esta ligação foi então transformada em células competentes de *E. coli* DH5 α ou DH10B por choque térmico, plaqueada em meio LB seletivo com 100 μ g/mL Amp e incubadas em estufa 37°C por 16 horas. Para verificar clones transformantes, alguns deles foram crescidos em meio líquido seletivo e os plasmídeos purificados por *miniprep*. Todas as construções foram confirmadas por PCR de colônia e seqüenciamento de DNA utilizando os primers pYEX 4T *forward* (5'- GCA TGG CCT TTG CAG GG) e pYEX 4T *reverse* (5'- TTT GCA GCT ACC ACA TT).

3.7.2. Transformação das construções pYEX 4T-1 em leveduras

Foram utilizadas a cepa selvagem SUB62 (*MATa lys2-801leu2-3, 112 ura3-52 his3-D200 trp1-1[am]*) e as cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ cedidas por Dr. Robert Cohen e Dr. Candice Carlile (Hofmann & Pickart, 1999). Nestes mutantes a lisina 63 foi trocada por arginina e com isso, essas leveduras não são capazes de realizar ubiquitinação K63 e são deficientes na via *Rad6* de reparo no DNA. As cepas foram recuperadas em meio completo YPD e em seguida, foram repicados em meio seletivo SC –Leu –Ura e crescidas em estufa 30°C por 4 a 5 dias. Foram preparados inóculos contendo uma das cepas de levedura descritas em meio YPD líquido incubados por 16 horas a 30°C/200 rpm. As células foram centrifugadas e aos *pellets* foi adicionado um mix de transformação contendo 240 μ L PEG 3350 50% w/v; 36 μ L LiAc 1M; 50 μ L ssDNA de esperma de salmão (2 mg/mL); 5 μ L de plasmídeo pYEX 4T-1 e água para completar um volume final de 360 μ L. As células foram ressuspendidas, submetidas a choque térmico no banho a 42°C por 2 horas e 30 minutos e novamente centrifugadas. Os *pellets* foram ressuspendidos em 130 μ L de água, as transformações foram plaqueadas em meio SC –Leu –Ura e incubadas em estufa 30°C por 4 dias. As seguintes construções

foram transformadas dessa forma nas três cepas mencionadas: pYEX 4T-1-Uev, pYEX 4T-1-Ubc13, pYEX 4T-1-PthA2, pYEX 4T-1-PthA4, pYEX 4T-1-PthA2-GFP e pYEX 4T-1-PthA4-GFP.

3.7.3. Expressão e Purificação

Para a indução de genes clonados em vetor pYEX 4T-1, o qual contém promotor *CUP1*, foi utilizado um protocolo de indução com Cu^{+2} como descrito no manual da Clontech. As construções descritas no item anterior foram então crescidas em 100 mL de meio SC –Leu –Ura sob agitação constante de 200 rpm a 30°C por 18 horas. Após esta fase de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 550 x g por 5 minutos, ressuspensas em mais 50 mL de meio SC –Leu –Ura e, então, crescidas durante mais 2 horas a 30°C sob agitação constante de 200 rpm ou até atingirem a fase logarítmica - OD a 600 nm entre 0,8 e 1,2 unidades de absorbância e a síntese das proteínas recombinantes foi induzida por 1 a 2 horas com adição de 0,5 mM de CuSO_4 . As células foram recuperadas por centrifugação de 4.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Para verificar se proteínas PthAs são ubiquitinadas *in vivo* (em leveduras), estas proteínas obtidas por meio deste sistema de expressão em leveduras foram purificadas. Com esta finalidade, vários testes para lisar as células de leveduras e melhorar a solubilidade das proteínas recombinantes em fusão GST foram realizados. Assim sendo, foi utilizado o reagente Y-Per (Pierce) e lyticase (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, as células foram ou não sonificadas (15 pulsos de 30 segundos cada). Uma outra estratégia foi ressuspender as células em tampão Z (21,5 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 5,5 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g/L de KCl; 0,246 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH 7,0), na presença ou não de lyticase e 0,01% de Triton X-100 incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, e realizar de 3 a 7 ciclos de congelamento/descongelamento em N_2 líquido e banho a 37°C, respectivamente. Alternativamente, os pellets foram também lavados com 1,2 M de Sorbitol e ressuspensos em tampão PBS 1X pH 7,4 contendo 1 mM do inibidor de protease PMSF e lyticase incubados por 1 hora sob agitação constante de 60 rpm a 37°C. As células foram lavadas novamente com Sorbitol e ressuspensas em tampão PBS e sonificadas (8 pulsos de 15 segundos cada). Foi testado também um protocolo no qual as células foram lavadas em água MiliQ gelada, ressuspensas em tampão PBS e submetidas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento em N_2 líquido e banho a 37°C. Em seguida, foram adicionados *glass beads* previamente lavados em água MiliQ, a mistura foi vortexada 15 vezes de 30 segundos com intervalos de 1 minuto no gelo e centrifugada a 18.000 rpm por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e realizada uma nova centrifugação a 18.000 rpm por mais 50 minutos a 4°C.

O extrato solúvel lisado foi incubado com resina de GST - “*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*”, previamente equilibrada com tampão PBS, por 16 a 18 horas a 4°C sob leve agitação. Após o período de incubação, a resina foi recuperada por centrifugação 1.000 x g durante 1 minuto e lavada com PBS – 3 vezes de 10 volumes de coluna cada por 3 minutos a 500 x g. A proteína ligada à resina foi eluída com tampão de amostra SDS-PAGE, sendo fervida a 95°C por 15 minutos. A indução, a solubilidade e a purificação foram avaliadas em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE corados com *Coomassie blue* e Western blot, como será descrito em seguida no item 3.15, com Anti-PthA, Anti-GST, Anti-Ubiquitina e Anti-K63 clone HWA4C4. As amostras foram sonicadas em sonificador de banho por 15 minutos antes de serem submetidas a SDS-PAGE para evitar o efeito no gel da presença excessiva de DNA nas amostras.

3.8. Ensaios de Complementação do Fenótipo de Cepas Mutantes

As cepas mutantes em ubiquitinação específica K63 (UbK63R), *Δubc13* e *Δmms2/uev1a*, ambas são capazes de crescer e degradar proteínas em níveis normais, mas são altamente sensíveis a radiação UV e ao agente alquilante MMS (*methyl methanesulfonate*). Dessa forma, o objetivo era verificar se as cepas mutantes transformadas com as proteínas de citros Uev e Ubc13 seriam capazes de recuperar o crescimento na presença de MMS.

Para isto, a cepa selvagem SUB62, as cepas mutantes, bem como os transformantes contendo as construções pYEX 4T-1-Uev e pYEX 4T-1-Ubc13 foram crescidos em meio líquido YPD a 30°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem a fase exponencial de 0,8 unidades de absorbância. Foram plaqueadas alíquotas de 5 µL com distância de 1,5 cm entre elas em placas contendo YPD e um gradiente de MMS de 0 a 0,025% e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas.

A cepa de levedura mutante *ess1* – H164R (Wu et al., 2000) derivada da cepa selvagem W303-1A (*MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 [psi+]*) é sensível a temperatura e apresenta defeitos no ciclo celular. O gene *ESS1* codifica uma prolil isomerase essencial para a viabilidade celular. Esta cepa mutante foi transformada com a proteína Cyp de citros clonada no vetor pYEX 4T-1 ou neste vetor vazio (controle negativo). Transformantes foram crescidos em meio SC-Leu-Ura em estufa 30°C por 7 dias. As proteínas foram induzidas pela adição de 0,5 mM de CuSO₄ por 2 horas e a presença das proteínas recombinantes detectadas por análise em Western blot (descrito no item 3.15) com anticorpo Anti-GST. Para análises qualitativas de crescimento em temperaturas permissiva e não-permissiva, culturas foram crescidas até a fase logarítmica em meio YPD e diluições seriadas de 1:5 foram plaqueadas. Estas placas foram incubadas a 21°C ou 37°C por 24 horas, como indicado por Wu et al., 2000.

A proteína Ciclofilina A (CypA) é conservada em leveduras e codificada pelo gene *CPR1*. A cepa de levedura mutante neste gene (*cpr1Δ::kanMX4/cpr1Δ::kanMX4*) (Arévalo-Rodríguez & Heitman,

2005) foi também transformada com a proteína Cyp de citros ou com o vetor pYEX 4T-1 vazio como controle negativo, e induzida pela adição de CuSO_4 da mesma forma como descrito para o mutante *ess1*. CypA normalmente atua no núcleo das células no controle da esporulação. Desta forma, foram realizados ensaios de esporulação com a cepa mutante em CypA transformada com a proteína Cyp de citros. Nestes ensaios, as células foram incubadas em meio de pré-esporulação (0,8% extrato de levedura; 0,3% peptona; 6% glicose e 2% Bacto-ágar) por 48 horas em estufa 30°C. Em seguida, as células foram transferidas para um meio de esporulação (1% acetato de potássio; 0,1% extrato de levedura; 0,05% glicose e 2% Bacto-ágar) por 72 horas. As culturas foram crescidas até OD a 600 nm de 1,0 unidade de absorbância e a formação dos ascos foi monitorada por observação microscópica em diferentes pontos ao longo do tempo após transferência das células para o meio de esporulação.

3.9. Localização de PthAs em Leveduras

Com o objetivo de verificar se a localização nuclear das proteínas PthAs seria dependente do complexo Ubc13/Uev, estas proteínas em fusão com GFP no vetor pYEX 4T-1 foram então transformadas na cepa SUB62 e nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ como descrito no item 3.7.2. As proteínas em fusão GFP foram então expressas como descrito no item 3.7.3 e amostras após 2 horas de indução com CuSO_4 foram submetidas a diferentes procedimentos, visando uma melhor observação das células por microscopia de fluorescência. Para marcação de núcleos foi empregado o corante DAPI. Este composto foi diluído em tampão PBS 1X pH 7,4 para concentração final de 600 nM e deixado em contato com a superfície foliar a ser analisada por 10 a 15 minutos no escuro antes da observação na fluorescência. Foram estes procedimentos: 1) apenas fixação com etanol 50% + corante DAPI; 2) fixação com metanol 2%, Triton X-100 + DAPI; 3) fixação com formaldeído 3,7% com ou sem 0,5% de Triton X-100 + DAPI; 4) sem fixação + corante Hoechst; 5) fixação com formaldeído 8% por 18 horas a 4°C + DAPI; 6) fixação com 0,5% de Triton X-100 + DAPI; 7) fixação com formaldeído 10% + 1% de Triton X-100 + DAPI e 8) fixação com glutaraldeído 5% + 1% de Triton X-100 + DAPI. O melhor resultado foi repetido para todas as condições.

3.10. Expressão Transiente Mediada por *Agrobacterium* em Citros

Sementes de laranja doce (*Citrus sinensis*) variedade 'Hamlin' foram obtidas do Centro APTA Citros Sylvio Moreira no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC – Cordeirópolis - SP), armazenadas a 4°C e esterilizadas antes do uso por 1 minuto em etanol 70% e solução contendo 0,1% de Tween 20 sob leve agitação por 15 minutos e, em seguida, lavadas três vezes com água MiliQ. Epicótilos estiolados germinados *in vitro* foram utilizados como fontes de explantes. As sementes esterilizadas

foram inoculadas em frascos contendo meio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 50 mg/mL de mio-inositol, 25 g/L de sacarose, 5 mL/L de solução de ferro e solidificado com 7 g/L de ágar para germinação e mantidas em sala climatizada $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, durante 4 semanas e mais 2 semanas com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Após este período, os epicótilos foram cortados transversalmente em segmentos menores de 1 cm e feridos de ambos os lados. Inóculos de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pBI121-PthA2, pBI121-PthA4 e pBI121-GUS (Controle) foram crescidos por 16 horas sob agitação constante de 200 rpm a 28°C em meio YEP contendo 50 mg/L de kanamicina, 25 g/L de estreptomicina, 100 mg/L de rifampicina para seleção da bactéria. Bactérias na OD a 600 nm entre 0,8 a 1,0 unidades de absorbância foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em meio basal MS líquido contendo 60 μM de acetoseringona. Segmentos de epicótilos foram incubados por 30 minutos nestas suspensões de *A. tumefaciens* EHA105 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 1,0). Excesso da suspensão bacteriana foi removida em papel de filtro estéril e os explantes foram distribuídos em placas contendo meio de co-cultivo – meio MS basal contendo 100 μM de acetoseringona e crescidos no escuro em sala climatizada $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 dias. Após este período, os epicótilos foram macerados em tampão de amostra 2X SDS-PAGE sem corante azul de bromofenol (100 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol e 50 mM Tris-HCl pH 6,8) e as amostras aquecidas a 95°C por 15 minutos. Proteínas na fração solúvel foram recuperadas por centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente, resolvidas em gel de poliacrilamida (8 a 10%) SDS-PAGE corados com *Coomassie blue* e detectadas por Western blot com os anticorpos Anti-PthA, Anti-Ubiquitina, Anti-SUMO e Anti-K63 clone HWA4C4.

3.11. PthAs X Mecanismos de Reparo no DNA

Considerando que a cepa selvagem de levedura SUB62 é capaz de realizar ubiquitinação K63 e de crescer em certas quantidades de MMS e com o intuito de verificar se as proteínas PthAs de *Xac* estariam associados com reparo de DNA, esta cepa selvagem foi transformada com os genes PthAs 2 e 4 clonados em vetor pYEX 4T-1, como descrito no item 3.7.2. Para isto, a cepa selvagem SUB62 e os transformantes contendo as construções pYEX 4T-1-PthA2 e pYEX 4T-1-PthA4 foram crescidos em meio líquido YPD a 30°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem a fase exponencial de 0,8 unidades de absorbância. Foram plaqueadas alíquotas de 5 μL com distância de 1,5 cm entre elas em placas contendo YPD e um gradiente de MMS de 0 a 0,025% e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas.

3.12. Tentativas de Co-Imunoprecipitação de PthA em *C. sinensis*

Nos ensaios com citros foram utilizadas folhas de laranja doce da variedade pêra. Bactérias *Xac* da linhagem 306 foram crescidas em meio LB sólido sem adição de NaCl (LBON), na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de Amp, durante 48 horas em estufa 28°C . As bactérias foram coletadas mediante

raspagem das placas, ressuspendidas em água e diluídas para OD a 600 nm entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância. Folhas de laranja foram então infiltradas com estas suspensões, utilizando seringas de 1 mL, em três pontos de inoculação na superfície adaxial de cada folha. Foram infiltradas 4 folhas com *Xac* e 4 folhas com água (Controle), as áreas infiltradas foram pontilhadas e estas plantas, mantidas em salas climatizadas. Após 48 horas de infiltração foi realizada a extração de proteínas das folhas infiltradas utilizando um Kit de Extração de Proteínas Totais de Plantas (Sigma). Inicialmente as áreas infiltradas foram recortadas, as plantas maceradas com N₂ líquido e foram seguidas as etapas de extração de acordo com as instruções do kit. A fração de proteínas hidrofílicas (sobrenadante) foi incubada com Anti-PthA (1:60) ou soro pré-imune (Controle) e Proteína A Sepharose (PIERCE) a 4°C sob leve agitação por 18 horas. Foi feito também um controle negativo (água infiltrada) incubado com o anticorpo Anti-PthA (1:60) e Proteína A Sepharose. Após o período de incubação, a resina foi recuperada por centrifugação 1.000 x g durante 1 minuto e lavada 4 vezes com PBS. Proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de amostra SDS-PAGE, sendo fervida a 95°C por 15 minutos. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE corados com *Coomassie blue* e detectadas por Western blot como será descrito em seguida no item 3.15, com os anticorpos Anti-PthA, Anti-Ubiquitina e Anti-K63 clone HWA4C4.

3.13. Obtenção de Proteínas Recombinantes para Produção de Anticorpos

As proteínas de citos Cyp e Uev clonadas em pET28a e Ubc13 clonada em pGEX4T-1 foram expressas em 500 mL de meio LB Amp (100 mg/mL - para pGEX) e meio LB Kana (50 mg/mL - para pET28a) a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. As culturas foram crescidas até atingirem a fase logarítmica – OD a 600 nm entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância e a síntese das proteínas recombinantes foi induzida por 2 horas com adição de 0,4 mM de IPTG. As células foram ressuspendidas com 20 mL de tampão A1 (para as construções com cauda de Histidina - 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 15 mM imidazol; 5% glicerol; 1 mM PMSF; 0,5% Nonidet P-40) ou tampão A2 (para a construção com cauda de GST – PBS 1X pH 7,4; 1 mM de DTT; 0,5% Nonidet P-40) e incubadas com 1 mg/mL de lisozima e RNase (10 µg/mL) a 4°C por 30 minutos. As suspensões foram sonicadas, centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 1 hora e a fração solúvel lisada incubada com DNase (0,5 µg/mL) e 2 mM de MgCl₂ e filtrada em filtro 0,45 µM. As proteínas fusionadas a cauda de Histidina ou cauda de GST foram purificadas utilizando Äkta Purifier FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) e colunas pré-equilibradas com os mesmos tampões A1 para HiTrap Chelating HP 1 mL e A2 para GSTrap 1 mL (GE Healthcare). As colunas foram lavadas também com 20 a 30 volumes de coluna de tampão A1 ou A2 e eluídas com gradiente de 0 a 100% de tampão B1 (para as construções com cauda de Histidina – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 500 mM imidazol; 5% glicerol; 1 mM PMSF) ou B2 (para a construção com cauda de GST – 50 mM

de Tris-HCl pH 8,0; 20 mM de glutatona reduzida). Após purificação em todas as frações eluídas foi adicionado DTT para concentração final de 1 mM. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida (10 a 13%) – SDS-PAGE e as frações com mais alto grau de pureza foram dialisadas para tampão C1 (para as construções 6xHis-Uev e 6xHis-Cyp – 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl) ou C2 (para a construção GST-Ubc13 - 20 mM Tris-HCl pH 8,0) sob leve agitação a 4°C por 16 a 18 horas. Para as construções com cauda de Histidina foi utilizada membrana de diálise de 3.500 Da e para a construção GST-Ubc13, membrana de 12-14.000 Da.

As amostras de 6xHis-Cyp, 6xHis-Uev e GST-Ubc13 foram concentradas para 1 mg/mL utilizando concentrador Amicon Ultra Millipore MWCO – 5.000 Da em centrífuga a 4°C – 2.500 rpm e liofilizadas durante um período de 2 dias. As amostras liofilizadas foram enviadas para produção de anticorpos por imunização seriada em ratos para Célula B – Serviço de Produção de Anticorpos Mono e Policlonais (<http://www.celulab.ufrgs.br/>).

A especificidade dos anticorpos foi testada para detecção das proteínas recombinantes purificadas de *E. coli* e das proteínas endógenas de extratos proteicos de leveduras e de epicótilos de citros. Os extratos proteicos de citros foram processados por maceração mecânica com nitrogênio líquido. Tampão de amostra para SDS-PAGE foi adicionado e as amostras aquecidas por 15 minutos a 95°C, centrifugadas a 20.000 x g durante 30 minutos e as frações solúveis submetidas a Western Blot. Foram utilizados também extratos solúveis de levedura como descrito no item 3.7.3.

3.14. Tentativas de Co-Imunoprecipitação de PthA de *Xac* por proteínas de *C. sinensis*

Epicótilos de laranja doce expressando transientemente PthA2 como descrito no item 3.10 foram macerados em nitrogênio líquido e ressuspensos em tampão de lise (PBS pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100; 10 mM EDTA; 0,1 mM PMSF) contendo inibidores de protease. Extratos proteicos foram imunoprecipitados com os anticorpos policlonais Anti-Cyp, Anti-Uev ou Anti-Ubc13 (1:50) ou com os correspondentes anticorpos pré-ímmes (controles). As proteínas ligadas foram imobilizadas em resina - Proteína A Sepharose (PIERCE), separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de PVDF e imunoblottadas com os anticorpos Anti-PthA (1:5000) e Anti-Cyp (1:3000), Anti-Uev (1:3000) ou Anti-Ubc13 (1:3000) e com os anticorpos secundários Anti-rabbit (1:3000) no caso de Anti-PthA como anticorpo primário e Anti-mouse (1:3000) para os demais.

3.15. Western Blot

As análises de Western blot foram realizadas a partir de géis de acrilamida de 8 a 13%. As proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinila)

em tampão de transferência (48 mM de Tris-base; 39 mM de glicina; 0,037% de SDS e 20% de metanol). A transferência foi realizada a 350 mA por 1 hora. Após a transferência a membrana foi incubada em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado em 1X TBS-T) por 1 hora. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário em solução bloqueadora. Depois desta incubação, a membrana foi lavada três vezes (de 10 minutos cada sob leve agitação) em solução TBS-T (20 mM de Tris-base; 150 mM de NaCl, pH 7,5; 0,05% de Tween 20) e incubada com o anticorpo secundário (ECL Kit – Amersham Biosciences) por 1 hora. A membrana foi novamente lavada três vezes de 10 minutos em solução TBS-T. A detecção foi feita utilizando-se o método de quimioluminescência do Kit ECL (Amersham Biosciences).

Foram utilizados os anticorpos primários da Sigma: Anti-GST (diluição de 1:3000) e Anti-6xHis (1:3000). Os anticorpos policlonais Anti-PthA (1:5000), Anti-Cyp, Anti-Uev e Anti-Ubc13 produzidos pela Célula B – Serviço de Produção de Anticorpos Mono e Policlonais. E como anticorpos secundários correspondentes Anti-mouse ou Anti-rabbit (ambos na diluição de 1:3000), dependendo do animal no qual foram produzidos.

Além disso, nos ensaios de ubiquitinação utilizou-se também Anti-Ubiquitina (Sigma - 1:50 a 1:500), Anti-SUMO (Sigma - 1:75) e Anti-K63 clone HWA4C4 (Biomol - 1:25 a 1:500) como anticorpos primários. No caso do anticorpo Anti-K63 também foi testada a incubação em solução TBS contendo 5% de BSA e 3 mM de azida sódica, sem adição de leite sob leve agitação a 4°C por 20 horas, como descrito por Wang et al., 2008. Seu respectivo anticorpo secundário Anti-mouse também foi incubado apenas em solução TBS na ausência de leite, visto que poderia haver a possibilidade do mesmo inviabilizar a detecção do blot.

3.16. Preparação de Amostras para SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*)

3.16.1. Expressão e Purificação de PthA-RD2

A construção PthA-RD2 (apenas domínio central contendo as 15,5 repetições da variante 2 de PthA) com cauda de Histidina foi expressa em 1L de LB contendo kanamicina (50 mg/mL) até OD a 600 nm de 0,6 unidades de absorbância e induzida com 0,4 mM de IPTG por 3 horas sob agitação constante de 200 rpm a 25°C. As células foram centrifugadas, ressuspensas com tampão de ligação e lisadas como descrito no item 3.2.5. O extrato solúvel lisado e filtrado foi carregado em coluna HiTrap Chelating HP 5 mL (GE Healthcare). A coluna foi lavada com 20 volumes de coluna num fluxo contínuo de 1 mL/min. e eluída em 15 volumes de coluna com gradiente de imidazol em frações de 1 mL. Após purificação por afinidade foram feitas tentativas de purificação por Troca Iônica e Gel Filtração com as alíquotas de mais alto grau de pureza com o objetivo de melhorar a

qualidade das amostras. A proteína em questão tem ponto isoelétrico (pI) de 6,71, assim sendo em pH 8,0 foi realizada uma Troca Aniônica com coluna HiTrap HP Q-Sepharose 5 mL. As frações provenientes da purificação por Afinidade foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e diluídas em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5% glicerol; 1 mM PMSF e 0,5 mM DTT, de tal forma que após diluição a concentração de NaCl passou de 200 para 20 mM, concentração esta utilizada no tampão A. As proteínas foram eluídas com gradiente de NaCl (20 volumes de coluna) de 0 a 100% de tampão B (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 1M NaCl; 5% glicerol; 1mM PMSF e 0,5 mM DTT). Uma alternativa foi também realizar um passo de purificação por Gel Filtração após a Afinidade. Para tal foi utilizado um tampão inicial sem imidazol e PMSF (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 5% glicerol e 1 mM DTT) e coluna Superdex 75 HR 16/60 (GE Healthcare). Foi injetada uma fração proveniente da purificação por Afinidade (volume de 1 mL) direto no equipamento e, em seguida, foi feita uma segunda injeção de outra fração. Algumas alíquotas resultantes da purificação por Afinidade foram reservadas e dialisadas com mesmo tampão da Gel Filtração (sem imidazol e sem PMSF) sob leve agitação a 4°C por 18 horas. Em seguida, as mesmas foram concentradas, assim como algumas frações provenientes da purificação por Gel Filtração, com Centricon Amicon Ultra Millipore MWCO – 5.000 Da ou Centriplus MWCO – 10.000 Da em centrífuga a 4°C – 3.000 x g. Todas as alíquotas preparadas foram mantidas a 4°C até serem utilizadas.

3.16.2. DLS (*Dynamic Light Scattering*)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada como uma forma de controle de qualidade para avaliar a monodispersividade e o efeito de agregação das amostras para a coleta de dados de SAXS, além de proporcionar informação sobre tamanho hidrodinâmico das partículas em solução. A polidispersividade é relativa ao desvio padrão da amostra e pode ser dividida em 3 ramos: a amostra é monodispersa se a polidispersividade está menor que 20%, é médio dispersa se a polidispersividade está entre 20 e 30% e é polidispersa se a polidispersividade for maior que 30%. As medidas foram realizadas a temperatura constante de 4°C no equipamento DynaPro (Protein Solutions), sendo previamente centrifugadas 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C. As medidas foram obtidas com um ângulo de espalhamento de 90°C e com 300 acumulações de 10 segundos cada. Parâmetros hidrodinâmicos foram determinados usando o software DYNAMICS v.6.10.1.2.

3.16.3. Coleta de dados de SAXS

Os dados de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) foram coletados na linha de luz D11A-SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O comprimento da radiação foi ajustado para 1,488 Å e foi utilizado um detector sensível à posição MARCCD, sendo a distância amostra-detector ajustada para aproximadamente 141 cm para resultar num vetor de espalhamento de 0,1 nm⁻¹ a 3,5 nm⁻¹. Foi utilizada uma cela porta-amostras constituída de mica, para reduzir ao

mínimo possível o espalhamento do sistema e favorecer o espalhamento da amostra. O vetor de espalhamento é definido como $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$, onde q é o ângulo de espalhamento e λ , o comprimento de onda da radiação espalhada.

As medidas foram realizadas com amostras em concentrações de 1 a 2 mg/mL em temperatura constante de 18°C. Todas as amostras foram previamente analisadas por espalhamento dinâmico de luz como descrito no item 3.16.2, sendo utilizadas apenas soluções monodispersas, ou seja, que apresentaram polidispersividade menor que 20%. As amostras proteicas foram centrifugadas 10.000 x g durante 15 minutos para eliminar o efeito da presença de possíveis agregados imediatamente antes de cada experimento. As curvas de espalhamento da amostra proteica e de seu respectivo tampão foram coletadas em *frames* de 300 segundos cada para evitar danos na amostra que poderiam ser induzidos por radiação. Além disso, cada *frame* foi cuidadosamente analisado para formação de bolhas ou ocorrência de agregação da proteína induzida por radiação antes do cálculo da intensidade média e do erro experimental associado. As intensidades experimentais foram corrigidas pelo *background*, contribuições do tampão, não homogeneidade da resposta detector e decaimento da fonte de luz síncrotron. Informações sobre a *MM* da partícula espalhadora foram obtidas utilizando a proteína soro albumina bovina (BSA – 66 kDa) e a proteína lisozima (14,3 kDa), como padrões externos de *MM*, sendo diluídas no mesmo tampão das amostras proteicas. A partir da razão entre o valor extrapolado $I(q) \rightarrow 0$ para a proteína de interesse e os padrões, foi obtida uma estimativa da *MM* da partícula espalhadora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Interação Proteína-Proteína *in vivo* e *in vitro*

A cepa de levedura utilizada nos ensaios de duplo-híbrido possui diferentes genes repórteres sob o controle de diferentes promotores e isto reduz significativamente o número de falsos-positivos (James & Craig, 1996; Coates & Hall, 2003). Como descrito no item 3.1 foram utilizados os seguintes controles negativos: pOBD-vazio + pOAD-presa, pOBD-isca + pOAD-vazio. Desta forma, caso a interação seja positiva, somente a condição pOBD-isca + pOAD-presa deve crescer, indicando que há interação entre isca-presa por se restabelecer a atividade do fator de transcrição, que culmina na ativação dos genes repórteres sob seu controle. Já no caso dos controles, não deve ocorrer crescimento, pois não há ativação dos genes repórteres, visto que a proteína fusionada a um dos domínios está ausente, BD (*B*inding *D*omain) no caso pOBD-vazio + pOAD-presa e AD (*A*ctivation *D*omain) no caso pOBD-isca + pOAD-vazio. Caso houvesse crescimento nos controles seria um indicativo de que a presença de apenas uma das proteínas (isca ou presa e não a presença do potencial par de interação) estaria ativando a transcrição dos genes repórteres, fenômeno este conhecido como transativação ou auto-ativação.

A remoção de Adenina do meio de interação e a adição de 3-AT em concentrações crescentes (3 e 5 mM) proporcionaram um cenário mais restritivo. O composto 3-AT, como já mencionado, atua como um inibidor competitivo da enzima codificada pelo gene *HIS3* e seu uso se justifica pelo fato de que algumas leveduras apresentam uma expressão basal de Histidina, mesmo na ausência deste aminoácido. Com estas estratégias eliminou-se a possibilidade de auto-ativação ou transativação dos genes repórteres *ADE2* e *HIS3*, pela presença somente da isca (domínio de ligação) ou da presa (domínio de ativação) no meio. Assim sendo, pode-se dizer que as interações isca-presa confirmadas não constituem falsos-positivos.

As quatro variantes de PthAs diferem essencialmente no número das repetições do domínio central e em alguns outros aminoácidos ao longo das seqüências (**Figura 18**). Portanto, decidimos testar as interações entre todas as variantes de PthAs contra as presas selecionadas.

Ensaio de duplo-híbrido confirmaram as interações, detectadas no *screening* inicial, entre as proteínas de laranja doce α -imp, Cyp, TDX, Uev e os domínios TPR e TRX da TDX com a isca PthA2 de *Xac*. Com o intuito de verificar se estas proteínas presa interagiam também com outras variantes de PthA, além de PthA2, as iscas PthA1 (16,5 repetições no domínio central), PthA3 (15,5 repetições no domínio central) e PthA4 (17,5 repetições no domínio central) fusionadas em pOBD foram testadas. Nestes ensaios *in vivo* foram utilizadas as construções de PthAs indicadas na **Figura 19**, as quais possuem uma deleção na parte N-terminal, uma estratégia encontrada para evitar a transativação do gene repórter *HIS3* causada por esta porção da proteína. A truncagem na região N-terminal provavelmente não afetaria os resultados por não ser necessária para o desenvolvimento

dos sintomas do cancro cítrico. Em meio restritivo, todas as proteínas presa interagiram com as iscas PthA2 e PthA3, enquanto que PthA4 interagiu apenas com a α -importina (**Figura 20**). Curiosamente, PthA1 não interagiu com nenhuma das proteínas presa. Entretanto, havia a possibilidade das interações com as iscas PthA1 e PthA4 não terem sido detectadas por serem mais fracas, assim isca e presa foram riscadas em um meio menos restritivo (SC +Ade –His –Leu –Trp) (**Figura 21**). Neste meio constatou-se que a isca PthA4 interage com todas as proteínas em diferentes intensidades, com destaque para os domínios da TDX, uma vez que esta isca interagiu fortemente com TRX, mas não houve interação com TPR. Por outro lado, a isca PthA1 interagiu fracamente com a maioria das presas testadas e observou-se fraca interação com o domínio TRX e ausência de interação com o TPR, seguindo o mesmo padrão da variante PthA4.

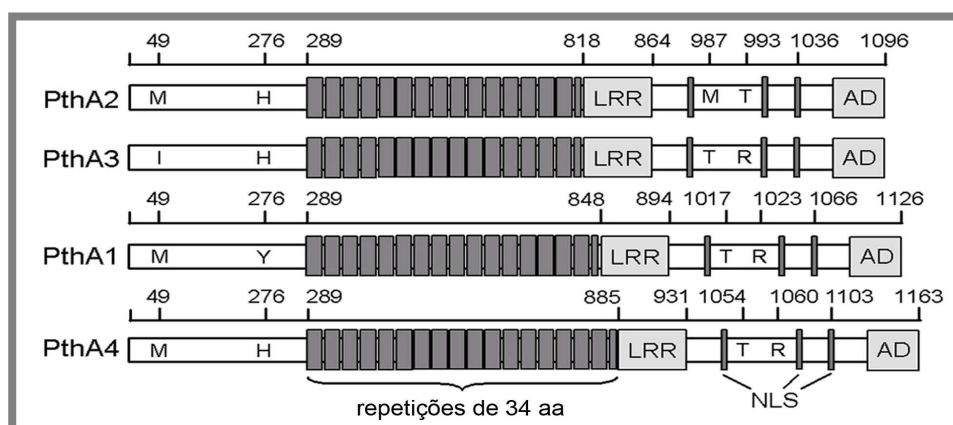


Figura 18: Representação esquemática das quatro variantes de PthAs da cepa 306 de *X. citri*. Mostrando que estas variantes diferem essencialmente no número de repetições no domínio central. Os números indicam a posição dos aminoácidos na sequência e as letras, as variações dos resíduos fora da região central repetitiva. LRR = Leucine Rich Repeat; NLS = Nuclear Localization Signal; AD = Activation Domain.

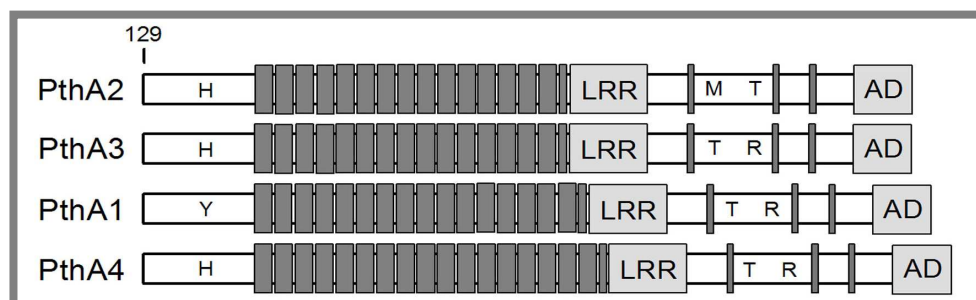


Figura 19: Representação esquemática das construções das quatro variantes de PthAs de *Xac* utilizadas nos ensaios *in vivo* de duplo-híbrido em leveduras. Os primeiros 128 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal da proteína foram removidas para evitar a transativação do gene repórter *HIS3*. As letras indicam as variações dos resíduos fora da região central repetitiva.

Nos ensaios de duplo-híbrido pode-se constatar que as variantes de 15,5 repetições (PthA2 e PthA3) seguem um mesmo padrão e interagem com todas as proteínas presa testadas, enquanto que as variantes maiores de 16,5 e 17,5 repetições (PthA1 e PthA4, respectivamente) seguem um padrão contrário, visto que não interagem com a maioria das presas ou apresentam interações mais fracas com estas. Tendo então por base estes resultados *in vivo* (em leveduras), os ensaios de confirmação *in vitro* foram realizados apenas com os PthAs 2 e 4 (construções indicadas na Figura 18).

Os experimentos de pull-down imobilizando na resina de GST o extrato de uma das proteínas expressas (iscas em fusão GST – α -imp, Cyp, TDX, TPR, TRX e Uev) e aplicando em seguida, a presa purificada (6xHis-PthA2 ou 6xHis-PthA4) podem ser analisados nas **Figuras 22A e 20B**, respectivamente. Assim como o controle da proteína GST sozinha imobilizada na resina e incubada com a presa purificada. Este controle mostrou que não houve interação inespecífica das presas com a proteína GST em ambos os casos. Os ensaios de pull-down confirmaram os resultados obtidos no duplo-híbrido, de tal forma que PthA2 interage com todas as proteínas de citros testadas, inclusive com os domínios TPR e TRX da TDX. Interações mais fortes foram observadas com α -imp e TDX (**Figura 22A**), assim como nos dados *in vivo* na Figura 20.

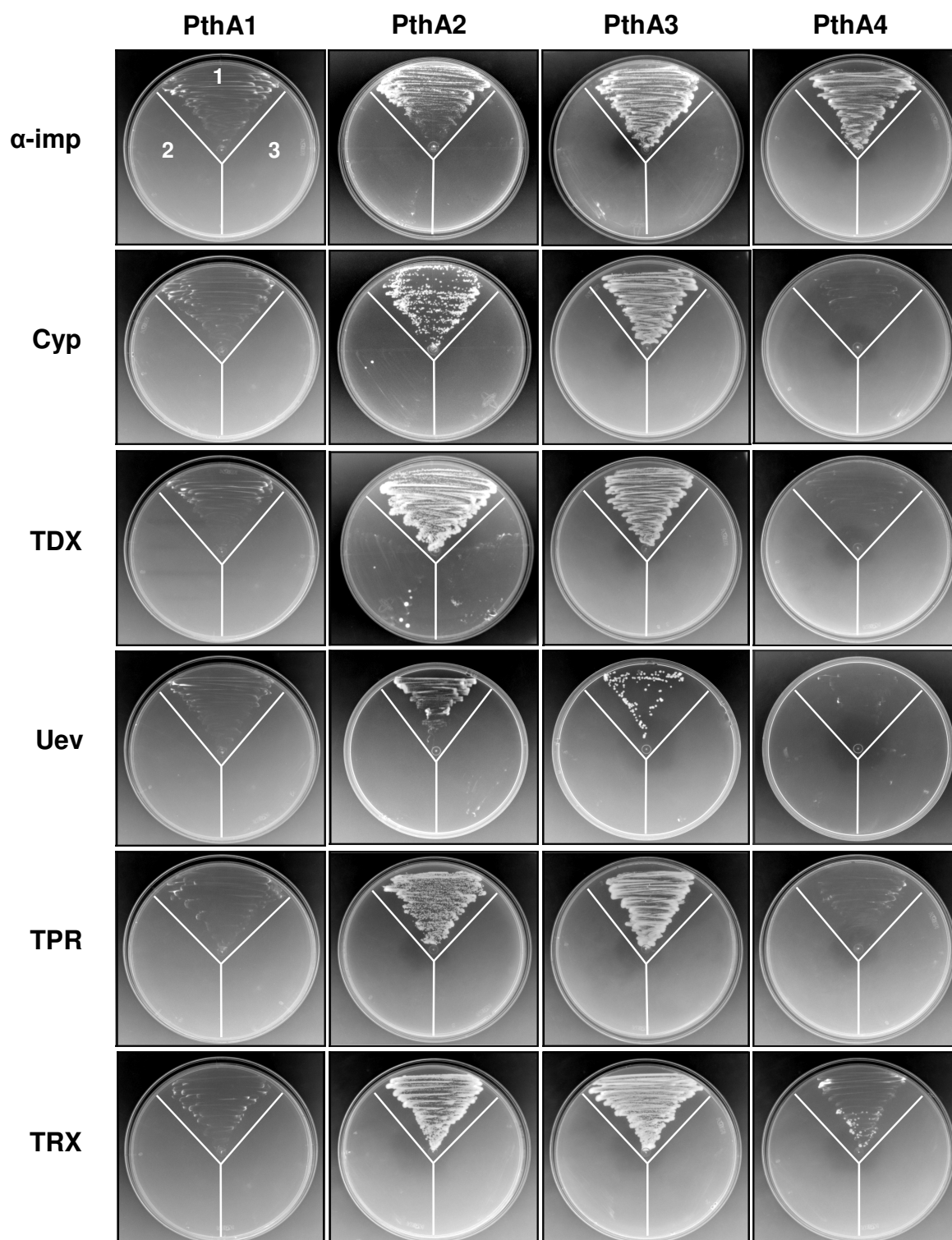


Figura 20: Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das 4 variantes de PthA com as proteínas α -imp, Cyp, TDX, Uev e os domínios TPR e TRX da TDX como presas, em meio restritivo SC -Ade -His -Leu -Trp nas concentrações de 3 a 5 mM de 3-AT. Números indicados na primeira placa: **1**– pOBD-isca + pOAD-presa (**interação**); **2**- pOBD-isca + pOAD-vazio e **3**- pOBD-vazio + pOAD-presa (**controles**). O mesmo padrão segue para todas as demais placas.

