



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**YURI DE ABREU MENDONÇA**

**“Clonagem e caracterização de uma Hsp90 de Citrus sinensis  
potencialmente envolvida no processo infectivo do fitopatógeno**

**Xanthomonas citri”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
YURI DE ABREU MENDONÇA  
Carlos Ramos  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

Co-Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M523c Mendonça, Yuri de Abreu, 1984-  
Clonagem e caracterização de uma Hsp90 de *Citrus sinensis* potencialmente envolvida no processo infectivo do fitopatógeno *Xanthomonas citris* / Renato Grillo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos.  
Coorientador: Celso Eduardo Benedetti.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas de choque térmico HSP90. 2. Chaperonas moleculares. 3. *Xanthomonas campestris*. 4. Dobramento de proteína. 5. Laranja. I. Ramos, Carlos Henrique Inácio. II. Benedetti, Celso Eduardo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Cloning and characterization of an Hsp90 *Citrus sinensis* potentially involved on the infective process of the plant pathogen *Xanthomonas citri*

**Palavras-chave em Inglês:**

Hsp90 heat shock proteins

Molecular chaperones

*Xanthomonas campestris*

Protein folding

Oranges

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Carlos Henrique Inácio Ramos [Orientador]

Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Richard John Ward

Ana Paula Ulian de Araújo

Renato Vicentini

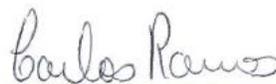
**Data da defesa:** 29-08-2011

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de agosto de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Elizabeth Pacheco Batista Fontes



Assinatura

Prof. Dr. Richard John Ward

Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Assinatura

Prof. Dr. Renato Vicentini dos Santos



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Assinatura

Prof. Dr. Júlio César Borges



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé



Assinatura

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer à FAPESP, pela bolsa de doutorado, à FAPESP, CNPq e FIRCA-NIH, pelo apoio financeiro, e ao LNLS e à UNICAMP pela infraestrutura. Todo o apoio fornecido por estes tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Ramos, pela oportunidade e pela orientação pessoal e profissional durante todo o período.

Ao Prof. Dr. Celso Benedetti, também pela orientação, pelas boas discussões e a boa relação criada no cotidiano.

Agradeço a todos os colegas, professores e alunos, técnicos e funcionários do instituto de Química da UNICAMP e do LNLS, por todo apoio, pelos diversos e excelentes momentos, tanto em ambiente de trabalho quanto fora dele, pelas inúmeras e valiosíssimas discussões científicas (em especial aos meus colegas do MGtalk), que me fizeram amadurecer enormemente nesses quatro anos de convívio. Em especial aos vários amigos que fiz nestes dois ambientes de trabalho, e pretendo carregá-los por toda a vida.

Devo fazer um agradecimento especial à Gabriela V. Meirelles, pelo maior e constante apoio pessoal e profissional em todos os momentos, desde o início da minha vida acadêmica. O caminho que percorri desde a minha graduação até este ponto da minha vida, e toda jornada que devo seguir deste momento em diante, tem e terá uma imensa contribuição desta pessoa. Por esses e muitos outros motivos, eu dedico esta tese a ela.

Agradeço também a todos os professores e amigos do curso de Ciências Biológicas da UFG, pela amizade e por terem me servido de guias para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Em especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Bastos pelo grande exemplo de garra, força de vontade, competência, e amizade.

Agradeço também aos meus pais, irmãos, avós, tios e primos, sempre presentes em todos os momentos da minha vida, e sempre me auxiliando de alguma forma, mesmo que em memória.

Finalmente gostaria de me desculpar por não poder citar e fazer um agradecimento especial para todos os nomes que estão embutidos nesta parte da minha tese. Todos, sem exceção, tiveram um papel importante para mim, e certamente pude aprender e desfrutar de bons momentos com cada relação que tive e mantive nesses 27 anos de vida.

E mais uma vez, o meu muito obrigado a todos.

Yuri de Abreu Mendonça

*“Se precisa de uma mão sempre disposta a te ajudar,  
a encontrará na extremidade de cada um dos seus braços.”*

(Oswaldo Mendonça Júnior)

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b>	iv
<b>Sumário</b>	vi
<b>Lista de figuras e tabelas</b>	xiv
<b>Lista de abreviações</b>	xviii
<b>Resumo</b>	xx
<b>Abstract</b>	xxii
<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b>	<b>1</b>
1.1 <i>Xanthomonas citri</i>	1
1.2 Sistemas de secreção de bactérias gram-negativas	2
1.3 Interação planta-patógeno	5
1.4 PthAs: as principais proteínas de virulência de <i>Xac</i>	7
1.5 Enovelamento de proteínas	8
1.6 Hsp90	10
1.7 Co-chaperonas de Hsp90	15
1.7.1 Ciclofilina	16

1.7.2 TDX	16
<b><u>2. OBJETIVOS</u></b>	18
<b><u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u></b>	19
3.1 Materiais	19
3.1.1 Biblioteca de cDNA de <i>C. sinensis</i> e clones de <i>Xac</i>	19
3.1.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados	19
3.1.3 Vetores utilizados	20
3.1.3.1 Vetores de clonagem	20
3.1.3.2 Vetores de expressão	21
3.1.3.3 Vetores de duplo-híbrido	22
3.1.4 Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas	22
3.1.5 Linhagem de <i>S. cerevisiae</i> utilizada	23
3.1.6 Tampões e soluções utilizadas	23
3.1.7 Meios de cultura	25
3.2 Métodos	27
3.2.1 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)	27
3.2.1.1 PCR de colônia	27

3.2.2 Eletroforese em gel de agarose	28
3.2.3 Determinação da concentração de DNA	28
3.2.4 Clonagens	29
3.2.4.1 Clonagem em pCR II	29
3.2.4.2 Clonagem em pGEM-T easy	29
3.2.4.3 Sub-clonagem em pET-28a	29
3.2.4.4 Sub-clonagem em pCOBD e pOBD	30
3.2.5 Obtenção de bactérias competentes para transformação por choque-térmico	30
3.2.6 Obtenção de células eletro-competentes	31
3.2.7 Transformação por eletroporação	31
3.2.8 Extração do DNA plasmidial	31
3.2.8.1 Protocolo de lise alcalina	31
3.2.8.2 Extração por fervura	32
3.2.8.3 Extração de DNA plasmidial de leveduras	33
3.2.9 Transformação de bactérias competentes por choque-térmico	34
3.2.10 Preparação de células competentes e transformação por cloreto de cálcio	34

3.2.11 Seleção de clones transformados	35
3.2.12 Sequenciamento de DNA	35
3.2.13 Expressão de proteínas recombinantes em bactérias	35
3.2.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)	37
3.2.15 Purificação de proteína	37
3.2.15.1 Lise bacteriana	37
3.2.15.2 Solubilização e purificação de proteína proveniente de corpos de inclusão	37
3.2.15.3 Cromatografia de afinidade	38
A) Afinidade a metal	38
B) Afinidade a GST	39
3.2.16 Gel-filtração e gel-filtração analítica	40
3.2.17 Cromatografia de exclusão molecular acompanhada por um detector de espalhamento de luz em vários ângulos (SEC-MALS)	41
3.2.18 Determinação da concentração de proteínas	42
3.2.19 Teste de reenovelamento da proteína Cointegrase auxiliado pela Hsp90 de laranja	43
3.2.20 Ensaio de interação proteína-proteína utilizando uma proteína fusionada à cauda de GST como isca (GST “ <i>pull-down</i> ”)	43

3.2.21 <i>Western blot</i>	44
3.2.22 Ensaio de atividade chaperona da Hsp90 utilizando citrato sintase	45
3.2.23 Sistema de duplo-híbrido	46
3.2.24 Transformação de leveduras competentes por choque-térmico	46
3.2.25 Transformação em larga-escala	47
3.2.26 Testes de auto-ativação dos genes repórteres do ensaio de duplo-híbrido	48
3.2.26.1 Gene <i>ade2</i>	48
3.2.26.2 Gene repórter <i>gal1-his3</i>	49
3.2.26.3 Gene <i>lacZ</i>	49
3.2.27 Recuperação dos plasmídeos das presas do duplo-híbrido	51
3.2.28 Caracterização de estrutura secundária de proteínas através de espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)	51
3.2.29 Desenovelamento térmico acompanhado por CD	52
3.2.30 Fluorescência intrínseca	53
3.2.31 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	53
3.2.32 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)	54
<b><u>4. RESULTADOS</u></b>	56

4.1 Hsp90 de <i>C. sinensis</i>	56
4.1.1 Clonagens	56
4.1.2 Expressão e purificação	61
4.1.3 Caracterização espectroscópica da proteína recombinante Hsp90	64
4.1.3.1 Espectros de CD	64
4.1.3.2 Estabilidade térmica	66
4.1.3.3 Espectros de fluorescência intrínseca	68
4.1.3.4 SAXS	70
4.1.4 Gel-filtração analítica e SEC-MALS	75
4.1.5 Proteção contra a agregação da CS	77
4.1.6 Identificação <i>in vivo</i> por <i>western blot</i>	78
4.1.7 Ensaio de duplo-híbrido	79
4.1.7.1 Testes de auto-ativação da Cointegrase de <i>Xac</i>	81
4.2 Proteínas parceiras de interação da Hsp90 de laranja	83
4.2.1 Cointegrase de <i>Xac</i>	83
4.2.1.1 Clonagem da orf XACb0010 de <i>Xac</i> , e expressão e purificação da proteína Cointegrase	83
4.2.1.2 Purificação da proteína Cointegrase proveniente de corpo de	85

inclusão

4.2.1.3 Teste de solubilização da Cointegrase de <i>Xac</i> com o auxílio da Hsp90 recombinante de laranja	87
4.3 Proteínas PthA de <i>Xac</i>	89
4.3.1 Expressão e purificação das PthAs 1 a 4	89
4.3.2 Ensaio de <i>pull-down</i> com as PthAs	91
4.3.3 Gel filtração analítica das proteínas PthA2 e 4 de <i>Xac</i>	93
<b><u>5 DISCUSSÃO</u></b>	95
5.1 Sequenciamento de genes codificantes para a Hsp90 de <i>C. sinensis</i>	95
5.2 Produção de Hsp90 recombinante em sistema heterólogo	95
5.3 Hsp90 recombinante apresentou-se corretamente enovelada e com funções preservadas	96
5.4 Identificação da Hsp90 em tecido vegetal	98
5.5 SAXS: medições e modelagens	98
5.6 Cointegrase	100
5.7 Duplo-híbrido	101
5.8 Ensaio de <i>pull-down</i>	103
<b><u>6 CONCLUSÕES</u></b>	105

**7 REFERÊNCIAS**

106

**ANEXO I**

118

## Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Infecção por <i>Xac</i> .	2
Figura 2: Sistemas secretórios tipo II, III e IV.	4
Figura 3: Hipótese de evolução conjunta da resistência de plantas a seus patógenos	7
Figura 4: Principais vias de enovelamento protéico nas células	10
Figura 5: Hsp90 de levedura e seus domínios internos.	12
Figura 6: Domínio C-terminal para interação com domínio TPR de cochaperonas.	13
Figura 7: Ciclo da atividade ATPase da Hsp90.	14
Tabela 1: Iniciadores desenhados para clonagem e sequenciamento dos genes de interesse.	20
Tabela 2: Condições de testes de expressão da proteína Cointegrase de <i>Xac</i> .	36
Tabela 3: Proteínas utilizadas como padrão para gel-filtração analítica.	40
Tabela 4: Diluições dos anticorpos utilizados nos experimentos de <i>western-blot</i> .	45
Figura 8: Amplificação por PCR da Hsp90 de <i>C. sinensis</i> .	56
Figura 9: Alinhamento das sequências das Hsp90a e b de <i>C. sinensis</i> .	58
Figura10: Alinhamento entre as sequências de Hsp90 encontradas em <i>C. sinensis</i> e outros homólogos de eucariotos.	59
Figura 11: Sequência e distribuição de domínios da Hsp90 de <i>C. sinensis</i> .	60
Figura12: Sequência de DNA da Hsp90a de <i>C.sinensis</i> .	61

Figura 13: Expressão da proteína recombinante Hsp90 de <i>C. sinensis</i> .	62
Figura 14: SDS-Page dos passos cromatográficos utilizados na purificação da Hsp90 de <i>C. sinensis</i> .	63
Tabela 5: Expressão e purificação da Hsp90 de <i>C. sinensis</i> em <i>E. coli</i> .	64
Figura 15: Espectro de CD da Hsp90 de <i>C. sinensis</i> na ausência de ligantes.	65
Figura 16: Espectro de CD da proteína Hsp90 na presença de ligantes.	66
Figura 17: Desenovelamento térmico da Hsp90.	67
Figura 18: Espectro de emissão de fluorescência dos triptofanos da Hsp90.	68
Figura 19: Fluorescência do triptofano da Hsp90 de laranja na presença de ligantes.	69
Tabela 6: Resumo dos dados de fluorescência de triptofano da Hsp90 de laranja.	70
Figura 20: Medidas SAXS da Hsp90 na presença e ausência de ligantes.	71
Tabela 7: Análise comparativa dos parâmetros hidrodinâmicos das Hsp90 de diferentes organismos.	73
Figura 21: Comparação dos modelos <i>ab initio</i> obtidos por SAXS para a Hsp90 de laranja com as estruturas já depositadas.	74
Figura 22: Gel-filtração analítica da Hsp90 de laranja.	75
Tabela 8: Parâmetros hidrodinâmicos da Hsp90 de laranja.	76
Figura 23: Hsp90 analisada por SEC-MALS.	77
Figura 24: Proteção da agregação da CS pela Hsp90 de <i>C. sinensis</i> .	78

Figura 25: Análise por SDS–PAGE e <i>western blot</i> da Hsp90 de <i>C. sinensis</i> em tecido vegetal.	79
Tabela 9: ORFs de <i>Xac</i> isoladas durante o ensaio de duplo-híbrido, utilizando como isca a Hsp90a de <i>C. sinensis</i> .	80
Figura 26: Alinhamento das sequências das ORFs relativas à Cointegrase de <i>Xac</i> .	81
Tabela 10: Condições utilizadas no teste de auto-ativação da Cointegrase de <i>Xac</i> em sistema de duplo-híbrido.	82
Figura 27: Testes de auto-ativação dos genes repórteres <i>his3</i> e <i>ade2</i> pela proteína Cointegrase em sistema de duplo híbrido.	83
Figura 28: Expressão da proteína Cointegrase de <i>Xac</i> .	84
Figura 29: Purificação por cromatografia de afinidade a níquel da proteína Cointegrase, fusionada a cauda de His <sub>6</sub> .	85
Figura 30: SDS-PAGE da lise de corpo de inclusão e reenovelamento da proteína Cointegrase, de <i>Xac</i> .	86
Figura 31 SDS-PAGE da solubilização da Cointegrase de <i>Xac</i> com o auxílio da Hsp90.	88
Figura 32: SDS-PAGE da purificação das quatro isoformas da proteína pthA de <i>Xac</i>	90
Figura 33: <i>Western blot</i> dos <i>pull-downs</i> das interações das PthAs com a Hsp90-GST de <i>C. sinensis</i> .	92
Figura 34: <i>Western blot</i> dos <i>pull-downs</i> da interação da PthA2 com a Hsp90-GST de <i>C. sinensis</i> na presença e ausência de aditivos.	93

Figura 35: Gel filtração analítica das proteínas PthA2 e PthA4, de <i>Xac</i> .	94
Tabela 11: Parâmetros hidrodinâmicos das proteínas PthA2 e PthA4 de <i>Xac</i> .	94
Figura 36: Modelo para a comparação das ações de uma transposase comum e uma cointegrase.	102
Figura 37: Localização da ORF XACb0010 no megaplasmídeo pXAC64 de <i>Xac</i>	103
Figura 38: Representação esquemática das quatro variantes de PthAs de <i>Xac</i> .	104

## Lista de abreviaturas

[ $\theta$ ]	Elipticidade molar residual
$\langle \lambda \rangle$	Centro de massa
3-AT	3-amino-1.2.4-triazol
AD	Domínio de ativação
AU	Unidade de absorbância
BD	Domínio de ligação
BSA	Albumina de soro bovino
C	Concentração
CD	Dicroísmo circular
cDNA	DNA complementar
CS	Citrato sintase
CsHsp90	Hsp90 de <i>Citrus sinensis</i>
Cyp	Ciclofilina
D	Coeficiente de difusão
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
$f$	Coeficiente friccional
$fH$	Fração de elipticidade
Gdm-Cl	Cloridrato de guanidina
GST	Glutathione S-transferase
His6	Cauda de polihistidinas (6 resíduos)
hr	Resposta de hipersensibilidade
hrp	Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade
Hsp	Heat shock protein (proteína de choque térmico)
$IF_{\lambda}$	Intensidade de fluorescência num determinado comprimento de onda
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D tiogalactopiranosídeo
Kav	Coeficiente de partição
kDa	kilo Dalton
l	Comprimento do caminho óptico (em nm)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LBON	Meio de cultura Luria-Bertani sem NaCl
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MM	Massa molecular
ON ou overnight	Crescimento celular por 16 h aproximadamente
ONPG	Orto-nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
ORF	(Open read frame) Janela aberta de leitura: sequência de nucleotídeos que codificam os aminoácidos que compõem uma proteína

$p(r)$	Função de distribuição de distâncias
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PVDF	Difluoreto de polivinila
$R_g$	Raio de giro
$R_s$	Raio de Stokes
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SDS	Duodecil-sulfato de sódio
SDS-Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SEC-MALS	Cromatografia de exclusão molecular acompanhada por um detector de espalhamento de luz em vários ângulos
ss-DNA	DNA fita simples
T3SS	Sistema de secreção tipo III
T4SS	Sistema de secreção tipo IV
TB	Meio de cultura Terrific Broth
TBE	Tampão tris-borato contendo EDTA
TDX	Proteína tiorredoxina-‘like’
UFC	Unidade formadora de colônia
vc	Volume de coluna
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas citri</i>
$\epsilon$	Coeficiente de extinção molar
$\theta$	Elipsidade
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda onde observa-se a máxima intensidade de fluorescência dos espectros

## Resumo

As bactérias patogênicas gram-negativas desenvolveram estratégias sofisticadas para infectar seus hospedeiros, utilizando sistemas de secreção especializados para translocar proteínas de virulência através da membrana das células eucarióticas para o citoplasma. Para que este processo seja eficiente, estas proteínas de virulência devem estar parcialmente enoveladas ou mesmo desenoveladas para que possam ser transportadas para o interior das células hospedeiras através desses sistemas de secreção. Uma vez dentro das células alvo, as proteínas de virulência são encaminhadas ao seu estado nativo e ativadas pela própria maquinaria de enovelamento da célula hospedeira. As proteínas responsáveis em auxiliar o enovelamento protéico nas células são as chaperonas, denominadas classicamente de proteínas de choque térmico (Hsps). Plantas, por serem organismos sésseis, são muito mais vulneráveis a fatores de estresse biótico e abiótico, tornando o papel das Hsps ainda mais relevante para a homeostase protéica e viabilidade celular. O estudo das proteínas da família Hsp90 é muito difundido devido ao seu papel fundamental desempenhado nas situações de infecção e em diferentes tipos de estresse. Neste trabalho, a proteína recombinante Hsp90 de laranja doce (*Citrus sinensis*) foi clonada e purificada com o objetivo de estudar o mecanismo geral de infecção do fitopatógeno bacteriano de espécies de citros *Xanthomonas citri* (*Xac*). Investigou-se a interação, combinando técnicas de *western blot* e ensaios de *pull-down*, entre a Hsp90 e todas as quatro variantes da PthA, principal fator de virulência de *Xac*, e as co-chaperonas da Hsp90 de laranja ciclofilina (Cyp) e uma proteína tiorredoxina-‘like’ (TDX). Estas proteínas já foram descritas por se apresentarem reguladas positivamente na laranja doce durante a infecção com *Xac*, apontando para um possível papel da Hsp90 na formação de um complexo de enovelamento capaz de ativar as proteínas de virulência de *Xac* no interior das células infectadas. Além disso, investigamos a estrutura e função da Hsp90 de laranja doce que apresentou-se enovelada e solúvel, como medido por dicroísmo circular (CD), espectroscopia de fluorescência intrínseca e espalhamento de luz dinâmico (DLS). A Hsp90 se apresentou como um dímero em solução com um raio

de Stokes de 62 Å, e altamente resistente á desnaturação por temperatura, como medido por CD. A proteína mostrou-se funcional, como medido pela sua capacidade de proteger a agregação da citrato sintase *in vitro* em um ensaio de espalhamento de luz. O estudo do efeito de nucleotídeos na conformação e função da Hsp90 através de CD, fluorescência intrínseca e de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) mostram alterações na conformação da proteína na presença destes ligantes.

## Abstract

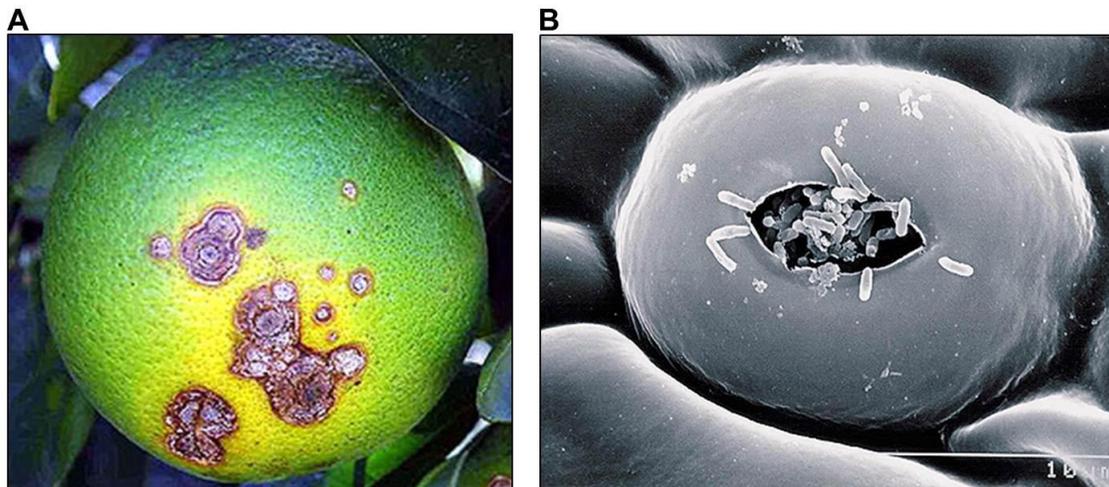
Gram-negative bacterial pathogens, which have developed sophisticated strategies to infect hosts, use specialized secretion systems to secrete and translocate virulence proteins across the eukaryotic cell membrane into the cytoplasm. The translocation process depends on unfolded or partially folded virulence proteins to be transported through the secretion system into the target inner cell where they are folded by the host chaperone machinery. Auxiliary proteins are responsible to help folding in cells and are known as molecular chaperones, or heat shock proteins (HSPs). Plants, being sessile organisms, are much more vulnerable to biotic and abiotic stress factors, making the role of HSPs even more important for protein homeostasis and cell viability. The study of the Hsp90 family is widespread due to the key role played in situations of infection and under various types of stress. In this work, an Hsp90 sweet orange (*Citrus sinensis*) was cloned and purified in order to study the general mechanism of infection of the bacterial pathogen of citrus species, *Xanthomonas citri* (*Xac*). First, we investigated the interaction, by combining immunostaining and pull-down assays, between Hsp90 and all four variants of PthA, the major virulence factor of *Xac*, and the orange Hsp90 cochaperones cyclophilin (Cyp) and a thioredoxin-like protein (TDX). These proteins have been described to be upregulated in sweet orange during infection with *Xac*, pointing to a possible role of Hsp90 in the formation of a folding complex able to activate the virulence proteins of *Xac* inside the infected cells. Furthermore, we took to investigate the structure and function of the Hsp90 from sweet orange, which was folded and soluble as measured by circular dichroism (CD), intrinsic fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). Hsp90 was a dimer in solution with a Stokes radius of about 62 Å, tolerating up to 90 °C without denaturation, as measured by CD. The protein was functional, as measured by its ability to protect the aggregation of citrate synthase in an light scattering assay. The study of the effect of nucleotides on the conformation and function of Hsp90 by CD, intrinsic fluorescence and small-angle X-ray scattering (SAXS) show evidence of conformation modulation by ATP and ADP.

# 1. Introdução

## 1.1 *Xanthomonas citri*

Diversas espécies e linhagens diferentes de *Xanthomonas* causam sérias doenças em plantas, e são responsáveis por perdas significativas na produção de importantes cultivares, como citros, arroz, uva, feijão e algodão (Swings e Civerolo, 1993). Surpreendentemente, algumas linhagens filogeneticamente distintas afetam os mesmos tipos de hospedeiros, causando os mesmos sintomas das doenças (Brunings e Gabriel, 2003; Jones *et al.*, 2000). *Xanthomonas citri* (*Xac*) é uma espécie de bactéria gram-negativa baciliforme que possui um flagelo polar, o qual lhe confere mobilidade. Esta bactéria é a causadora do cancro cítrico (Figura 1), uma infecção que afeta plantações de frutas cítricas de diversos países de todo o mundo, incluindo o Brasil (Brunings e Gabriel, 2003).

*Xac* é um organismo que não necessita de vetor para que aconteça a infecção. Sua transmissão se dá através do vento, água, ou pelo homem, devido ao contato destes com a bactéria, que é liberada na superfície da planta contaminada, no fim do seu ciclo (Brunings e Gabriel, 2003). Após o contato com o hospedeiro, a bactéria penetra em seus tecidos através de estômatos, lenticelas ou pequenas lesões na sua superfície. Caso não entre em contato com algum citro, a *Xac* ainda pode sobreviver por alguns meses na rizosfera de algumas gramíneas e em frutos e folhas em decomposição (Goto *et al.*, 1975; Christiano, 2003. Dissertação).



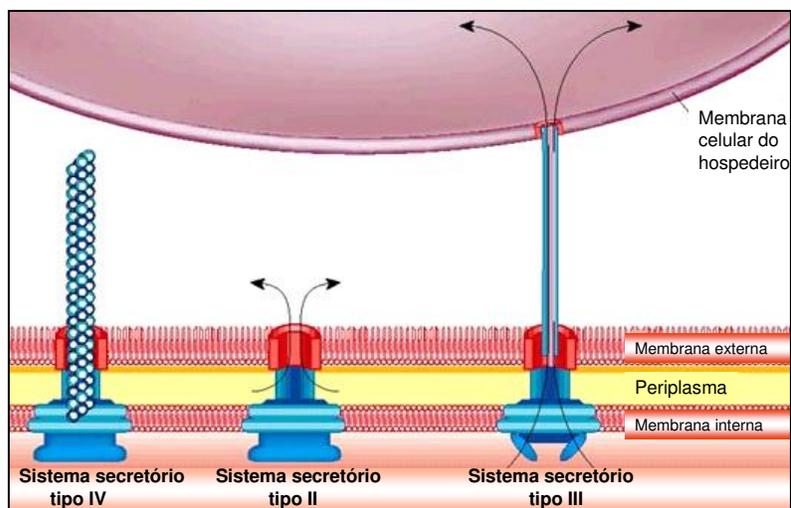
**Figura 1:** Infecção por *Xac*. A) Lesão típica de cancro cítrico, provocando abscisão prematura dos frutos e folhas (figura retirada de Brunings e Gabriel, 2003). B) Microscopia eletrônica de varredura de um estômato de folha de toranja (*Citrus paradisi*) durante infecção por *Xac* (figura retirada de Graham *et al.*, 2004).

## 1.2 Sistemas de secreção de bactérias gram-negativas

Muitas bactérias patogênicas gram-negativas compartilham uma habilidade marcante de injetar fatores de virulência bacterianos diretamente no interior das células de seus hospedeiros eucariotos. Estas proteínas efetoras subsequentemente subvertem os processos celulares do hospedeiro de várias maneiras, a fim de possibilitar a modulação direta do novo ambiente pelo patógeno, deixando este suscetível à invasão e infecção. Os componentes-chave que medeiam a secreção destes fatores de virulência são os chamados sistemas de secreção (Moraes *et al.*, 2007). Estes são divididos em quatro tipos, de acordo com sua morfologia e função. Esses sistemas são de fundamental importância para as bactérias gram-negativas, pois, além de realizarem a secreção de diversas proteínas, principalmente as de patogenicidade, participam também da montagem dos flagelos (Hueck, 1998; Galán e Collmer, 1999; Cornelis e Van Gijsegem, 2000; Cornelis, 2006; MacNab, 2003).

Em *Xac* foram encontrados dois diferentes tipos de sistemas de secreção do tipo II, responsáveis pela secreção de enzimas extracelulares que degradam a parede celular, sendo um deles específico de *Xac* (Da Silva *et al.*, 2002). No genoma deste fitopatógeno foi anotado um único cluster de sistema de secreção tipo III (T3SS, “type three secretion system”), encontrado no cromossomo, sendo importante para a patogenicidade (secreção de Hrp), e dois tipos de sistema de secreção tipo IV (T4SS, “type four secretion system”), um encontrado no cromossomo, e outro encontrado no plasmídeo pXAC64 (Da Silva *et al.*, 2002). Os sistemas de secreção dos tipos III e IV (Figura 2) são os mais importantes durante o processo de infecção a ser realizado pela *Xanthomonas* (Hueck, 1998; Galán e Collmer, 1999; Cornelis e Van Gijsegem, 2000; Alegria *et al.*, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006; Stavrinides *et al.*, 2008).

A estrutura supramolecular do T3SS torna este sistema muito mais eficiente no processo de infecção das células hospedeiras do que os sistemas dos tipos I e II. O T3SS consiste de um complexo protéico macromolecular com estrutura e função conservadas, constituído por mais de 20 proteínas diferentes. Este complexo, também conhecido como “complexo agulha” constitui um caminho contínuo para as proteínas efetoras do citosol bacteriano até o citosol da célula hospedeira (Cornelis, 2006; Moraes *et al.*, 2007). Este complexo caracteriza-se por apresentar uma porção externa, alongada e oca, com cerca de 120 nm de comprimento, semelhante a uma agulha, e uma porção basal cilíndrica, a qual permanece ancorada na membrana plasmática da bactéria.



**Figura 2:** Sistemas secretórios tipo II, III e IV. A possibilidade de se injetar proteínas no interior da célula hospedeira constitui uma vantagem importante para os patógenos bacterianos gram-negativos de animais e plantas. (figura adaptada de Cascales e Christie, 2003).

Segundo da Silva *et al.* (2002), 25 dos 27 genes codificantes para o T3SS encontram-se no único *locus* (*hrp*) do cromossomo de *Xac*. Vários desses genes *hrp* são conservados (*hrc*) em fitopatógenos e patógenos de animais. Muitos dos genes *hrp* do *locus* não apresentam função bem estabelecida, mas alguns podem ter suas funções preditas pela sua homologia aos genes do flagelo.

O sistema de secreção do tipo IV é responsável por transportar o DNA bacteriano, auxiliando no mecanismo de conjugação, em bactérias, além de estar envolvido na secreção de algumas proteínas de virulência e complexos DNA - proteína (Cascales e Christie, 2003). O T4SS possui uma estrutura muito semelhante à do T3SS, o que também possibilita a injeção de proteínas e complexos protéicos diretamente no citoplasma de outras células (Christie e Vogel, 2000; Groisman, 2001, Qiao *et al.*, 2007).

### 1.3 Interação planta-patógeno

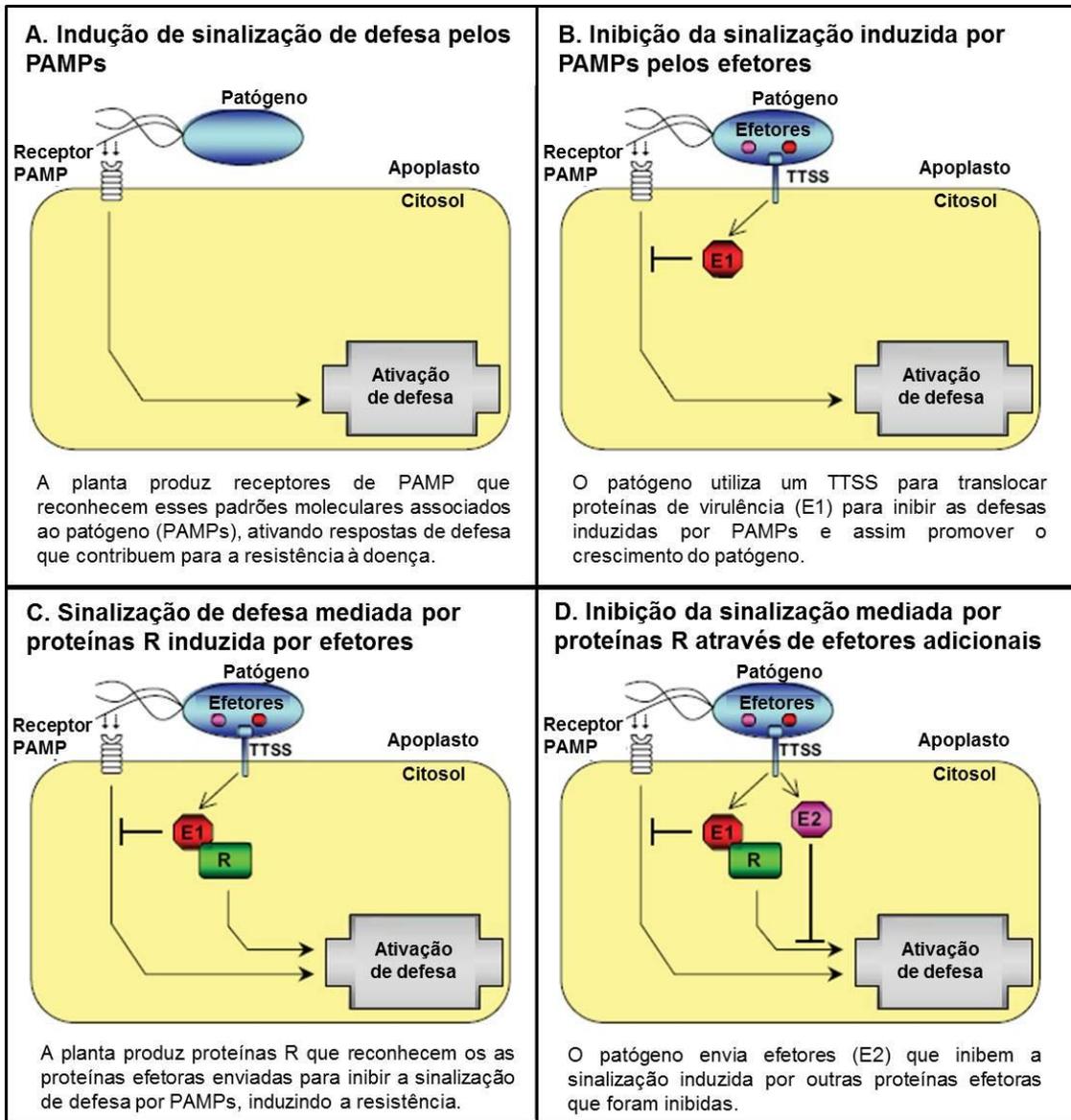
Existem diversos organismos, dentre fungos, vírus, nematodos e bactérias que são patógenos de plantas. Tais organismos utilizam diversas estratégias para a infecção. Bactérias patogênicas podem se proliferar nos espaços intracelulares (o apoplasto) após adentrarem no hospedeiro através de estômatos e hidatódios, ou através de feridas nos tecidos. Muitos organismos que representam esta classe enviam proteínas efetoras, conhecidos como fatores de virulência, para dentro das células da planta, a fim de melhorar seu desempenho na infecção (Jones e Dangl, 2006), causando uma grande variedade de doenças na maioria dos cultivares (Alfano e Collmer, 1996). A maioria desses patógenos são bactérias gram-negativas e pertencem aos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, e *Ralstonia*.

As plantas, diferente dos mamíferos, não possuem células de defesa móveis nem um sistema imune somático adaptativo. Estas possuem um sistema imune natural baseado no reconhecimento de fatores externos. A detecção de um organismo invasor em potencial é um passo crítico para a ativação de uma resposta efetiva. Desta forma, para acompanhar a enorme gama de patógenos em constante alteração, as proteínas de defesa desenvolveram nas plantas (da Cunha *et al.*, 2006).