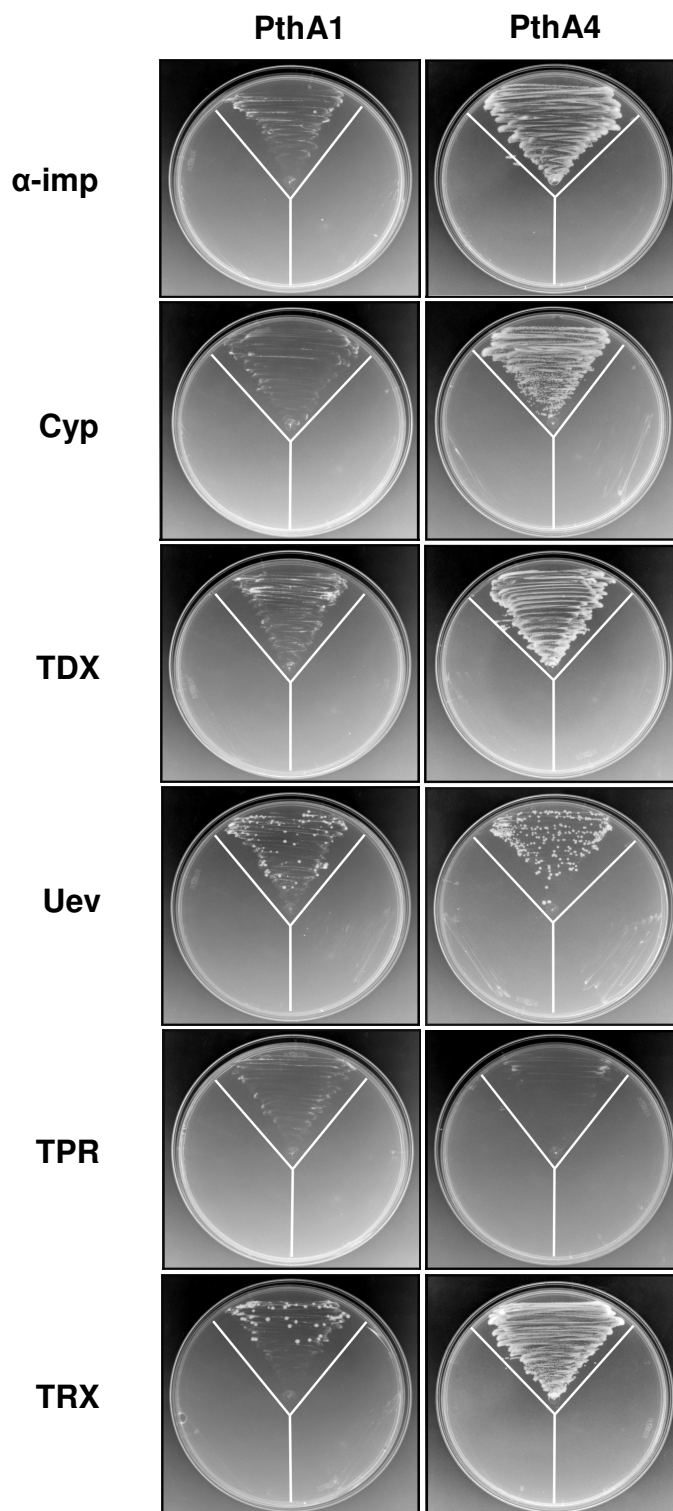


Figura 21: Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das variantes 1 e 4 de PthA com as proteínas α -imp, TDX, Cyp, Uev e os domínios TPR e TRX da TDX como presas. Em meio menos restritivo SC +Ade –His –Leu –Trp nas concentrações de 3 a 5 mM de 3-AT, crescidas em estufa 30°C por 4 dias.

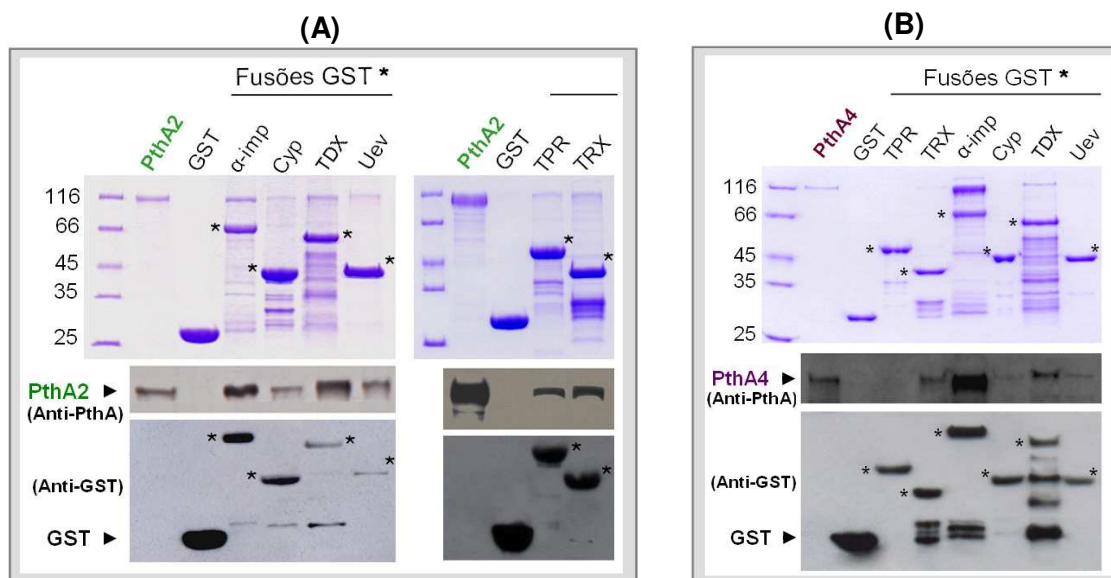


Figura 22: Géis de poliacrilamida 10% e Western blots, com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST, representando as interações de PthA2 (A) e PthA4 (B) com as proteínas α -imp (65 kDa), Cyp (44 kDa), TDX (63 kDa) e seus domínios TPR (47 kDa) e TRX (43 kDa), Uev (43 kDa) e controle GST (26 kDa). As proteínas 6xHis-PthA2 (116 kDa) e 6xHis-PthA4 (118 kDa) purificadas estão indicadas na primeira canaleta em cada figura. As proteínas fusionadas a GST estão destacadas por asteriscos.

Na **Figura 22B** pela análise do blot Anti-PthA pode-se constatar que TDX, Cyp e Uev também interagem com PthA4, porém a interação com as duas últimas proteínas citadas, são mais fracas. Pois, no caso destas proteínas, bandas de menor intensidade correspondentes a PthA4 são observadas no western em comparação com as bandas de interação com α -imp, TDX e TRX. Por este mesmo blot também foi possível observar que o domínio TPR não interage com PthA4, como era esperado pelo resultado do duplo-híbrido, portanto, a interação de PthA4 com TDX provavelmente ocorre via domínio TRX. No blot Anti-GST foi notado um pouco de degradação da cauda de GST para α -imp, TDX e TRX, o que não interferiu na constatação das interações.

Como mencionado na introdução Cyp, TDX e Uev têm sido associadas com enovelamento proteico, ativação e controle de qualidade, desta forma foi testado se estas proteínas poderiam interagir entre si. Para tal, TDX e Uev foram subclonadas no vetor pOBD e testadas como isca contra Cyp no pOAD. Estas construções crescidas em meio SC –Ade –His –Leu –Trp contendo 5 mM 3-AT estão representadas na **Figura 23A**. Nesta figura nota-se que TDX interage com Cyp e Uev e ambos os domínios da TDX contribuem para esta interação (**Figura 23C**). Apesar da interação entre TDX e Uev ter se mostrado relativamente fraca nos ensaios de pull-down comparada com a interação entre TDX e Cyp é notada uma interação mais pronunciada entre TDX e Uev na presença de Cyp. Da mesma forma, maior quantidade de Cyp foi detectada no pull-down com TDX na presença de Uev (**Figura 23B**). A interação entre Cyp e Uev foi relativamente fraca tanto *in vivo* quanto *in vitro* (**Figura 23A** e **23B**, respectivamente).

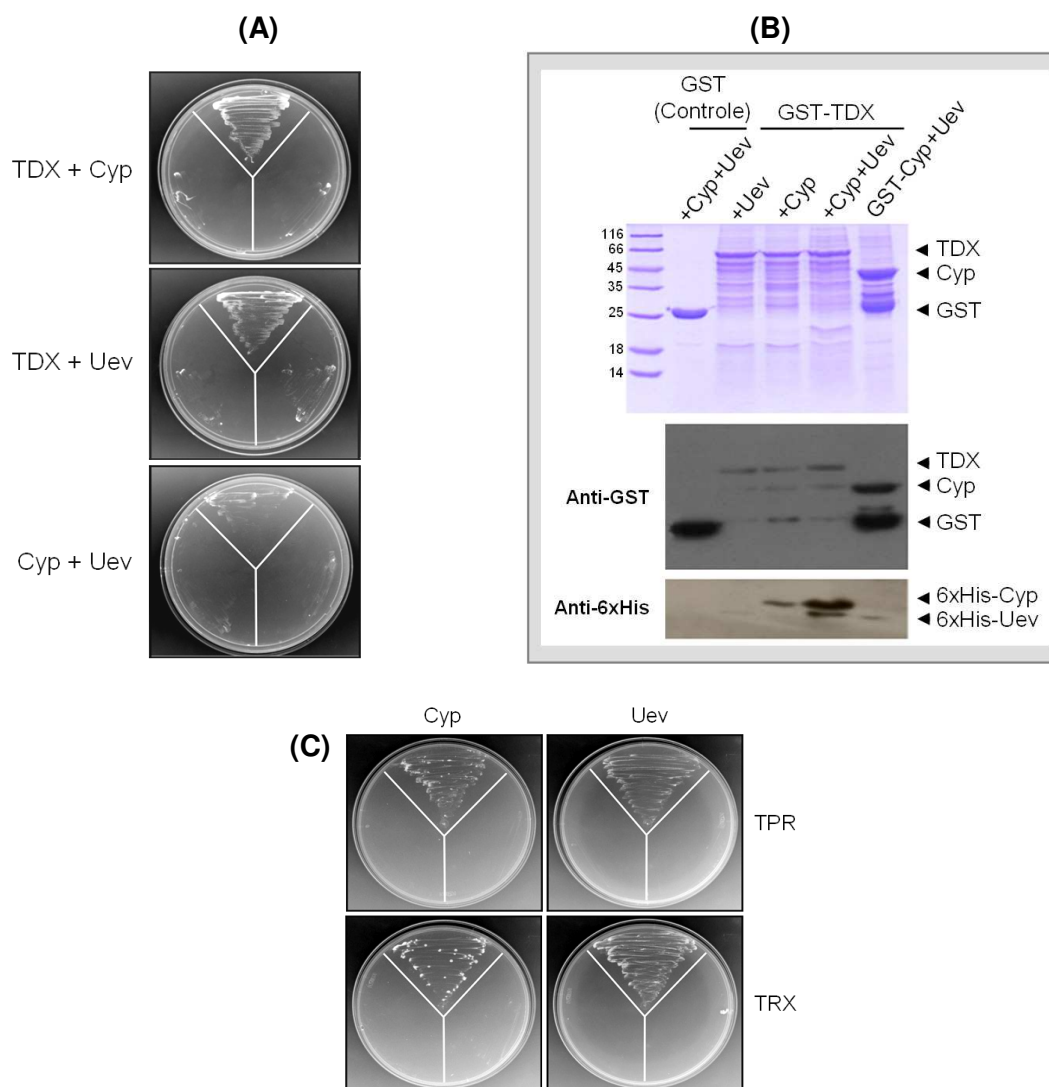
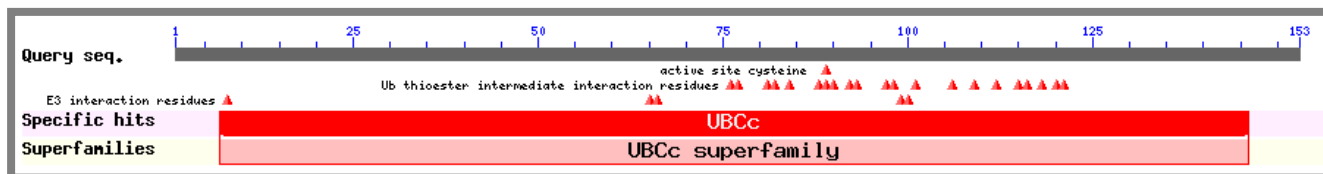


Figura 23: **(A)** Ensaios de duplo-híbrido mostrando a interação entre TDX, Cyp e Uev em meio SC -Ade -His -Leu -Trp contendo 5 mM de 3-AT; **(B)** Gel de poliacrilamida 13% e Western blots, com os anticorpos Anti-GST e Anti-6xHis, referente aos ensaios de pull-down utilizando GST-TDX e GST-Cyp como iscas e 6xHis-Cyp (20 kDa) e 6xHis-Uev (18 kDa) como presas; **(C)** Ensaios de duplo-híbrido mostrando que os domínios TPR e TRX da TDX também interagem com Cyp e Uev.

Inúmeros trabalhos descrevem a interação entre Ubc13 e Uev em vários organismos (Hofmann & Pickart, 1999; Hoege et al., 2002; McKenna et al., 2001; 2003a; 2003b; Andersen et al., 2005b; Hau et al., 2006; Hurley et al., 2006; Syed et al., 2006; Wen et al., 2006; Panier & Durocher, 2009; Pelzer et al., 2009). Visando constatar se a Uev isolada interage com Ubc13 de citros, esta proteína foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis* e subclonada nos vetores apropriados para o duplo-híbrido.

A **Figura 24A** mostra que a Ubc13 de *C. sinensis* (código GenBank número GQ862814) contém um único domínio Ubc característico desta família de proteínas e na **Figura 24B** nota-se a alta identidade de sequência desta proteína com Ubc13 humana e de levedura.

(A)



(B)

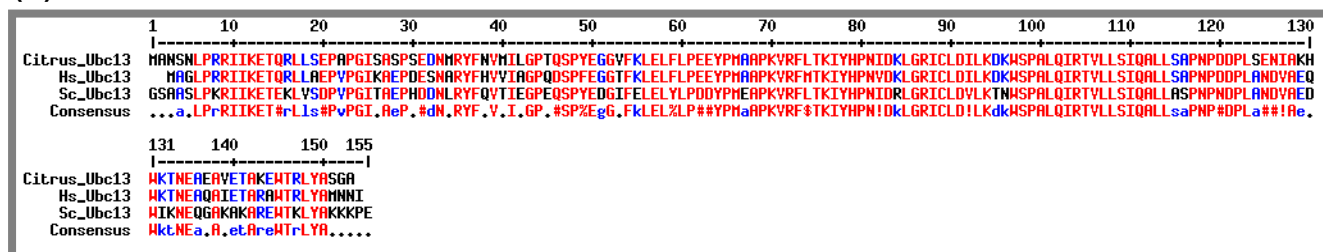


Figura 24: (A) Representação esquemática do domínio de conjugação a ubiquitina (Ubc) na sequência de aminoácidos da proteína Ubc13 de *C. sinensis*; (B) Alinhamento de sequências de aminoácidos da proteína Ubc13 de *C. sinensis* com as proteínas HsUbc13 e ScUbc13 mostrando a alta identidade de sequência entre elas. Alinhamento realizado com o programa MultAlin (Corpet, 1988).

Nos ensaios de duplo-híbrido pode-se observar que a Uev interage fortemente com a Ubc13 de citros mesmo em meio mais restritivo na presença de 5 mM de 3AT (**Figura 25A**). Notavelmente, Ubc13 interagiu apenas com Uev e não com TDX ou Cyp, corroborando assim os dados da literatura, os quais mostram que Ubc13-Uev formam um heterodímero estável. Por outro lado, verificamos interação da Ubc13 apenas com as variantes 2 e 3 de PthA (**Figura 25B**), ou seja, num padrão de interação semelhante ao observado para as demais proteínas nas Figuras 20 e 21. Estas interações foram confirmadas por ensaios *in vitro* de GST pull-down (**Figura 25C**), no qual verificou-se uma forte interação da proteína Ubc13 com Uev e com PthA2, porém não houve interação da Ubc13 com PthA4.

Na tentativa de mapear a região de interação das proteínas em estudo com a proteína efetora PthA foram realizados ensaios de duplo-híbrido com as formas truncadas de PthA: pOBD-PthA-LRR (apenas região do *Leucine Rich Repeat*), pOBD-PthA-RD1 (apenas domínio central de PthA1 com 16,5 repetições), pOBD-PthA-RD2 (apenas domínio central de PthA2 com 15,5 repetições), pOBD-PthA-RD3 (apenas domínio central de PthA3 com 15,5 repetições), pOBD-PthA-RD4 (apenas domínio central de PthA4 com 17,5 repetições), uma construção contendo as últimas 5,5 repetições do domínio central seguido da região C-terminal (pOBD-PthA 5.5rep + CT2) e uma outra contendo

apenas a região C-terminal de PthA2 (PthA-CT2). Estas construções estão representadas na **Figura 26**.

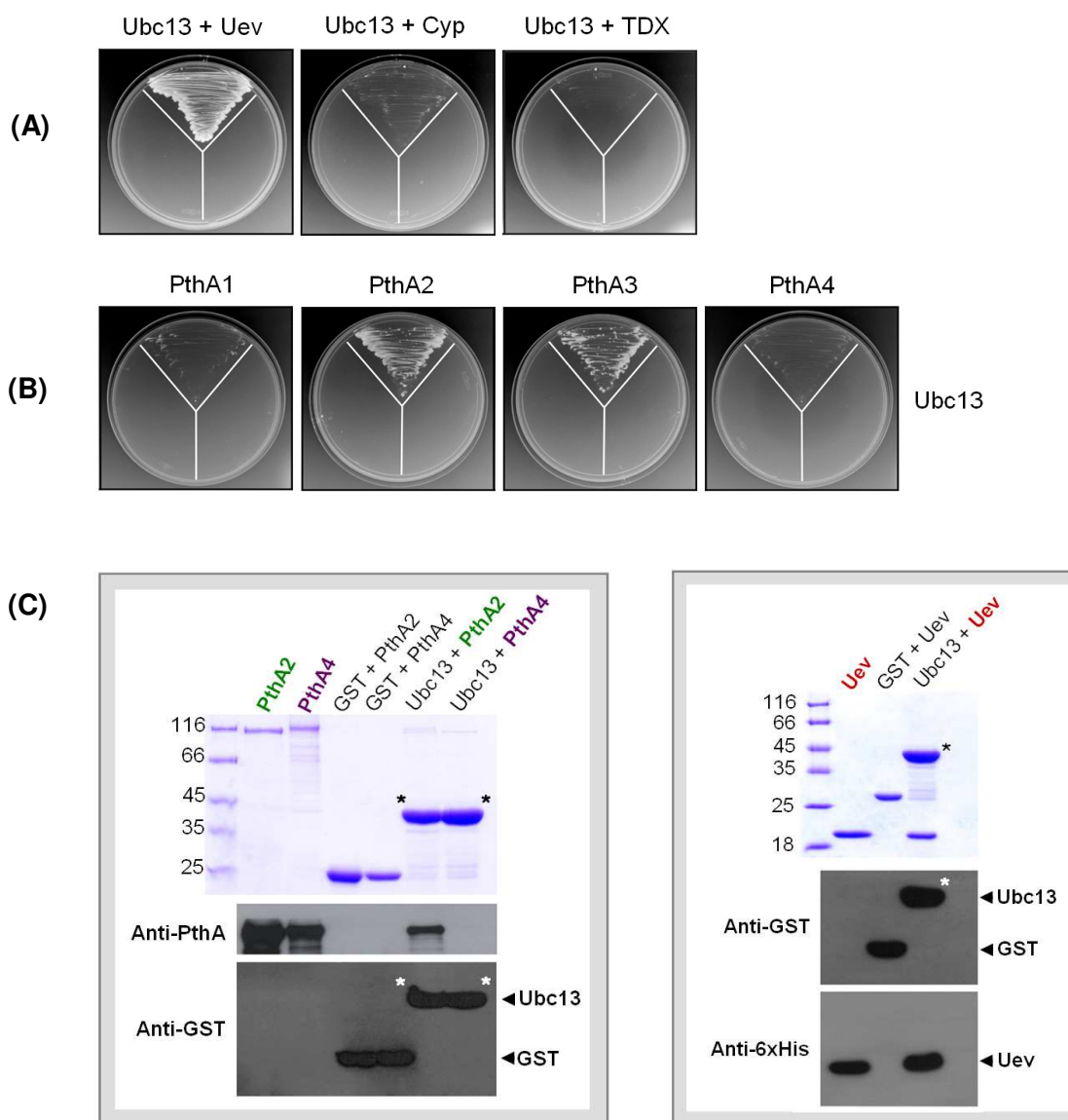


Figura 25: Placas representando os ensaios de duplo-híbrido da proteína Ubc13 de citros **(A)** com as presas Uev, Cyp e TDX; **(B)** com as 4 variantes de PthA, em meio SC +Ade –His –Leu –Trp nas concentrações de 3 a 5 mM de 3-AT; **(C)** Géis de poliácridamida 10% e 12%, respectivamente e Western blots, com os anticorpos Anti-PthA, Anti-GST e Anti-6xHis, das interações de GST-Ubc13 com 6xHis-PthA2 e 6xHis-PthA4 purificadas (à esquerda) e com 6xHis-Uev purificada (à direita). As proteínas purificadas estão indicadas no géis nas primeiras canaletas logo após a canaleta do marcador de peso molecular. As bandas correspondentes as proteínas GST-Ubc13 (43 kDa) estão indicadas por asteriscos.

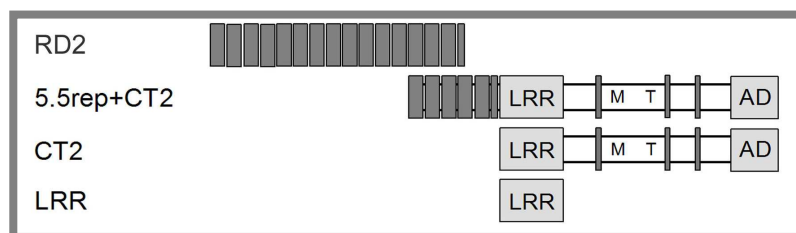


Figura 26: Truncagens de PthAs utilizados nos ensaios *in vivo* de duplo-híbrido em leveduras e nos ensaios *in vitro* de GST pull-down. RD2 – domínio interno de PthA2, 5.5rep+CT2 - últimas 5,5 repetições do domínio central de PthA2 seguida da região C-terminal, CT2 – região C-terminal de PthA2 e LRR – invariável nos PthAs. Estas construções foram expressas em fusão com 6xHis, purificadas e utilizadas nos ensaios de pull-down. A construção CT2 foi utilizada apenas nos ensaios de pull-down, visto que este domínio auto-ativou os genes repórteres em leveduras e não pode ser utilizado nos ensaios *in vivo*.

Nos ensaios de duplo-híbrido com os domínios centrais de PthA1 e PthA4 ocorreu transativação dos controles pOBD-isca + pOAD-vazio, portanto, não foi possível trabalhar com estas truncagens. Não foi possível também realizar ensaios *in vivo* com a construção contendo apenas a região C-terminal de PthA, pois esta construção (pOBD-PthA-CT2) auto-ativou os genes repórteres, inviabilizando os ensaios. Os dados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro* com PthA-RD2 e PthA-RD3 foram muito semelhantes, assim sendo é mostrado apenas o resultado com PthA-RD2.

O domínio central repetitivo de PthA2 (RD2), assim como a construção contendo 5,5 repetições do domínio central de PthA seguido de sua região C-terminal (5.5rep + CT2) interagiram com Cyp, TDX, Uev, Ubc13 e α -imp, porém a interação de RD2 com a proteína α -imp foi menos pronunciada (**Figura 27A**). O domínio LRR interagiu apenas com a α -importina. Este resultado é muito interessante, pois o domínio LRR está adjacente ao domínio central repetitivo e é invariável entre PthAs. Os dados *in vivo* foram também confirmados por ensaios *in vitro* de pull-down (**Figura 27B**), os quais mostraram que RD2 e 5.5rep + CT2 interagem com todas as proteínas de citros em questão. No caso da construção PthA-CT2, que transativou os genes repórteres da levedura e não pode ser utilizada nos ensaios de duplo-híbrido, foi demonstrado por ensaio *in vitro* de GST pull-down que esta truncagem interage somente com a α -imp (**Figura 27B**). Em conjunto esses resultados indicam que a região central repetitiva da proteína PthA contribui para interação com as proteínas de citros Cyp, TDX, Uev e Ubc13, entretanto o LRR e o NLS parecem ser requeridos apenas para interação com a α -imp.

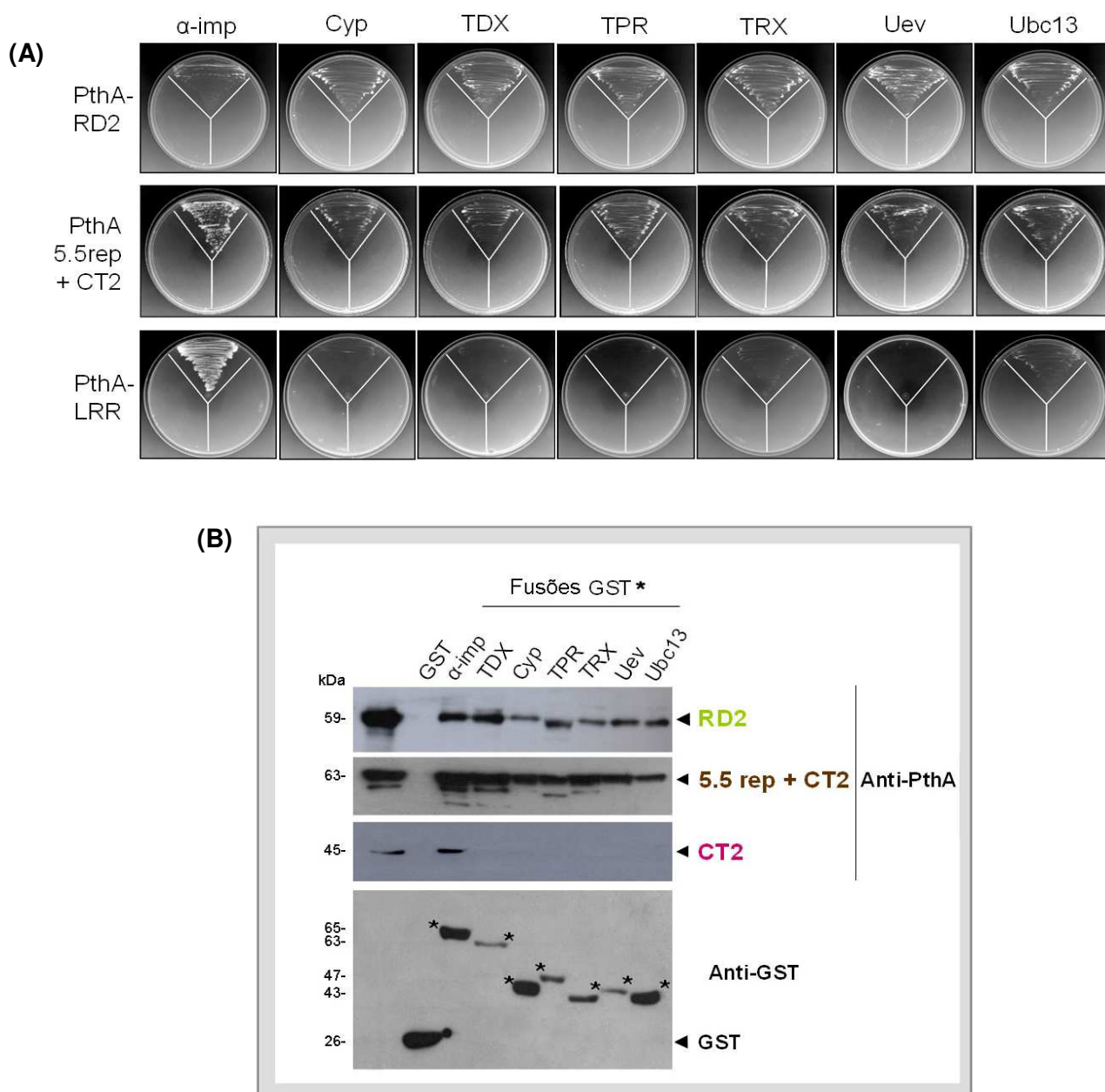


Figura 27: **(A)** Placas representando os ensaios de duplo-híbrido, em meio menos restritivo SC +Ade –His – Leu –Trp, das interações de 6xHis-PthA-RD2 (59 kDa) e 6xHis-PthA 5.5rep + CT2 (63 kDa) com todas as proteínas de citos e 6xHis-PhA-LRR (45 kDa) interagiu somente com a proteína α -imp; **(B)** Western blots dos ensaios de GST pull-down, com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST, do mapeamento da região de interação de PthA com as proteínas de citos α -imp, TDX, Cyp, TPR, TRX, Uev e Ubc13. Proteínas PthAs purificadas e o peso molecular das proteínas estão indicados a esquerda dos blots. As proteínas fusionadas a GST estão representadas por asteriscos no blot Anti-GST.

Como AvrBs3 dimeriza no citosol da célula hospedeira antes de ser transportada para o núcleo (Gürlebeck et al., 2005) levantamos então a hipótese de que as quatro variantes de PthAs poderiam formar homo e/ ou heterodímeros na célula hospedeira. Para testar esta hipótese ensaios de duplo-híbrido foram empregados com o intuito de verificar todas as possíveis interações entre as variantes de PthA. Para tal, foram utilizadas as construções isca pOBD- Δ N e pOAD- Δ N (presa) dos PthAs 1, 2, 3 e 4. Verificamos que as variantes 2 e 3 de PthA (ambas com 15,5 repetições no domínio central) interagem consigo mesmo, ou seja, são capazes de formar homodímeros. E que as seguintes combinações formam heterodímeros: PthA1 + PthA2, PthA1 + PthA3, PthA2 + PthA3, PthA2 + PthA4 e PthA3 + PthA4 (**Figura 28A**). Verificamos ainda que PthA1 e PthA4 (16,5 e 17,5 repetições, respectivamente), em meio menos restritivo, formam homodímeros, porém não são capazes de formar heterodímeros entre si (**Figura 28B**).

Para verificar se apenas o domínio central de PthA (RD2) ou apenas as últimas 5,5 repetições do domínio central (5.5rep + CT2) seriam suficientes para homo e heterodimerização de PthA, foram realizados também ensaios de interação *in vivo*. Para tal, pOBD-PthA-RD2 e pOBD-PthA-5.5rep + CT2 foram utilizados com iscas contra as presas pOAD-PthA2 e pOAD-PthA3 (**Figura 28C**). Em ambos os meios de cultura na presença ou não de adenina, pode-se constatar que há interação das duas iscas com os PthAs 2 e 3, de tal forma que conforme esperávamos, a presença das repetições do domínio central de PthA são suficientes para homo e heterodimerização destas proteínas.

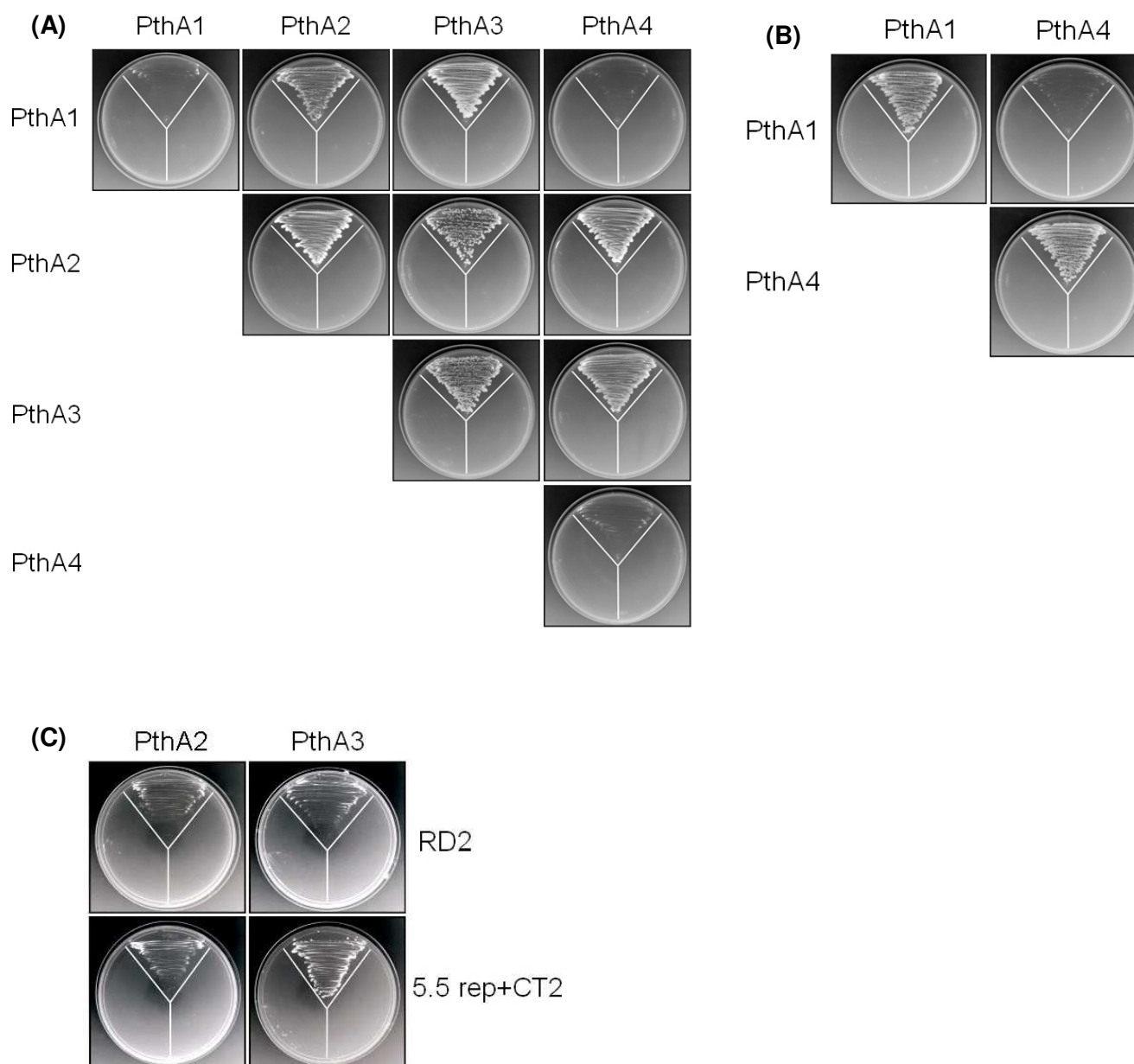


Figura 28: **(A)** Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das variantes de PthAs entre si para verificar a formação de homo e heterodímeros. PthAs 2 e 3 formam homodímero e também heterodimerizam entre si e com PthAs 1 e 4, em meio mais restritivo SC -Ade -His -Leu -Trp nas concentrações de 3 a 5 mM de 3-AT; **(B)** Em condições menos restritivas (SC +Ade -His -Leu -Trp) PthAs 1 e 4 foram homodímeros, mas não são capazes de formar heterodímeros; **(C)** Placas representando os ensaios de duplo-híbrido das iscas PthA-RD2 e PthA 5.5rep + CT2 com as proteínas PthA2 e PthA3 como presas. Em meio menos restritivo SC +Ade -His -Leu -Trp nas concentrações de 3 a 5 mM de 3-AT, crescidas em estufa 30°C por 4 dias.

4.2. Ensaio de Atividade PPlásica de Ciclofilina

Inicialmente o objetivo foi demonstrar que a Cyp isolada de *C. sinensis* é uma ciclofilina clássica e possui atividade de PPlase. A **Figura 29** mostra o resultado da purificação das proteínas GST-Cyp (**Figura 29A**) e do controle GST (**Figura 29B**) utilizadas nos ensaios bioquímicos de atividade PPlásica. Utilizou-se neste experimento Cyp fusionada a GST e a proteína GST como controle negativo, pois foi previamente reportado por Gopalan e colaboradores (2004) que GST sozinha não possui atividade PPlase e a proteína de fusão não mostrou redução ou variação desta atividade comparada com a proteína pura clivada com trombina. O melhor resultado foi obtido para GST-Cyp na concentração de 50 nM. A **Figura 29C** mostra um gráfico da absorbância no comprimento de onda de 390 nm em função do tempo (em segundos) para a média entre triplicatas de GST-Cyp nesta concentração. Na presença de PPlases, a ligação proil do substrato Suc-AAPF-rNA é mais rapidamente convertida para a conformação *trans*, que é prontamente clivada pela α -quimiotripsina conduzindo à formação de um produto de cor amarela, o 4-nitroaniline. Então, na presença de Cyp enzimaticamente ativa é esperado um aumento na absorbância no 390 nm devido a atividade PPlase, em relação ao tampão ou controle GST. Portanto, como observado na Figura 29C, verifica-se que os mais altos valores da absorbância no 390 nm são obtidas nas amostras contendo Cyp (no gráfico – curva em vermelho), indicando que Cyp de *C. sinensis* é uma PPlase ativa.

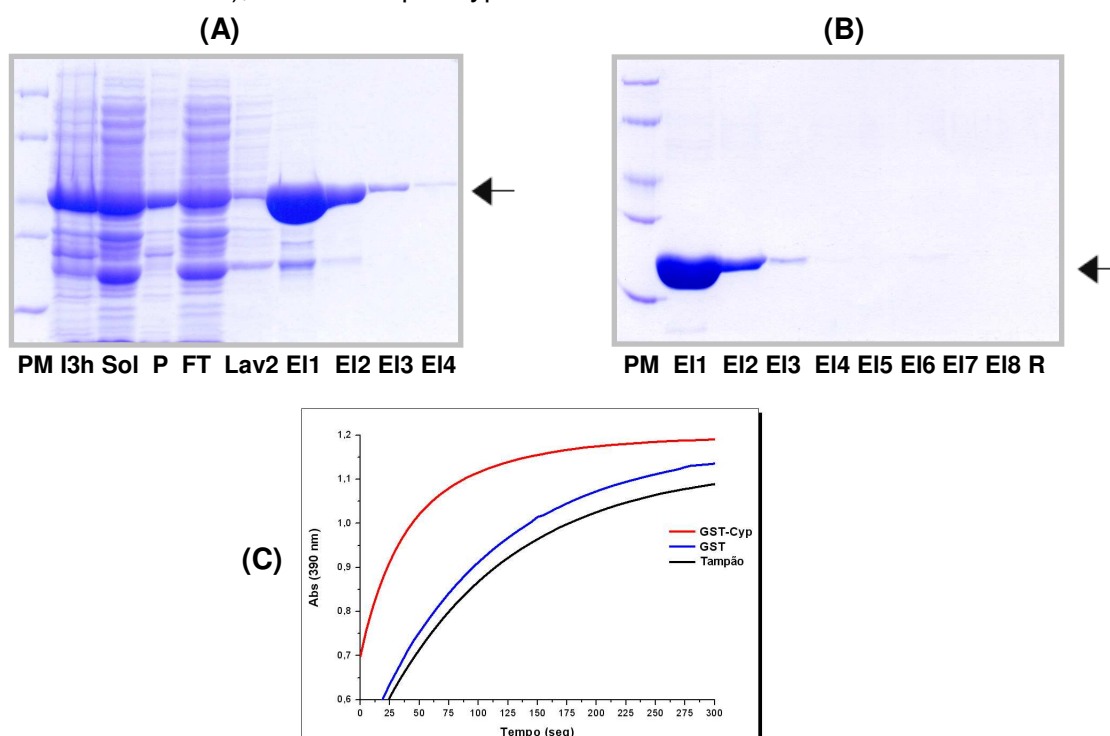


Figura 29: Purificação por afinidade em resina de GST (**A**) GST-Cyp. A seta indica esta proteína com peso molecular de 44 kDa; (**B**) Controle GST. Peso molecular de 26 kDa, indicado pela seta. PM = marcador de peso molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* - Fermentas); I3h = amostras com 3 horas de indução; Sol = amostra solúvel; P = amostra insolúvel (*pellet*); FT = *Flow Through*; Lav2= lavagem; EI1 a 8 = eluições e R = amostra resina. As proteínas foram recuperadas em maior quantidade na primeira e segunda eluições; (**C**) Gráfico representando o ensaio de atividade enzimática PPlase pareado com α -quimiotripsina para GST-Cyp de citros (curva em vermelho), o controle GST (curva em azul) e o tampão da reação (curva em preto). Este gráfico foi gerado pelo programa *ORIGIN 8*.

Em seguida empregou-se o mesmo ensaio enzimático para verificar se Ciclosporina A (CsA), um inibidor de ciclofilinas, seria também um inibidor da Cyp de citros e também para constatar se a presença de PthA influenciaria a atividade de Cyp. Nestes ensaios foi utilizada 6xHis-Cyp recombinante purificada de *E.coli* e sem cauda de Histidina (removida por clivagem com Trombina). Na **Figura 30A** pode se notar a curva em vermelho com mais alto valor de absorbância indicando uma atividade PPlase aumentada para Cyp. Atividade esta que foi drasticamente reduzida na presença de 30 nM e 300 nM do inibidor CsA (curvas em verde e azul escuro, respectivamente). Curiosamente, na **Figura 30B** observa-se que a presença da proteína PthA2 recombinante purificada diminuiu a atividade PPlase de Cyp (curva em verde). Proteína BSA purificada foi utilizada como controle negativo neste ensaio (curva em azul escuro) para mostrar que não é qualquer proteína contendo resíduos de prolina que pode ser modificada por PPlases ou influenciar esta atividade enzimática.

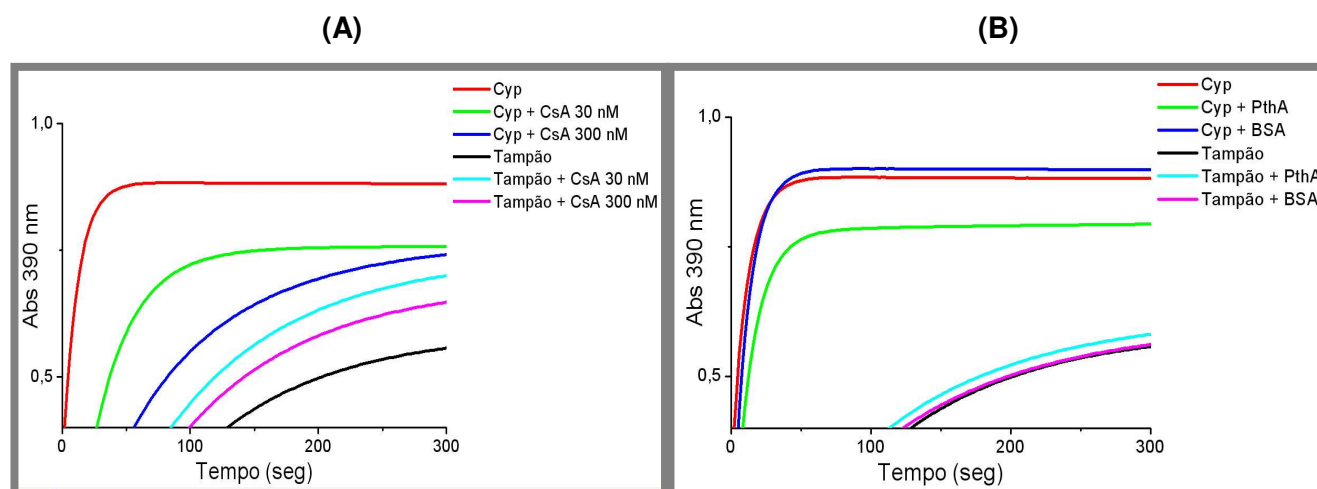


Figura 30: Gráficos representando ensaios de atividade enzimática PPlase pareado com α -quimiotripsina para Cyp de citros **(A)** na presença do inibidor CsA nas concentrações de 30 e 300 nM; **(B)** na presença de PthA2 recombinante purificada e do controle BSA. As curvas em preto, azul claro e magenta representam condições controle.

Portanto, diferente do que se acreditava PthA não é alvo de Cyp, mas sim inibe a sua atividade. A partir deste resultado foi considerado relevante investigar se a presença de CsA afetaria a interação entre Cyp e PthA. Assim sendo, ensaios de interação *in vitro* de pull-down foram realizados utilizando a isca GST-Cyp e a presa 6xHis-PthA2 (aproximadamente 100 μ M de cada proteína) purificada na presença de 200 μ M de CsA (**Figura 31**). Analisando-se o blot com Anti-PthA pode-se observar que com adição de CsA não há mais interação entre Cyp e PthA. Considerando que CsA se liga ao sítio ativo de Cyp e a presença de CsA previne a interação de PthA2 com Cyp, provavelmente, o sítio

ativo de Cyp é o sítio de ligação de PhA e, portanto, PthA e CsA competem pela ligação ao sítio ativo de Cyp.

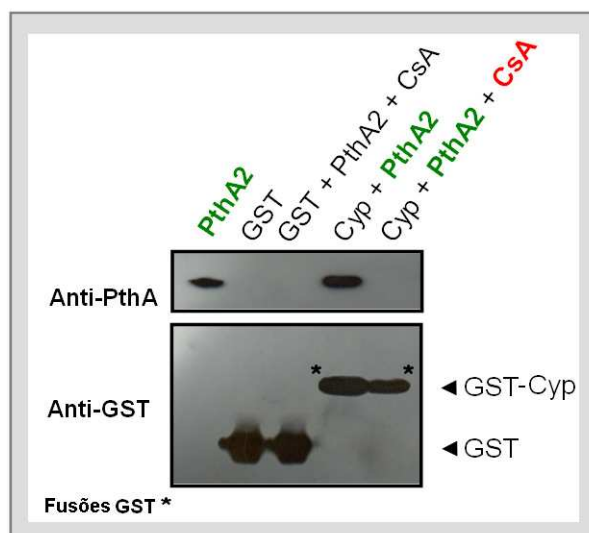


Figura 31: Western blots com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST representando ensaios *in vitro* de pull-down da isca GST-Cyp na presença de 6xHis-PthA2 e do inibidor de ciclofilinas, CsA. A presença do inibidor CsA interrompe a interação de Cyp com PthA2. A proteína 6xHis-PthA2 purificada e os controles são representados nas três primeiras canaletas. As bandas correspondentes a GST-Cyp estão indicadas por asteriscos.

4.3. HR em *Nicotiana benthamiana* mediada por PthAs

Inicialmente foram realizados 8 tratamentos com réplicas de 3 folhas infiltradas para cada tratamento, sendo o tampão de infiltração e cepas de *Agrobacterium* (LBA4404 e EHA105) transformadas com pBI121-GUS, utilizados como controles. Os tratamentos consistiram na infiltração das cepas mencionadas acima transformadas com pBI121-PthA2, pBI121-PthA3 e pBI121-PthA4. As infiltrações foram realizadas nas folhas mais apicais, as quais estão mais bem expostas à luz, em uma área de aproximadamente 1 cm², para cada ponto de infiltração. Cinco dias após constatou-se a presença de lesões características de HR (*Hypersensitive Response*) nas folhas infiltradas (**Figura 32**). Lesões estas não observadas nos controles (tampão e pBI121-GUS). Onze dias após a infiltração foi detectada inclusive morte celular nas regiões infiltradas (**Figura 32B**). Melhor resposta foi verificada para a cepa LBA4404, sendo esta utilizada nas demais infiltrações. Folhas transformadas com a variante 4 de PthA em pBI121 exibiram maior intensidade de HR (**Figuras 32A e B**). Também foi notado que folhas mais basais e menos expostas à luz, apresentaram sintomas mais sutis, o que pode ser explicado pelo fato da HR ser uma resposta dependente de luz. A presença de HR induzida por PthAs em plantas de *Nicotiana* mostra que a transformação com *A.*

tumefaciens foi eficiente, além de salientar que PthA poderia ser reconhecida pelo sistema de resistência desta planta, mediado por proteínas *R*, reforçando a existência de uma interação planta-patógeno incompatível neste caso.

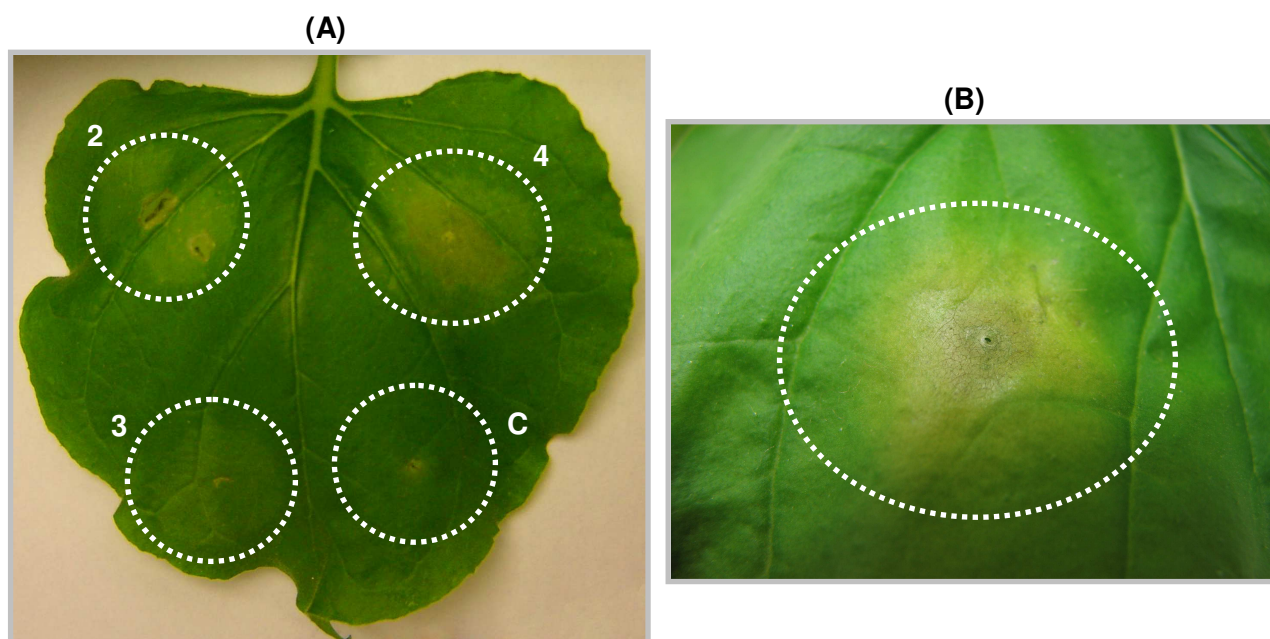


Figura 32: HR em folhas de *Nicotiana benthamiana* (A) PthAs 2, 3, 4 e controle GUS em pBI121; (B) Lesão em maior aumento da região infiltrada, com pBI121-PthA4, 11 dias após a infiltração. 2 = pBI121-PthA2; 3 = pBI121-PthA3; 4 = pBI121-PthA4 e C = controle pBI121-GUS. Construções em pBI121 transformadas em cepas de *Agrobacterium* LBA4404. As regiões pontilhadas correspondem à demarcação das áreas infiltradas.

4.4. Localização de PthAs em células de *Nicotiana benthamiana*

Como mostrado no item acima, a transformação de plantas de *N. benthamiana* com *Agrobacterium* foi eficiente, e tendo por base esse resultado positivo na transformação, decidiu-se verificar a localização de PthA fusionada a GFP, em células de *Nicotiana*, por meio de microscopia de fluorescência. Desta forma, a infiltração foi procedida como para as construções não fusionadas a GFP descritas no item acima. Foram realizados os seguintes tratamentos: pBI121-PthA1-GFP, pBI121-PthA2-GFP, pBI121-PthA3-GFP, pBI121-PthA4-GFP e como controle pBI121-GFP transformados em cepas de *A. tumefaciens* LBA4404.

A fluorescência da GFP foi observada de 48 até 72 horas após a infiltração nas folhas, depois deste período notou-se uma redução significativa de sua expressão. Para visualização em microscópio de fluorescência, as áreas infiltradas foram recortadas, imersas em tampão PBS pH 7,4

e recobertas por lamínula. A **Figura 33A** mostra a fluorescência detectada para o controle GFP, a qual encontra-se dispersa de forma geral nas células tanto epidérmicas quanto do mesófilo foliar. Em contrapartida, as proteínas PthAs fusionadas a GFP foram vistas preferencialmente no núcleo das células (**Figuras 33 B, C e D**).

Para confirmar que estas fusões realmente estavam localizadas no núcleo foi utilizada a marcação com DAPI. Este composto é um corante fluorescente azul que se liga fortemente ao DNA e tem sido utilizado extensivamente em microscopia de fluorescência, por ser capaz de atravessar membranas celulares intactas e, com isso, pode ser usado tanto para células vivas, quanto fixadas. Na microscopia de fluorescência, DAPI é excitado com luz ultravioleta e quando ligado ao DNA fita-dupla sua absorção máxima é de 358 nm e sua emissão máxima de 461 nm (Du et al., 1998). Este corante foi adicionado sobre a superfície foliar recortada na lâmina, recoberto com lamínula e deixado agir no escuro por 10 a 15 minutos antes de ser observado.

Por estes experimentos pode-se então demonstrar que as variantes de PthA possuem localização nuclear em células de *N. benthamiana* e provavelmente, também, em citros.

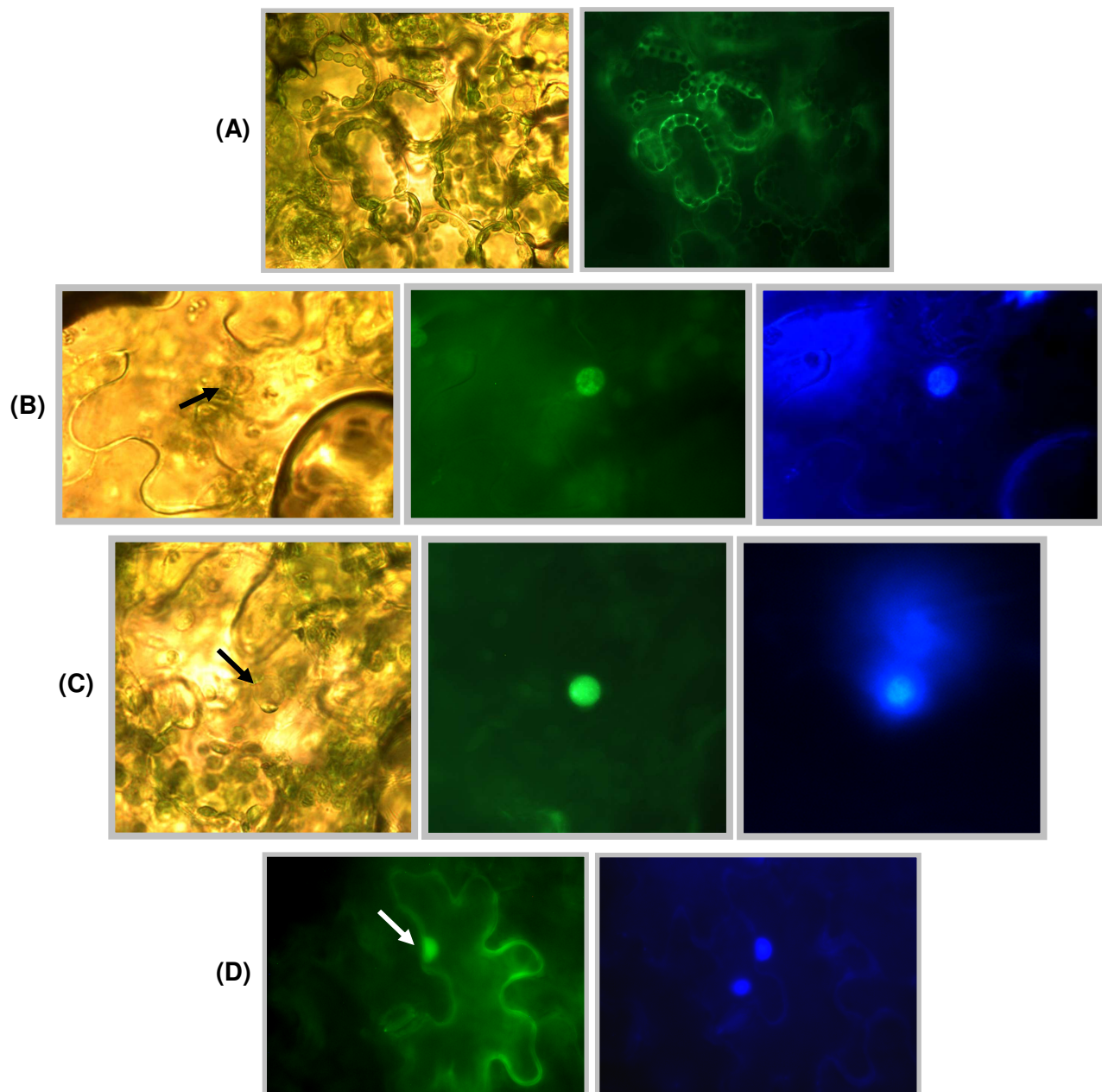


Figura 33: Fluorescência em *Nicotiana benthamiana* representando a localização das variantes de PthA no núcleo. **(A)** controle pBI121-GFP em células do mesófilo foliar; **(B)** pBI121-PthA1-GFP; **(C)** pBI121-PthA2-GFP e **(D)** pBI121-PthA4-GFP em células epidérmicas. Na sequência de três imagens em **A**, **B** e **C**: campo claro, emissão da fluorescência da GFP e coloração com DAPI. As setas estão indicando núcleos transformados com PthA.

4.5. Localização de Proteínas de Citros Fusionadas com DsRed

Como descrito no item 3.6 foi produzida uma construção controle do gene repórter DsRed no pBI121. Esta construção foi transformada em *Agrobacterium* LBA4404 como mencionado anteriormente e infiltrada em *N. benthamiana* com o intuito de verificar sua funcionalidade. Assim como para GFP as observações foram feitas de 48 a 72 horas após infiltração. Com 48 horas pode-se visualizar apenas a fluorescência basal da clorofila dispersa por todo o tecido do mesófilo. Entretanto, com 72 horas foi observada uma melhor fluorescência da DsRed nas células epidérmicas do que nas células do mesófilo (devido a grande quantidade de cloroplastos e, conseqüentemente, de clorofila). A construção controle, portanto, apresentou uma ótima taxa de expressão transiente estando dispersa por toda a célula, como visto também para o controle GFP. Em relação às construções das proteínas TDX, Cyp, Uev e Ubc13 de citros fusionadas a DsRed, obteve-se sucesso na clonagem apenas com Cyp e Uev. Assim como para o controle melhor nível de expressão foi visto nas células epidérmicas 72 horas após a infiltração. Na **Figura 34** pode-se verificar que tanto Cyp quanto Uev estão localizadas no núcleo das células epidérmicas.

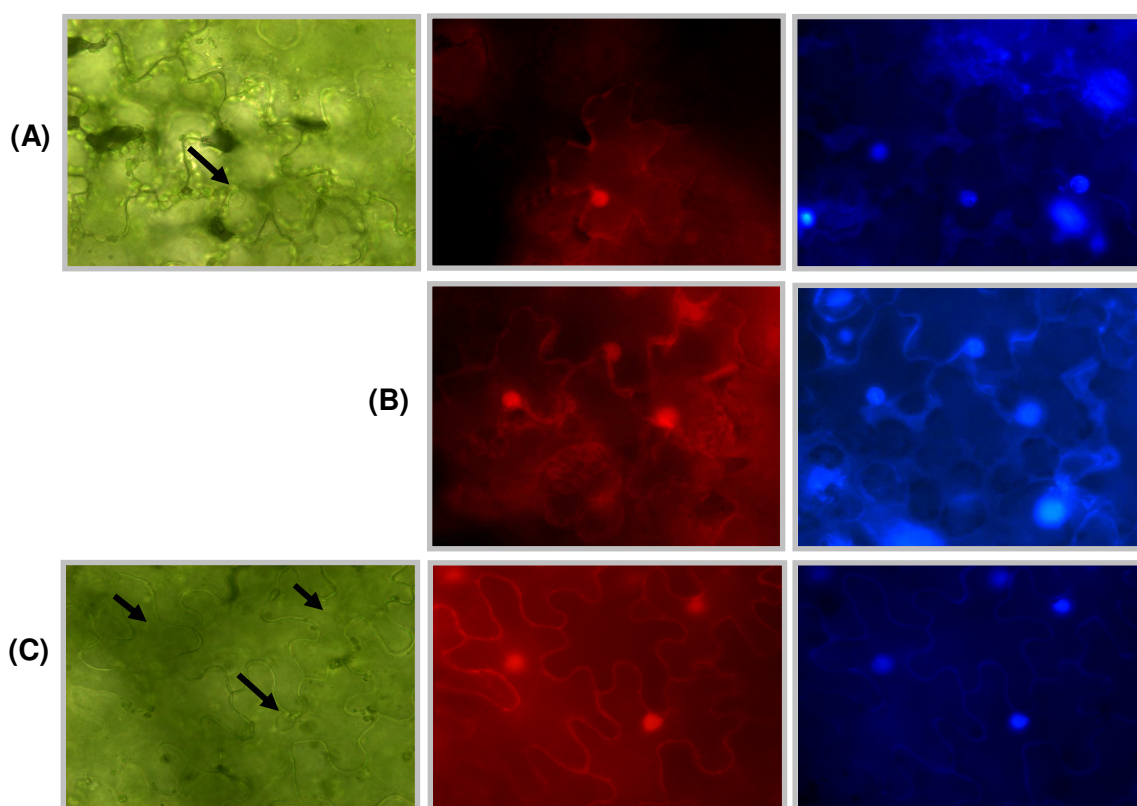


Figura 34: Fluorescência em *Nicotiana benthamiana* representando a localização das proteínas Cyp e Uev no núcleo de células epidérmicas. **(A)** e **(B)** pBI121-Cyp-DsRed; **(C)** pBI121-Uev-DsRed. Na seqüência de três imagens: campo claro, emissão da fluorescência da DsRed e coloração com DAPI. As setas, no campo claro, indicam núcleos.

4.6. Complementação do Fenótipo de Cepas Mutantes com Ubc13 e Uev de Citros

As cepas de levedura mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ são deficientes na ubiquitinação K63 e com isso são incapazes de crescer na presença de metil metano sulfonato (MMS), uma vez que estas cepas são deficientes em vias de reparo de DNA (Broomfield et al, 1998; Hofmann & Pickart, 1999). Para testar se as correspondentes proteínas de citros estão também envolvidas no reparo de DNA, as proteínas de citros Ubc13 e Uev foram expressas nos respectivos mutantes de levedura $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$. Os blots da **Figura 35A** mostram que estas proteínas de citros foram expressas nas cepas mutantes de leveduras, e estão presentes mesmo na fração não-induzida, que corresponderia à expressão basal das células, visto que houve um longo período de crescimento das culturas antes da indução com CuSO_4 . Na **Figura 35B** pode-se observar que a cepa selvagem SUB62 cresce mesmo na presença de MMS, uma vez que esta é ativa no reparo de DNA, porém as cepas mutantes tiveram seu crescimento prejudicado em um gradiente de MMS, assim como era esperado. Foi constatado também que as cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ transformadas com as proteínas de *C. sinensis* Ubc13 e Uev, respectivamente, tiveram seu crescimento recuperado na presença de MMS, indicando que estas proteínas estão envolvidas em vias de reparo de DNA e assim poderiam ser homólogos funcionais das proteínas Ubc13 e Uev de levedura.

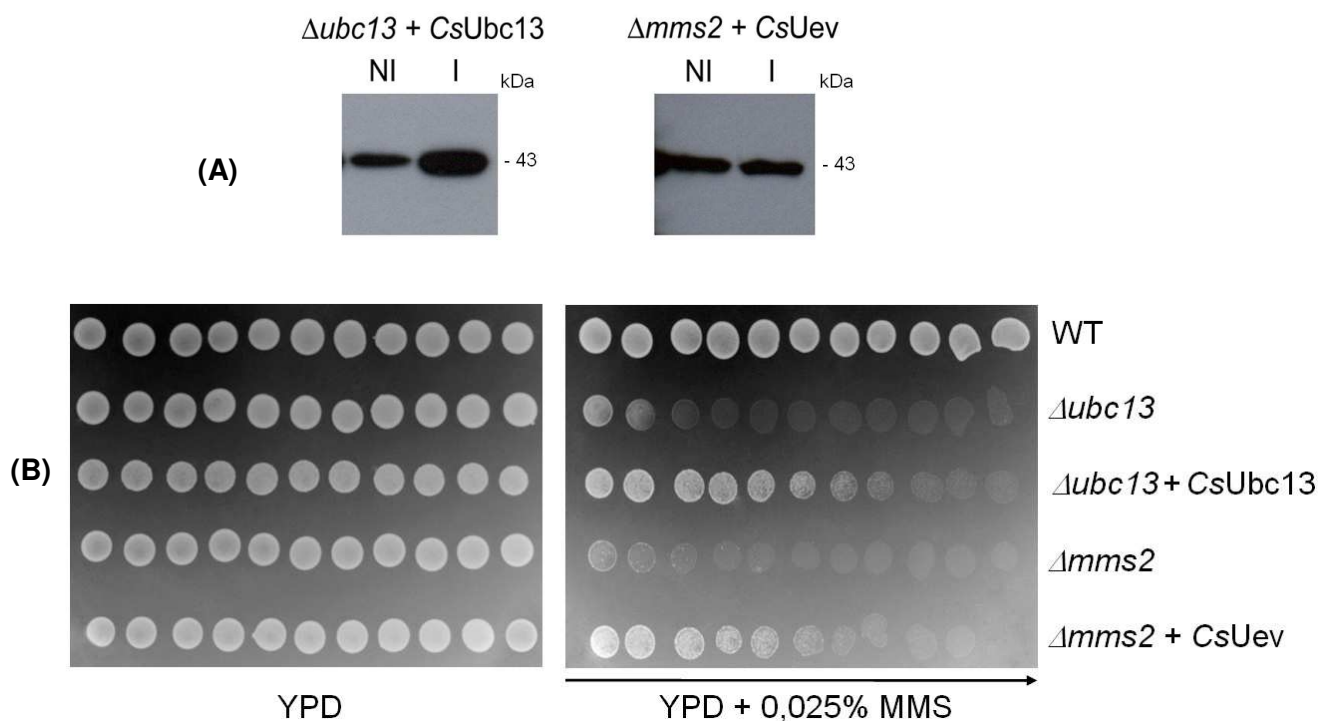


Figura 35: Proteínas de *C. sinensis* Ubc13 e Uev complementam funcionalmente mutantes de levedura $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$, respectivamente. Em **(A)** membrana incubada com Anti-GST, indicando a expressão das proteínas GST-Ubc13 e GST-Uev (ambas com 43 kDa), presentes mesmo na fração não-induzida; **(B)** placa controle e placa gradiente MMS crescidas em meio YPD por 24 horas em estufa 30°C.

4.7. Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em *S. cerevisiae*

As proteínas de citros Ubc13 e Uev bem como PthAs 2 e 4 de *Xac* clonadas em vetor pYEX 4T-1, ou seja, em fusão com cauda de GST apresentaram um ótimo nível de expressão tanto na cepa selvagem SUB62 quanto nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$. Esta expressão pode ser visualizada na **Figura 36**, referente aos géis de poliacrilamida 10% (**Figuras 36A e 36B**) e 8% (**Figuras 36C e 36D**) com as amostras não-induzidas e induzidas com CuSO_4 . A expressão de GST-Ubc13 e GST-Uev foi confirmada com blots incubados com Anti-GST (**Figuras 37A e 37B**) e as proteínas GST-PthA2 e GST-PthA4 foram confirmadas com blots incubados com Anti-PthA (**Figuras 37C e 37D**). Pode-se constatar que todas as proteínas estão presentes mesmo nas frações não-induzidas, o que corresponde à expressão basal das células, visto que houve um longo período de crescimento das culturas antes da indução com CuSO_4 .

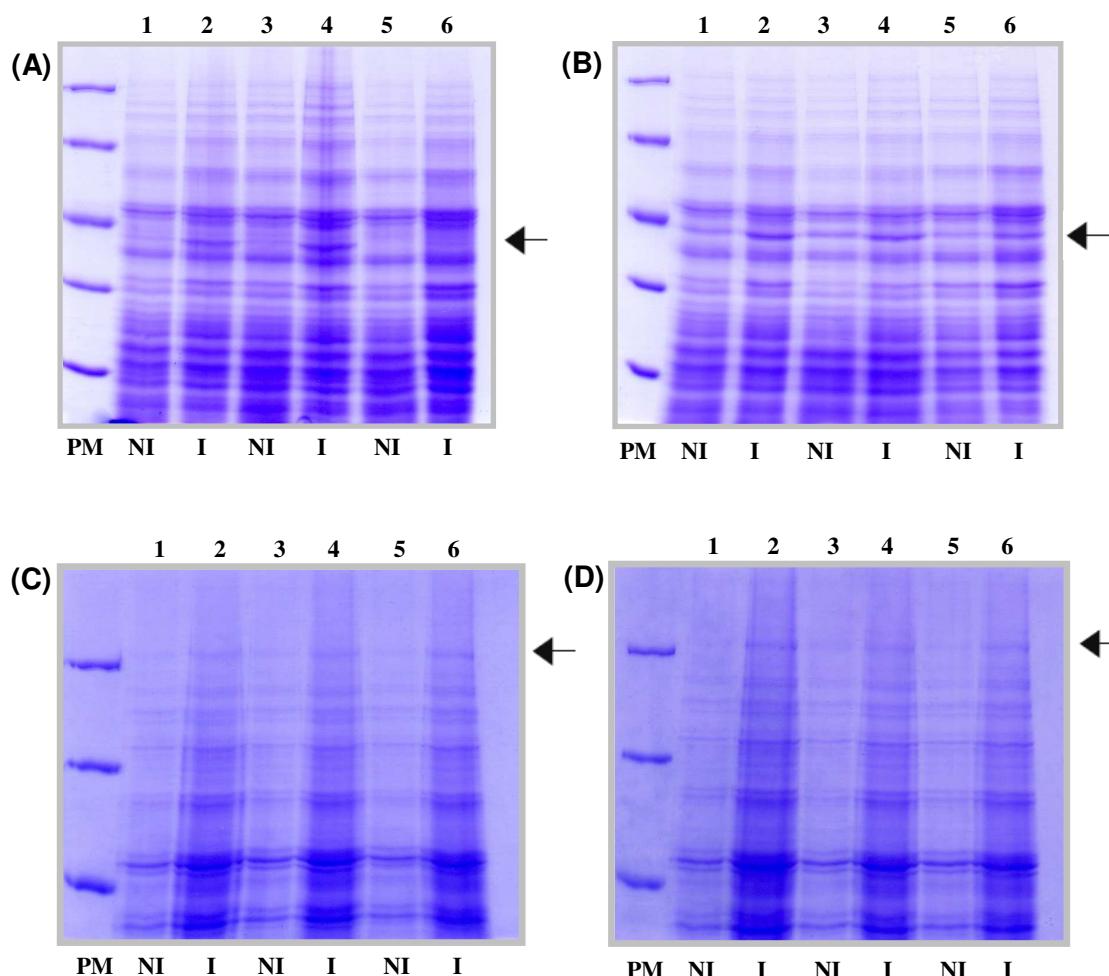


Figura 36: Expressão e indução por CuSO_4 em sistema de levedura nas cepas SUB62 e mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ de proteínas clonadas em pYEX 4T-1. **(A)** GST-Ubc13. A seta indica banda correspondente a esta proteína com peso molecular de 43 kDa; **(B)** GST-Uev. Peso molecular de 43 kDa, indicado pela seta; **(C)** GST-PthA2. A seta indica banda correspondente a esta proteína com peso molecular de 143 kDa e **(D)** GST-PthA4 com 148 kDa. PM = marcador de peso molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* - Fermentas); NI = amostras não induzidas; I = amostra induzida com CuSO_4 . Canaletas 1 e 2 – SUB62; 3 e 4 – $\Delta ubc13$; 5 e 6 – $\Delta mms2/uev1a$.

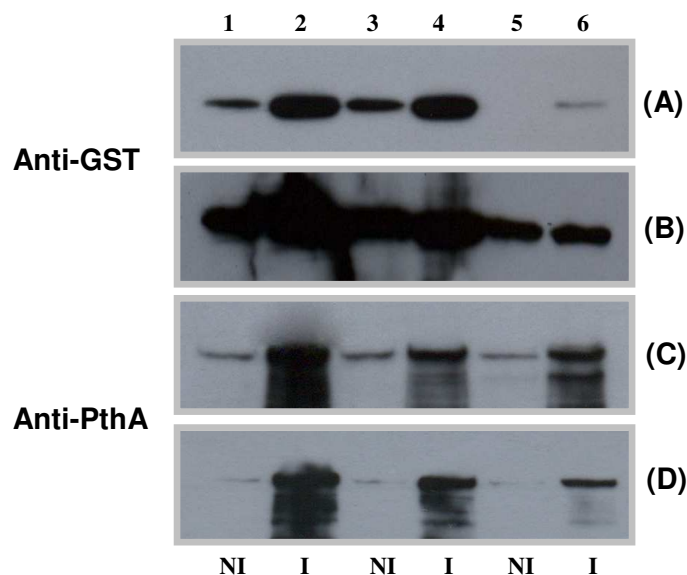


Figura 37: Blots referentes a Expressão e Indução por CuSO_4 em sistema de levedura nas cepas SUB62 e mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$ de proteínas clonadas em pYEX 4T-1. **(A)** GST-Ubc13 e **(B)** GST-Uev, sendo ambos os blots incubados com anticorpo Anti-GST; **(C)** GST-PthA2 e **(D)** GST-PthA4, sendo ambos os blots incubados com anticorpo Anti-PthA. NI = amostras não induzidas; I = amostra induzida com CuSO_4 . Canaletas 1 e 2 - SUB62; 3 e 4 - $\Delta ubc13$; 5 e 6 - $\Delta mms2/uev1a$.

Na primeira tentativa de purificação dos PthAs 2 e 4 produzidos em sistema de levedura, utilizando o reagente Y-Per e lyticase para lise das células, como descrito no item 3.7.3, não foram obtidos bons resultados (**Figuras 38A e 38B**), uma vez que as proteínas estavam em grande parte na fração insolúvel e, portanto, não se ligaram a resina. Uma estratégia que melhorou a lise e a solubilidade das células foi o uso de lyticase e ciclos de congelamento/descongelamento. Porém, os melhores resultados foram detectados com o acréscimo de *glass beads* (**Figura 38C**).

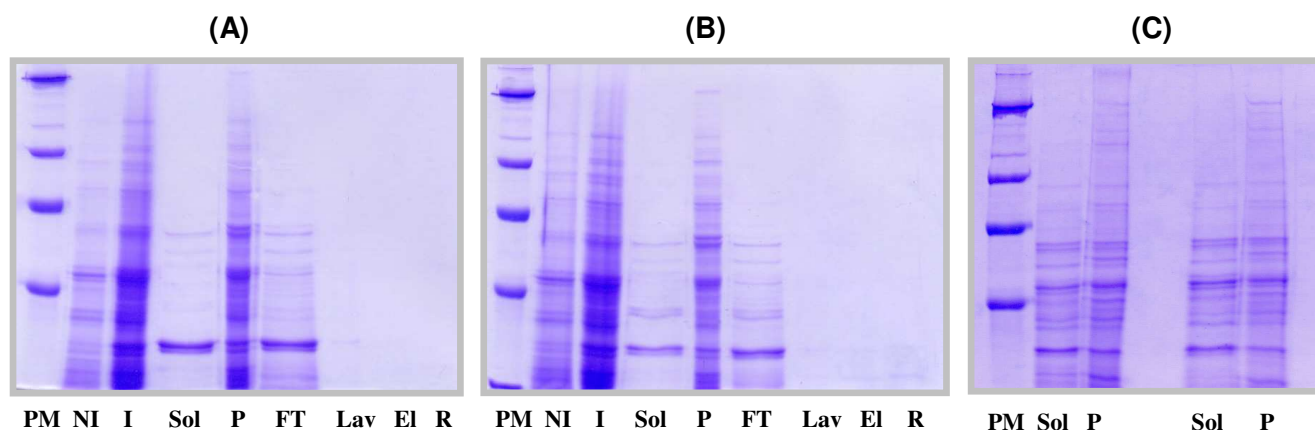


Figura 38: Tentativas de Purificação em sistema de levedura na cepa SUB62 de proteínas PthAs clonadas em pYEX 4T-1. **(A)** GST-PthA2; **(B)** GST-PthA4; **(C)** GST-PthA2 nas duas canaletas iniciais após marcador de peso molecular e GST-PthA4 nas duas últimas canaletas. NI = amostras não induzidas; I = amostra induzida com CuSO_4 ; Sol = fração solúvel; P = fração insolúvel (*pellet*); FT = *Flow Through*; Lav = Lavagem; El = Eluição e R = Resina.

O fato das proteínas de citos Ubc13 e Uev complementarem mutantes de levedura deficientes em vias de reparo de DNA sugere que PthA poderia ser ubiquitinado *in vivo* pelo complexo Ubc13-Uev de levedura. Para testar esta hipótese PthAs 2 e 4 foram expressas em fusão com cauda de GST na cepa de levedura selvagem SUB62 e nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$, como mencionado acima. As proteínas purificadas correspondentes foram transferidas pra membrana de PVDF e incubada com Anti-PthA para confirmar que PthAs 2 e 4 estavam sendo expressos na cepa de levedura selvagem e nas cepas mutantes. Como observado na **Figura 39A** temos bandas correspondentes a GST-PthA2 e GST-PthA4, indicando que o processo de purificação foi bem sucedido e estas proteínas foram expressas em quantidades relativamente iguais tanto na cepa selvagem quanto nas cepas mutantes. As mesmas amostras foram então transferidas para membrana de PVDF e incubadas com Anti-Ubiquitina (**Figura 39B**) para verificar se os PthAs seriam ubiquitinados *in vivo* (neste caso em leveduras). A presença de bandas de menor peso molecular detectadas tanto no blot marcado com Anti-PthA, quanto no blot marcado com Anti-Ubiquitina indicam que PthAs sofreram degradação nas células de levedura. Na membrana incubada com Anti-Ubiquitina, foi detectada uma banda correspondente ao tamanho de GST-PthA2 na cepa selvagem em relação aos mutantes e a GST-PthA4 como indicado pela seta, porém quando a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal Anti-K63 nenhuma banda foi detectada (**Figura 39C**), o que nos leva a acreditar que PthAs 2 e 4 não sofrem ubiquitinação específica K63.

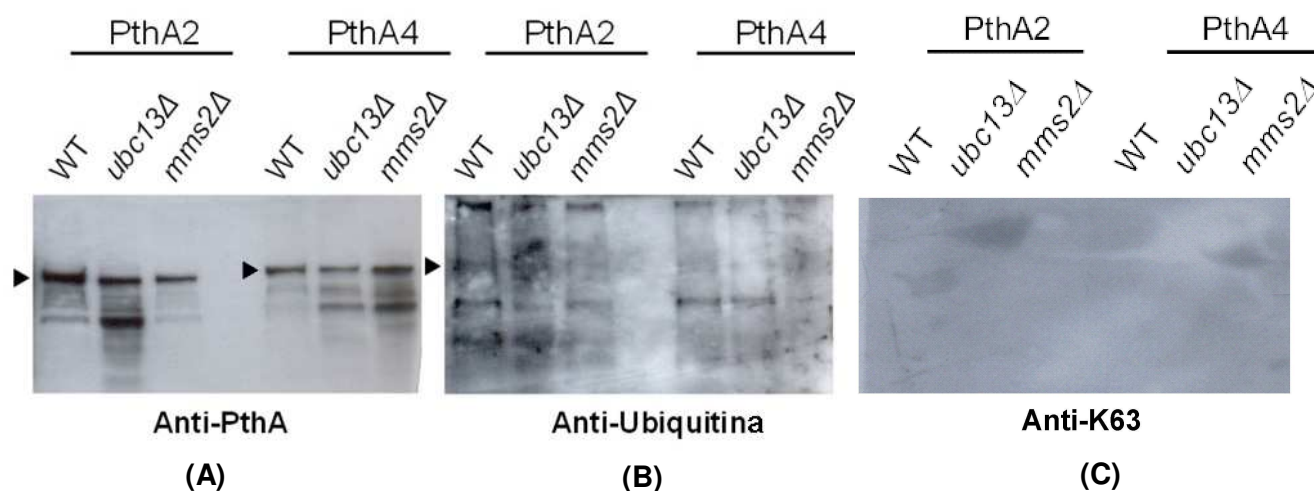


Figura 39: Blots referentes a Purificação em sistema de levedura das proteínas PthA2 e PthA4 clonadas em pYEX 4T-1 (com aproximadamente 140 e 147 kDa, respectivamente) na cepa selvagem SUB62 (WT) e nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$. Em **(A)** membrana incubada com Anti-PthA; **(B)** membrana incubada com Anti-Ubiquitina e **(C)** membrana incubada com Anti-K63. As bandas indicadas por setas no primeiro blot correspondem ao tamanho esperado das proteínas GST-PthA2 e GST-PthA4 purificadas. Em todas as canaletas foram aplicadas amostras correspondentes a proteínas que se ligaram a resina de GST.

4.8. Ubiquitinação em *C. sinensis*

Para testar se PthAs são ubiquitinados *in planta*, epicótilos de *Citrus* da variedade `Hamlin` foram transformados com PthA2, PthA4 ou controle GUS.

Na extração de proteínas de epicótilos de laranja doce transformados de forma transiente via *Agrobacterium*, melhores resultados foram obtidos com um simples processo de extração utilizando tampão de amostra de SDS-PAGE como descrito no item 3.10. Sendo que se pode observar uma grande quantidade de proteínas na fração solúvel das amostras (**Figura 40**). Estas amostras foram então utilizadas para verificar se PthAs são ubiquitinados *in vivo* (em *Citrus*), uma vez que não foi possível detectar ubiquitinação destas proteínas em leveduras, como descrito no item anterior. Na **Figura 41A** observamos que nenhuma banda foi detectada no controle GUS com o anticorpo Anti-PthA, de acordo com o esperado, e neste mesmo blot observa-se também que PthAs 2 e 4 foram fortemente expressos em epicótilos de citros, de tal forma que a expressão transiente foi satisfatória.

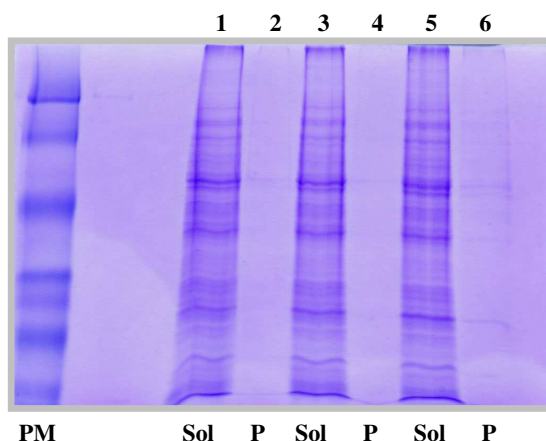


Figura 40: Gel de poliacrilamida 8% representando a Extração de proteínas de epicótilos de *Citrus* `Hamlin` transformados com pBI121-PthA2, pBI121-PthA4 ou controle pBI121-GUS. Sol = fração solúvel; P = fração insolúvel. Canaletas 1 e 2 – pBI121-GUS; 3 e 4 - pBI121-PthA2; 5 e 6 - pBI121-PthA4.