O caráter das respostas defensivas das plantas é controlado pelos seus genes. A resistência aos patógenos pode proceder tanto ao nível de espécie quanto de cultivar. A resistência de cultivares está associada a uma morte celular localizada, conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR). Esta resposta geralmente é induzida por uma interação direta de proteína com proteína (Flor, 1955). Os fatores de virulência dos patógenos são reconhecidos por proteínas de resistência (R) sintetizadas pela planta hospedeira.

Diversas proteínas “R” atuam em complexos R multi-protéicos os quais interagem com os efetores do patógeno, induzindo uma sinalização para a resistência (Friedman e Baker, 2007). O reconhecimento de patógenos por plantas não se dá somente através da interação de suas proteínas R com as proteínas

efetoras do patógeno. As proteínas estruturais desses organismos formam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que são reconhecidos por receptores localizados na membrana celular das células do hospedeiro (Figura 3). Devido a esse reconhecimento, vários genes de patogenicidade acabam sendo responsáveis por cessar a propagação da doença, tornando o parasita avirulento. Por isso, são denominados de genes *avr* (avirulência) (Alfano e Collmer, 1996; Baker, 1997; Büttner e Bonas, 2006). Os genes bacterianos relacionados ao desenvolvimento de uma HR, em plantas não hospedeiras, e de patogenicidade, nos hospedeiros naturais, foram denominados “*hrp*” (*hypersensitive response and pathogenicity*) por Lindgren *et al.* (1986).



**Figura 3:** Hipótese de evolução conjunta da resistência de plantas a seus patógenos (figura adaptada de da Cunha *et al.*, 2006).

#### 1.4 PthAs: as principais proteínas de virulência de *Xac*

O gene de patogenicidade, *pthA*, é encontrado em todas as linhagens patogênicas de *Xanthomonas* (Cubero e Graham, 2002). A PthA é uma proteína requerida para que ocorra o aparecimento dos sintomas da doença do cancro cítrico em citros. A introdução de PthA em linhagens oportunistas de *Xac*, ou de média virulência em citros, conferiu a habilidade de induzir o cancro cítrico (Swarup

*et al.*, 1991). Esta proteína possui repetições quase idênticas de uma sequência de 34 aminoácidos em sua porção central, três sequências de sinalização para localização nuclear, e um domínio de ativação de transcrição na região C-terminal. O número de repetições e sua disposição dão à linhagem a especificidade aos seus hospedeiros (Marois *et al.*, 2002). Estas características estruturais sugerem que a PthA é transportada para o citoplasma do hospedeiro através do T3SS, e encaminhada ao núcleo, onde regula a expressão de genes que levam à HR ou à patogenicidade (Swarup *et al.*, 1992; Szurek *et al.*, 2002; Shiotani *et al.*, 2007).

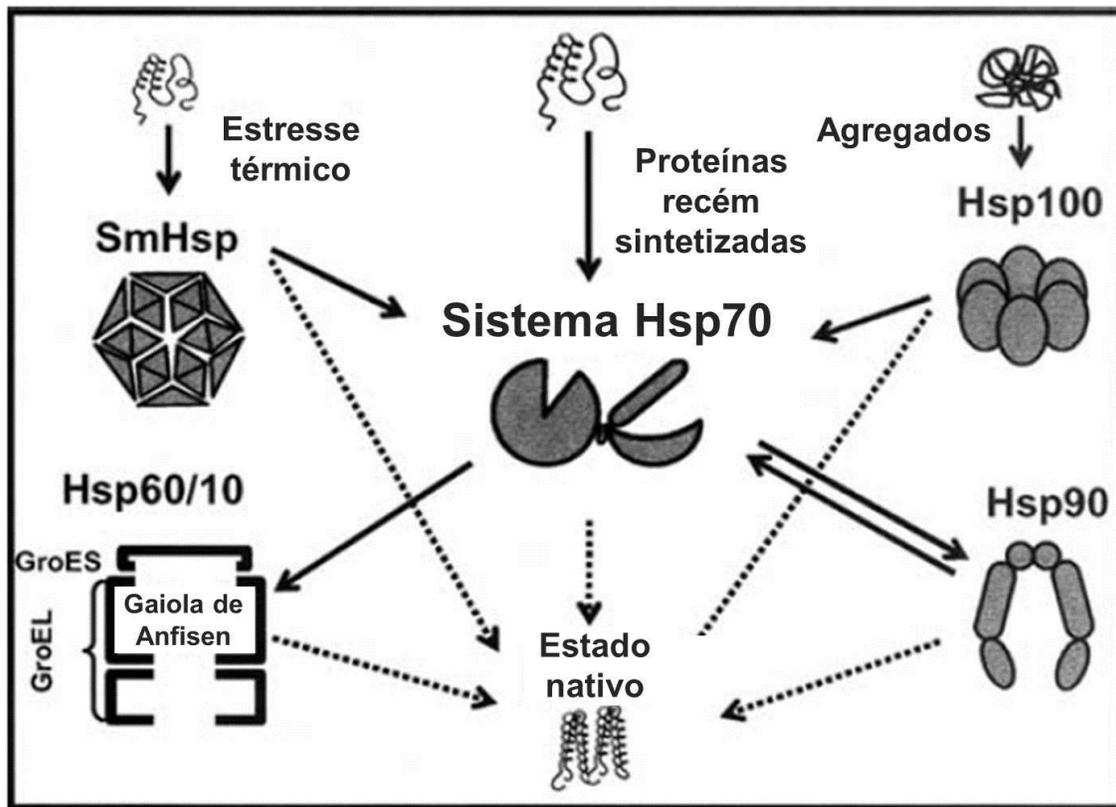
As proteínas secretadas por esses sistemas são endereçadas e introduzidas no canal de secreção parcialmente desenoveladas, devido à limitação de tamanho do canal (cerca de 20 Å), que é inferior à espessura de estruturas protéicas em seu estado enovelado, podendo causar, desta forma, a obstrução do canal (Feldman *et al.*, 2002). Uma vez dentro das células infectadas, estas proteínas efetoras devem se enovelar para que atinjam seu estado nativo, desempenhando assim, sua função na infecção. A célula infectada fornece toda a maquinaria de enovelamento para auxiliar a proteína efetora a se ativar em seu interior. Desta forma, é fundamental entender como estas proteínas se tornam ativas dentro das células do hospedeiro, e quais são as proteínas e complexos protéicos envolvidos neste processo.

### **1.5 Enovelamento de proteínas**

Enovelamento protéico refere-se ao processo em que as proteínas recém sintetizadas devem passar para adquirirem estrutura nativa. Para que as proteínas consigam desempenhar suas funções corretamente nas células, estas devem alcançar sua estrutura nativa após sua síntese. No meio intracelular, a concentração de macromoléculas é extremamente alta, chegando a cerca de 400 mg/ml (Ellis, 2001). Em um ambiente tão concentrado, o enovelamento das proteínas até sua estrutura nativa torna-se difícil, podendo levar ao enovelamento incorreto destas ou à formação de agregados protéicos inespecíficos, os quais estão relacionados a diversas doenças, como: mal de Parkinson, fibrose cística,

doença de Huntington, mal de Alzheimer, entre outras (Ruddon e Bedows, 1997; Beissinger e Buchner, 1998; Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Ramos e Ferreira, 2005).

Para contornar estes problemas, as células utilizam de um sistema bastante elaborado envolvendo proteínas capazes de auxiliar os polipeptídios recém sintetizados em seu enovelamento correto (Borges e Ramos, 2005; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011). Um breve esquema deste sistema pode ser visto na figura 4. Estas proteínas são chamadas de chaperonas moleculares, classicamente denominadas de proteínas de choque térmico (Hsps) por sua expressão aumentada em condições de estresse térmico, assim como em diversos tipos de estresse biótico e/ou abiótico (Albanèse *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Kubota *et al.*, 2010). Estas proteínas ainda recebem o auxílio de outras para desempenhar suas funções corretamente na via de enovelamento protéico, chamadas de cochaperonas (Taherian *et al.*, 2008; Johnson e Brown, 2009). Grande parte das Hsps são constitutivas nas células, e são normalmente denominadas e separadas em famílias de acordo com suas massas moleculares. Além de auxiliarem no enovelamento protéico (Martin e Hartl, 1997; Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Dickey *et al.*, 2007) as proteínas desta classe também tem suas funções associadas à recuperação de proteínas de agregados protéicos (Sanchez e Lindquist, 2000), translocação de proteínas através de membranas (Hartl e Hayer-Hartl, 2002), encaminhamento de proteínas à proteólise (Schirmer *et al.*, 1996; Connell *et al.*, 2001; Dickey *et al.*, 2007), entre outras.



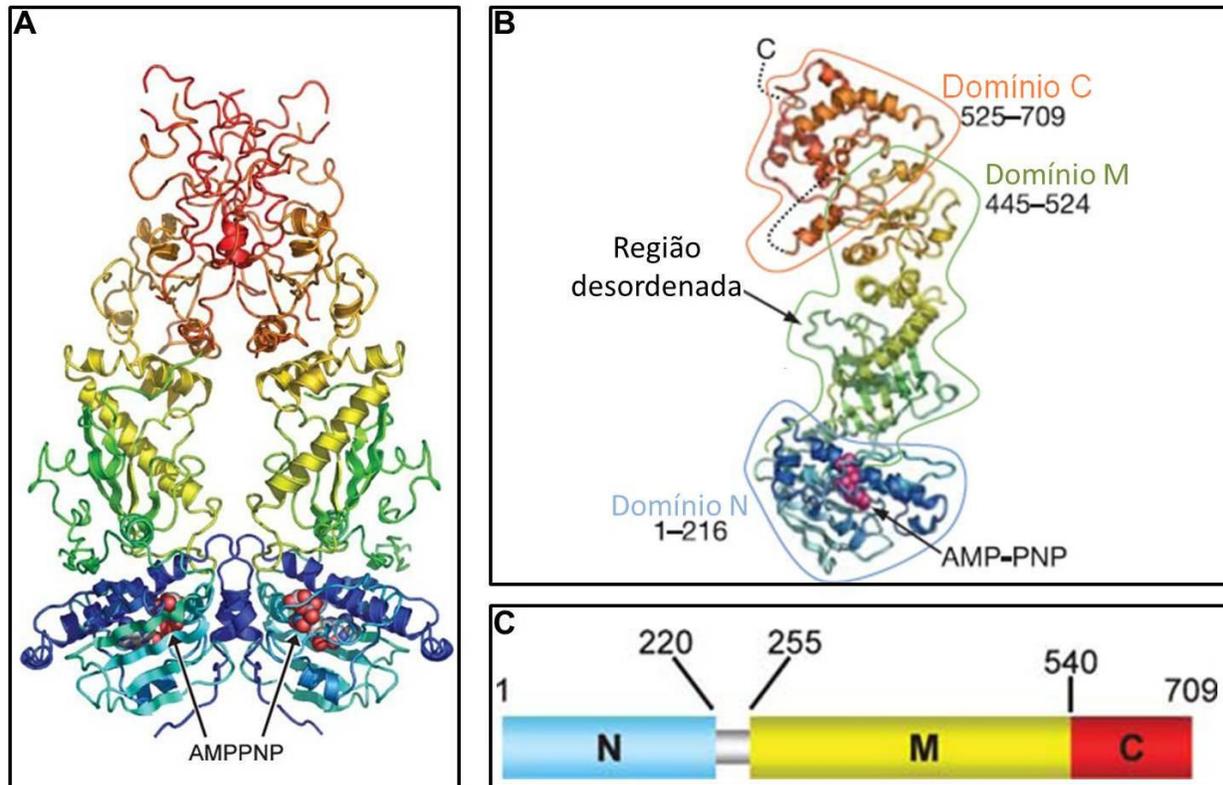
**Figura 4:** Principais vias de enovelamento proteico nas células (figura adaptada de Borges e Ramos, 2005)

### 1.6 Hsp90

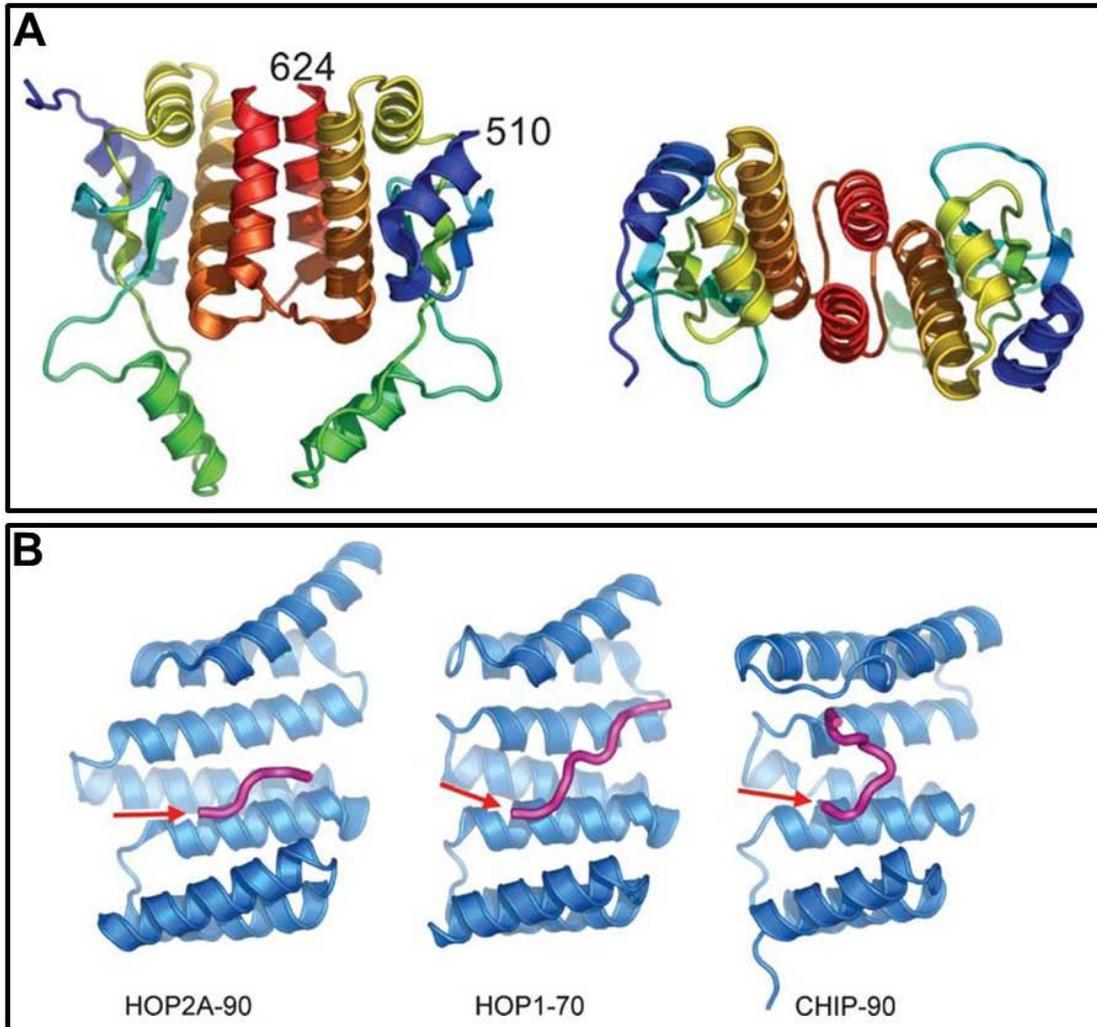
A Hsp90 pertence a uma família de chaperonas moleculares de aproximadamente 90 kDa. As sequências de nucleotídeos dos homólogos de *hsp90* são altamente conservadas em procariontes e eucariotes. É uma proteína abundantemente expressa em eucariotes superiores, nos quais já foi mostrado que é necessária para a viabilidade celular (Mitsui *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2008). Além disso, tem grande importância na manutenção da conformação, estabilidade e função de uma enorme variedade de proteínas envolvidas na transdução de sinais, ciclo celular e apoptose (Buchner, 1999; Young *et al.*, 2001; Pearl e Prodromou, 2001; Theyssen *et al.*, 1996). Esta proteína funciona como um homodímero, ao qual se associam co-chaperonas com a finalidade de enovelar e/ ou ativar diversas

proteínas, conhecidas como proteínas clientes, envolvidas em diferentes vias regulatórias da célula (Pearl e Prodromou, 2006; Brown *et al.*, 2007). Dentre estas proteínas clientes, estão presentes proteínas quinases, receptores nucleares de hormônios, fatores de transcrição, entre outras (Whitesell e Lindquist, 2005).

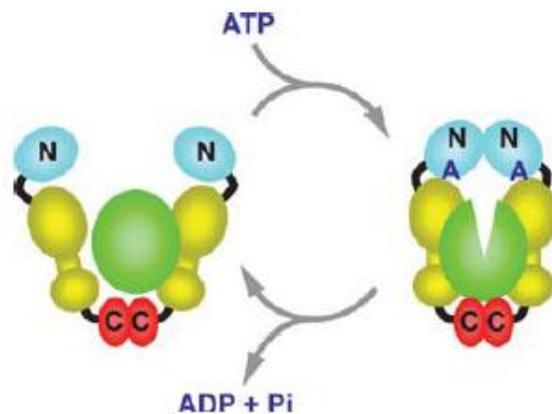
A Hsp90 se comporta essencialmente como um homodímero, com cerca de 170 kDa (o dímero), sendo cada monômero dividido em três domínios estruturais (Figura 5). O domínio C-terminal (resíduos 600-709 na Hsp82 de levedura) contém a interface de dimerização molecular, e possui o motivo MEEVD (Figura 6), responsável pela interação com cochaperonas que possuem o domínio TPR (*tetratricopeptide repeat*) (Pearl e Prodromou, 2000). A dimerização da Hsp90 é essencial para o desempenho de sua atividade biológica (Scheufler *et al.*, 2000; Brinker *et al.*, 2002; Onuoha *et al.*, 2008). O domínio central (resíduos 255-599 na Hsp82 de levedura) é considerado a principal região de interação com suas proteínas clientes. Este domínio está conectado ao domínio N-terminal por uma região altamente carregada. Finalmente, o domínio N-terminal (resíduos 1-220 em Hsp82 de levedura) possui um sítio de ligação a nucleotídeos responsável por uma fraca atividade da ATPase, o que provoca uma dimerização nesta região, ocasionando uma mudança de conformação fundamental para sua função (Figura 7).



**Figura 5:** Hsp90 de levedura e seus domínios internos. A Hsp90 encontra-se dimerizada em solução pela região C-terminal, ocorrendo também a dimerização no domínio N-terminal quando na presença de ATP ou algum análogo não clivável, como o AMPPNP (A). Em “C” pode-se ver mais detalhadamente quais as regiões da proteína se distribuem em cada um dos três domínios. Uma região carregada é observada entre os domínios N e M da proteína (figura adaptada de Ali *et al.*, 2006).



**Figura 6:** Domínio C-terminal para interação com domínio TPR de cochaperonas. A) Domínio C-terminal evidenciando as últimas hélices da estrutura. A última hélice (em vermelho) possui o motivo MEEVD, responsável pela interação com o domínio TPR das co-chaperonas (figura retirada de Ali *et al.*, 2006). B) Modelagens das interações dos domínios TPR (indicados pelas setas vermelhas) de três co-chaperonas de Hsp90 com o motivo MEEVD de Hsp90 localizado no domínio C-terminal (figura adaptada de Pearl e Prodomou, 2006).



**Figura 7:** Ciclo da atividade ATPase da Hsp90. A Hsp90 livre de nucleotídeos apresenta-se em uma conformação “aberta” com o domínio C-terminal (em vermelho) estando dimerizado. A ligação de ATP ao domínio N-terminal induz alterações conformacionais que resultam em uma conformação “fechada” da molécula (figura adaptada de Pearl e Prodomou, 2006).

Devido ao grande tamanho da Hsp90 e flexibilidade em algumas regiões, poucos estudos estruturais de alta resolução foram possíveis para a molécula de inteira. Vários estudos utilizam construções truncadas da Hsp90 para estudos estruturais (Harris *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2004; Sreeramulu *et al.*, 2009). Até o momento, apenas três homólogos de Hsp90 inteira tem sua estrutura resolvida: os homólogos citoplasmáticos HtpG, de *Escherichia coli*, e Hsp82 de levedura, e a Grp94 canina, um homólogo de retículo endoplasmático (Shiau *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2006; Dollins *et al.*, 2007). Mesmo assim, foram necessários alguns pequenos cortes de regiões muito flexíveis das estruturas da Hsp82 e da Grp94 para que estas pudessem ser cristalizadas. Estudos estruturais da Hsp90 inteira são importantes para uma melhor compreensão de seu funcionamento e dinâmica de interação no meio intracelular.

Muitos trabalhos recentes têm vinculado a Hsp90 ao desenvolvimento da resposta da planta a estímulos externos, mostrando um papel crucial da Hsp90 na resistência a doenças de plantas mediada por proteínas R. Em *Nicotiana*

*benthamiana*, foi visto que a interação entre a Hsp90 e a proteína fosfatase 5 (PP5), uma co-chaperona, era necessária para o enovelamento e o estabelecimento da atividade da proteína I-2 de resistência ao fungo patogênico *Fusarium oxysporum* (van Bentem *et al.*, 2005). Takahashi *et al.* (2003) examinou os efeitos da modulação da Hsp90 em *Arabidopsis thaliana* na sinalização de vias de resistência contendo os genes *rpm1* e *rsp2*. Foi observado que uma mutação em uma Hsp90 reduzia a resistência da planta mediada pelo gene *rsp2* de *A. thaliana* durante a infecção causada pelo patógeno. Outros trabalhos demonstraram que as resistências de *Nicotiana benthamiana*, mediadas pelos genes de resistência, *pto*, contra *Pseudomonas syringae*, *rx*, contra o vírus X de batata, e *n*, contra o vírus do mosaico do tabaco, eram todas dependentes da Hsp90 (Lu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Kanzaki *et al.*, 2003). Em 2007, Bhattarai mostrou que a Hsp90 também possui um papel fundamental na resistência da espécie de tomate *Solanum lycopersicum*, mediada pelo gene *mi-1*, a nematodos (*Meloidogyne spp.*), e insetos (*Macrosiphum euphorbiae* e *Bemisia tabaci*). Sangster e Queitsch (2005) sugeriram que a Hsp90 e sua co-chaperona RAR1 funcionem como ativadores da sinalização de proteínas R.

### **1.7 Co-chaperonas de Hsp90**

A Hsp90 recebe o auxílio de várias outras proteínas para o desempenho de suas funções dentro da célula. Estas proteínas são conhecidas como co-chaperonas que, juntamente com outras chaperonas e proteínas celulares, formam grandes complexos citoplasmáticos de controle de qualidade protéica. Dentre essas proteínas, a Hsp90 interage com diversas delas, como por exemplo, a Hsp40, Hop, p23, Cyp40 e HIP (Borges e Ramos, 2005; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011).

### 1.7.1 Ciclofilina

As ciclofilinas pertencem a uma família conservada de proteínas chamada de imunofilinas, presentes em todos os organismos. A ciclofilina A citosólica é amplamente conhecida e estudada por ser um alvo celular primário da droga imunossupressora ciclosporina A (Marks, 1996). As ciclofilinas possuem uma atividade peptidil prolil cis-trans isomerase, que acelera diretamente o enovelamento de proteínas por catalisar a isomerização das ligações peptídicas que precedem os resíduos de prolina (Fischer e Schmid, 1990). A ciclofilina A (CypA) e a ciclofilina 40 (Cyp40), são proteínas citosólicas que aparecem atuando como acessórias da Hsp90 na maquinaria de enovelamento de proteínas por chaperonas (Zhao e Houry, 2007). As ciclofilinas possuem o domínio TPR, que é responsável pela interação com o motivo MEEVD localizado no domínio C-terminal da Hsp90. As ciclofilinas estão relacionadas com resposta de plantas a ação de patógenos. Em estudos recentes, com *A. thaliana*, foi verificado que as ciclofilinas foram responsáveis pela ativação da AvrRpt2, uma proteína de avirulência de *P. syringae*, que era introduzida na célula vegetal através do T3SS, e enovelada dentro da própria célula hospedeira tornando-se ativa (Coaker *et al.*, 2005).

### 1.7.2 TDX

A proteína TDX é bastante similar à co-chaperona Hip (*Hsp70-interacting protein*), a qual coopera com diversas chaperonas em processos de enovelamento de cadeias polipeptídicas recém sintetizadas, e na regulação conformacional de moléculas de sinalização conhecidas por interagirem com Hsc70 (*70-kDa heat shock cognate protein*) (Irmer e Höhfeld, 1997). A TDX diferencia-se da Hip pela presença de um domínio tiorredoxina (TRX) em sua extremidade carboxi-terminal. Esta Hip com o domínio tiorredoxina (TRX) foi primeiramente identificada por Vignols e colaboradores (2003), quando descreveram um novo gene de *A. thaliana* que codificava uma proteína de 42 kDa composta por dois domínios, o domínio

TPR, no seu N-terminal, e um domínio tiorredoxina (TRX) no C-terminal, com função e parceiros de ligação semelhantes às da Hip. Esta proteína foi então denominada de TDX.

A TDX é conhecida por ser uma cochaperona de Hsp70, que atua no ciclo de ligação do ATP, sua hidrólise, e na reposição do ADP por ATP (Mayer, *et al.*, 2000; Borges e Ramos, 2005). Além disso, esta proteína possui uma atividade chaperona intrínseca, ligando especificamente a proteínas desoveladas e prevenindo a agregação destas (Höhfeld *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1997). A TDX, assim como algumas imunofilinas (Cyp40, por exemplo), e a co-chaperona Hop (*Hsp70 organization protein*), possui motivos TPR estruturalmente relacionados, mas sua interação com a Hsp70 ocorre próximo ao sítio de clivagem de ATP, diferentemente das outras cochaperonas que interagem por uma associação do TPR com os motivos MEEVD de Hsp90 e/ ou Hsp70 (Höhfeld *et al.* 1995; Carrelo, *et al.*, 2004).

## 2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo isolar uma Hsp90 de *C. sinensis* e caracterizar aspectos estruturais, dinâmicos e funcionais, além de tentar identificar um possível papel para esta proteína durante o processo infectivo causado pela *Xac* na planta.

Objetivos específicos:

- Clonar, expressar e purificar uma Hsp90 de *C. sinensis*.
- Caracterizar a conformação e dinâmica dessa proteína utilizando técnicas espectroscópicas e hidrodinâmicas.
- Analisar sua função *in vitro* na prevenção da agregação por temperatura de uma proteína-modelo.
- Identificar parceiros de interação da Hsp90 relacionados ao processo infectivo pela técnica de duplo-híbrido, e confirmar estas interações por ensaios de *pull-down*
- Caracterizar as proteínas parceiras de interação da Hsp90 encontradas

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Biblioteca de cDNA de *C. sinensis* e clones de *Xac***

A biblioteca de cDNA de *C. sinensis* foi feita no laboratório pelo grupo do Dr. Benedetti. Esta nos foi gentilmente cedida para a amplificação de sequências.

#### **3.1.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados**

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificar e sequenciar a sequência da Hsp90 de *C. sinensis* foram desenhados utilizando o programa Gene Runner 3.01 a partir da sequência da Hsp82 de *Saccharum officinarum* (cana de açúcar), a qual já havia sido clonada previamente em nosso laboratório. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da sequência da XACb0010 de *Xac*, assim como os utilizados para a Hsp90 de *C. sinensis* estão listados na tabela 1.

**Tabela 1: Iniciadores desenhados para clonagem e sequenciamento dos genes de interesse**

Nome do oligonucleotídeo	ORF amplificada	Sequência do oligonucleotídeo	Temperatura de anelamento utilizada	Sítios de enzimas de restrição utilizados
HSP90-F2	Hsp90 de laranja	5'- GGA TCCCAT ATG GCA TCA GAG ACA GAG AC -3'	63°C	<b>Bam HI</b> / <b>Nde I</b>
HSP90-R1		5'- GCG GCC GCT TAA TCA ACT TCC TCC ATC -3'	63°C	<b>Not I</b>
HSP90MF	Região central da Hsp90 de laranja	5' - GATCAAGGAGGTGTCCC - 3'	50°C	-
HSP90MR		5' - GGGAGTTCTCAACAGCC - 3'	50°C	-
Xacb0010-F	XACb0010	5' - GAATTCATATG GCAAGGTCCGGG - 3'	55°C	<b>Eco RI</b> / <b>Nde I</b>
Xacb0010-R		5' - GAGCTC TCATTTGCCTGCCGG - 3'	55°C	<b>Sal I</b>

### 3.1.3 Vetores utilizados

#### 3.1.3.1 Vetores de clonagem

Para clonagem dos produtos de PCR dos cDNAs produzidos a partir de oligonucleotídeos flanqueados para os sítios de restrição adequados, foi utilizado o vetor pGEM-T easy<sup>®</sup> (Promega), e pCR<sup>®</sup>II (Invitrogen). O produto de PCR gerado pela maior parte das DNA polimerases termoestáveis utilizadas em biologia molecular, apresentam uma base não pareada em ambas as extremidades. Essas polimerases adicionam uma deoxiadenosina, de forma independente de molde, nas extremidades 3' do fragmento amplificado (Clark, 1988). Baseando-se nisso, os vetores de clonagem utilizados são construídos adicionando uma timina em ambas as extremidades 3' de sua sequência. Estes vetores plasmidiais encontram-se linearizados em solução. Esta timina não pareada na região 3' do vetor caracteriza a região de inserção do fragmento desejado, aumenta a eficiência de ligação do produto de PCR.

### 3.1.3.2 Vetores de expressão

Para a expressão da proteína de interesse fusionada a uma cauda de histidina, o fragmento de DNA que codifica a proteína de interesse foi subclonado no vetor de expressão pET28a (Novagen). Estes vetores estão sob o controle do sistema T7, no qual o fragmento de DNA alvo é clonado sob o controle do promotor do gene 10 do bacteriófago T7 (Studier e Moffatt, 1986). A expressão do gene alvo ocorre somente na presença da RNA polimerase desse vírus, devido à especificidade do promotor. A cepa BL21(DE3) possui, integrado ao seu genoma, o prófago do bacteriófago T7, que é lisogênico. Neste prófago, a expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do promotor lacUV5 do operon *lac*, que é mantido reprimido na presença de glicose e na ausência de seu indutor natural a 1,6 aldolactose, um derivado da galactose. O produto do gene *lac I* representa o repressor que, quando ligado ao operador presente no prófago do T7, impede a expressão da T7 RNA polimerase e, conseqüentemente, a transcrição do gene alvo. Porém, na presença de IPTG (isopropil- $\beta$ -D tiogalactopiranosídeo), um análogo do indutor natural (1,6-aldolactose), o repressor se desligará do operador liberando a expressão da T7 RNA polimerase do bacteriófago T7. Esta, por sua vez, irá atuar na transcrição do gene alvo clonado no vetor do sistema pET (Studier *et al.*1990). Como a T7 RNA polimerase é cinco vezes mais eficiente que a RNA polimerase da *E. coli*, e por ser produzida em grandes quantidades, em pouco tempo todo o produto protéico sintetizado pela bactéria será, praticamente, apenas o codificado pelo fragmento de DNA clonado. Assim, na presença da RNA polimerase do bacteriófago T7, o gene de interesse é transcrito em altas taxas, resultando em grande quantidade do produto protéico. Outra vantagem desse promotor é sua especificidade, ou seja, a RNA polimerase da *E. coli* não transcreve o fragmento clonado, o que permite controlar o momento exato em que ele será expresso (Studier e Moffatt, 1986). Em cada extremidade do sítio de clonagem múltipla do vetor pET28a, existe uma sequência de nucleotídeos que codifica para 20 aminoácidos, dentre eles, seis histidinas que poderão ser adicionadas à extremidade amino-terminal e/ou carboxi-terminal (cauda de poli-histidina), dependendo da estratégia de clonagem. A adição desta sequência de histidinas

permite a purificação do polipeptídeo, através de cromatografia de afinidade em coluna contendo íons de níquel, uma vez que a sequência de histidinas confere à proteína afinidade a este tipo de coluna.

O vetor pET-TEV e pET-GST-TEV também foram utilizados para expressão. Estes são variações do vetor pET28a alterando apenas o sítio de clivagem por protease para a liberação da cauda utilizada (sítio para TEV no lugar do sítio de trombina, presente no pET28a). No caso do pET-GST-TEV, além do sítio para protease, também foi alterada a proteína de fusão, trocando a cauda de poli-histidina por uma glutatona S-transferase (GST).

### **3.1.3.3 Vetores de duplo-híbrido**

Para a realização dos ensaios de duplo-híbrido, foram utilizados os vetores pOBD e pCOBD, como vetores isca, e pOAD, como vetor presa. Os vetores de duplo-híbrido pOAD; contendo o domínio de ativação de GAL4 e pOBD; contendo o domínio de ligação ao DNA de GAL4 (Uetz *et al.*, 2000), que nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Stan Fields da Washington University, foram modificados substituindo-se o gene de resistência a ampicilina (*bla*) pelo gene de resistência a cloranfenicol (*cm*) para que fossem produzidos os vetores pCOAD e pCOBD (Khater, 2006. Tese). Os sítios de restrição para as enzimas *Nde* I e *Not* I foram adicionados ao sítio múltiplo de clonagem dos vetores pOAD e pOBD, para facilitar as clonagens.

### **3.1.4 Linhagens de *E. coli* utilizadas**

A linhagem DH5 $\alpha$  foi utilizada para a multiplicação e a manutenção de vetores plasmidiais. A linhagem DH10b foi utilizada para a multiplicação de vetores plasmidiais após extração destes de levedura. A linhagem BL21(DE3) possui baixos níveis de produção de proteases, que poderiam degradar a proteína de interesse, e

possui ainda o gene (DE3), responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase controlado pelo promotor lacUV5 e ativado pela adição de IPTG.

A linhagem BL21 (DE3) pRARE, além das características descritas para a BL21 (DE3), apresenta o vetor pRARE, que contém os genes dos tRNAs para os códons AGG (arginina), AGA (arginina), AUA (isoleucina), CUA (leucina), CCC (prolina), e GGA (glicina), suplementando a bactéria com estes, para o reconhecimento de tais códons raros durante a expressão de proteínas.

A cepa de *E. coli*, KC8 possui mutações nos genes *leuB*, *trpC*, e *hisB*, conferindo marcas de seleção auxotróficas para leucina, triptofano e histidina. Estas deficiências podem ser sanadas pela suplementação por transformação com plasmídeos que contém o alelo selvagem dos genes análogos de levedura *leu2*, *trp1*, e *his3*. Desta forma, esta cepa pode ser utilizada no resgate seletivo, a partir de clones positivos cotransformados, dos plasmídeos fusionados tanto ao domínio de ativação, quanto ao domínio de ligação a DNA, utilizados em sistema de duplo-híbrido. As bactérias KC8 transformadas com o plasmídeo de interesse podem ser selecionadas por plaqueamento em meio mínimo M-9, na ausência do nutriente apropriado (leucina ou triptofano, por exemplo).

### **3.1.5 Linhagem de *S. cerevisiae* utilizada**

A cepa PJ69-4A *MATa* (*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2:GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2:GAL7-lacZ*) (James *et al.*, 1996) foi usada para transformações com a biblioteca de cDNA de *C. sinensis*.

### **3.1.6 Tampões e soluções utilizadas**

- Tampão de amostra para DNA: azul de bromofenol 0,25%;sacarose 40%.
- Tampão TBE: Tris-Borato 45 mM; EDTA 1 mM pH 8,0.
- Tampão de amostra de SDS-PAGE: Tris-HCl 50 mM pH 6,8; DTT 100 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 10%.