Porém, não foram encontradas bandas correspondentes a PthAs nos blots com Anti-K63 (**Figura 41B**), Anti-Ubiquitina (**Figura 41C**) e nem Anti-SUMO (**Figura 41D**), indicando que PthAs não sofrem ubiquitinação específica K-63 *in vivo* e nem mesmo sumoilação, que poderia ser uma outra possibilidade de modificação pós-traducional.

Foram detectadas bandas extras no blot com anticorpo ubiquitina específico Anti-K63, as quais estão presentes em células de citros transformadas com GUS, mas não nas amostras transformadas com PthAs (**Figura 41B**), o que nos levou a supor que PthAs poderiam inibir ubiquitinação K63.

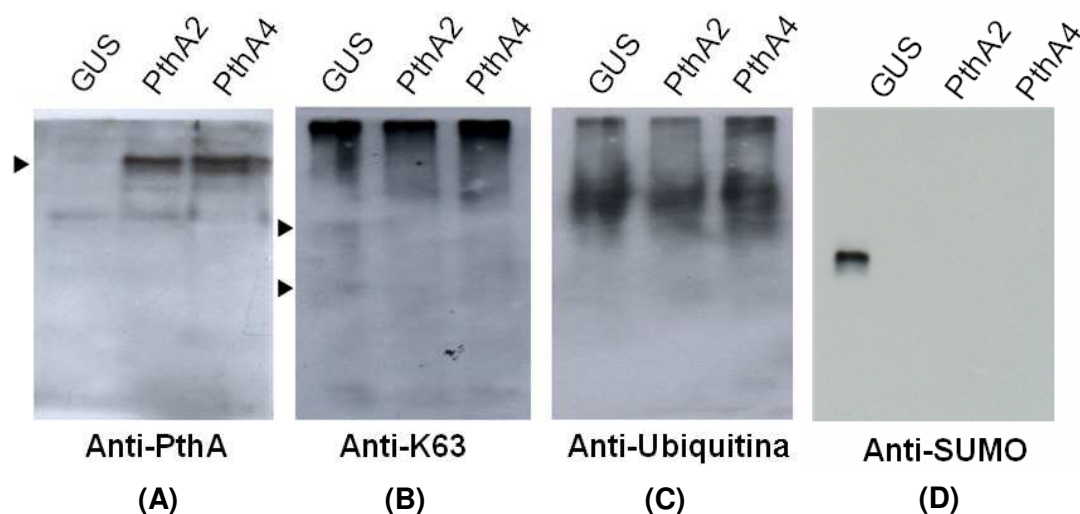


Figura 41: Blots referentes à Expressão Transiente de PthA2, PthA4 e controle GUS via transformação por *Agrobacterium* em epicótilos de *Citrus* `Hamlin`. Membranas incubadas com (A) Anti-PthA; (B) Anti-K63; (C) Anti-Ubiquitina e (D) Anti-SUMO. As setas em (A) indicam bandas correspondentes as proteínas PthA2 e PthA4 sendo expressas fortemente em *Citrus*. Nos demais blots não foram detectadas bandas correspondentes a PthAs.

4.9. PthAs X Mecanismos de Reparo no DNA

Para verificar a hipótese de que PthAs poderiam inibir ubiquitinação K63, utilizou-se a cepa de levedura selvagem SUB62 expressando PthA2 ou PthA4 para testar a habilidade destas construções de crescerem na presença do agente alquilante MMS, que induz dano no DNA. Na **Figura 42A** observou-se que PthAs, na presença deste agente, inibiram significativamente o crescimento de células de leveduras normais. Houve ainda um efeito negativo mais pronunciado na expressão de PthA2 sobre o reparo no DNA do que quando PthA4 foi expresso, embora os níveis intracelulares de PthA4 foram mais elevados em comparação com PthA2 (**Figura 42B**). Na **Figura 42C**, com o anticorpo Anti-Ubiquitina geral pode-se notar uma perda de bandas na amostra de levedura expressando PthA2, comparado com o controle GUS e PthA4. Esta inibição preferencial de PthA2 pela ubiquitinação K63 estaria de acordo com nossa observação de que PthA2 interage preferencialmente com Ubc13/Uev em ensaios *in vivo* e *in vitro* descritos no item 4.1. Com as mesmas amostras foi feito também blot com o anticorpo ubiquitina específico Anti-K63, porém não foram detectadas bandas. Estes dados então indicam que preferencialmente PthA2 inibe ubiquitinação K63 requerida em vias de reparo ao dano no DNA.

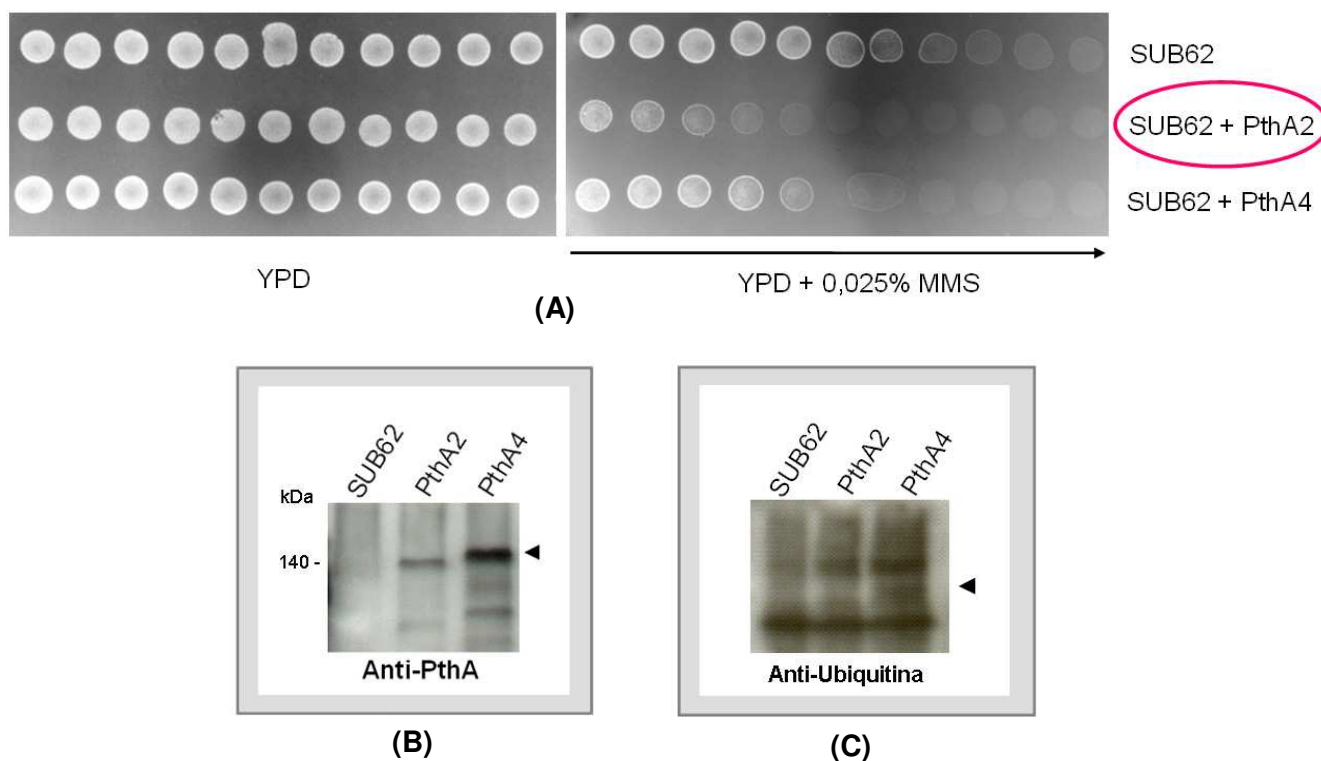


Figura 42: (A) Cepa selvagem de levedura SUB62 e SUB62 expressando separadamente PthAs 2 e 4, crescidas em meio YPD (controle) e YPD + gradiente de MMS. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa 30°C; (B) Blot com anticorpo Anti-PthA confirmando a expressão de PthAs em células de levedura; (C) Blot com anticorpo Anti-Ubiquitina das amostras de PthAs e do controle expressos na cepa selvagem de levedura SUB62.

4.10. Localização de PthAs em Leveduras

Para visualização dos PthAs por Microscopia de Fluorescência o melhor procedimento encontrado foi utilizando as cepas de leveduras frescas logo após indução por CuSO_4 e fixadas com glutaraldeído e Triton X-100. Neste experimento pode-se notar que PthA2 apresentou uma distribuição mais dispersa, estando presente tanto no núcleo quanto no citoplasma das células, enquanto PthA4 foi observado principalmente no núcleo. Além disso, não foram verificadas diferenças na distribuição dos PthAs entre a cepa selvagem de levedura SUB62 (**Figura 43A**) e as cepas mutantes $\Delta ubc13$ (**Figura 43B**) e $\Delta mms2/uev1a$ (**Figura 43C**). Uma vez que acreditávamos que a ausência das proteínas Ubc13 e Uev e, portanto, a ausência de ubiquitinação K63 poderia alterar a localização dos PthAs nas células.

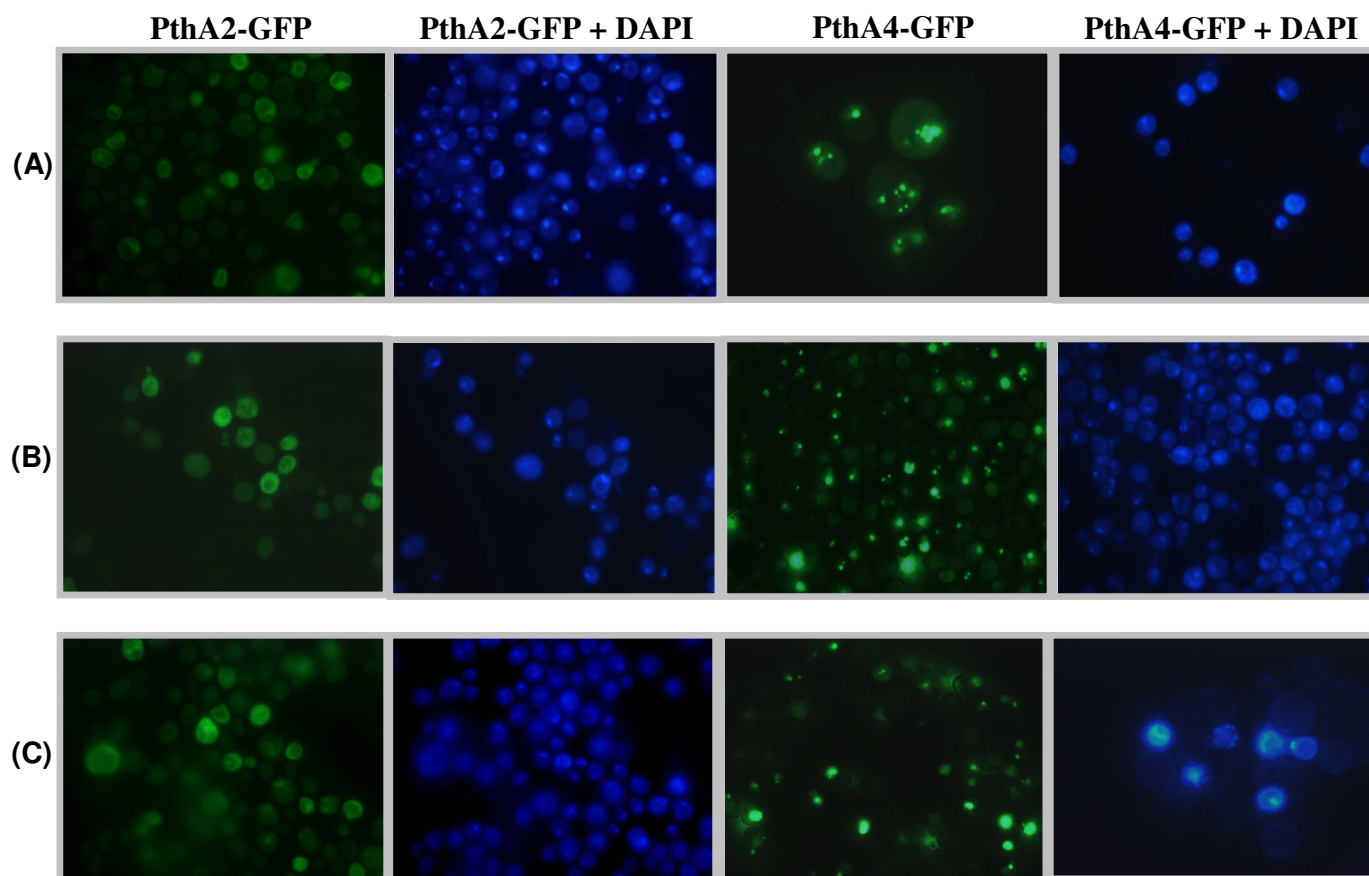


Figura 41: Imagens de Microscopia de Fluorescência representando PthA2-GFP e PthA4-GFP expressos nas cepas de levedura SUB62 e nas cepas mutantes $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$. (A) cepa selvagem SUB62; (B) cepa mutante $\Delta ubc13$ e (C) cepa mutante $\Delta mms2/uev1a$. Corante DAPI foi utilizado para marcação de núcleos.

4.11. Co-Imunoprecipitação de PthA em *C. sinensis*

Para os ensaios de co-imunoprecipitação em citros inicialmente foram realizados testes para obtenção de um bom protocolo para extração de proteínas de folhas de laranja doce. Os melhores resultados foram obtidos com um simples processo de maceração das folhas com N₂ líquido (**Figura 44A**). Com este protocolo obteve-se uma quantidade bem maior de proteínas na forma solúvel comparado com o protocolo utilizando o kit de Extração de Proteínas Totais de Plantas (**Figura 44B**). Como descrito no item 3.12 a fração de proteínas solúveis foi incubada com Anti-PthA ou soro pré-imune (Controle) e Proteína A Sepharose, além de um controle negativo (água infiltrada) incubado com anticorpo Anti-PthA e Proteína A Sepharose. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida (**Figuras 45 e Figura 46A**) e blotadas com os anticorpos Anti-PthA (**Figura 46B**) e Anti-Ubiquitina (**Figura 46C**). Tanto no gel quanto nos blots, as duas maiores bandas evidentes correspondem as cadeias leve e pesada da Imunoglobulina G e não foram detectadas bandas correspondentes a PthAs nem com Anti-PthA e nem com Anti-Ubiquitina, além disso não foram observadas diferenças entre a condição *Xac* + Anti-PthA em relação aos controles *Xac* + anticorpo pré-imune e água + Anti-PthA.

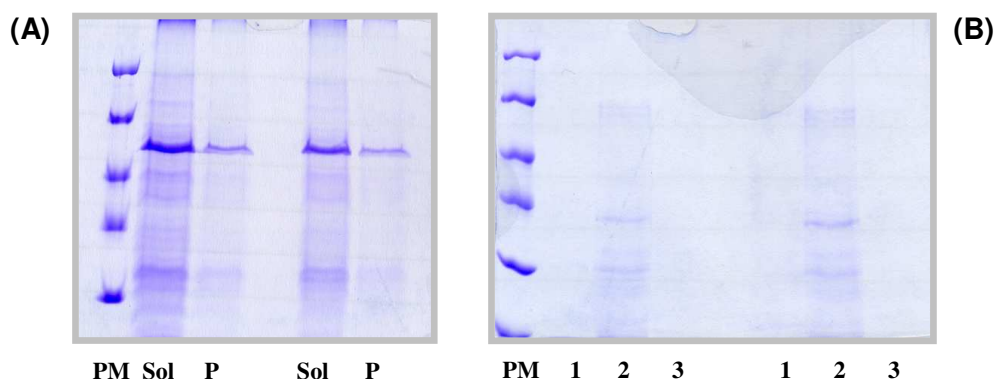


Figura 44: Géis de poliacrilamida 10% representando a Extração de proteínas de folhas de *Citrus* `Hamlin` (**A**) simples protocolo de maceração com N₂ líquido e (**B**) utilizando kit de Extração de Proteínas Totais (Sigma). Em (**A**) Sol = fração solúvel e P = fração insolúvel e em (**B**) Canaleta 1 – amostra de proteínas hidrofílicas; 2 – amostra de proteínas hidrofóbicas; 3 – amostra de proteínas insolúveis.

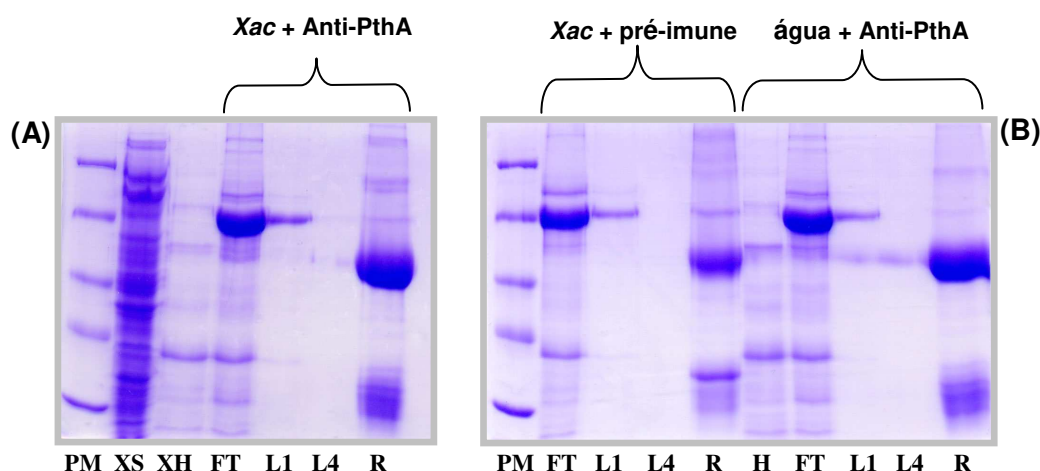


Figura 45: Géis de poliácridamida 10% representando os Ensaio de Co-Imunoprecipitação em folhas de laranja doce infiltradas com suspensão de *Xac*. **(A)** suspensão de *Xac* incubada com anticorpo Anti-PthA; **(B)** Controles - suspensão de *Xac* incubada com anticorpo pré-imune e água incubado com anticorpo Anti-PthA. **XS** = suspensão de *Xac*; **XH** = suspensão de *Xac* solúvel; **FT** = *Flow-Through*; **L1** = primeira lavagem; **L4** = última lavagem e **R** = resina.

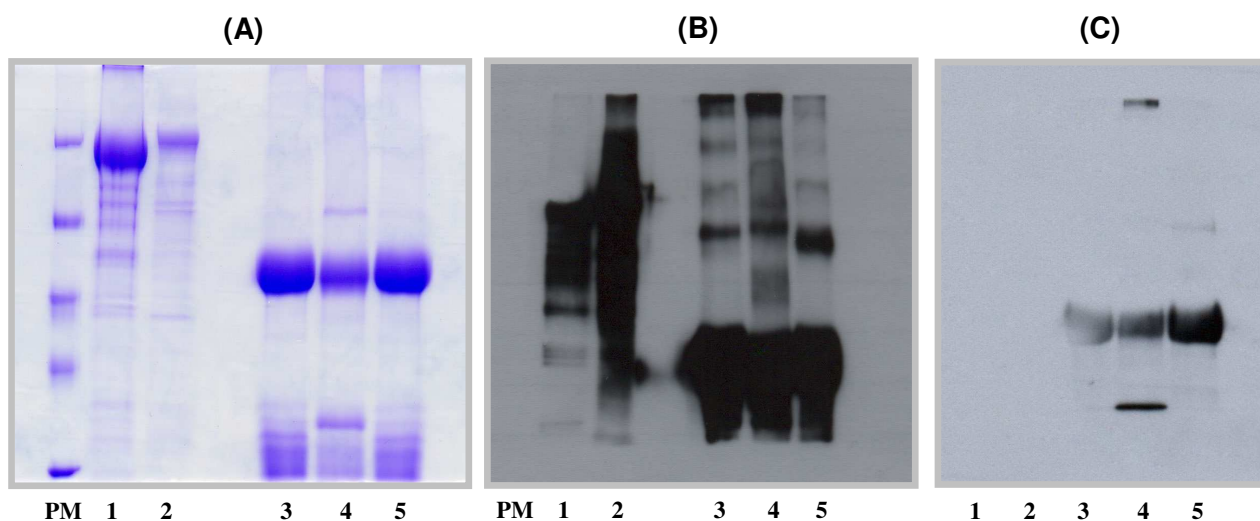


Figura 46: Ensaio de Co-Imunoprecipitação em folhas de laranja doce infiltradas com suspensão de *Xac*. **(A)** Gel de poliácridamida 10% SDS-PAGE representando um destes ensaios com controles de PthAs 2 e 4 com cauda de Histidina purificados de bactérias; **(B)** Blot com anticorpo Anti-PthA e **(C)** Blot com anticorpo Anti-Ubiquitina. Canaletas **1** e **2** – Controles PthAs 2 e 4 purificados de *E. coli*, respectivamente; Canaletas **3** – suspensão de *Xac* incubada com anticorpo Anti-PthA; Canaletas **4** – suspensão de *Xac* incubada com anticorpo pré-imune e Canaletas **5** – Controle negativo de água incubado com anticorpo Anti-PthA.

4.12. Obtenção de Proteínas Recombinantes para Produção de Anticorpos

• Cyp em pET28a

A proteína Cyp com cauda de Histidina apresentou um bom nível de expressão a 37°C (**Figura 47A**). Pode-se observar uma boa quantidade de proteína na fração solúvel, a qual foi utilizada para purificação por Afinidade em resina de níquel com o sistema FPLC. A proteína foi eluída com quase 100% de tampão B, nas alíquotas de B12 a C1 indicadas na **Figura 47B**. Como a purificação por afinidade teve um bom resultado e as amostras eluídas apresentaram um bom grau de pureza não foram necessários passos adicionais de purificação. Portanto, as alíquotas destacadas por um retângulo na **Figura 47B** foram dialisadas para remoção do imidazol do tampão de eluição e então, concentradas e dialisadas como descrito no item 3.13. A amostra final após diálise e concentração para 1 mg/mL está indicada na **Figura 47C**, sendo que a mesma foi liofilizada e enviada para produção de anticorpos.

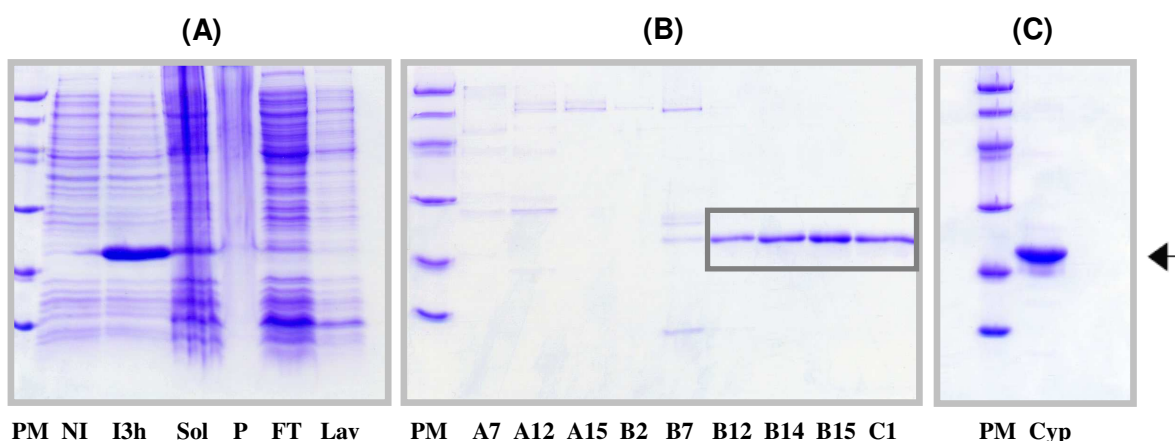


Figura 47: Géis de poliacrilamida 13% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de níquel da proteína Cyp com cauda de Histidina **(A)**; **(B)** Expressão e Purificação; **(C)** Amostra final da proteína dialisada e concentrada. A seta indica a proteína 6xHis-Cyp com peso molecular de 20 kDa. PM = marcador de peso molecular; NI = amostra não-induzida; I3h = amostra com 3 horas de indução; Sol = amostra solúvel; P = amostra insolúvel; FT = *Flow Through*; Lav = lavagem e A7 a C1 = frações da eluição. Retângulo destacado em **(B)** indicam as frações da eluição utilizadas.

- Uev em pET28a

A proteína Uev com cauda de Histidina foi bem expressa a 37°C e o protocolo empregado produziu uma quantidade suficiente de proteínas na forma solúvel (**Figura 48A**). O extrato solúvel foi submetido à purificação por Afinidade em resina de níquel no sistema FPLC e foi obtida, na eluição, uma quantidade razoável de proteína com um ótimo grau de pureza (**Figura 48B**). No gráfico da **Figura 48D** há um pico no qual a proteína foi eluída com quase 100% de tampão B. As amostras correspondentes a este pico podem ser observadas na **Figura 48B**. Algumas alíquotas da eluição foram dialisadas e concentradas para 1 mg/mL. O resultado final da amostra que em seguida foi liofilizada e enviada para produção de anticorpos está indicada na **Figura 48C**.

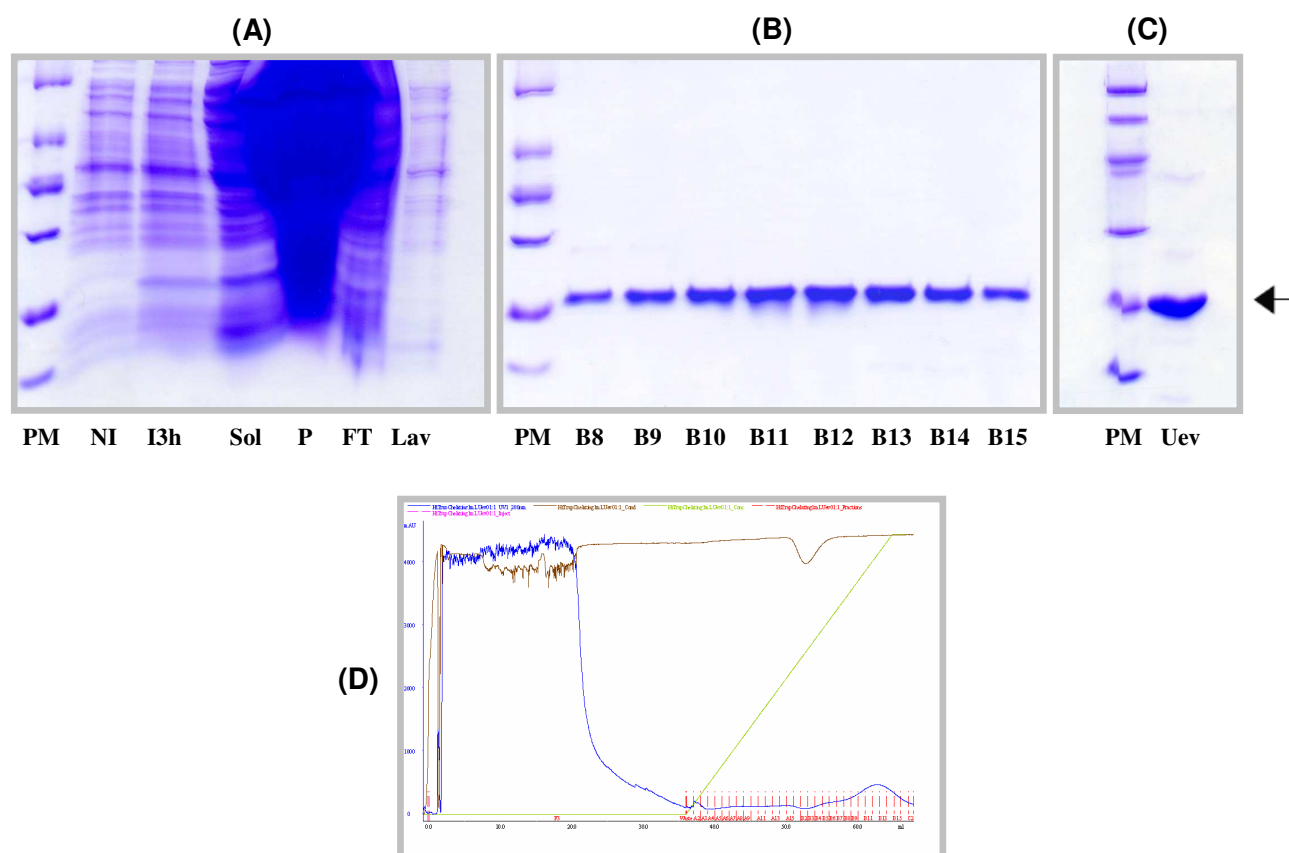


Figura 48: Géis de poliacrilamida 13% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de níquel da proteína Uev com cauda de Histidina (**A**); (**B**) Expressão e Purificação; (**C**) Amostra final da proteína dialisada e concentrada e (**D**) Gráfico da Purificação gerado pelo sistema FPLC. A seta indica a proteína 6xHis-Uev com peso molecular de 18 kDa. PM = marcador de peso molecular; NI = amostra não-induzida; I3h = amostra com 3 horas de indução; Sol = amostra solúvel; P = amostra insolúvel; FT = *Flow Through*; Lav = lavagem e B8 a B15 = frações da eluição.

- **Ubc13 em pGEX4T-1**

Diversos testes foram realizados com o intuito de utilizar a construção da proteína Ubc13 com cauda de Histidina em pET28a, porém nenhum deles foi satisfatório, visto que esta proteína expressa muito pouco neste vetor e se liga de forma inespecífica na resina de níquel, sendo eluída com uma série de contaminantes, apesar de haver um pico bem definido no gráfico gerado pelo programa do sistema FPLC. A presença de contaminantes nas frações eluídas acabou inviabilizando a utilização destas amostras para produção de anticorpos e, desta forma, optamos por trabalhar com a construção com cauda de GST em pGEX4T-1. O nível de expressão da proteína foi melhor nesta construção, assim como a quantidade de proteína na fração solúvel do extrato (**Figura 49A**). Apesar da proteína ter sido eluída juntamente com alguns contaminantes (**Figura 49B**), a quantidade de proteína purificada foi bem maior quando comparada à quantidade de contaminantes, diferentemente do que foi verificado para a construção com cauda de Histidina. As alíquotas da eluição destacadas no retângulo da **Figura 49B** foram dialisadas, concentradas, liofilizadas e enviadas para obtenção de anticorpos.

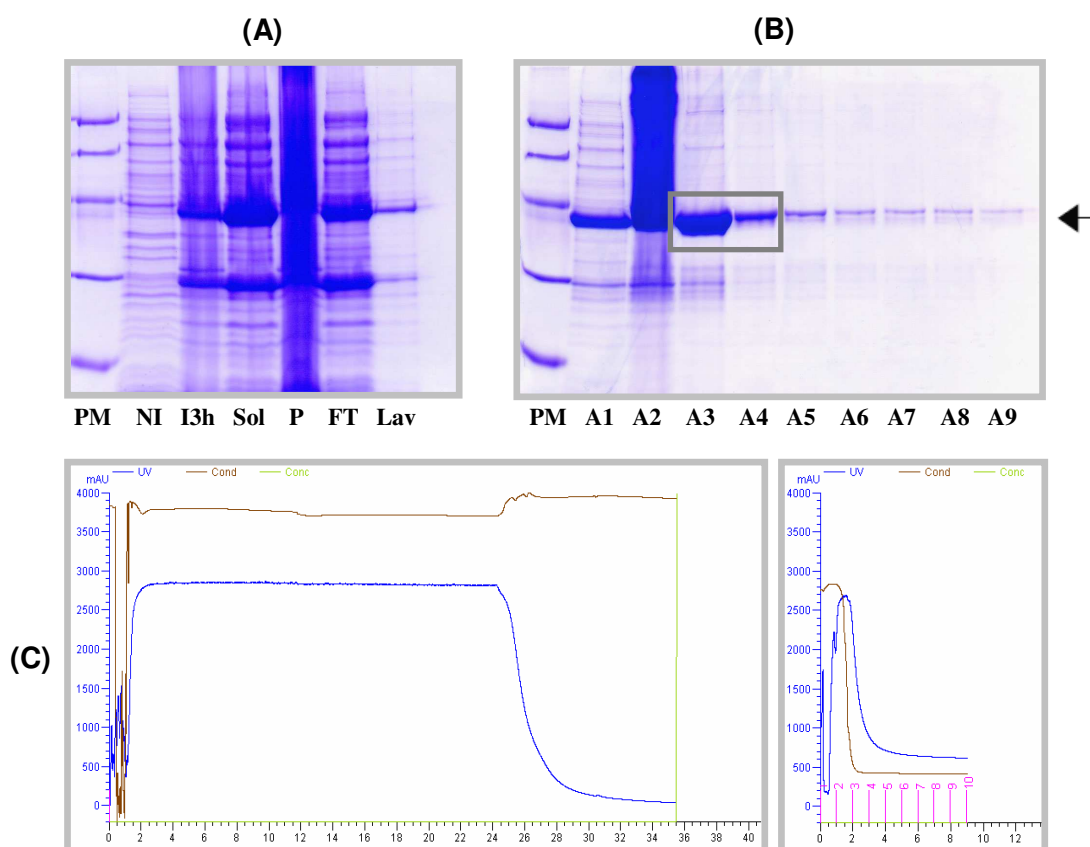


Figura 49: Géis de poliacrilamida 10%SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de GST da proteína Ubc13 em pGEX4T-1. **(A); (B)** Expressão e Purificação e **(C)** Gráfico da Purificação gerado pelo sistema FPLC. A seta indica a proteína GST-Ubc13 com peso molecular de 43 kDa. PM = marcador de peso molecular; NI = amostra não-induzida; I3h = amostra com 3 horas de indução; Sol = amostra solúvel; P = amostra insolúvel; FT = *Flow Through*; Lav = lavagem e A1 a A9 = frações da eluição. Retângulo destacado em **(B)** indicam as frações da eluição utilizadas.

4.13. Complementação do Fenótipo de Cepas Mutantes com Cyp de Citros

De acordo com Arévalo-Rodríguez & Heitman (2005) a proteína CypA, conservada em leveduras, normalmente atua no núcleo das células no controle da esporulação e é codificada pelo gene *CPR1*. Foi reportado também que *Cpr1* se torna essencial em células que tenham a função da proteína *Ess1* comprometida e, nestes casos, a superexpressão de *Cpr1* suprime as mutações de $\Delta ess1$, sugerindo uma sobreposição funcional entre essas duas prolil-isomerases não relacionadas e proporcionando assim evidência de que a atividade enzimática de CypA de levedura é importante para a função biológica. A proteína Cyp de citros apresenta 70% de identidade de sequência com a proteína *Cpr1* de levedura (**Figura 50**). Tendo em vista a elevada identidade entre estas proteínas decidimos testar se a Cyp de citros seria capaz de complementar o fenótipo de cepas de levedura mutantes em *Cpr1* ou *Ess1*. As cepas mutantes $\Delta ess1$ (H164R) e $\Delta cpr1/\Delta cpr1$ (33513) foram gentilmente cedidas por Steven Hanes (Wu et al., 2000) e Joseph Heitman (Arévalo-Rodríguez & Heitman, 2005), respectivamente. Procedemos, então, para as transformações destas cepas com Cyp fusionada a GST (no vetor pYEX 4T-1) ou com o vetor vazio (controle negativo), como descrito no item 3.8.

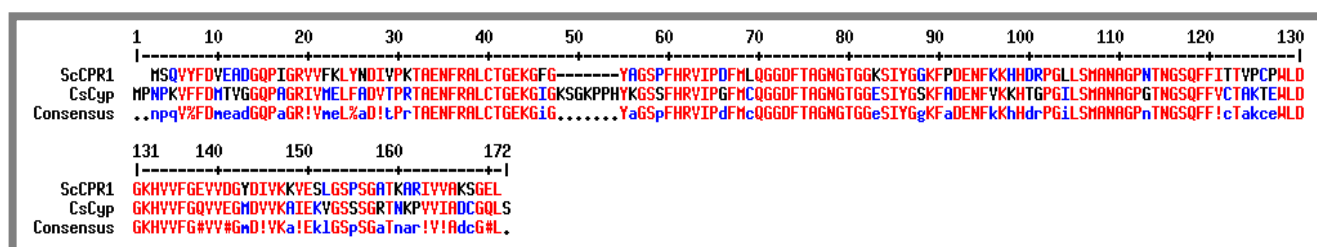


Figura 50: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína Cyp de *C. sinensis* com a proteína ScCPR1 mostrando a identidade de seqüência entre elas. Alinhamento realizado com o programa *MultAlin* (Corpet, 1988).

Na **Figura 51A** pode-se constatar que a proteína Cyp de citros foi expressa no mutante *Cpr1*, estando presente mesmo na fração não-induzida, como também foi visto para Uev e Ubc13 neste mesmo sistema de expressão que emprega um promotor induzido por cobre. Células induzidas expressando GST-Cyp ou GST (controle) foram então crescidas em meio de pré-esporulação e, em seguida, transferidas para um meio de esporulação. Contagens de células em processo de esporulação (**Figura 51B**) foram feitas apartir do terceiro dia após transferência para o meio de esporulação. As contagens foram realizadas em 20 campos de imagem, em microscópio, para cada uma das seguintes condições [33513 – cepa mutante não transformada; 33513 + pYEX vazio (GST) e 33513 + pYEX-Cyp (GST-Cyp)]. As médias dessas contagens ao longo do tempo bem como o erro

padrão associado estão indicadas no gráfico da **Figura 51C**. Analisando este gráfico observa-se que Cyp de citros foi capaz de substituir a função da proteína Cpr1 de levedura no processo de esporulação, visto que a porcentagem de ascos foi bem maior nas células complementadas com GST-Cyp de citros, comparadas com as células não transformadas e com o controle GST. Nota-se também que mesmo células de leveduras mutantes em CypA ($\Delta cpr1/\Delta cpr1$ - 33513) são ainda capazes de passar por processo de esporulação em níveis reduzidos, indicando que CypA é importante para a esporulação, mas não estritamente essencial, como já havia sido reportado anteriormente (Arévalo-Rodríguez & Heitman, 2005). Esses dados indicam que Cyp de citros poderia ter a mesma função de Cpr1 de leveduras.

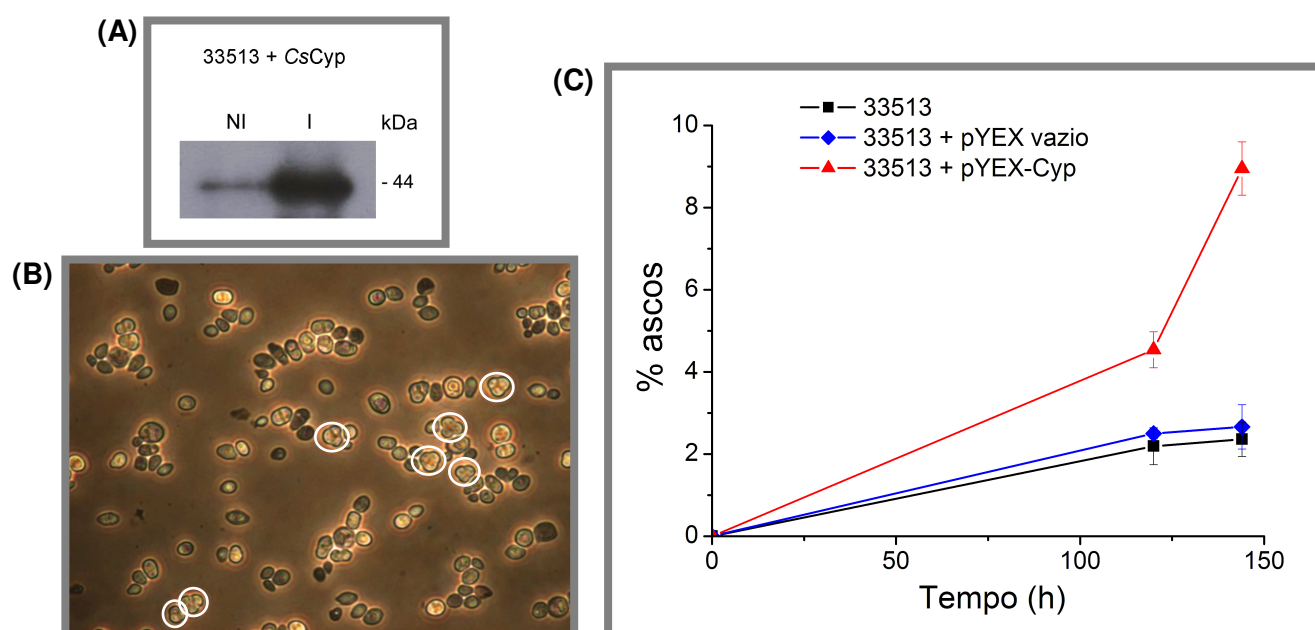


Figura 51: (A) Cepa mutante de levedura 33513 ($\Delta cpr1/\Delta cpr1$) expressando a proteína Cyp de *C. sinensis* em fusão com cauda de GST. Proteínas foram induzidas com 0,5 mM de CuSO_4 por 2 horas e blotadas com anticorpo Anti-GST. Amostras não-induzidas (NI) e induzidas (I) são mostradas; (B) Leveduras em processo de esporulação 120 horas após incubação em meio apropriado estão indicadas por círculos; (C) Cyp de citros complementou cepas de levedura mutantes $\Delta cpr1/\Delta cpr1$ deficientes no processo de esporulação. A esporulação foi medida ao longo do tempo após transferência para um meio de esporulação e representada como a porcentagem de ascos em relação ao número total de células para a cepa mutante 33513 não transformada (em preto), 33513 transformada com pYEX vazio (em azul) e 33513 transformada com pYEX-Cyp (em vermelho). 33513 não transformada e 33513 transformada com pYEX vazio representam os controles. Barras de erro padrão são indicados para os tempos de 120 e 144 horas.

CypA também interage com Ess1, uma prolil-isomerase envolvida no remodelamento de cromatina e no processo de transcrição através da isomerização de prolinas do C-terminal (CTD) da RNA polimerase II (Hani et al., 1999; Wu et al., 2000; Krishnamurthy et al., 2009). A ligação de Ess1,

altera sua estrutura para promover a ligação ou dissociação de proteínas que interagem com CTD e funcionam na transcrição e no processamento de mRNA (Wu et al., 2000). Além disso, a atividade de Ess1 é afetada por uma ubiquitina E3 ligase que promove ubiquitinação K63 e na degradação de RNA polimerase II (Wu et al., 2001; Somesh et al., 2007). Ess1 consiste, portanto, num forte link entre PPlases e a maquinaria transcricional. Tendo por base estes dados testamos se a Cyp de citros seria capaz também de complementar a função da proteína Ess1 de levedura.

O blot da **Figura 52A** indica que a proteína GST-Cyp de citros transformada na cepa mutante de levedura para Ess1 (H164R) está sendo expressa mesmo na fração não induzida do extrato de células. A cepa mutante H164R tem dois dos três resíduos catalíticos de PPlases substituídos, porém estas substituições não alteram a atividade mitótica em temperaturas permissivas, assim, esses mutantes são capazes de crescer a 21°C, mas não a 37°C. Na **Figura 52B** pode-se notar que a expressão de Cyp de citros foi capaz de recuperar o crescimento de mutantes $\Delta ess1$ na temperatura não-permissiva de 37°C. Este resultado sugere que Cyp de citros poderia desempenhar funções semelhantes as de Ess1 de levedura na maquinaria transcricional, através da isomerização de prolinas do CTD da RNA pol II.

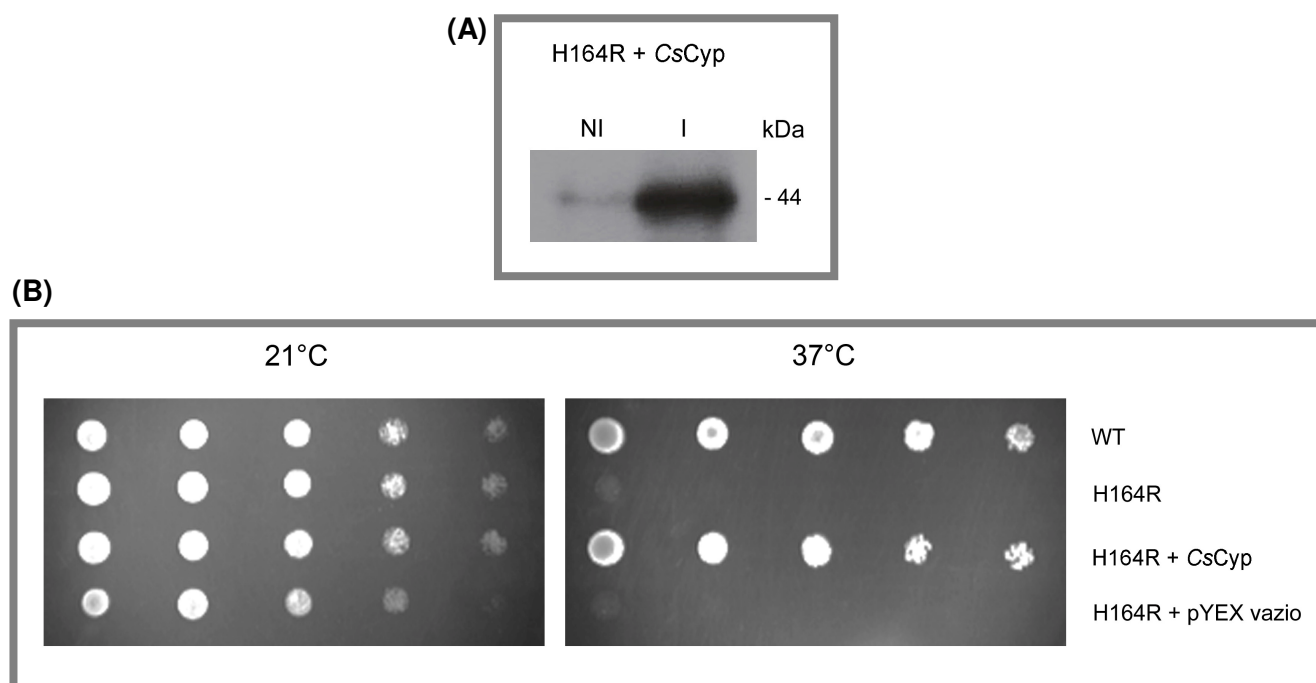


Figura 52: **(A)** Western blot marcado com anticorpo Anti-GST indicando a expressão da proteína GST-Cyp na cepa mutante de levedura H164R ($\Delta ess1$). Amostras não-induzidas (NI) e induzidas (I) são mostradas; **(B)** Crescimento da cepa de levedura selvagem W303-1A (WT), da cepa mutante H164R não transformada e das cepas mutantes transformadas com GST-Cyp ou com GST (controle – pYEX vazio) em temperaturas permissiva (21°C) e não-permissiva (37°C). Células foram crescidas até a fase logarítmica em meio YPD e diluições seriadas foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa nas temperaturas indicadas. Extratos de células expressando WT e células com o gene Ess1 deletado (H164R) também serviram como controles.

4.14. Co-Imunoprecipitação de PthA de *Xac* por Cyp de *C. sinensis*

Inicialmente foram realizados testes para estabelecer a titulação e verificar a especificidade dos anticorpos produzidos e, ainda, se haveria reação cruzada com proteínas endógenas de leveduras e de citros. Os anticorpos obtidos, Anti-Cyp, Anti-Uev e Anti-Ubc13, foram específicos e marcaram as correspondentes proteínas recombinantes purificadas de *E. coli*. Nos três anticorpos em questão, títulos de 1:1000 a 1:3000 foram suficientes para a detecção. Porém, o anticorpo Anti-Cyp foi o único capaz de fazer reação cruzada com proteínas endógenas de citros, enquanto Anti-Uev e Anti-Ubc13 falharam no reconhecimento de proteínas endógenas, tanto de leveduras quanto de citros (**Figura 53**).

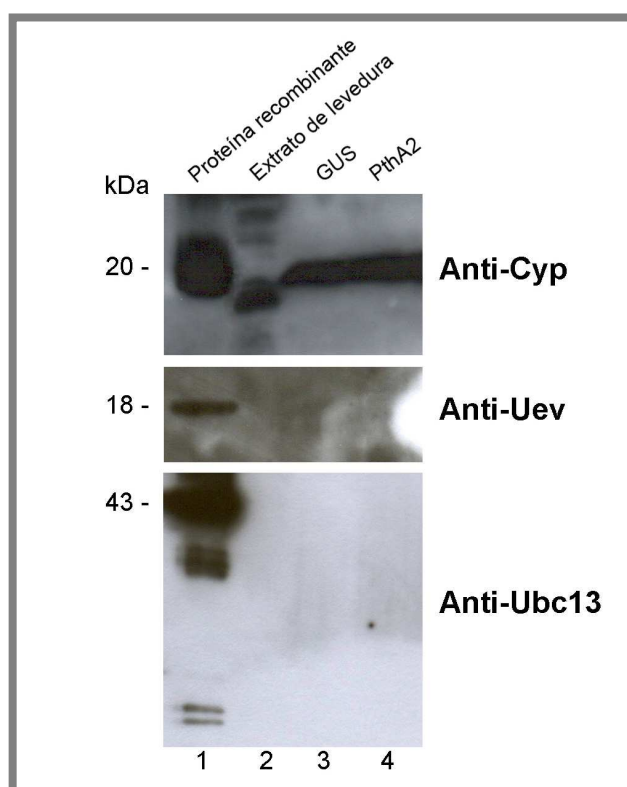


Figura 53: Blots marcados com os anticorpos Anti-Cyp, Anti-Uev e Anti-Ubc13 para verificar se os anticorpos produzidos reconhecem as correspondentes proteínas endógenas em leveduras e em citros. Canaleta 1 – proteína recombinante purificada de *E. coli*; Canaleta 2 – extrato lisado de levedura da cepa selvagem SUB62; Canaleta 3 - lisados celulares de epicótilos de citros expressando GUS; Canaleta 4 - lisados celulares de epicótilos de citros expressando PthA2. Peso Molecular das proteínas Cyp e Uev com cauda 6xHis e de Ubc13 com cauda GST são indicados a esquerda.

A técnica de Co-Imunoprecipitação foi empregada com o objetivo de confirmar a interação das proteínas de citros com PthA de *Xac* *in vivo* (*in planta*), gerando assim uma maior confiabilidade na descrição das interações detectadas. Para tal, epicótilos de laranja doce expressando

transientemente PthA2 foram lisados em tampão apropriado como descrito no item 3.14 e procedeu-se a incubação do extrato proteico com cada um dos anticorpos mencionados acima separadamente ou com o respectivo anticorpo pré-imune (controles) e Proteína A Sepharose. As amostras foram imunoblotadas com Anti-PthA e com Anti-Cyp, Anti-Uev ou Anti-Ubc13. No caso da incubação com Anti-Uev e Anti-Ubc13 nada foi detectado nos blots marcados com Anti-PthA, entretanto encontrou-se um resultado positivo para a incubação com Anti-Cyp (**Figura 54**). Nesta figura pode-se notar que PthA de *Xac* foi co-imunoprecipitada por Cyp de citros.

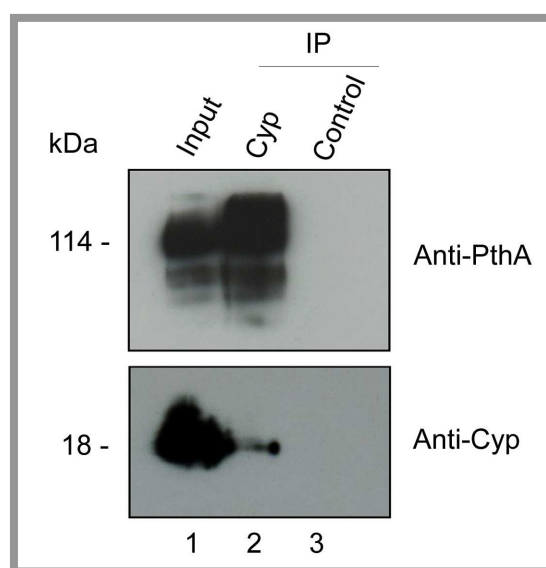


Figura 54: Lisados celulares de epicótilos de citros expressando transientemente PthA2 imunoprecipitados com Anti-Cyp (canaleta 2) ou com soro pré-imune (canaleta 3 - controle) e imunoblotados com os anticorpos Anti-PthA e Anti-Cyp. Na canaleta 1 está indicada a amostra de entrada (input) – extrato proteico incubado com Anti-Cyp, porém antes da incubação com Proteína A Sepharose.

4.15. Preparação de Amostras para SAXS

Para os experimentos de SAXS foi utilizada a construção PthA-RD2 com cauda de Histidina. Esta proteína apresentou bom nível de expressão a 25°C sendo que maior parte da proteína foi obtida na parte solúvel do extrato de *E.coli* (**Figura 55A**). O processo de purificação foi bem sucedido e grande quantidade de proteína foi eluída, como pode ser visto na **Figura 55B**, porém na eluição também foi detectada a presença de contaminantes que se ligaram de forma inespecífica na resina. Analisando o gráfico da **Figura 55C** pode-se notar que o volume de lavagem foi pequeno e que os contaminantes poderiam ter sido eliminados caso a lavagem fosse maior, de tal forma que o valor de mAU decaísse até próximo ao zero, ou ainda, no primeiro pico do gráfico poderia ter sido dado um *hold*, até que o valor de mAU decaísse próximo ao zero, e pudesse haver uma melhor separação entre a amostra desejada e os contaminantes. Foi realizado um passo de Gel Filtração após a purificação por Afinidade.

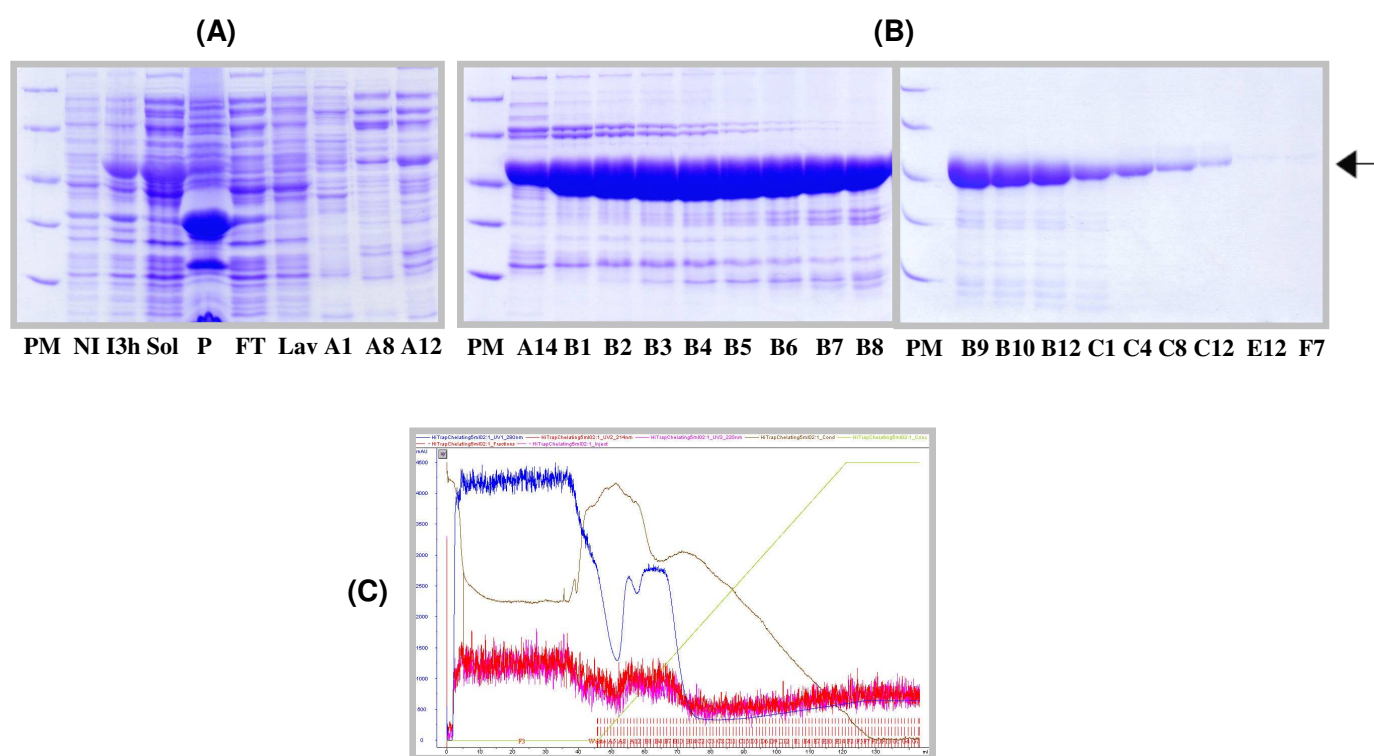


Figura 55: Géis de poliacrilamida 10% SDS-PAGE representando a Expressão e Purificação por Afinidade em resina de níquel da proteína PthA-RD2 em pET28a. **(A)**; **(B)** Expressão e Purificação e **(C)** Gráfico da Purificação gerado pelo sistema FPLC. A seta indica a proteína 6xHis- PthA-RD2 com peso molecular de 59 kDa. PM = marcador de peso molecular; NI = amostra não-induzida; I3h = amostra com 3 horas de indução; Sol = amostra solúvel; P = amostra insolúvel; FT = Flow Through; Lav = lavagem e A14 a F7 = frações da eluição.

Diversas tentativas foram realizadas para a etapa de Gel Filtração no processo de Purificação, nas quais vários picos são observados durante a eluição da amostra, porém em nenhum deles a eluição da proteína em questão foi satisfatória.

Como descrito no item 3.16.1 para tentar melhorar a qualidade das amostras para a coleta de SAXS foi realizado ainda uma etapa de Troca Aniônica. Para tal foi utilizada uma alíquota proveniente de Purificação por Afinidade e dialisada. Entretanto, o resultado encontrado também não foi bom, visto que esta etapa apenas diluiu a amostra inicial de entrada e não houve separação das bandas correspondentes aos contaminantes.

Desta forma, as melhores amostras obtidas e utilizadas na coleta de dados de SAXS estão representadas na **Figura 56A**. Amostras estas provenientes de purificação por Afinidade e Gel Filtração, purificada apenas por Afinidade, purificada por Afinidade e dialisada, purificada por Afinidade, dialisada e concentrada ou purificadas por Afinidade, Gel Filtração e concentradas. O melhor conjunto de dados da coleta foi obtido com a amostra purificada apenas por Afinidade e dialisada para remoção do imidazol do tampão de eluição. Na **Figura 56B** está indicado o DLS proveniente desta amostra, no qual a polidispersividade está dentro da faixa considerada como uma amostra monodispersa (abaixo de 20%) e o peso molecular estimado, próximo do valor real da proteína. Análise dos dados de SAXS foi realizada em colaboração com Dr. Mário T. Murakami do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

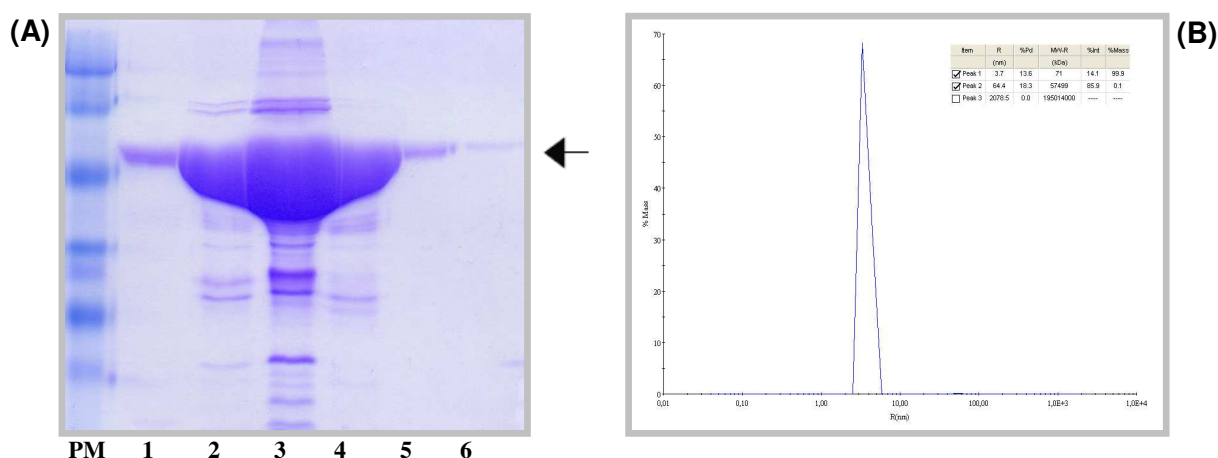


Figura 56: (A) Gel de poliácridamida 10% SDS-PAGE representando as amostras utilizadas na coleta de dados de SAXS. (B) DLS para a amostra que resultou no melhor conjunto de dados para coleta de SAXS. A seta indica a proteína 6xHis-PthA-RD2 com peso molecular de 59 kDa. **1** - amostra purificada por Afinidade e Gel Filtração; **2** - purificada apenas por Afinidade; **3** - purificada por Afinidade e dialisada; **4** - purificada por Afinidade, dialisada e concentrada; **5 e 6** - purificadas por Afinidade, Gel Filtração e concentradas.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos para este trabalho foram descritas novas e diferenciais interações das variantes de PthA de *Xac* com as proteínas de citros Cyp, TDX e o par Ubc13-Uev.

- As 4 variantes de PthA de *Xac* exibiram 2 padrões distintos de interação: PthA2 e PthA3 (15,5 repetições no domínio central) interagem com todas as proteínas de *Citrus sinensis* analisadas (α -importina, TDX, Cyp, Uev e Ubc13), tanto *in vivo* quanto *in vitro*; enquanto que as interações com as variantes 1 e 4 de PthA (16,5 e 17,5 repetições, respectivamente) são mais fracas ou não há interação;
- As variantes de PthA de 15,5 repetições formam homo e heterodímeros, enquanto as variantes maiores, 16,5 e 17,5 repetições não são capazes de formar heterodímeros. Neste caso, a especificidade das interações é mediada pelo domínio central da proteína;
- A presença de 5,5 repetições do domínio central de PthA foi essencial para interação com todas as proteínas de citros testadas, o que indica que a região central de PthA seja a responsável por mediar as interações com as proteínas de citros TDX, Cyp, Uev e Ubc13. Portanto, os resultados obtidos até agora indicam que a região repetitiva de PthA pode não ser apenas crítica para o reconhecimento de seqüências promotoras alvo de citros, como esperado, considerando o papel desempenhado por AvrBs3, mas parece também desempenhar um importante papel na interação com proteínas do hospedeiro;
- A região do LRR de PthA, adjacente ao NLS, é suficiente para promover interação com a proteína α -importina;
- PthAs de *Xac* e as proteínas de citros Cyp e Uev possuem localização nuclear em células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana*;
- PthAs induzem HR em plantas de tabaco, de tal forma que PthA poderia ser reconhecida pelo sistema de resistência desta planta, mediado por proteínas *R*, reforçando a existência de uma interação planta-patógeno incompatível neste caso;
- As proteínas de citros TDX, Cyp, Uev e Ubc13 interagem entre si e podem fazer parte de um possível complexo juntamente com PthAs de *Xac*;
- Cyp de citros é uma ciclofilina clássica, ou seja, possui atividade de PPIase e é inibida por Ciclosporina A;
- PthA e CsA competem pela ligação ao sítio ativo de Cyp e ao contrário do que se acreditava PthA não é alvo de Cyp, mas sim inibe sua atividade;

- Cyp de citros complementou funcionalmente mutantes de leveduras Cpr1 e Ess1 envolvidos na maquinaria transcricional, indicando que a proteína de citros poderia exercer um papel semelhante;
- PthA de *Xac* foi co-imunoprecipitado com Anti-Cyp em epicótilos de citros, confirmando os ensaios de interação em leveduras e *in vitro*;
- Análises da expressão gênica de PthA na presença do inibidor de Cyp, CsA, estão sendo realizadas para investigar um possível papel de Cyp de citros na transcrição dependente de PthA;
- Ubc13 de citros interage, *in vivo* e *in vitro*, com Uev e apenas com a variante 2 de PthA, mas não com a variante 4, o que indica que o número de repetições no domínio central de PthA afeta seu perfil de interação, de tal forma que PthA2, mas não PthA4, poderia ser alvo da ubiquitinação K63;
- Ubc13 e Uev de citros complementaram funcionalmente as cepas mutantes de leveduras $\Delta ubc13$ e $\Delta mms2/uev1a$, respectivamente, indicando que estas proteínas poderiam ser homólogos funcionais das proteínas Ubc13 e Uev de levedura e assim, estariam envolvidas em vias de reparo de DNA;
- Dados de Ubiquitinação *in vivo* (em leveduras e em citros) nos leva a acreditar que PthAs 2 e 4 não sofrem ubiquitinação específica K63, sendo que preferencialmente PthA2 inibe ubiquitinação K63 requerida para o reparo no DNA;
- Por meio de ensaios de fluorescência em *N. benthamiana* foi visto que a ausência de ubiquitinação K63 (cepas mutantes de leveduras) não altera a localização dos PthAs nas células e, portanto, não é dependente do complexo Ubc13-Uev;
- Os dados obtidos apontam para um modelo em que PthAs deveriam inibir a atividade de um complexo de proteínas de citros associado com reparo ao dano no DNA;
- PthAs poderiam inibir também a ubiquitinação K63 do CTD da RNA pol II e ao mesmo tempo favorecer a ação de Cyp para aumentar as taxas de iniciação e terminação da transcrição. Esta idéia está de acordo com o papel esperado para PthAs como ativadores transcricionais e é suportada pelo fato que ambas as proteínas de citros Cyp e Uev foram identificadas no núcleo.

De forma geral, nossos dados permitem concluir que PthAs de *X. citri*, funcionam como fatores de transcrição em citros, porém, não devem atuar de forma isolada e sim necessitam da atividade de outras proteínas da célula hospedeira para promoverem uma ação como ativadores transcricionais. Nossos dados sugerem que pelo menos PthAs 2 e 3 modulam a transcrição alterando a atividade da RNA polimerase II pela inibição de proteínas acessórias da maquinaria transcricional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, P. K. Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories*, 5(2):1-12, 2006.
- Alfano, J. R. & Collmer, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol.*, 42:385-414, 2004.
- Al-Saadi, A.; Reddy, J. D.; Duan, Y. P.; Brunings, A.M.; Yuan, Q.; Gabriel, D.W. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one PthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol Plant Microbe Interact*, 20:934–943, 2007.
- Andersen, K. M.; Hoffmann, K.; Hartmann-petersen, R. Ubiquitin-binding protein: similar, but different. *The Biochemical Society Essays in Biochemistry* vol.4:49-63, 2005a.
- Andersen, P. L.; Zhou, H.; Pastushok, L.; Moraes, T.; McKenna, S.; Ziola, B.; Ellison, M. J.; Dixit, V. M.; Xiao, W. Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *The Journal of Cell Biology*, 170(5):745–755, 2005b.
- Angot, A.; Vergunst, A.; Genin, S.; Peeters, N. Exploitation of Eukaryotic Ubiquitin Signaling Pathways by Effectors Translocated by Bacterial Type III and Type IV Secretion Systems. *PLoS Pathogens*, 3:1, 2007.
- Arévalo-Rodríguez, M. & Heitman, J. Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 4, 17–29, 2005.
- Arévalo-Rodríguez, M.; Cardenas, M.E.; Wu, X.; Hanes, S.D.; Heitman, J. Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J.* 19, 3739-3749, 2000.
- Barbosa-Mendes, J. M.; Mourão-Filho, A. A. F.; Bergamin-Filho, A.; Harakava, R.; Beer, V. S.; Mendes, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. *Scientia Horticulturae*, 122: 109–115, 2009.
- Berndt, C.; Christopher, H. L.; Holmgren, A. Review: Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:641–650, 2008.
- Boch, J. & Bonas, U. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 48:419–36, 2010.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. Breaking the code of DNA-binding specificity of TAL-Type III effectors. *Science* 326, 1509–1512, 2009.
- Boston, R. S.; Viitanen, P. V.; Vierling, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* 32: 191–222, 1996.

- Bové, J. M. & Ayres, A. J. Etiology of Three Recent Diseases of *Citrus* in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Life*. 59, 346-354, 2007.
- Broomfield, S.; Chow, B. L.; Xiao, W. *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5678–5683, 1998.
- Büttner, D. & Bonas, U. Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.*, 21: 5313-5322. 2002.
- Büttner, D. & Bonas, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Mar;34(2):107-33, 2010. Review.
- Büttner, D. & Bonas, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology*, 9:193–200, 2006.
- Brunings, A. M. & Gabriel, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4 (3):141-157, 2003. Review.
- Cernadas, R. A. & Benedetti, C. E. Role of Auxin and Gibberellin in citruscanker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Sci.* 177, 190-195, 2009.
- Cernadas, R. A., Camillo, L. R. and Benedetti, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 609-631, 2008.
- Chalfie, M.; Yu, T.; Guskirchen, G.; Ward, W. W.; Parsher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805, 1994.
- Cheung, J. & Smith, D. F. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol* 14:939–946, 2000.
- Coaker, G.; Falick, A.; Staskawicz, B. Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic Cyclophilin *Science* 308, 548, 2005.
- Coaker, G.; Zhu, G.; Ding, Z.; Van Doren, S. R.; Staskawicz, B. Eukaryotic cyclophilin as a molecular switch for effector activation *Molecular Microbiology* 61 (6):1485–1496, 2006.
- Coates, P.J. & Hall, P.A. The yeast two hybrid system for identifying protein-protein interactions. *J.Pathol.* v.199, p. 4-7, 2003.
- Corpas, F. J.; Trelease, R. N. The plant 73kDa peroxisomal membrane protein, PMP73, is immunorelated to molecular chaperones. *Eur J Cell Biol* 73:49–57, 1997.
- Corpet, F. “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering” *Nucl.Acids.Res.*, 16 (22):10881-10890, 1988.
- Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. Understanding improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455, 1995.

- da Silva, A. C.; Ferro, J. A.; Reinach, F. C.; Farah, C. S.; Furlan, L. R.; Quaggio, R. B.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Van Sluys, M.A.; Almeida, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417:459-463, 2002.
- Das, A. K. Citrus canker – A review *J. Appl. Hort.*, 5 (1):52-60, 2003.
- Daulny, A.; Geng, F.; Muratani, M.; Geisinger, J. M.; Salghetti, S. E.; Tansey, W. P. Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation. *PNAS*, 105 (50) 19649–19654, 2008.
- Daulny, A. & Tansey, W. P. Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system. *DNA Repair* 8, 444-448, 2009.
- Deng, W.; Chen, L.; Wood, D. W.; Metcalfe, T.; Liang, X.; Gordon, M. P.; Comai, L.; Nester, E.W. *Agrobacterium* Vird2 Protein Interacts With Plant Host Cyclophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7040–7045, 1998.
- Devoto, A.; Muskett, P. R.; Shirasu, K. Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol.*, 4:307-11, 2003.
- Domingues, M. N.; Souza, T. A.; Cernadas, R. A.; Oliveira, M. L. P.; Docena, C.; Farah, S. C.; Benedetti, C. E. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Molecular Plant Pathology*, 11 (5), 663-675, 2010.
- Du, H.; Fuh, R. A.; Li, J.; Corkan, A.; Lindsey, J. S. "PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry" *Photochemistry and Photobiology*, 68:141-142, 1998.
- Duan, Y. P.; Castañeda, A.; Zhao, G.; Erdos, G.; Gabriel, D. W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant-Microbe Interact*, 12 (6):556-560, 1999.
- Galat, A. Review: Peptidylproline cis-trans-isomerases : immunophilins. *FEBS Eur. J. Biochem.*, 216: 689-707, 1993.
- Galat, A. Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: an analysis of the cyclophilin family of proteins. *Arch Biochem Biophys* 371:149–162, 1999.
- Geetha, T.; Kenchappa, R.S.; Wooten, M.W.; Carter, B.D. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *The EMBO Journal* , 24:3859–3868, 2005.
- Gerlach, R. G. & Hensel, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol.*, 297: 401–415, 2007.
- Ghosh, P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol R*, 68: 771–795, 2004.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A.. Transformation of yeast by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods in Enzymology* 350: 87-96, 2002.

- Gill, S. C. & Von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182:319-326, 1989.
- Göhre, V. & Robatzek, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol.*, 46:189-215, 2008.
- Goritschnig, S.; Zhang, Y.; Li, X. The ubiquitin pathway is required for innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 49(3): 540 – 551, 2007.
- Görlich, D. Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol.*, 9(3):412-9, 1997. Review.
- Gottwald, T. R.; Graham J. H.; Schubert, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 2002.
- Gourlay, L. J.; Angelucci, F.; Baiocco, P.; Boumis, G.; Brunori, M.; Bellelli, A. & Miele, A. E. The Three-dimensional Structure of Two Redox States of Cyclophilin A from *Schistosoma mansoni* – Evidence for redox regulation of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J. Biol. Chem.*, 282(34):24851–24857, 2007.
- Gullerova, M.; Barta, A.; Lorkovic, Z. J. AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* 12:631–643, 2006.
- Gürlebeck, D.; Szurek, B.; Bonas, U. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.*, 42:175-187, 2005.
- Gürlebeck, D.; Thieme, F.; Bonas, U. Type III effector proteins from pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, 163:233-255, 2006.
- Graham, J. H. & Gottwald, T. R. Research perspectives on eradication of citrus bacterial canker diseases in Florida. *Plant Disease*, 75: 1193-1200, 1991.
- Graham, J. H.; Gottwald, T. R.; Cubero, J.; Achor, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol.*, 5(1):1-15, 2004.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M. & Dangl, J. L. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 425–449, 2006.
- Hani, J.; Schelbert, B.; Bernhardt, A.; Domdey, H.; Fischer, G.; Wiebauer, K.; Rahfeld, J. U. Mutations in a peptidylprolyl-cis/ trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a premRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 274, 108–116, 1999.
- Hatzfeld, M. The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol.*, 186:179-224, 1999. Review.
- He, S.Y.; Nomura, K.; Whittam, T.S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694:181–206, 2004.
- Hicks, G. R. & Raikhel, N. V. Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(3):734-8, 1995.

- Hiraishi, H.; Mochizuki, M.; Takagi, H. Enhancement of Stress Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of Ubiquitin Ligase Rps5 and Ubiquitin-Conjugating Enzymes. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 70 (11) 2762-2765, 2006.
- Hoege, C.; Pfander, B.; Moldovan, G.; Pyrowolakis, G.; Jentsch, S. *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419:135-141, 2002.
- Hofmann, K. Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response. *DNA Repair* 8, 544–556, 2009.
- Hofmann, R. M. & Pickart, C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitinconjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96:645–653, 1999.
- Huen, W. J.; Huang, J.; Yamamoto, Y. J.; Akira, S.; Ashley, C.; Xiao, W.; Chen, J. Noncanonical E2 variant-independent function of UBC13 in promoting checkpoint protein assembly. *Mol. Cell Biol.* 28, 19, 6104-12, 2008.
- Hurley, J.H.; Lee, S.; Prag, G. Review Article Ubiquitin-binding domains. *Biochem. J.* 399:361–372, 2006.
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E.A. Genomics libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, v. 144, p. 1425-1436, 1996.
- Janjusevic, R.; Abramovitch, R. B.; Martin, G. B.; Stebbins, C. E. A Bacterial Inhibitor of Host Programmed Cell Death Defenses is an E3 Ubiquitin Ligase. *Science* 311:222-226, 2006.
- Jans, D. A. & Hübner, S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev.*, 76(3):651-85, 1996. Review.
- Jeong, S.; Kim, H.; Yang, Y.; Seol, J.; Jung, B.; Han, J.; Lee, H.; Cho, E. Role of RNA Polymerase II Carboxy Terminal Domain Phosphorylation in DNA Damage Response. *The Journal of Microbiology*, 43 (6) p.516-522, 2005.
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature Reviews* Vol. 444 323-29, 2006.
- Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S.H., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K.; Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat. Cell. Biol.* 11, 312-319, 2009.
- Kay, S. & Bonas, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 37-43, 2009.
- Kay, S.; Hahn, S.; Marois, E.; Hause, G.; Bonas, U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318: 648-651, 2007.
- Kimmins, S. & Macrae, T. H. Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell stress chaperones*, 5:76–86, 2000.

- Kofron, J. L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Bonilla-Colon, E.; Rich, D. H. Determination of Kinetic Constants for Peptidyl-Prolyl *Cis-Trans* Isomerases by an improved Spectrophotometric Assay. *Biochemistry* 30:6127-6134, 1991.
- Krishnamurthy, S.; Ghazy, M. A.; Moore, C.; Hampsey, M. Functional interaction of the Ess1 prolyl isomerase with components of the RNA polymerase II initiation and termination machineries. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2925-2934, 2009.
- Lahaye, T. & Bonas, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends in Plant Science*, 6 (10):479-485, 2001. Review.
- Lam, E.; Kato, N.; Lawton, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411: 848-853, 2001.
- Laxa, M.; Onig, J. K.; Dietz, K. J.; Kandlbinder, A. Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and redox-related functions *Biochem. J.* 401:287-297, 2007.
- Lin, A. & Karin, M. NF- κ B in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* 13:107-114, 2003.
- Lu, K. P.; Finn, G.; Lee, T. H.; Nicholson, L.K. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature Chemical Biology*, 3:619 – 629, 2007.
- Marois, E.; Ackerveken, G.V.; Bonas, U. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hyperthrophy in the susceptible host. *Mol Plant-Microbe Interact*, 15 (7):637-646, 2002.
- Mcdonough, H. & Patterson, C. Mini-review CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress & Chaperones*, 8 (4):303-308, 2003.
- Mckenna, S.; Moraes, T.; Pastushok, L.; Ptak, C.; Xiao, W.; Spyrapopoulos, L.; Ellison, M.J. An NMR-based model of the ubiquitin-bound human ubiquitin conjugation complex Mms2.Ubc13. The structural basis for lysine 63 chain catalysis, *J. Biol. Chem.* 278:13151-13158, 2003a.
- Mckenna, S.; Hu, J.; Moraes, T.; Xiao, W.; Ellison, M. J.; Spyrapopoulos, L. Energetics and specificity of interactions within Ub · Uev · Ubc13 human ubiquitin conjugation complexes. *Biochemistry* 42:7922-7930, 2003b.
- Mckenna, S.; Spyrapopoulos, L.; Moraes, T.; Pastushok, L.; Ptak, C.; Xiao, W.; Ellison, M.J. Noncovalent Interaction between Ubiquitin and the Human DNA Repair Protein Mms2 Is Required for Ubc13-mediated Polyubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43): 40120-40126, 2001.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S.; Cramer, P. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19, 1401-1415, 2005.
- Meyer, Y.; Siala, W.; Bashandy, T.; Riondet, C.; Vignols, F.; Reichheld, J. P. Review: Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et. Biophysica Acta* 1783:589-600, 2008.
- Meyers, B. C.; Kozik, A.; Griego, A.; Kuang, H.; Michelmore, R.W. Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 15, 809-834, 2003.

- Miernyk, J. A. Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol.* 121:695–703, 1999.
- Moraes, T. F.; Edwards, R. A.; McKenna, S.; Pastushok, L.; Xiao, W.; Glover, J. N.; Ellison, M. J. Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nat. Struct. Biol.* 8:669–673, 2001.
- Morris, D. P. & Greenleaf, A. L. The Splicing Factor, Prp40, Binds the Phosphorylated Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II *The Journal of Biological Chemistry* 275, 51, 39935–39943, 2000.
- Morris, D. P.; Phatnani, H. P.; Greenleaf, A. L. Phospho-Carboxyl-Terminal Domain Binding and the Role of a Prolyl Isomerase in Pre-mRNA 3-End Formation. *Journal of Biological Chemistry.* 274, 44, 31583–31587, 1999.
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs TAL effector-DNA recognition. *Science*, 326, 1501, 2009.
- Motohashi, K.; Koyama, F.; Nakanishi, Y.; Ueoka-nakanishi, H.; Hisabori, T. Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin. thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J. Biol. Chem.* 278:31848–31852, 2003.
- Mudgett, M. B. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 509–531, 2005.
- Murakami, M.T.; Sforça, M.L.; Neves, J.L.; Paiva, J.H.; Domingues, M.N.; Pereira, A.L.A.; Zeri, A.C.M.; Benedetti, C.E. The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. *Proteins: Structure, Functions and Bioinformatics*, in press.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497, 1962.
- Murata, S.; Chiba, T.; Tanaka, K. Review CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:572–578, 2003.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., & Tanaka, K. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* 2, 1133–1138, 2001.
- Neves, M. F.; Jank, M. S.; Lopes, F. F.; Trombin, V. G.; Fava, B. B.; Brugnaro, R. Perspectivas da Cadeia Produtiva da Laranja no Brasil: A Agenda 2015, 2006.
- Panier, S. & Durocher, D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA-double strand breaks. *DNA Repair* 8, 436-443, 2009.
- Pelzer, L.; Pastushok, L.; Moraes, T.; Glover, J.N.M.; Ellison, M.J.; Ziola, B.; Xiao, W. Biological significance of structural differences between two highly conserved Ubc variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378:563–568, 2009.
- Pfalz, J.; Bayraktar, O. A.; Prikryl, J.; Barkan, A. Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J.*, 28:2042–2052, 2009.
- Plafker, S. M.; Plafker, K. S.; Weissman, A. M.; Macara, I. G. Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import. *The Journal of Cell Biology*, 167:4, 2004.
- Preston, G. M.; Studholme, D. J.; Caldelari, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, 29: 331–360, 2005.