- Tampão de lise bacteriana: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 100 mM; EDTA 1 mM pH 8,0.
- Solução de lavagem do precipitado (PWS): Uréia 1 M; Triton X-100 1%.
- Tampão de transformação I: KOH 30 mM; ácido acético 30 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; RbCl<sub>2</sub> 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 13 mM; glicerol 13,5% (v/v); pH 5,8.
- Tampão de transformação II: MOPS (Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) 0,084 g/l; CaCl<sub>2</sub> 100 mM; RbCl<sub>2</sub> 10 mM; glicerol 13,5% (v/v); pH 7,0.
- Solução P1 para extração de DNA: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; pH 8,0.
- Solução P2 para extração de DNA: NaOH 200 mM; SDS 1%.
- Solução P3 para extração de DNA: 60 ml de acetato de potássio 5 M; 11,5 ml de ácido acético; 28,5 ml de água.
- Stet Tween-20: para 40 ml: 2,2 g de Tween; 800 µl de NaCl 5 M; 88 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0; 640 µl Tris-HCl pH 8,0.
- MW Tween-20: 40 ml de solução Stet Tween-20: 20mg de lisozima; 960µl de RNase 10 mg/µl.
- Tampão de resgate: Tris-Cl 50 mM pH 7,5; EDTA 10mM; β-mercaptoetanol 0,3%.
- Solução de lise de levedura: 2 mg/ml de zymoliase; 0,2 mg/ml de RNase, em tampão de resgate
- Corante Comassie-Blue: 2,5 g/l de Comassie brilliant blue R250; (1:2) etanol absoluto: água MilliQ; 50 ml de ácido acético glacial em 1 L.
- Solução descorante: etanol absoluto: água MilliQ - 1:2; 50 ml de ácido acético glacial em 1 L.
- Novobiocina: 1 mg/ml em H<sub>2</sub>O MilliQ; Massa molar = 612,624 g/ mol.
- 5 x M-9 salts: 64 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 g de NaCl; 5 g de NH<sub>4</sub>Cl, para 1 l de uma solução. Autoclavado.
- Tampão A: 20 mM de Tris-HCl; 200 mM de NaCl; 15 mM de Imidazol, pH = 7,4.
- Tampão B: 20 mM de Tris-HCl; 200 mM de NaCl; 500 mM de Imidazol, pH = 7,4.

- Tampão B-glutationa: 50 mM Tris-HCl; 10 mM Glutationa reduzida, pH = 8,0.
- Tampão GF: 20 mM de Tris-HCl; 200 mM de NaCl, pH = 7,4.
- Tampão para experimento de atividade chaperona: 40mM Hepes buffer, pH 7,5.
- Z-buffer: 16,1 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,5 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,75 g de KCl; 0,246 g de MgSO<sub>4</sub>, para volume final de 900 ml, diluído em H<sub>2</sub>O. O pH foi ajustado para 7,0.
- Tampão de transferências: 48 mM de Tris-HCl; 39 mM de glicina; 0,037% de SDS e 20% de metanol.
- Tampão de CD para a pthA2: 10 mM de Tris-HCl; 50 mM de NaCl; 0,1% de glicerol, pH = 7,4.
- Tampão TBS: 20 mM de Tris-HCl; 150 mM de NaCl, pH = 7,5.
- Solução de bloqueio: 5% de leite em pó desnatado em tampão TBS1 X.
- Tampão de ressuspensão: 50 mM de Hepes; 0,5 M de NaCl; 1mM de PMSF; 5mM de DTT, pH = 7,5.
- PBS: 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mM de KCl; 137 mM de NaCl, pH = 7,4.
- Tampão de solubilização: 50 mM de Hepes; 200 mM de NaCl; 6M de Guanidina-HCl; 25mM de DTT, pH = 7,5.
- Tampão de reenovelamento: 50 mM de Hepes; 200 mM de NaCl; 1mM de DTT, pH = 7,5.

### **3.1.7 Meios de cultura**

Os protocolos descritos abaixo são modificações dos apresentados por Sambrook *et al.*, 1989. O meio de cultura LB (Luria-Bertani) foi utilizado para o crescimento de bactérias, preparação de células competentes, expressão de proteínas e manutenção de bactérias transformadas com o vetor de interesse. Composição: triptona 10g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Para o meio sólido (LB/Ágar) foi acrescentado 15 g/L de ágar.

O meio de cultura LBON (Luria-Bertani sem NaCl) foi utilizado para o crescimento celular de *Xac*. Composição: triptona 10 g/L e extrato de levedura 5 g/l. Para o meio sólido foi acrescentado 15 g/L de ágar.

O meio de cultura SOC foi utilizado para crescimento de células transformadas por choque térmico. Composição: triptona 20 g/l, extrato de levedura 5g/l, NaCl 10 mmol/l, KCL 2,5 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/l, MgSO<sub>4</sub> 10 mmol/l e Glicose 20 mmol/l. A glicose foi acrescentada, após a autoclavagem do restante dos reagentes, a partir de uma solução estoque 1 mol/l filtrada (filtro 22 µM).

O meio 2TY foi utilizado para preparação de células competentes por cloreto de cálcio. Composição: 16 g/l de triptona; 5g/l de NaCl; 10 g/l de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 5 M.

O meio TB (*Terrific Broth*) foi utilizado para crescimento de células transformadas por choque térmico. Composição: 12 g/l de triptona, 24 g/l de extrato de leveduras.

O meio de cultura PSI foi utilizado na preparação de bactérias competentes por choque térmico. Composição: peptona 16 g/l, extrato de levedura 10 g/l, NaCl 5 g/l, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g/l e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g/l, pH 7,6 com NaOH 5 M.

O meio de cultura YAPD foi utilizado para o crescimento celular de leveduras para o duplo-híbrido. Composição: extrato de levedura 10 g/l; peptona 20 g/l; glicose 20 g/l; adenina 100 mg; ágar bacteriológico 16 g/l (para meio sólido). O pH foi ajustado para 5,6 com NaOH 5 M.

O meio de cultura SC drop-out (*Synthetic Complete Drop Out Medium*) foi utilizado como meio mínimo durante o ensaio de duplo-híbrido. Neste meio, foram adicionados todos os aminoácidos essenciais, retirando apenas os aminoácidos referentes às marcas de seleção presentes (SC-trip = meio SC sem triptofano; SC-WL = meio SC sem triptofano e leucina; SC-WLH = meio SC sem triptofano, leucina e histidina; SC-leu = meio SC sem leucina; SC-A = meio SC sem adenina; SC-WA = meio SC sem triptofano e adenina; SC-LA = meio SC sem Leucina e adenina; SC-

WLA = meio SC sem triptofano, leucina e adenina). Composição: base de nitrogênio sem aminoácidos 6,6 g/l; glicose 20 g/l; mistura de aminoácidos 0,83 g/l; ágar bacteriológico 16 g/l(ágar para meio sólido). O pH foi ajustado para 5,6 com NaOH 5 M.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)**

Para as amplificações por PCR, foram utilizados os kits PCR SuperMix<sup>®</sup> (Invitrogen), PCR MasterMix<sup>®</sup> (Eppendorf), uma DNA Polymerase *Pfu* Turbo<sup>®</sup> (Stratagene), e uma *Taq* DNA Polymerase Platinum<sup>®</sup> High Fidelity (Invitrogen), de acordo com os protocolos dos fabricantes. A reação foi realizada no termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied biosystem), com temperatura de 95°C por 5 min, para o desenovelamento inicial do DNA molde. Esse passo foi procedido de 25 a 30 ciclos de desenovelamento do DNA molde a 95°C por 1 min, anelamento dos primers ao DNA molde por aproximadamente 90 s, e extensão da nova fita pela DNA polimerase a 72°C. Foi escolhida a temperatura de anelamento de 50°C para as reações. Na etapa de extensão (temperatura de 72°C), o tempo foi determinado a partir do tamanho do fragmento de interesse, utilizando 2min para a amplificação da Hsp90 de *C. sinensis*. Finalmente, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C, assegurando que a última população de novas fitas seja inteiramente sintetizada. A temperatura da reação foi, então, diminuída para 4°C, podendo ser armazenada.

#### **3.2.1.1 PCR de colônia**

Com o intuito de fazer uma identificação rápida dos clones positivos e negativos após transformação bacteriana, foi utilizada a técnica de PCR de colônia. Para isso, uma colônia de bactéria foi coletada com o auxílio de palitos de madeira estéreis e dissolvidas em 10 µl de água MilliQ estéril. A solução foi diluída na razão de 1:20. Esta solução diluída foi fervida a 95°C por 10 min e 1 µl desta diluição foi então

adicionada a uma reação de PCR no lugar do DNA molde. A reação seguiu como descrito no tópico 3.2.1 acima.

### **3.2.2 Eletroforese em gel de agarose**

O DNA foi analisado por eletroforese (sistema Horizon<sup>®</sup> 58 – Life Technologies) em gel de agarose 1% contendo 10 mg/ml de agarose dissolvida em 100 ml de tampão TBE. Depois de aplicado no gel, o DNA foi submetido a uma voltagem inicial de 60 Volts por aproximadamente 15 min, aumentando logo depois para 85 Volts, por aproximadamente 30 min. Em seguida o gel foi incubado em tampão TBE, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, por 30 min, e visualizado no transluminador de UV T1202 (Sigma<sup>™</sup>). Utilizamos a câmera digital DC120 (Kodak<sup>™</sup>) acoplada a um computador contendo o programa EDAS120 (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 – Kodak) para o registro das imagens.

### **3.2.3 Determinação da concentração de DNA**

A determinação da concentração de DNA foi feita através da comparação entre a intensidade da banda de DNA marcada com brometo de etídeo e a intensidade das bandas dos marcadores de DNA utilizados, como indicado pelos fornecedores. Para medições mais precisas, a concentração de DNA foi obtida com o auxílio de um espectrofotômetro V-530 UV/VIS (Jasco). Para isso, a amostra do DNA foi diluída de acordo com a intensidade da banda em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A absorbância da amostra foi medida à 260 nm. Para estimar a concentração de DNA, foi utilizada a equação de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l} \quad (1)$$

Onde  $C$  é a concentração em M,  $A$  é absorvância,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar em  $M^{-1} \times cm^{-1}$ , e  $l$  é a comprimento do caminho óptico, em cm. Para amostras de DNA dupla-fita, o  $\epsilon$  utilizado foi de  $0,02 M^{-1} \times cm^{-1}$ . Em seguida, o resultado foi multiplicado pelo fator de diluição utilizado, para se obter a concentração do DNA na solução concentrada.

### **3.2.4 Clonagens**

#### **3.2.4.1 Clonagem em pCR II**

As clonagens no vetor pCR II foram realizadas com o kit de clonagem TA Cloning<sup>®</sup> Kit Dual Promoter (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de ligação continha 1  $\mu$ l do produto de PCR (aproximadamente 300ng de DNA), 2  $\mu$ l do vetor (60ng de DNA), 1  $\mu$ l de 5X tampão de ligação, fornecido pelo fabricante, e 1  $\mu$ l de T4 DNA Ligase.

#### **3.2.4.2 Clonagem em pGEM-T easy**

As clonagens no vetor pGEM-T easy foram realizadas com o kit de clonagem pGEM-T easy<sup>®</sup> (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de ligação apresentava 3  $\mu$ l do produto de PCR (aproximadamente 250 ng de DNA), 1  $\mu$ l do vetor (50ng de DNA), 5  $\mu$ l de 2X tampão de ligação rápida, fornecido pelo fabricante, e 1  $\mu$ l de T4 DNA Ligase

#### **3.2.4.3 Sub-clonagem em pET-28a**

O fragmento de DNA subclonado no vetor de transferência (pGEM-Teasy ou pCR II) e o vetor pET-28a foram digeridos com pares de enzimas de restrição específicos para cada caso. Após este procedimento, vetor e fragmentos foram

utilizados para a reação de ligação: 2 µl do vetor pET-28a digerido com o mesmo par de enzimas, 10 µl do fragmento de DNA extraído, 2 µl tampão da T4 DNA Ligase (10X), 1 µl de T4 DNA Ligase (USB) (1 U/µl), e 5 µl de água estéril. Esta reação foi incubada a 4°C por aproximadamente 48 h.

#### **3.2.4.4 Sub-clonagem em pCOBD e pOBD**

Tanto o vetor de clonagem, que apresentava o fragmento de DNA de interesse, quanto o vetor de expressão (aproximadamente 1 µg cada), foram submetidos à digestão com as respectivas enzimas – conforme o protocolo do fabricante. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. As bandas, correspondentes ao fragmento de interesse e ao vetor de expressão digerido com as duas enzimas, foram extraídas do gel e purificadas usando o Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorff) – conforme o protocolo do fabricante. Após a purificação, inserto e vetor digeridos foram quantificados. Em seguida foram incubados, por aproximadamente 48 h a 4°C: aproximadamente 600 ng de inserto, em torno de 50 ng de vetor digerido e, a enzima T4 DNA ligase (USB).

#### **3.2.5 Obtenção de bactérias competentes para transformação por choque-térmico**

A cepa de interesse foi pré-inoculada em 5 ml de meio PSI e crescida por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado em 200 ml de meio PSI, e incubado a 37°C, 200 rpm até a cultura atingir  $A_{600nm}$  (absorvidade) igual a 0,6. A cultura foi então centrifugada a 4000 rpm (rotor F45-30-11 - Eppendorf), por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 25 ml de tampão de transformação I e deixado em gelo por 15 min. As bactérias foram então centrifugadas a 4000 rpm, 4°C, por 15 min; o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 8 ml de Tampão de

transformação II. As células foram alíquotadas em tubos de micro centrífuga de 1,5 ml, contendo 100 µl cada alíquota, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As alíquotas foram armazenadas a -80°C.

### **3.2.6 Obtenção de células eletro-competentes**

A cepa de interesse foi pré-inoculada em 20 ml de LB e incubada sob agitação ON. O pré-inóculo (5 ml) foi diluído em 500 ml de meio LB e as células novamente incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm até a  $A_{600nm} = 0,5 - 0,7$ . As células foram armazenadas em banho de gelo por 20 min e centrifugadas por 15 min a 15000xg, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 ml de glicerol 10% gelado. Esta operação foi repetida três vezes, com ressuspensão em 250 ml, seguida pela ressuspensão em 20 ml, e finalmente em 2 ml de glicerol 10%. As células foram armazenadas em alíquotas de 100 µl a -80°C.

### **3.2.7 Transformação por eletroporação**

As transformações de bactérias pelo método de eletroporação, utilizando o eletroporador MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad), foram realizadas conforme protocolo do fabricante.

### **3.2.8 Extração do DNA plasmidial**

#### **3.2.8.1 Protocolo de lise alcalina**

A extração de DNA plasmidial foi realizada através do método de lise alcalina em pequena escala (alterado de Sambrook *et al.*, 1989). Neste protocolo, 5 ml de cultura de bactérias em meio LB foram precipitados em tubo de micro centrífuga de 2 ml por centrifugação a 13.500 rpm (rotor EE30 - Eppendorf). O sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foram adicionados 300 µl da solução P1 acrescidos de

5 µl de RNase a 10 mg/ml. O precipitado foi ressuspenso em vortex e então, adicionados 300 µl da solução P2. A solução foi, em seguida, misturada por inversão. Por fim, 300 µl da solução P3 gelada, foram adicionados e, novamente, o conteúdo do tubo foi misturado por inversão. A solução foi centrifugada a 14000 rpm, 4°C por 10 min. Do sobrenadante, 800 µl foram transferidos para um tubo novo de micro centrífuga de 2 ou 1,5 ml contendo 400 µl de isopropanol. A solução foi misturada por inversão e centrifugada a 14000 rpm, em temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e ao precipitado, foram adicionados 700 µl de etanol 70% gelado. A solução foi, novamente, misturada por inversão, e centrifugada a 14000 rpm, 4°C durante 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o tubo foi deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min para secagem do etanol. O precipitado de DNA foi então ressuspenso em 40 µl de água MilliQ e armazenado a -20°C.

### **3.2.8.2 Extração por fervura**

Este protocolo foi utilizado para a extração de DNA plasmidial de bactérias durante os ensaios de duplo-híbrido. Neste protocolo foram utilizadas para as amostras, placas de 96 poços utilizadas em testes de ELISA. As amostras foram centrifugadas por 8 min, 2700 rpm (rotor A-4-62 - Eppendorf) a 20°C, para precipitar as bactérias. Enquanto isso, a solução Stet Tween-20 foi preparada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram invertidas sobre papel toalha por 5 min. As células foram ressuspenso em 25 µl de água MilliQ autoclavada, vortexando até total ressuspenso. Foram adicionados 70 µl da solução MW Tween-20. Em seguida, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Seu conteúdo foi fervido em forno microondas na potência máxima por 3 min, girando as placas para haver aquecimento homogêneo. Imediatamente após a fervura, 300 µl de água MilliQ foram adicionados em cada poço, sendo as placas vortexadas por 30 s. Estas foram então colocadas em gelo por 10 min. Por fim as placas foram centrifugadas durante 30 min, 4000 rpm (rotor A-4-62 Eppendorf) a

20°C. Setenta microlitros do sobrenadante dos poços foram transferidos para placas de ELISA. Este DNA foi mantido a -20°C.

### **3.2.8.3 Extração de DNA plasmidial de leveduras**

Para extração de DNA de 96 clones independentes, foi utilizado um método em placas de 96 poços (COSTAR, “assay block”, cat No. 3960), as quais foram inoculadas com colônias His+/Ade+ em meio seletivo SC-leu. As placas foram incubadas a 30°C, sob agitação (300 rpm) por 48h. Após este procedimento, estas foram centrifugadas a 2700 rpm (rotor A-4-62 Eppendorf), 4°C durante 5 min e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com o auxílio de vortex, no volume residual do meio de cultura. A esta suspensão, foi adicionado 1 ml de tampão de resgate. As placas receberam agitação em vortex. As células novamente centrifugadas durante 5 min, 2700 rpm a 4°C, e ressuspensas em 25 µl de solução de lise de levedura. O conjunto foi incubado a 37°C por 1 h. Foram então adicionados 25 µl de SDS (10%) a cada poço das placas, incubando-as a temperatura ambiente por 5 min após agitação em vortex. Posteriormente, 100 µl de acetato de potássio 3 M foram adicionados à placa, a qual foi acondicionada em freezer -80°C por 15 min. Após o congelamento e descongelamento, a placa foi centrifugada a 4000 rpm (rotor A-4-62 Eppendorf) por 15 min a 4°C e 120 µl do sobrenadante foi transferido para placa MicroAmp (Applied Biosystem, cat No. N801-0560).

O DNA foi precipitado com a adição de 84 µl de isopropanol ao sobrenadante. A placa recebeu agitação em vortex e foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. Esta foi, então, centrifugada a 4000 rpm (rotor A-4-62 Eppendorf) por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol (70%). O precipitado foi ressuspensado em 20 µl de água MilliQ e usado na transformação de células de *E. coli* da linhagem DH10b, para a obtenção dos vetores para sequenciamento.

### **3.2.9 Transformação de bactérias competentes por choque-térmico**

Nas transformações de bactérias competentes por choque térmico, cerca de 200 ng de DNA foram incubados em um tubo de micro centrifuga, contendo 100 µl de bactérias competentes, por 30 min em gelo. O tubo foi então transferido para um banho-maria a 42°C por 1 min e 30 s e imediatamente recolocado no gelo por mais 2 min. Foram adicionados então 900 µl de meio SOC. A solução foi incubada a 37°C, 200 rpm por 1 h. Finalmente, cerca de 200 µl da transformação foram plaqueados em meio LB sólido contendo o antibiótico seletivo. No caso da transformação em cepa DH5α com os vetores de transferência pCR II e pGEM-T easy, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB/Ágar contendo IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo), além do antibiótico.

### **3.2.10 Preparação de células competentes e transformação por cloreto de cálcio**

Para o preparo das células competentes (DH10b), uma cultura de bactérias foi colocada sob agitação em 5 ml de meio 2TY por 12 h a 37°C, 200 rpm. Um mililitro deste pré-inóculo foi transferido para 100 ml de meio 2TY até atingir  $A_{600nm}$  igual a 0,6. A cultura foi centrifugada por 5 min a 4000 rpm (rotor A-4-62 Eppendorf), 4°C, e ressuspendida em 50 ml de cloreto de cálcio (100mM). A solução foi então centrifugada novamente nas mesmas condições e ressuspendida em 10 ml da mesma solução. As células em solução foram divididas em alíquotas de 100 µl, partindo imediatamente para a transformação. Para a transformação de uma alíquota, foram usados 5 µl de DNA dos clones His+/Ade+, distribuídos em placa MicroAmp. As placas foram levadas ao vortex, e incubadas em gelo por 30 min. Logo em seguida, as células foram submetidas a um choque-térmico a 42°C por 120 s, seguidos por mais 2 min no gelo. Após isso, 20 µl das culturas foram transferidas para uma placa Deep Well de 96 poços (COSTAR), contendo 400 µl de meio 2TY e incubadas a 37°C por 40 min. Após este período, a cultura foi

centrifugada, e ao precipitado foi adicionado 1ml de meio TB + 110 µl de tampão fosfato + 1,1 µl de carbenicilina (200µg/ml) + 0,8 µl de glicerol 50% em cada um dos poços da placa COSTAR, para crescimento dos clones a 37°C (300 rpm) por 24 h. O plástico que protege a cada poço foi furado para aeração.

### **3.2.11 Seleção de clones transformados**

A seleção dos clones transformados foi feita através da análise de clivagem do DNA plasmidial pelas enzimas adequadas, utilizando as especificações do fabricante de cada enzima. As transformações provenientes de ligações em vetores de transferência (pCR II e pGEM-T easy) possuem um passo anterior de seleção dos clones positivos, que facilita o isolamento de clones contendo o fragmento desejado inserido no vetor. Nesse caso, a seleção dos clones transformados foi feita primeiramente através da coloração das colônias. Isso por que a enzima  $\beta$ -galactosidase cliva o X-gal, que é um análogo da galactose, liberando um composto de coloração azul. Quando o fragmento de interesse é inserido no vetor, ele interrompe o gene da  $\beta$ -galactosidase, não havendo, deste modo, a clivagem do X-gal, resultando na coloração branca da colônia.

### **3.2.12 Sequenciamento de DNA**

A reação de PCR, para sequenciamento de clones, foi feita utilizando-se o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer) e foi conduzida em termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystem). O sequenciamento foi realizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) utilizando um sequenciador automático 377 ABI Prism (Perkin Elmer).

### **3.2.13 Expressão de proteínas recombinantes em bactérias**

O sistema de expressão utilizado para a produção das proteínas recombinantes foi o sistema pET, descrito por Studier *et al.* (1986). As bactérias, transformadas

com o plasmídeo contendo o fragmento de DNA que codifica a proteína de interesse, foram incubadas em meio de cultura LB contendo 30 µg/ml de canamicina, sob agitação constante de 200 rpm a 37°C (Orbital Shaker – Forma Scientific). Este crescimento foi monitorado até que a  $A_{600nm}$  atingisse entre 0,6 e 0,8. Atingida esta fase de crescimento, foi adicionado IPTG na concentração final entre 0,4 e 1,0 mmol/L à cultura de células, induzindo, desta forma, a expressão da proteína recombinante. Para determinar o melhor tempo de indução para cada proteína recombinante, 50 ml de cultura de células foram induzidos nas condições descritas acima e alíquotas de 1,0 ml foram retiradas a cada hora. Estas alíquotas foram preparadas e avaliadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As culturas foram centrifugadas a 2600 x g por 10 min e a 4°C, e o sedimento foi armazenado à -80°C. Para a expressão da proteína Cointegrase de *Xac* foram testadas mais condições de expressão, descritas na tabela 2.

**Tabela 2: Condições de testes de expressão da proteína Cointegrase de *Xac*.**

Clone	Temperatura de indução	Concentração de IPTG	Cepa bacteriana utilizada	Tempo de indução
pET 28aXACb0010	37°C	0,2 e 0,4 mM	BL21 (DE3)	4h
	30°C			
	25°C			
	20°C			
pGEX 4T-1	37°C	0,4 mM		
	30°C			

### **3.2.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)**

As amostras foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese, fervidas durante 10 min e centrifugadas por 2 min em micro centrífuga Eppendorf à temperatura ambiente. Estas amostras foram submetidas, juntamente com um marcador de massa molecular, à eletroforese em SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A eletroforese foi realizada com o Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad), utilizando gel de empacotamento 5%, gel de separação 10%, e voltagem constante de 150-200 V por aproximadamente 45 min. O gel foi corado por 30 min em Corante Comassie-Blue, e descorado em solução descorante. Este protocolo é uma variação do apresentado por Sambrook *et al.* (1989), onde podem ser encontradas mais informações sobre a técnica.

### **3.2.15 Purificação de proteína**

#### **3.2.15.1 Lise bacteriana**

As bactérias que expressaram as proteínas de interesse foram suspensas em tampão de lise bacteriana (15 ml/l de cultura), lisadas com aplicação de sonicador Sonifier 450 (Branson), e centrifugadas a 15000 x g, por 30 min, a 4°C. A verificação da presença da proteína de interesse na amostra foi feita por SDS-Page.

#### **3.2.15.2 Solubilização e purificação de proteína proveniente de corpos de inclusão**

O precipitado de um litro de indução foi ressuspensionado em 20 ml de tampão de ressuspensão, contendo 0,35 mg/ml de lisozima, e então incubado por 30-60 min em gelo. Após o período de incubação, as células foram lisadas com o auxílio de sonicação. Os corpos de inclusão foram sedimentados por centrifugação a 20000 x g durante 40 min, a 4°C. Na sequência, a fração solúvel foi separada do precipitado, o qual foi lavado com 40 ml de PBS por duas vezes, com centrifugações a 20000 x

g durante 40 min, a 4°C, após cada lavagem. O precipitado contendo os corpos de inclusão foi então ressuspendido em tampão de solubilização, e deixado a 4°C por pelo menos 1h. Após este período, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 20000 x g durante 40 min, a 4°C. Após este passo, a concentração da proteína em solução foi determinada e ajustada para a concentração desejada. Em seguida, a solução contendo a proteína passa por diálises lentas e seriadas, a fim de extrair totalmente a Guanidina-HCl do meio, e diminuir a concentração de DTT de 25 mM para 1 mM. Para as diálises, foi feito um tampão de reenovelamento, contendo 4 M de Guanidina-HCl e 25 mM de DTT, o qual foi o tampão para o primeiro passo de diálise. Os passos subsequentes foram feitos com a diluição deste tampão em tampão de reenovelamento, para as concentrações de 2M e 0,5 M de Guanidina-HCl, e 12,5 mM e 5 mM de DTT. O último passo de diálise foi feito em tampão de reenovelamento. O pH dos tampões devem ser mantidos constantes durante todo o processo. A solução foi, por final, centrifugada a 20000 x g durante 10 min, a 4°C, para a separação das frações solúvel e insolúvel, as quais foram analisadas posteriormente por SDS-PAGE.

### **3.2.15.3 Cromatografia de afinidade**

#### **A) Afinidade a metal**

Para a purificação das proteínas recombinantes fusionadas à cauda de polihistidina, foi utilizada a coluna de afinidade HiTrap Chelating 1 x 5 ml ou 1 x 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech) previamente carregada com níquel – de acordo com o protocolo do fabricante, ou com a resina Talon Metal Chelate<sup>®</sup> (Clontech), carregada com cobalto. O processo de purificação foi feito com a coluna HiTrap Chelating acoplada ao sistema de FPLC ('Fast Protein Liquid Chromatography') ÄKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). Utilizando o sistema acoplado ao ÄKTA FPLC, foi feito o seguinte protocolo: a coluna foi equilibrada com 2 vc (volume de coluna) de tampão A, seguida pela injeção da fração solúvel do lisado celular e eluição da fração não ligante com 10 - 15 vc. Após estes passos, foram

feitos dois passos de eluição. Primeiramente, foi injetado à resina 5 – 10 vc de tampão com concentração de imidazol equivalente a 50 mM (10% do tampão B). Este passo foi introduzido no protocolo de purificação de algumas das proteínas a fim de eliminar uma fração conhecida de contaminantes protéicos de menor afinidade pelo níquel, imobilizado na resina. A concentração de imidazol foi então elevada abruptamente a 500 mM (100% do tampão B), para a eluição da amostra de proteína. Todo o processo foi realizado com monitoramento constante da absorbância a 280 nm, da condutância, e da concentração do tampão B

### **B) Afinidade a GST**

As purificações por cromatografia de afinidade a GST de proteínas recombinantes fusionadas a GST utilizaram a coluna GSTtrap FF 1 x 5 ml ou 1 x 1 ml, acoplada ao sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ÄKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech), ou resina “Glutathione Sepharose 4 Fast Flow” (Amersham Biosciences). Foi também utilizado um sistema acoplado ao ÄKTA FPLC para a realização do seguinte protocolo: a coluna foi equilibrada com 2 vc de tampão A, seguida pela injeção da fração solúvel do lisado celular e eluição da fração não ligante com 10 - 15 vc. Após estes passos, a amostra foi eluída com 2 - 5 vc, com 100% do tampão B-glutathiona. Todo o processo foi realizado com monitoramento constante da absorbância a 280 nm, da condutância, e da concentração do tampão  $\beta$ -glutathiona. As purificações utilizando a resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow foram feitas na bancada (à temperatura ambiente), utilizando colunas descartáveis de plástico. Foi adicionada à coluna em torno de 500  $\mu$ l de resina por litro de indução, sendo a resina equilibrada com 3 vc do tampão A, e incubada com a fração solúvel do lisado celular por 1h, sob agitação leve, a 4°C. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado da coluna, a qual foi lavada com 10 – 15 vc do tampão A. A eluição da fração ligada à resina foi feita com a adição de 3 vc do tampão B-glutathiona, e as frações foram coletadas.

### 3.2.16 Cromatografia por filtração em gel

Foram utilizadas as colunas de purificação HiLoad Superdex 200 pg 16/60 (Amershan Pharmacia Biotech), para purificações por gel filtração, e a coluna Superdex 200 10/300 GL (GE), para as análises de gel-filtração analítica, acopladas ao equipamento ÄKTA FPLC (Amershan Pharmacia Biotech). Ambos os processos foram feitos da mesma forma, utilizando o tampão GF. A purificação por gel filtração foi utilizada para melhorar a pureza da amostra, enquanto as análises de gel-filtração analíticas foram utilizadas para extrair dados hidrodinâmicos das moléculas analisadas.

A coluna de gel filtração analítica utilizada possui resolução suficiente para identificar moléculas de 3 a 600 kDa, e requer fluxo de 0,5 ml/min, segundo especificações do fabricante. O experimento requer dois padrões para a posterior análise dos dados. Primeiramente foi utilizado o corante Blue Dextran, de alta massa molecular (MM), o qual foi utilizado a fim de avaliar o volume em que uma molécula com tamanho acima de 600 kDa (máximo da coluna) seria eluída, valor esse chamado de volume morto ou  $V_0$ . O outro padrão utilizado foi uma mistura de proteínas de tamanho e raio de Stokes conhecidos. As proteínas utilizadas estão representadas na tabela 3.

**Tabela 3: Proteínas utilizadas como padrão para gel-filtração analítica.**

Proteína	Raio de Stokes (Å)	Concentração (mg/ml) (Erro: $\pm 0,2$ mg/ml)
Tiroglobulina	85	4,5
Ferritina	61	0,6
Aldolase	48	4,3
Ovalbumina	30	3,5
Anidrase Carbônica	23	2,8

Após a aplicação e eluição dos padrões e da amostra da coluna, o valor do volume em que a amostra foi eluída ( $V_e$ ) foi colocado na equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (2)$$

Onde  $K_{av}$  é o coeficiente de partição, e  $V_t$  é o volume total da coluna. O raio de Stokes da proteína foi estimado com base em um ajuste linear dos raios de Stokes ( $R_s$ ) dos padrões contra os coeficientes de partições dos mesmos (no caso  $\sqrt{-\log K_{av}}$ ). Além disso, um raio de Stokes teórico foi predito para uma esfera rígida com a mesma massa da proteína, que se difunde com a mesma velocidade. O coeficiente friccional e o fator de formato de Perrin foram calculados a partir do raio de Stokes (Cantor e Shimmel, 1980). O coeficiente friccional para uma esfera rígida, possuindo massa idêntica ao da molécula de interesse ( $f_0$ ) e o coeficiente friccional da proteína foram obtidos via equação de Stokes:

$$f_0 = 6\pi\eta \left( \frac{3MV_{bar}}{4\pi N} \right)^{1/3} \quad (3)$$

$$f = 6\pi\eta R_s \quad (4)$$

Onde  $\eta$  é a viscosidade do solvente,  $M$  é a massa molecular, e  $N$  é o número de Avogrado. O software Sednterp (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>) foi utilizado para estimar a viscosidade do tampão GF a 25°C (0,01 P).

### **3.2.17 Cromatografia de exclusão molecular acompanhada por um detector de espalhamento de luz à vários ângulos (SEC-MALS)**

As análises de SEC-MALS foram feitas utilizando um ÄKTA FPLC (Amershan Pharmacia Biotech) acoplado ao equipamento miniDAWN™ TREOS (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA), o qual contém três detectores de

espalhamento de luz a ângulos distintos, que foram utilizados para informar a massa molecular média e a polidispersidade da amostra, entre outros (Young e Foegeding, 2008). Este equipamento utiliza as leituras de absorvância a 280 nm providas do ÄKTA FPLC, e as apresenta paralelamente com os dados de espalhamento de luz, coletados pelos detectores. A separação das amostras foi feita em coluna de gel-filtração analítica Superdex 200 10/300 GL (GE), como descrito no tópico 3.2.16 dos métodos. Os dados de SEC-MALS foram coletados e analisados com o auxílio do programa Astra, versão 5.3.4.14 (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA).

### 3.2.18 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas puras foi determinada espectroscopicamente, medindo absorvância a 280 nm através do método descrito por Edelhock (1967). As amostras foram centrifugadas a 10000 x g em temperatura ambiente durante 10 min, e então diluídas em tampão contendo fosfato de sódio (pH 6,5) na concentração final de 20 mM e 6 M de cloridrato de guanidina (Gdm-Cl). O calculada concentração das amostras foi feito utilizando a equação de Lambert-Beer, descrita acima (equação 1). O coeficiente de extinção molar para proteínas a 280 nm foi calculado utilizando-se a seguinte equação:

$$\varepsilon(\lambda) = n_{Trp} \times \varepsilon_{Trp} + n_{Tyr} \times \varepsilon_{Tyr} + n_{Cys} \times \varepsilon_{Cys} \quad (5)$$

Sendo,  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de extinção molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) da proteína de interesse em um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ );  $n_{Trp}$ ,  $n_{Tyr}$ , e  $n_{Cys}$  são os números de triptofanos, tirosinas e cisteínas, respectivamente, presentes na sequência da proteína;  $\varepsilon_{Trp}$ ,  $\varepsilon_{Tyr}$  e  $\varepsilon_{Cys}$ , os coeficientes de extinção molar do triptofano, tirosina e cisteína, respectivamente.

Para medição da concentração de proteína total em extrato bruto foi utilizado o método de Bradford, descrito por Sambrook *et al.*, 1989. A medição da concentração da proteína de interesse diretamente do extrato bruto foi feita

quantificação das bandas do SDS-Page por densitometria, utilizando o programa gratuito Image J.

### **3.2.19 Teste de renovelamento da proteína Cointegrase auxiliado pela Hsp90 de laranja**

Este protocolo se inicia a partir da solubilização dos corpos de inclusão em tampão de solubilização e ajuste da concentração, como descrito no tópico 3.2.15.2 dos métodos. Foram separadas duas alíquotas de cada concentração da proteína alvo para o renovelamento, as quais foram dialisadas em paralelo, além de um controle apenas com tampão de solubilização. Na diálise para tampão com 0,5 M de Guanidina-HCl, foi adicionada a Hsp90 na concentração desejada, em uma das alíquotas de cada concentração da proteína alvo, e no controle. Após o último passo de diálise, as amostras foram centrifugadas a 20000g durante 15 min, a 4°C, para a separação das frações solúvel e insolúvel. O precipitado foi ressuspenso no mesmo volume de tampão de amostra de SDS-PAGE, e fervido. Por fim, as alíquotas foram aplicadas em SDS-PAGE.