- Rajagopal, L.; Sundari, C. S.; Balasubramanian, D.; Sonti, R. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett*, 415: 125–128, 1997.
- Romano, P. G. N.; Horton, P.; Gray, J. E. The *Arabidopsis* Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiology* 134:1268-1282, 2004.
- Römer, P.; Hahn, S.; Jordan, T.; Strauss, T.; Bonas, U. & Lahaye, T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318, 645-648, 2007.
- Römer, P.; Strauss, T.; Hahn, S.; Scholze, H.; Morbitzer, R.; Grau, J.; Bonas, U. & Lahaye, T. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol.* 150, 1697–1712, 2009.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A.; Tanaka, K. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J.* 28, 359-371, 2009.
- Schornack, S.; Meyer, A.; Römer, P.; Jordan, T.; Lahaye, T. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant Physiol.*, 163:256-272, 2006.
- Schubert, T. S. & Sun, X. Bacterial Citrus Canker. *Plant Pathology Circular* . 377 Fl. Dept. of Agriculture & Cons. Svcs. Division of Plant Industry May/June 1996 (fifth revision January 2003).
- Shcherbik, N. & Haines, D. S. Ub on the move. *J Cell Biochem.* 93(1):11-9, 2004.
- Smith, H. M. & Raikhel, N. V. Nuclear localization signal receptor importin alpha associates with the cytoskeleton. *Plant Cell.*, 10(11):1791-9, 1998.
- Somesh, B. P.; Sigurdsson, S.; Saeki, H.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Svejstrup, J.Q. Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell*, 129, 57–68, 2007.
- Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J.E. Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* 214: 253–260, 1990.
- Sugio, A.; Yang, B.; Zhu, T. and White, F.F. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA γ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10720-10725, 2007.
- Sun, L. & Chen, Z. J. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:119–126, 2004.
- Syed, N. A.; Andersen, P. L.; Warrington, R. C.; Xiao, W. Uev1A, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF- κ B activation *Apoptosis* 11:2147–2157, 2006.
- Szurek, B.; Marrois, E.; Bonas, U.; van den Ackerveken, G. Eukaryotic features of the Xanthomonas type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, 26:523-534, 2001.
- Szurek, B.; Rossier, O.; Hause, G. & Bonas, U. Type III dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.*, 46, 13–23, 2002.

- Swarup, S.; de Feyter, E.; Bransky, R. H.; Gabriel, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology*, 81:802-809, 1991.
- Swarup, S.; Yang, Y.; Kingsley, M. T.; Gabriel, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Microbe-Plant Interact*, 5: 204-213, 1992.
- Uetz, P.; Giot, L.; Cagney, G.; Mansfield, T. A.; Judson, R.S.; Knight, J. R.; Lockshon, D.; Narayan, V.; Srinivasan, M.; Pochart, P.; Qureshi-Emili, A.; Li, Y.; Godwin, B.; Conover, D.; Kalbfleisch, T.; Vijayadamodar, G.; Yang, M.; Johnston, M.; Fields, S.; Rothberg, J.M. A comprehensive analysis of Protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, Vol .403: 623-627, 2000.
- Vandemark, A. P.; Hofmann, R. M.; Tsui, C.; Pickart, C. M.; Wolberger, C. Molecular Insights into Polyubiquitin Chain Assembly: Crystal Structure of the Mms2/Ubc13 Heterodimer. *Cell*, 105:711–720, 2001.
- Xu, Z.; Kohli, E.; Devlin, K.; Bold, M.; Nix, J. C.; Misra, S. Interactions between the quality control ubiquitin ligase CHIP and ubiquitin conjugating enzymes. *BMC Structural Biology*, 8:26, 2008.
- Xu, Y. & Manley, J. L. Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle. *Genes Dev*. 21: 2950-2962, 2007.
- Wang, G.; Yang, J.; Huibregtse, J. M. Functional domains of the Rps5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol*.19, 342-352, 1999.
- Wang, P. & Heitman, J. Protein family review: The cyclophilins *Genome Biology*, 6:226, 2005.
- Webb, M. A.; Cavaletto, J. M.; Klanrit, P.; Thompson, G. A. Orthologs in *Arabidopsis thaliana* of the Hsp70 interacting protein Hip. *Cell Stress & Chaperones* 6 (3), 247–255, 2001.
- Welchman, R. L.; Gordon, C.; Mayer, R. J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(8):599-609, 2005.
- Welsh, S.; Kay, S. A. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Current Biology in Biotechnology* 8:617-622, 1997.
- Wen, R.; Newton, L.; Li, G.; Wang, H.; Xiao, W. *Arabidopsis thaliana* UBC13: implication of error-free DNA damage tolerance and Lys63-linked polyubiquitylation in plants *Plant Molecular Biology* 61:241–253, 2006.
- Wen, R.; Torres-Acosta, J. A.; Pastushok, L.; Lai, X.; Pelzer, L.; Wang, H.; Xiao, W. *Arabidopsis* UEV1D Promotes Lysine-63–Linked Polyubiquitination and is involved in DNA Damage Response. *The Plant Cell Preview*, 2008.
- Williams-Carrier, R.; Kroeger, T.; Barkan, A. Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native groupII intron ligand. *RNA*, 14:1930–1941, 2008.
- Wu, X.; Chang, A.; Sudol, M.; Hanes, S. D. Genetic interactions between the ESS1 prolyl-isomerase and the RSP5 ubiquitin ligase reveal opposing effects on RNA polymerase II function. *Curr. Genet*. 40, 234-242, 2001.

- Wu, X.; Wilcox, C. B.; Devasahayam, G.; Hackett, R. L.; Arévalo-Rodríguez, M.; Cardenas, M.E.; Heitman, J.; Hanes, S.D. The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.* 19, 3727–3738, 2000.
- Yang, B.; Sugio, A. & White, F.F. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10503-10508, 2006.
- Yang, Y.; de Feyter, R.; Gabriel, D.W. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. *Mol Plant-Microbe Interact*, 7:345-355, 1994.
- Yang, Y. & Gabriel, D. W. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *J. Bacteriology*, 177(17): 4963-4968, 1995.
- Zhang, M.; Windheim, M.; Roe, S.M.; Pegg, M.; Cohen, P. Chaperoned Ubiquitylation—Crystal Structures of the CHIP U Box E3 Ubiquitin Ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a Complex. *Molecular Cell*, 20: 525–538, 2005.
- Zhou, H.; Wertz, I.; O’rourke, K.; Ultsch, M.; Seshagiri, S.; Eby, M.; Xiao, W.; Dixit, V.M. Bcl10 activates the NF- κ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 427:167–171, 2004.

7. ANEXO I – Artigo publicado como primeira autoria

The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair

MARIANE NORONHA DOMINGUES¹, TIAGO ANTONIO DE SOUZA¹, RAÚL ANDRÉS CERNADAS^{1,†}, MARIA LUIZA PEIXOTO DE OLIVEIRA¹, CÁSSIA DOCENA^{2,‡}, CHUCK SHAKER FARAH² AND CELSO EDUARDO BENEDETTI^{1,*}

¹Laboratório Nacional de Biotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, R. Giuseppe Máximo Scollaro 10000, Campinas, SP, CP6192, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

SUMMARY

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* utilizes the type III effector protein PthA to modulate host transcription to promote citrus canker. PthA proteins belong to the AvrBs3/PthA family and carry a domain comprising tandem repeats of 34 amino acids that mediates protein–protein and protein–DNA interactions. We show here that variants of PthAs from a single bacterial strain localize to the nucleus of plant cells and form homo- and heterodimers through the association of their repeat regions. We hypothesize that the PthA variants might also interact with distinct host targets. Here, in addition to the interaction with α -importin, known to mediate the nuclear import of AvrBs3, we describe new interactions of PthAs with citrus proteins involved in protein folding and K63-linked ubiquitination. PthAs 2 and 3 preferentially interact with a citrus cyclophilin (Cyp) and with TDX, a tetratricopeptide domain-containing thioredoxin. In addition, PthAs 2 and 3, but not 1 and 4, interact with the ubiquitin-conjugating enzyme complex formed by Ubc13 and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev), required for K63-linked ubiquitination and DNA repair. We show that Cyp, TDX and Uev interact with each other, and that Cyp and Uev localize to the nucleus of plant cells. Furthermore, the citrus Ubc13 and Uev proteins complement the DNA repair phenotype of the yeast $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ mutants, strongly indicating that they are also involved in K63-linked ubiquitination and DNA repair. Notably, PthA 2 affects the growth of yeast cells in the presence of a DNA damage agent, suggesting that it inhibits K63-linked ubiquitination required for DNA repair.

INTRODUCTION

Citrus canker, caused by the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, is characterized by water-soaked eruptions and pustule formation on the surface of the host plant (Brunings and Gabriel, 2003). Although it is known that canker lesions result from the intense division and expansion of the host cells at the site of infection, the molecular events leading to cell hypertrophy and hyperplasia are not fully comprehended. Previous studies have shown that *X. axonopodis* pv. *citri* infection changes the transcription of a large set of host genes associated with cell division and expansion, including genes involved in ribosome biogenesis, cell wall remodelling, vesicle trafficking, and the synthesis and mobilization of auxin and gibberellin (Cernadas *et al.*, 2008). The expression of the cell wall remodelling genes, as well as those involved in the synthesis and mobilization of auxin and gibberellin, was shown to be similarly regulated by auxin and gibberellin, indicating that *X. axonopodis* pv. *citri* changes the active contents of both hormones to promote cell division and enlargement (Cernadas and Benedetti, 2009). Indeed, it was found that both auxin and gibberellin are required for canker development and that polar transport of auxin and vesicle trafficking mediate this process (Cernadas and Benedetti, 2009; Cernadas *et al.*, 2008).

The transcriptional changes associated with the growth and expansion of citrus cells in response to *X. axonopodis* pv. *citri* infection are thought to be triggered by the Type III effector protein PthA. PthA is recognized as the major determinant of *X. axonopodis* pv. *citri* pathogenicity (Al-Saadi *et al.*, 2007; Brunings and Gabriel, 2003). This protein is required for pathogen growth and canker elicitation, and is sufficient to promote hypertrophy and hyperplasia in citrus (Duan *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 1991, 1992). PthA belongs to the AvrBs3/PthA protein family. Members of this family, also known as transcription activator-like (TAL) effectors, are translocated by the Type III secretion system

*Correspondence: Email: celso@lnls.br

†Present address: Department of Plant Pathology, Iowa State University, Ames, IA, USA.

‡Present address: Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

and function as transcriptional activators in the host (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Sugio *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006).

One of the most surprising features of AvrBs3/PthA proteins is that they have an internal region comprising variable, nearly identical tandem repeats of 34 amino acids that determine both pathogenicity and avirulence (Kay and Bonas, 2009; Swarup *et al.*, 1992; Yang and Gabriel, 1995). For instance, AvrBs3, the most well-characterized TAL effector, dimerizes through its repeat region and interacts with an α -importin (α -Imp) that mediates its transfer to the nucleus of the host cell (Gürlebeck *et al.*, 2005; Szurek *et al.*, 2001). In the nucleus, AvrBs3 recognizes plant promoters and activates the transcription of a helix-loop-helix factor required for cell enlargement in susceptible plants, whereas, in resistant plants, it transactivates its cognate Bs3 resistance gene, triggering a hypersensitive reaction (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Most remarkably, it is the repeat region that mediates DNA recognition, and the amino acid polymorphism found within the repeat units determines the DNA sequence specificity of TAL effectors (Boch *et al.*, 2009; Moscou and Bogdanove, 2009).

Many *Xanthomonas* pathogens contain multiple variants of AvrBs3/PthA proteins. The existence of multiple copies of *avrBs3/pthA* genes in a single strain is thought to facilitate recombination and rapid adaptation to new hosts (Yang and Gabriel, 1995). However, in the light of the findings of Boch *et al.* (2009) and Moscou and Bogdanove (2009), it is expected that multiple variants of TAL effectors would also directly affect the transcription of target genes in the host and, consequently, the outcome of the disease process. Accordingly, it has been shown that multiple TAL effectors contribute additively to symptom development (Yang and White, 2004; Yang *et al.*, 1996). The *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 (da Silva *et al.*, 2002) contains four related PthA proteins (PthA 1–4) that differ from each other essentially by the number of their 34-amino-acid repeats and by the polymorphic residues found within the repeat units (Fig. S1A,B, see Supporting information). These PthA variants are the equivalents of the four functionally characterized PthAs of strain 3213 (Al-Saadi *et al.*, 2007). Interestingly, it was found that all *X. axonopodis* pv. *citri* strains carry one PthA variant with 17.5 repeats that determines the pathogenicity on citrus, and that the other variants of different repeat sizes do not complement a knockout mutation of the 17.5-repeat PthA (Al-Saadi *et al.*, 2007). Thus, how PthA variants with 15.5 (PthAs 2 and 3) and 16.5 (PthA 1) repeats contribute to symptom development is not yet clear. Microarray analyses of sweet orange epicotyls transformed with individual PthAs have shown that PthA 4 (17.5 repeats) up-regulates a larger set of citrus genes associated with cell division and expansion relative to PthA 2. Nevertheless, a number of genes implicated in canker development are up-regulated by both PthAs, and some are specifically induced by

PthA 2 (A. Pereira and C. Benedetti, unpublished data), indicating that they contribute to symptom development in an additive or synergistic manner.

Although the ultimate target of Type III TAL effectors appears to be the plant nuclear DNA (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Sugio *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006), it is reasonable to expect that these proteins might interact with other host factors to direct the transcriptional activation of their target genes. Thus far, α -Imp is the only TAL effector interactor known (Szurek *et al.*, 2001). Therefore, considering the sequence variability among the four PthA internal repeats (Fig. S1, see Supporting Information), and given the extraordinary phenotypes elicited by TAL effectors in the host, we hypothesized that the PthA variants might differentially interact with distinct host proteins in addition to α -Imp.

To gain insights into the functional dynamics of TAL effectors, we combined two-hybrid assays with *in vitro* binding and complementation studies to identify and characterize the interactions of each of the *X. axonopodis* pv. *citri* PthAs with sweet orange proteins. In addition to the identification of a citrus α -Imp similar to that responsible for the nuclear import of AvrBs3 (Szurek *et al.*, 2001), we describe new interactions of PthA proteins with components of a citrus protein complex implicated in protein folding and DNA repair.

RESULTS

PthA proteins localize to the nucleus and form homo- and heterodimers

Figure 1A shows that all PthA variants localize to the nucleus of *Nicotiana benthamiana* cells and, in some nuclei, the proteins appear to concentrate into multiple nuclear dots, indicating that they might be associated with sites of increased transcriptional activity.

As AvrBs3 dimerizes in the cytosol of the host cell prior to its nuclear import (Gürlebeck *et al.*, 2005), we hypothesized that the four PthA variants would possibly form homo- and/or heterodimers in the host cell. To test this assumption, we used two-hybrid assays to verify all possible interactions among the PthA proteins. We observed that all PthAs are capable of forming homodimers, but only PthAs 2 and 3 heterodimerize with each other and with PthAs 1 and 4 (Fig. 1B). Surprisingly, PthAs 1 and 4 do not form heterodimers even under less stringent conditions of interaction, i.e. in the presence of adenine (Fig. 1C). As shown for AvrBs3, the repeat domain of PthA was sufficient for homo- and heterodimerization (Fig. 1D). In addition, a truncated version of PthA2 (5.5rep + CT2), carrying the last 5.5 repeat units plus the C-terminus (Fig. S1C, see Supporting Information), also formed homo- and heterodimers with PthAs 2 and 3, respectively (Fig. 1D).

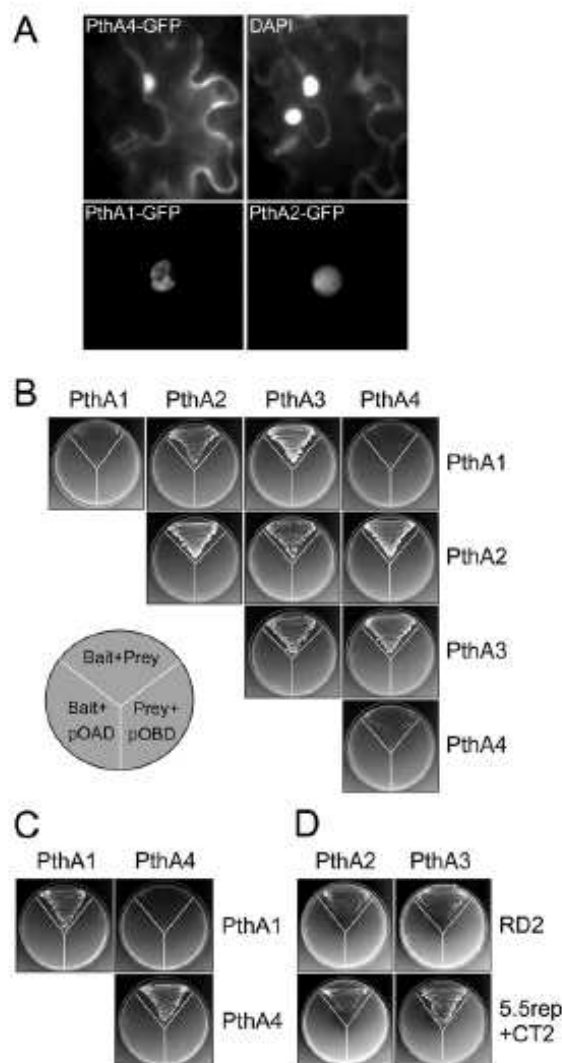


Fig. 1 PthA proteins localize to the nucleus and form homo- and heterodimers. (A) Fluorescence of PthA-green fluorescent protein (GFP) fusions in the nucleus of transiently transfected *Nicotiana benthamiana* cells 72 h after *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. The top panels show the PthA4-GFP and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescence of the same cell at $\times 400$ magnification. The bottom panels show the localization of PthA1- and PthA2-GFP fusions in nuclear dots at $\times 1000$ magnification. (B) Yeast two-hybrid assays showing that PthAs 2 and 3 form homodimers but also heterodimerize with each other and with PthAs 1 and 4. Yeast cells co-transformed with the bait and prey constructs are shown at the top of the plate, whereas cells carrying the bait construct plus the empty pOAD or the prey construct plus the empty pOBD are shown at the sides, as indicated. (C) Under less stringent conditions of interaction (synthetic complete medium lacking histidine but containing adenine, SC – His + Ade), PthAs 1 and 4 homodimerize but do not self-interact. (D) The repeat domain (RD2) as well as the 5.5rep + CT2 of PthA2 were sufficient for homo- and heterodimerization with PthAs 2 and 3, respectively. In (B–D), bait and prey are indicated horizontally and vertically, respectively.

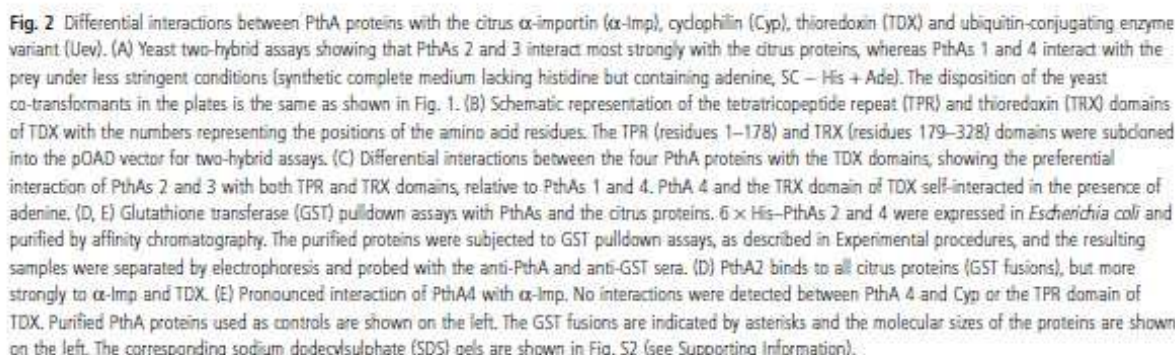
Identification of sweet orange interactors of PthA

To identify interactors of PthAs, we performed two-hybrid screening of a citrus cDNA library using PthAs 2, 3 and 4 as bait (Fig. S1C, see Supporting Information). The majority of the identified proteins can be classified into four major functional categories, including protein folding, nuclear transport, transcriptional control and DNA repair. The screenings made with PthA 4 retrieved primarily proteins associated with transcriptional control, RNA stabilization and DNA repair, carrying either DNA- or RNA-binding motifs. These interactions will, however, be reported elsewhere. Below, we describe the interactions of the four PthAs with the citrus proteins implicated in protein folding, K63-linked ubiquitination and nuclear transport, identified with PthAs 2 and 3.

Of particular relevance was the identification of interactions with α -Imp, which is 87% identical to the *Capsicum annuum* α -Imp shown to interact with AvrBs3 and to mediate its nuclear import (Szurek *et al.*, 2001), and with citrus cyclophilin (Cyp), thioredoxin (TDX) and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev). The citrus Cyp has a single peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) domain and is 84% identical to ROC1, an *Arabidopsis thaliana* Cyp required for the activation of AvrRpt2 inside the host cell (Coaker *et al.*, 2005). TDX (tetrapeptide domain-containing thioredoxin) is a two-domain protein with disulphide reductase activity found only in plants (Vignols *et al.*, 2003). Its N-terminus contains a tetrapeptide repeat (TPR) found in the co-chaperone Hsp70-interacting protein HIP, whereas its C-terminus carries a thioredoxin (TRX) domain (Fig. 2B). The citrus Uev is closely related to the yeast methyl-methanesulphonate 2 (MMS2) and its human orthologue Uev1a, which act in conjunction with Ubc13 to promote K63-linked ubiquitination of components of the DNA repair machinery (Hofmann and Pickart, 1999; Petroski *et al.*, 2007; Windheim *et al.*, 2008).

To confirm the interactions, the full-length Cyp, TDX and Uev proteins were used as prey in two-hybrid assays against all four PthA baits. We also used an α -Imp construct in which the first 80 residues carrying the N-terminal auto-inhibitory region (Harreman *et al.*, 2003) were deleted. Figure 2A shows that both PthAs 2 and 3 interact more strongly than PthAs 1 and 4 with the citrus proteins. Indeed, with the exception of α -Imp, PthA 4 interacts weakly with Cyp, TDX and Uev, and the interactions of PthA 1 with the citrus prey are even weaker, as observed in synthetic complete medium lacking tryptophan, leucine and histidine but containing adenine (SC – Leu – Trp – His + Ade) (Fig. 2A).

As TDX was the only prey protein displaying two functional domains (Fig. 2B), we tested the requirement of each of its domains for interaction with PthAs. Figure 2C shows that both the TPR and TRX domains of TDX strongly and preferentially interact with PthAs 2 and 3, whereas only the TRX domain



To confirm the interactions observed in yeast, glutathione transferase (GST) pull-down assays were carried out using PthAs 2 and 4 as representative bait. This choice was based on the differential interaction shown by the PthA variants with the prey proteins, i.e. PthA 1 interacts weakly with the prey, PthAs 2 and

3 show similar interaction patterns with all prey, and both have the same number of repeat units, and PthA4, carrying 17.5 repeat units, is the form required to elicit canker on citrus (Al-Saadi *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 1999). Consistent with the two-hybrid data, pulldown assays revealed that PthA 2 binds to all prey proteins, including the TPR and TRX domains of TDX. Stronger interactions were observed with α -Imp and TDX, as observed

in yeast (Fig. 2D). Similarly, we observed a good correspondence between the two-hybrid and *in vitro* protein interaction assays performed with PthA 4 (Fig. 2E). PthA 4 binds more tightly to α -Imp than to Cyp and Uev. In addition, only the TDX domain of TDX interacts with PthA 4 *in vitro* (Fig. 2E).

Cyp, TDX and Uev interact with each other

As described in the Discussion, Cyp, TDX and Uev have been associated with protein folding, activation and quality control. We thus tested whether they could interact with each other. Figure 3A shows that TDX interacts with Cyp and Uev, and that both TPR and TRX domains contribute to these interactions. Although the binding of TDX to Uev is relatively weak in the *in vitro* pulldown assays relative to the binding with Cyp, it is notable that significantly larger amounts of Uev were pulled down with TDX in the presence of Cyp (Fig. 3B). Similarly, larger amounts of Cyp were detected when Uev was added in the pulldown with TDX (Fig. 3B). Considering that the interaction between Cyp and Uev is relatively weak (Fig. 3A,B), this synergism of interaction is best interpreted as evidence of the formation of a protein complex involving TDX, Cyp and Uev.

The citrus Ubc13 interacts with PthA2 and forms a heterodimer with Uev

The role of the Uev-Ubc13 heterodimer in the K-63 ubiquitination of components of the DNA damage repair machinery has been well documented in yeast, animals and plants (Broomfield *et al.*, 1998; Hofmann and Pickart, 1999; Motegi *et al.*, 2008; Panier and Durocher, 2009; Wen *et al.*, 2006, 2008). Given the high degree of identity shared by Ubc13 proteins, we were able to identify the citrus Ubc13 orthologue. We therefore investigated whether the citrus Ubc13 would interact with Uev, as has been observed in yeast and vertebrates. Figure 4A shows that Ubc13 strongly interacts with Uev, but not with TDX or Cyp. In addition, consistent with the results shown in Fig. 2, Ubc13 interacts with PthAs 2 and 3 only (Fig. 4A). These interactions were also confirmed by *in vitro* pulldown assays, where we detected strong binding of Ubc13 to Uev and PthA2, but no binding to PthA4 (Fig. 4B).

The PthA repeat domain and leucine-rich repeat (LRR) are important for protein-protein interactions

Yeast two-hybrid assays showed that the repeat domain of PthA2 (RD2), as well as the 5.5rep + CT2 fragment (Fig. S1C, see Supporting Information), interacts with Cyp, TDX, Uev, Ubc13 and α -Imp, except that the interaction of RD2 with α -Imp is less pronounced (Fig. 5A). Interestingly, LRR, which is located adjacent to the repeat region and is invariable among

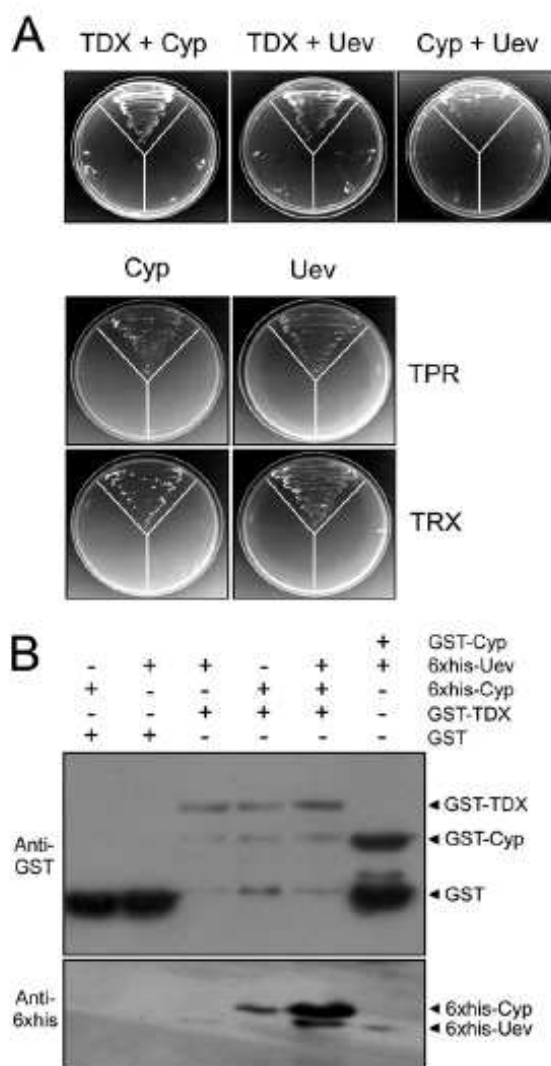


Fig. 3 The citrus proteins cyclophilin (Cyp), thioredoxin (TDX) and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev) interact with each other. (A) Yeast two-hybrid assays showing interactions between TDX, Cyp and Uev, as well as between Cyp and Uev. The tetratricopeptide repeat (TPR) and thioredoxin (TRX) domains of TDX also interact with Cyp and Uev. The disposition of the yeast co-transformants in the plates is the same as shown in Fig. 1. (B) Western blot of glutathione transferase (GST) pulldown assays using GST-TDX or GST-Cyp as bait and 6 $\times$ His-Cyp and 6 $\times$ His-Uev as prey. Consistent with the *in vivo* assay shown in (A), stronger interactions between TDX and Cyp are observed in the presence of Uev, suggesting the existence of a protein complex formed by TDX, Cyp and Uev. The corresponding sodium dodecylsulphate (SDS) gel is shown in Fig. S2 (see Supporting Information).

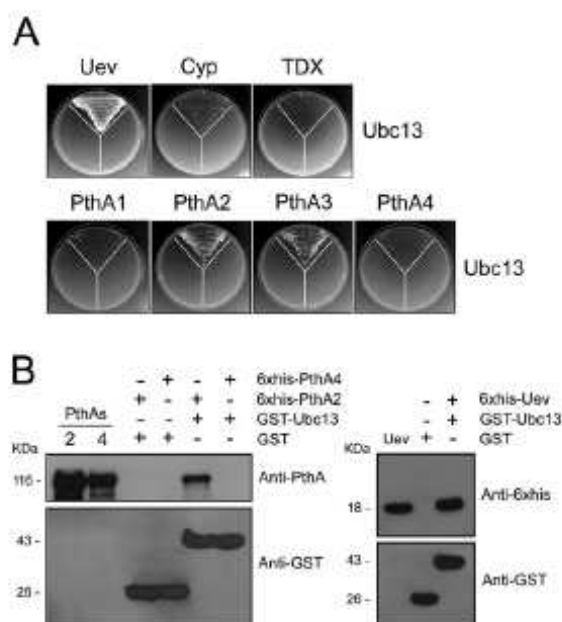


Fig. 4 The citrus Ubc13 interacts with ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev) and PthA proteins. (A) Sweet orange Ubc13 interacts with Uev and with PthAs 2 and 3. The disposition of the yeast co-transformants in the plates is the same as shown in Fig. 1. (B) Western blots of glutathione transferase (GST) pull-down assays using GST-Ubc13 as bait and 6 × His-Uev and 6 × His-PthAs 2 and 4 as prey. According to the assay shown in (A), Ubc13 binds to Uev and PthA2, but not to PthA 4. Purified PthA proteins used as controls and the molecular sizes of the proteins are shown on the left. The corresponding sodium dodecylsulphate (SDS) gels are shown in Fig. S2 (see Supporting Information).

PthAs (Fig. S1, see Supporting Information), interacts only with α -Imp (Fig. 5A). These results were also confirmed by GST pull-down assays, which showed that both RD2 and 5.5rep + CT2 bind to the citrus proteins (Fig. 5B). The C-terminus of PthAs transactivated the yeast reporter genes and so could not be used in the *in vivo* assays. In this case, we demonstrated by GST pull-down that the C-terminus of PthA2 (CT2), carrying LRR and the nuclear localization signal (NLS) (Fig. S1, see Supporting Information), binds to α -Imp only (Fig. 5B). Taken together, the results indicate that the repeat region, which is sufficient for homo- and heterodimerization of PthAs (Fig. 1C), also contributes to the interactions with Cyp, TDX, Uev and Ubc13, whereas LRR and NLS appear to be required for interaction with α -Imp only.

Citrus Uev and Ubc13 complement the $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ yeast mutants

The yeast mutants $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ are defective in K63-linked ubiquitination and, as a result, are unable to grow in

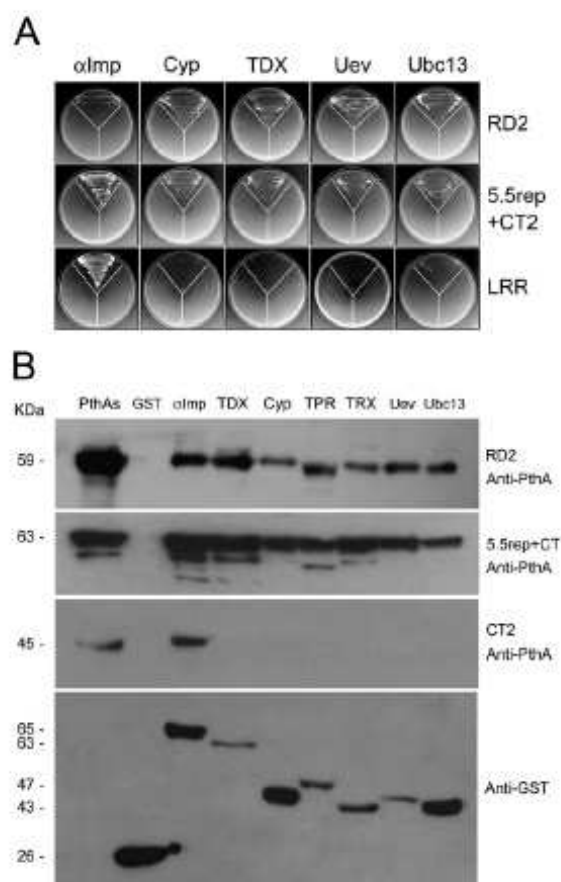


Fig. 5 The repeat domain and leucine-rich repeat (LRR) are important for protein-protein interactions. (A) Yeast two-hybrid assays showing the interactions of the internal repeat domain of PthA2 (RD2) and the 5.5rep + CT2 construct with all citrus proteins. LRR interacted with α -importin (α -Imp) only. (B) Western blot of glutathione transferase (GST) pull-down assays showing that both RD2 and 5.5rep + CT2 constructs bind to citrus proteins (GST fusions). The C-terminus of PthA2 (CT2), carrying LRR and the nuclear localization signal (NLS), binds to α -Imp only. Purified PthA proteins used as controls and the molecular sizes of the proteins are shown on the left. The corresponding sodium dodecylsulphate (SDS) gels are shown in Fig. S2 (see Supporting Information).

the presence of MMS as they are defective in DNA damage repair (Broomfield *et al.*, 1998; Hofmann and Pickart, 1999). To test whether the corresponding citrus proteins are also involved in DNA repair, we expressed the citrus Ubc13 and Uev genes in the corresponding yeast mutants (Fig. 6A). We observed that the growth of both mutants in MMS gradient plates can be rescued by the citrus proteins, strongly indicating that the citrus Ubc13 and Uev are functional homologues of the yeast proteins (Fig. 6B).

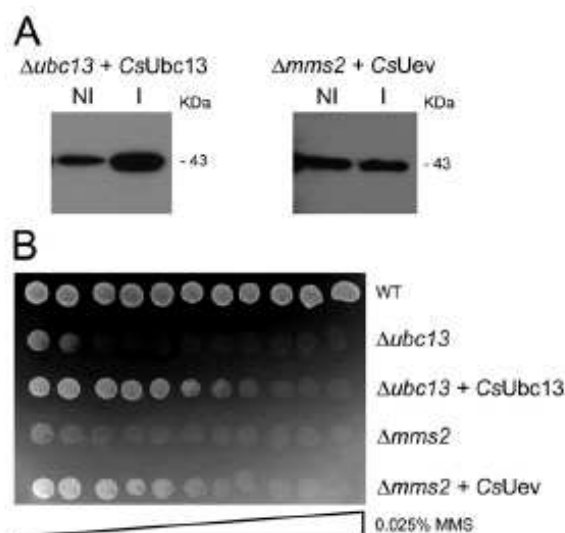


Fig. 6 The citrus Ubc13 and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev) proteins complement yeast $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ mutants. (A) The *Citrus sinensis* Ubc13 and Uev genes under the control of a copper-induced promoter were expressed in the yeast mutants $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ as glutathione transferase (GST) fusions. The proteins (43 kDa) were induced with 0.5 mM copper sulphate for 2 h, purified by affinity chromatography and probed with anti-GST serum. Induced (I) and noninduced (NI) samples are shown. The amounts of protein loaded on the gels are shown in Fig. S2 (see Supporting Information). (B) Growth of the yeast strain SUB62 and its derivative mutants $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ in synthetic complete (SC) medium in the presence of increasing amounts of methylmethanesulphonate (MMS). The growth of both mutants in MMS gradient plates can be rescued by the corresponding citrus Ubc13 and Uev genes.

PthA proteins are not K63-linked ubiquitinated *in vivo*

The fact that the citrus Uev and Ubc13 complemented the yeast $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ mutants suggested that PthA could be ubiquitinated *in vivo* by the yeast Ubc13–Uev complex. To test this hypothesis, we expressed PthAs 2 and 4 as GST fusions in the wild-type yeast and mutant derivatives. The proteins were purified by affinity chromatography and detected by Western blot. Blots developed with the anti-PthA serum revealed a major band with the expected size for the GST–PthA fusions (Fig. 7A). Both PthAs were expressed in the wild-type and mutant cells at relatively equal amounts, and the presence of lower molecular weight bands detected by the anti-PthA and anti-ubiquitin sera indicates that the PthAs were degraded in the yeast cells (Fig. 7A). Although a band corresponding to the size of the GST–PthA2 fusion was predominantly labelled by the anti-ubiquitin serum in the wild-type yeast, relative to the mutants and relative to the GST–PthA4 fusions, no bands were detected by an anti-K63-linked ubiquitin monoclonal antibody (not

shown), indicating that the PthAs were not ubiquitinated through K63-linked ubiquitin chains.

To test whether PthA is ubiquitinated *in planta*, sweet orange hypocotyls were transformed with PthA 2, PthA 4 or β -glucuronidase (GUS) as control. Both PthAs 2 and 4 were detected by the anti-PthA serum, but not by the anti-K63-linked ubiquitin or by the general anti-ubiquitin antibodies (Fig. 7B). Taken together, these results indicate that PthA proteins are not K63-linked ubiquitinated *in vivo*.

PthAs inhibit K63-linked ubiquitination and affect DNA repair

The fact that the PthA proteins were not ubiquitinated *in vivo* suggests that they might, on interaction with the Ubc13–Uev complex, inhibit or promote the K63-linked ubiquitination of target proteins. Indeed, the presence of extra bands detected by the anti-K63-linked ubiquitin antibody in citrus cells transformed with GUS relative to PthAs (Fig. 7B) suggests that PthAs might inhibit K63-linked ubiquitination. Consistent with this idea, the expression of PthAs 2 and 4 significantly inhibited the growth of normal yeast cells in the presence of MMS (Fig. 7C), indicating that DNA repair mechanisms were affected by the PthA proteins. Notably, the negative effect of PthA2 expression on DNA repair was more pronounced than that of PthA4 expression, although the intracellular levels of PthA4 were higher in comparison with the levels of PthA2 (Fig. 7D). This is in agreement with the observation that PthA2 preferentially interacts with the Ubc13–Uev proteins. In addition, although the anti-K63-linked ubiquitin antibody detected no bands in yeast extracts, blots developed with the general anti-ubiquitin serum revealed a missing band in the yeast extract expressing PthA2 relative to control and PthA4 (Fig. 7D). Taken together, these results indicate that PthA2 preferentially inhibits K63-linked ubiquitination required for DNA repair.

DISCUSSION

The presence of four PthA variants in a single bacterial strain suggests that they might interact with distinct host factors. Here, in addition to the interaction with α -Imp, the only protein interactor of this class of effectors known to date (Szurek *et al.*, 2001), we describe new and differential interactions of PthA variants with the citrus proteins Cyp, TDX and the Uev–Ubc13 pair. In agreement with previous reports (Szurek *et al.*, 2001), all PthAs interacted with α -Imp and were localized to the nucleus. This interaction appears to be mediated primarily by NLS found at the C-terminus of the protein. However, we noted that LRR located adjacent to NLS, which has been shown to influence AvrBs3 dimerization (Gürlebeck *et al.*, 2005), was sufficient to promote an interaction with α -Imp. In addition, as dimerization

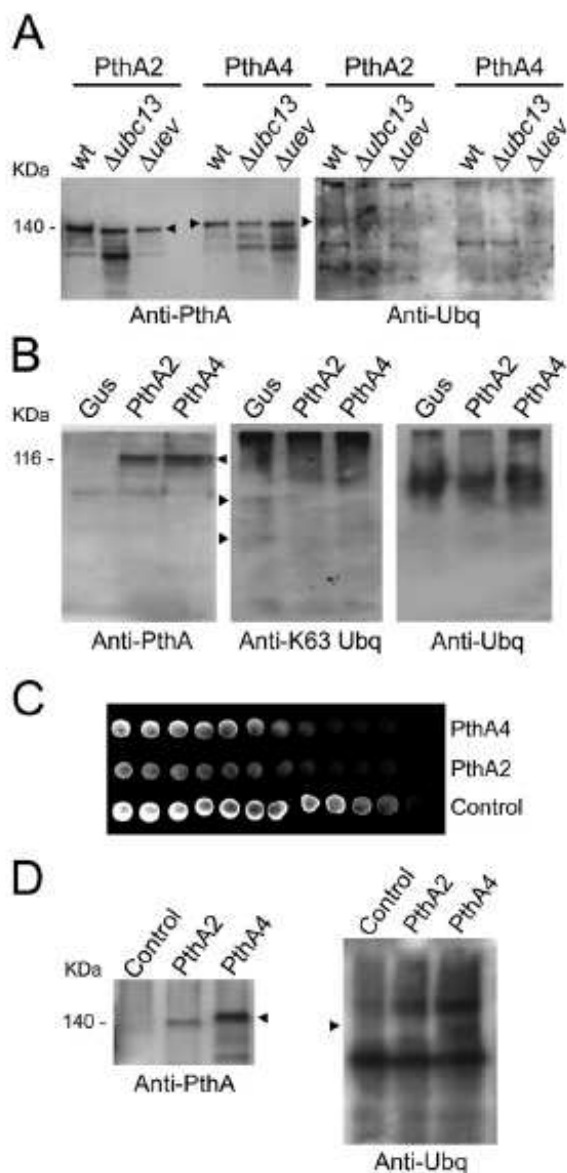


Fig. 7 PthA proteins are not K63-linked ubiquitinated *in vivo*. (A) PthA 2 and 4 were expressed in the wild-type yeast strain SUB62 and its derivative mutants $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ as glutathione transferase (GST) fusions (~140 and 147 kDa, respectively). The proteins were purified by affinity tag and subjected to sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Western blot detection with anti-PthA or anti-ubiquitin sera. Major PthA bands of the expected size for the GST fusions are indicated by the arrows. (B) PthAs 2 and 4 were expressed in sweet orange epicotyl sections using *Agrobacterium tumefaciens* transformation. A β -glucuronidase (GUS) construct was used as control. Both PthA proteins (~116 kDa) were detected by anti-PthA serum (arrow), but not by anti-ubiquitin serum. (C) Growth of yeast strain SUB62 (control expressing GST only) and SUB62 separately transformed with PthA 2 and 4 GST fusions in yeast peptone dextrose (YPD) medium in the presence of a methylmethane-sulphonate (MMS) gradient. (D) The anti-PthA serum confirms the presence of PthA proteins in the yeast extracts (arrow), whereas the anti-ubiquitin serum reveals a missing band in the yeast extract expressing PthA2 (arrow). The amounts of proteins loaded on the sodium dodecylsulphate (SDS) gels are shown in Fig. S2 (see Supporting Information).

contributed to the interactions with the citrus proteins. Therefore, the results indicate that the repeat region may not only be critical to match citrus target promoters, as expected considering the role played by AvrBs3 (Boch *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009), but may also play a role in the interaction with host proteins.

The PthA-interacting proteins Cyp, TDX and the Uev–Ubc13 pair have all been associated with protein folding, activation and quality control. In this study, we have presented evidence indicating that they interact to form a protein complex. This is consistent with the fact that Cyps are targets of TRX (Laxa *et al.*, 2007; Motohashi *et al.*, 2003) and interact with the TPR domain of Hsp90 and Hsc70 (Carrello *et al.*, 2004; Ratajczak and Carrello, 1996). In addition, Uev1a, which lacks ubiquitin-conjugating activity, associates with Ubc13 to form a functional heterodimer that promotes K63-linked ubiquitination of target proteins implicated in DNA repair, signal transduction and homologous recombination (Hofmann and Pickart, 1999; Wang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007). The Uev1a–Ubc13 pair has also been described as a component of the quality control C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) U-box ubiquitin ligase complex, which comprises a TPR domain that mediates interactions with Hsp90 and Hsp70 (Zhang *et al.*, 2005). As some effectors are transferred by secretion systems in an unfolded or inactive state and are activated by plant Cyps related to the citrus Cyp (Coaker *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 1998), we initially hypothesized that the citrus proteins might be part of a chaperone or quality control protein complex required for the folding and/or activation of PthAs. However, recombinant PthAs produced in *Escherichia coli* are structured and have DNA-binding activity (M. Domingues and C. Benedetti, unpublished results), suggesting that proline isomerization by the plant Cyp is not critical for PthA folding/action. Accordingly, PthAs are not ubiq-

of TAL effectors is required for their nuclear import (Gürlebeck *et al.*, 2005), the existence of related PthA proteins in a single pathogen also suggested that they might interact with each other. Indeed, all PthAs formed homodimers, but only PthAs 2 and 3 heterodimerized with each other and with PthAs 1 and 4. As the repeat region was sufficient to promote homo- and heterodimerization, these interactions may reflect variations in the number of repeat units.

The pattern of homo- and heterodimerization of PthAs may be correlated with the preferential interaction of PthAs 2 and 3, relative to PthAs 1 and 4, with Cyp, TDX and Uev. Again, this seems to reflect variations in the repeat region as this region also

uitinated *in vivo*, but apparently inhibit K63-linked ubiquitination associated with DNA repair. Thus, our data strongly point to a model in which PthAs would inhibit the activity of a citrus protein complex associated with DNA repair. Interestingly, other citrus proteins identified as PthA4 interactors, including a high mobility group (HMG) protein, a homologue of the mammalian translin-associated factor (TRAX) and an SMC (structural maintenance of chromosomes), are associated with DNA repair and chromatin stability (Erdemir *et al.*, 2002; Hirano, 2002; Prasad *et al.*, 2007).

Although the role of Uev-Ubc13 in response to DNA damage has been well established in yeast, animals and plants (Broomfield *et al.*, 1998; Hofmann and Pickart, 1999; Motegi *et al.*, 2008; Panier and Durocher, 2009; Wen *et al.*, 2006, 2008), recent studies have shown that K63-linked ubiquitination also serves as a targeting signal for the 26S proteasome (Saeki *et al.*, 2009). This is in line with recent findings showing that CHIP targets the degradation of mammalian SRC-3, a transcriptional co-activator associated with tumour progression (Kajiro *et al.*, 2008). It is thus attractive to speculate that, if a CHIP-related complex operates in citrus, its inhibition by PthAs might favour canker development.

Alternatively, it is notable that citrus Cyp is 64% identical to yeast Cyp A, a protein that decreases gene silencing (Arévalo-Rodríguez and Heitman, 2005; Arévalo-Rodríguez *et al.*, 2000) and interacts with Ess1, a prolyl-isomerase that affects chromatin remodelling and the process of transcription through isomerization of prolines of the C-terminal domain of the RNA polymerase II (Hani *et al.*, 1999; Krishnamurthy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2000). Interestingly, Ess1 activity is affected by a ubiquitin ligase that promotes K63 ubiquitination and the degradation of RNA polymerase II (Somes *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2001). As the ubiquitination and degradation of RNA polymerase II occur in response to DNA damage and during transcriptional elongation arrest, as a mechanism to avoid the transcription of damaged chromatin and prolonged transcriptional arrest of active genes (Daulny and Tansey, 2009; Somes *et al.*, 2005, 2007), we propose that PthAs might increase the rates of transcription through the modulation of the activity of a protein complex associated with chromatin remodelling and transcriptional control. This idea is in agreement with the expected role of PthAs as transcriptional activators, and is supported by the fact that both Cyp and Uev identified here localize to the nucleus (Fig. S3, see Supporting Information). A possible role of the citrus Cyp in PthA-dependent transcription is under investigation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and bacterial infiltration

Six-month-old plants of sweet orange (*Citrus sinensis*) were obtained from certified nurseries and kept in a growth room at

25–28 °C under 14 h/day fluorescent light. Leaves were infiltrated with suspensions of *X. axonopodis* pv. *citri*, as described previously (Cemadas *et al.*, 2008). Leaf sectors were infiltrated with approximately 0.3 mL of an aqueous suspension of bacterial cells [optical density at 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) = 0.5].

Leaves of *N. benthamiana* were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* suspensions ($OD_{600\text{ nm}}$ = 0.5) carrying the constructs pBI-35S::PthA(1–4)-GFP, pBI-35S::GFP, pBI-35S::GUS, pBI-35S::DsRed, pBI-35S::Cyp-DsRed or pBI-35S::Uev-DsRed. The subcellular localization of the fusion proteins was visualized by fluorescence microscopy equipped with filters for green fluorescent protein (GFP), red fluorescent protein (DsRed) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescence.

Citrus cDNA library construction and yeast two-hybrid assays

Messenger RNA was extracted from sweet orange leaves 48 h after *X. axonopodis* pv. *citri* infiltration using Trizol and FastTrack (Invitrogen). RNA samples from noninfiltrated and infiltrated leaf sectors were reverse-transcribed using an oligo-dT with a *NotI* restriction site. cDNAs were ligated to *SalI* adaptors, digested with *SalI/NotI* and ligated into a modified pOAD vector (Uetz *et al.*, 2000) carrying a *NotI* site between *SalI* and *PstI*. The generated cDNA library containing approximately 0.8×10^6 independent clones was moved into the *Saccharomyces cerevisiae* strain PJ694a (*MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) (James *et al.*, 1996) by high-efficiency lithium acetate transformation (Gietz and Woods, 2002).

The genes corresponding to PthAs 1–4 were amplified from *X. axonopodis* pv. *citri* plasmids and cloned into the *NdeI/EcoRI* sites of pET28 (Novagen). The genes were subsequently digested with *NotI* and subcloned into pOBD/pOAD vectors (Uetz *et al.*, 2000). This created an N-terminal truncation of the proteins lacking the first 128 amino acid residues (Fig. S1C, see Supporting Information). This construct was chosen to avoid the transactivation of the yeast *HIS3* reporter gene by the N-terminus (not shown). The constructs were verified by DNA sequencing and used as bait/prey in two-hybrid assays.

The initial two-hybrid screening was performed on synthetic complete medium lacking tryptophan, leucine, histidine and adenine (SC – Trp – Leu – His – Ade), supplemented with 5 mM 3-aminotriazole (3AT), using PthAs 2 and 3 as bait. pOAD plasmids recovered from positive clones were sequenced and, when required, the full-length citrus cDNAs, including Ubc13, were obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and subcloned downstream of and in frame with the fusion proteins Gal4 (pOAD), GST (pGEX-4T1) and 6 × His (pET28). Bait (pOBD) and prey (pOAD) constructs, including controls (empty pOBD + pOAD prey and pOBD bait + empty pOAD), were used to

co-transform PJ694a cells. The cells were grown on SC – Trp – Leu – His ($\pm$ Ade) containing 0, 3 or 5 mM 3AT for 5 days at 30 °C. The cDNA sequences of the citrus Cyp, TDX, Uev, Ubc13 and α -Imp were deposited in the GENBANK database as GQ853548, GQ853549, GQ455410, GQ862814 and GQ475487, respectively.

Protein purification and GST pulldown

The 6 $\times$ His-tagged proteins PthA2, PthA4, 5.5rep + CT2, CT2 and Uev were expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells and purified by metal affinity chromatography. Briefly, cultures were grown at 25 °C in Luria–Bertani (LB) medium containing kanamycin (50 μ g/mL) to OD_{600 nm} = 0.6, followed by induction with 0.4 mM isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) for 3 h. Cells harvested by centrifugation were suspended in binding buffer [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 20% glycerol, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 0.5 mM dithiothreitol (DTT)] and incubated on ice with lysozyme (1 mg/mL) for 30 min. Bacterial cells were sonicated and the clarified supernatants were incubated with nickel or cobalt resins for 4 h at 4 °C under slow agitation. The beads were washed three times with two column volumes of washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 15 mM imidazole, 20% glycerol, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT) and the retained proteins were eluted with washing buffer containing up to 200 mM imidazole.

Prey proteins, subcloned into the *SalI/NotI* sites of pGEX-4T, were expressed in BL21(DE3) cells on induction with IPTG for 2 h at 30–37 °C. Cell pellets were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM DTT and lysozyme. After sonication and centrifugation, soluble fractions of GST fusions were immobilized on glutathione resin and nonbound proteins were removed with three PBS washes. Thirty micrograms of the purified 6 $\times$ His fusion proteins were incubated with the resins containing GST or the GST fusion proteins for 2 h at 4 °C. The beads were washed four times with PBS and the resin-bound proteins were resolved on 10–13% sodium dodecylsulphate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) gels. Proteins were transferred onto nylon membranes, probed with anti-PthA (1 : 5000), anti-6 $\times$ His (1 : 3000) or anti-GST (1 : 1000) sera and developed with the ECL kit (GE Healthcare).

Functional complementation of yeast mutants

The yeast strain SUB62 (*MATa lys2-801leu2-3, 112 ura3-52 his3-D200 trp1-1[am]*) and its single mutant derivatives Δ ubc13 and Δ mms2 (*uev1a*) (Hofmann and Pickart, 1999) were transformed with the citrus Ubc13 or Uev genes cloned into pYEX-4T (Clontech). Transformants were grown on SC – Leu – Ura plates at 30 °C for 4 days. For qualitative analysis of MMS sensitivity, liquid cultures were grown overnight to exponential phase in

yeast peptone dextrose (YPD) medium and plated in YPD supplemented with 0.025% MMS gradient (Pastushok *et al.*, 2005). The plates were incubated at 30 °C for 24 h.

In vivo ubiquitination

PthA ubiquitination in yeast was evaluated using the wild-type yeast strain SUB62 and the corresponding mutant derivatives Δ ubc13 and Δ uev1. The strains were transformed with PthA 2 and 4 GST fusions cloned into pYEX4T-1 and grown in SC – Leu – Ura for 4 days at 30 °C. Liquid cultures were grown to OD_{600 nm} = 0.8 and protein expression was induced with 0.5 mM CuSO₄ for 2 h. Cells were collected by centrifugation (6000 *g* for 15 min at 4 °C), resuspended in PBS containing 1 mM PMSF and lysed with glass beads and freeze–thaw cycles. Recombinant proteins were purified using glutathione sepharose beads. Purified proteins were analysed by 7% SDS-PAGE and probed with the anti-PthA and anti-ubiquitin sera.

To evaluate possible PthA ubiquitination *in planta*, PthAs 2 and 4 were expressed in etiolated epicotyls of sweet orange 'Hamlin' according to de Oliveira *et al.* (2009). Surface-sterilized seeds were sown in half-strength Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 50 mg/L myo-inositol and 25 g/L sucrose. Seeds were incubated at 27 $\pm$ 2 °C under dark conditions for 6 weeks. Epicotyl sections of etiolated seedlings were cut transversally into 1-cm segments and incubated for 15 min with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (OD_{600 nm} = 1.0) carrying the pBI121-PthA2, pBI121-PthA4 or pBI121-GUS construct in MS basal medium containing 100 μ M acetosyringone. Excess of *Agrobacterium* suspension was removed by blotting, and co-cultivation was carried out in the dark at 26 $\pm$ 2 °C for 2 days. Epicotyls were macerated in liquid nitrogen and resuspended in SDS-PAGE sample buffer. Soluble proteins were recovered by centrifugation (16 000 *g* for 30 min at 4 °C), resolved by 10% SDS-PAGE and detected by the anti-PthA, anti-ubiquitin (Sigma) and anti-polyubiquitin K63-linkage-specific clone HWA4C4 (Biomol International) antibodies.

Inhibition of K63-linked ubiquitination-mediated DNA repair in yeast

PthAs 2 and 4 were expressed in the SUB62 wild-type strain. Transformants were selected on SC – Leu – Ura plates at 30 °C for 4 days. Liquid cultures were grown overnight to exponential phase in YPD medium and plated in YPD supplemented with a 0.025% MMS gradient. The plates were incubated at 30 °C for 24 h and the expression of PthAs 2 and 4 was detected by Western blot with anti-PthA serum.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Robert Cohen and Dr Candice Carlile for providing the yeast strain SUB62 and the Δ ubc13 and Δ mms2 mutants.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants 98/14138-2; 00/10266-8; 03/08316-5; 07/06686-0). MND, TAS, RAC, MLPO, CD and CEB received fellowships from FAPESP and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Al-Saadi, A., Reddy, J.D., Duan, Y.P., Brunings, A.M., Yuan, Q. and Gabriel, D.W. (2007) All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 934–943.
- Arévalo-Rodríguez, M. and Heitman, J. (2005) Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 4, 17–29.
- Arévalo-Rodríguez, M., Cardenas, M.E., Wu, X., Hanes, S.D. and Heitman, J. (2000) Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J.* 19, 3739–3749.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA-binding specificity of TAL-Type III effectors. *Science*, 326, 1509–1512.
- Broomfield, S., Chow, B.L. and Xiao, W. (1998) MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5678–5683.
- Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4, 141–157.
- Carrello, A., Allan, R.K., Morgan, S.L., Owen, B.A., Mok, D., Ward, B.K., Minchin, R.F., Toft, D.O. and Ratajczak, T. (2004) Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones*, 9, 167–181.
- Cernadas, R.A. and Benedetti, C.E. (2009) Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Sci.* 177, 190–195.
- Cernadas, R.A., Camillo, L.R. and Benedetti, C.E. (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolia*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 609–631.
- Coaker, G., Falick, A. and Staskawicz, B. (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science*, 308, 548–550.
- Daulny, A. and Tansey, W.P. (2009) Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system. *DNA Repair*, 8, 444–448.
- Deng, W., Chen, L., Wood, D.W., Metcalfe, T., Liang, X., Gordon, M.P., Comai, L. and Nester, E.W. (1998) *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7040–7045.
- Duan, Y.P., Castañeda, G.Z., Erdos, G. and Gabriel, D.W. (1999) Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 556–560.
- Erdemir, T., Bilican, B., Oncel, D., Goding, C.R. and Yavuzer, U. (2002) DNA damage-dependent interaction of the nuclear matrix protein C1D with translin-associated factor X (TRAX). *J. Cell Sci.* 115, 207–216.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350, 87–96.
- Gürlebeck, D., Szurek, B. and Bonas, U. (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* 42, 175–187.
- Hani, J., Schelbert, B., Bernhardt, A., Domdey, H., Fischer, G., Wiebauer, K. and Rahfeld, J.U. (1999) Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 108–116.
- Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E. and Corbett, A.H. (2003) The auto-inhibitory function of importin alpha is essential *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 278, 5854–5863.
- Hirano, T. (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16, 399–414.
- Hofmann, R.M. and Pickart, C.M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 96, 645–653.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425–1436.
- Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S.H., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. (2008) The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat. Cell Biol.* 11, 312–319.
- Kay, S. and Bonas, U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 37–43.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318, 648–651.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R. and Bonas, U. (2009) Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. *Plant J.* 59, 859–871.
- Krishnamurthy, S., Ghazy, M.A., Moore, C. and Hampsey, M. (2009) Functional interaction of the Ess1 prolyl isomerase with components of the RNA polymerase II initiation and termination machineries. *Mol. Cell Biol.* 29, 2925–2934.
- Laxa, M., König, J., Dietz, K.J. and Kandlbinder, A. (2007) Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and redox-related functions. *Biochem. J.* 401, 287–297.
- Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326, 1501.
- Motegi, A., Liaw, H.J., Lee, K.Y., Roest, H.P., Maas, A., Wu, X., Moinova, H., Markowitz, S.D., Ding, H., Hoeijmakers, J.H. and Myung, K. (2008) Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTf and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 12 411–12 416.
- Motohashi, K., Koyama, F., Nakanishi, Y., Ueoka-Nakanishi, H. and Hisabori, T. (2003) Chloroplast cyclophilin is a target protein of thiore-

- doxin. Thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 31 848–31 852.
- de Oliveira, M.L.P., Febres, V.J., Costa, M.G.C., Moore, G.A. and Otoni, W.C. (2009) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep.* 28, 387–395.
- Panier, S. and Durocher, D. (2009) Regulatory ubiquitylation in response to DNA-double strand breaks. *DNA Repair*, 8, 436–443.
- Pastushok, L., Moraes, T.F., Ellison, M.J. and Xiao, W. (2005) A single Mms2 'key' residue insertion into a Ubc13 pocket determines the interface specificity of a human lys63 ubiquitin conjugation complex. *J. Biol. Chem.* 280, 17 891–17 900.
- Petroski, M.D., Zhou, X., Dong, G., Daniel-Issakani, S., Payan, D.G. and Huang, J. (2007) Substrate modification with lysine 63-linked ubiquitin chains through the UBC13-UEV1A ubiquitin-conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* 282, 29936–29945.
- Prasad, R., Liu, Y., Deterding, L.J., Poltoratsky, V.P., Kedar, P.S., Horton, J.K., Kanno, S., Asagoshi, K., Hou, E.W., Khodyreva, S.N., Lavrik, O.I., Tomer, K.B., Yasui, A. and Wilson, S.H. (2007) HMG81 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol. Cell*, 27, 829–841.
- Ratajczak, T. and Carrello, A. (1996) Cyclophilin 40 (Cyp-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with Cyp-40 for hsp90 binding. *J. Biol. Chem.* 271, 2961–2965.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. and Lahaye, T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318, 645–648.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U. and Lahaye, T. (2009) Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol.* 150, 1697–1712.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A. and Tanaka, K. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J.* 28, 359–371.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C. and Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417, 459–463.
- Somesh, B.P., Reid, J., Liu, W.F., Søgaard, T.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell*, 121, 913–923.
- Somesh, B.P., Sigurdsson, S., Saeki, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2007) Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell*, 129, 57–68.
- Sugio, A., Yang, B., Zhu, T. and White, F.F. (2007) Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 10 720–10 725.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H. and Gabriel, D.W. (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathogens of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. *Phytopathology*, 81, 803–809.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T. and Gabriel, D.W. (1992) An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 204–213.
- Szerek, B., Marois, E., Bonas, U. and Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.* 26, 523–534.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadmodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403, 623–627.
- Vignols, F., Mouaheb, N., Thomas, D. and Meyer, Y. (2003) Redox control of Hsp70-Co-chaperone interaction revealed by expression of a thioredoxin-like Arabidopsis protein. *J. Biol. Chem.* 278, 4516–4523.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346–351.
- Wen, R., Newton, L., Li, G., Wang, H. and Xiao, W. (2006) Arabidopsis thaliana UBC13: implication of error-free DNA damage tolerance and Lys63-linked polyubiquitylation in plants. *Plant Mol. Biol.* 61, 241–253.
- Wen, R., Torres-Acosta, J.A., Pastushok, L., Lai, X., Pelzer, L., Wang, H. and Xiao, W. (2008) Arabidopsis UEV1D promotes Lysine-63-linked polyubiquitination and is involved in DNA damage response. *Plant Cell*, 20, 213–227.
- Windheim, M., Pegg, M. and Cohen, P. (2008) Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem. J.* 409, 723–729.
- Wu, X., Wilcox, C.B., Devasahayam, G., Hackett, R.L., Arévalo-Rodríguez, M., Cardenas, M.E., Heitman, J. and Hanes, S.D. (2000) The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.* 19, 3727–3738.
- Wu, X., Chang, A., Sudol, M. and Hanes, S.D. (2001) Genetic interactions between the ESS1 prolyl-isomerase and the RSP5 ubiquitin ligase reveal opposing effects on RNA polymerase II function. *Curr. Genet.* 40, 234–242.
- Yang, Y. and Gabriel, D.W. (1995) Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *J. Bacteriol.* 177, 4963–4968.
- Yang, B. and White, F.F. (2004) Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 1192–1200.
- Yang, Y., Yuan, Q. and Gabriel, D.W. (1996) Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avirp* gene family. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 105–113.

- Yang, B., Sugio, A. and White, F.F. (2006) OsBN3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10 503–10 508.
- Zhang, M., Windheim, M., Roe, S.M., Pegg, M., Cohen, P., Prodromou, C. and Pearl, L.H. (2005) Chaperoned ubiquitylation-crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol. Cell*, **20**, 525–538.
- Zhao, G.Y., Sonoda, E., Barber, L.J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Boulton, S.J. and Takeda, S. (2007) A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol. Cell*, **25**, 663–675.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1 PthA proteins and constructs used in two-hybrid and pulldown assays. (A) Schematic representation of the four PthAs from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306. Dark-grey bars indicate the 34-amino-acid repeats depicted in (B). Light-grey boxes indicate the C-terminal leucine-rich repeat (LRR) and the acidic domain (AD) flanking three nuclear localization signals (NLSs). The numbers represent the positions of the amino acid residues and the letters indicate residue variation outside the repetitive domain. The proteins were expressed in *Escherichia coli* as 6 × His fusions and used in glutathione transferase (GST) pulldown assays. (B) Sequence alignment of the 34-amino-acid repeats of the four PthA proteins, depicting the regions of increased amino acid variation (*). Comma indicates 'and', whereas hyphen indicates 'to'. (C) Schematic representation of the PthA constructs in pOBD/pOAD used as bait/prey in the

two-hybrid assays. The internal repeat domain of PthA2 (RD2), the invariable LRR and the C-terminal (CT2) and C-terminal with the last 5.5 repeats of PthA2 (5.5rep + CT2) were also expressed as 6 × His fusions for pulldown assays.

Fig. S2 Coomassie blue-stained sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels corresponding to the Western blots shown in Figs 2D, E, 3B, 4B, 5B, 6A, 7A, B and D, showing the relative amounts of proteins loaded in each lane. The molecular size markers are indicated on the left. The glutathione transferase (GST) fusion proteins used in the pulldown assays of Figs 2D, E, 3B, 4B and 5B are indicated by the asterisks. The gels corresponding to Fig. 6A show the copper-induced expression (I) of citrus ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev) and Ubc13 in the yeast mutants, relative to non-induced samples (NI). Arrows indicate the induced bands. The gels corresponding to Fig. 7A show the GST-PthA samples purified from wild-type and mutant yeast cells. NI (noninduced), I (induced), S (soluble), FT (flow-through), W (wash) and E (elution). The 'E' samples were loaded side by side in the blot shown in Fig. 7A. The gels corresponding to Fig. 7B and D show the amounts of proteins loaded from plant and yeast cells expressing PthAs 2 and 4. Arrows indicate the positions of PthA bands.

Fig. S3 Nuclear localization of cyclophilin (Cyp) and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev) in *Nicotiana benthamiana* cells. Fluorescence of Uev–red fluorescent protein (DsRed) and Cyp–DsRed fusions in the nucleus of transiently transfected *N. benthamiana* cells 72 h after *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescence of the same cells is shown alongside.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Fig. S1

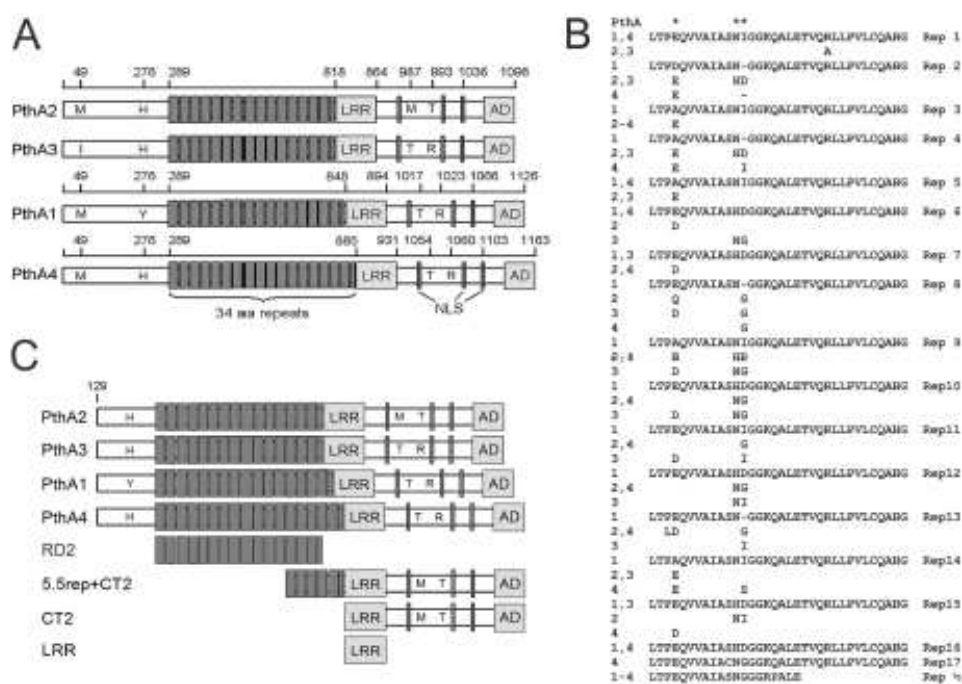
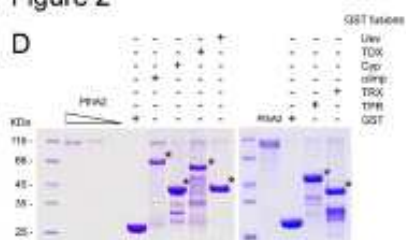


Fig. S2

Figure 2



E

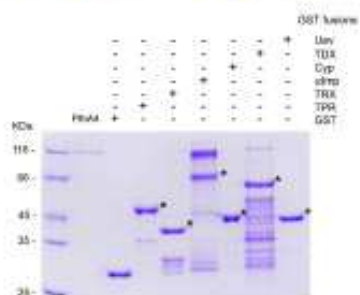


Figure 5B

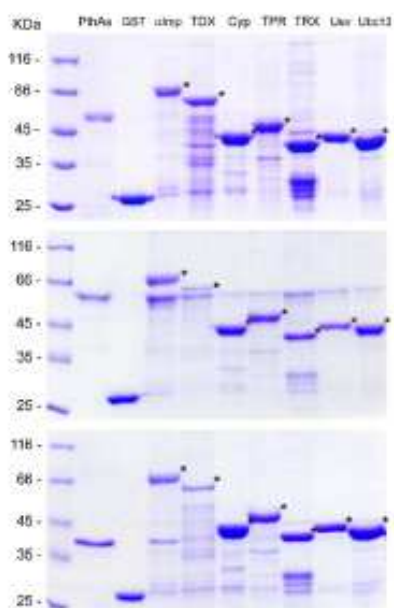


Figure 6A

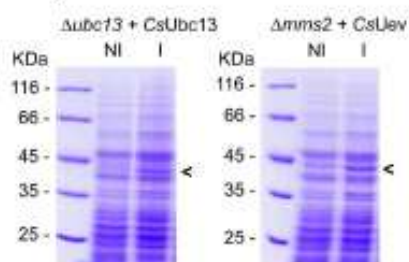


Figure 3B

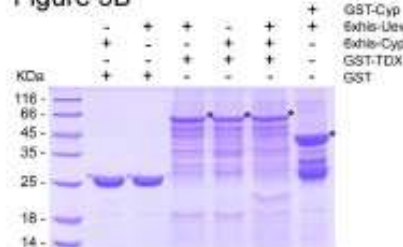


Figure 4B

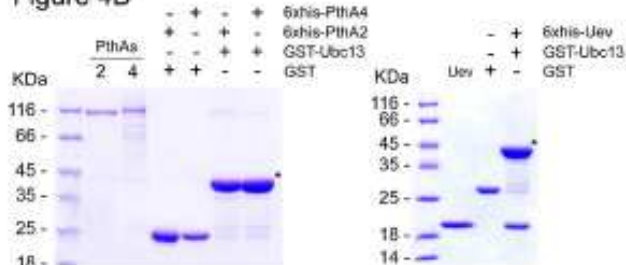


Figure 7A

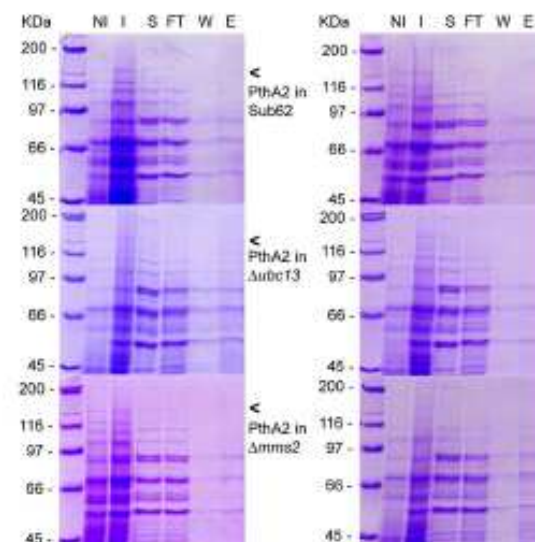


Figure 7B

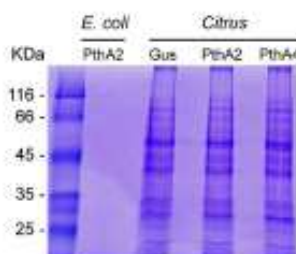


Figure 7D

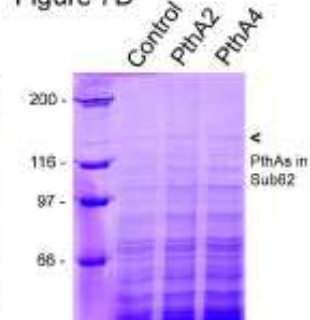
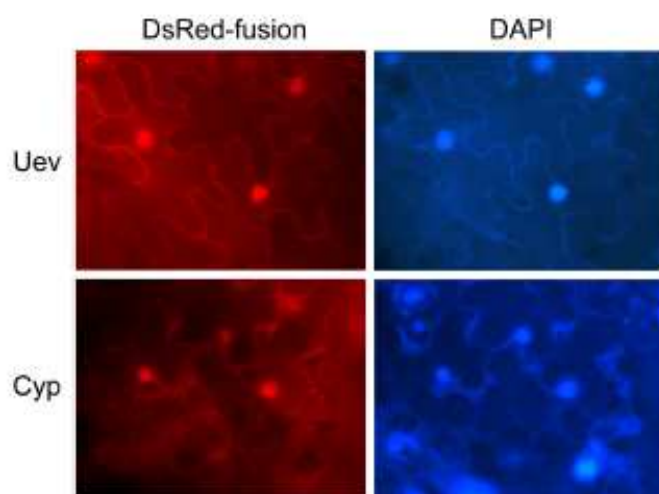


Fig. S3



8. ANEXO II – Artigo publicado em colaboração

The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction

Mário Tyago Murakami,* Mauricio Luis Sforça, Jorge Luiz Neves, Joice Helena Paiva, Mariane Noronha Domingues, André Luiz Araujo Pereira, Ana Carolina de Mattos Zeri, and Celso Eduardo Benedetti*

Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

Many plant pathogenic bacteria rely on effector proteins to suppress defense and manipulate host cell mechanisms to cause disease. The effector protein PthA modulates the host transcriptome to promote citrus canker. PthA possesses unusual protein architecture with an internal region encompassing variable numbers of near-identical tandem repeats of 34 amino acids termed the repeat domain. This domain mediates protein–protein and protein–DNA interactions, and two polymorphic residues in each repeat unit determine DNA specificity. To gain insights into how the repeat domain promotes protein–protein and protein–DNA contacts, we have solved the structure of a peptide corresponding to 1.5 units of the PthA repeat domain by nuclear magnetic resonance (NMR) and carried out small-angle X-ray scattering (SAXS) and spectroscopic studies on the entire 15.5-repeat domain of PthA2 (RD2). Consistent with secondary structure predictions and circular dichroism data, the NMR structure of the 1.5-repeat peptide reveals three α -helices connected by two turns that fold into a tetratricopeptide repeat (TPR)-like domain. The NMR structure corroborates the theoretical TPR superhelix predicted for RD2, which is also in agreement with the elongated shape of RD2 determined by SAXS. Furthermore, RD2 undergoes conformational changes in a pH-dependent manner and upon DNA interaction, and shows sequence similarities to pentatricopeptide repeat (PPR), a nucleic acid-binding motif structurally related to TPR. The results point to a model in which the RD2 structure changes its compactness as it embraces the DNA with the polymorphic residues facing the interior of the superhelix oriented toward the nucleotide bases.

Proteins 2010; 00:000–000.
 © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: TAL effectors; tetratricopeptide repeat; pentatricopeptide repeat (PPR); *Xanthomonas citri*.

INTRODUCTION

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac), the causal agent of citrus canker, induces the formation of raised pustules on the surface of the host plant. The pustules typically develop into larger corky and water-soaked lesions, which break the epidermis favoring bacterial dissemination.^{1,2} Although it is known that canker lesions result from the intense division and expansion of the host cells at the site of infection, how exactly Xac induces cell division and growth is not yet clear. We have shown that Xac modulates the synthesis of cell growth regulators during the onset of infection³ and that the common action of auxin and gibberellin is required for initial canker development.⁴ Interestingly, these hormones alone or in combination had no apparent effect on citrus cell growth or division, suggesting that another factor is required for canker formation.⁴ This additional factor is thought to be the Xac effector protein PthA, which is sufficient to promote cell hypertrophy when transiently expressed in citrus leaves.⁵ Accordingly, expression of PthA proteins in citrus cells provokes transcriptional changes that overlap with those triggered by Xac infection associated with auxin and gibberellin action (Pereira and Benedetti, unpublished data).

PthA proteins differ from each other primarily by the number of near-identical repeats of 33–34 amino acids that are tandemly located in the central region of the protein. This domain confers host selectivity and is critical to determine pathogenicity.^{6,7} PthA proteins are 95–97% identical to AvrBs3, the best known *Xanthomonas* type III effector protein. AvrBs3 is targeted to the nucleus of host cells where it modu-

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.
 Grant sponsors: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Correspondence to: M.T. Murakami, Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Energia e Materiais, R. Giuseppe Máximo Scolaro, 10000, Campinas, SP, 13083-970, Brazil. E-mail: mario.murakami@lnbio.org.br or C.E. Benedetti, Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Energia e Materiais, R. Giuseppe Máximo Scolaro, 10000, Campinas, SP, 13083-970, Brazil. E-mail: celso.benedetti@lnbio.org.br

Received 26 May 2010; Revised 16 July 2010; Accepted 24 July 2010

Published online 17 August 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/prot.22846

lates transcription.⁸ Notably, AvrBs3 recognizes different plant promoters and activates transcription of particular genes in both susceptible and resistant plants.^{9,10} The interaction of AvrBs3 with its target DNA is mediated by its repeat domain,^{9–12} which is also essential for AvrBs3 dimerization before its nuclear import.¹³ Likewise, we found that the repeat domain of PthA proteins is critical for protein–protein interactions.¹⁴ Therefore, it is becoming clear that the repeat domain of such effectors has a dual character as a protein scaffold that allows protein–protein and protein–DNA contacts with host targets.

An intriguing aspect of the repeat domain of such effectors is the variability found in every repeat unit at certain amino acid positions. In the case of the PthA variants, the polymorphism occurs preferentially at Positions 4 (D, E, Q, or A), 12 (N or H), 13 (I, D, G, or S), and 24 (R or A) of the repeat units.¹⁴ Since most members of the AvrBs3/PthA protein family share high-sequence identity, it has been postulated that, besides the variation in the number of repeat units, the polymorphism within the repeat units would play a critical role in conferring the specificity required for the interactions with particular protein or DNA targets. Indeed, recent studies have demonstrated that the pair of residues at Positions 12–13 determines the DNA sequence specificity^{15,16}; however, the structural basis for these interactions is presently unknown. Thus, structural information on the repeat region becomes highly relevant for understanding the molecular function of this unique protein domain. Although numerous homologues of AvrBs3/PthA proteins have been identified, no three-dimensional (3D) structure is yet available for any transcription activator-like (TAL) effector. Despite considerable efforts, we have not yet been able to crystallize any of the PthA variants or their repeat domains. Thus, we used a combination of circular dichroism (CD), dynamic light scattering (DLS), nuclear magnetic resonance (NMR), small-angle X-ray scattering (SAXS) and molecular modeling approaches to gain insights into the 3D structure of the PthA repeat domain. In this work, we present the first 3D structure of a peptide corresponding to 1.5-repeat units of PthA2 (PDB code: 2KQ5) and a low-resolution envelope for the entire repeat domain of PthA2 (RD2) that is in agreement with its theoretical tetratricopeptide repeat (TPR)-like structure. Spectroscopic studies also revealed that RD2 undergoes conformational changes in a pH-dependent manner and in the presence of DNA. Furthermore, we show that the repeat units of RD2 are similar to pentatricopeptide repeat (PPR), a 35 amino acid motif that is structurally related to TPR and have nucleic acid binding activity.^{17,18}

MATERIALS AND METHODS

Protein expression and purification

The 15.5-RD2 was amplified from *X. citri* plasmids and cloned into the *Bam*HI/*Sac*I sites of pET28a

(Novagen). The construct was sequenced and used to transform *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). Protein expression was induced at OD₆₀₀ = 0.6 with 0.4 mM IPTG at 25°C. The cells were harvested after 3 h, centrifuged, and suspended in binding buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 15 mM imidazole, 5% (v/v) glycerol, 1 mM PMSF, 0.5% Nonidet P-40) and incubated on ice with lysozyme (1 mg mL^{−1}) and RNase (10 µg mL^{−1}) for 30 min. Bacterial cells were disrupted by sonication and the soluble fraction was incubated with DNase I (0.5 µg mL^{−1}) and MgCl₂ (2 mM). The suspension containing the 6xHis-RD2 was loaded on a 5-mL HiTrap chelating HP (GE Healthcare) column pre-equilibrated with binding buffer. The column was washed with 20 column volumes of the same buffer and the protein was eluted with imidazole gradient. After purification, dithiothreitol (DTT) was added to a final concentration of 1 mM and fractions displaying the highest purity were concentrated and loaded on a G75 16/60 Superdex (GE Healthcare) column, pre-equilibrated with 20 mM Tris–HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, and 1 mM DTT. RD2 was eluted as a single peak with a molecular mass corresponding to the monomer.

Dynamic light scattering

DLS experiments were carried out using a DynaPro 810 (Protein Solutions) apparatus equipped with a Peltier module for temperature control. The wavelength of the laser light and the output power were set to 830 nm and 30 mW, respectively. About 100 measurements were made at intervals of 20 s for each run. The DLS experiments were repeated several times with intervals of 30 min to check stability. Protein solutions of 1 mg mL^{−1} were prepared in 50 mM sodium acetate pH 5.0, 50 mM sodium phosphate pH 6.0 and 7.0, and 20 mM Tris–HCl pH 8.0. The complex of RD2:DNA was prepared in a molar ratio of 1.0:1.2, incubated for 12 h at 20°C, and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C before analysis. Standard curves of bovine serum albumin were used for calibration and the experiments were conducted at 18°C. Hydrodynamic parameters were determined using the software DYNAMICS v.6.10.1.2.

CD measurements

CD spectroscopy experiments were conducted on a JASCO J-810 CD spectrophotometer equipped with a Peltier temperature control using 1-mm path quartz cuvettes. Spectra were acquired with a final protein concentration of 5.0–10 µM in 20 mM Tris–HCl pH 8.0, containing 1.0 mM DTT and 100 mM NaCl. The RD2:DNA mixes were incubated for 3 h at 20°C and centrifuged (10,000g) for 15 min at 4°C before analyses. CD measurements were collected between 185 and 260 nm using a scanning rate of 50 nm min^{−1} with an average response time of 4 s.