### **3.2.20 Ensaio de interação proteína-proteína utilizando uma proteína fusionada à cauda de GST como isca (GST “pull-down”)**

As proteínas recombinantes expressas em fusão com GST foram ressuspendidas em 1 ml de tampão A, lisadas e as frações solúveis obtidas foram incubadas separadamente com 30 µl de resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*, previamente equilibrada com tampão A, por 1 h sob agitação leve, a 4°C (como alternativa, também foram utilizadas aproximadamente 1 ml de amostras de proteínas isca previamente purificadas por cromatografia de afinidade a GST). Após o período de incubação, a resina foi lavada quatro vezes com tampão A (aproximadamente 30 vc), para remoção de amostra não ligada. Em seguida, a resina foi incubada com 1ml da proteína presa, fusionada a cauda de polihistidina (His<sub>6</sub>), previamente expressas e purificadas por afinidade em resina Talon Metal

Chelate<sup>®</sup>. A incubação foi realizada a 4°C, por 2 h sob agitação leve. As amostras foram centrifugadas e a resina lavada cinco vezes com tampão A, e mais três vezes com tampão A, acrescido de 0,1% de Triton X-100. Foram acrescentados às resinas, 1 vc de tampão de amostra de SDS-PAGE, as quais foram fervidas por 10 min a 95°C, e fracionadas em gel SDS-PAGE 10% para coloração com corante Coomassie blue, e visualização por *western blot*. Como controle foi realizado o mesmo procedimento para a proteína GST sozinha presa à resina, e incubada separadamente com as proteínas-presa utilizadas.

### **3.2.21 Western blot**

As análises de *western blot* foram realizadas a partir de SDS-PAGE a 10 e 12%. As proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinila) Immobilon-P (Millipore) previamente ativada em metanol (aproximadamente 1 min), em tampão de transferência. A transferência foi realizada a 350 mA por 1 h, utilizando o sistema de transferência molhado (BioRad). Após a transferência a membrana foi incubada em solução de bloqueio por 1 h, sob agitação branda, à temperatura ambiente, ou por 16 h a 4°C, sem agitação. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo primário, em solução bloqueio por 1 h, a temperatura ambiente, sob agitação branda. Depois da incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada quatro vezes (10 min cada e sob leve agitação) em tampão TBS, acrescido de 0,05% de Tween 20, e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (GE Healthcare) por 1 h, temperatura ambiente e sob leve agitação. As diluições dos anticorpos utilizadas nos experimentos foram feitas em solução de bloqueio, e estão descritas na tabela 4 abaixo. A membrana foi novamente lavada quatro vezes (10 min cada, sob agitação leve) em tampão TBS, acrescido de 0,05% de Tween 20. A detecção foi feita utilizando-se o método de quimioluminescência com o kit *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) e exposta ao filme de raios-X.

**Tabela 4: Diluições dos anticorpos utilizados nos experimentos de *western blot*.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Organismo de origem</b>	<b>Diluição</b>
Anti-His	Primário	Camundongo	1:5000
Anti-pthA	Primário	Coelho	1:5000
Anti-Hsp90laranja	Primário	Camundongo	1:2000
Anti-GST 1	Primário	Coelho	1:5000
Anti-GST 2	Primário	Camundongo	1:6
Anti-camundongo	Secundário	Cabra	1:3000
Anti-coelho	Secundário	Cabra	1:3000

\* As diluições foram feitas de acordo com as condições preestabelecidas pelo fabricante.

### **3.2.22 Ensaio de atividade chaperona da Hsp90 utilizando citrato sintase**

A citrato sintase (CS) é uma proteína altamente sensível à agregação por temperatura (Zhi *et. al.*, 1991; Jakob *et. al.*, 1995) pois mesmo uma incubação por poucos minutos a 47°C leva a agregação que pode ser detectada por espalhamento de luz. A CS mitocondrial suína foi incubada com diferentes concentrações de Hsp90 em tampão 40 mM HEPES, pH 7,5, em 0,5 ml de volume final. As soluções foram inicialmente mantidas a 47°C por 5 min e após a adição de CS e Hsp90, iniciou-se o monitoramento do espalhamento de luz a 360 nm, por 40 min, com intervalos de 1 min entre as medidas, em um fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (SLM AMINCO) com temperatura ajustada para 47°C. Os controles foram feitos na ausência de CS (negativo) ou Hsp90 (positivo). Foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) no lugar de Hsp90 em alguns ensaios, como controle.

### **3.2.23 Sistema de duplo-híbrido**

O sistema de duplo-híbrido baseia-se na estrutura do fator de transcrição GAL4 de *S. cerevisiae*. Este apresenta dois domínios fisicamente separados *in vivo*; o domínio de ligação ao DNA (binding domain - BD) e o domínio de ativação da transcrição (activation domain - AD). O domínio da ligação de DNA se liga a uma sequência promotora específica, que se situa no início de um gene repórter. Este, por sua vez, atrai os componentes críticos do complexo de transcrição, que fica inativo. O domínio de ativação se encarrega de ativar este complexo, iniciando, assim, a transcrição. No sistema de duplo híbrido, a proteína de interesse é fusionada ao domínio de ligação de DNA enquanto uma biblioteca de cDNA ou genômica, codificando as proteínas de todo o organismo, foi fundida ao domínio de ativação de transcrição. Através de processos de co-transformação ou transformação sequencial, as duas construções são introduzidas nas células de levedura. Quando ocorre uma interação entre a proteína de interesse e uma proteína da biblioteca, o fator de transcrição funcional completo é reconstituído no interior da célula, e os genes repórteres são ativados. A transcrição dos genes repórteres pode resultar em colônias com colorações específicas (*lacZ*) ou permitem o crescimento celular em condições restritas através de utilização de marcas de auxotrofia (histidina, uracila, adenina).

Cada um dos vetores utilizados no duplo-híbrido (pOBD e pOAD) contém marcas de seleção específicas. Além dos antibióticos, cada vetor supre a célula com um tRNA que a cepa de levedura não produz. O pOBD confere o tRNA para o triptofano, enquanto o pOAD proporciona o tRNA para leucina na célula. Os clones podem então ser selecionados também por seu crescimento em meios mínimos (SC drop-out).

### **3.2.24 Transformação de leveduras competentes por choque-térmico**

A transformação da linhagem PJ69-4A *MATa* baseou-se no protocolo descrito por Gietz *et al.* (1998). A levedura foi repicada em meio YAPD e incubada por 16-24

h a 30°C. Da placa, foram removidos 25 µl de células, os quais foram ressuspensos em 1ml de água MilliQ em um tubo de micro centrífuga com capacidade para 1,5 ml. As células foram lavadas e centrifugadas a 12000 rpm (rotor EE30 Eppendorf) por 30 s. Ao precipitado, foram adicionados na seguinte ordem: 240 µl PEG MW 3350 (50%); 36 µl acetato de lítio (1M); 50 µl ss-DNA de esperma de salmão (2 mg/ml, Sigma, cat. No. L-1626); 2 µl do plasmídeo contendo a sequência de interesse, e água MilliQ para um volume final de 360 µl. As células foram ressuspensas com o auxílio de vortex, receberam choque térmico a 42°C por 30 min, e foram centrifugadas novamente. Ao precipitado, foram adicionados 400 µl de água MilliQ para que as células fossem ressuspensas. Estas foram então incubadas em temperatura ambiente por 5 min. Amostras de 200 µl foram plaqueadas em meio SC-triptofano (SC-trip), e incubadas a 30°C por 2-4 dias. As colônias obtidas foram transportadas para uma placa SC-trip, para manutenção por repiques periódicos.

### **3.2.25 Transformação em larga-escala**

No ensaio de duplo-híbrido realizado neste trabalho foi utilizada uma biblioteca genômica de *Xac*, feita pelo prof. Dr. Chuck Farah e gentilmente cedida ao nosso grupo. Esta biblioteca possui boa representatividade de todo o genoma da bactéria. O clone contendo o vetor com domínio de ligação ao DNA e a sequência de DNA de interesse (isca), foi inoculado em 100 ml de meio SC-trip e incubado a 30°C, 200 rpm por 16 h. Após este período, foi medida a  $A_{600nm}$  e calculado o volume de pré-inóculo necessário pra obter um total de  $1,5 \times 10^9$  células, as quais foram centrifugadas a 3000 x g e inoculadas em 300 ml de meio YAPD. Após incubação a 30°C, 200 rpm por 6h, novamente foi verificada a quantidade de células, a qual deveria atingir uma  $A_{600nm}$  igual a 2,0 (aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  UFC/ml).

A cultura foi então dividida em 3 tubos Falcon de 50 ml e centrifugada a 3000 x g por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 25 ml de água estéril. Ao precipitado, foram adicionados os seguintes componentes

na ordem indicada: 7,2 ml de PEG (50%); 1,08 ml de acetato de lítio (1,0 M); 1,5 ml de ss-DNA de esperma de salmão (2 mg/ml); 30 µl de DNA plasmidial (aproximadamente 1 µg/µl da biblioteca de cDNA), e 990 µl H<sub>2</sub>O. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada em banho-maria a 42°C (choque térmico) por 60 min, agitando bem o tubo a cada 5 min. Posteriormente ao choque-térmico, a mistura foi centrifugada a 3000 x g, 20°C por 5 min e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 100 ml de meio YPAD e incubadas a 30°C, 200 rpm por 1 h, para recuperação após o choque térmico. Após a recuperação, a cultura foi novamente centrifugada a 3000 x g, 20°C por 5 min e o sobrenadante removido. O precipitado foi ressuspensado em 10 ml de água MilliQ estéril. Desta solução, 500 µl foram plaqueados em placas (150x15mm) contendo meio SC-triptofano-leucina-histidina (SC-WLH) + 3-AT em concentração suficiente para impedir auto-ativação do gene repórter GAL1-HIS3. Para o ensaio da Hsp90 contra a biblioteca de *Xac*, foram utilizadas duas concentrações diferentes de 3-AT: 1 e 3 mM. Trinta placas foram feitas com cada concentração utilizando meio SC drop-out na ausência de triptofano, leucina e histidina (-WLH). Em outra placa contendo SC-leu, foram plaqueados 50 µl de uma diluição 1:100 da solução resultante da transformação (controle do número de transformantes totais). As placas foram incubadas a 30°C por até 14 dias, no decorrer dos quais as colônias foram contadas e foram feitos repiques dos clones positivos em placas SC-WLH + 3-AT cobertas por papel quadriculado (para a identificação dos clones). Os clones positivos foram confirmados pelo crescimento em placas SC-WLHA + 3-AT.

### **3.2.26 Testes de auto-ativação dos genes repórteres do ensaio de duplo-híbrido**

#### **3.2.26.1 Gene *ade2***

O teste de auto-ativação do gene *ade2*, pode ser feito simplesmente repicando colônias de levedura transformadas com os plasmídeos a serem testados em meio SC sem adenina (SC-A, SC-WA, SC-LA, ou SC-WLA), ou em conjunto com o teste

de auto-ativação do gene repórter *his3*, retirando histidina e adenina da composição do meio. O crescimento de colônias de levedura transformadas com o plasmídeo a ser testado indica a auto-ativação deste gene repórter por parte da sequência testada.

### **3.2.26.2 Gene repórter *gal1-his3***

O clone contendo a sequência de interesse, a qual serviu como isca, foi repicado em placa contendo meio SC-trip, incubada por 16-24 h a 30°C. Após o crescimento celular, aproximadamente 10 µl de células foram transferidos para um tubo de micro centrífuga contendo 1 ml de água MilliQ estéril, do qual foi medida a absorbância ( $A_{600nm}$  0,1 equivale a  $1 \times 10^6$  UFC/ml) após a diluição de 1:1000 desta cultura em água. Assim, calculou-se a diluição que apresentaria aproximadamente 10 UFC/µl. Cem microlitros desta diluição (aproximadamente 1.000 colônias) foram plaqueados em meio SC-W (controle) e SC-WH, em concentrações crescentes do inibidor do gene repórter de histidina, 3-amino triazol (3-AT): 0 mM; 1 mM; 5 mM; 10 mM; 25 mM e 50 mM. As placas foram incubadas a 30°C durante 5 dias. A concentração inibitória de 3-AT foi determinada para cada clone.

### **3.2.26.3 Gene *lacZ***

O teste de auto-ativação do gene *lacZ* mede a atividade da enzima β-galactosidase, cuja expressão é regulada pelo promotor GAL4, na presença dos domínios de ativação e de ligação contidos nos plasmídeos utilizados na técnica. Desta forma, havendo interação (ou auto-ativação deste promotor), a produção desta enzima é aumentada e, conseqüentemente ocorre atividade aparente. Para este teste, foi utilizado o orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG), um composto incolor que simula a lactose, que na presença da β-galactosidase, é hidrolisado em galactose e orto-nitrofenol, o qual apresenta coloração amarelada. A concentração de orto-nitrofenol na solução pode ser medida por espectroscopia. É

possível então relacionar o aumento da atividade aparente da  $\beta$ -galactosidase com a força de interação da isca e da presa utilizadas, ou a capacidade de auto-ativação de uma sequência específica, de forma quantitativa.

Para se fazer este teste, colônias (no mínimo duas) de levedura contendo os plasmídeos testados (pOBD isca + pOAD presa, pOBD isca + pOAD vazio, pOBD vazio + pOAD presa, além de um controle positivo de interação ou de auto-ativação) foram pré-inoculadas em 1 ml de meio SC-WL, e incubadas a 30°C sob agitação constante a 200-225 rpm por 16h (*over-night*). Cento e cinquenta  $\mu$ l deste pré-inóculo foram transferidos para 1,5 ml de meio YPD, em tubo de 5 ml, o qual foi incubado a 30°C sob agitação a 200-225 rpm, por aproximadamente 4h, até  $A_{600nm} = 0,5 - 0,8$ . Após o período de incubação, 1,5 ml da cultura foi transferida para tubo de 2,0 ml, e centrifugado a 16000 x g por 30 s. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspendido em 300  $\mu$ l de Z-buffer, e diluído em mais 1 ml de Z-buffer. As células em Z-buffer foram lisadas por 3 ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria a 37°C. Após a lise celular, foram acrescentados 200  $\mu$ l de ONPG ao tubo e incubar em estufa a 30°C, cronometrando o tempo, até a coloração amarelada tornar-se visível em um dos tubos (normalmente o controle positivo). Os tubos foram então retirados da estufa e foram adicionados imediatamente 0,5 ml de  $Na_2CO_3$ , parando a reação juntamente com a contagem do tempo de incubação. A solução foi centrifugada novamente a 16000 x g por 10 min, a fim de eliminar resíduos celulares em solução. O sobrenadante foi então transferido para um tubo novo, e levado ao espectrofotômetro. Foram medidas as leituras de absorvância a 420 nm, a fim de verificar a concentração de orto-nitrofenol, e a 550 nm, para medição de concentração de impurezas na solução (fragmentos celulares). O cálculo da atividade da  $\beta$ -Galactosidase foi feito utilizando a seguinte equação:

$$x = 1000 \times \frac{[A_{420} - (1,75)A_{550}]}{t \times v \times A_{600}} \quad (6)$$

Sendo  $A_{420}$  a absorvidade a 420 nm,  $A_{550}$  a absorvidade a 550 nm,  $t$  o tempo (em min) de incubação a 30°C da solução, após a adição do ONPG,  $v$  o volume inicial do inoculo (1,5), e  $A_{600}$  a absorvidade óptica obtida inicialmente.

### **3.2.27 Recuperação dos plasmídeos das presas do duplo-híbrido**

A estratégia utilizada com o auxílio da cepa KC8, de *E. coli* é baseado nas marcas de seleção auxotróficas desta cepa. Para isso, as colônias transformadas com DNA extraído da levedura, foram repicadas em meio LB, contendo o devido antibiótico, e incubadas a 30°C, por 24h aproximadamente. As colônias que demonstraram crescimento foram transferidas para placa contendo meio M-9, na ausência de leucina (M-9-L). Isso faz com que a bactéria mantenha o plasmídeo da presa, o qual possibilita a produção deste aminoácido, e exclui o plasmídeo da isca, desnecessário para sua sobrevivência. As placas foram então incubadas a 30°C por aproximadamente 48h. Após esse período, as colônias que apresentaram crescimento no meio seletivo foram inoculadas em meio M-9 - L líquido, a 30°C, sob agitação ON, e tiveram seus plasmídeos extraídos com o auxílio do kit de extração de DNA plasmidial, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante.

### **3.2.28 Caracterização de estrutura secundária através de espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)**

Os espectros de CD foram feitos utilizando-se um espectropolarímetro J-810 (JASCO), cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico e Hsp90 numa concentração de  $3,0 \mu\text{M} \pm 0,3$ , suficiente para fornecer um sinal bruto a 222 nm entre -20 e -40 m graus. Os programas utilizados para o registro e o tratamento dos dados foram Spectra manager® (JASCO) e Origin® versão 8 (OriginLAB Corporation). A temperatura da cela foi mantida constante à 20°C através de um sistema interno de controle (Peltier Type Control System PFD 425S- Jasco) e controlador externo de temperatura NESLAB RTE Series (NESLAB). Os valores

obtidos na leitura de CD (m graus) foram convertidos para elipticidade molar residual  $[\theta]$ , definida pela equação:

$$[\theta] = \frac{(\theta \times 100 \times M)}{(C \times l \times n)} \quad (7)$$

Onde  $\theta$  é a elipticidade em graus,  $M$  é a massa molecular da proteína em g/mol,  $C$  é a concentração da proteína em mg/ml,  $l$  é o comprimento do caminho ótico em cm, e  $n$  é o número de resíduos de aminoácidos da respectiva proteína. As porcentagens de estrutura secundária dos tipos hélice alfa, folha beta e estrutura randômica foram calculadas com o auxílio do programa CDNN Deconvolution (Versão 2 – <http://Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.dee/cdn>). O conteúdo de hélice alfa foi também obtido utilizando a elipticidade molar residual a 222 nm, como descrito na equação (Morriset *et al.*, 1973):

$$fH = \frac{([\theta]_{222} - 3.000)}{(-36.000 - 3.000)} \quad (8)$$

Onde  $[\theta]_{222}$  é a elipticidade molar residual média a 222 nm, e  $fH$ , a fração de helicidade (em %).

### 3.2.29 Desenovelamento térmico acompanhado por CD

Os experimentos de desenovelamento térmico acompanhado por CD utilizam os mesmos princípios apresentados no item 3.2.27 sobre dicroísmo circular. As leituras foram feitas utilizando-se cubetas de quartzo de 1 mm de caminho ótico em espectropolarímetro de CD J-810 (JASCO) com temperatura controlada por Peltier Type Control System PFD 425S (JASCO) e controlador externo NESLAB RTE Series (NESLAB). Ver legenda das figuras para mais detalhes.

### 3.2.30 Fluorescência intrínseca

Os experimentos de fluorescência foram realizados utilizando-se um fluorímetro Aminco Bowman<sup>®</sup> Series 2 (SLM-AMINCO), cubetas de quartzo de 1 cm x 1 cm de caminho ótico. Os programas utilizados para registro dos dados foram SLMAB2 (SLM-AMINCO) e Origin<sup>®</sup> Pro versão 8.0 (OriginLAB Corporation). A temperatura da câmara de leitura foi mantida constante à 25°C através de um banho-maria com fluxo. A proteína foi incubada nesta temperatura por 5 min antes do início das leituras. Os espectros de emissão fluorescência foram monitorados utilizando-se comprimento de onda ( $\lambda$ ) de excitação de 295 nm, com a abertura para passagem de luz de 4 nm e de emissão de 335 nm (abertura 8 nm). Os pontos para a composição do espectro de emissão foram coletados a cada 1 nm dentro do intervalo de 300 a 400 nm. Os dados foram analisados avaliando o perfil dos espectros, o comprimento de onda onde se observa a máxima intensidade de fluorescência dos espectros ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), em nm, e o centro de massa espectral, extraído utilizando a seguinte equação:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum(\lambda \times IF_{\lambda})}{\sum IF_{\lambda}} \quad (9)$$

Onde  $\langle \lambda \rangle$  é o centro de massa, em nm,  $\lambda$  é o comprimento de onda, em nm, e  $IF_{\lambda}$  é a intensidade de fluorescência num determinado comprimento de onda.

### 3.2.31 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Os dados referentes ao coeficiente de difusão (D) foram estimados por experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS), que foram realizados em um equipamento DynaPro-MS/X (Protein Solutions) em temperatura constante de 20°C. As amostras foram previamente centrifugadas a 14000 x g por 10 min a 20°C. A função de auto-correlação foi medida em um ângulo de espalhamento de 90 graus, com aproximadamente 400 acumulações de 10 s cada e analisados pelo programa

fornecido pelo fabricante. O DLS também foi utilizado como forma de medir a monodispersidade das amostras.

### **3.2.32 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)**

As coletas de SAXS e as análises dos dados foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Ricardo Aparício, do Departamento de Físico-Química do IQ - UNICAMP. As medidas de SAXS foram realizadas na linha de luz SAXS 1, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), situado em Campinas/SP. As linhas de luz possuem diferenças com relação à intensidade do feixe e ao detector. A linha SAXS 1 possui um detector do tipo Pilatus, o qual é muito mais sensível que detectores de CCD utilizados em outras linhas de luz. Os dados relativos a condições como concentração de proteína, tampão, e com relação aos aditivos utilizados nos experimentos estão detalhados nos resultados. A aquisição de dados foi feita através de um detector multicanal unidimensional sensível à posição, sendo possível adquirir a curva de intensidade de espalhamento em função do número de canal. O comprimento de onda do raio incidente utilizado foi de 1,488 Å e a distância entre amostra-detector foi escolhida de modo a adquirir o espalhamento de 0,01 a 0,4 Å<sup>-1</sup>. Foi utilizada uma cela porta-amostra na forma de janela, constituída de mica, para reduzir ao mínimo possível o espalhamento do sistema e favorecer o espalhamento da amostra. Para o tratamento de dados, onde todas as curvas foram corrigidas por efeitos associados a não homogeneidade da resposta do detector e pelo decaimento da fonte de luz síncrotron, foi utilizado um script em Linux, elaborado pelo prof. Dr. Ricardo Aparício.

Para obter informações sobre a MM da partícula espalhadora foi utilizada a proteína soroalbumina bovina (BSA; MM = 69,0kDa) e a lisozima de galinha (MM = 14,3 kDa) como padrões externos de MM, sendo estas diluídas nos respectivos tampões da proteína de interesse, em concentrações próximas à da amostra analisada. A partir da razão entre o valor extrapolado de  $I(q) \rightarrow 0$  para a proteína de interesse e da BSA ou lisozima, foi obtido uma estimativa da MM da partícula espalhadora.

Os dados de SAXS permitem a construção de modelos *ab initio* de proteínas e, apesar destes modelos serem de baixa resolução, informações sobre o tamanho, a forma e as posições relativas dos domínios da partícula podem ser obtidas (Svergun, 1999; Svergun e Koch, 2003). As informações contidas nas curvas de SAXS também ajudam a interpretar e comparar, através de programas computacionais, as possíveis diferenças entre a estrutura de proteínas em solução e àquela apresentada em alta resolução (Svergun e Koch, 2003). Para melhorar estas comparações, foi utilizado o programa de utilização livre HydroPro (Garcia de la Torre *et al.*, 2000), o qual fornece dados hidrodinâmicos para um dado modelo do tipo .pdb. A comparação foi feita entre os modelos *ab initio* gerados e as estruturas de homólogos de Hsp90 já depositadas em banco de dados.

A função de distribuição de distâncias  $p(r)$  e o raio de giro  $R_g$  da proteína determinados por SAXS, foram calculadas a partir das curvas corrigidas e normalizadas pela transformada de Fourier indireta com o auxílio do programa GNOM (Semenyuk e Svergun, 1991).

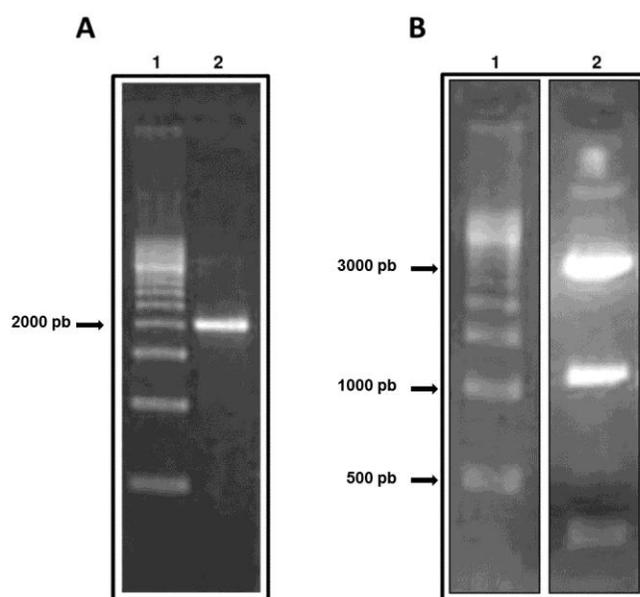
A  $p(r)$  e o  $R_g$  da Hsp90 de laranja foram calculadas a partir das curvas corrigidas e normalizadas pela transformada de Fourier indireta com o auxílio do programa GNOM (Semenyuk e Svergun, 1991). Os modelos em baixa resolução foram construídos a partir dos dados experimentais de SAXS através de método *ab initio* implementado pelos programas DAMMIN (Svergun, 1999) e GASBOR (Svergun *et al.*, 2001).

## 4. Resultados

### 4.1 Hsp90 de *C. sinensis*

#### 4.1.1 Clonagens

A sequência da Hsp90 foi amplificada por PCR utilizando como molde o cDNA de *C. sinensis*, e os primers HSP90-F2 e HSP90-R1, como se pode ver na figura 8A. O produto de PCR foi extraído do gel, ligado no vetor de clonagem pGEM-T easy. Os plasmídeos dos clones obtidos foram digeridos com a enzima de restrição *Hind* III, produzindo três bandas distintas no gel: uma de aproximadamente 3000 pb, uma banda de 1102pb e uma de 246 pb, referentes a cortes feitos pela enzima na região que codifica Hsp90 (possui dois sítios de clivagem para *Hind* III) e uma clivagem no sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM-T easy (Figura 8B).



**Figura 8:** A: Amplificação por PCR da Hsp90 de *C. sinensis*. 1) Marcador de DNA de 500 pb (BioRad). 2) Amplificação de uma sequência de aproximadamente 2000 pb equivalente aos 2103 pb, referente à Hsp90. B: Digestão de um clone pGEMTeasy-Hsp90 com a enzima de restrição *Hind* III para a confirmação de clonagem. 1) Marcador de DNA de 500 pb (BioRad). 2) Digestão do clone pGEMTeasy-Hsp90 com *Hind* III. Pode ser observada a presença de três bandas com aproximadamente 3000 pb, 1100 pb, e 240 pb, referentes às digestões feitas pela enzima na molécula de DNA referente à Hsp90, confirmando sua presença nesse clone.

Após o sequenciamento dos clones, estes foram digeridos com as enzimas *Nde* I e *Not* I, assim como os vetores de duplo-híbrido pOBD e pET28a. Foram obtidos dois clones da Hsp90 inseridos em pET28a a partir destas ligações. Vários clones da Hsp90 em pOBD foram confirmados por PCR de colônia. Todos os clones foram sequenciados. O clone 54 da construção pOBD-Hsp90 foi selecionado para os experimentos em levedura.

Com o sequenciamento completo dos clones obtidos, foram observadas duas sequências de DNA diferentes de Hsp90 presentes na laranja. A figura 9 mostra o alinhamento das sequências de DNA dos dois genes *hsp90* encontradas desta forma na laranja. As sequências foram denominadas “Hsp90a” e “Hsp90b”. Um alinhamento destas duas sequências com homólogos da Hsp90 de *Homo sapiens* (isoformas alfa e beta), *S. cerevisiae*, *S. officinarum*, *Hordeum vulgare* e *Nicotiana tabacum* pode ser observado na figura 10. A Hsp90a possui uma maior similaridade à Hsp90 de *S. officinarum* (93,4% de identidade), utilizada inicialmente como molde para construção dos oligonucleotídeos. Esta sequência, a qual é idêntica a do clone 54 de duplo-híbrido, foi utilizada em todos os ensaios subsequentes. A figura 11 mostra a sequência de nucleotídeos acompanhada por sua estrutura primária, evidenciando as regiões limitantes de cada domínio interno da proteína, baseado na similaridade com a Hsp82 de *S. cerevisiae*, cuja sequência está apresentada na figura 12.

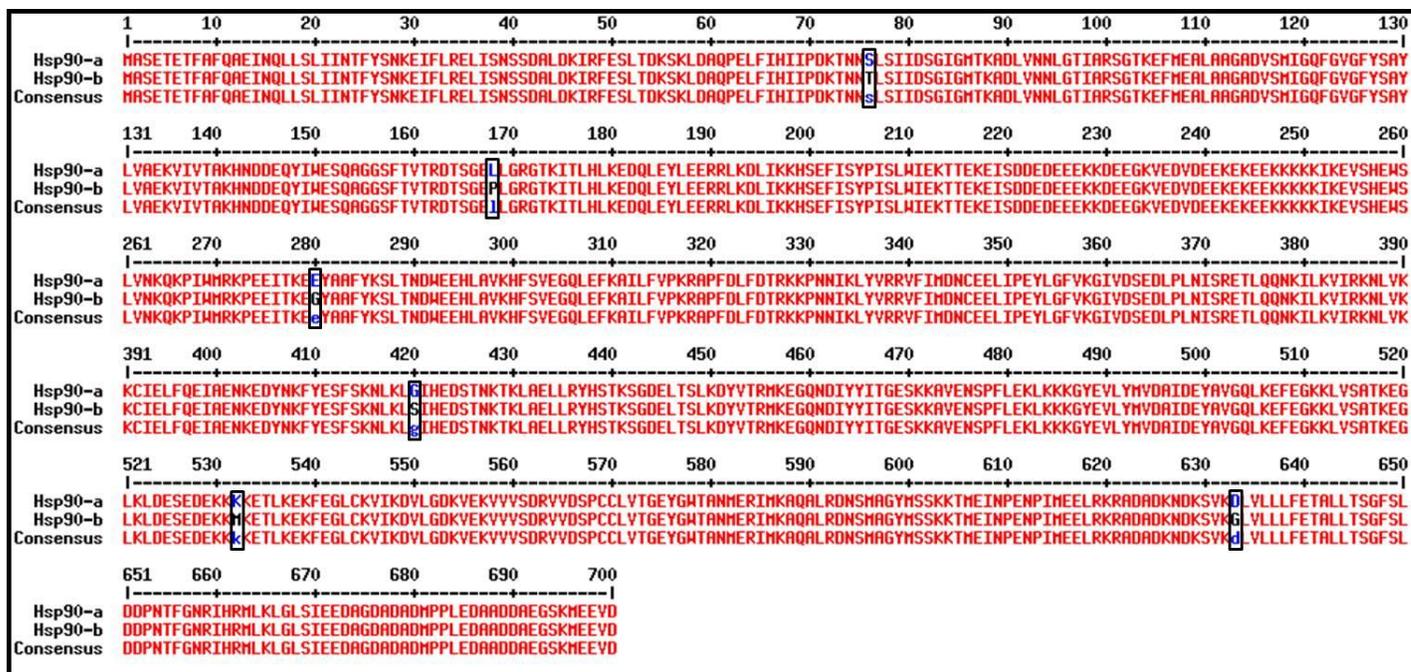
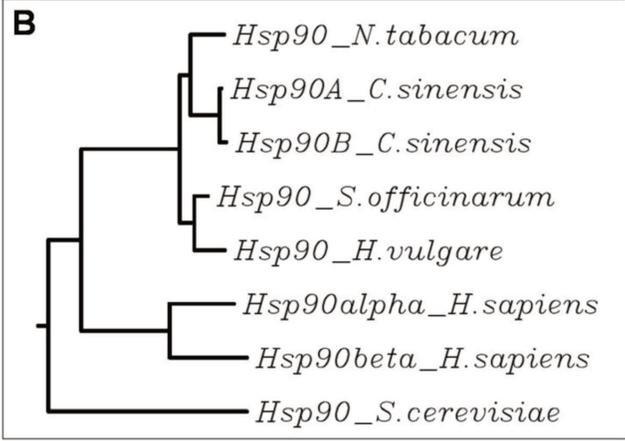
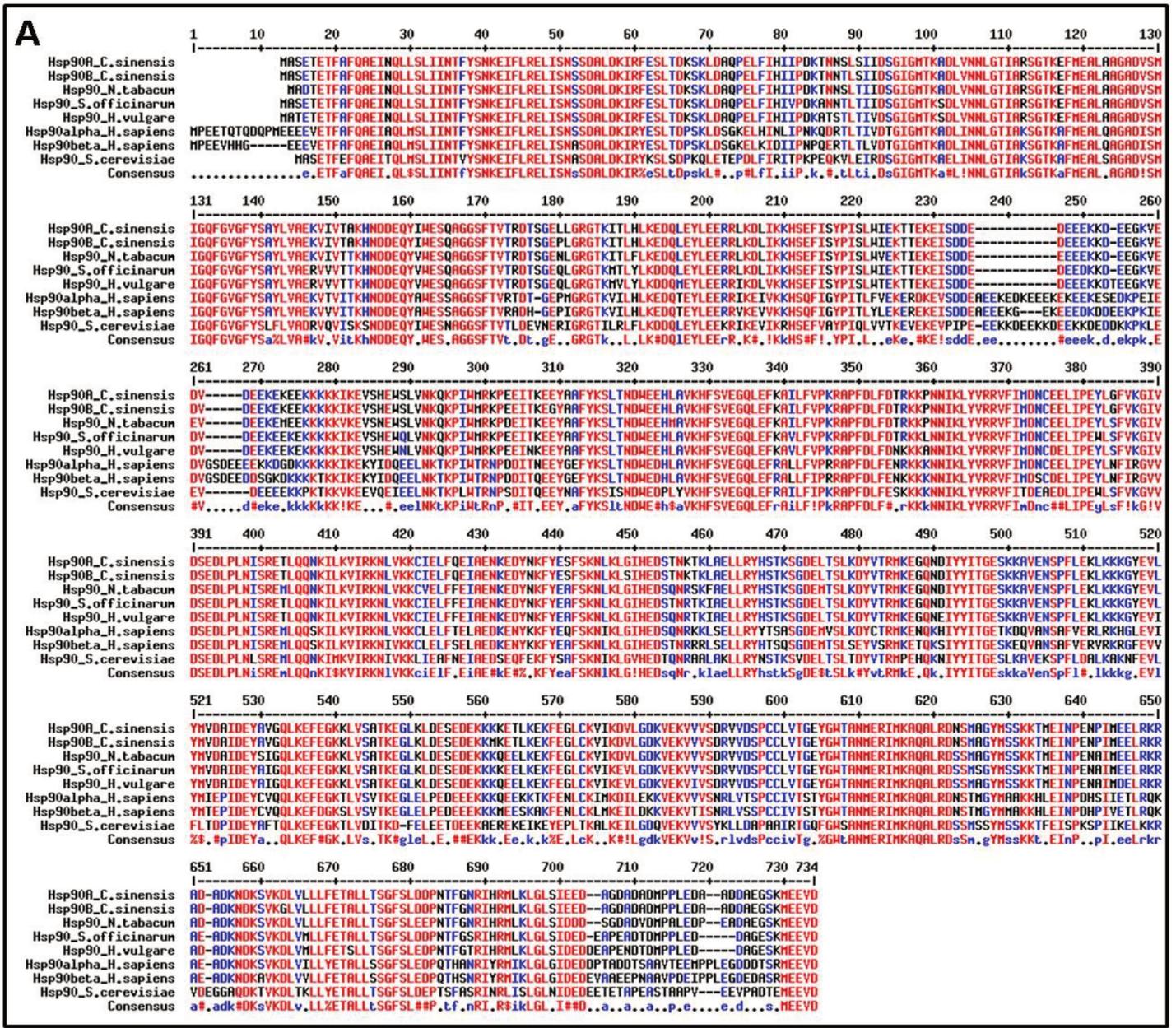
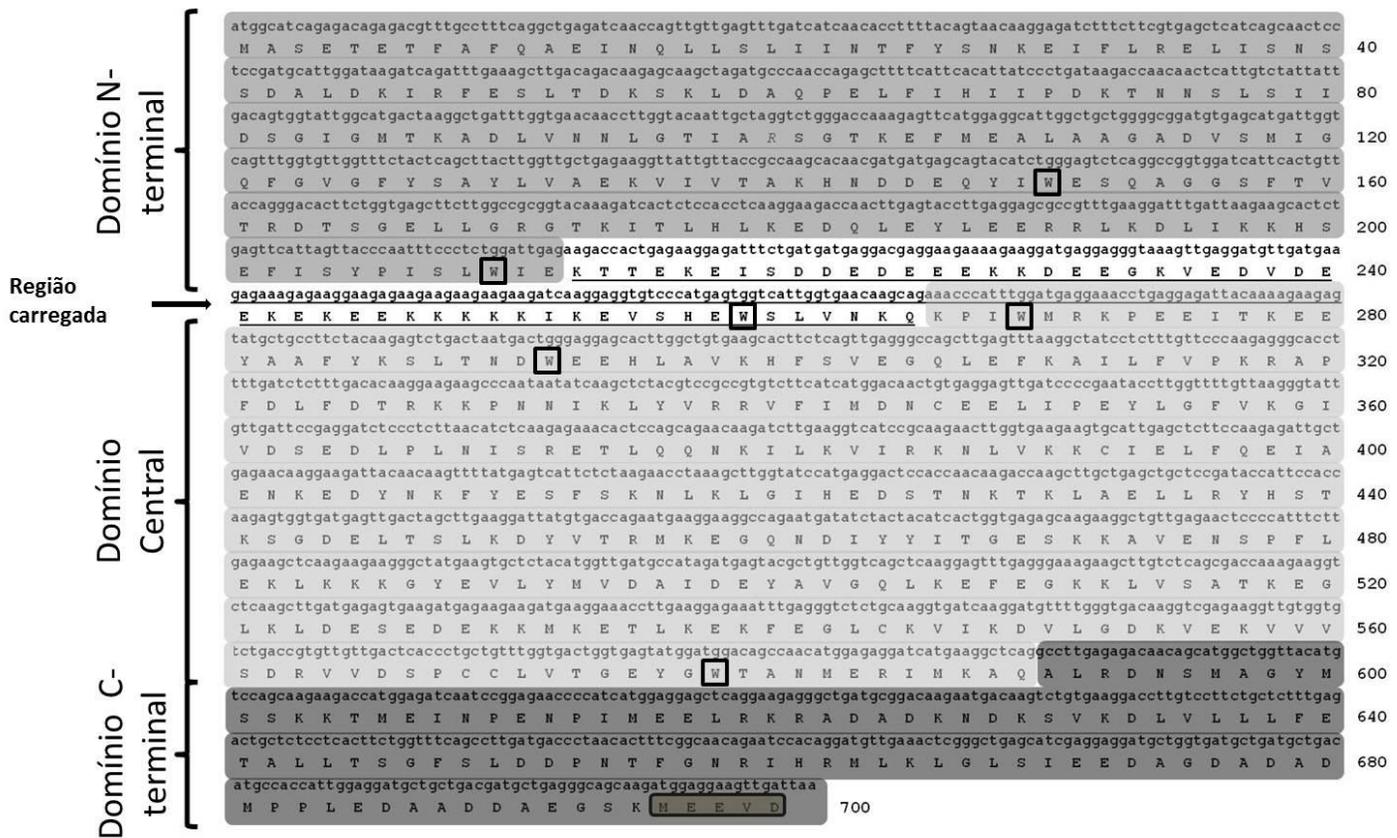


Figura 9: Alinhamento das sequências das Hsp90a e b de *C. sinensis*.



**Figura10:** Alinhamento entre as Hsp90 encontradas em *C. sinensis* e outros homólogos de eucariotos (A). Um dendograma de similaridade de sequência das Hsp90 de seis organismos eucariotos está representado em B.



**Figura 11:** Sequência e distribuição de domínios da Hsp90 de *C. sinensis*. A sequência de nucleotídeos da *hsp90* está acompanhada da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína. As regiões correspondentes aos domínios internos da Hsp90 estão evidenciados com retângulos em escala de cinza, e a região carregada, que conecta o domínio c-terminal ao domínio central, está sublinhada. O motivo MEEVD (no domínio c-terminal), é responsável pela interação com domínios TPR de co-chaperonas.

---

**Sequência de DNA**

---

Hsp90 de  
*C. sinensis*

```

ATGGCATCAG AGACAGAGAC GTTTGCCTTT CAGGCTGAGA TCAACCAGTT GTTGAGTTTG
ATCATCAACA CCTTTTACAG TAACAAGGAG ATCTTTCTTC GTGAGCTCAT CAGCAACTCC
TCCGATGCAT TGGATAAGAT CAGATTTGAA AGCTTGACAG ACAAGAGCAA GCTAGATGCC
CAACCAGAGC TTTTCATTCA CATTATCCCT GATAAGACCA ACAACTCATT GTCTATTATT
GACAGTGGTA TTGGCATGAC TAAGGCTGAT TTGGTGAACA ACCTTGGTAC AATTGCTAGG
TCTGGGACCA AAGAGTTCAT GGAGGCATTG GCTGCTGGGG CGGATGTGAG CATGATTGGT
CAGTTTGGTG TTGGTTTCTA CTCAGCTTAC TTGGTTGCTG AGAAGGTTAT TGTTACCGCC
AAGCACAACG ATGATGAGCA GTACATCTGG GAGTCTCAGG CCGGTGGATC ATTCACTGTT
ACCAGGGACA CTCTGGTGA GCTTCTTGGC CGCGGTACAA AGATCACTCT CCACCTCAAG
GAAGACCAAC TTGAGTACCT TGAGGAGCGC CGTTTGAAGG ATTTGATTAA GAAGCACTCT
GAGTTCATTA GTTACCCAAT TTCCCTCTGG ATTGAGAAGA CCACTGAGAA GGAGATTTCT
GATGATGAGG ACGAGGAAGA AAAGAAGGAT GAGGAGGGTA AAGTTGAGGA TGTTGATGAA
GAGAAAGAGA AGGAAGAGAA GAAGAAGAAG AAGATCAAGG AGGTGTCCA TGATGGTCA
TTGGTGAACA AGCAGAAACC CATTTGATG AGGAAACCTG AGGAGATTAC AAAAGAAGAG
TATGCTGCC TCTACAAGAG TCTGACTAAT GACTGGGAGG AGCACTTGGC TGTGAAGCAC
TTCTCAGTTG AGGGCCAGCT TGAGTTTAAAG GCTATCCTCT TTGTTCCCAA GAGGGCACCT
TTTGATCTCT TTGACACAAG GAAGAAGCCC AATAATATCA AGCTCTACGT CCGCCGTGTC
TTCATCATGG ACAACTGTGA GGAGTTGATC CCCGAATACC TTGGTTTTGT TAAGGGTATT
GTTGATTCCG AGGATCTCCC TCTTAACATC TCAAGAGAAA CACTCCAGCA GAACAAGATC
TTGAAGGTCA TCCGCAAGAA CTTGGTGAAG AAGTGCATTG AGCTCTTCCA AGAGATTGCT
GAGAACAAGG AAGATTACAA CAAGTTTTAT GAGTCATTCT CTAAGAACCT AAAGCTTGGT
ATCCATGAGG ACTCCACCAA CAAGACCAAG CTTGCTGAGC TGCTCCGATA CCATTCCACC
AAGAGTGGTG ATGAGTTGAC TAGCTTGAAG GATTATGTGA CCAGAATGAA GGAAGGCCAG
AATGATATCT ACTACATCAC TGGTGAGAGC AAGAAGGCTG TTGAGAACTC CCCATTTCTT
GAGAAGCTCA AGAAGAAGGG CTATGAAGTG CTCTACATGG TTGATGCCAT AGATGAGTAC
GCTGTTGGTC AGCTCAAGGA GTTTGAGGGA AAGAAGCTTG TCTCAGCGAC CAAAGAAGGT
CTCAAGCTTG ATGAGAGTGA AGATGAGAAG AAGATGAAGG AAACCTTGAA GGAGAAAATTT
GAGGGTCTCT GCAAGGTGAT CAAGGATGTT TTGGGTGACA AGGTCGAGAA GGTGTGGTG
TCTGACCGTG TTGTTGACTC ACCCTGCTGT TTGGTGACTG GTGAGTATGG ATGGACAGCC
AACATGGAGA GGATCATGAA GGCTCAGGCC TTGAGAGACA ACAGCATGGC TGTTACATG
TCCAGCAAGA AGACCATGGA GATCAATCCG GAGAACCCCA TCATGGAGGA GCTCAGGAAG
AGGGCTGATG CGGACAAGAA TGACAAGTCT GTGAAGGACC TTGTCTTCT CATCTTTGAG
ACTGCTCTCC TCACTTCTGG TTTCAGCCTT GATGACCCTA ACACTTTCCG CAACAGAATC
CACAGGATGT TGAAACTCGG GCTGAGCATC GAGGAGGATG CTGGTGATGC TGATGCTGAC
ATGCCACCAT TGGAGGATGC TGCTGACGAT GCTGAGGGCA GCAAGATGGA GGAAGTTGAT TAA

```

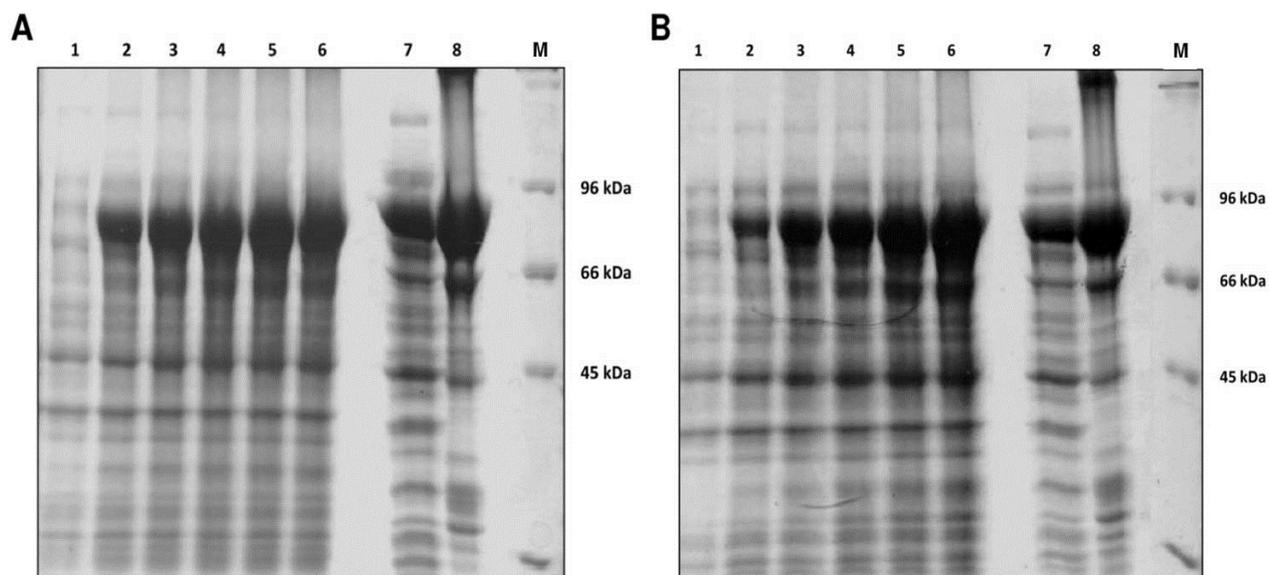
---

**Figura 12:** Sequência de DNA da Hsp90a de *C. sinensis*.

### 4.1.2 Expressão e purificação

A expressão da Hsp90 de *C. sinensis*, de 80,02 kDa, como previsto pela estrutura primária, clonada em vetor pET-28a, fusionada á uma cauda de histidina, de 2,17 kDa, foi testada nas cepas BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pRARE. Em ambas as cepas, foi possível observar a expressão da proteína recombinante. Ambas as expressões foram bem sucedidas, e não ocorreram diferenças de expressão entre

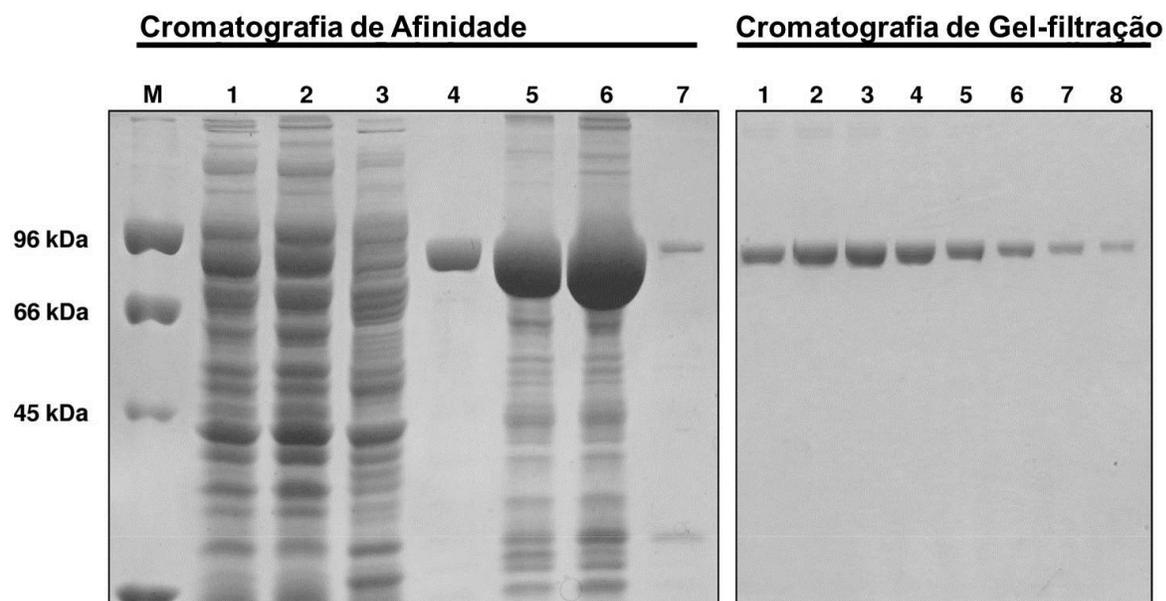
as cepas. Uma fração da proteína purificada foi obtida na porção solúvel da indução (Figura 13).



**Figura 13:** Expressão da proteína recombinante Hsp90 de *C. sinensis*. As bandas de 82 kDa podem ser vistas entre as marcações de 96 e 66 kDa do marcador. A) Expressão em BL21 (DE3). B) Expressão em BL21 (DE3) pRARE. Ambos os géis seguem a seguinte sequência: 1) Não induzido. 2) 1 h de indução. 3) 2 h de indução. 4) 3 h de indução. 5) 4 h de indução. 6) 5 h de indução. 7) Sobrenadante de 5 h de indução. 8) Precipitado de 5 h de indução. M: Marcador de massa molecular.

Para a purificação da Hsp90 de *C. sinensis* foram utilizados dois passos cromatográficos (Figura 14). Primeiramente foi feita uma cromatografia de afinidade a níquel, utilizando a coluna HiTrap Chelating 1 x 5 ml (Amersham Pharmacia Biotech). Neste passo, uma grande quantidade de proteína é eluída da resina, porém com baixo grau de pureza. Em seguida, uma cromatografia de gel-filtração, utilizando a coluna HiLoad Superdex 200 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech) foi realizada na tentativa de aumentar ainda mais a pureza da amostra. Todas essas purificações foram realizadas com colunas acopladas ao sistema de FPLC ('Fast Protein Liquid Chromatography') ÄKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). O

rendimento total de proteína e a pureza da amostra em cada passo do processo de purificação da Hsp90 pode ser observado na tabela 5.



**Figura 14:** SDS-Page dos passos cromatográficos utilizados na purificação da Hsp90 de *C. sinensis*. Cromatografia de afinidade: Canaleta 1: Fração solúvel após lise bacteriana; Canaleta 2 e 3: Frações sem afinidade à resina carregada com níquel. Canaleta 4: Lavagem com 50 mM de imidazol; Canaletas 5 a 7: Lavagem com 500 mM de imidazol. As frações 5 e 6 foram submetidas à cromatografia de gel-filtração: Canaletas 1 a 8: Proteína eluída e utilizada nas análises subsequêntes. M: Marcador de massa molecular.

**Tabela 5: Expressão e purificação da Hsp90 de *C. sinsesis* em *E. coli* (erro: ± 5%)**

<b>Passos de purificação</b>	<b>Proteína total (mg)<sup>a</sup></b>	<b>Proteína alvo(mg)<sup>b</sup></b>	<b>Rendimento (%)<sup>d</sup></b>	<b>Pureza aproximada (%)</b>
Extrato celular solúvel <sup>c</sup>	457	72	100	16
Proteína insolúvel no precipitado celular	143	85	-	60
Após cromatografia de afinidade	61	46	63	75
Após cromatografia de gel filtração	30	29	39	96

<sup>a</sup> A concentração de proteína total foi medida pelo método de Bradford .

<sup>b</sup> A quantidade da proteína alvo no total de proteína foi determinado por quantificação das bandas do gel por densitometria.

<sup>c</sup> O material inicial foi 1 l de cultura líquida de *E. coli* BL21 (DE3) utilizada durante a expressão.

<sup>d</sup> O rendimento da purificação foi calculado com base na quantidade da proteína de interesse em cada passo em relação à quantidade da mesma no extrato celular inicial.

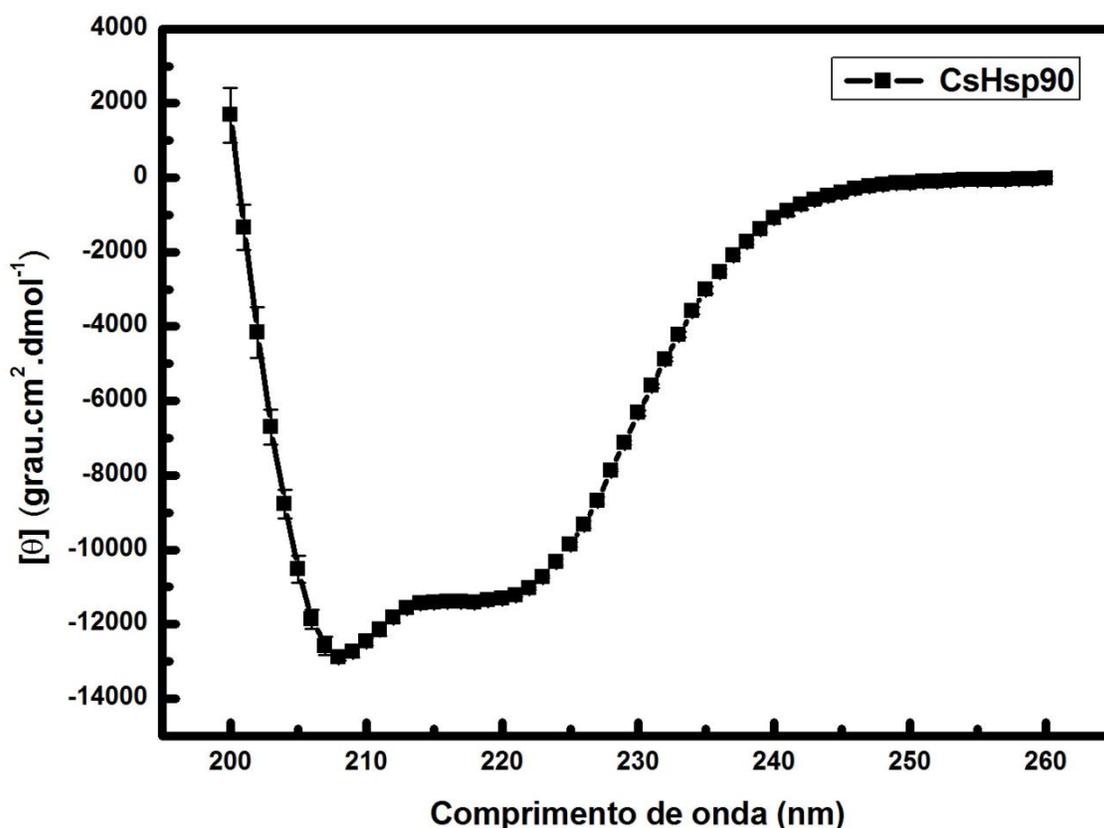
### **4.1.3 Caracterização espectroscópica da proteína recombinante Hsp90**

A proteína Hsp90, fusionada à cauda de His<sub>6</sub>, foi caracterizada por diversos métodos biofísicos. Além da caracterização da proteína em tampão, foram feitas medidas na presença de 200 µM dos nucleotídeos ATP, ADP e ATPγS (análogo do ATP de clivagem lenta). Foram coletados dados de SAXS na presença de 200 µM de ADPβS (análogo de ADP de clivagem lenta) e 50 µM de Novobiocina (inibidor da Hsp90), além dos demais aditivos descritos. Para todos os experimentos, foi utilizado um tempo de incubação de 1 h em gelo da proteína com os aditivos antes das medidas serem feitas. Os controles (sem aditivos) receberam o mesmo tratamento. Todas as medidas de CD da Hsp90 de laranja foram feitas no tampão GF.

#### **4.1.3.1 Espectros de CD**

Os espectros de dicroísmo circular da Hsp90 na ausência de ligantes foram obtidos a partir da média de quatro experimentos independentes com 32

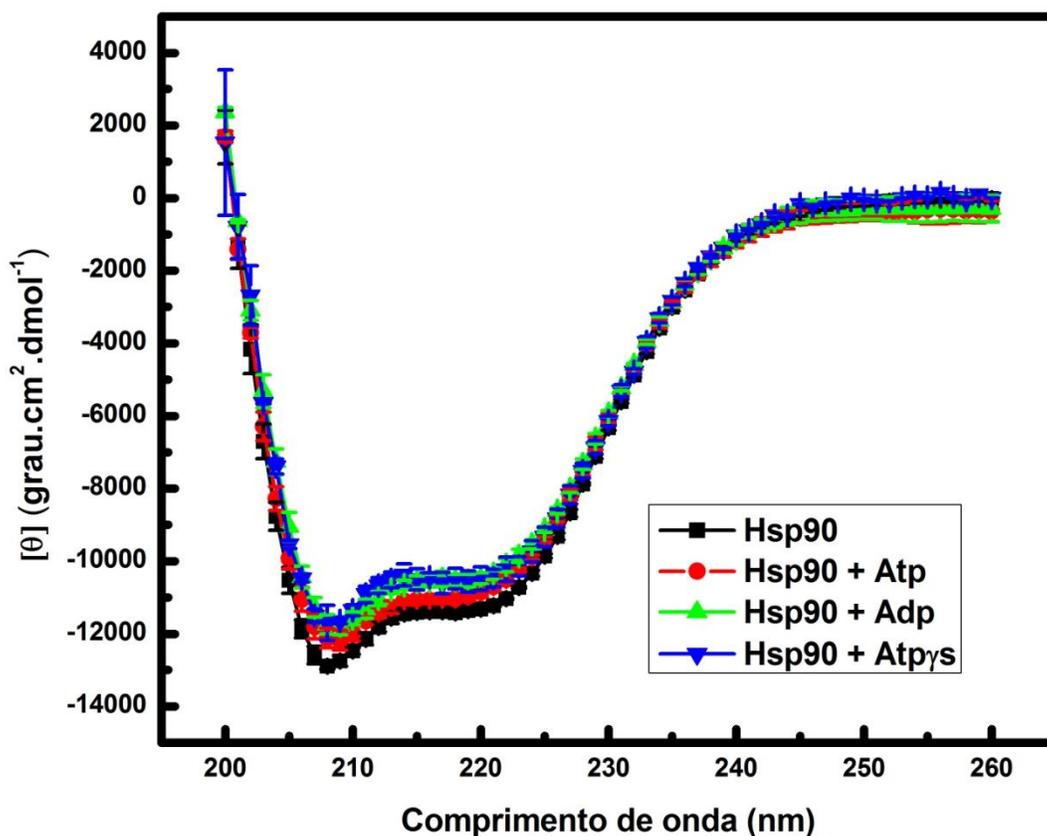
acumulações cada (Figura 15). O conteúdo de estrutura secundária da Hsp90 predito pelo CDNN foi de aproximadamente 60% de hélice alfa, 35% de folha-beta e 20% de estrutura randômica (Erro padrão =  $\pm 10\%$ ). Foram feitas predições de estrutura secundária utilizando a sequência de resíduos de aminoácidos da proteína. Foi gerada uma média dos resultados de 5 programas diferentes: GOR IV, Jpred 3, NetSurfP v 1.1, SSpro 4.5 e SSpro v 8. Segundo essa média, o conteúdo de estrutura secundária é 46% de hélice alfa, 15% de folha beta e 39% de estrutura randômica (Erro padrão =  $\pm 5\%$ ). Utilizando apenas o sinal a 222 nm, foi obtido 35% de hélice alfa.



**Figura 15:** Espectro de CD da Hsp90 de *C. sinensis* na ausência de ligantes. A elipticidade molar residual  $[\theta]$  foi medida de 200 a 260 nm a 20°C com a proteína em solução em tampão GF. Os mínimos em 222 e 208 nm indicam que a proteína está enovelada.

Para as medidas na presença de ligantes foram feitos três experimentos independentes com 16 acumulações para cada uma das condições. Não foram

observadas grandes alterações nos espectros de CD da proteína nas condições analisadas (Figura 16).

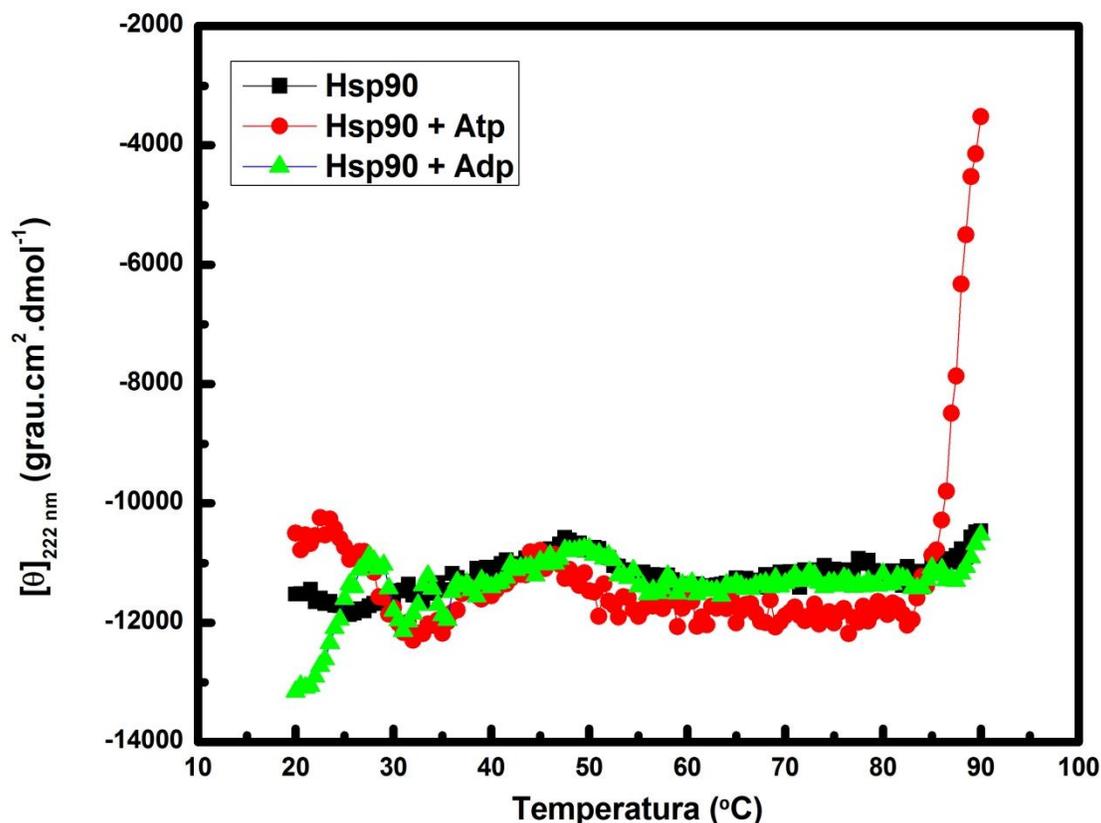


**Figura 16:** Espectro de CD da proteína Hsp90 na presença de ligantes. A Hsp90 foi submetida a análises de CD em uma concentração de aproximadamente 3  $\mu\text{M}$  no tampão GF, em cubetas de 1 mm de caminho óptico, com temperatura constante a 25°C. Os experimentos foram realizados em um espectropolarímetro acoplado a um banho-maria externo e a um controlador interno de temperatura tipo Peltier. Os dados foram tratados com o programa Origin<sup>®</sup> Pro 8. Não há alteração dentro do erro.

#### 4.1.3.2 Estabilidade térmica

Para os experimentos de desenovelamento térmico, foram utilizadas concentrações de aproximadamente 3,0  $\mu\text{M}$  da Hsp90. Estes experimentos foram feitos acompanhando o sinal a 222 nm da proteína em solução a cada 1°C de 20°C a 90°C, a fim de visualizar alterações na quantidade de estrutura em hélice alfa (Figura 17). Não foram feitas medidas com a adição de ATP $\gamma$ S. A Hsp90 de laranja

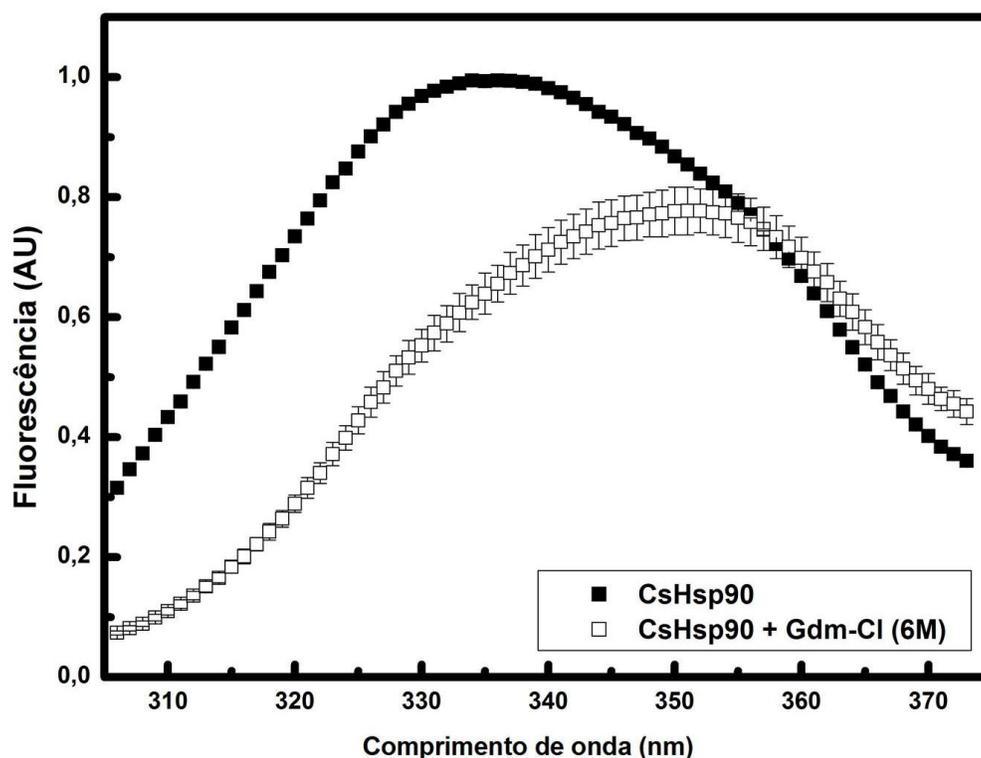
mostrou-se bastante estável nestas condições até a temperatura de 90°C. Assim como não foi observada perda de sinal a 222 nm durante o aumento da temperatura, também não foram observadas alterações no sinal a 222 nm durante o processo de resfriamento, de 90 a 20°C (dados não mostrados), confirmando a tolerância desta proteína a grandes alterações de temperatura.



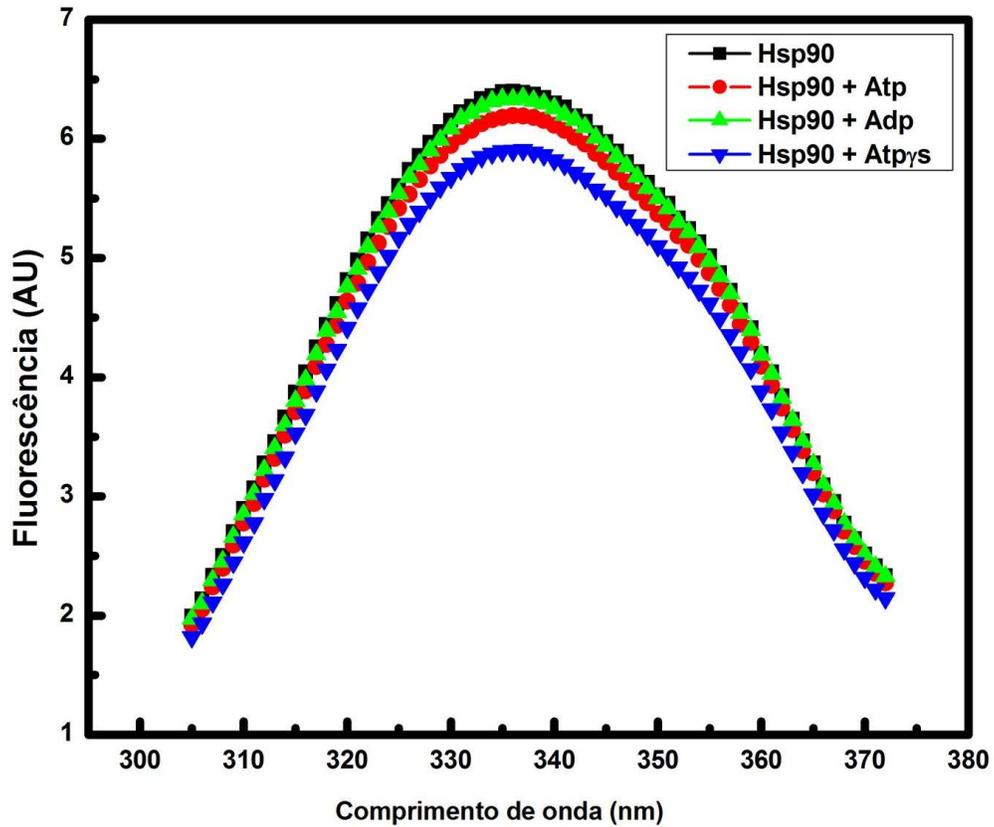
**Figura 17:** Desenovelamento térmico da Hsp90. As amostras de Hsp90 na concentração de  $3,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$  foram submetidas a aquecimento de 20 a 90°C na ausência e presença de 200  $\mu\text{M}$  dos diferentes ligantes testados no experimento de desenovelamento térmico acompanhado por CD, com comprimento de onda fixo em 222 nm. A Hsp90 manteve-se estável durante o aumento da temperatura na presença e ausência dos diferentes ligantes.

### 4.1.3.3 Espectros de fluorescência intrínseca

Foram analisados os espectros de fluorescência de triptofano da Hsp90 de laranja na ausência e presença de nucleotídeos (Figuras 18 e 19). A Hsp90 de laranja possui seis triptofanos em sua estrutura primária, como mostrado na figura 11. Os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  e centro de massa dos espectros de cada uma das medidas estão resumidos na tabela 6.



**Figura 18:** Espectro de emissão de fluorescência dos triptofanos da Hsp90. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 295 nm e a emissão, de 300 a 450 nm em tampão GF, na ausência e presença 6 M do agente denaturante cloreto de guanidina (Gdm-Cl). Os espectros de fluorescência revelam que a maior parte dos seis triptofanos da Hsp90 encontra-se enterrados em sua estrutura terciária. O  $\lambda_{\text{máx}}$  observado para a Hsp90 em estado nativo foi  $338 \pm 1$  nm e o centro de massa,  $336 \pm 1$  nm. Na presença de 6 M Gdm-Cl o  $\lambda_{\text{máx}}$  se altera para  $351 \pm 1$  nm e o centro de massa para  $352 \pm 1$  nm.



**Figura 19:** Fluorescência do triptofano da Hsp90 de laranja na presença de ligantes. Espectros da fluorescência dos triptofanos da Hsp90 de laranja na presença e ausência de nucleotídeos. Os experimentos foram realizados em tampão GF, e temperatura constante de 25 °C.

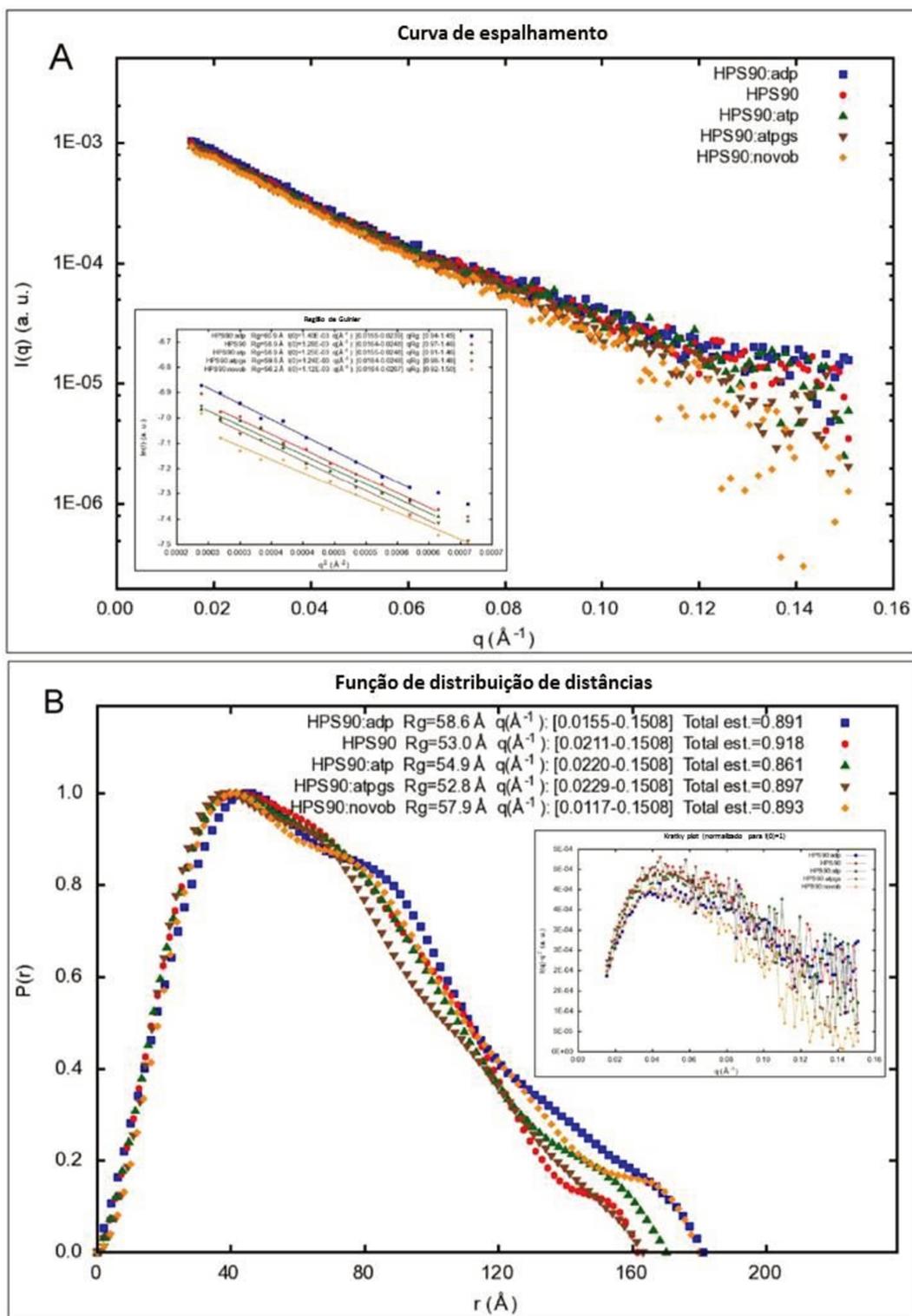
**Tabela 6: Resumo dos dados de fluorescência de triptofano da Hsp90 de laranja.**

	<b>Centro de massa (nm)</b>	<b><math>\lambda</math> máx (nm)</b>
<b>Sem nucleotídeos</b>	<b>338</b>	<b>336</b>
<b>+ATP</b>	<b>338</b>	<b>336</b>
<b>+ADP</b>	<b>338</b>	<b>337</b>
<b>+ATP<math>\gamma</math>S</b>	<b>338</b>	<b>337</b>
<b>+Gdm-Cl</b>	<b>352</b>	<b>351</b>

\*Erro padrão =  $\pm$  1 nm.

#### **4.1.3.4 SAXS**

Foram feitas coletas da Hsp90 de *C. sinensis*, na concentração de 2,25 mg/ml (aproximadamente 27  $\mu$ M), nas condições com e sem ligantes, em tampão Tris 10 mM, pH 7,4, seguindo as condições de incubação descritas no tópico 4.1.3 dos resultados. Foram feitas coletas na ausência de aditivos, e na presença de ATP, ADP, ATP $\gamma$ S, ADP $\beta$ S, e Novobiocina (Figura 20). Os dados coletados forneceram um raio de giro de aproximadamente 59 Å, e uma massa de aproximadamente 160 kDa, confirmando a dimerização da proteína nestas condições.



**Figura 20:** Medidas SAXS da Hsp90 na presença e ausência de ligantes. Os ligantes ATP, ADP, ATP $\gamma$ S, ADP $\beta$ S foram utilizados na concentração final de 200  $\mu$ M, enquanto a novobiocina foi adicionada numa concentração final de 50  $\mu$ M. A) Curva experimental de SAXS da Hsp90 nas diferentes condições e seus respectivos ajustes teóricos calculados utilizando o programa GNOM. Inset: Região de Guinier e ajuste linear. B) Função de distribuição de distâncias  $p(r)$ . Inset: Kratky plot da curva de intensidade.

Foram então gerados 40 modelos para cada condição, com simetria P2 e eixo de simetria livre utilizando o programa Dammin. Foi feita então uma triagem inicial desses modelos, utilizando os dados estruturais dos homólogos de Hsp90 disponíveis na literatura. Os modelos selecionados nessa triagem inicial foram então submetidos a uma análise *in silico* utilizando o programa, HydroPro. Os dados de coeficiente de difusão  $D$ , obtido em medidas de DLS, coeficiente de sedimentação  $s$ , raio hidrodinâmico  $R_S$  e raio de giro  $R_g$  para cada modelo, fornecidos pelo programa HydroPro, foram comparados aos dados experimentais alcançados anteriormente para a Hsp90 de laranja e dados experimentais disponíveis na literatura para homólogos de Hsp90 de outros organismos (Garnier *et al.*, 2002), além dos mesmos dados fornecidos pelo mesmo programa para as estruturas cristalográficas dos homólogos já conhecidos (tabela 7). Com base nestas comparações, foram selecionados modelos para a Hsp90 apo e na presença de ADP (Figura 21).

**Tabela 7: Análise comparativa dos parâmetros hidrodinâmicos das Hsp90 de diferentes organismos.**

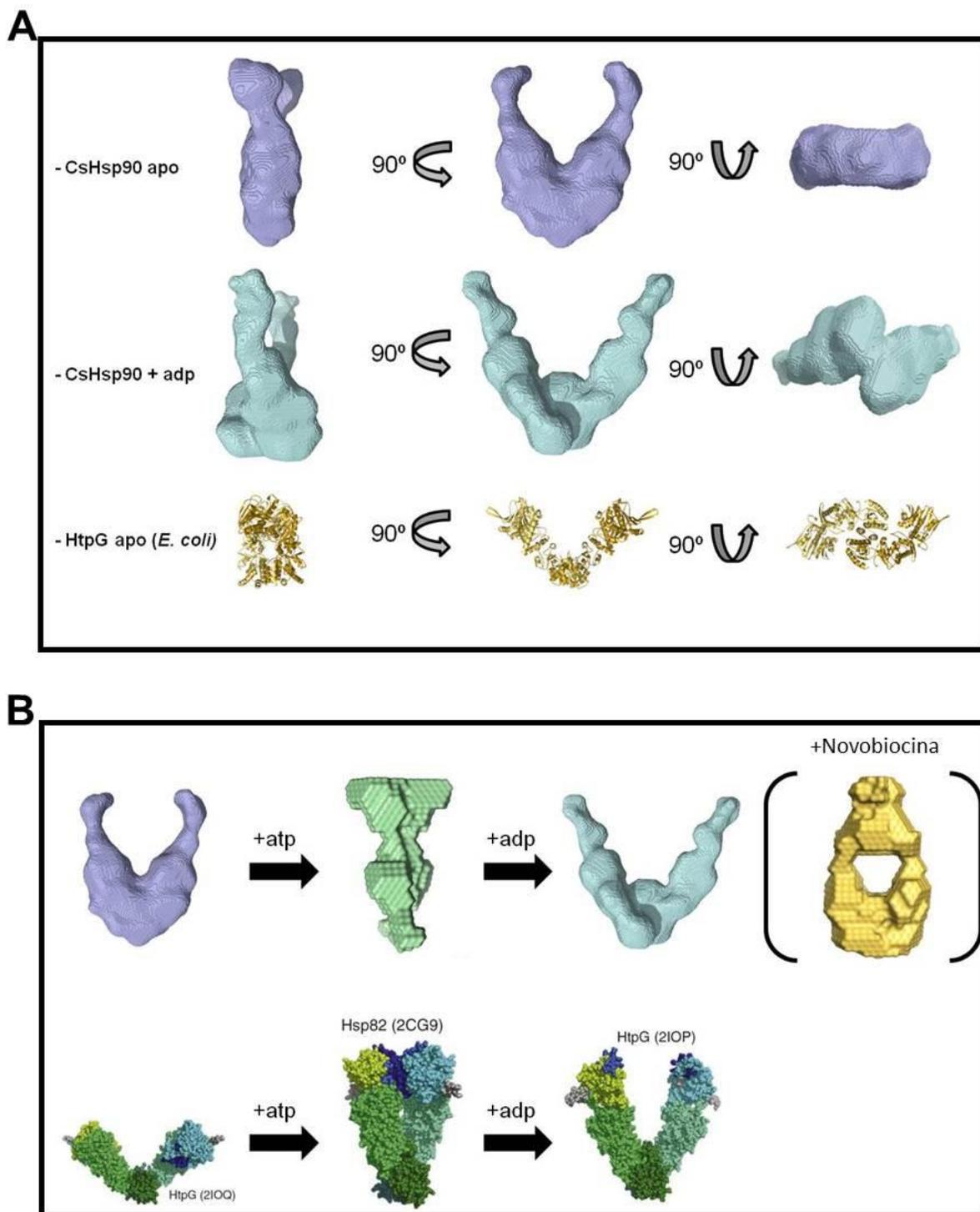
Proteína	Massa Molar (kDa)	R <sub>Stokes</sub> (x10 <sup>-7</sup> cm)*	S (Svedberg)*	D (x10 <sup>-7</sup> cm <sup>2</sup> /s)*
Hsp90 <sup>a</sup> apo		6,2 ± 2	-	3,3
Hsp90 <sup>a</sup> + ATP	152 ± 3 <sup>b</sup>	-	-	3,5
Hsp90 <sup>a</sup> + ADP		-	-	3,1
HtpG apo	142,8	6,2	6,0	3,4
Hsp90 (cérebro suíno) <sup>a</sup>	164 ± 10	6,5	6,1	3,3
Hsp90 apo (SAXS)		6,1	6,4	3,4
Hsp90 + ATPys (SAXS)		5,7 ± 1 <sup>c</sup>	6,9 ± 1 <sup>c</sup>	3,7 ± 0,5 <sup>c</sup>
Hsp90 + ADP (SAXS)	152 ± 3 <sup>b</sup>	6,8	5,8	3,1
Hsp90 + novobiocina (SAXS)		5,6 ± 1 <sup>c</sup>	7,1 ± 1 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Retirado de Garnier *et al.* 2002.

<sup>b</sup> Valor obtido experimentalmente por SEC-MALS,

<sup>c</sup> Dado médio obtido para os modelos,

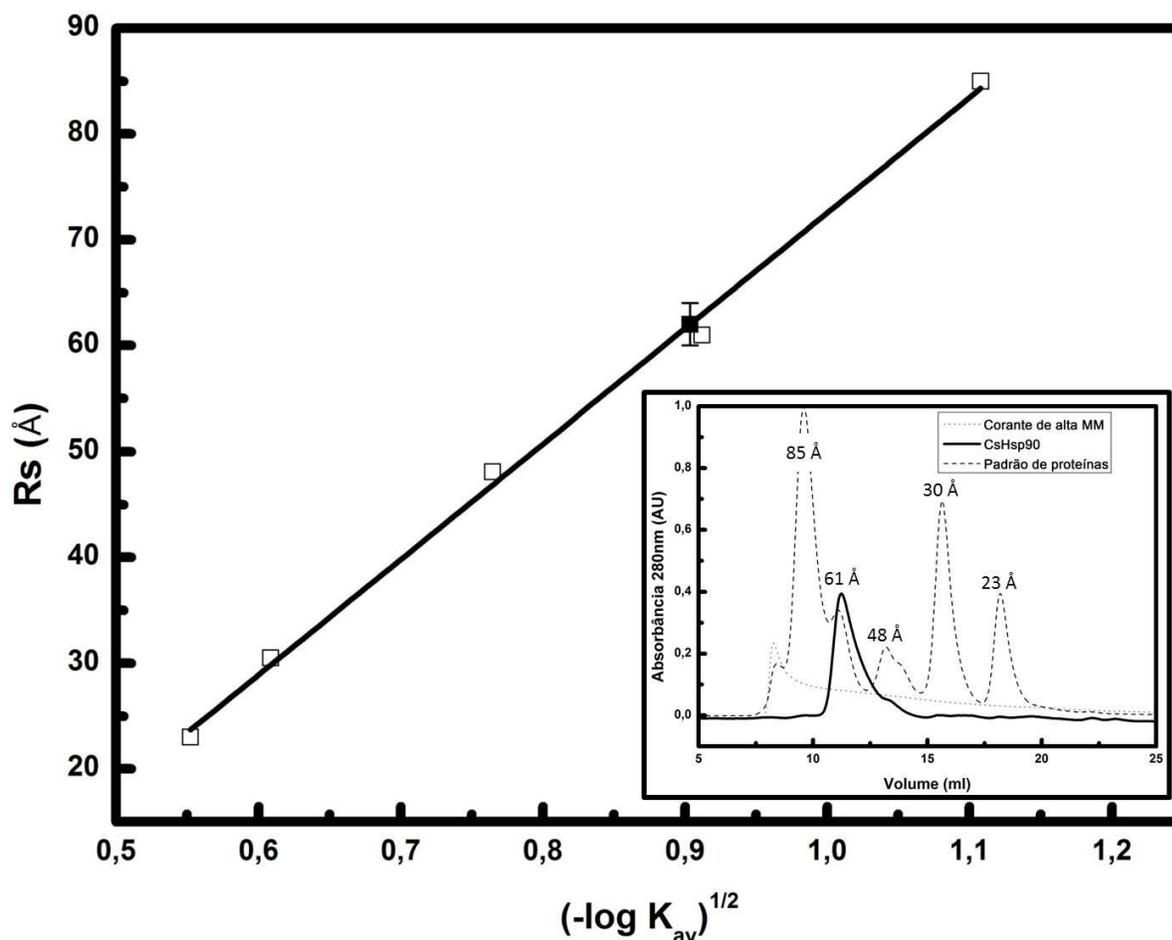
\*Com exceção aos dados experimentais (a), estes resultados foram obtidos utilizando o programa HYDROPRO,



**Figura 21:** Comparação dos modelos *ab initio* obtidos por SAXS para a Hsp90 de laranja com as estruturas já depositadas. Em A e B estão representados os modelos encontrados para Hsp90 em solução para as dadas condições em comparação com as estruturas de Hsp90s previamente conhecida.

#### 4.1.4 Gel-filtração analítica e SEC-MALS

As análises de gel filtração analítica possibilitaram prever o  $R_s$  da Hsp90 de laranja em tampão GF, a 25°C, com base nos raios previamente conhecidos das proteínas do padrão (Figura 22). Além disso, foi possível obter uma noção sobre o formato da molécula em solução, a partir do fator de Perrin. Os dados obtidos estão resumidos na tabela 8. Os experimentos foram repetidos quatro vezes.



**Figura 22:** Gel-filtração analítica da Hsp90 de laranja. Ajuste linear dos raios de Stokes conhecidos em função do coeficiente de partição ( $K_{av}$ ). O ponto em preto é o coeficiente de partição Hsp90, que corresponde a um raio de  $62 \pm 2$  Å. Inset: Padrão de eluição da Hsp90 (linha preta), a mistura do padrão de proteínas com raio conhecido (linha pontilhada), e o corante Blue Dextran, de alta massa molecular (linha cinza), foram carregados na coluna de gel filtração. O tamanho, em Å, de cada uma das proteínas padrão utilizadas, está em evidência acima dos seus respectivos picos de eluição, ao longo da linha pontilhada.

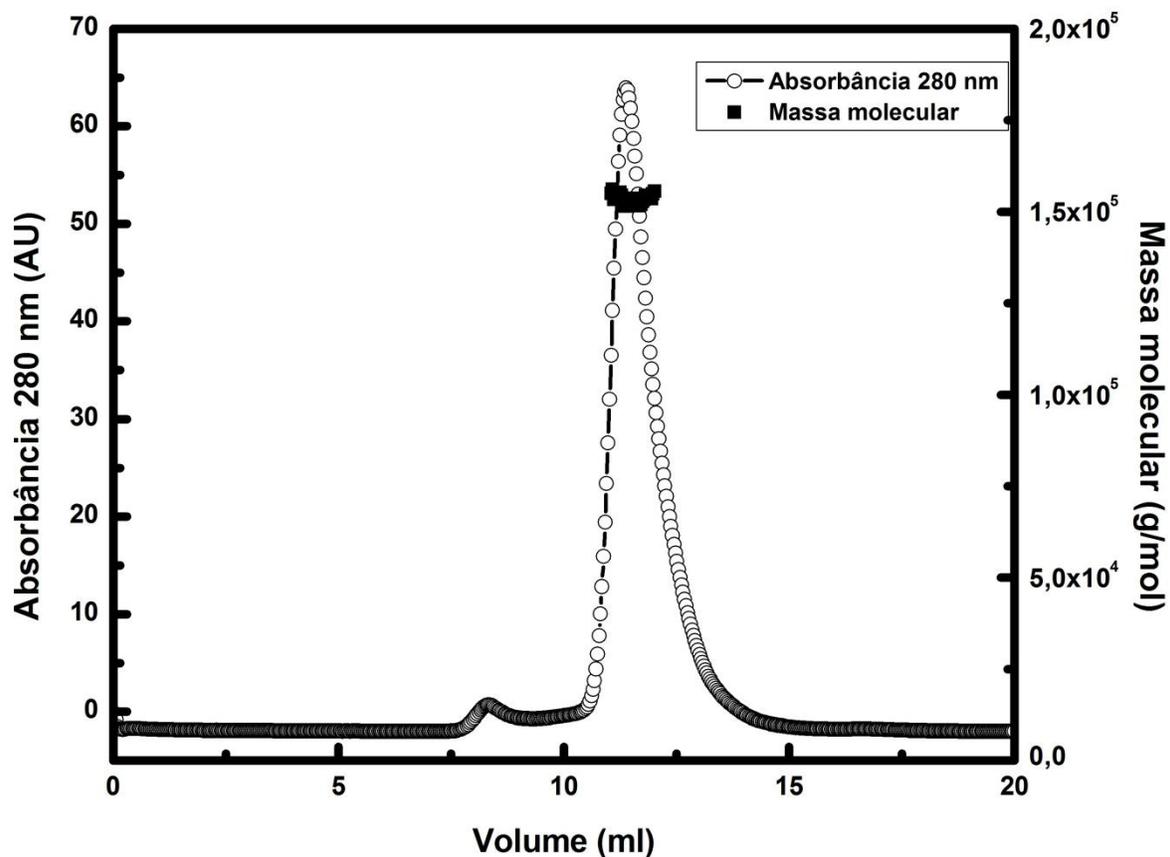
**Tabela 8: Parâmetros hidrodinâmicos da Hsp90 de laranja.**

	<b>*Massa molecular predita do dímero (kDa)</b>	<b>**Rs predito p/ dímero (Å)</b>	<b>Rs observado (Å)</b>	<b>f/fo (dímero)</b>
<b>Hsp90</b>	<b>164</b>	<b>36,3</b>	<b>62 ± 2</b>	<b>1,7</b>

\*\*A partir da estrutura primária.

\*\*Raio predito para uma esfera rígida com a mesma massa da molécula em análise.

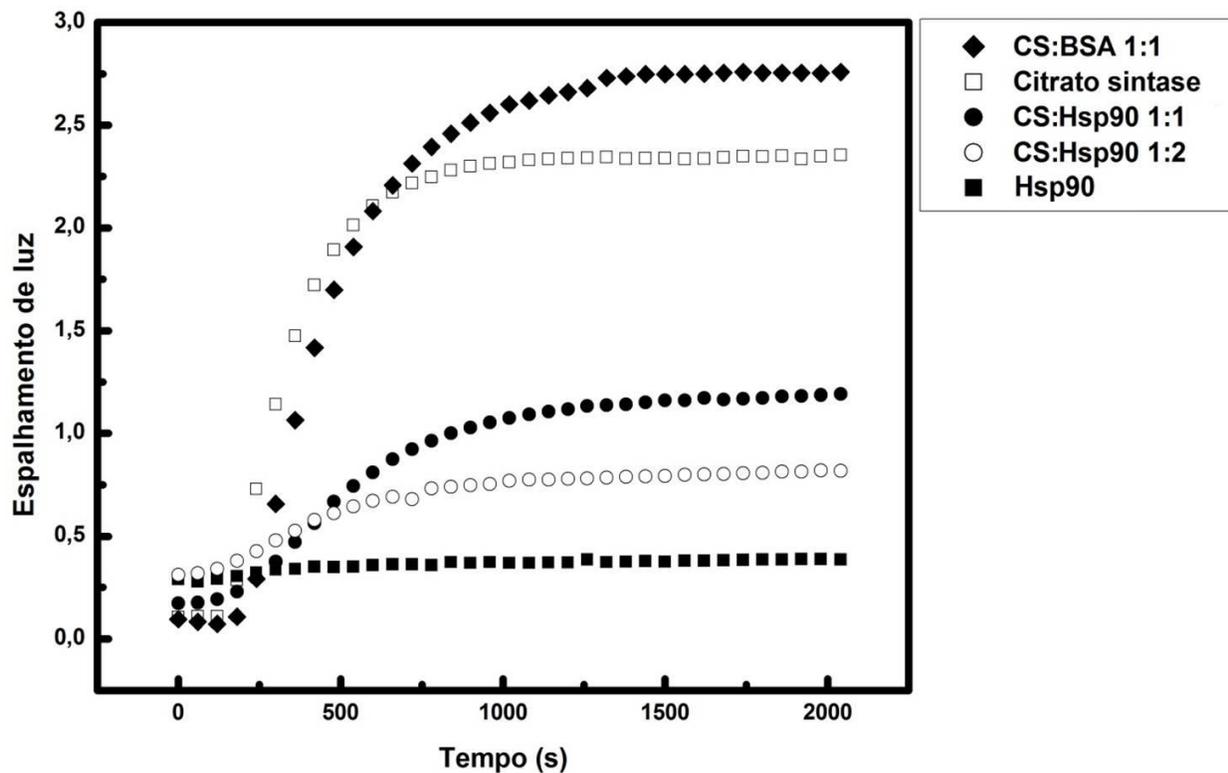
Em paralelo às análises de gel filtração analítica, foi utilizada a metodologia de SEC-MALS, com intuito de identificar a massa real da Hsp90 em solução (Figura 23). Os experimentos foram realizados em tampão GF, a 20°C. Os experimentos com a proteína foram feitos em triplicata. Os dados apontam que a amostra está monodispersa em solução, apresentando uma massa de  $152 \pm 3$  kDa, próxima da massa predita pela estrutura primária para o dímero (aproximadamente 164 kDa).



**Figura 23:** Hsp90 analisada por SEC-MALS. A absorbância a 280 nm detectada devido à eluição da proteína (quadrados brancos) estão representados em relação às massas moleculares correspondentes (quadrados pretos). A Hsp90 apresenta-se monodispersa em solução, com uma massa molecular de  $152 \pm 3$  kDa.

#### 4.1.5 Proteção contra a agregação da CS

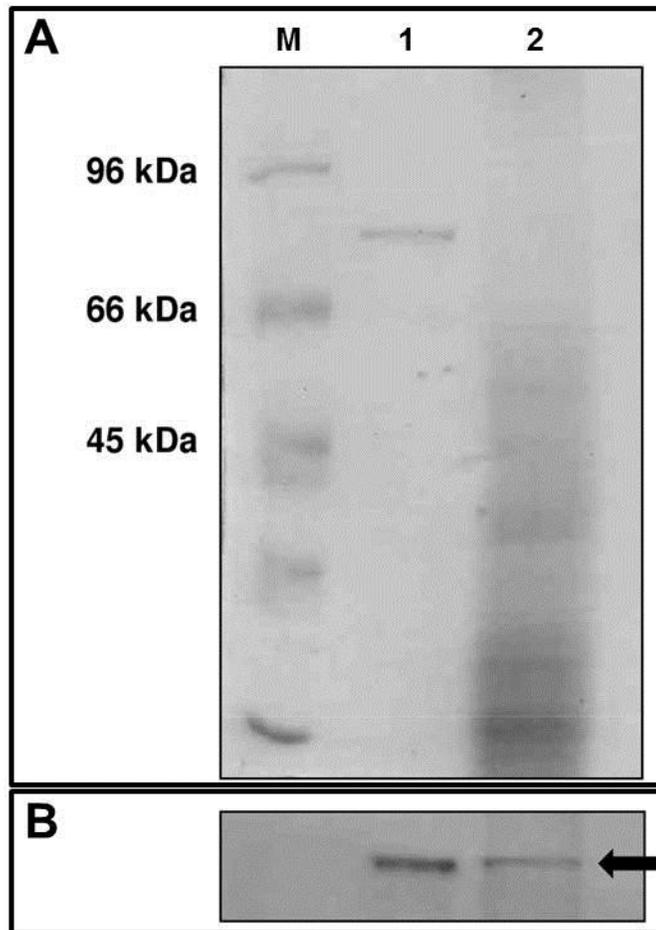
A Hsp90 foi incubada com 0,012 mg/ml de CS na mesma temperatura, alterando a concentração da Hsp90 de acordo com as proporções, avaliadas no ensaio, entre as duas proteínas. A Hsp90 foi capaz de prevenir a agregação da CS *in vitro* a 47°C (Figura 24). O BSA, utilizado como controle, não apresentou efeito protetor sobre a agregação da CS.



**Figura 24:** Proteção da agregação da CS pela Hsp90 de *C. sinensis*. A agregação induzida por temperatura da citrato sintase (CS) a 47°C foi acompanhada por espalhamento de luz a 360 nm e inibida pela Hsp90 em uma maneira concentração dependente. Foi utilizado BSA como controle.

#### 4.1.6 Identificação *in vivo* por *western blot*

Com o auxílio de um anticorpo policlonal para a Hsp90 recombinante de *C. sinensis*, identificou-se a presença desta proteína diretamente em extrato de tecido vegetal. O experimento foi feito com tecido foliar de *C. sinensis*. Foi possível identificar, por *western blot*, uma banda definida com massa molecular equivalente à da Hsp90 recombinante, indicando a expressão desta proteína na planta (Figura 25).



**Figura 25:** Análise por SDS-PAGE e *western blot* da Hsp90 de *C. sinensis* em tecido vegetal. A) A Hsp90 purificada (canaleta 1) e o extrato de planta (canaleta 2) foram analisados em SDS-PAGE 10% corado com Comassie blue. O marcador de massa molecular está representado na canaleta M. B) Análise de *western blot* da Hsp90 em tecido vegetal. A seta indica a banda referente à Hsp90 identificada no extrato de *C. sinensis*.

#### 4.1.7 Ensaio de duplo-híbrido

Foi realizado um ensaio de duplo-híbrido utilizando como isca a Hsp90 de *C. sinensis*, clonada em vetor pOBD, contra a biblioteca de *Xac*. Foram feitos testes a fim de verificar a ocorrência de auto-ativação dos genes repórteres utilizados no ensaio. Não foi observada auto-ativação de nenhum dos genes repórteres testados.

Foram obtidos 300 colônias nas placas contendo 1 mM de 3-AT e 11 colônias nas placas contendo 3 mM de 3-AT, as quais foram repicadas em placas com meio

SC-WLH acrescido de 3 mM de 3-AT, retirando também adenina de sua composição, aumentando assim sua estringência. Após o período de incubação, foi observado crescimento em 296 colônias do total de 311 isoladas da primeira transformação.

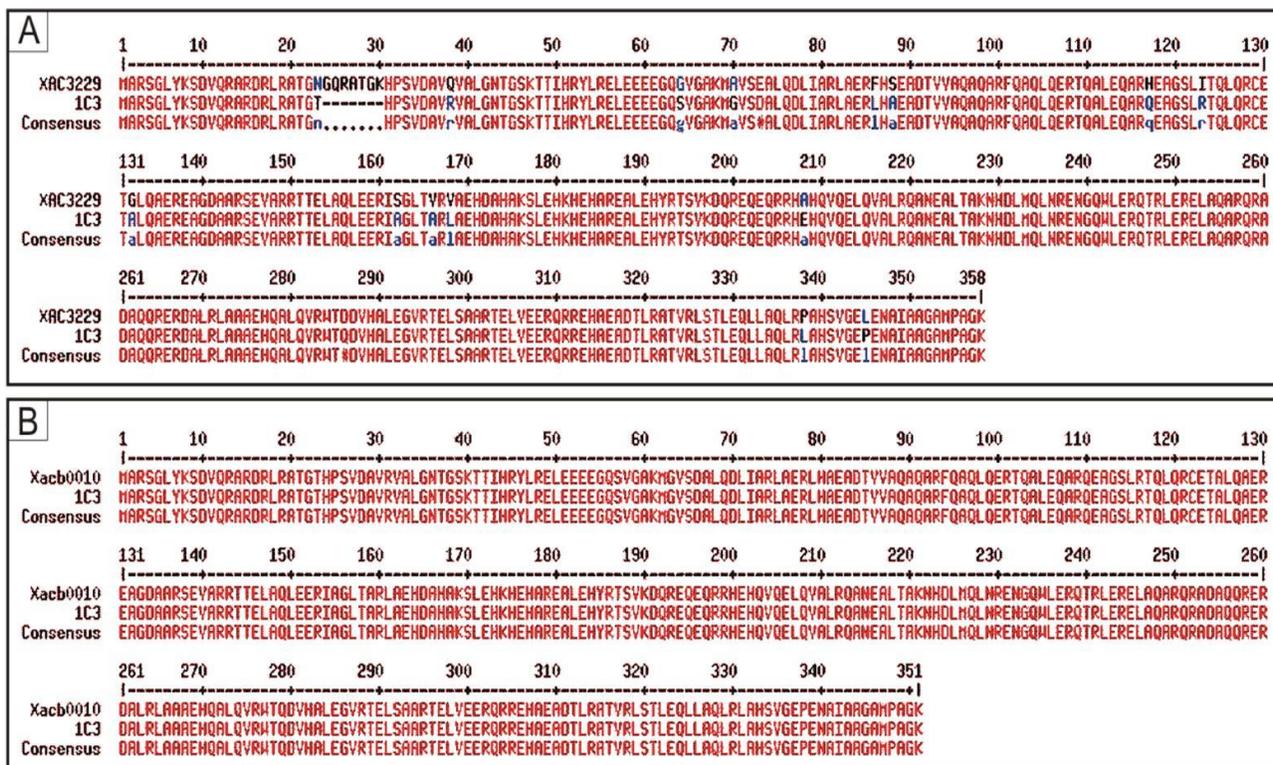
Não foi possível recuperar os plasmídeos de todos os 296 clones para seqüenciamento. Apenas 36 clones (aproximadamente 12% do total de colônias) foram sequenciados (tabela 9).

**Tabela 9: ORFs de *Xac* isoladas durante o ensaio de duplo-híbrido, utilizando como isca a Hsp90a de *C. sinensis*.**

Produto gênico encontrado	Quadro de leitura	e-value	Redundância
Cointegrase orf T	+1/+2/+3	$3e^{-104}$ (média)	25
Integrase	+2	$1e^{-56}$	1
Proteína de transporte	+3	$5e^{-65}$	1
Transposase Tn5044	-2	$2e^{-96}$	1
Proteína hipotética XAC0145	-1	$1e^{-178}$	1
Xilosidase	-2	$5e^{-143}$	1

Vinte e cinco clones dos 36 sequenciados eram referentes ao gene XACb0010, relativo a uma Cointegrase de *Xac*. A *Xac* possui duas seqüências de cointegrase em seu genoma: uma delas presente em seu cromossomo, com o nome de XAC3229, e outra presente no mega plasmídeo pXAC64, com o nome de XACb0010. O alinhamento das seqüências encontradas em banco de dados com a seqüência isolada mostrou que todas as presas identificadas como Cointegrase no duplo-híbrido eram referente ao gene XACb0010 (Figura 26). A interação desta Cointegrase com a Hsp90 de *C. sinensis*, por sua alta redundância, foi considerada bastante significativa. Por esse motivo, foram realizados testes a fim de verificar se tal interação realmente estaria ocorrendo, ou se era fruto de auto-ativação por parte da presa. As presas encontradas em quadros de leitura negativos não são

corretamente transcritas na levedura, e devido a isso foram consideradas como falso-positivos. As outras duas interações não foram levadas adiante, devido à baixa redundância. Os clones restantes não apresentaram similaridade com nenhuma sequência depositada no banco de dados.



**Figura 26:** Alinhamento das sequências das orfs relativas à Cointegrase de *Xac*. Foi feito o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Cointegrase, de *Xac*, encontradas no banco de dados do GenBank, com a sequência isolada em duplo-híbrido. Nesta figura, a proteína Cointegrase isolada, está representada pelo clone “1C3”. A) Sequência da proteína codificada pelo gene XAC3229 (número de acesso no NCBI: NP\_643537.1), contido no cromossomo de *Xac*, com a sequência da proteína isolada. B) Sequência da proteína codificada pelo gene XACb0010 (número de acesso no NCBI: NP\_644738.1), contido no plasmídeo pXAC64 de *Xac*, com a sequência da proteína isolada.

#### 4.1.7.1 Testes de auto-ativação da Cointegrase de *Xac*

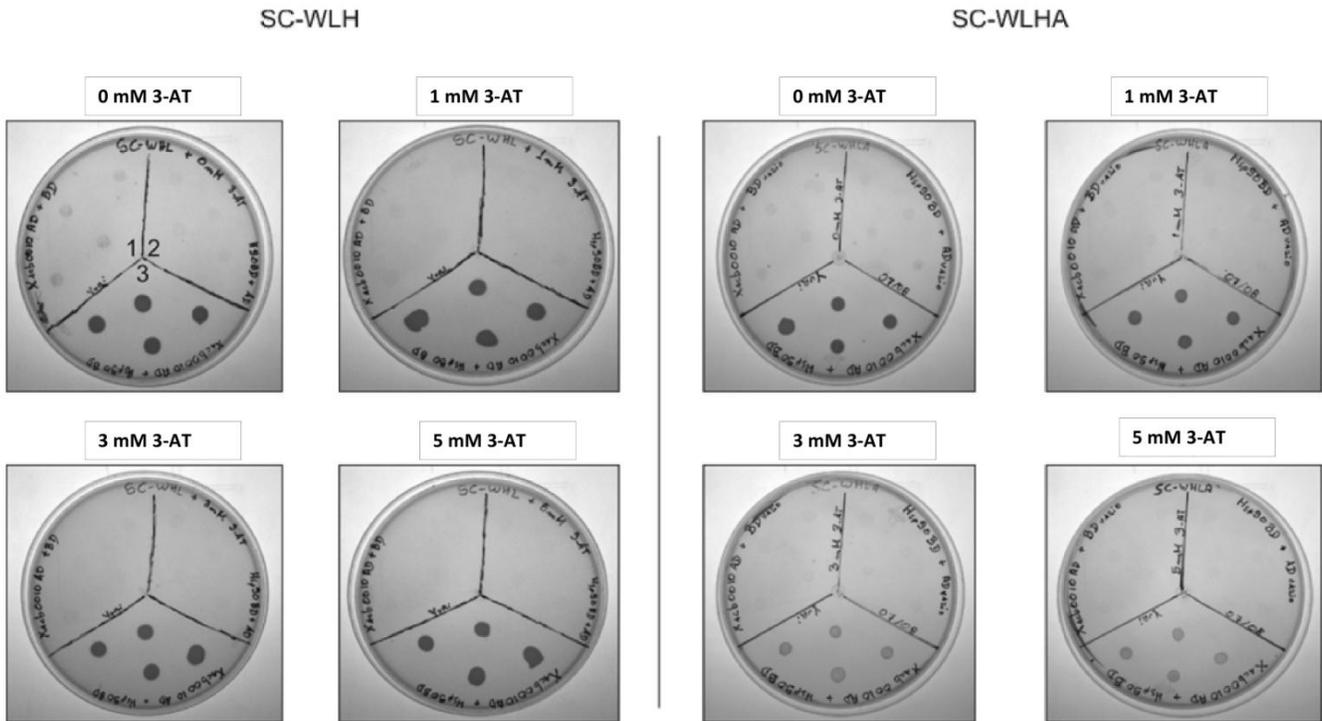
Juntamente com o teste de auto-ativação da Cointegrase de *Xac* em sistema de duplo-híbrido, foi feita a confirmação da interação entre esta e a Hsp90 de laranja.

Para isso, a levedura PJ694-a foi transformada com os plasmídeos descritos na tabela 10.

**Tabela 10: Condições utilizadas no teste de auto-ativação da Cointegrase de *Xac* em sistema de duplo-híbrido**

Plasmídeo isca(pOBD)	Plasmídeo presa (pOAD)	Condição	Meio utilizado	Concentrações de 3-AT
pOBdHsp90	pOADCointegrase	Interação	SC-WLH	
pOBdHsp90	pOAD	Controle negativo	e	0, 1, 3 e 5 mM
pOBD vazio	pOADCointegrase	Controle negativo	SC-WLHA	

Não foi observada auto-ativação dos genes *his3* e *ade2*. A interação foi confirmada novamente por duplo-híbrido (Figura 27). Foi realizado então, o teste para verificar se havia auto-ativação do gene repórter *gal4*. Neste teste, foi observada auto-ativação deste gene repórter. Apesar de ter sido observada auto-ativação de um dos três genes repórteres utilizados na técnica, a interação foi considerada positiva. A sequência referente à Cointegrase foi então clonada em vetor de expressão, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos no tópico 4.2.1.1, para a confirmação da interação *in vitro* por *pull-down*.



**Figura 27:** Testes de auto-ativação dos genes repórteres *his3* e *ade2* pela proteína Cointegrase em sistema de duplo híbrido. Cada placa está dividida em três partes: 1) pOBD vazio + pOADXACb0010. 2) pOBDHsp90 + pOAD vazio. 3) pOBDHsp90 + pOADXACb0010. Esta divisão é ilustrada na placa SC-WLH com 0 mM de 3-AT. Todas as placas seguem esse mesmo padrão.

## 4.2 Proteínas parceiras de interação da Hsp90 de laranja

### 4.2.1 Cointegrase de *Xac*

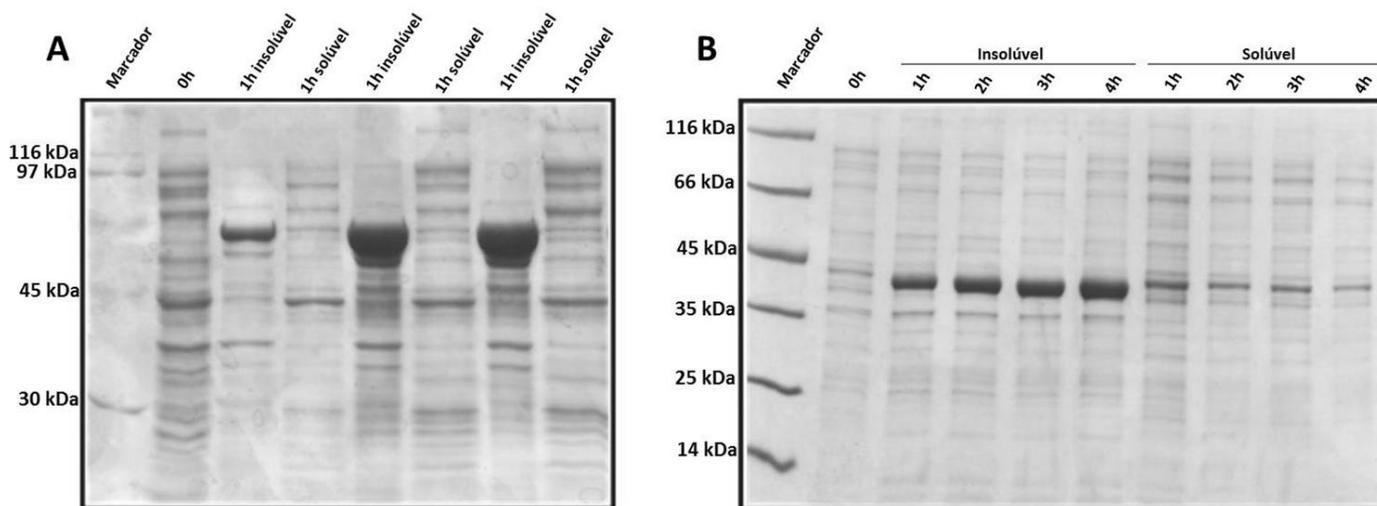
#### 4.2.1.1 Clonagem da orf XACb0010 de *Xac*, e expressão e purificação da proteína Cointegrase

O gene XACb0010 foi inteiramente sequenciado no vetor de duplo-híbrido pOAD. Oligonucleotídeos foram então desenhados para a clonagem deste gene em vetores de expressão pET-28a e pGEX 4T-1. Sua sequência de DNA possui 1056

pb. Foram adicionados sítios para enzimas de restrição às extremidades da sequência através dos oligonucleotídeos, para facilitar as subclonagens.

A proteína Cointegrase possui 39 kDa, e teve sua massa molecular aumentada para 41 kDa quando fusionada à cauda de His<sub>6</sub>, e para 66 kDa, quando fusionada à GST. As expressões dos clones da Cointegrase em vetor pGEX 4T-1 e pET 28a foram feitas de acordo com as condições apresentadas na tabela 2.

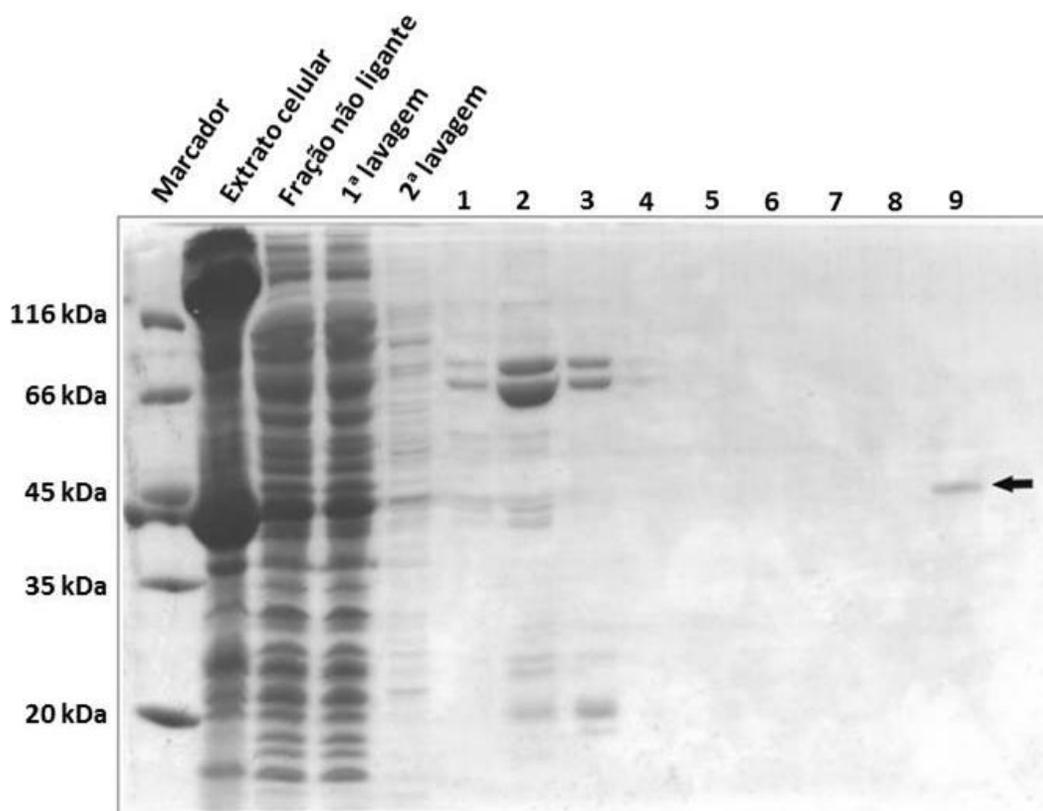
Em quase todos os testes de indução as proteínas estavam insolúveis. Com exceção das induções a 37°C, em temperaturas mais baixas e, principalmente com 0,4 mM de IPTG, uma pequena quantidade de proteína foi obtida na fração solúvel, após a lise celular (Figura 28). Na condição de 30°C, com 0,4 mM de IPTG, foi observado um leve aumento na solubilidade da proteína fusionada à cauda de His<sub>6</sub> (clone pET 28aXACb0010). Todas as condições de indução da proteína fusionada à GST obtiveram o mesmo resultado. Essa condição foi utilizada pra uma expressão em maior escala, visando a purificação da proteína solúvel.



**Figura 28:** Expressão da proteína Cointegrase de *Xac*. Expressão da proteína fusionada (A) a GST, à temperatura de 37°C e 0,4 mM de IPTG, e (B) a cauda de His<sub>6</sub>, à temperatura de 30°C e 0,4 mM de IPTG.

Uma cromatografia de afinidade a níquel, utilizando a coluna HiTrap Chelating 1 x 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech), foi utilizada na tentativa de purificar a proteína Cointegrase. A proteína foi eluída da coluna com aproximadamente 250

mM de Imidazol, conferindo um bom grau de pureza, como pode ser observado na figura 29.



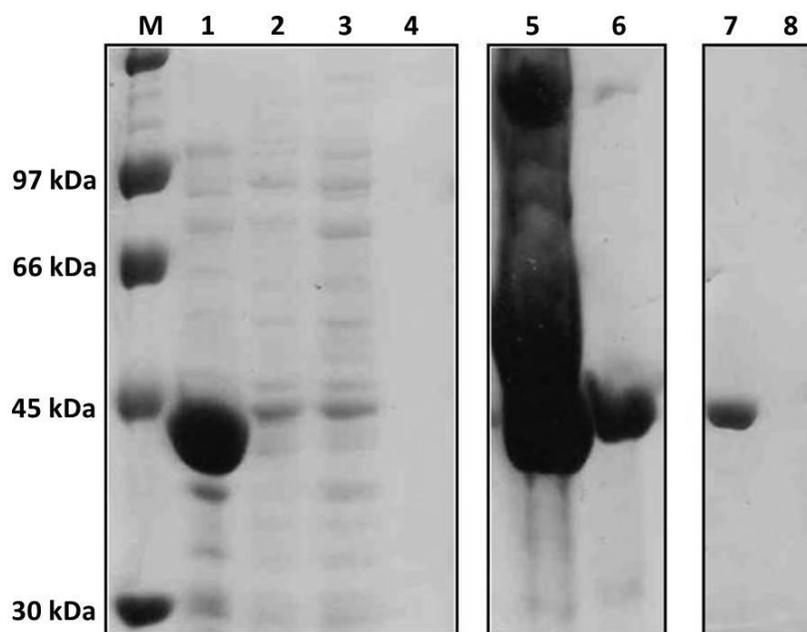
**Figura 29:** Purificação por cromatografia de afinidade a níquel da proteína Cointegrase, fusionada a cauda de His<sub>6</sub>. Nas canaletas de 1 a 4 é possível ver uma grande quantidade de contaminantes separados da amostra, durante o processo. É possível ver, na canaleta 9, a banda referente à Cointegrase de *Xac*, apontada pela seta.

A proteína purificada mostrou-se bastante instável, agregando com extrema facilidade.

#### 4.2.1.2 Purificação da proteína Cointegrase proveniente de corpo de inclusão

A proteína Cointegrase, de *Xac*, é expressa em grande quantidade em sistema heterólogo, porém bastante insolúvel. Uma hipótese é que esta proteína poderia

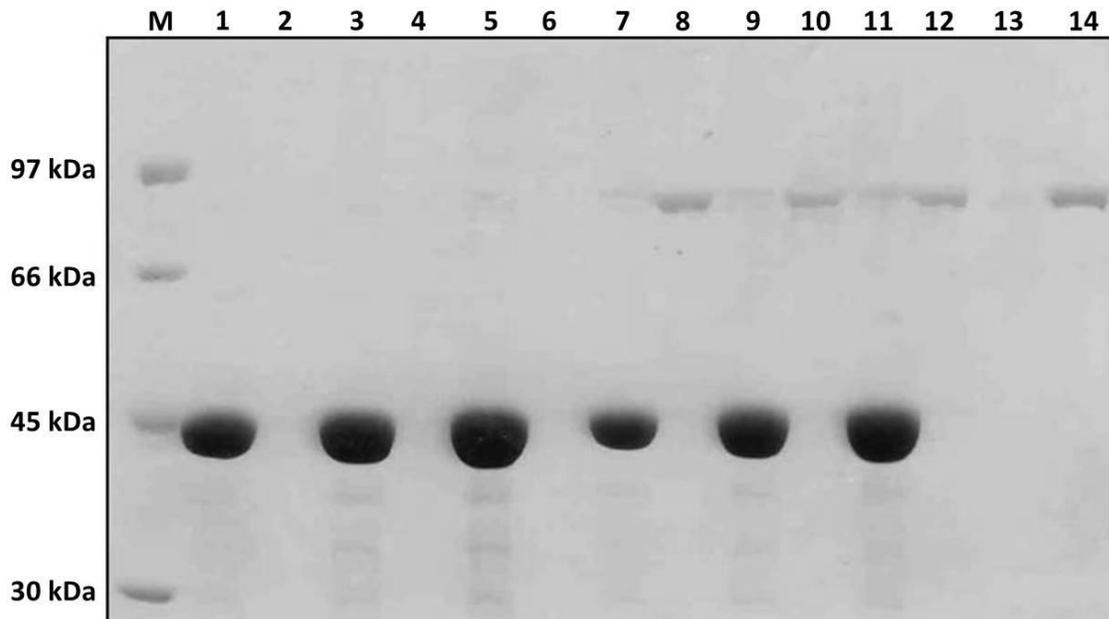
estar sendo enviada para corpos de inclusão após sua expressão em *E. coli*. Devido a isso, um protocolo de solubilização de corpos de inclusão foi desenvolvido, como descrito nos métodos, no intuito de colocar esta proteína em uma condição passível de se trabalhar. Este protocolo também foi utilizado como método para a purificação desta proteína. Foi obtida uma concentração de 42 a 60 mg/ml (próximo de 1,2 mM) da proteína, em tampão de solubilização (Figura 30). Após o reenovelamento da proteína, ao retirar a Gdm-Cl por completo do tampão, a máxima concentração alcançada foi de aproximadamente 0,4 mg/ml, o equivalente a aproximadamente 10  $\mu$ M.



**Figura 30:** SDS-PAGE da lise de corpo de inclusão e reenovelamento da proteína Cointegrase, de Xac. M: Marcador de peso molecular. 1: Fração insolúvel do extrato celular da indução do clone pETTEVCointegrase. 2: Fração solúvel do extrato celular da indução do clone pETTEVCointegrase. 3: Primeira lavagem do precipitado. 4: Segunda lavagem do precipitado. 5: Precipitado ressuspendido em tampão de solubilização. 6: Diluição 1:20 da suspensão em tampão de solubilização. 7: Fração solúvel pós reenovelamento. 8: Fração insolúvel pós reenovelamento.

#### **4.2.1.3 Teste de solubilização da Cointegrase de *Xac* com o auxílio da Hsp90 recombinante de laranja**

A proteína Cointegrase foi obtida na fração solúvel, porém em baixa concentração. A fim de tentar aperfeiçoar o processo de solubilização da proteína, foi proposta adição da Hsp90 à solução contendo a Cointegrase, durante o processo de reenovelamento (Figura 31). Como a Cointegrase foi obtida em solução em uma concentração de no máximo 0,4 mg/ml aproximadamente, tentou-se neste experimento utilizar concentrações maiores da proteína, de 0,5 a 1,0 mg/ml (12 a 24  $\mu$ M). Ao fim do experimento, após a centrifugação das amostras, os precipitados dos tubos, onde foi adicionada a Hsp90 a 1  $\mu$ M, estava visivelmente menor. Porém, na análise em SDS-PAGE não foi possível observar a proteína Cointegrase na fração solúvel em quantidade significativa. Esta se apresentou praticamente toda na fração insolúvel.

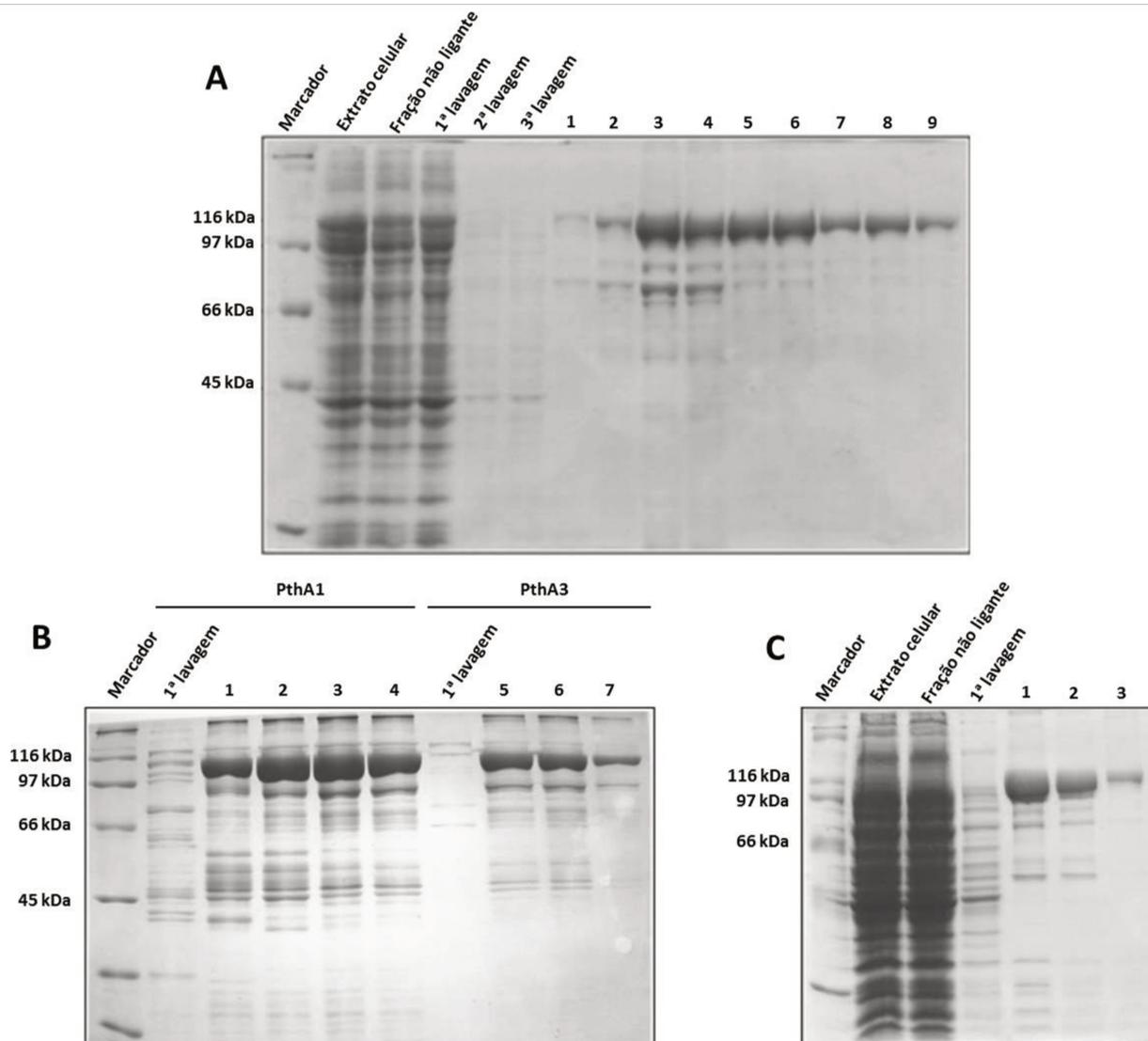


**Figura 31:** SDS-PAGE da solubilização da Cointegrase de *Xac* com o auxílio da Hsp90. M: Marcador de massa molecular. 1: Fração insolúvel da Cointegrase a 0,5 mg/ml pós reenovelamento. 2: Fração solúvel da Cointegrase a 0,5 mg/ml pós reenovelamento. 3: Fração insolúvel da Cointegrase a 0,75 mg/ml pós reenovelamento. 4: Fração solúvel da Cointegrase a 0,75 mg/ml pós reenovelamento. 5: Fração insolúvel da Cointegrase a 1,0 mg/ml pós reenovelamento. 6: Fração solúvel da Cointegrase a 1,0 mg/ml pós reenovelamento. 7: Fração insolúvel da Cointegrase a 0,5 mg/ml pós reenovelamento, com a adição de Hsp90. 8: Fração solúvel da Cointegrase a 0,5 mg/ml pós reenovelamento, com a adição de Hsp90. 9: Fração insolúvel da Cointegrase a 0,75 mg/ml pós reenovelamento, com a adição de Hsp90. 10: Fração solúvel da Cointegrase a 0,75 mg/ml pós reenovelamento, com a adição de Hsp90. 11: Fração insolúvel da Cointegrase a 1,0 mg/ml pós reenovelamento, com a adição de Hsp90. 12: Fração solúvel da Cointegrase a 1,0 mg/ml pós reenovelamento, com a adição de Hsp90. 13: Fração insolúvel do Controle de tampão com a Hsp90 adicionada no mesmo ponto do reenovelamento. 14: Fração solúvel do controle de tampão com a Hsp90 adicionada no mesmo ponto do reenovelamento.

### **4.3 Proteínas PthA de *Xac***

#### **4.3.1 Expressão e purificação das PthAs 1 a 4**

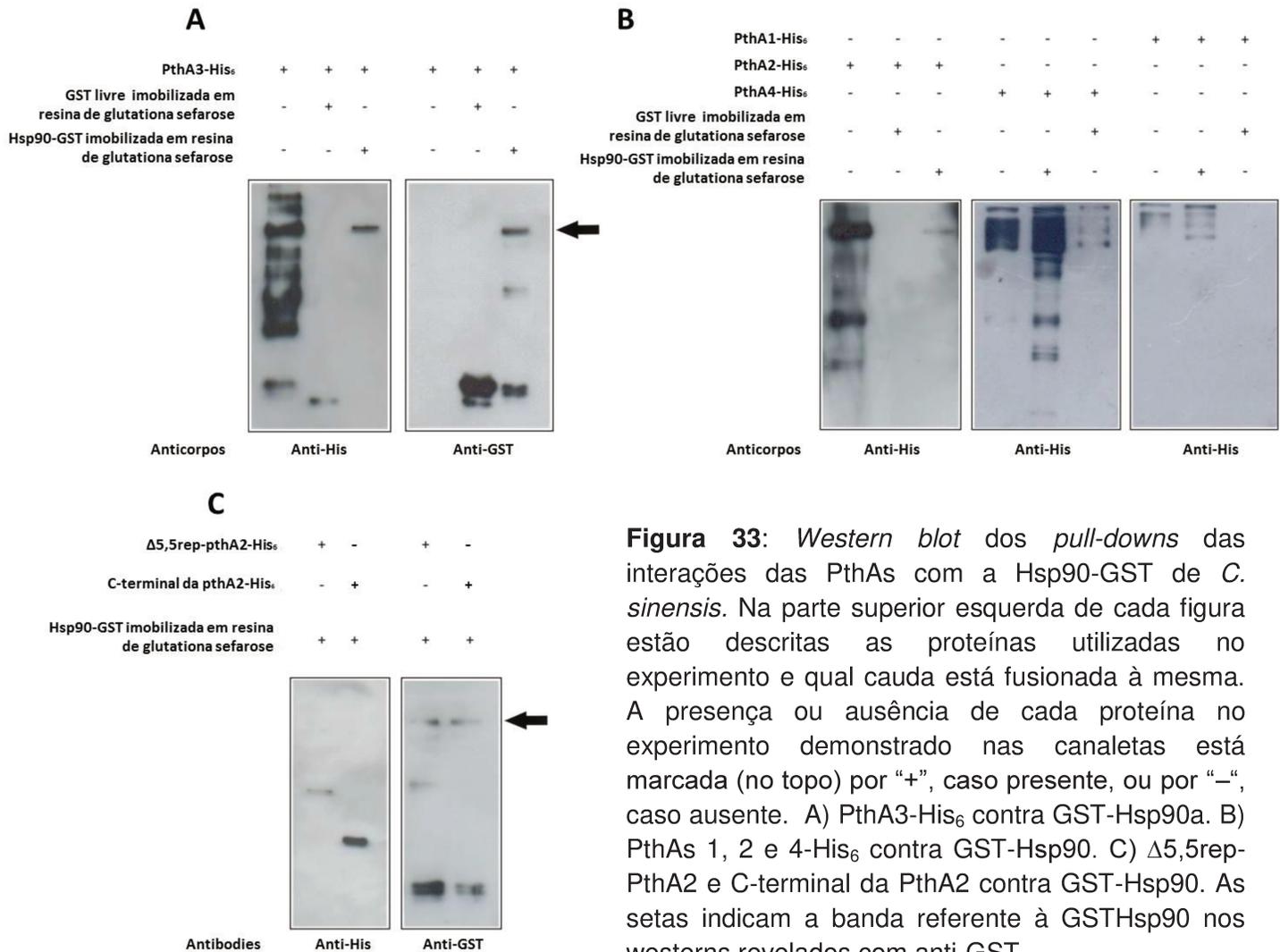
As quatro isoformas da proteína PthA de *Xac*, clonadas em vetor de expressão pET-28a foram fornecidas pelo grupo do prof. Dr. Celso Benedetti. Estas proteínas foram expressas em cepa BL21 (DE3), a 25°C, com uma concentração de 0,4 mM de IPTG, durante 4h. Por estarem fusionadas à cauda de His<sub>6</sub>, foi utilizada cromatografia de afinidade a cobalto, utilizando a resina Talon Metal Chelate<sup>®</sup> (Clontech), para a purificação destas. As proteínas foram eluídas com 100% do tampão B (Figura 32).



**Figura 32:** SDS-PAGE da purificação das quatro isoformas da proteína PthA de *Xac*. A) Purificação da proteína PthA2, com 117 kDa, por cromatografia de afinidade em sistema acoplado ao aparelho ÄKTA FPLC. B) Purificações das proteínas PthA1, com 119 kDa, e PthA3, com 117 kDa, por cromatografia de afinidade a cobalto, utilizando a resina Talon Metal Chelate<sup>®</sup>. C) Purificação da proteína PthA4, com 122 kDa, por cromatografia de afinidade a cobalto, utilizando a resina Talon Metal Chelate<sup>®</sup>. As bandas vistas no gel além da banda referente às proteínas purificadas, nas alturas referentes às suas respectivas massas moleculares, correspondem a agregados protéicos ou degradação das mesmas, o que foi confirmado por *western blot*.

### 4.3.2 Ensaio de *pull-down* com as PthAs

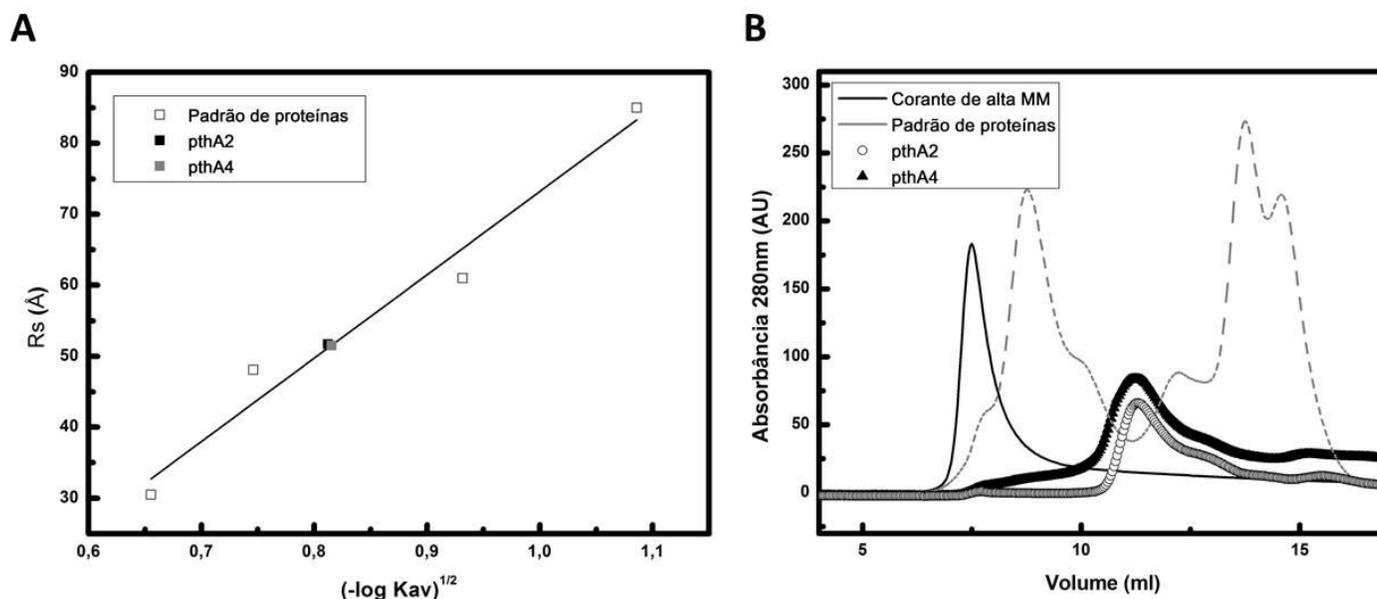
Para os ensaios de GST *pull-down*, foram utilizadas as quatro variantes da PthA, e duas construções truncadas, sendo uma contendo apenas a região C-terminal, e outra na qual são expressas 5,5 repetições do domínio central da proteína ( $\Delta$ 5,5rep-PthA2), além do C-terminal, todas fusionadas a uma cauda de His<sub>6</sub> (Figura 33). A fim de verificar e confirmar a presença tanto da isca quanto das presas no fim do experimento, foi utilizada a técnica de *western blot*, como descrito em métodos. Foram utilizados anticorpos anti-His (devido à cauda de His<sub>6</sub> das presas) e anticorpo anti-GST, para identificação da isca.



**Figura 33:** *Western blot* dos *pull-downs* das interações das PthAs com a Hsp90-GST de *C. sinensis*. Na parte superior esquerda de cada figura estão descritas as proteínas utilizadas no experimento e qual cauda está fusionada à mesma. A presença ou ausência de cada proteína no experimento demonstrado nas canaletas está marcada (no topo) por “+”, caso presente, ou por “-”, caso ausente. A) PthA3-His<sub>6</sub> contra GST-Hsp90a. B) PthAs 1, 2 e 4-His<sub>6</sub> contra GST-Hsp90. C)  $\Delta 5,5\text{rep-PthA2}$  e C-terminal da PthA2 contra GST-Hsp90. As setas indicam a banda referente à GSTHsp90 nos westerns revelados com anti-GST.

As proteínas PthA, 1 a 4, o C-terminal da PthA2, a construção  $\Delta 5,5\text{rep-PthA2}$  apresentaram interação com a Hsp90 fusionada à GST. O ensaio foi repetido, mantendo os mesmos resultados. Foi então feito um experimento controlando as concentrações de ATP e de Geldanamicina (GA), inibidor da Hsp90 (Figura 34). Para isso, foi utilizada somente a PthA2. Não houve alteração na interação da Hsp90 com a PthA2.





**Figura 35:** Gel filtração analítica das proteínas PthA2 e PthA4, de *Xac*. A) Cromatografia de gel filtração. A PthA2 (círculos brancos), a PthA4 (triângulos pretos) a mistura do padrão de proteínas com raio conhecido (linha tracejada), e o corante Blue Dextran, de alto peso molecular (linha preta), foram carregados na coluna de gel filtração. Sobre os picos estão os volumes de eluição de cada. B) Ajuste linear dos raios de Stokes conhecidos em função do coeficiente de partição ( $K_{av}$ ). Os pontos em preto e cinza são os coeficientes de partição das proteínas PthA2 e PthA4 respectivamente, os quais correspondem a raios de aproximadamente 50 Å.

**Tabela 11: Parâmetros hidrodinâmicos das proteínas pthA2 e pthA4 de *Xac*.**

	*Massa molecular predita do monômero/dímero (kDa)	** $R_s$ predito p/ monômero esférico (Å)	** $R_s$ predito p/ dímero esférico(Å)	$R_s$ observado (Å)	$f/f_0$ (monômero)	$f/f_0$ (dímero)
pthA2	117 / 235	29	41	$50 \pm 4$	1,55	1,2
pthA4	124 / 249	33	42	$51 \pm 3$	1,54	1,2

\*A partir da estrutura primária.

\*\*Raio predito para uma esfera rígida com a mesma massa da molécula em análise.

## 5. Discussão

### 5.1 Sequenciamento de genes codificantes para a Hsp90 de *C. sinensis*

Duas sequências foram isoladas com pequenas variações entre elas e os resultados de sequenciamento mostram que existem variabilidades genéticas da Hsp90 de laranja. Para chegar a esta conclusão, ambas as sequências foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Neste banco de dados havia informações de sequências de ESTs depositadas por dois grupos de pesquisa diferentes. Cada uma das sequências possuía ESTs equivalentes em apenas um dos bancos de dados depositados por cada grupo. Desta forma, a existência de cada sequência no genoma de laranja foi confirmada e, por isso, estes genes foram denominados diferentemente no nosso trabalho. Assim como é observado em outros organismos, como em humanos, por exemplo, pôde-se verificar que a espécie *C. sinensis* também possui pelo menos duas isoformas citosólicas da proteína Hsp90. Foi dado o nome de Hsp90a para a sequência que apresentava maior similaridade com a Hsp82 de cana-de-açúcar, como descrito em Resultados. Esta foi então utilizada em todos os experimentos subsequentes.

### 5.2 Produção de Hsp90 recombinante em sistema heterólogo

Como pode ser visto na figura 13, uma fração de toda a Hsp90 recombinante expressa em *E. coli* apresentava-se insolúvel. Diversas cepas e alterações variadas nas condições de indução foram testadas com o intuito de aumentar o rendimento de proteína solúvel em um estado não agregado. Foi testado um protocolo de indução de 16 hrs a 25°C, que resultou em um aumento considerável na proporção proteína solúvel / agregado (dados não mostrados). Entretanto o rendimento total de proteína foi drasticamente reduzido, alcançando finalmente uma quantidade menor de proteína do que a apresentada na tabela 5. A cepa, os tampões utilizados e as condições de expressão e purificação apresentadas nesta tese foram as que

mostraram os melhores resultados para a Hsp90. Em um esforço para melhorar a quantidade de proteína solúvel não agregada em solução e reduzir sua precipitação durante a lise celular e purificação, foram testados diversos tampões alterando força iônica, pH, agente tamponante e íons solúveis, mas foi sem efeito. A concentração máxima alcançada para a Hsp90 de *C. sinensis* foi de aproximadamente 70  $\mu\text{M}$ . Tentativas de concentrar as amostras resultaram em agregação. No entanto, a Hsp90 em concentrações menores que 70  $\mu\text{M}$  apresentou-se bastante tolerante a grandes variações de temperatura, concentração ou força iônica.

### **5.3 Hsp90 recombinante apresentou-se corretamente enovelada e com funções preservadas**

A proteína Hsp90 de laranja foi caracterizada espectroscopicamente pelos métodos de CD, fluorescência de triptofano, desenovelamento térmico acompanhado por CD, gel filtração analítica, SEC-MALS e por SAXS. Na maioria dos experimentos, esta caracterização também foi feita na ausência e presença dos nucleotídeos ATP, ADP e ATP $\gamma$ S.

O conteúdo de estrutura secundária da Hsp90 foi examinado pela deconvolução dos espectros de CD e uma análise *in silico* baseada na sequência de resíduos de aminoácidos da proteína, apresentando resultados semelhantes. Contudo, uma análise mais precisa do teor de hélice alfa usando o valor da elipticidade molar residual a 222 nm (revisto em Correa e Ramos, 2009), mostrou um conteúdo de 35% de hélice alfa, muito próximo ao que é já descrito para os homólogos de outras Hsp90 com estruturas cristalográficas.

O espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano da proteína, em condição de desnaturação, sugeriu que a Hsp90 estava enovelada, apresentando estrutura terciária definida após as etapas de purificação. Estes resultados foram suportados por dados fornecidos por cromatografia de gel-filtração analítica, SEC-MALS e DLS.

A Hsp90 provou ser uma proteína dimérica e moderadamente alongada em solução. Foi possível isolar essa conformação da proteína em uma solução

monodispersa. Os dados hidrodinâmicos obtidos foram muito semelhantes aos encontrados na análise *in silico* e *in vitro* para os homólogos Hsp90 de outros organismos (Garnier *et al.*, 2002). A proteína não apresentou grandes alterações em sua estrutura secundária, após a adição dos nucleotídeos, e mostrou-se bastante estável com o aumento de temperatura, não perdendo estrutura após o aquecimento. A estabilidade térmica das Hsp90 tende a proporcionar um bom desempenho de sua atividade em temperaturas elevadas (Weis *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 1992).

Os experimentos de gel filtração analítica sugeriram que a molécula em solução possui um formato oblato, de acordo com o fator de Perrin encontrado, no valor de 1,7, com um  $R_s$  de  $62 \pm 2$  Å, equivalente ao que é descrito na literatura para a Hsp90 de diversos organismos diferentes (Tbarka *et al.*, 1993; Garnier *et al.*, 2002). A Hsp90 apresentou-se monodispersa e dimérica em solução, com uma massa de  $152 \pm 3$  kDa, próxima da massa predita para o dímero, a partir da estrutura primária (aproximadamente 164 kDa), de acordo com os dados coletados por SEC-MALS.

Sabe-se que chaperonas moleculares têm um papel na proteção de agregação, que também é atribuída a Hsp90 (Johnson *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Wayne e Bolon, 2010). A Hsp90 de laranja produzida durante este trabalho também se mostrou funcional, como pôde ser observado pela sua função de proteção da CS à temperatura (Jakob *et al.*, 1995). O efeito de proteção causado pela Hsp90 na agregação da CS já pôde ser observado na proporção 5:1 de CS para Hsp90, na qual a agregação ficou evidentemente mais lenta (dados não mostrados). Com o aumento da concentração de Hsp90 na solução, a agregação diminuiu consideravelmente, alcançando mais de 50% de proteção, na proporção 1:1, e em torno de 70% na proporção 1:2.

A preservação da estrutura secundária da Hsp90 recombinante, e a posterior determinação de estruturas terciárias e quaternárias bem definidas, mostraram que a Hsp90 recombinante estava enovelada após todo o processo de expressão em sistema heterólogo e purificação *in vitro*. A alta estabilidade térmica e a identificação da atividade chaperona para a Hsp90 recombinante sugere que cada domínio desta proteína, essenciais para o pleno exercício desta função, atingiram um estado

enovelado funcional e estruturalmente semelhante à estrutura nativa desta proteína produzida constitutivamente nas células de *C. sinensis*.

#### **5.4 Identificação da Hsp90 em tecido vegetal**

Foram produzidos anticorpos policlonais para a Hsp90 recombinante. O ensaio de *western blot* na tentativa de identificar a Hsp90 nativa em tecido foliar de laranja doce em condições de não estresse obteve êxito. Isso confirma que a proteína isolada e utilizada neste trabalho possui um representante nativo na laranja. A Hsp90 é uma proteína constitutiva em todos os organismos em que é presente. Portanto pode-se afirmar que a proteína identificada pelo ensaio é realmente uma Hsp90, uma chaperona constitutiva da laranja.

#### **5.5 SAXS: medições e modelagens**

A estrutura tridimensional da Hsp90 é bastante estudada, devido ao papel central desta proteína em inúmeros processos biológicos e em doenças. Mesmo assim, são raras as publicações que apresentam estes dados para a molécula inteira (Shiau *et al.*, 2006; Ali *et al.* 2006; Dollins *et al.*, 2007). Pelo fato da Hsp90 inteira ser de difícil cristalização, devido à sua flexibilidade conformacional (Pearl e Prodomou, 2006), são realizados diversos trabalhos estruturais utilizando os domínios isolados desta proteína (Prodomou *et al.*, 1997; Stebbins *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2004). Alguns trabalhos mostram modelos de média-baixa resolução desta molécula construídos a partir de dados de SAXS (Bron *et al.*, 2008), embora representem apenas a molécula na ausência de qualquer ligante. A Hsp90 de laranja nunca foi descrita na literatura. Por esta molécula ser oriunda de um organismo eucarioto superior, a construção de modelos desta proteína somente na ausência de ligantes é interessante.

As coletas de SAXS e a análise dos dados mostraram que a proteína está dimérica em solução, com uma massa de aproximadamente 160 kDa, com um raio de giro em torno de 55 Å. Os dados encontrados pelas análises de SAXS são muito

semelhantes aos observados pelas demais técnicas utilizadas para esta proteína. Os pontos de espalhamento utilizados para todas as análises das coletas foram até aproximadamente  $q=1,5 \text{ \AA}^{-1}$ . É importante notar que para proteínas grandes, os pontos no início da curva têm maior relevância para as análises. A menor intensidade do feixe na linha SAXS 1 gera gráficos mais ruidosos, o que é compensado pela maior sensibilidade de seu detector. Apesar da proteína não ter apresentado grandes alterações em sua estrutura secundária e em seus espectros de fluorescência intrínseca, a Hsp90 de laranja apresentou mudanças aparentemente significativas em sua conformação nas condições testadas por SAXS.

A Hsp90 é uma proteína descrita na literatura por possuir atividade ATPásica, e há modelos que sugerem uma mudança conformacional desta quando na presença de ATP, e nos passos subsequentes à sua clivagem. No entanto, não existem relatos na literatura sobre um homólogo de laranja desta proteína. Além disso, os modelos existentes da dinâmica da proteína durante o ciclo de hidrólise do ATP, fundamental para a realização de sua função, são baseados em poucas estruturas cristalográficas, provenientes de homólogos de Hsp90 de apenas três diferentes organismos, a HtpG, de *E. coli*, a Hsp90 complexada à co-chaperona p23, de *S. cerevisiae*, e um homólogo de Hsp90 de retículo endoplasmático de *Canis lupus familiaris*, a Grp94 (Ali *et al.*, 2006; Dollins *et al.*, 2007; Shiau *et al.*, 2006)

Para a melhor compreensão e corroboração dos modelos gerados com os dados de SAXS, foi utilizado o programa HydroPro, o qual fornece parâmetros hidrodinâmicos para uma dada estrutura de proteína. Os dados hidrodinâmicos obtidos para as estruturas dos homólogos de Hsp90 descritos acima com o auxílio deste programa foram utilizados como parâmetros para a comparação. Os modelos nas condições não apresentadas na figura 21 ainda estão sob análise. As condições com ATP e ADP $\beta$ s geraram modelos incongruentes e/ou incompatíveis com o que é disponível na literatura, e necessitam de uma análise mais fina.

## 5.6 Cointegrase

A purificação da Cointegrase de *Xac*, por cromatografia de afinidade, não estava sendo muito produtiva, devido à alta insolubilidade desta, quando expressa em sistema heterólogo. Chegou-se a conclusão de que a Cointegrase é enviada a corpos de inclusão, após sua expressão em *E. coli*. Com o protocolo utilizado, foi possível obter a proteína solúvel na concentração máxima de 0,4 mg/ml. Esta baixa concentração impossibilitou o uso da Cointegrase em experimentos de gel filtração analítica e SEC-MALS, devido à baixa resolução dos equipamentos em com amostras em concentrações muito baixas.

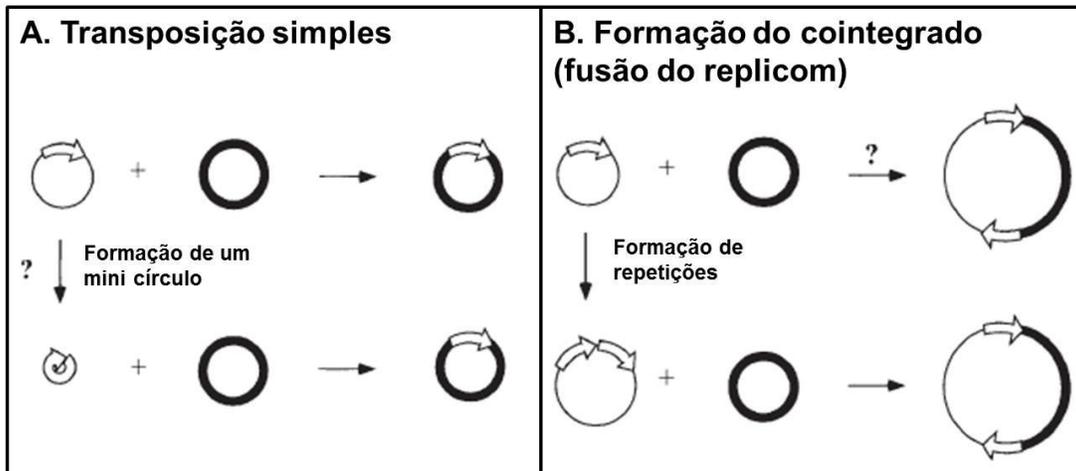
Na literatura, é descrita a atividade da Hsp90 na prevenção da agregação protéica (Miyata e Yahara, 1992; Jakob *et al.*, 1995). Sabendo que há interação entre a Hsp90 de laranja e a Cointegrase, os experimentos de reenovelamento foram realizados. Quando utilizadas concentrações inferiores a 0,4 mg/ml da Cointegrase nos experimentos, todas as frações solúveis das amostras continham as mesmas quantidades da proteína, na presença ou ausência da Hsp90. Foram então utilizadas concentrações entre 0,5 e 4,0 mg/ml da Cointegrase. Como descrito nos resultados, o volume dos precipitados nos tubos de 0,5, 0,75 e 1,0 mg/ml da Cointegrase, contendo a Hsp90, foram visivelmente menores que os tubos com as mesmas concentrações da Cointegrase, o que poderia indicar uma possível proteção da Hsp90 a agregação da proteína de *Xac*. Este resultado pode ser observado em todos os experimentos. Contudo, as análises destes experimentos em SDS-PAGE não revelaram diferenças entre as amostras em que a Hsp90 estava ausente ou presente. Aumentar a concentração da Hsp90 nestes experimentos, e precipitar uma alíquota maior das frações solúveis com ácido tricloroacético a 10%, pode otimizar a visualização das proteínas em SDS-PAGE, revelando outro resultado. Infelizmente, como não foi possível obter uma co-integrase solúvel, não foi possível realizar mais experimentos para testar a potencial ligação à Hsp90 identificada por experimentos de duplo-híbrido.

## 5.7 Duplo-híbrido

Mesmo não tendo sido observada auto-ativação por parte da Hsp90 no sistema utilizado, foi adotada uma concentração mínima de 3-AT de 1 mM para a realização do ensaio, a fim de evitar o aparecimento de falsos positivos oriundos de uma pequena auto-ativação por parte da própria biblioteca genômica de *Xac*, como observado anteriormente por Alegria (2004). Evitou-se utilizar concentrações muito elevadas de 3-AT, primeiramente por não ter sido observada auto-ativação por parte da isca (pOBHsp90), e para que fosse possível observar interações mais fracas entre a Hsp90 e suas parceiras.

A utilização de vetores, tanto de isca quanto de presa, com as mesmas marcas de seleção para antibiótico, que seriam utilizadas posteriormente para a separação e isolamento dos clones isolados, fez com que utilizássemos de outras ferramentas para esse fim. A escolha da cepa KC8, de *E. coli* possibilitava essa separação através das marcas de seleção auxotróficas dos vetores, a qual foi utilizada anteriormente por Docena (2006). Porém, a eficiência desta cepa mostrou-se muito baixa.

Das presas isoladas e analisadas por sequenciamento, o aparecimento de 25 clones dos 36 sequenciados (aproximadamente 70% dos clones sequenciados, e 8,4% dos clones isolados), referentes a uma Cointegrase (*cointegrate resolution protein T*) de *Xac*, chamou atenção para esta interação. Cointegrase é um tipo de transposase, que auxilia no translocamento de sequências móveis de DNA (Schmid *et al.*, 1998; Berger e Haas, 2001). Estes genes têm a capacidade de se autoduplicar na molécula de DNA onde esta inserida e, com a ajuda de seu produto protéico, transportar suas próprias sequências de DNA para outra região ou até mesmo outra molécula de DNA, levando consigo as sequências que flanqueiam (Figura 36).



**Figura 36:** Modelo para a comparação das ações de uma transposase comum (A) e uma cointegrase (B). Figura adaptada de Berger e Haas, 2001.

Uma análise sobre a localização do gene XACb0010 no megaplasmídeo de *Xac*, pXAC64, mostrou que este gene localiza-se na mesma orientação e imediatamente antes do gene *avrXacE3*, um gene de avirulência ainda não caracterizado em *Xac*. Contudo, este gene possui 80% de identidade de sequência com o gene *hopPmaB*, de avirulência de *P. syringae* pv. *Maculicola*, também patógeno de plantas. Este gene de *P. syringae* pertence a uma família de genes que codificam para proteínas efetoras de virulência secretadas pelo sistema de secreção tipo III, sendo responsável por suprimir a morte celular programada no tecido infectado, resposta conhecida com HR (Espinosa *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2004). Este mesmo gene XACb0010 localiza-se, também na mesma orientação, a 3767 pb de distancia anteriormente ao gene *pthA3*, um dos quatro principais genes de virulência de *Xac* (Figura 37).



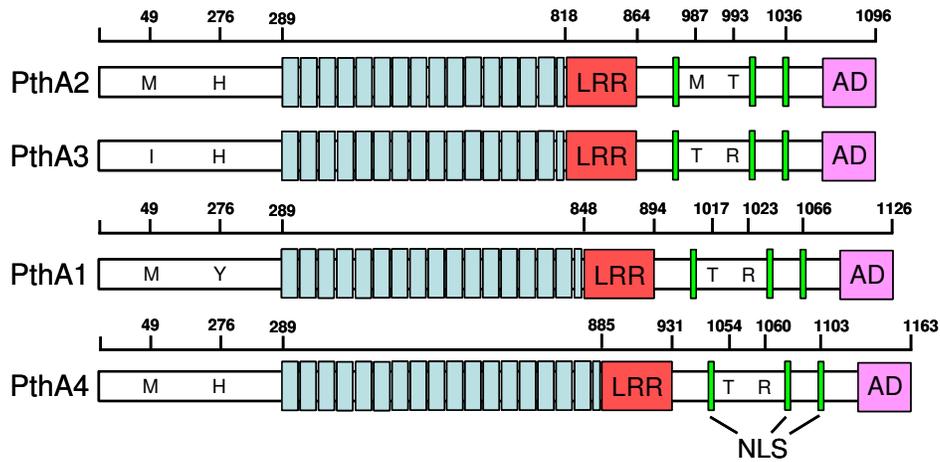
**Figura 37:** Localização da ORF XACb0010 no megaplasmídeo pXAC64 de *Xac*. Os números marcados com “[”, representam a região do plasmídeo pXAC64, em pares de bases, evidenciada pela figura. O gene XACb0010 está marcado da cor vermelha, o gene de avirulência *avrXacE3* está marcado em azul, e o gene da *pthA3* está marcado em verde. As setas indicam a orientação 5’ - 3’ do gene (sentido da transcrição).

### 5.8 Ensaios de *pull-down*

Durante os ensaios de GST *pull-down* foram primeiramente utilizadas as quatro isoformas da PthA existentes em *Xac*. As quatro variantes de PthAs de *Xac* diferem essencialmente no número das repetições do domínio central e em alguns outros aminoácidos ao longo das sequências (Figura 38). Porém, como estas proteínas possivelmente funcionam como clientes da Hsp90, as diferenças encontradas entre as isoformas de PthA não foram consideradas como determinantes para diferenciar a interação da Hsp90 com uma, em detrimento das outras. As interações identificadas pelos ensaios de *pull-down* com as proteínas PthAs mostram que a Hsp90 de laranja pode estar funcionando como um intermediador no processo de ativação de proteínas efetoras de *Xac* durante o processo infectivo.

As interações descritas na literatura da Hsp90 com a proteína ciclofilina referem-se à ciclofilina-40 (Dolinski *et al.*, 1998; Faou e Tropschug, 2003), uma proteína de 40 kDa que possui domínio TPR, que medeia sua associação com a Hsp90 e/ou Hsp70 (Höhfeld *et al.*, 1995; Carrelo, *et al.*, 2004). Porém, a ciclofilina de *C. sinensis* encontrada primeiramente em interação com a proteína PthA, é uma proteína de 18 kDa, a qual não possui o domínio TPR. Mesmo assim, esta proteína foi incluída nos experimentos, embora não tenha sido possível identificar nenhuma interação.

A proteína TDX é muito similar à cochaperona Hip, possuindo um domínio TRX. A interação da Hsp90 com a proteína TDX dá indícios da formação de um grande complexo de enovelamento composto por chaperonas de laranja.



**Figura 38:** Representação esquemática das quatro variantes de PthAs de *Xac*, evidenciando as diferenças existentes entre as quatro isoformas presentes na bactéria. LRR = Leucine Rich Repeat; NLS = Nuclear Localization Signal; AAD = Acidic Activation Domain. Os resíduos de aminiácidos nos domínios N e C-terminais que diferenciam as variantes, assim como suas posições na seqüências de resíduos estão em evidência. Esta figura foi gentilmente cedida pelo Dr. Celso Benedetti.

## 6. Conclusões

A proteína Hsp90 recombinante de *C. sinensis* expressa em sistema heterólogo e purificada neste trabalho apresentou-se corretamente enovelada, mantendo as mesmas características descritas na literatura necessárias para o desempenho de suas funções em seu ambiente *in vivo*. Essas características foram:

- A Hsp90 recombinante de *C. sinensis* foi caracterizada com sendo um dímero alongado em solução, possuindo  $R_s$  de  $62 \pm 2 \text{ \AA}$ , com massa de  $152 \pm 3 \text{ kDa}$ .
- Esta proteína possui estrutura secundária semelhante a homólogos de outros organismos.
- A Hsp90 recombinante de *C. sinensis* apresentou alta tolerância a temperatura, mostrando-se bastante estável à alterações de temperatura e concentração salina.
- A presença dos nucleotídeos ATP e ADP nas formas clivável e não-clivável causam alterações conformacionais na molécula em solução.
- Desempenhou atividade de proteção a agregação da proteína modelo citrato sintase.
- A Hsp90 recombinante pôde interagir com proteínas em experimentos de duplo-híbrido e *pull-down*.

Foram identificados e confirmados como parceiros de interação da Hsp90 de *C. sinensis*, a proteína TDX, de *C. sinensis*, as quatro isoformas da PthA, de *Xac* e uma Cointegrase, também de *Xac*. Esta última, a proteína Cointegrase, foi também expressa em sistema heterólogo e purificada por cromatografia de afinidade.

## 7. Referências

- Albanèse, V., Yam, A.Y., Baughman, J., Parnot, C., Frydman, J. (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124: 75-88.
- Alegria, M.C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C.H.I., Da Silva, A.C.R., Farah C.S. (2004). New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion System of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *J. Bacteriol.* 186: 6186-97.
- Alfano, J.R., Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* 8: 1683-1698.
- Ali, M.M., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., Pearl, L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440: 1013-1017.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-33.
- Beissinger, M., Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379: 245-259.
- Berger, B., Haas, D. (2001). Transposase and cointegrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *Cell Mol. Life Sci.*, 58: 403-419.
- Bhattarai, K.K., Li, Q., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S.P., Kaloshian, I. (2007). The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiol.* 144:312-23.
- Borges, J.C., Ramos, C.H.I. (2005). Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept. Lett.* 12: 257-261.
- Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mulbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I., Hartl, F.U. (2002). Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.* 277: 19265-19275.

- Bron, P., Giudice, E., Rolland, J.P., Buey, R.M., Barbier, P., Diaz, J.F., Peyrot, V., Thomas, D., Garnier, C. (2008). Apo-Hsp90 coexists in two open conformational states in solution. *Biol. Cell* 100: 413-425.
- Brown, M.A., Zhu, L., Schmidt, C., Tucker, P.W. (2007). Hsp90-From signal transduction to cell transformation. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 363: 241-246.
- Brunings, A.M., Gabriel, D.W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4: 141-157.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 and Co.—a holding for folding. *Trends Biochem. Science* 24: 136-141.
- Büttner, D., Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Cur. Opin. Micr.* 9: 193-200.
- Cantor, C.R., Schimmel, P.R. (1980). Size and shape of macromolecules. in L.W.McCombs (Ed.), *Biophysical chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Carrello, A., Allan, R.K., Morgan, S.L., Owen, B.A., Mok, D., Ward, B.K., Minchin, R.F., Toft, D.O., Ratajczak, T. (2004). Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin40 with Hsc70. *Cell Stress Chap.* 9: 167-181.
- Cascales, E., Christie, P.J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Rev. Microbiol.* 1: 137-149.
- Chakraborty, A., Koldobskiy, M.A., Sixt, K. M., Juluri, K. R., Mustafa, A. K., Snowman, A. M., van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Snyder, S. H. (2008). HSP90 regulates cell survival via inositolhexakisphosphate kinase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1134-1139.
- Cheng, L., Hirst, K., Piper, P.W. (1992). Authentic temperature-regulation of a heat shock gene inserted into yeast on a high copy number vector. Influences of overexpression of HSP90 protein on high temperature growth and thermotolerance. *Biochim. Biophys. Acta* 1132: 26-34.
- Christiano, R.S.C. (2003). Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da USP, para a obtenção do título de mestre em agronomia.

- Christie, P.J., Vogel, J.P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8: 354-60.
- Clark, J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 16: 9677-86.
- Coaker, G., Falick, A., Staskawicz, B. (2005). Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic Cyclophilin. *Science* 308: 548-50.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J., Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3: 93-96.
- Cornelis, G.R., Van Gijsegem F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 735-774.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Rev. Microb.* 4: 811-825.
- Corrêa, D.H.A., Ramos, C.H.I. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afric. Jour. Bioch. Res.* 3: 164-173.
- Cubero, J., Graham, J.H. (2002). Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1257-1264.
- da Cunha, L., McFall, A.J., Mackey, D. (2006) Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. *Microbes Infect.* 8: 1372–1381.
- 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., Kitajima, J.P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-63.

- Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C.B. *et al.* (2007). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J. Clin. Invest.* 117: 648-658.

- Docena, C. (2006). Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese apresentada ao Instituto de Química da USP, para a obtenção do título de doutor em bioquímica.

- Dolinski, K.J., Cardenas, M.E., Heitman, J. (1998). CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7344-7352.

- Dollins, D.E., Warren, J.J., Immormino, R.M., Gewirth, D.T. (2007). Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol. Cell* 28: 41-56.

- Edelhock, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine proteins. *Biochem.* 6: 1948-54.

- Ellis, R.J. (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 114-119.

- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q., Alfano, J.R. (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol. Microbiol.* 49: 377-397.

- Faou, P., Tropschug, M. (2003). A novel binding protein for a member of CyP40-type cyclophilins: *N.crassa* CyPBP37, a growth and thiamine regulated protein homolog to yeast Thi4p. *J. Mol. Biol.* 333: 831-844.

- Feldman, M.F., Muller, S., Wuest, E., Cornelis, G.R. (2002). SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol. Microbiol.* 46: 1183-1197.

- Fischer, G., Schmid, F.X. (1990) The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochem.* 29: 2205-2212.
- Galán, J.E., Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Garcia de la Torre, J., Huertas, M.L., Carrasco, B. (2000). Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78: 719-730.
- Garnier, C., Barbier, P., François, D., German, R., Vincent, P. (2002). Hydrodynamic Properties and Quaternary Structure of the 90 kDa Heat-Shock Protein: Effects of Divalent Cations. *Biochem.* 41: 11770-11778.
- Gietz ,R.D., Agatep, R., R., Woods ,R.A. *et al.* (1998) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>).
- Goto, M., Ohta, K., Okabe, N. (1975). Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson: 2. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soils. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 41: 141-147.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J., Achor, D,S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.* 5: 1-15.
- Groisman, E.A. (2001). The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol*, 183: 1835-1842.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant *J. Plant Physiol.* 163: 233-255.
- Harris, S.F., Shiau, A.K., Agard, D.A. (2004). The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure* 12: 1087-1097.

- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol, from nascent chain to folded protein. *Science* 276: 1852-1858.
- Höhfeld, J., Minami, Y., Hart, F.U. (1995). Hip, a Novel Cochaperone Involved in the Eukaryotic Hsc70/Hsp40 Reaction Cycle. *Cell*, 83: 589-598.
- Hueck, C.J. (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.
- Irmer, H., Höhfeld, J. (1997). Characterization of Functional Domains of the Eukaryotic Co-chaperone Hip. *J. Biol. Chem.* 272: 2230-2235.
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I., Buchner, J. (1995). Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 270: 7288-7294.
- James, P., Halladay, J., Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436.
- Johnson, J. L., Brown, C. (2009). Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chap.* 14: 83-94.
- Johnson, B.D., Chadli, A., Felts, S.J., Bouhouche, I., Catelli, M.G., Toft, D.O. (2000). Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *J. Biol. Chem.* 275: 32499-32507.
- Jones, J.B., H. Bouzar, R.E., Stall, E.C., Almira, P.D., Roberts, B.W., Bowen, J., Sudberry, P.M., Strickler, J., Chun. (2000). Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1211-1219.
- Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kang, L., Tang, X., Mysore, K.S. (2004). *Pseudomonas* Type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 1328-1336.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R. (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* 4: 383-391.

- Kather, L. (2006). Identificação e caracterização de chaperones de secreção no genoma do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* patovar *citri*. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp, para a obtenção do título de doutor em bioquímica.
- Kubota, H., Yamamoto, S., Itoh, E., Abe, Y., Nakamura, A., Izumi, Y., Okada, H., Iida, M., Nanjo, H., Itoh, H. *et al.* (2010). Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. *Cell Stress Chap.* 15: 1003-1011.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lindgren, P.B., Peet R.C., Panopoulos, N.J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168: 512-522
- Liu, D., Lu, Z., Mao, Z., Liu, S. (2009). Enhanced thermotolerance of *E. coli* by expressed OsHsp90 from rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Microbiol.* 58: 129-133.
- Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J. Biol. Chem.* 279: 2101-2108.
- Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., Baulcombe, D.C. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22: 5690-5699.
- Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77-100.
- Marks, A.R. (1996). Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.* 76: 631-649.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., Bonas, U. (2002). The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15: 637-46.

- Martin, J., Hartl, F.U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 41-52.
- Mayer, M.P., Schröder, H., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., Bukau, B. (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nature Struct. Biol.* 7: 586-593.
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W., Pearl, L.H. (2003). Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol. Cell.* 11: 647-658.
- Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Vlastic, I., Panaretou, B., Piper, P.W., Pearl, L.H. (2004). Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J.* 23: 1402-1410.
- Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., Nukina, N. (2002). Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 $\alpha$  and heatshock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J. Neurosci.* 22: 9267-9277.
- Miyata, Y., Yahara, I. (1992). The 90-kDa Heat Shock Protein, HSP90, Binds and Protects Casein Kinase I1 from Self-aggregation and Enhances Its Kinase Activity. *The J. of Biol. Chem.* *J. Biol. Chem.* 267: 7042-7047.
- Moraes, T.F., Spreter, T., Strynadka, N.C.j. (2007). Piecing together the Type III injectisome of bacterial pathogens. *Cur. Opin. Struc. Biol.* 18: 1-9.
- Morrisett, J.D., David, J.S., Pownall, H.J., Gotto, A.M.Jr. (1973) Interaction of an apolipoprotein (apoLP-alanine) with phosphatidylcholine. *Biochem.* 12: 1290-1299.
- Muller, L., Schaupp, A., Walerych, D., Wegele, H., Buchner, J. (2004). Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J. Biol. Chem.* 279: 48846-48854.
- Pearl, L.H., Prodromou, C.(2000). Structure and *in vivo* function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 46-51.
- Pearl, L.H., Prodromou, C. (2001). Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv. Protein Chem.* 59: 157-186.

- Pearl, L.H., Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 271-294.
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., Pearl, L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell.* 90: 65-75.
- Qiao, Z., Shi-he, S., Lei-lei, C., Run-hong, M., Xiao-li, M., Su-rong, D. (2007). Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*: a new insight into pathogenicity. *Chin. Med. J.* 120: 2138-2142.
- Ramos, C.H.I., Ferreira, S.T. (2005). Protein folding, misfolding and aggregation: evolution concepts and conformational diseases. *Prot. Pept. Lett.* 12: 213-222.
- Ruddon, R.W., Bedows, E. (1997). Assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272: 3125-28.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Segunda Edição. Cold spring Harbor Laboratory. New York.
- Sanchez, Y., Lindquist, S.L. (2000). Hsp104 required for induced thermotolerance. *Science* 248: 1112-1115.
- Sangster, T.A., Queitsch, C. (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 86–92.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101: 199-210.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Siger, M.A., Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21: 289-296.
- Schmid, S., Seitz, T., Haas, D. (1998). Cointegrase, a naturally occurring, truncated form of IS21 transposase, catalyzes replicon fusion rather than simple insertion of IS21. *J. Mol. Biol.* 282: 571-583.
- Semenyuk, A.V., Svergun, D.I. (1991). GNOM – a program package for small-angle scattering data processing. *J. App. Crystall.* 24: 537-540.

- Shiao, A.K., Harris, S.F., Southworth, D.R., Agard, D.A. (2006). Structural analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* 127: 329-340.
- Shiotani, H., Fujikawa, T., Ishihara, H., Tsuyumu, S., Ozaki, K. (2007). A pthA Homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Responsible for Host-Specific Suppression of Virulence. *J. Bacteriol.* 189: 3271-3279.
- Sreeramulu, S., Jonker, H.R., Langer, T., Richter, C., Lancaster, C.R., Schwalbe, H. (2009). The human Cdc37.Hsp90 complex studied by heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 284: 3885-3896.
- Stavrinides, J., McCann, H.C., Guttman, D.S. (2008). Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors *Cell. Microb.* 10: 285-292.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., Pavletich, N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell.* 89: 239-250.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-30.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- Svergun, D.I. (1999). Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophys. J.* 76: 2879-2886.
- Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., Koch, M.H. (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* 80: 2946-53.
- Svergun, D.I., Koch, M.H.J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* 66: 1735-1782.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., Gabriel, D.W. (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopath.* 81: 802-809.

- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T., Gabriel, D.W. (1992). An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5: 204-13.
- Swings, J.G., Civerolo, E.L. (1993). *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, 25-30.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., Bonas, U. (2002). Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas AvrBs3* protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* 46: 13-23.
- Taherian, A., Krone, P.H., Ovsenek, N. (2008). A comparison of Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  interactions with cochaperones and substrates. *Biochem. Cell Biol.* 86: 37-45.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu, K. (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11777-11782.
- Tanaka, E., Nemoto, T.K., Ono, T. (2001). Liberation of the intramolecular interaction as the mechanism of heat-induced activation of HSP90 molecular chaperone. *Europ. J. Bioch. / FEBS* 268: 5270-5277.
- Tbarka, N., Richard-MCreau, C., Formstecher, P., Dautrevaux M. (1993). Biochemical and immunological evidence that an acidic domain of hsp 90 is involved in the stabilization of untransformed glucocorticoid receptor complexes. *FEBS.* 322: 125-128.
- Theyssen, H., Schuster, H.P., Packshies, L., Bukau, B., Reinstein, J. (1996). The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* 263: 657-670.
- Tiroli-Cepeda, A.O., Ramos, C.H.I. (2011). An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Prot. Pept. Lett.* 18: 101-9.
- 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. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627.

- Van Bentem, S.F., Vossen, J.H., de Vries, K.J., van Wees, S., Tameling, W.I., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Haring, M.A., Takken, F.L., Cornelissen, B.J. (2005). Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *Plant J.* 43:284-98.
- Vignols, F., Mouaheb, N., Thomas, D. 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.
- Wayne, N., Bolon, D.N. (2010). Charge-rich regions modulate the anti-aggregation activity of Hsp90. *J. Mol. Biol.* 401: 931-939.
- Weis, F., Moullintraffort, L., Heichette, C., Chretien, D., Garnier, C. (2010). The 90-kDa heat shock protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J. Biol. Chem.* 285: 9525-9534.
- Whitesell, L., Lindquist, S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Rev. Cancer.* 5: 761-772.
- Young, J.C., Moarefi, I., Hartl, F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* 154: 267-273.
- Young, Y. H., Foegeding, E. A. (2008). Effects of Caseins on Thermal Stability of Bovine Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10352–10358.
- Zhao, R., Houry, W.A. (2007). Molecular interaction network of the Hsp90 chaperone system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594: 27-36.
- Zhi, W., Srere, P.A., Evans, C.T. (1991). Conformational stability of pig citrate synthase and some active-site mutants. *Biochemistry* 30: 9281-9286.

## **ANEXO I**



COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970 SP - BRASIL  
<http://www.iqm.unicamp.br>



Solicitação/Procolo: CHIR 2007-3

Nome do aluno: Yuri de Abreu Mendonça.

Nível: doutorado

Período: 03/2007 – 02/2012

Nome do orientador: Carlos H. I. Ramos

Resumo:

As bactérias patogênicas gram-negativas utilizam sistemas de secreção especializados para translocar proteínas de virulência através da membrana das células eucarióticas para o citoplasma, causando assim a infecção. Para que este processo seja eficiente, estas proteínas de virulência devem estar em um estado parcialmente enovelado ou desenoveladas para que possam ser transportadas para o interior das células hospedeiras através desses sistemas de secreção. Uma vez dentro das células alvo, as proteínas de virulência são encaminhadas ao seu estado nativo e ativadas pela própria maquinaria de enovelamento da célula hospedeira, composta por chaperonas moleculares. A Hsp90 é uma chaperona molecular cuja função é vinculada a diversas e situações de estresse biótico e abiótico. Este trabalho tem como objetivo isolar uma Hsp90 de *Citrus sinensis* e caracterizar em aspectos estruturais, dinâmicos e funcionais, além de tentar identificar um possível papel para esta proteína durante o processo infectivo causado pelo fitopatógeno bacteriano, *Xanthomonas citri*, na planta.

*O projeto de pesquisa acima descrito, a ser conduzido pelo aluno de doutorado Yuri Abreu Mendonça, recebeu autorização desta Comissão Interna de Biossegurança.*

Presidente em exercício da CIBio-IQ: Carlos H. I. Ramos