Secondary structure variations were monitored as a function of changes in the initial CD spectrum upon addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) for the 1.5-repeat unit. For all the spectra, an average of 10 scans was accumulated and the background spectrum of the buffer was subtracted.

NMR studies

NMR experiments were performed at 20°C using a Varian Inova 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenic probe. Synthetic peptides (Proteimax, São Paulo, Brazil) corresponding to 1.0- or 1.5-repeat units of the repeat domain of PthA were dissolved in 20 mM phosphate buffer, pH 5.0, containing 70 mM SDS, 1.0 mM DTT, and 5% (v/v) D₂O, at a final concentration of ~1.0 mM. Peptide resonance peaks were assigned using standard methods including correlation spectroscopy,¹⁹ total correlation spectroscopy (TOCSY),²⁰ and nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY).²¹ The TOCSY spectra were acquired using a DIPSI spin-lock sequence at a field strength of 10 kHz and a mixing time of 70 ms. NOESY spectra were recorded with mixing times of 150 and 300 ms. All 2D experiments were acquired in the phase-sensitive mode using the method of states.²² Water suppression was achieved by low-power continuous wave irradiation during the relaxation delay or using the WATERGATE method.²³ Data were processed and analyzed using the NMRPipe/NMRVIEW software.²⁴ Before Fourier transformation, the time domain data were zero filled in both dimensions to yield a (4096 by 4096) data matrix. When necessary, a fifth-order polynomial baseline correction was applied after transformation and phasing. To obtain distance constraints, crosspeak volumes were estimated from the NOESY spectra.

The structure of the peptide corresponding to 1.5-repeat units of PthA was calculated in a semiautomated iterative manner with the program CYANA version 2.1,²⁵ using 100 starting conformers. CYANA 2.1 protocol was applied to calibrate and assign NOE crosspeaks. After the first few rounds of automatic calculations, the NOESY spectra were analyzed again to identify additional crosspeaks consistent with the structural model and to correct misidentified NOEs. The structures obtained were further refined by restrained minimization and molecular dynamic (MD) studies using the CNS software.²⁶ The 20 structures with the lowest target function were selected to represent the ensemble of peptide structures. The quality of the structures was analyzed with PROCHECK-NMR.²⁷ The NMR data were deposited in the biological magnetic resonance bank (BMRB) and protein data bank (PDB) under the entry codes 16589 and 2KQ5, respectively.

SAXS data collection and analysis

SAXS data were collected at the D11A-SAXS beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS). The

radiation wavelength was set to 1.488 Å and a charge-coupled device area detector (MARCCD 165 mm) was used to record the scattering patterns. The sample-to-detector distance was set to 1415.95 mm to give a scattering vector ranging from 0.10 to 3.5 nm⁻¹. The measurements were carried out with a sample concentration of 2 mg mL⁻¹ at 18°C. Each protein sample was previously analyzed by DLS and only monodisperse solutions (polydispersity <20%) were used. Protein samples were centrifuged for 15 min at 10,000g to eliminate any existing aggregates immediately before each measurement. The scattering curves of the protein solutions and buffers were collected in frames of 300 s each to avoid radiation-induced protein damage. Each frame was carefully checked for possible bubbles or radiation-induced aggregation of the protein before calculating the average intensity and the associated experimental error. The experimental intensities were corrected for background, buffer contributions, detector inhomogeneities, and sample transmission.

The radius of gyration (R_g) was evaluated using Guinier approximation²⁸ as implemented in the program PRIMUS.²⁹ The indirect Fourier transform package GNOM³⁰ was used to evaluate the pair-distance distribution function $p(r)$. The low-resolution envelope of the RD2 protein was determined using *ab initio* modeling implemented in DAMMIN.³¹ An averaged model was generated from several runs using the DAMAVER suite of programs.³² The SAXS model and the NMR structures were superimposed with SUPCOMB.³³

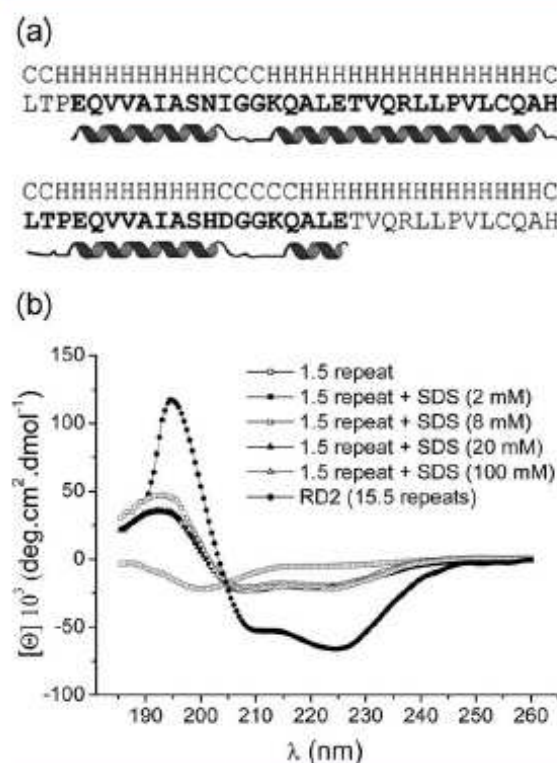
Homology molecular modeling of the RD2

The crystal structures of importin β -1 from *Saccharomyces cerevisiae* (2BPT)³⁴ and TIP120 from *Homo sapiens* (1U6G)³⁵ were used as 3D templates for restraint-based modeling as implemented in the MODELLER program.³⁶ The overall model was improved enforcing the proper stereochemistry using spatial restraints and CHARMM energy terms, followed by conjugate gradient simulation based on the variable target function method.³⁶ Ten models were built for the RD2 sequence based on the (m)GenThreader alignment. All models were evaluated with the DOPE potential and the one with the lower global score was selected for explicit solvent MD simulation using GROMACS³⁷ to check its stability and consistency. The overall and local quality analyses of the final model were assessed by VERIFY3D,³⁸ PROSA,³⁹ and VADAR.⁴⁰ Three-dimensional structures were displayed, analyzed, and compared using the program COOT.⁴¹

RESULTS AND DISCUSSION

The 1.5-repeat peptide of PthA shows a TPR-like fold

Secondary structure algorithms predict only α -helices and turns for the repeat domains of PthA proteins. Not

**Figure 1**

Structural features of the repetitive units of RD2: (a) PSIPRED secondary structure prediction of two consecutive repeat units of RD2 showing coils (C) and helices (H). The 1.5-repeat unit peptide used for structural resolution is shown in bold and the secondary structure elements determined by NMR are represented underneath the sequence. (b) CD curves of the purified 15.5-repeat domain (5 μ M) of PthA2 (RD2) in comparison with that of the 1.5-repeat unit peptide (10 μ M) in the presence and absence of different SDS concentrations.

surprisingly, the predictions are almost identical within each of the repeat units, as shown for two consecutive repeats found in the PthA variants [Fig. 1(a)]. The predictions are consistent with the far-UV CD spectrum of the entire 15.5-RD2 showing two minimum peaks at 208 and 222 nm and a positive peak at 193 nm, which indicate that RD2 has high contents of α -helices [Fig. 1(b)].

CD data analysis has indicated that the 34-amino acid peptide corresponding to one repeat unit of PthA is not structured in solution (not shown). Thus, we have used *in silico* 3D modeling algorithms to find a minimal peptide size that possesses the stereochemical requirements for a structured motif, and we observed that the 1.5-repeat peptide is the minimal structural unit of the repeat region of PthA. CD measurements indicated that the 1.5-repeat peptide is partially unfolded in solution; however, addition of 2 mM SDS was sufficient to increase the contents of secondary structural elements, particularly α -helices [Fig. 1(b)]. Although SDS has been suc-

cessfully used to investigate the structure of membrane peptides, it has also been shown to stabilize conformations in peptides with propensity to form α -helices via electrostatic interactions.⁴² We therefore used NMR techniques to solve the structure of the 1.5-repeat peptide in the presence of SDS since no experimental 3D model of the repeat unit was yet available.

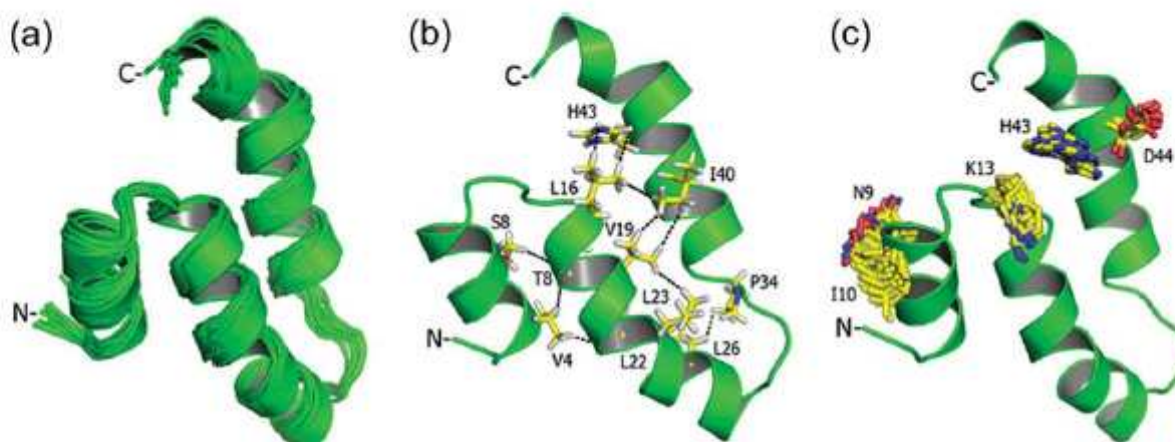
The 1.5-repeat structure was solved using 982 distance constraints derived from the NOESY spectra. The inter-residue NOEs correlate with the chemical shift index and show a dense pattern of $d\alpha N(i, i+3)$, $d\alpha\beta(i, i+3)$, and $d\alpha N(i, i+4)$ NOEs involving residues V3-I10, Q14-Q20, P24-A29, and V37-G45, indicating that these regions possess an helical fold (Supporting Information Figure 1). Statistics of an ensemble of 20 lower energy structures [Fig. 2(a)] show no significant violations of the molecular geometry parameters (Table 1). In addition, the Ramachandran plot analysis shows that all ϕ/ψ angles are in allowed regions and the root mean square deviations (RMSD) for the backbone and side chains are within expected values, indicating a good stereochemical quality of the ensemble.

The peptide folds into a helical-bundle structure that is very similar to the TPR topology [Fig. 2(a)], thus corroborating the secondary structure predictions and CD data. In fact, the CD curve of RD2 is quite similar to those of TPR domains with a 222/208 nm ratio of ~ 1.3 , which indicates coiled-coil-like conformations.^{43–46} The specific interactions responsible for these conformational states are the presence of a series of hydrogen bonds between the backbone carbonyl (C=O) of residues “*i*” and the backbone amide (NH) of residues “*i* + 4” spanning the helical regions. The secondary structure is also stabilized by hydrophobic interactions that keep the helical regions close together. Preferential spatial arrangement is confirmed by NOE interactions between side chains of the hydrophobic residues V4-S8 with T18-L22 and L16-C27 with L32-H43 [Fig. 2(b)].

Interestingly, the two hypervariable diresidues NI and HD, known to specify preferential interactions with adenine and cytosine in DNA target sites, respectively,^{15,16} are structurally close in the NMR structures [Fig. 2(c)]. This would be expected considering that each pair of the variable residues recognizes one nucleotide in a linear fashion, that is, one variable diresidue to one nucleotide in the DNA target sequence.^{15,16} We also noticed that the K residues, which typically play a central role in protein–DNA interactions,⁴⁷ are located adjacently to the polymorphic diresidues [Fig. 2(c)].

The RD2 has an elongated shape

The *ab initio* molecular shape of RD2 was determined by SAXS analysis and the corresponding profiles of the scattering curve and distance distribution function $p(r)$ are shown in Figure 3(a). SAXS calculations revealed a maximum dimension of 129 Å from the $p(r)$ curve and a gya-

**Figure 2**

The NMR structure of the 1.5-repeat peptide of PthA. (a) Ensemble of the 20 lowest energy structures showing three helices connected by two turns. (b) The lowest energy structure showing the hydrophobic interactions between the side chains of residues VVAIA and LLPVL, which stabilize the structure. (c) Orientation of the hypervariable diresidues NI and HD relative to the K residue in the peptide structure.

tion radius of 40.82 ± 0.01 Å for the RD2 molecule. These values are in agreement with those obtained from the *in silico* modeling (see below) and indicate that RD2 is a monomer in solution. Analytical size-exclusion chromatography and DLS data also suggest that RD2 is a monomer in solution with a hydrodynamic radius of around 4.5 nm for a sample with low polydispersity index (15%).

The low resolution envelope of RD2 was derived without imposing any constraints [Fig. 3(b)]. Structural alignments of each individual molecular model, obtained by *ab initio* shape reconstruction, showed that they are very similar as indicated by the normalized spatial discrepancy (NSD) values, which are around 0.8. The RD2 model reveals an elongated or extended shape consistent with the notion that the repeat units are structurally arranged in tandem along the repeat region [Fig. 3(b)]. The elongated shape of the RD2 molecule can also be noted from the $p(r)$ curve profile [Fig. 3(a)].

Molecular modeling predicts a TPR-like superhelical structure for RD2

Fold assignment searches for RD2 using PSIPRED⁴⁸ returned 10 protein structures with significant scores, all displaying TPR domains. The crystal structures of the yeast importin β 1 (PDB code: 2BPT) and human TIP120 (PDB code: 1U6G) were used as templates to generate a restraint-based 3D model of RD2 [Fig. 4(a)]. The model shows good local and global stereochemical properties with a Z-score of 6.8. Analyses of the Ramachandran plot indicate that 93% of the RD2 residues are in most favorable regions, 5% are in additional allowed regions and only 2% are in disallowed regions. In addition, local quality analysis assessed by plotting the energies as a function of

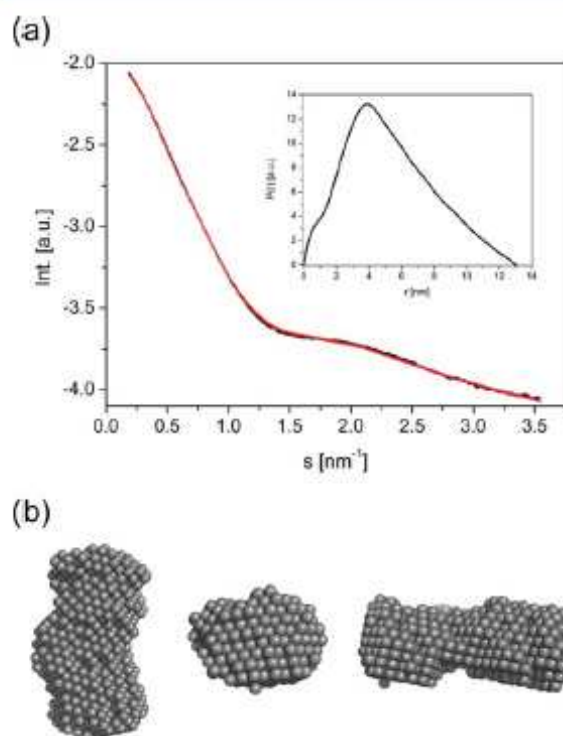
the amino acid positions shows no positive values thus highlighting the good stereochemical quality of the model and its suitability for structural analysis and comparisons. The NMR structure of the 1.5-repeat peptide superimposes adequately with the RD2 model with an RMSD of 2.7 Å [Fig. 4(b)], thus corroborating the *in silico* model.

The RD2 3D model conserves all the structural features found in TPR-containing proteins encompassing 31 anti-parallel α -helices that fold into a superhelical structure [Fig. 4(a)] and is in agreement with previous molecular modeling studies.⁴⁹ Furthermore, the superhelix model is consistent with the RD2 CD data showing an average 222/208 nm ratio >1.1 , which is typical of coiled-coil regions. The repeat units of RD2 have the same amino acid segment length of TPRs and their superposition indicates that

Table 1

Structural Statistics of the 1.5-Repeat Unit Peptide

NOEs	
Total number	982
Short range $i - j \leq 1$	650
Medium range $1 < i - j < 5$	156
Long range $i - j \geq 5$	176
CYANA	
Target function	1.01 ± 0.15
Distance violation >0.20	0
Dihedral angles $>5^\circ$	0
RMSD	
Backbone (total)	0.72 ± 0.13
Side chain (total)	1.54 ± 0.17
PROCHECK	
Most favorable	84.1%
Additional allowed	15.3%
Generously allowed	0.6%
Not allowed	0.0%

**Figure 3**

Ab initio shape determination of RD2. (a) Experimental SAXS curve and the theoretical fitting of the data (black and red, respectively) using the program GNOM. The inset shows the pair distance distribution function $p(r)$. (b) Different views of the *ab initio* low resolution DAMMIN envelope model of RD2 in solution. The NSD values for a set of 15 DAMMIN and GASBOR models ranged from 0.85 to 0.95 in both calculations.

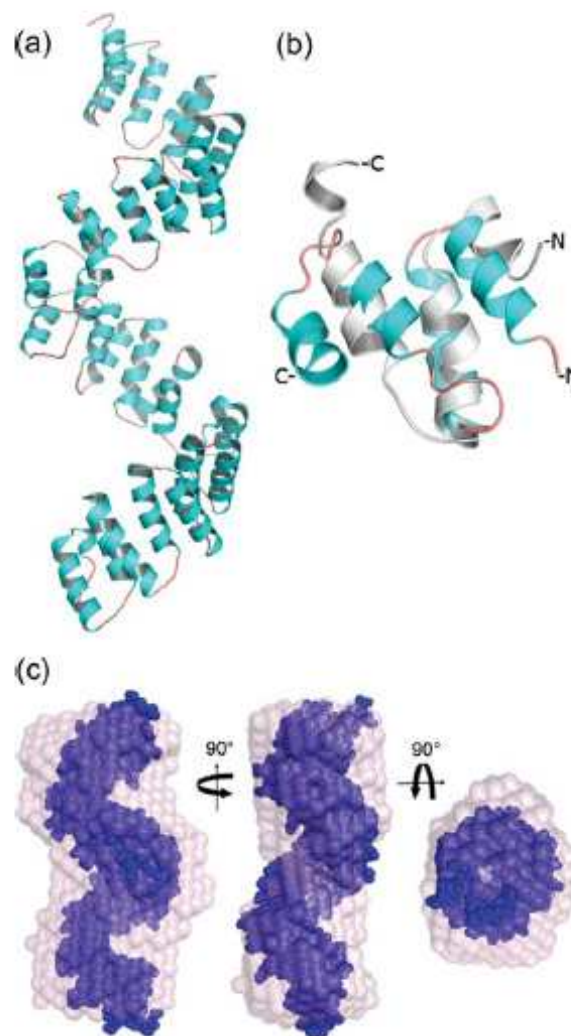
they are quite similar to one another ($\text{RMSD} \leq 1.5 \text{ \AA}$). As observed in the structure of the 1.5-repeat peptide [Fig. 2(b)], the superhelix is stabilized by contacts of hydrophobic residues across the α -helical faces resulting in a continuous hydrophobic core. Additional polar interactions between close side chains contribute to the protein packing and stabilization. Notably, the *in silico* model fits remarkably well on the SAXS envelope and displays a NSD of 1.25, indicating high-shape complementarity between the *ab initio* envelope and the surface of the theoretical superhelix model [Fig. 4(c)].

TPR domains are a well-known protein scaffolds that mediate interprotein associations and assembly of multi-protein complexes in numerous organisms. The domain was first identified in yeast proteins required for mitosis and RNA synthesis as a degenerated 34-amino acid sequence arranged in tandem repeats.^{50,51} Since then, studies have highlighted its diversity of arrangements and functions.^{52,53} More recently, it was found that TPR domains can self-interact and promote protein oligomerization.^{43,54,55} Thus, the TPR-superhelical structure of

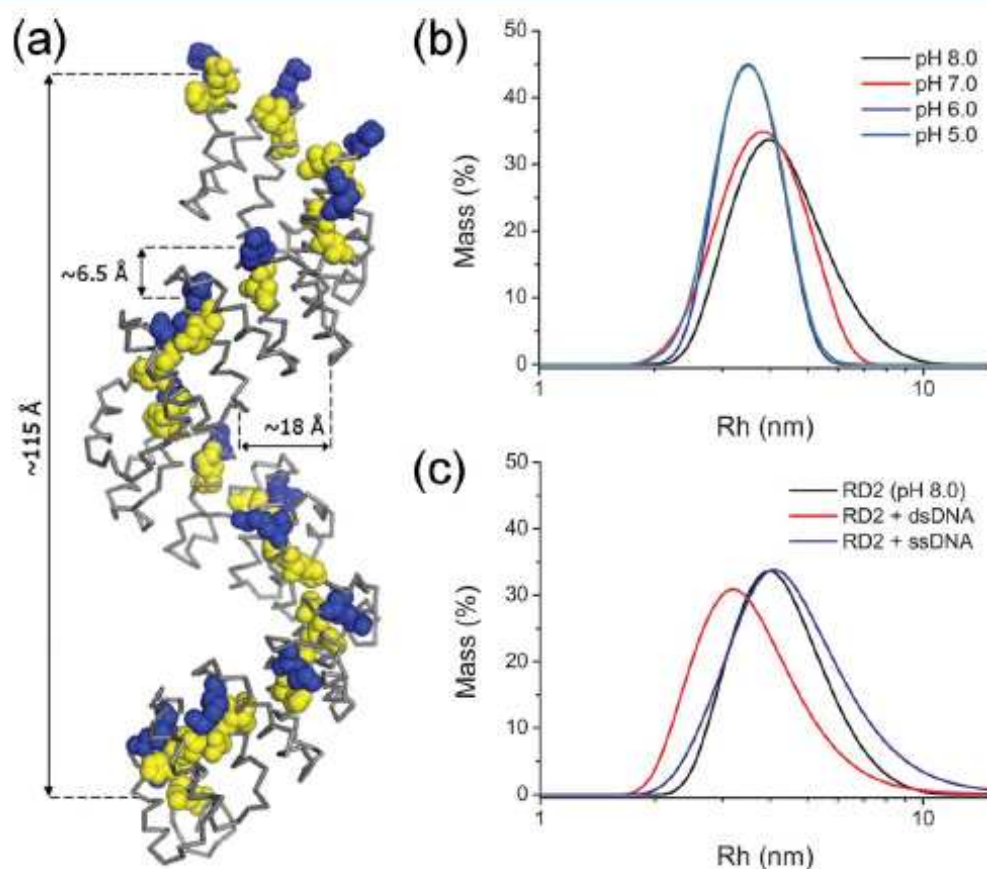
RD2 is consistent with the fact that RD2 also self-interacts in two-hybrid assays and associates with a number of citrus proteins, including the TPR domain of TDX.¹⁴

Conformational changes of RD2 upon interaction with DNA

Although TPR domains have not been reported to bind nucleic acids directly, they are found in numerous DNA and RNA-binding proteins.^{51,53,56,57} To gain insights into how the RD2 superhelix could bind DNA with

**Figure 4**

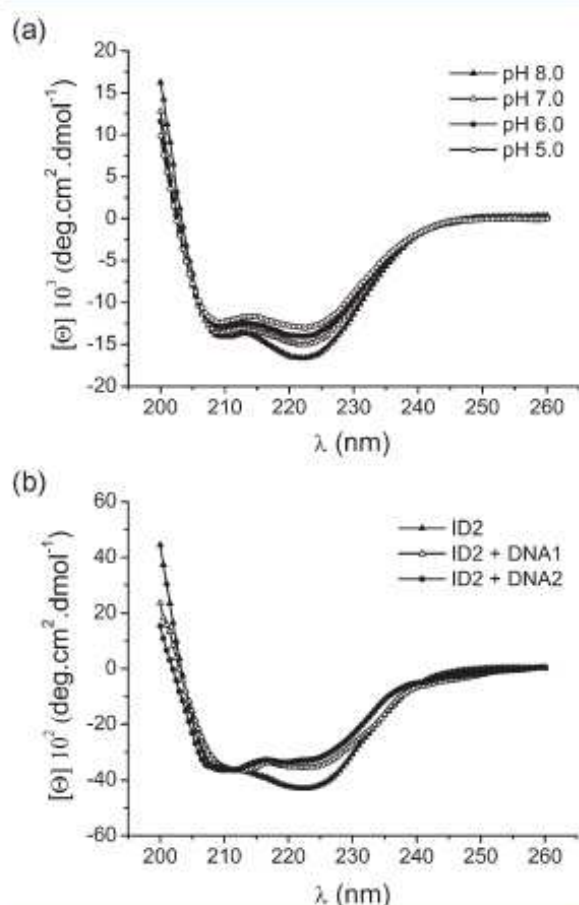
The structural model of RD2. (a) A cartoon representation of the TPR-like superhelical structure of RD2 depicting helices in cyan and loops in magenta. (b) Superposition of the NMR (gray) and modeled structures (cyan) of the PthA 1.5-repeat unit. (c) Orthogonal views illustrating the superposition of the TPR-like superhelical structure of RD2 onto its SAXS envelope.

**Figure 5**

Conformational changes of RD2. (a) A ribbon representation of the RD2 TPR-like structure highlighting the relative location of the hypervariable diresidues (yellow spheres) and the lysines (blue spheres). The approximate dimensions of the height, cleft and spacing between two consecutive hypervariable diresidues are shown. DLS curves of RD2 at different pHs (b) and after incubation with the single-strand (ss) or double-strand (ds) DNA sequence ACACATTCTAAATTTATATAAGCCCTCATCCATTTC derived from a citrus PthA-induced promoter (c).

sequence specificity, we looked at the spatial distribution of the polymorphic residues at Positions 12 (N or H) and 13 (I, D, or G). As observed in the 1.5-repeat peptide structure [Fig. 2(c)], the NI, HD, and NG pairs are located at the same side of the molecule at the tip of helix1, in close proximity to the K residues [Fig. 5(a)]. Furthermore, it is evident from the RD2 model that the polymorphic diresidues are mostly oriented to the inner face of the superhelix [Fig. 5(a)]. Thus, the only way the polymorphic residues could contact DNA would be the protein embracing the double strand, which is consistent with the fact that ligand binding in TPR proteins predominantly involves the concave surface of the TPR domain.⁵³ The atomic distances of the superhelix clefts (18 Å wide on average) supports this notion [Fig. 5(a)]. However, both the modeled structure and the SAXS envelop of RD2 have a molecular length of $\sim 115 \text{ \AA}$ [Fig. 5(a)], which would cover ~ 34 nucleotides, that is, twice as many nucleotides as predicted to bind RD2.¹⁵ Therefore, to be able to bind a 17-nucleotide target

sequence, as predicted by the linear recognition model of one nucleotide per hypervariable diresidues,^{15,16} the RD2 protein would have to undergo some degree of compaction, like a coil spring being compressed. Surprisingly, when the hydrodynamic behavior of RD2 was investigated, substantial changes in its hydrodynamic radius (R_h) due to pH changes were found [Fig. 5(b)]. At pH 8.0, the RD2 molecule displays an R_h of 4.5 nm that is consistent with the SAXS measurements done at similar pH. However, at more acidic pH, which might mimic the DNA surface, the R_h values are around 3.5 nm, indicating that RD2 can assume a more compact structure [Fig. 5(b)]. Similarly, RD2 significantly increased its compactness (R_h of 3.6 nm) in the presence of a DNA fragment derived from a citrus promoter upregulated by PthA2 [Fig. 5(c)]. Changes in the hydrodynamic radius was not clearly observed when the corresponding single-strand sense DNA was used [Fig. 5(c)], indicating that compaction preferentially occurs upon double-strand DNA interaction.

**Figure 6**

CD spectra of RD2 at different pHs and in the presence of DNA. CD curves of RD2 protein taken at different pHs (a) and after incubation with two DNA fragments (c), showing major changes in the 222/208 nm ratios at acidic pH and in the presence of DNA. The DNA1 sequence (ACACATTCTAAAATTATATTAACCCCTCATTCATTTCC) is derived from a citrus promoter upregulated by PthA2 whereas DNA2 contains the predicted PthA2 binding site¹⁵ (ACACATTCTAAAATTATACACACCTCTTTTAATATTTCC).

To further investigate these conformational changes, the secondary structure of RD2 at different pHs and in the presence of DNA was analyzed by CD spectroscopy. At acidic pH, RD2 apparently loses some of its α -helical contents, as judged by the lower intensities of the 208 and 222 nm negative signals at pHs 7.0, 6.0, and 5.0, relative to pH 8.0 [Fig. 6(a)]. However, the 222/208 nm ratio shifted from 1.3 at pH 8.0 to nearly 1.0 at pH 5.0, indicating a decrease in coiled-coil-like conformations at acidic pHs. The 222/208 nm ratio of RD2 also diminished in the presence of DNA. This was observed not only with the citrus promoter fragment but also with a DNA fragment containing the predicted PthA2 binding site¹⁵ [Fig. 6(b)]. Interestingly, it has been shown that a disulfide bond

within the TPR region of the barley Sgt1 protein is thought to promote a compaction of the helical bundles.⁴³ The reduced Sgt1 has a CD 222/208 nm ratio of ~ 1.2 , whereas oxidized Sgt1 has a ratio of ~ 0.9 ,⁴³ indicating that compaction of the TPR helical bundles is associated with a decrease in its coiled-coil-like conformation.

The repeat units of RD2 are similar to PPR motifs

As TPR domains show no obvious sequence similarities to the repeat units of RD2 and so far have not been reported to bind DNA directly, we searched for TPR-related motifs with known nucleic acid binding properties. Surprisingly, we found that the consensus sequence of PPR motifs^{58,59} is very similar to that of the repeat units of RD2 (see Fig. 7). In addition, BLAST searches using the RD2 sequence as query also identified a number of Arabidopsis (Q9MA95.2, NP_187175.1) and rice (Os02g0555100, OsJ_07125, OsJ_12287) proteins containing PPR motifs.

PPRs are formed by 2–26 tandem arrays of a degenerate 35 amino acid motif with an average of 9–12 motifs per protein.^{17,58} PPR proteins have been associated with the transcription and translational machineries, playing roles in mRNA stabilization and RNA editing.^{17,18,60} Interestingly, some of the citrus proteins that were isolated in a two-hybrid screening as interactors of PthAs are associated with RNA stabilization.¹⁴ Although no PPR structures are known, tandem PPR motifs are predicted to fold into a superhelical structure just like the TPR superhelix.^{18,58} Accordingly, the CD spectrum of maize PPR5 resembles that of RD2¹⁷ and a structural model of PPRs superposes well to the RD2 superhelix (results not shown). Thus, the structure of RD2 proposed here is consistent with the notion that nucleic acid-binding PPR motifs display a TPR-like fold. Although PPR proteins are almost absent in prokaryotes, the fact that they are predominantly found in plant mitochondria and chloroplasts⁶¹ raises the possibility that PthAs and related type III effectors might have evolved from a common PPR ancestor protein.

```
ETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDG-GKQAL RD2 rep2
ETVQRLLPVLCAHGLTPDQVVAIASHDG-GKQAL RD2 rep6
ETVQRLLPVLCAHGLTPQVVAIASNGG-GKQAL RD2 rep8
EEA..LY..M....G..PN..TYNALINAYAK.G. PPR cons.
```

Figure 7

The repeat units of RD2 are similar to PPR motifs. Protein sequence alignment between three polymorphic repeat units of RD2 and the consensus sequence from 1303 pentatricopeptide (PPR) motifs⁵⁷ performed by ClustalW2 (EMBL-EBI). Identical residues are shaded and indicated by asterisks, whereas similar residues are indicated by single or double dots. Dots in the PPR consensus sequence represent the most variable residues in PPR motifs.

In conclusion, this work provides the first experimental structural data of the PthA repeat domain. Both the NMR structure of the 1.5-repeat peptide and the SAXS envelope of RD2 corroborate the theoretical model that predicts a TPR-superhelical structure for RD2. Moreover, DLS and CD studies show that RD2 undergoes conformational rearrangements upon DNA interaction thus supporting the idea that the protein embraces the DNA with differential compactness as to cover a variable number of nucleotides.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Laboratório Nacional de Biotecnologias (LNBio) and the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) for providing the NMR facilities and SAXS beamline time, respectively. They also thank Renata Rocha de Oliveira for technical assistance on the CD measurements.

REFERENCES

1. Brunings AM, Gabriel DW. *Xanthomonas citri* breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 2003;4:141–157.
2. Wichmann G, Bergelson J. Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics* 2004;166:693–706.
3. Cernadas RA, Camillo LR, Benedetti CE. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolia*. *Mol Plant Pathol* 2008;9:609–631.
4. Cernadas RA, Benedetti CE. Role of Auxin and Gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Sci* 2009;177:190–195.
5. Duan YP, Castañeda GZ, Erdos G, Gabriel DW. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 1999;12:556–560.
6. Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pth A*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact* 1992;5:204–213.
7. Al-Saadi A, Reddy JD, Duan YP, Brunings AM, Yuan Q, Gabriel DW. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one PthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol Plant Microbe Interact* 2007;20:934–943.
8. Kay S, Bonas U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:37–43.
9. Kay S, Hahn S, Marois E, Haase G, Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 2007;318:648–651.
10. Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 2007;318:645–648.
11. Kay S, Hahn S, Marois E, Wieduwild R, Bonas U. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3DeltaREP16. *Plant J* 2009;59:859–871.
12. Römer P, Strauss T, Hahn S, Scholze H, Moritz R, Grau J, Bonas U, Lahaye T. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol* 2009;150:1697–1712.
13. Gürlbeck D, Szurek B, Bonas U. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J* 2005;42:175–187.
14. Domingues MN, Souza TA, Cernadas RA, de Oliveira MLP, Docena C, Farah CS, Benedetti CE. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Mol Plant Pathol* 2010;11:663–675.
15. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nikstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA-binding specificity of TAL-Type III effectors. *Science* 2009;326:1509–1512.
16. Moscou MJ, Bogdanov AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL Effectors. *Science* 2009;326:1501.
17. Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A. Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 2008;14:1930–1941.
18. Pfalz J, Bayraktar OA, Prikrýl J, Barkan A. Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* 2009;28:2042–2052.
19. Aue WP, Bartholdi E. Ernst RR2-dimensional spectroscopy—application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* 1976;64:2229–2246.
20. Braunschweiler L, Ems RR. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J Magn Reson* 1983;53:521–528.
21. Kumar A, Ernst RR, Wüthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton crossrelaxation networks in biological macromolecules. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;95:1–6.
22. States DJ, Haberkorn RA, Ruben DJ. A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in 4 quadrants. *J Magn Reson* 1982;48:286–292.
23. Piotto M, Saudek V, Sklenar V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 1992;2:661–665.
24. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 1995;6:277–293.
25. Güntert P. Automated nmr structure calculation with cyana. *Methods Mol Biol* 2004;278:353–378.
26. Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Gross-Kunstleve RW, Jiang J-S, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren LG. Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998;54:905–921.
27. Laskowski RA, Rullmann JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 1996;8:477–486.
28. Guinier A, Fournet G. Small angle scattering of X-rays. New York: Wiley; 1955. pp17–19.
29. Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, Svergun DI. PRIMUS: a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 2003;36:1277–1282.
30. Svergun DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* 1992;25:495–503.
31. Svergun DI. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Bio-phys J* 1999;76:2879–2886.
32. Volkov VV, Svergun DI. Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* 2003;36:860–864.
33. Kozin MB, Svergun DI. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Crystallogr* 2001;34:33–41.
34. Liu SM, Stewart M. Structural basis for the high-affinity binding of nucleoporin Nup1p to the *Saccharomyces cerevisiae* importin-beta homologue, Kap95p. *J Mol Biol* 2005;349:515–525.

35. Goldenberg SJ, Cascio TC, Shumway SD, Garbutt KC, Liu J, Xiong Y, Zheng N. Structure of the Cull1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell* 2004;119:517–528.
36. Fiser A, Sali A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 2003;374:461–491.
37. Lindahl E, Hess B, van der Spoel DL. Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 2001;7:306–317.
38. Eisenberg D, Luthy R, Bowie JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol* 1997;277:396–404.
39. Wiedenstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 2007;35:407–410.
40. Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Robert FB, Sykes BD, Wishart DS. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3316–3319.
41. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126–2132.
42. Montserret R, McLeish MJ, Böckmann A, Geourjon C, Penin E. Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding. *Biochemistry* 2000;39:8362–8373.
43. Nyarko A, Mosbahi K, Rowe AJ, Leech A, Boter M, Shirasu K, Kleanthous C. TPR-mediated self-association of plant SGT1. *Biochemistry* 2007;46:11331–11341.
44. Cortajarena AL, Regan L. Ligand binding by TPR domains. *Protein Sci* 2006;15:1193–1198.
45. Carrigan PE, Sikkink LA, Smith DE, Ramirez-Alvarado M. Domain-domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure. *Protein Sci* 2006;15:522–532.
46. Mirus O, Bionda T, von Haeseler A, Schleiff E. Evolutionary evolved discriminators in the 3-TPR domain of the Toc64 family involved in protein translocation at the outer membrane of chloroplasts and mitochondria. *J Mol Model* 2009;15:971–982.
47. Luscombe NM, Laskowski RA, Thornton JM. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2860–2874.
48. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 2000;16:404–405.
49. Schornack S, Meyer A, Römer P, Jordan T, Lahaye T. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol* 2006;163:256–272.
50. Sikorski RS, Boguski MS, Goebel M, Hieter P. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* 1990;60:307–317.
51. Hirano T, Kinoshita N, Morikawa K, Yanagida M. Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+. *Cell* 1990;60:319–328.
52. Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 1995;20:257–259.
53. D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 2003;28:655–662.
54. Bansal PK, Nourse A, Abdulle R, Kitagawa K. Sgt1 dimerization is required for yeast kinetochore assembly. *J Biol Chem* 2009;284:3586–3592.
55. Krachler AM, Sharma A, Kleanthous C. Self-association of TPR domains: lessons learned from a designed, consensus-based TPR oligomer. *Proteins* 2010;78:2131–2143.
56. Weber P, Fulgosi H, Piven I, Müller L, Knapinska K, Duong VH, Herrmann RG, Sokolenko A. TCP34, a nuclear-encoded response regulator-like TPR protein of higher plant chloroplasts. *J Mol Biol* 2006;357:535–549.
57. Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. AfsR recruits RNA polymerase to the afsS promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol* 2007;369:322–333.
58. Small ID, Peeters N. The PPR motif—a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 2000;25:46–47.
59. Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10887–10892.
60. Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R. pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 2006;18:176–197.
61. O'Toole N, Hattori M, Andres C, Ikeda K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I. On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* 2008;25:1120–1128.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: CEB 04.1

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

Título do projeto: “Caracterização de proteínas de Citrus que interagem com a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico”

Pesquisador responsável: Celso Eduardo Benedetti

Experimentador: Mariane Noronha Domingues

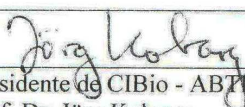
Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☐ -mestrado, ☐ -doutorado, ☒ -doutorado direto, ☐ -pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique: _____

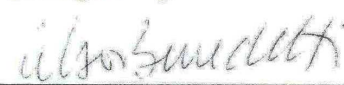
Resumo do projeto:

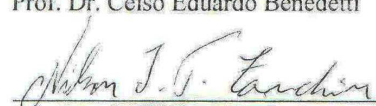
O cancro cítrico, causado pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), constitui uma doença que afeta a maioria das espécies do gênero *Citrus* e se destaca como uma das maiores ameaças à citricultura brasileira. *Xac* penetra no hospedeiro através de estômatos ou pequenos ferimentos na epiderme das folhas, frutos e ramos. A bactéria ancora-se à parede da célula hospedeira e usa o sistema de secreção de proteínas tipo III (T3S) para injetar suas proteínas de patogenicidade, entre elas, as PthAs da família AvrBs3/PthA. Quando injetado na célula hospedeira, a PthA induz as lesões características do cancro, incluindo hipertrofia e hiperplasia do tecido. Alguns estudos têm sugerido que as proteínas da família AvrBs3/PthA funcionam como fatores de transcrição. Elucidar como a PthA ativa a transcrição e suas funções é de grande importância para o esclarecimento do seu modo de ação e da patogenicidade de *Xac*. Este trabalho visa caracterizar as interações entre as proteínas PthA2 e PthA4 de *Xac* e proteínas de laranja doce (*Citrus sinensis*) previamente identificadas em ensaios de duplo híbrido de leveduras. Entre as proteínas selecionadas para esse estudo, destacamos uma cisteína protease envolvida em respostas de defesa, uma proteína de parede celular rica em glicinas, uma provável serina-hidrolase, uma proteína intrínseca de membrana, além de uma proteína ligadora de RNA. É esperado que a caracterização dessas novas interações trará informações relevantes sobre o sutil mecanismo de interação entre *Xac* x *Citrus* e um esclarecimento adicional sobre o modo de ação de PthA. Com as proteínas presa sendo expressas na forma solúvel e em quantidades suficientes propõe-se a cristalização das mesmas na ausência e presença de domínios de PthA.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 16.4.2007.

Parecer final: ☒ -projeto aprovado, ☐ -projeto recusado, ☐ -projeto com deficiências, favor comentários abaixo:


Presidente da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Jörg Kobarg


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


Membro da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin