

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARINA MARQUES TEIXEIRA VANINI

**“ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA LIPOPROTEÍNA  
DE MEMBRANA EXTERNA OMLA DE *Xanthomonas citri*”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Marina Marques Teixeira Vanini*  
*Celso Benediti*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Genética de  
Microorganismos

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Celso Eduardo Benediti

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Thelma Aguiar Pertinhez

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V319a

Vanini, Marina Marques Teixeira  
Análise estrutural e funcional da lipoproteína de membrana externa omlA de *Xanthomonas citri* / Marina Marques Teixeira Vanini. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti, Thelma Aguiar Pertinhez.

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

1. Lipoproteínas. 2. *Xanthomonas axopodis* pv. citri.  
3. Ressonância magnética nuclear. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Pertinhez, Thelma Aguiar. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

**Título em inglês:** NMR resolution structure of the outer membrane lipoprotein omlA from *Xanthomonas citri*.

**Palavras-chave em inglês:** Lipoproteins; *Xanthomonas axopodis* pv. citri; Nuclear magnetic resonance.

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

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

**Banca examinadora:** Celso Eduardo Benedetti, Shaker Chuck Farah, Roberto Kopke Salinas, Jörg Kobarg, Anete Pereira de Souza.

**Data da defesa:** 18/02/2008.

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

Campinas, 18 de fevereiro de 2008

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

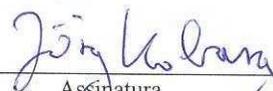


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Valente

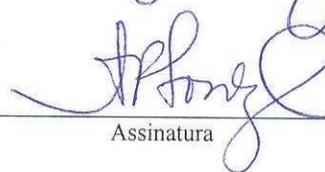
Assinatura

Prof. Dr. Jorg Kobarg



Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



Assinatura

Prof. Dr. Andrés Yunes

Assinatura

Prof. Dr. João Alexandre Barbosa

Assinatura

Dr. Roberto Kopke Salinas



Assinatura

*E qual é a causa da felicidade?*  
*Respondo: é a certeza da Minha Presença em suas vidas,*  
*é o conhecimento da minha Verdade.*  
*Tal conhecimento se realiza na inteligência, que é o olho da alma;*  
*pupila de tal olho é a fé.*  
*Sem fé ninguém reconhece a estrada,*  
*à semelhança daquele que possuísse o olho,*  
*mas coberto por um pano.*  
*Sim, a pupila deste olhar é a fé;*  
*nada verá quem cobrir sua inteligência com o pano da infelicidade*  
*por causa do egoísmo.*  
*Tal pessoa terá a inteligência,*  
*mas não a luz para conhecer.*

Deus a Santa Catarina de Siena  
em “O Diálogo”, Santa Catarina de Siena, Doutora da Igreja (1347-1380)

*A meu amável e doce pai, Prof. Dr. Elenaldo Celso Teixeira, a quem tanto devia e não pude  
retribuir,  
À minha querida e tenra mãe, Profa. Dra. Maria do Carmo Araújo, que apesar das perdas,  
radia a todos com sua alegria,  
ofereço este pequeno fruto destes meus anos de trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Celso Benedetti, sempre dedicado, presente e bem humorado, pela sua orientação;

À Dra. Thelma Aguiar Pertinhez, sempre paciente, solícita e atenciosa, pela sua co-orientação;

À Fapesp e Capes pelo auxílio financeiro;

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e *Università Degli Studi di Parma* pela infra-estrutura de alta qualidade para a pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP pela oportunidade do doutorado, em especial aos coordenadores Prof(a)s. Dr(a)s. Anete Pereira de Souza e Marcelo Menossi;

Aos membros da banca – Prof(a)s. Dr(a)s. Shaker Chuck Farah, Ana Paula Valente, Jörg Kobarg e Anete Pereira de Souza – e pré-banca – Prof(a)s. Dr(a)s. Jörg Kobarg e Ljubica Tasic – por aceitarem participar da avaliação deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Alberto Spisni, pela colaboração e pela oportunidade de estágio na *Università Degli Studi di Parma* e todo seu apoio à minha família durante a estadia na Itália;

À equipe do Prof. Spisni – Dr. Giorgio Sartor e Prof. Dra. Lorella Franzoni, Dra. Emanuela Casali e especialmente Dra. Elena Ferrari – pela hospitalidade e apoio;

Ao Dr. Maurício Sforça, pela colaboração e contribuição na finalização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, por ceder a biblioteca genômica de *Xanthomonas*;

Ao Dr. João Alexandre Barbosa, pelo auxílio nos alinhamentos estruturais;

À toda a equipe técnica do LNLS, em especial à equipe de Espectrometria de Massas;

Aos meus colegas de trabalho pela descontração, bom convívio e sugestões, e especialmente à Rosi e Aline, *experts* em Biologia Molecular e RMN, respectivamente;

Ao aluno Guilherme Oliveira do programa Bolsa de Verão do LNLS, pela sua dedicação;

A todos meus amigos Fluelitas e Montfortianos, pela verdadeira amizade, e especialmente aos queridos pequeninos Gabriel e Ana Maria;

Aos meus sogros e cunhados, por todo apoio a uma retirante nordestina;

Aos meus irmãos Tiago e Ana Rosa, por saberem compartilhar docemente da dor,

A meu pai e minha mãe, pelo zelo, pela dedicação e, enfim, pela vida;

Aos meus melhores frutos, meus pequenos Davi, Giordano e Maria Letizia;

Ao meu esposo Fábio, amigo para a eternidade, por tudo;

A Deus, Nosso Senhor, que alegra a minha juventude.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
A espectroscopia de RMN em Biologia Estrutural .....	3
A bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .....	5
As Lipoproteínas de Membrana Externa .....	6
A Família OmlA de Lipoproteínas .....	9
O Locus <i>omlA-fur</i> .....	11
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>CAPÍTULO I: Análise Estrutural da Proteína OmlA</b> .....	19
Introdução .....	19
Artigo I .....	20
Artigo II .....	24
<b>CAPÍTULO II: Análise Funcional do Locus <i>omlA-fur</i> e da Proteína OmlA</b> .....	39
Introdução .....	39
Material e Métodos .....	40
Confecção de Mutantes <i>omlA</i> e <i>fur</i> .....	40
Confecção e Ensaio com Genes Repórteres para os Promotores <i>PomlA</i> e <i>Pfur</i> .....	42
Confecção e Ensaio com Gene Repórter Bidirecional para o Promotor <i>PomlA-fur</i> ....	45
Detecção da Proteína OmlA em <i>Xac</i> submetida a diferentes tratamentos .....	46
Ensaio de mono-híbrido .....	47
Ensaio de Co-expressão OmlA e $\beta$ -lactamase .....	49
Experimento de <i>pulldown</i> .....	51
Experimentos de Coimunoprecipitação .....	52
Resultados e Discussão .....	55
Confecção de Mutantes <i>omlA</i> e <i>fur</i> .....	55
Análise da Atividade dos Promotores <i>PomlA</i> e <i>Pfur</i> Através dos Genes Repórteres ....	56
Análise da Expressão da Proteína OmlA em <i>Xac</i> .....	60

Ensaio com Gene repórter de <i>PomLA-fur</i> ou Pbidirecional .....	65
Ensaio de Mono Híbrido .....	69
Análise de Inibição da $\beta$ -lactamase pela Proteína Omla .....	72
Pull Down e Coimunoprecipitação .....	75
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## RESUMO

Dentro do programa *Smolbnet* (*Structural Molecular Biology Network*) da Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), a *orf* (*open reading frame*) XAC1516 da bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), foi selecionada para estudos de estrutura e função. XAC1516 codifica uma lipoproteína de membrana externa semelhante a membros da família OmlA/SmpA (*Outer membrane lipoprotein A/Small membrane protein A*) de pequenas lipoproteínas, amplamente distribuída entre as Proteobacteria  $\beta$  e  $\gamma$ . Apesar de se conhecer o papel de muitas lipoproteínas, nenhum membro OmlA/SmpA tem estrutura 3D (tridimensional) determinada e pouco se sabe sobre esta família do ponto de vista funcional, sendo sugerido um possível papel na manutenção da integridade do envelope celular. Curiosamente, no genoma de diversas bactérias o gene *omlA* apresenta localização adjacente ao gene *fur* (*ferric uptake regulator*), que codifica o principal regulador transcricional dos níveis intracelulares de ferro em bactérias Gram-negativas. O curto espaço intergênico entre *omlA* e *fur* sugere que os seus promotores são sobrepostos e que suas funções e/ou regulação podem estar associadas.

Este trabalho procurou investigar a função da proteína OmlA de *Xac*, primordialmente através da determinação da sua estrutura 3D e análise das suas propriedades dinâmicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Também se buscou estudar a possibilidade de associação regulatória e/ou funcional entre *omlA* e *fur*, e o envolvimento do locus no metabolismo de ferro ou na resposta ao estresse celular.

Nós observamos que durante a infecção em folhas de citrus OmlA tem sua expressão aumentada em *Xac* e que neste processo os genes *omlA* e *fur* são co-ativados, sugerindo seu envolvimento na interação planta-patógeno. No entanto, o locus não foi ativado em condições associadas ao metabolismo de ferro e à regulação por Fur observada em outros organismos. Ensaio de mono-híbrido foram realizados para tentar detectar possíveis fatores de ligação ao promotor do locus *omlA* e fornecer informações sobre a sua regulação, mas sem sucesso.

Pela primeira vez, as propriedades conformacionais e dinâmicas foram determinadas por RMN para um membro da família OmlA, e a estrutura 3D da proteína OmlA de *Xac* não revelou sua associação direta com processos de captação de ferro. A proteína possui extremidades desenvolvidas e uma porção central estruturada intercalada por *loops* flexíveis

e composta de três fitas  $\beta$  e duas pequenas  $\alpha$  hélices que se empacotam numa arquitetura do tipo bicamada  $\alpha/\beta$ . Curiosamente, este enovelamento se assemelha aos domínios da proteína BLIP ( *$\beta$ -lactamase inhibitory protein*), um inibidor de  $\beta$ -lactamase envolvido em interações proteína-proteína. Testes *in vivo* de co-expressão das proteínas OmlA e  $\beta$ -lactamase não indicaram que OmlA possua atividade de inibição da  $\beta$ -lactamase, e que portanto é provável que se associe a outra(s) proteína(s). Possíveis parceiros de interação não foram detectados através de experimentos de *pull-down* e coimunoprecipitação. Apesar disso, os resultados sugerem que a proteína OmlA pode estar envolvida em algum tipo de interação proteína-proteína associada à infecção na planta e sua co-ativação com *fur* deve fazer parte de uma resposta global relacionada à ativação de mecanismos de importância para sobrevivência de *Xac* durante a colonização na planta.

## **ABSTRACT**

The XAC1516 gene from the citrus canker pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), was selected for structural and functional studies in the context of the Fapesp Smolbnet program. XAC1516 codes for an outer membrane lipoprotein similar to members of the OmlA/SmpA (Outer membrane lipoprotein A/Small membrane protein A) family of small lipoproteins widely distributed across the  $\beta$  and  $\gamma$  Proteobacteria. Although the role of numerous bacterial lipoproteins is known, the tridimensional (3D) structure of OmlA/SmpA members has never been reported and little is known about its biological function. However, it has been proposed a role of OmlA in the stability of the cellular envelope. Curiously, the *omlA* gene is located adjacently to the *fur* (ferric uptake regulator) gene, which codes for the most important transcriptional regulator of iron intracellular levels in Gram-negative bacteria. The tight intergenic spacement between *omlA* and *fur* suggests that they have superimposed promoters and that their function or regulation may be associated.

In this work, we have investigated the function of the OmlA protein from *Xac* essentially through its 3D structure determination and dynamic analysis by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). We also investigated the possibility of a functional association between *omlA* and *fur* and the involvement of this locus in iron metabolism or cellular stress response.

We found that in *Xac* OmlA expression is enhanced during citrus infection and that in this process *omlA* and *fur* are co-activated, thus suggesting their involvement in plant-pathogen interaction. The locus, though, was not activated upon conditions associated to iron metabolism or Fur regulation already observed in other organisms. One-hybrid assay were performed in order to detect possible transcriptional factors implicated in *omlA/fur* expression or repression, but without success. Conformational and dynamical properties of OmlA were determined by NMR. The protein has unfolded N and C termini and a structurally well defined core interconnected by flexible loops and composed by three  $\beta$ -strands and two small  $\alpha$ -helices, which pack against each other forming a two-layer  $\alpha/\beta$  scaffold. Curiously, this fold resembles the domains of BLIP ( $\beta$ -lactamase inhibitory protein), a  $\beta$ -lactamase inhibitor involved in protein-protein interaction. OmlA and  $\beta$ -lactamase co-expression *in vivo* experiments did not indicate that OmlA has a  $\beta$ -lactamase inhibitory activity. It is possible then that OmlA associates with another protein or proteins, but interacting partners were not

detected through *pulldown* and coimmunoprecipitation assays. Nonetheless, the results suggests that OmlA may be implicated in some sort of protein-protein interaction associated to plant infection and its coactivation with *fur* may take part of a global response related to activation of important mechanisms for *Xac* surviving during its colonization in plant.

## INTRODUÇÃO

A parceria entre a FAPESP e o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) criou, no ano de 2000, o programa *SmolBnet* ou Rede de Biologia Molecular Estrutural. A iniciativa visou dar o necessário prosseguimento aos diversos projetos do Programa Genoma FAPESP e ampliar a capacitação de recursos humanos brasileiros no campo da pesquisa pós-genômica. A obtenção de estruturas tridimensionais a partir da disponibilidade das *orfs* dos projetos Genoma Humano do Câncer, Genoma Cana, Genoma *Xylella* e Genoma *Xanthomonas citri* previa ampliar o conhecimento acerca das proteínas, podendo designar funções aos produtos gênicos e validar os dados de anotação genômica. A determinação de estruturas moleculares em alta resolução também possibilitaria a capacitação de pesquisadores em técnicas ainda pouco estabelecidas no estado de São Paulo e no Brasil, como a Cristalografia de Raio-X e a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

As *orfs* da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* isolado 306 integraram um dos focos do *SmolBnet*. O seqüenciamento completo do genoma de *Xac* também resultou de uma parceria entre a FAPESP e a iniciativa privada ligada ao setor da citricultura para ajudar a elucidar a biologia deste importante fitopatógeno (<http://www.fundecitrus.com.br>). O genoma de *Xac* é constituído de um cromossomo circular com cerca de 5000 kpb e dois plasmídeos (pXAC33 e pXAC64) com cerca de 33 kpb e 65 kpb, aproximadamente (Da Silva *et al.*, 2002). O sequenciamento revelou a existência de inúmeras *orfs* conservadas que codificam proteínas de função e estrutura ainda desconhecida, assim como de proteínas ainda não identificadas e caracterizadas, além de uma série de elementos do tipo *transposon* (Da Silva *et al.*, 2002).

Proteínas conservadas com função desconhecida são interessantes alvos para estudos estruturais e funcionais no nível molecular pois contribuem para a compreensão sobre a fisiologia do organismo, e tais estudos podem ser extrapolados à proteínas homólogas. As estruturas 3Ds podem revelar funções biológicas até então não contempladas e, ao mesmo tempo, a informação estrutural em alta resolução é, em muitos casos, o meio mais eficiente através do qual estas funções são descobertas. Além disso, estes estudos podem revelar novos tipos de enovelamento, ampliando o conhecimento sobre a biologia estrutural de proteínas.

Os principais métodos de obtenção de informação estrutural em alta resolução consistem nas técnicas de cristalografia de raios-X e espectroscopia de RMN. Após os alvos

de estudos superarem os gargalos relacionados às etapas de clonagem, expressão e purificação, ambas as técnicas ainda apresentam suas limitações, como a necessidade da obtenção de cristais com bom padrão de difração, no caso da cristalografia, e a limitação do tamanho da proteína, no caso da RMN. No entanto, ambas metodologias têm desenvolvido rápido progresso devido à automação de uma série de procedimentos e com isso aumentado o seu sucesso (Lamzim & Perrakis, 2000; Kim & Szyperski, 2003).

Apesar da desvantagem de se aplicar apenas a moléculas de tamanho limitado, a espectroscopia de RMN apresenta importantes vantagens em relação à cristalografia. A principal delas refere-se ao estudo das moléculas em solução e portanto, num ambiente que é muito mais próximo ao seu estado nativo. Além disso, a RMN é a única técnica capaz de obter informações sobre as propriedades dinâmicas das proteínas (Ferentz & Wagner, 2000). O sucesso na determinação de uma estrutura baseada em RMN vai depender da seleção de proteínas que cumpram as seguintes exigências: serem pequenas, solúveis, monodispersas e enoveladas.

Como parte do programa *SmolBnet* da FAPESP, este projeto, desenvolvido no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) do LNLS, selecionou a *orf* XAC1516 para estudos de estrutura e função através de RMN e técnicas de biologia molecular. A *orf* XAC1516 codifica uma proteína de cerca de 15 kDa, similar a membros da família OmlA/SmpA de lipoproteínas de membrana externa com função desconhecida. De acordo com os dados do genoma, a proteína OmlA de *Xac* apresenta baixo peso molecular e parece não formar dímero e nem se complexar a metais, preenchendo assim, pré-requisitos importantes para o estudo por RMN. Além disso, nenhum depósito de coordenadas estruturais para qualquer membro da família OmlA tinha até então sido registrado no PDB (*Protein Data Bank*). Curiosamente, a *orf* XAC1516 está disposta no genoma de *Xac* em posição adjacente e divergente à *orf* XAC1517, que codifica uma proteína semelhante ao fator Fur (*ferric uptake regulator*), e esta organização genômica se observa em diversas outras Proteobacterias. Fur é considerado o principal regulador em resposta aos níveis de ferro em bactérias Gram-negativas e um repressor transcricional global em resposta ao estresse celular. Assim, a obtenção da estrutura da proteína OmlA poderia revelar um novo *folding* e auxiliar na elucidação da função desta molécula, cuja disposição no genoma sugeria o envolvimento funcional com um dos principais fatores relacionados à resposta ao estresse celular em bactérias Gram-negativas.

## A espectroscopia de RMN em Biologia Estrutural

A espectroscopia de RMN é um fenômeno físico relacionado com a propriedade de *spin* dos núcleos atômicos e se baseia na medida da absorção da radiação eletromagnética por núcleos atômicos submetidos a um intenso campo magnético (Cavanagh *et al.*, 1996). O próton  $^1\text{H}$  é o núcleo mais amplamente utilizado em RMN, pois suas propriedades de *spin* são adequadas à técnica, possuem alta sensibilidade à mesma e este núcleo apresenta grande abundância natural. A RMN possui uma ampla variedade de aplicações em Física, Química, Biologia e Biomedicina. A sua aplicação mais universalmente conhecida é, sem dúvida, a criação de imagens do corpo humano de forma não invasiva, competindo de maneira favorável com outras técnicas de diagnóstico clínico, como a Tomografia Computadorizada por Raio-X. Tão importante quanto estas aplicações médicas é a utilização da RMN na determinação de estruturas de macromoléculas biológicas no nível atômico (Wutrich, 1986; Cavanagh *et al.*, 1996).

A RMN representa uma poderosa ferramenta para investigar a estrutura e, conseqüentemente, a função de macromoléculas biológicas. Esta técnica espectroscópica de alta resolução é especial para o estudo de proteínas, sobretudo de peso molecular até 30 kDa. A técnica permite a determinação da estrutura molecular através de medidas da interação da radiação eletromagnética de rádio-frequência com núcleos apropriados imersos em um forte campo magnético (Cavanagh *et al.*, 1996). Os espectros de RMN podem fornecer, além das informações sobre a estrutura tridimensional das proteínas, dados sobre a estereoquímica, o modo de interação entre moléculas e a sua dinâmica molecular (Ferentz & Wagner, 2000).

O advento da RMN multidimensional associado ao uso da marcação isotópica uniforme de proteínas e ácidos nucleicos com os isótopos RMN-ativos  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  abriu as portas para a análise detalhada de estruturas macromoleculares, dinâmica e interação macromolecular. A aplicação da técnica de RMN multidimensional para a determinação da estrutura 3D de proteínas é bem estabelecida e requer o enriquecimento das proteínas com os núcleos  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$ . Estes núcleos apresentam as propriedades magnéticas de *spin* adequadas à RMN, mas abundância natural muito baixa, devendo ser incorporados às moléculas através de métodos da tecnologia do DNA recombinante para expressão heterolológica de proteínas (Evans, 1995). O enriquecimento das moléculas de interesse com os núcleos  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  permite a aquisição de experimentos de tripla ressonância cuja combinação é rotineiramente utilizada para o estabelecimento de

conectividades sequenciais entre aminoácidos e o assinalamento de valores dos deslocamentos químicos a cada núcleo de  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  da proteína, permitindo em seguida a interpretação dos espectros que fornecem informações espaciais (Cavanagh *et al.*, 1996).

A utilização de experimentos de tripla ressonância ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$ ) baseia-se no acoplamento do tipo escalar existente entre os núcleos de  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  e entre estes isótopos e o  $^1\text{H}$  diretamente ligado a eles. Os estudos estruturais de proteínas por RMN utilizam tais experimentos explorando a eficiente transferência de magnetização entre os núcleos através do acoplamento escalar para atribuir conjuntos de ressonâncias a aminoácidos individuais. Adicionalmente, experimentos que exploram os efeitos inter-residuais do tipo NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), cuja transferência de magnetização se dá não mais através das ligações químicas, mas sim através do espaço, são utilizados para atribuir os sinais de NOE a pares de núcleos específicos na sequência (Evans, 1995; Wutrich, 1986). O procedimento de atribuição permite a posterior interpretação dos NOEs como distâncias entre pares de átomos. Tais distâncias são utilizadas como restrições em algoritmos construídos para calcular estruturas moleculares compatíveis com a estrutura das ligações químicas e com as observações experimentais (Guntert, 1998).

A etapa de atribuição das ressonâncias no espectro de RMN é crucial e ainda considerada um pré-requisito para a posterior interpretação dos espectros que fornecem informações espaciais (Wutrich, 1986), como os NOEs, constantes de acoplamento, RDCs (Tjandra & Bax, 1997) e pontes de hidrogênio (Cordier & Grzesiek, 1999; Cornilescu *et al.*, 1999). Apesar do desenvolvimento de métodos automáticos de assinalamento (Moseley & Montelione, 1999), a conferência manual dos dados ainda se faz precisa. A atribuição também é necessária para a interpretação detalhada das medidas de relaxação, estudos de acessibilidade ao solvente ou de experimentos de mapeamento de deslocamento químico. O assinalamento dos NOEs a pares de núcleos é uma tarefa igualmente difícil e trabalhosa. Apesar de uma série de métodos de automação terem sido desenvolvidos (Mumenthaler & Braun, 1995; Nilges, 1995), este processo permanece largamente um procedimento manual (Atkinson & Saudek, 2002).

Além da determinação da estrutura molecular, a espectroscopia de RMN é a única técnica de resolução atômica que permite observar proteínas em estados intermediários de enovelamento, o que é essencial para o estudo deste processo (Ferentz & Wagner, 2000). Através das mudanças

de deslocamento químico, as fracas interações entre macromoléculas e ligantes também podem ser definidas em resolução atômica usando RMN, o que torna a técnica uma ferramenta poderosa na descoberta e no desenho de drogas (Shuker, 1996).

A técnica é também a única capaz de caracterizar a dinâmica interna de macromoléculas em solução através de medidas de relaxação nuclear, fornecendo informações essenciais para estudos de atividade biológica (Ishima & Torchia, 2000). A relaxação de um núcleo é causada pela flutuação no campo magnético que é resultado do tombamento da molécula em solução, assim como pela sua dinâmica interna. Os parâmetros de relaxação permitem monitorar a mobilidade da ligação N-H na cadeia principal da proteína que diferem conforme a flexibilidade ou rigidez das suas porções, caracterizando a sua dinâmica própria (Ishima & Torchia, 2000). A combinação das medidas de relaxação fornecem informações sobre os movimentos moleculares internos em escala de pico a nano segundos, dessa forma a RMN preenche a falha existente entre a estrutura molecular estática e a estrutura dinâmica, proporcionando meios para melhor compreender como mobilidade e função estão relacionadas (Palmer, 2004).

Os grandes e rápidos avanços em RMN têm permitido superar as limitações em relação ao tamanho das moléculas estudadas. A baixa velocidade de tombamento em solução de grandes estruturas resulta em perda da magnetização num curto espaço de tempo e o espectro obtido apresenta pouca sensibilidade e baixa resolução devido às linhas alargadas (Fernández & Wüthrich, 2003). No entanto, as técnicas modernas de RMN em solução já permitem os estudos de grandes estruturas (de 50 a 90kDa) através da aplicação dos princípios de TROSY (*transverse relaxation-optimized spectroscopy*) e CRINEPT (*cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer*) (Fernández & Wuthrich, 2003), tornando a aplicação da RMN em biologia estrutural ainda mais promissora.

### **A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

O gênero *Xanthomonas* pertence ao grupo das  $\gamma$ -Proteobacteria e compreende organismos gram-negativos aeróbicos que atacam aproximadamente todos os principais grupos de plantas superiores. Os hospedeiros da espécie *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, por sua vez, se

restringem aos membros da família Rutaceae (citrus) e o patógeno não se desenvolve em outras plantas, mesmo quando inoculado artificialmente (Duan *et al.*, 1999).

*Xac* é um fitopatógeno de ampla ocorrência e o agente causador do cancro cítrico. A doença produz lesões em ramos, folhas e frutos em todas as variedades de *Citrus* e a principal forma de controle da praga consiste na eliminação dos indivíduos contaminados e suspeitos dos pomares. A bactéria se dispersa no ambiente através do vento ou chuva e penetra na planta por meio dos estômatos ou outras aberturas causadas por lesões nas partes verdes. *Xac* se multiplica e coloniza os espaços intercelulares do mesófilo, provocando a hipertrofia e hiperplasia das células vegetais e, em última instância, a morte celular. A multiplicação massiva do patógeno no mesófilo associada à degeneração do tecido no local da infecção pode provocar a ruptura da epiderme, favorecendo a nova dispersão da bactéria no ambiente (Swarup *et al.*, 1991).

Apesar de haver diferentes graus de susceptibilidade, nenhuma variedade de *Citrus* é resistente ao patógeno, causando um grande impacto na citricultura brasileira e internacional. O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja e a citricultura é de fundamental importância para a sua economia, gerando divisas e empregos. O cancro cítrico provoca grandes perdas para a agricultura baseada em citrus não só devido aos danos que causa às plantas e frutos, mas também em virtude da necessidade de manter programas de erradicação e fiscalização. No Estado de São Paulo, a rigorosa fiscalização dos pomares permitiu a diminuição considerável da incidência do cancro cítrico nos últimos anos. Apesar disso, levantamentos recentes apontam o surgimento de novos focos da doença em determinadas regiões do Estado (<http://www.fundecitrus.com.br>).

Sabe-se que o desenvolvimento do cancro cítrico por *Xac* em citrus depende especificamente da proteína efetora PthA. A expressão de *pthA* em células de citrus desencadeia os processos de divisão, entumescimento e morte das células hospedeiras, sendo portanto considerada um dos determinantes principais da patogenicidade de *Xac* (Duan *et al.*, 1999). No entanto, o papel das lipoproteínas de membrana externa no desenvolvimento da infecção e na sobrevivência do patógeno na planta nunca foi avaliado.

### **As Lipoproteínas de Membrana Externa**

No genoma de *Xac*, a *orf* XAC1516 codifica uma proteína semelhante a uma lipoproteína de membrana externa observada em diversas bactérias Gram-negativas conhecida como OmlA

(*outer membrane lipoprotein A*). De modo geral, as lipoproteínas bacterianas possuem na sua porção N-terminal uma seqüência sinal para processamento no periplasma através de modificação por lipídio e para ancoragem na membrana. Estas proteínas estão envolvidas em ampla gama de funções como: proteínas de ligação a substrato, em sistema de transporte do tipo ABC, resistência a antibióticos, sinalização celular, exportação e enovelamento de proteínas, esporulação, geminação e conjugação, além de proteínas de função desconhecida (Sutcliffe & Russel, 1995). A localização celular das lipoproteínas no envelope celular das bactérias Gram-negativas as torna um foco de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas e o desenho de drogas (Réglier-Poupet *et al.*, 2003).

O envelope celular é uma estrutura característica das bactérias Gram-negativas e fundamental para a sua sobrevivência. Consiste de uma membrana interna e outra externa, separadas por um compartimento preenchido por uma fina camada de peptidoglicanos. Ambas membranas são bicamadas lipídicas enriquecidas com proteínas, mas diferem dramaticamente na sua estrutura e composição, refletindo a diversidade das funções que desempenham e do ambiente com o qual estão em contato. Enquanto a membrana interna está em contato direto com o citoplasma, a membrana externa serve como uma barreira protetora que controla o influxo e efluxo de compostos e separa o periplasma do ambiente externo. Diferentemente da membrana interna, a membrana externa é assimétrica, contendo lipopolissacarídeos na sua face externa e fosfolipídios na sua face interna. Esta bicamada contém duas classes de proteínas, que se associam com a membrana de diferentes modos. As proteínas do tipo barril beta, exclusivas da membrana externa, são proteínas integrais embebidas na bicamada que funcionam como canais de transporte de compostos; e as lipoproteínas, ancoradas na membrana através da porção lipídica ligada numa cisteína N-terminal (Ruiz *et al.*, 2006).

A modificação pós-traducional de proteínas pela incorporação de um lipídio foi primeiramente identificada na proteína *major outer membrane protein* de *E. coli*, conhecida como *Braun lipoprotein* (Hantke & Braun, 1973). Posteriormente, muitas proteínas bacterianas, relacionadas ou não, mas possuindo a mesma modificação, foram descobertas e atualmente são genericamente denominadas como lipoproteínas.

As primeiras pesquisas sobre a biosíntese destas proteínas estabeleceu que as lipoproteínas bacterianas são sintetizadas no citoplasma como pré-lipoproteínas possuindo um peptídeo sinal na porção N-terminal (Inouye *et al.*, 1977). Este precursor é translocado para a

face periplasmática da membrana interna através da translocase *Sec*, onde sofre uma série etapas de modificação. Primeiramente a cisteína presente numa sequência característica e reconhecida do peptídeo sinal é ligada a um diacilglicerol através de uma ligação tioéter. Em seguida, ocorre a clivagem do peptídeo sinal através da peptidase sinal II tornando a cisteína modificada o resíduo N-terminal. Esta cisteína é finalmente acilada através de uma fosfolípido-apolipoproteína transacilase (Sankaran & Wu, 1994). Dependendo da ausência ou presença do aminoácido aspartato em determinada posição da sequência, a lipoproteína madura é então direcionada à membrana externa ou retida na membrana interna, respectivamente.

O direcionamento de lipoproteínas para a membrana externa é catalisado pelo sistema *Lol*, composto por cinco proteínas, LolA-E, e elegantemente descrito em *E. coli* (Masuda *et al.*, 2002; Tokuda & Matsuyama, 2004). O complexo transportador LolCDE, um cassete de ligação a ATP, reconhece, na face periplasmática da membrana interna, as lipoproteínas recém-sintetizadas e direcionadas à membrana externa. O cassete promove o desligamento das lipoproteínas da membrana na presença de uma outra proteína do sistema, LolA. LolA é uma proteína periplasmática que forma um complexo solúvel com a lipoproteína e atravessa o periplasma afim de alcançar o receptor específico de lipoproteínas de membrana externa, LolB. LolA transfere a lipoproteína a LolB, também uma lipoproteína de membrana externa, que finalmente incorpora a nova lipoproteína à membrana externa.

A análise da sequência do peptídeo sinal em 26 lipoproteínas bem caracterizadas revelou a presença de uma porção distinta na sua extremidade C-terminal, caracterizada pela sequência LAGC, posteriormente identificada como *lipobox* (Sankaran & Wu, 1994). A cisteína presente nesta sequência (posição +1) é invariável, e a posição -3 é em geral ocupada por uma leucina. Estudos com mutações na sequência N-terminal mostraram outras características importantes no reconhecimento do peptídeo sinal: entre os primeiros 5 a 7 resíduos geralmente existem 2 resíduos carregados positivamente (Arg/Lys) caracterizando a *n-region*, seguida por uma sequência de 7 a 20 aminoácidos que caracterizam a *h-region*, rica em resíduos hidrofóbicos e neutros. Em *E. coli*, a presença do aminoácido aspartato na posição +2 determina, unicamente, o direcionamento das lipoproteínas para a membrana interna, enquanto que a sua ausência determina o seu transporte para a membrana externa. A presença

do aspartato funciona então como sinal para retenção das lipoproteínas na membrana interna (Yamaguchi *et al.*, 1988; Terada *et al.*, 2001).

A seqüência sinal consenso para o *lipobox* tem sido efetivamente utilizada como ferramenta para predição de lipoproteínas e mais de 450 lipoproteínas foram assim identificadas em diferentes bactérias (Babu & Sankaran, 2002). Recentemente, a análise de 43 genomas bacterianos completos disponíveis em rede permitiu a organização de um banco de dados para lipoproteínas de bactérias, estabelecendo que a seqüência canônica para o *lipobox* seria [LV][ASTVI][GAS][C] (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/lipobox.shtml>).

As proteínas de superfície celular e extracelulares apresentam uma localização ideal para participar de interações patógeno-hospedeiro. Trabalhos relacionados com as enzimas da via biosintética das lipoproteínas também têm mostrado que esta via é essencial para o crescimento e viabilidade de bactérias. Lipoproteínas de patógenos associadas a virulência já foram identificadas e parecem desempenhar um papel crucial em interações na superfície patógeno-hospedeiro (Chambaud *et al.*, 1999, Zgurskaya & Nikaido, 2000). Em *Mycobacterium tuberculosis*, observou-se que o metabolismo das lipoproteínas é um importante determinante de virulência (Sander *et al.*, 2004). Em *Listeria monocytogenes*, a maturação das lipoproteínas também é necessária no processo de infecção deste patógeno de humanos e animais (Réglier-Poupet *et al.*, 2003). No entanto, muito pouco se sabe sobre as lipoproteínas de membrana externa de fitopatógenos.

### **A Família OmlA/SmpA de Lipoproteínas**

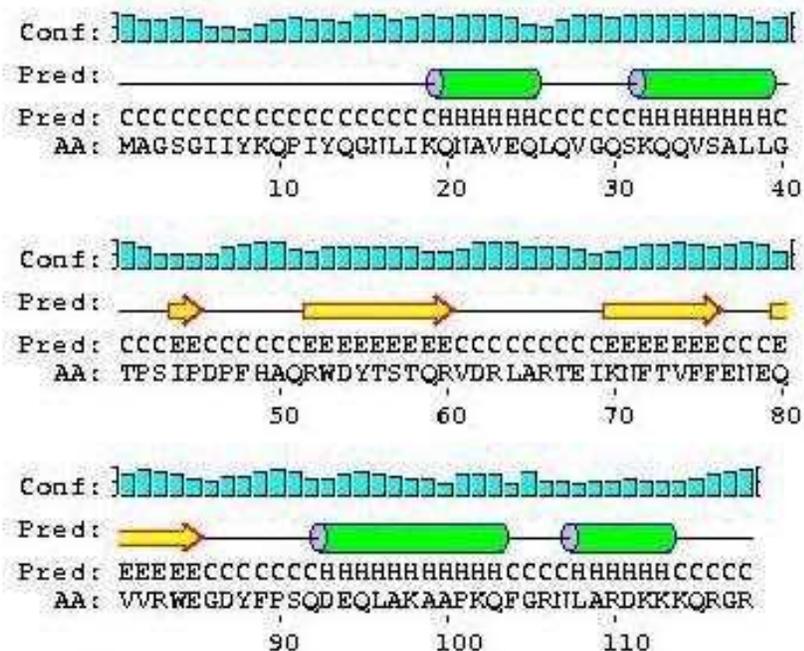
A família de lipoproteínas OmlA/SmpA (*outer membrane lipoprotein A/small membrane protein A*) possui membros em diversas bactérias das subclasses  $\beta$  e  $\gamma$  das Proteobacterias. São lipoproteínas de baixo peso molecular e função primária desconhecida. Devido à sua provável localização celular, a proteína OmlA de bactérias que infectam animais é alvo para o desenvolvimento de vacinas e testes de detecção de patógenos. A proteína OmlA da bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* foi utilizada com sucesso como alvo de vacina para imunizar porcos contra a pleuropneumonia (Gerlach *et al.*, 1993; Bunka *et al.*, 1995; Alcon *et al.*, 2003). A presença da OmlA também foi utilizada com sucesso como teste para detecção prévia da infecção por este patógeno (Fittipaldi *et al.*, 2003). Além disso, a regulação

positiva de *omlA* sob indução de fluido da lavagem bronquealveolar foi observada, sugerindo um papel da OmlA na virulência deste patógeno (Jacobsen *et al.*, 2005).

Do ponto de vista estrutural, funcional e genético, esta família de proteínas permanece pouco caracterizada. Apenas recentemente foi demonstrado que o membro SmpA de *E. coli* faz parte de um complexo envolvido na inserção de proteínas na membrana externa, auxiliando na integridade estrutural do envelope celular (Sklar *et al.*, 2007). Consistentemente, mutantes *omlA* em *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 1999) e, mais recentemente, em *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Fuangthong *et al.*, 2007) são sensíveis a detergentes e antibióticos variados e em *Pseudomonas putida* um mutante *omlA* foi selecionado através da sensibilidade ao ácido benzóico (Reva *et al.*, 2006). Assim, tem-se atribuído um papel estrutural aos membros da família OmlA/SmpA, pois a sua presença parece ser importante na manutenção da membrana externa como barreira de integridade física. No entanto, os mecanismos relacionados a este papel são totalmente desconhecidos e durante o planejamento deste trabalho, apenas o mutante em *P. aeruginosa* havia sido descrito (Ochsner *et al.*, 1999).

Os membros desta família contêm a seqüência sinal N-terminal típica de lipoproteínas bacterianas, que compreende os sítios de clivagem e de ligação de lipídio, e a porção central similar, mas a extremidade C-terminal apresenta tamanhos variados (vide o alinhamento entre membros da família mostrado na Figura 1 do artigo publicado em *Proteins, Structure, Function and Bioinformatics*, capítulo I). A seqüência primária da OmlA de *Pseudomonas* é bastante similar a OmlA de *Xac*, no entanto, a primeira apresenta uma extensão na porção C-terminal em relação a segunda, com características de motivo rico em prolina (não mostrado no alinhamento). A SmpA de *E. coli* possui uma porção C-terminal menor, que parece ter uma função estrutural importante no caso das OmlAs, como mostra a predição de estrutura secundária da proteína OmlA de *Xac* (Figura 1).

De acordo com a predição, a proteína OmlA mostra a porção central caracterizada por prováveis fitas beta e a presença de elementos de estrutura secundária em alfa-hélice nas extremidades N- e C-terminal, enquanto a porção N-terminal mais extrema encontra-se desenovelada (Figura 1). As diferenças nas estruturas primárias devem refletir diferenças também nas estruturas terciárias, e conseqüentemente no papel destas proteínas do ponto de vista celular, mas a semelhança considerável na porção central permite sugerir comparações estruturais e funcionais entre os membros da família.



**Figura 1.** Predição da estrutura secundária para proteína XAC-OmlA recombinante utilizada neste trabalho (*Psipred* – McGuffin *et al.*, 2000). As barras (1ª linha) correspondem à confiabilidade da predição; a linha, o cilindro e a seta (2ª linha) correspondem respectivamente à porções desenoveladas, em  $\alpha$ -hélice e em folha- $\beta$ , identificadas pelas letras C, H e E (3ª linha), respectivamente; na 4ª linha estão as letras correspondentes aos aminoácidos da sequência em questão.

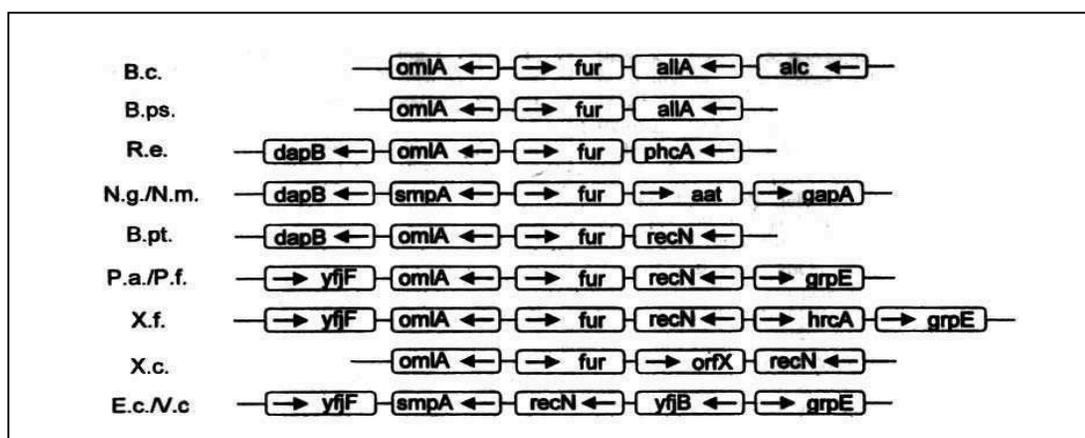
### O Lócus *omlA-fur*

Além do fato de serem proteínas cuja localização celular não permite descartar um possível papel em interações patógeno-hospedeiro, a família OmlA/SmpA é um interessante alvo de estudo sobretudo pelo fato de diversos homólogos *omlA* possuírem localização adjacente ao gene *fur* (*ferric uptake regulator*). O gene *fur* codifica o principal regulador dos níveis intracelulares de ferro nas bactéria Gram-negativas (Andrews *et al.*, 2003).

O fator Fur de *E. coli* é uma metaloproteína de zinco de 17 kDa (Althaus *et al.*, 1999) que sob condições de suficiência de ferro forma um complexo dimérico com íons  $Fe^{+2}$ , ligando-se aos *Fur box* – seqüências palindrômicas de DNA ricas em AT que estão presentes nos promotores de diversos genes regulados por ferro (Bagg & Neilands, 1987a, b; de Lorenzo *et al.*, 1987; Calderwood & Mekalanos, 1988). O paradigma clássico descreve que a ligação do complexo Fur- $Fe^{+2}$  ao *Fur box* resulta na repressão da transcrição destes genes, e em

resposta à limitação de ferro, Fur não forma o complexo e não se liga mais aos sítios operadores, permitindo a transcrição gênica (Bagg & Neilands, 1987a).

A organização genômica caracterizada pela presença do gene *omlA* imediatamente após o gene *fur* é amplamente observada nos organismos dos grupos  $\beta$  e  $\gamma$  da subclasse Proteobacteria (Figura 2) (Lowe *et al.*, 2001). O espaçamento curto ou superposição de promotores divergentes é uma característica comum em bactérias e geralmente ocorre quando dois genes transcritos divergentemente são co-regulados (Bertrand *et al.*, 1983; Marques *et al.*, 1998).



**Figura 2:** Organização genômica de *omlA* e *fur* em membros das subclasses  $\beta$  e  $\gamma$  de Proteobacteria: *Burkholderia cepacia* (B.c.), *Burkholderia pseudomallei* (B.ps.) *Ralstonia eutropha* (R.e.), *Neisseria gonorrhoeae* (N.g.), *Neisseria meningitidis* (N.m.), *Bordetella pertussis* (B.pt.), *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.), *Pseudomonas fluorescens* (P.f.), *Xylella fastidiosa* (X.f.), *Xanthomonas campestris* (X.c.), *Escherichia coli* (E.c.) e *Vibrio cholerae* (V.c.). Os produtos conhecidos são: RNAt transferase (aat), alantoicase (alc), ureidoglicolato hidrolase (allA), dihidropicolonato redutase (dapB), gliceraldeído fosfato desidrogenase (gapA), proteína *heat-shock* (grpE), repressor-choque térmico (hrcA), ativador t Lys-R (phcA), proteína de recombinação (recN), orfX, yjF e yjB de função desconhecida (extraído de Lowe *et al.*, 2001)

Em *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 1999) e *Burkholderia cepacia* (Lowe *et al.*, 2001), *fur* e *omlA* são divergentemente transcritos, mas apesar da superposição dos seus promotores, Fur parece não afetar a regulação destes genes. Em *Xac*, os genes que codificam as proteínas OmlA e Fur (XAC1516 e XAC1517, respectivamente) também estão proximamente localizados no cromossomo e são transcritos em orientações opostas (Figura 3). A pequena região não traduzida entre *fur* e *omlA* no genoma de *Xac* também sugere que estes genes possuem promotores sobrepostos, podendo haver sequências regulatórias de *fur* na

região codificadora de *omlA* e vice-versa. Apesar de não se detectar nenhuma sequência do tipo *Fur box*, algumas regiões ricas em AT podem ser observadas. Assim, a regulação da transcrição de ambos os genes poderia de alguma forma estar relacionada, ainda que as funções destes genes não pareçam estar associadas.

```
TCAACGGCCGCGTTGCTTCTTCTTGTGCGGTGCCAGGTTGCGGCCGAATTGCTTGGGGCGGGCTTTGGCCAGCTG
CTCGTCTTGCAGCGGGAAATAGTCGCCTTCCCAGCGCACGACCTGTTTCGTTCTCGAAGAACACAGTGAAATTCTT
GATCTCGGTACGCGCCAGACGGTCCACGCGCTGCGTGGAGGTATAGTCCCAGCGCTGGGCATGGAACGGGTTCGGG
GATCGAGGGCGTGCCAGCAACGCGCTGACCTGCTGCTTGTGCTTGGCCTACCTGCAGTTGCTCCACGGCGTTCTG
TTTGATCAGATTGCCCTGGTAGATCGGCTGCTTGTAGATGATGCCGCGAGCCAGCGGTGGAAAGAGCAACGGCGGC
GACCAGCAGGAGATTACGCATCGGGGATTAAGTGTGAGGAAATCACGCCGATGATACACTTCCGCGGGTTCGCCG
CGACCCGTTTGATGGCAGCTGGCGCTAAATCGCCAATGAACGGAGAACGATGGAAACCCACGACCTGCGCAAAG
TCCGGCTCAAGGTGACCCATCCGCGCATGCGGATCCTGGAAGTCTCGAACAGAAGAGCAATCAGCATCACCTCA
GCGCAGAAGACATCTATCGCCAAGTCTCGACCACGGCGACGAGATCGGCTTGGCCACGGTCTACCGCGTGCTGA
CCCAGTTCGAGGGCGCCGGCTTGGTGCTGAAGCACAATTTGAAAGGCGGGCAGGCCGTCTACGAGCTGGATCGCG
GCGGTACACCACGACCATATGGTGGACGTGGATAACCGGTACCGTATCGAGTTCGAGAGCGAGGAAATCGAGGCGT
TGCAGCGCCAGATCGCCGCAAGCATGGCTATGAACTGGAAGAGCACTCGCTGGTGCTGTACGTGCGCAAGAAGC
GTGCGCGCTGA
```



**Figura 3:** Sequência de nucleotídeos da região cromossômica de *Xac* 306 compreendendo as ORFs (em preto) XAC1516 e XAC1517 (*omlA/fur*) em orientação oposta e a região intergênica (em azul). Os ATGs de *omlA* e *fur* estão indicados por setas. Em rosa, sequência *Shine-Delgarno*. Em vermelho, regiões ricas em AT. Em laranja um palíndromo observado.

A regulação gênica pelo fator Fur é bastante complexa e ainda não totalmente compreendida apesar de ser alvo de diversos estudos. Em algumas bactérias, Fur promove sua autoregulação (Delany *et al.*, 2002, 2003), enquanto que em outras reprime (Delany *et al.*, 2003, 2004) ou promove (Hall & Foster, 1996) a transcrição gênica em resposta a ferro. Além disso, o fator Fur é considerado um regulador global em resposta a ferro, pois regula a transcrição não apenas de genes de captação do metal, mas também de genes de resposta ao estresse oxidativo (Hasset *et al.*, 1996), de fatores de virulência (Litwin & Calderwood, 1993), tolerância a acidez (Bijlsma *et al.*, 2002) e expressão de fatores sigma alternativos (Ochsner & Vasil, 1996).

O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos microorganismos. Apesar de ser um elemento muito abundante na natureza, sua disponibilidade no ambiente, no entanto, é limitada pelo fato de ser rapidamente oxidado de  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  em condições aeróbicas e apresentar baixa solubilidade em pH neutro (Braun *et al.*, 1998). Em tecidos hospedeiros, a

disponibilidade de ferro também é limitada (Neidlands, 1995) e nos locais de interação entre plantas e micróbios é considerada muito baixa (Loprasert *et al.*, 1999). Por outro lado, o excesso de ferro é tóxico para as células, sobretudo devido a sua habilidade de catalisar as reações de Fenton, resultando na formação de radicais hidroxila que reagem fortemente com todos os tipos de biomoléculas (Touati, 2000). Conseqüentemente, é necessário que os sistemas de aquisição de ferro sejam precisamente regulados. Não é surpreendente, assim, que a produção de componentes celulares responsáveis pela utilização deste metal seja controlada por vários parâmetros que atuam sob diferentes condições fisiológicas e ambientais, tanto de maneira positiva quanto negativa (Crosa, 1997).

A expressão dependente de ferro, no entanto, não está necessariamente associada à regulação por Fur em todas as bactérias. Em *Rhizobium leguminosarum*, membro das  $\alpha$ -Proteobacteria, uma mutação no gene *fur* não mostrou nenhum efeito na expressão de uma série de *operons* envolvidos na captação de ferro (Wexler *et al.*, 2003). Ao invés disso, outra proteína, denominada RirA, foi identificada como responsável pela regulação de genes dos sistemas de aquisição de ferro (Todd *et al.*, 2002). RirA não possui nenhuma semelhança a Fur ou a DtxR – outro regulador transcricional do metabolismo de ferro presente em Actinobacterias – e pertence a família *Rrf2* de repressores transcricionais. A  $\alpha$ -Proteobacteria *Mesorhizobium loti*, por sua vez, não possui um homólogo de Fur no seu genoma (Wexler *et al.*, 2003). Paralelamente, em *R. leguminosarum* muitos genes expressos em maior nível em condições de excesso de ferro são regulados pelo fator Irr (*iron repressor regulator*), membro da superfamília Fur. Irr ocorre em todos os membros Rizhobiales e Rhodobacterales, enquanto RirA encontra-se em apenas um ramo destas duas linhagens.

Curiosamente, todos esses grupos contêm genes que se assemelham a *fur*, mas os estudos genéticos realizados com os mesmos indicam que os seus produtos gênicos funcionam como Mur (*manganese uptake regulator*), repressor transcricional em resposta a manganês de genes envolvidos na captação deste metal. As proteínas Fur de Rhizobia, porém, possuem uma série de características próprias de proteínas Fur clássicas. Tanto no caso de *R. leguminosarum* (Wexler *et al.*, 2003) quanto de *Bradyrhizobium japonicum* (Hamza *et al.*, 1999), Fur se liga a sequências *Fur box* canônicas de forma dependente de metal. Na  $\alpha$ -proteobacteria *Agrobacterium tumefaciens*, por sua vez, a proteína Fur atua como Mur, mas mantém importante papel na regulação das concentrações intracelulares de ferro (Kitphati *et al.*, 2007).

Dentre as  $\beta$  e  $\gamma$ -Proteobacteria, no entanto, o fator Fur parece ser o predominante na regulação do metabolismo de ferro, mas os padrões de regulação envolvendo ferro e Fur são variados, como já afirmado. Na bactéria *Vibrio cholera* foi observado um sistema de regulação formado por determinados genes que responde à ferro de forma independente de Fur (Mey *et al.*, 2005). Em *Neisseria meningitidis*, a mutação no gene *fur* resultou na indução de uma resposta a choque térmico e a transcrição deste genes não responde à limitação por ferro; paralelamente, as análises do mutante sob condições de insuficiência de ferro fornecem indícios de uma regulação associada ao ferro e que é independente do fator Fur (Delany *et al.*, 2006).

Dentre os patógenos de planta, também foi recentemente isolado um mutante *fur* em *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Cha *et al.*, 2007). Este mutante produz sideróforos de maneira constitutiva e, curiosamente, os fenótipos indicaram a associação do fator Fur com a regulação de genes envolvidos em *quorum sensing*, evidenciando mais uma vez a amplitude da regulação por Fur.

No gênero *Xanthomonas*, pouco se sabe sobre a regulação do metabolismo de ferro e o papel da proteína Fur. Em *X. campestris* pv. *phaseoli*, maiores níveis do RNAm de *fur* foram detectados em condições de baixa concentração de ferro e a proteína Fur de *X. phaseoli* mostrou-se capaz de reprimir um promotor regulado por Fur em *E. coli* (Loprasert *et al.*, 1999). Em *X. oryzae* pv. *oryzae*, o mutante *fur* avirulento e sensível a peróxido de hidrogênio também produz sideróforos de maneira constitutiva e é hipersensível ao metalo-antibiótico estreptonigrina, indicando que ocorre acúmulo do metal no meio intracelular na ausência da proteína Fur. A secreção constitutiva de sideróforos pelo mutante *fur* indica que ocorre desrepressão da maquinaria de captação de ferro na ausência da proteína Fur. A identidade dos genes que estão envolvidos na captação de ferro ou na síntese de sideróforos em *X. oryzae*, porém, não é conhecida e informações adicionais acerca da captação de ferro diretamente regulada por Fur só poderão ser obtidas após a identificação destes genes (Subramoni & Sonti, 2005).

Tão pouco é conhecida a identidade de tais genes em *X. axonopodis* pv. *citri*, e em qualquer outro membro do gênero *Xanthomonas*. Os sistemas envolvidos no metabolismo de ferro nestas bactérias permanecem ainda pouco caracterizados, assim como a co-localização *omlA-fur*, aspecto ainda menos estudado nas bactérias, em geral, com tal disposição genômica.

## OBJETIVOS

Dentro do contexto exposto, este trabalho buscou, através de técnicas de RMN e biologia molecular, caracterizar a estrutura e a função da proteína OmlA de *Xac* relacionadas ao gene *fur*, assim como estudar aspectos da regulação do locus *omlA-fur*.

Para tanto, contamos com a co-orientação da Dra. Thelma Aguiar Pertinhez, cuja supervisão foi de fundamental importância na análise por RMN, sobretudo para o cumprimento das etapas de aquisição de espectros e atribuição das ressonâncias dos núcleos da proteína OmlA recombinante de *Xac*. Também contamos com a realização de estágio doutorando na Universidade de Parma, Itália sob a supervisão do Prof Dr. Alberto Spisni na *Sezione di Chimica e Strutturistica Biochimica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia*.

Os objetivos específicos do projeto consistiram em, dentro da análise estrutural:

- Clonagem, expressão e purificação da proteína OmlA de *Xac*;
- Caracterização estrutural através de Dicroísmo Circular (CD) e RMN;
- Expressão e purificação da proteína OmlA de *Xac* enriquecida com os núcleos  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- Aquisição e análise de espectros de RMN para atribuição das ressonâncias das cadeias principal e lateral;
- Aquisição e análise de espectros de relaxação do  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  para o estudo de dinâmica molecular;
- Aquisição e análise de espectros de NOESY (*NOE Spectroscopy*) para obtenção de distâncias interprotônicas;
- Cálculos e modelagem das estruturas 3D.

E dentro da análise funcional:

- Confecção de plasmídios suicidas para obtenção de mutantes *omlA* e *fur* em *Xac*;
- Confecção e ensaios com fusões dos protomeres *omlA* e *fur* estendidos e do promotor mínimo *omlA-fur* ao repórter EGFP para avaliar a atividade dos genes e sua regulação;
- Análise da expressão da proteína Omla em *Xac* através de anticorpo;

- Ensaio de mono-híbrido para buscar possíveis fatores reguladores do promotor *omlA*;
- Co-expressão das proteínas OmlA de *Xac* e  $\beta$ -lactamase para verificar inibição da atividade da  $\beta$ -lactamase;
- Ensaio de *pulldown* e co-imunoprecipitação para buscar possíveis parceiros de interação com a proteína OmlA.

## **JUSTIFICATIVA**

A proteína OmlA pertence a uma família que não possui estruturas 3D conhecidas e cuja função permanece pouco caracterizada e, por outro lado, cujo gene está associado a um locus considerado essencial à sobrevivência de muitos microorganismos. Assim, a determinação da estrutura 3D da proteína OmlA por uma técnica de alta resolução, como a RMN, pode levar à informações sobre a provável função desta família de proteínas, assim como à descoberta de um novo tipo de enovelamento protéico. Paralelamente, estudos sobre aspectos regulatórios do locus *omlA-fur* podem contribuir para compreender o papel funcional destes genes e a sua co-localização, observada amplamente entre as bactérias Gram-negativas. Além disso, a implantação e utilização das técnicas de determinação de estrutura de proteínas por RMN no país e sobretudo no estado São Paulo é recente. A capacitação em área de pesquisa com potencial ainda pouco explorado se faz necessária para o progresso científico brasileiro nesta área.

## CAPÍTULO I :

### **ANÁLISE ESTRUTURAL DA PROTEÍNA OMLA**

#### INTRODUÇÃO

Neste capítulo, apresentamos as publicações resultantes deste trabalho de doutorado e que se referem, primordialmente, aos dados estruturais da proteína OmlA de *Xac* analisados por RMN.

O primeiro artigo foi publicado na revista *Journal of Biomolecular NMR* e trata-se de uma *letter to the editor* que notifica a atribuição das ressonâncias da proteína. A publicação é acompanhada de um material suplementar, disponível *on-line*, e concretiza a finalização de uma etapa essencial e crucial na resolução de uma estrutura protéica através de RMN.

O segundo artigo foi aceito para publicação na revista *Proteins: Structure, Function & Bioinformatics* e sua versão *on-line* já se encontra disponível (<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/117883624/ABSTRACT>). Este artigo compreende os resultados mais relevantes do trabalho. A publicação revela a primeira estrutura e as propriedades dinâmicas de um membro da família OmlA/SmpA de lipoproteínas, que se assemelha a proteína BLIP envolvida em interações proteína-proteína. Os resultados estão em consistência com recentes dados funcionais da literatura referentes a outros membros desta família de proteínas. Adicionalmente, mostramos a ativação do locus *omlA-fur* durante a infecção de *Xac* em citrus, discutindo a associação entre os dados funcionais e estruturais obtidos.

**ARTIGO I:**

**NMR ASSIGNMENT OF THE OUTER MEMBRANE  
LIPOPROTEIN (OmlA) FROM  
*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.**

**Marina M. T. Vanini, Celso E. Benedetti, Alberto Spisni &  
Telma A. Pertinhez**

**Journal of Biomolecular NMR 36 Suppl 1:34 (2006)**

## Letter to the Editor

### NMR assignment of the outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

DOI 10.1007/s10858-006-0022-x

An outer membrane lipoprotein (OmlA) belonging to the small membrane protein A (SmpA) family was identified in *Xanthomonas citri* (Da Silva et al., 2002). Although many functions have been assigned to bacterial lipoproteins, the role of OmlA/SmpA remains unknown. To gain insights into OmlA function, we have been prompted to determine its 3D solution structure by NMR using a recombinant  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  double-labelled protein. All  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  backbone resonances have been completely assigned. Side-chain assignments are almost complete, with the exception of Pro11, Lys32 and Lys70, and the aromatic rings of Phe72, Phe89 and Phe101. Chemical shift index analysis indicates that the protein has  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet elements with an unfolded C-terminus. Besides helping to understand the function of this family of membrane proteins, the 3D structure of *X. citri* OmlA may eventually unveil a new protein fold. Resonance assignments have been deposited in the BioMagResBank under the accession number 6797.

References: Da Silva et al. (2002). *Nature*, **417**, 459–463

Marina M. T. Vanini<sup>a</sup>, Celso E. Benedetti<sup>a</sup>, Alberto Spisni<sup>a,b</sup> & Thelma A. Pertinhez<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Centre for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, 13084-971, Brazil; <sup>b</sup>Department of Experimental Medicine, Sect. Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Parma, 43100, Italy

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [thelma@unipr.it](mailto:thelma@unipr.it)

**Supplementary material** is available in electronic format at <http://dx.doi.org/10.1007/s10858-006-0022-x>.

# NMR assignment of the outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Marina M. T. Vanini<sup>a</sup>, Celso E. Benedetti<sup>a</sup>, Alberto Spisni<sup>a,b</sup> & Thelma A. Pertinhez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centre for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, 13084-971, Brazil; <sup>b</sup>Department of Experimental Medicine, Sect. Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Parma, 43100, Italy.

Key words: NMR, Outer membrane lipoprotein, OmlA, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

## Biological context

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. citri*) is a bacterial pathogen causative of the citrus canker disease, which affects the citrus culture world-wide (Brunings and Gabriel, 2003). New strategies are needed to control this disease and the characterization of proteins potentially involved in host-pathogen interaction is considered of great importance. A gene encoding a conserved outer membrane lipoprotein (OmlA) belonging to the small membrane protein A (SmpA) family was identified (Da Silva et al., 2002). The *X. citri* OmlA is thought to be associated to the pathogen outer membrane through a hydrophobic anchor present in its N-terminus. Upon cleavage of the signal peptide, the protein remains attached to the membrane through a cysteine residue (Hayashi and Wu, 1990). Although many functions have been assigned to bacterial lipoproteins the role of OmlA/SmpA remains unknown. Interestingly, OmlA genes are often found adjacent to ferric uptake regulator (Fur) genes (Lowe et al, 2001), suggesting that OmlA and Fur are co-regulated and that OmlA plays a role in iron homeostasis. To gain insights into the biological function of *X. citri* OmlA, we are determining its 3D-structure by NMR. Here, we report the complete sequence-specific assignments of the <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N double labelled protein. The 3D structure of *X. citri* OmlA will be the first representative of the OmlA/SmpA family, it will contribute to increase the number of membrane proteins solved and it might unveil a new protein fold.

## Methods and experiments

The OmlA gene was amplified in order to produce a recombinant protein lacking the N-terminal pro-lipoprotein signal. In addition, Cys17, responsible for anchoring the protein to the membrane, was replaced by Ser. The gene was cloned in pET28a as a hexa-histidine tag fusion and expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysE grown in M9 minimal medium containing <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, at 30°C. The protein was purified by nickel affinity chromatography followed by removal of the histidine-tag with thrombin. Cleaved protein was further purified by ion exchange chromatography followed by a final nickel affinity step to produce fractions of pure double labelled OmlA. For the NMR measurements, protein samples (~0.3 mM) were prepared in 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 5.8 containing 0.05% of NaN<sub>3</sub> and 5% or 100% of D<sub>2</sub>O. NMR spectra were collected at 298K on either a Varian Inova<sup>®</sup> 500AS or 600AS spectrometers at the LNLS. The <sup>15</sup>N edited HSQC spectrum and the HNCA, HN(CO)CA, HNC(O), HNCACB and CBCACONH 3D triple resonance experiments recorded using the 5% D<sub>2</sub>O sample were combined to obtain the backbone resonance assignments. For side-chain assignments we carried out TOCSY-NHSQC experiment with the 5% D<sub>2</sub>O sample and <sup>13</sup>C edited HSQC, HCCH-TOCSY and HCCH-COSY experiments with the 100% D<sub>2</sub>O sample. The spectra were processed and analyzed using NMRPipe/NMRView (Delaglio *et al.*, 1995; Johnson and Blevins, 1994).

## Extent of assignments and data deposition

All <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C backbone resonances have been completely assigned. Side-chain assignments are almost complete, with the exception of residues Pro11, Lys32 and Lys70, and

the aromatic ring of residues Phe72, Phe89 and Phe101. Chemical Shift Index analysis (Wishart et al, 1992) indicates that the protein has  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet elements with a C-terminal region unfolded (data not shown). Resonance assignments have been deposited in the BioMagResBank under the accession number 6797.

### **Acknowledgements**

Supported by FAPESP grants (NMR project 99/11030-9, CEPID-CEBIME 98/14138-2, SMOLBNET 00/10266-8, TAP 00/02026-7). MMTV is recipient of a FAPESP PhD fellowship (03/00544-9).

### **References**

- Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. (2003). *Mol. Plant Path.*, **4**, 141-157.
- Da Silva, A.C.R. et al. (2002). *Nature*, **417**, 459-463.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995). *J. Biomol. NMR*, **6**: 277-293.
- Hayashi, S. and Wu, H.C. (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**: 451-471
- Johnson, B. and Blevins, R.A. (1994). *J. Biomol. NMR*, **4**, 603-614
- Lowe, C.A., Asghar, A.H., Shalom, G., Shaw, J.G. and Thomas, M.S. (2001). *Microbiol.*, **147**: 1303-1314
- Wishart, D., Sykes, B., and Richards, F. (1992). *Biochem*, **31**, 1647-51.

**ARTIGO II:**

**THE SOLUTION STRUCTURE OF THE OUTER MEMBRANE  
LIPOPROTEIN OMLA FROM *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*  
REVEALS A PROTEIN FOLD IMPLICATED IN PROTEIN-  
PROTEIN INTERACTION**

**Marina M. T. Vanini, Alberto Spisni, Maurício L. Sforça, Telma A.  
Pertinhez & Celso E. Benedetti**

**Proteins: Structure, Function & Bioinformatics (2008)**



# The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein–protein interaction

Marina Marques Teixeira Vanini,<sup>1</sup> Alberto Spisni,<sup>2</sup> Maurício Luis Sforça,<sup>1</sup> Thelma Aguiar Pertinhez,<sup>2\*</sup> and Celso Eduardo Benedetti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Sao Paulo, Campinas 6192, Brazil

<sup>2</sup> Department of Experimental Medicine, University of Parma, Parma 43100, Italy

## ABSTRACT

The outer membrane lipoprotein A (OmlA) belongs to a family of bacterial small lipoproteins widely distributed across the beta and gamma proteobacteria. Although the role of numerous bacterial lipoproteins is known, the biological function of OmlA remains elusive. We found that in the citrus canker pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. citri*), OmlA is coregulated with the ferric uptake regulator (*Fur*) and their expression is enhanced when *X. citri* is grown on citrus leaves, suggesting that these proteins are involved in plant–pathogen interaction. To gain insights into the function of OmlA, its conformational and dynamic features were determined by nuclear magnetic resonance. The protein has highly flexible N- and C- termini and a structurally well defined core composed of three  $\beta$ -strands and two small  $\alpha$ -helices, which pack against each other forming a two-layer alpha/beta scaffold. This protein fold resembles the domains of the  $\beta$ -lactamase inhibitory protein BLIP, involved in protein–protein binding. In conclusion, the structure of OmlA does suggest that this protein may be implicated in protein–protein interactions required during *X. citri* infection.

Proteins 2007; 00:000–000.  
© 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** outer membrane lipoprotein; OmlA; *Xanthomonas citri*; protein structure; BLIP fold; NMR.

## INTRODUCTION

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. citri*) is the bacterial pathogen responsible for the citrus canker disease, which affects all citrus varieties worldwide. The disease is characterized by an intense growth and division of the host cells leading to pustule-like lesions on the surface of leaves, stems and fruits.<sup>1</sup> Although some studies have shown that translocation of *X. citri* effector proteins into the host cell is required for plant cell hypertrophy<sup>2</sup>, the role of *X. citri* membrane lipoproteins in canker development and bacterial survival in the host is not known.

Bacterial lipoproteins represent a large group of specialized membrane proteins that perform a variety of functions including maintenance and stabilization of the cell envelope,<sup>3,4</sup> protein targeting and transit to the outer membrane,<sup>5,6</sup> membrane biogenesis<sup>7</sup>, and cell adherence.<sup>8</sup> The principal feature of bacterial lipoproteins is the presence of a predominantly hydrophobic signal peptide located at the N-terminus.<sup>9–11</sup> Cleavage of the signal peptide occurs at a conserved cysteine residue required for the covalent binding to a lipid, a step necessary to anchor the protein to the membrane.<sup>9,12</sup>

Though a number of lipid-modified outer membrane proteins have been functionally<sup>13,14</sup> and structurally<sup>15–19</sup> studied, a group of small lipoproteins belonging to the SmpA/OmlA family remains largely uncharacterized. Members of this family have recently been shown to be involved in the assembly of outer membrane proteins and to be necessary for preserving the structural integrity of the cell envelope.<sup>20</sup> For instance, an *omlA* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* turned out to be hyper-susceptible to detergents and antibiotics,<sup>21</sup> whereas in *Pseudomonas putida*,

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Grant numbers: 03/00544-9, NMR 99/11030-9, CEPID 98/14138-2, SMOLBNET 00/10266-8, TAP 00/02026-7; Grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Grant number: BEX1920/05-7; Grant sponsor: Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPQ).

\*Correspondence to: Celso E. Benedetti, Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, R. Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil. E-mail: celso@lnls.br or Thelma A. Pertinhez, Università degli Studi di Parma, Via Volturno, 39, 43100 Parma, Italy. E-mail: thelma@unipr.it

Received 9 August 2007; Revised 18 October 2007; Accepted 25 October 2007

Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/prot.21886

AQ2

OmlA was essential to provide protection against benzoic acid,<sup>22</sup> a plant defense molecule that accumulates during pathogen attack.<sup>23,24</sup> In none of these cases, however, the precise mechanism of action of OmlA has been determined.

Interestingly, in several gram-negative bacteria, the *omlA* gene has been found adjacent to the gene that encodes the ferric uptake regulator Fur,<sup>21,25</sup> the principal regulatory protein of iron homeostasis and stress response in bacteria.<sup>26–28</sup> Nonetheless, though *omlA* and *fur* are divergently transcribed from an overlapping bidirectional promoter,<sup>21,25</sup> a fact that would suggest some functional correlation, a possible link between Fur-dependent responses and OmlA function has not been found so far.

Here, we show that OmlA and Fur are coregulated and their expression is particularly enhanced when *X. citri* is grown on citrus leaves. We also report the solution structure of OmlA; the first one of a member of this protein family. While the structure does not unveil any association with iron homeostasis, it is consistent with the hypothesis that OmlA may be involved in protein–protein interactions, as recently shown to be the case for the *E. coli* OmlA homolog.<sup>20</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial growth conditions

*E. coli* cells were grown in LB medium,<sup>29</sup> under agitation (200 rpm) at 30°C with the appropriate antibiotics, whereas *X. citri*, strain 306,<sup>30</sup> was grown in LB medium without NaCl (LBON), supplemented with ampicillin (100 mg/L) at 28°C with shaking (200 rpm).

### Cloning, expression, and purification of *X. citri* OmlA

The gene encoding the OmlA (NP 641849) was amplified from CTAB-extracted<sup>29</sup> genomic DNA with forward (5'-CATATGCGTAATCTCCTGCTG-3') and reverse (5'-CTCGAGTCAACGGCCGCGTTG-3') primers. PCR products were cloned into pGemT (Promega), sequenced and subcloned into the *NdeI/XhoI* sites of pET28a (Novagen) for the expression of OmlA with a six-histidine tag at the N-terminal. *E. coli* BL21(DE3) pLysE cells transformed with the pET-*omlA* plasmid were grown at 30°C under agitation and the protein was expressed by addition of 0.4 mM IPTG (isopropyl-*b*-D-thiogalactopyranoside) after the optical density of the culture reached 0.6 at 600 nm. After 3 h of induction, cells were disrupted by sonication and the protein was purified by standard Ni-affinity chromatography. After elution in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 300 mM NaCl and 120 mM imidazol, OmlA was cleaved overnight with thrombin in the presence of 2.5 mM CaCl<sub>2</sub><sup>31</sup> at 25°C and further purified in

a Hi-Trap SP Sepharose column (Amersham Biosciences) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM NaCl. OmlA was eluted with a 0–1M NaCl gradient and subjected to a final Ni-affinity purification step. The protein was dialyzed against 100 mM sodium phosphate buffer, pH 5.8 and concentrated with Centricon (Millipore) filters. The purity of OmlA was estimated to be >98% by SDS-PAGE.

For isotopic labelling of OmlA, the protein was expressed and purified as described.<sup>32</sup>

### Antiserum production and western blot

Purified OmlA without the 6xHis tag was used to immunize white rabbits according to standard procedures.<sup>31</sup> Proteins were separated by 12% SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF (Millipore) membranes, which were incubated with the anti-OmlA at 1:5000 dilution at room temperature for 1 h, and subsequently washed with TBS.<sup>29</sup> Membranes were incubated with a secondary anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate and developed with the ECL reagent (Amersham Biosciences).

### Reporter gene constructs and expression analysis

The bidirectional *omlA/fur* promoter was cloned in both orientations to drive the expression of an EGFP reporter gene. The *omlA* promoter was amplified with primers 5'-CCATGGGGGATTAAGTGCTG-3' and 5'-GGGCCCAGCGGTAGACC-3' to obtain a DNA fragment encompassing the entire intergenic region plus 170 bp of the *fur* coding region. Similarly, the *fur* promoter was amplified with primers 5'-CCATGGGTTCTCCGTTTCATT-3' and 5'-GGGCCAGCAACGCGCTGAC-5' to obtain the intergenic region plus 156 bp of the *omlA* coding region. PCR products were cloned into the *Apal/NcoI* sites of a pGem-T vector carrying an *NcoI/NotI* EGFP gene. The constructs were subcloned into the *Apal/NotI* sites of pBlueScript (Stratagene) and subsequently moved into the pKX33<sup>33</sup> with *KpnI/SacI*. All constructs were verified by sequencing and used to transform competent *X. citri* cells. The reporter cells were infiltrated into *Citrus sinensis* leaves at a density of 10<sup>8</sup> cells per mL. After 5–10 days, leaf sectors with canker lesions were sliced and placed in sterile water for 10 min. Bacterial cells were recovered by centrifugation and visualized by fluorescence microscopy.

### Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) measurements were carried out on a JASCO J-810 spectropolarimeter at 25°C with OmlA 15 μM in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 5.8. The far-UV spectra were recorded in a 1-mm optical path length cell in the wavelength range 190–260 nm with a bandwidth of 0.5 nm and scan speed of 100 nm min<sup>-1</sup>. The near-UV spectra were recorded in a 10-mm

optical path length cell in the wavelength range 250–350 nm. For each measurement, the average of 10 (far-UV) or 100 (near-UV) spectra were taken to improve the signal to noise ratio and each spectrum was corrected by subtracting its blank.

### NMR sample preparation and data acquisition

<sup>15</sup>N-OmlA or double-labelled <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-OmlA at 0.3 mM were prepared in 100 mM sodium phosphate, pH 5.8, containing 0.05% NaN<sub>3</sub> and 5 or 100% D<sub>2</sub>O. 2D and 3D NMR spectra were collected at 25°C on spectrometers Varian Inova AS 500 MHz or 600 MHz at the CeBiME-LNLS, Brazil, or on a Varian Inova AS 600 MHz at the CIM, University of Parma, Italy. All NMR spectrometers were equipped with a z pulsed-field gradient unit and a triple resonance probe.

### NMR structure calculation

NOE-derived distance restraints were obtained from 3D <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–NOESY<sup>34</sup> and 3D <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C–NOESY (separately optimized for aliphatics and aromatics)<sup>35</sup> collected with 100-ms mixing times. All spectra were processed and analyzed using NMRView/NMRPipe softwares.<sup>36,37</sup> After manual assignment, 3D NOESY cross-peaks volumes were converted in distance constraints using the NMRView automatic integration function.<sup>36</sup>

Structure calculation and refinement were performed using DYANA 1.5 program package.<sup>38</sup> The final round of refinement started with 180 randomized structures, and the 40 best DYANA conformers selected on the basis of their minimum target function were further energy-minimized with the DISCOVER module. After minimization, 20 structures, selected on the basis of their lower energy and of systematic violations less than 0.2 Å for residual NOE and less than 5° for dihedral angles were chosen to represent the NMR structure.

The quality of the structures was evaluated with the program PROCHECK-NMR.<sup>39</sup> The structural coordinates of the ensemble of the 20 conformers that represent the solution structure of OmlA have been deposited in the Protein Data Bank under accession number: 2PXG.

### Hydrogen exchange measurements

Proton–deuterium (H/D) exchange measurements were performed with a lyophilized <sup>15</sup>N-labeled sample dissolved in 100% D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories). The loss of intensity of labile protons was monitored by recording a series of <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC spectra at 500 MHz. The elapsed time between dissolving the lyophilized protein and starting the first <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC experiment was 8 min and a series of <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC spectra were recorded every 20 min for 24 h.

Exchangeable amide protons were also identified by the 2D (CLEANEX-PM)-FHSQC experiment.<sup>40</sup> <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC and CLEANEX-PM spectra were performed at 600 MHz with a <sup>15</sup>N labeled sample using a mixing time of 150 ms. The amide protons accessibility was measured as the ratio of the peak volumes of the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC and the CLEANEX-PM spectra and also by the permanence of amide signals in the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC collected after D<sub>2</sub>O addition.

### Backbone <sup>15</sup>N relaxation measurements and analysis

Longitudinal (*T*<sub>1</sub>) and transverse (*T*<sub>2</sub>) relaxation times as well as <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N NOEs of backbone amides were determined using experiments acquired at 500 MHz with a <sup>15</sup>N-OmlA sample.<sup>41</sup> The <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N NOE values were taken as the ratio of the peak volumes of the experiments recorded with and without <sup>1</sup>H saturation using a saturation time of 3 s and a recycle delay of 6 s. Relaxation delays of 100, 200, 300, 400, 600, 800, and 900 ms were employed for *T*<sub>1</sub> measurements, and 1, 5, 9, 13, 19, 27, 33, and 39 ms for *T*<sub>2</sub> measurements. *T*<sub>1</sub> and *T*<sub>2</sub> values were extracted by fitting the peak intensities to a single exponential decay function in NMRView.<sup>36</sup>

Reduced spectral density mapping analysis was performed according to the equations described<sup>42</sup>:

$$\sigma_{\text{NH}} = R_1(\text{NOE} - 1)(\gamma_{\text{N}}/\gamma_{\text{H}})$$

$$J(0.87\omega_{\text{H}}) = \frac{4\sigma_{\text{NH}}}{5d^2}$$

$$J(\omega_{\text{N}}) = \frac{4R_1 - 5\sigma_{\text{NH}}}{3d^2 + 4c^2}$$

$$J(0) = \frac{6R_2 - 3R_1 - 2.72\sigma_{\text{NH}}}{3d^2 + 4c^2}$$

where  $d = (\mu_0 h \gamma_{\text{N}} \gamma_{\text{H}} / 8\pi^2)(r_{\text{NH}}^{-3})$  and  $c = \omega_{\text{N}} \Delta\sigma / \sqrt{3}$ .  $\mu_0$  is the permeability of free space,  $h$  is Planck's constant,  $\gamma_{\text{N}}$  and  $\gamma_{\text{H}}$  are the gyromagnetic ratios of the <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N nuclei, respectively,  $r_{\text{NH}} = 1.02$  Å is the average amide bond length,  $\omega_{\text{N}}$  is the <sup>15</sup>N Larmor frequency and  $\Delta\sigma = -160$  ppm is the chemical shift anisotropy for <sup>15</sup>N.

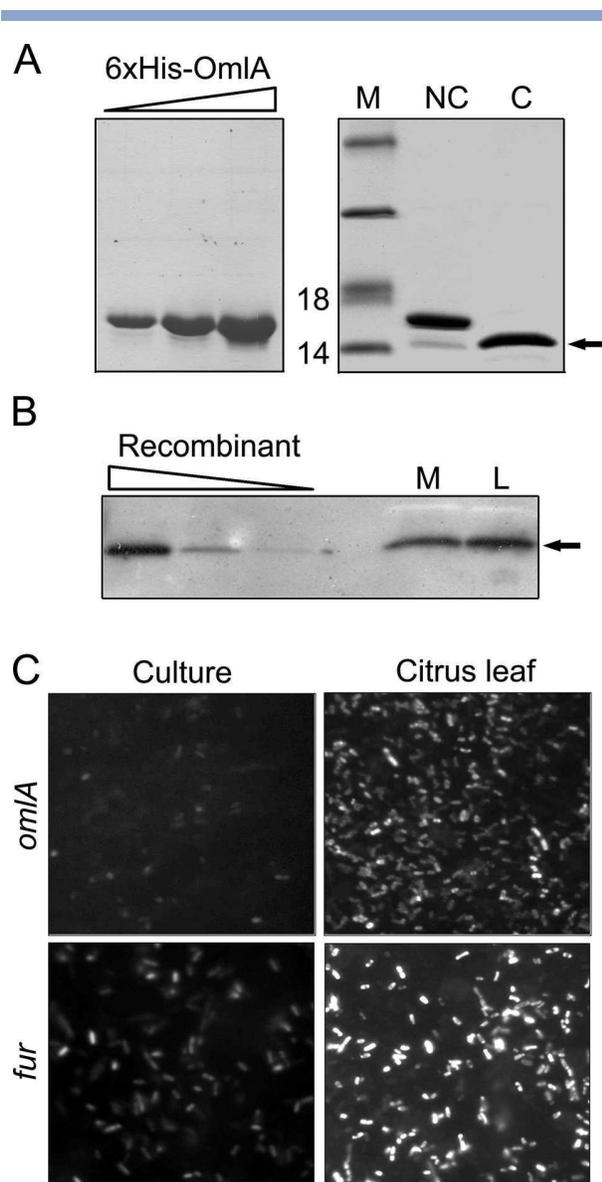
## RESULTS

### The *X. citri* OmlA

The XAC1516 locus from *X. citri* encodes a predicted 15 kDa OmlA protein with a typical lipoprotein signal peptide at N-terminus and a central SmpA OmlA domain common to several beta and gamma proteobacteria lipoproteins (see Fig. 1). The signal peptide carries the lipobox motif<sup>43</sup> with the conserved cysteine residue required for lipid attachment (see Fig. 1). In addition,

F1



**Figure 2**

Purification and detection of *X. citri* OmlA. (A) SDS-PAGE electrophoresis of increased amounts of recombinant 6xHis-OmlA (~15.7 kDa) after purification by Ni-affinity followed by ion exchange chromatography and cleavage "C" of the 6xHis tag with thrombin resulting in a ~13.5 kDa polypeptide (arrow); a non cleaved "NC" control and the molecular marker "M" are shown. (B) Western blot of decreased amounts of recombinant OmlA without the 6xHis tag and samples of whole cell extracts of *X. citri* grown in LBON medium "M" or from infected citrus leaves with canker lesions "L". (C) Fluorescence micrographs showing the transcriptional activation of the *omlA/fur* promoters in *X. citri* isolated from infected citrus leaves, compared with cells grown in culture medium.

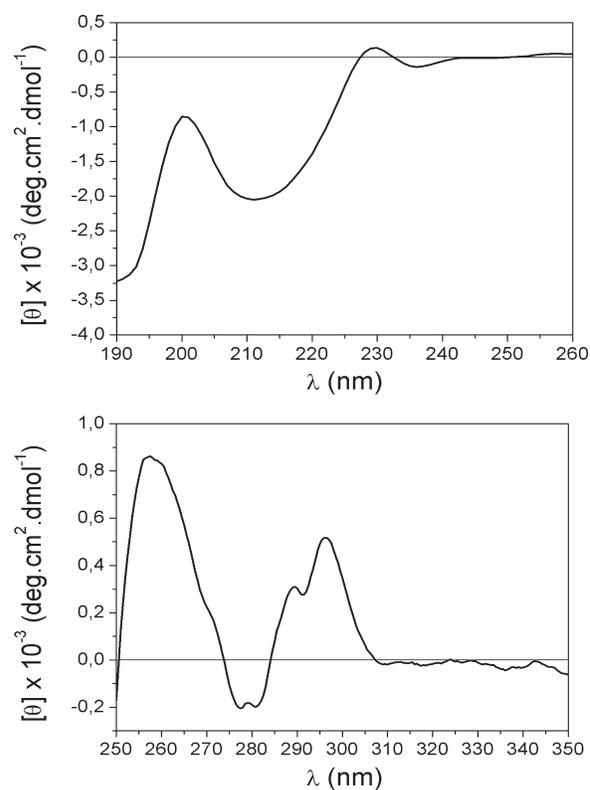
protein sequence alignment revealed a number of other conserved residues within the SmpA OmlA domain, such as the QGN motif (residues 14–16) at N-terminus and a group of aromatic residues in the core of the protein (see Fig. 1). Interestingly, these residues are con-

served in more than seventy OmlA sequences found in the databank.

### OmlA and fur are coregulated during citrus infection

To verify that OmlA was produced by *X. citri*, the *omlA* gene was amplified and expressed in *E. coli* cells without the signal peptide. Additionally, the cysteine residue of the lipobox was replaced by a serine (see Fig. 1). The recombinant OmlA, a protein of 118 amino acids and a predicted molecular mass of 13.6 kDa was purified by affinity and ion exchange chromatography [Fig. 2(A)] and used for antibody production. The OmlA antiserum recognized the purified recombinant OmlA as well as a single protein of similar molecular mass present in the cell extracts of *X. citri* grown in culture media or isolated from citrus canker lesions [Fig. 2(B)]. These findings confirm the production of OmlA by *X. citri*.

Because the *omlA* and *fur* genes are located opposite to each other and share a divergent promoter in the *X. citri*

**Figure 3**

Circular dichroism spectra of recombinant OmlA (15  $\mu$ M) in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 5.8. (A) Far-UV CD spectrum recorded in a 1-mm optical path length cell in the wavelength range 190–260 nm. (B) Near-UV CD spectrum recorded in a 10-mm optical path length cell in the wavelength range 250–350 nm.



**Table I***Experimental Restraints and Structural Statistics of the 20 Lowest Energy Structures of OmlA*

Distance restraints		
Total	1115	
Intra-residue ( $i, i$ )	588	
Sequential ( $i, i + 1$ )	306	
Medium range ( $2 \leq  i - j  \leq 4$ )	90	
Long range ( $ i - j  \geq 5$ )	131	
Distance restraints violations ( $>0.2 \text{ \AA}$ )	7	
Highest distance violation value ( $\text{\AA}$ )	0.23	
Angle restraints violations ( $>5^\circ$ )	0	
Average target function value	0.92 $\pm$ 0.11	
Overall RMSD residues ( $\text{\AA}$ )	Backbone	Heavy-atoms
22–88	2.48 $\pm$ 0.72	3.45 $\pm$ 0.70
RMSD for structured regions: residues ( $\text{\AA}$ )		
23–26	0.16 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.20
34–39	0.09 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.20
53–57	0.66 $\pm$ 0.43	1.47 $\pm$ 0.67
70–76	0.41 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.21
80–86	0.37 $\pm$ 0.12	1.25 $\pm$ 0.28
RMSD for loops: residues ( $\text{\AA}$ )		
27–33	0.39 $\pm$ 0.16	1.48 $\pm$ 0.21
40–52	0.76 $\pm$ 0.17	1.34 $\pm$ 0.21
58–69	2.19 $\pm$ 0.55	4.38 $\pm$ 0.56
77–79	0.14 $\pm$ 0.05	1.40 $\pm$ 0.43
Ramachandran Analysis (residues 22–88)		
Residues in most favored regions (%)	64.8	
Residues in additionally allowed regions (%)	34.1	
Residues in generously allowed regions (%)	1.1	
Residues in disallowed regions (%)	0	

F4 4(A)] indicating that the protein is folded. All  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{13}\text{C}$  backbone resonances were completely assigned (BMRB 6797),<sup>32</sup> and the resonances of all amides are indicated in the  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum [Fig. 4(A)].

The OmlA structure was resolved with the program DYANA using 1115 distance constraints derived from 3D  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ –NOESY and  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ –NOESY. The structural statistics of the ensemble of the 20 lower energy structures are shown in Table I and the backbone superposition is illustrated in Figure 5(A). The analysis of the data in Table I highlights the good stereochemical features of the models. In fact, there are no residues in the disallowed regions of the Ramachandran plot and the residues in the generously allowed regions (only 1.1%) belong to the flexible loops.

T1 F5 The good quality of the structural definition is highlighted by the RMSD measured for the 20 selected models in the folded region. Significantly, if we do not consider the long loop 3 (residues T58–I69), the RMSD falls to  $1.01 \pm 0.28$  for backbone and  $1.84 \pm 0.23$  for the heavy atoms.

The structure of OmlA shows the N- and C- termini unfolded [Fig. 5(A)], with a well structured core characterized by two small  $\alpha$ -helices ( $\alpha_1$ : V23–L26;  $\alpha_2$ : Q34–L39) and three anti-parallel  $\beta$ -strands ( $\beta_1$ : W53–S57;  $\beta_2$ : K70–F76, and  $\beta_3$ : Q80–G86) [Fig. 5(B)]. The two  $\alpha$ -helices, that exhibit an antiparallel orientation with respect to each other, pack against the  $\beta$ -sheet, forming a two-

layer sandwich architecture [Fig. 5(B)]. It is worth noting that loop 2, connecting  $\alpha_2$  with  $\beta_1$ , contains three prolines, one of which is conserved in the OmlA family (see Fig. 1), whereas loop 3 is quite long and flexible [Fig. 5(B)], as evidenced by the very high RMSD (Table I).

The analysis of the protein surface [Fig. 5(C)] shows hydrophilic patches mainly in the region of the  $\beta$ -sheet and in loop 3, whereas hydrophobic areas are located particularly at the interfaces between the two  $\alpha$ -helices. Interestingly, the hydrophobic side chains of residues conserved in the OmlA family (see Fig. 1) face the interior of the protein forming the hydrophobic core. Moreover, the detection of a network of NOEs involving some of these residues (F72, F76, Y55, Y88, W53, and W84) is consistent with the formation of an aromatic cluster that contributes to the stabilization of the protein (see Fig. 6).

F6

### Amide exchange analysis

H/D exchange and CLEANEX experiments were performed using the  $^{15}\text{N}$  labeled OmlA to evaluate the compactness of the protein. The CLEANEX-type  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ –HSQC spectrum of OmlA shows numerous water–NOE correlations [Fig. 4(B)], indicating that a good number of the amide protons are highly accessible to water. In particular, they refer to the amide protons belonging to the loops and to the unfolded regions.

Consistent with the CLEANEX experiments, the H/D exchange measurements show high exchange rates for most of the amide protons. The ones protected for longer than 285 min [Fig. 4(C)] are associated with the residual globular structure of the folded hydrophobic core.

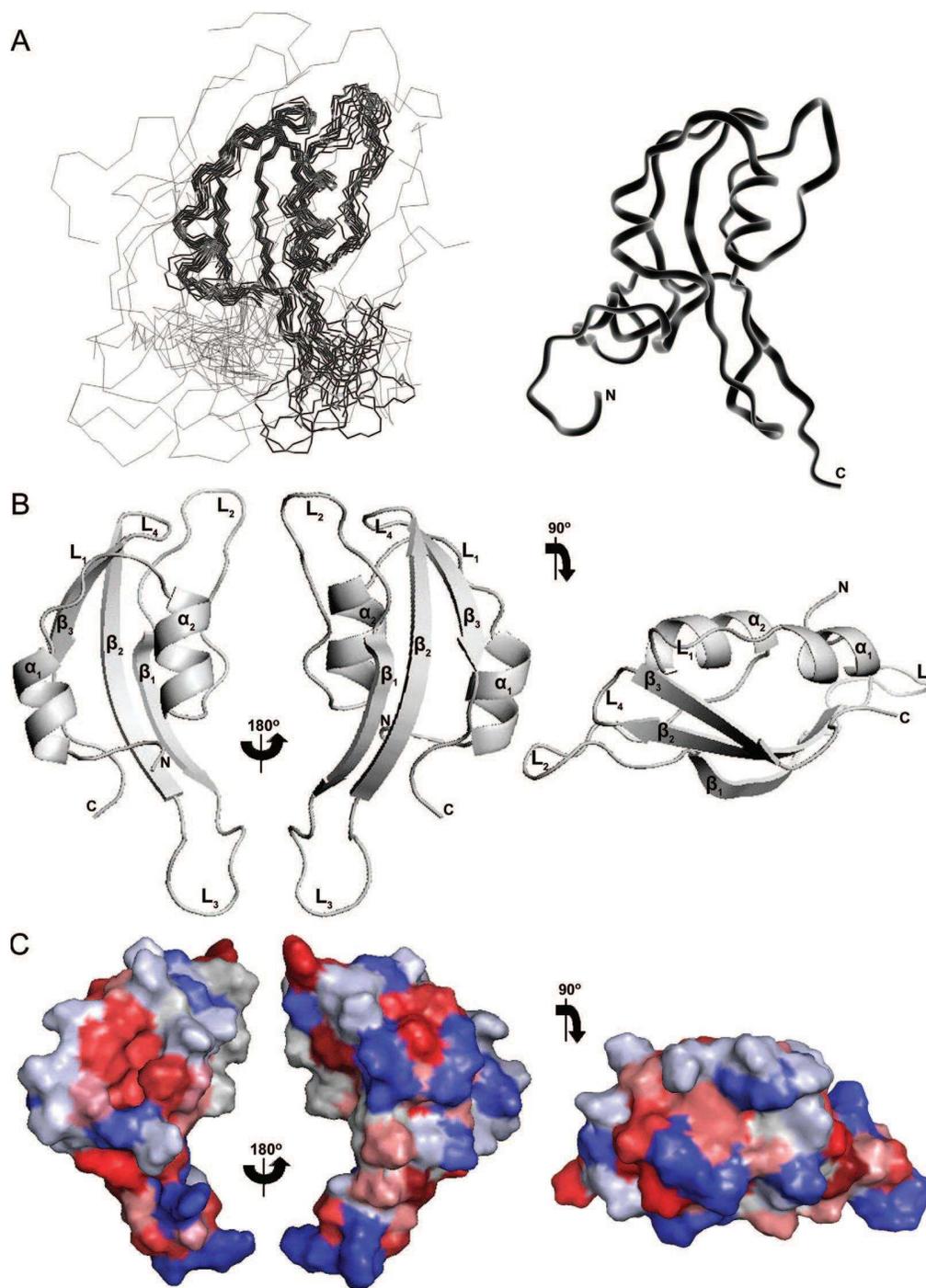
Taken together, the data suggest a protein structure characterized by a rather solvent protected hydrophobic core, while both the loops and the N- and C- termini are fairly solvent accessible. The comparison of the ratio between the  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ –HSQC and the CLEANEX-PM peak intensities with both the secondary structure pattern and the plot of the persistence of the amide signals in H/D experiments (see Fig. 7) shows that the residues involved in secondary structure are characterized by a stronger solvent-protection and higher  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ –HSQC/CLEANEX peak intensity ratios, thus confirming the structural model proposed.

F7

### Backbone relaxation data and reduced spectral density analysis

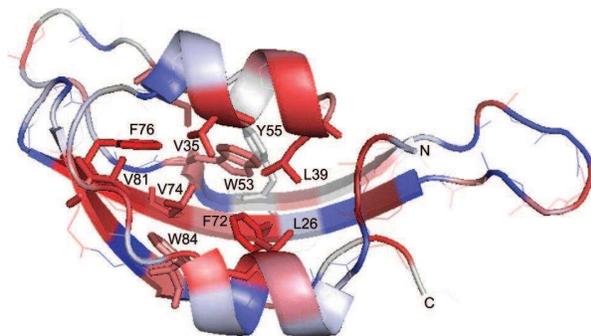
As expected, the patterns of the  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ –NOEs [Fig. 8(A), upper panel] and  $T_2$  [Fig. 8(A), middle panel] values confirm that the unstructured N- and C- termini are highly flexible. In particular, residues 2–7, 19, 20, and 97–118 generate negative NOEs, indicating fast backbone mobility in the pico to nanosecond time scale. Interestingly, residues 10–19, which span the conserved QGN motif, and residues 61–68 of loop 3 exhibit small ( $\leq 0.5$ ),

F8

**Figure 5**

The 3D structure of OmlA. (A) Superimposition of the backbone atoms of the 20 lower energy structures of OmlA and aside the ribbon representation of the minimum energy model. (B) Ribbon diagrams of the core domain (residues 16–90) of the minimum energy model. (C) Surface of OmlA. Hydrophilic and hydrophobic areas are shown in blue and red, respectively. The surface models shown in (C) are in the same orientation as the cartoons shown in (B). The N- and C- termini are indicated. Figures were produced with PyMol.<sup>44</sup>

## NMR Solution Structure of OmlA

C  
O  
L  
O  
R**Figure 6**

The hydrophobic core of OmlA. Ribbon diagram of the minimum energy model of OmlA core (residues 16–90) colored according to residue hydrophobicity showing the side chains for which long range NOEs were observed. Hydrophobic residues are colored in red, hydrophilic residues are in blue and the neutral ones are in white. The N- and C- termini are indicated. Figures were produced with PyMol.<sup>44</sup>

though positive NOEs, suggesting that those portion of the protein are disordered but not as flexible as the N- and C- termini. Overall, the data point towards a protein architecture characterized by regions with diverse dynamics.

<sup>15</sup>N relaxation measurements were further analyzed by reduced spectral density mapping.<sup>42</sup> The low values of  $J(0)$ , which is sensitive to slow internal motions on the milli to microsecond time scale, confirm that OmlA is characterized by flexible termini and by a more rigid core [Fig. 8(B), upper panel]. This is consistent with the pattern of  $J(0.87\omega_H)$  [Fig. 8(B), middle panel], a parameter sensitive to fast internal motions. In particular, values of  $J(0.87\omega_H)$  higher than the average for the structured core were found for the residues of loop 3, confirming its pronounced flexibility. Interestingly, however, the majority of the residues of loop 3 show unusually large  $J(0)$  values, which may reflect contributions from conformational exchange,<sup>45</sup> a feature that has been suggested to be important for biological function.<sup>46,47</sup>

**OmlA display a BLIP fold**

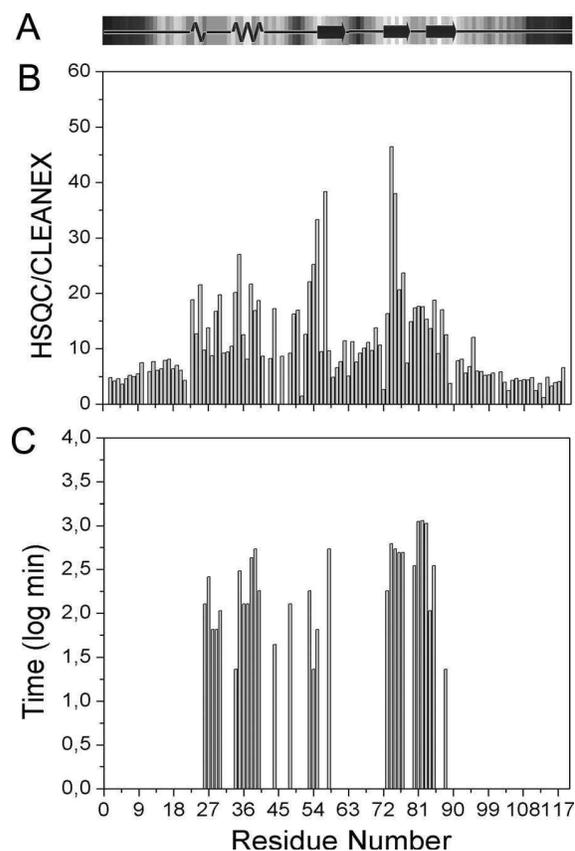
Surprisingly, using the CATH server,<sup>48</sup> we found that the OmlA core has a fold similar to the two 76-residue domains of the  $\beta$ -lactamase inhibitory protein BLIP (see Fig. 9), involved in protein binding and inhibition of  $\beta$ -lactamase activity.<sup>49–51</sup> The OmlA models could be well superposed to both BLIP domains [Fig. 9(A)]. In addition, primary sequence alignments of OmlA with the two BLIP domains revealed significant sequence similarities within the OmlA structured core, particularly in the region comprising the helix–loop–helix [Fig. 9(B)], which is also the region with the highest degree of identity shared by the two BLIP domains.<sup>49</sup> Moreover, five of the

residues that are common to OmlA and BLIP not only are conserved in the OmlA family [Figs. 1 and 9(B)] but they are also found in similar spatial locations in the 3D structures of the proteins [Fig. 9(C)]. In addition, it is worth noting that residue D62 of loop 3 in OmlA presents a spatial location similar to BLIP D49 [Fig. 9(D)], which forms hydrogen bonds with the  $\beta$ -lactamase catalytic site and blocks the enzyme activity.<sup>50</sup>

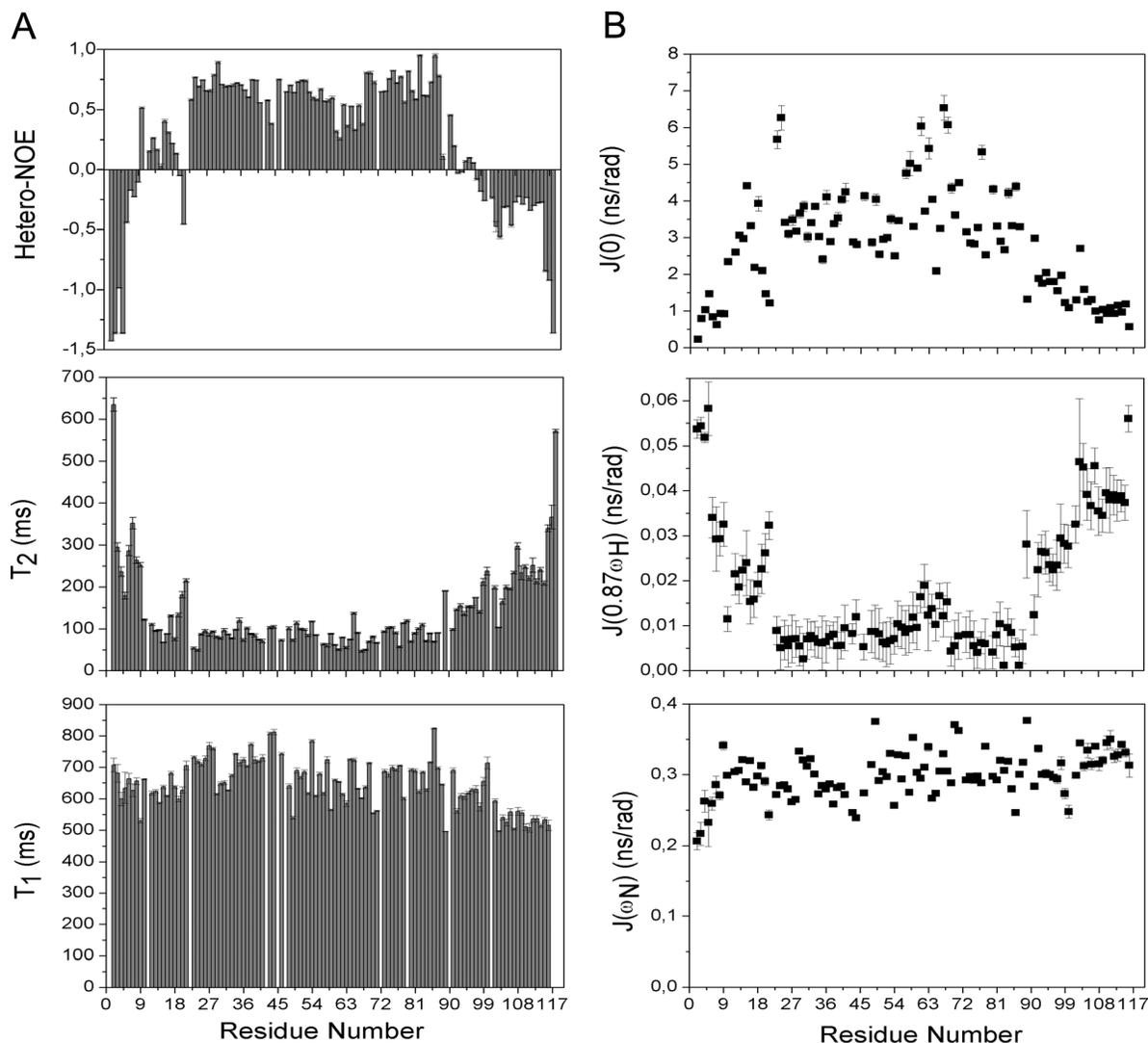
**DISCUSSION**

To date, only a few structures of bacterial lipid-modified proteins have been determined,<sup>15–19</sup> and none of them are related to OmlA. Here, we present the first structure of a member of the SpmA/OmlA family from a bacterial plant pathogen.

OmlA possesses two highly flexible tails and a central structured region stabilized by a hydrophobic cluster

**Figure 7**

Solvent accessibility of backbone amide protons compared with the protein secondary structure. (A) Secondary structure representation generated by Procheck<sup>39</sup> for one of the lowest energy model of OmlA. (B) Plot of the ratio between the peak intensities of the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–HSQC and the CLEANEX-PM spectra, for each residue. (C) Plot of the persistence time of the amides signals in the H/D exchange experiment, for each residue.

**Figure 8**

Backbone relaxation analysis of OmlA. (A) Plots of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE (upper panel),  $T_2$  (middle panel) and  $T_1$  (lower panel) vs. the protein residues. Values that did not fit well to the decay function as well as those of residues A22 and F72, which presented weak amide resonance signals, were excluded from the plots. (B) Spectral densities of backbone motions in nanoseconds/radians calculated from the relaxation data vs. the protein residues.  $J(0)$  (upper panel),  $J(0.87\omega_{\text{H}})$  (middle panel) and  $J(\omega_{\text{N}})$  (lower panel). Measurements have been carried out at 500 MHz, 25°C in 0.1 mM sodium phosphate buffer, pH 5.8.

involving conserved aromatic residues (F72, F76, Y55, Y88, W53, and W84). Interestingly, this structured core nearly matches the assigned SmpA OmlA domain, suggesting that, in the OmlA family, the region with the highest degree of conservation is the folded one. Accordingly, most of the conserved residues in the OmlA structure are located in or adjacent to regions of secondary structure.

Backbone dynamics and amide exchange experiments reveal that residues involved in secondary structure elements are relatively rigid and solvent protected, whereas those in the loops as well as in the N- and C- termini ex-

perience a high degree of flexibility and are solvent exposed. In addition, the  $^{15}\text{N}$  relaxation rates and the reduced spectral density analysis indicate that the protein exhibits regions characterized by variable internal dynamics and conformational plasticity. Though we recognize that the protein in its native form is bound to the bacterial membrane, a situation certainly different from our experimental conditions, we believe that the dynamic features of the protein core as well as of the loops may indeed provide a realistic description of the protein flexibility. In fact, we envisage the protein internal motions as an essential property to allow the onset of the conforma-



to  $\beta$ -lactams, it seems unlikely that OmlA may function as a  $\beta$ -lactamase inhibitor. In fact, the growth of a  $\beta$ -lactamase-producing strain of *E. coli* was unaffected by the over-expression of *X. citri* OmlA (data not shown).

Gene knock-out studies have indicated a role for BLIP in cell morphology and sporulation and a hypothesis has been put forward suggesting that penicillin-binding proteins, which controls cells wall synthesis, could be targets of BLIPs.<sup>52,53</sup> Notably, the *omlA* mutants described to date exhibit alterations in cell wall stability and permeability.<sup>20–22</sup> Such a phenotype is observed also in the *oprL* mutant, which presents an altered peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal), required for outer membrane integrity and nutrient transport.<sup>54</sup> Pal interacts with the periplasmic protein TolB and the outer membrane OmpA.<sup>55</sup> Interestingly, a search in the protein family databank revealed that proteins of the SmpA/OmlA family present two types of domain architectures; one in which the domain is found alone (OmlA) and another where it is fused to the OmpA domain. Thus, the SmpA OmlA domain may function as a protein module involved in protein–protein interaction. As it is for TolB, Pal, and OmpA, OmlA could interact with a multi-protein complex that links the peptidoglycan to the outer membrane. Consistent with this idea is the recent finding that the SmpA lipoprotein from *E. coli* (35% of identity with OmlA) interacts with the YaeT complex, required for the assembly of outer membrane proteins.<sup>20</sup> This complex, however, does not appear to be conserved in *X. citri*, since one of its components, NlpB,<sup>56</sup> is not found in the *X. citri* genome. Interestingly, only the SmpA OmlA domain is conserved between the *E. coli* and *X. citri* proteins (see Fig. 1), thus supporting the notion that the SmpA OmlA domain functions as a module for protein–protein interaction.

The observation that OmlA and Fur are coregulated from a divergent promoter in *X. citri* during citrus infection, suggests that they are required for host colonization and may be functionally related. In most bacteria, Fur controls transcription of genes associated to iron uptake and stress responses.<sup>26–28</sup> In *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, iron availability is a limiting factor for pathogen growth,<sup>57</sup> nonetheless, a *X. oryzae* pv. *oryzae fur* mutant, which produces siderophores in a constitutive manner, shows growth deficiency in rice leaves and compromised antioxidant functions,<sup>58</sup> suggesting that Fur-regulated genes, not associated to iron uptake, are required during infection. Accordingly, in *X. citri* we did not observe significant changes in *omlA/fur* transcription or in OmlA protein levels in response to iron supplementation or depletion (data not shown).

In conclusion, the role of OmlA during citrus infection remains unknown and it is not clear, at this stage, whether a functional connection between OmlA and Fur exists. However, as Fur influences transcription of membrane and peptidoglycan proteins such as TolB and Pal<sup>59</sup>

and OmlA may interact with protein complexes like YaeT,<sup>20</sup> it is reasonable to hypothesize that expression of both OmlA and Fur need to be coupled to allow the assembly of cell wall components required for pathogen growth during *X. citri* infection.

## REFERENCES

- Brunings AM, Gabriel DW. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 2003;4:141–157.
- Duan YP, Castaneda AL, Zhao G, Erdos G, Gabriel DW. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. *Mol Plant Interact* 1999;12:556–560.
- Suzuki H, Nishimura Y, Yasuda S, Nishimura A, Yamada M, Hirota Y. Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Mol Gen Genet* 1978;167:1–9.
- Cascales E, Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Lloubes R. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol* 2002;184:754–759.
- Nudleman E, Wall D, Kaiser D. Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science* 2005;309:125–127.
- Robichon C, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP. Depletion of apolipoprotein *N*-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2005;14:974–983.
- Wu HC, Lai JS, Hayashi S, Giam CZ. Biogenesis of membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *Biophys J* 1982;37:307–315.
- Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001;39:1225–1236.
- Hantke K, Braun V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem* 1973;34:284–296.
- Hayashi S, Wu HC. Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 1990;22:451–471.
- Pugsley AP. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 1993;57:50–108.
- Sankaran K, Wu HC. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 1994;269:19701–19706.
- Yakushi T, Masuda K, Narita S, Matsuyama S, Tokuda H. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol* 2000;2:212–218.
- Neilsen PO, Zimmerman GA, McIntyre TM. *Escherichia coli* Braun lipoprotein induces a lipopolysaccharide-like endotoxic response from primary human endothelial cells *J Immunol* 2001;67:5231–5239.
- Takeda K, Miyatake H, Yokota N, Matsuyama S, Tokuda H, Miki K. Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors. Lol A and Lol B. *EMBO J* 2003;22:3199–3209.
- Campanacci V, Nurizzo D, Spinelli S, Valencia C, Tegoni M, Cambillau C. The crystal structure of the *Escherichia coli* lipocalin Blc suggests a possible role in phospholipid binding. *FEBS Lett* 2004;562:183–188.
- Higgins MK, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9994–9999.
- Chan ACK, Lejl-Garolla B, Rosell FI, Pedersen KA, Mauk AG, Murphy MEP. Cofacial heme binding is linked to dimerization by a bacterial heme transport protein. *J Mol Biol* 2006;362:1108–1119.
- Parsons LM, Lin F, Orban J. Peptidoglycan recognition by Pal, an outer membrane lipoprotein. *Biochemistry* 2006;45:2122–2128.

## NMR Solution Structure of OmlA

20. Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ. Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:6400–6405.
21. Ochsner UA, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein OmlA. *J Bacteriol* 1999;181:1099–1109.
22. Reva ON, Weinel C, Weinel M, Bohm K, Stjepandic D, Hoheisel JD, Tummler B. Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* 2006;188:4079–4092.
23. Chong J, Pierrel MA, Atanassova R, Werck-Reichhart D, Fritig B, Saindrean P. Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol* 2001;125:318–328.
24. Fayos J, Belles JM, Lopez-Gresa MP, Primo J, Conejero V. Induction of gentisic acid 5-O-beta-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* 2006;67:142–148.
25. Lowe CA, Asghar AH, Shalom G, Shaw JG, Thomas MS. The *Burkholderia capacia* fur gene: co-localization with omlA and absence of regulation by iron. *Microbiology* 2001;147:1303–1314.
26. Hassett DJ, Sokol PA, Howell ML, Ma JF, Schweizer HT, Ochsner U, Vasil ML. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* 1996;178:3996–4003.
27. Bijlsma JJ, Waidner B, Vliet AH, Hughes NJ, Hag S, Bereswill S, Kelly DJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Kusters JG. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* 2002;70:606–611.
28. Delany I, Rappuoli R, Scarlato V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 2004;52:1081–1090.
29. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
30. da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergio F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Curmino-Santos JR, El-Dorri H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spicola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas pathogens* with differing host specificities. *Nature* 2002;417:459–463.
31. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley; 1998.
32. Vanini MMT, Benedetti CE, Spisni A, Pertinhez TA. NMR assignment of the outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *J Biomol NMR* 2006;36 (Suppl. 1):34.
33. Baldini RL, Tahara ST, Rosato YB. A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. *Plasmid* 1999;42:126–133.
34. Zhang O, Kay LE, Olivier JP, Forman-Kay JD. Backbone <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of dark in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J Biomol NMR* 1994;4:845–858.
35. Muhandiram DR, Farrow NA, Xu G, Smallcombe SH, Kay LE. A gradient <sup>13</sup>C NOESY-HSQC experiment for recording NOESY spectra of <sup>13</sup>C proteins dissolved in H<sub>2</sub>O. *J Mag Reson B* 1993;102:314–321.
36. Johnson BA, Blevins RA. NMRVIEW: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR* 1994;4:603–614.
37. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 1995;6:277–293.
38. Güntert P, Mumenthaler C, Wüthrich K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* 1997;273:283–298.
39. Laskowski RA, Rullman JAC, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 1996;8:477–486.
40. Hwang TL, Van Zyl PCM, Mori S. Accurate quantification of water-amide proton exchanges rates using the Phase-Modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme. *J Biomol NMR* 1998;11:221–226.
41. Ishima R, Torchia DA. Protein dynamics from NMR. *Nat Struct Biol* 2000;7:740–743.
42. Farrow NA, Zhang O, Forman-Kay JD, Kay LE. Spectral density function mapping using <sup>15</sup>N relaxation data exclusively. *J Biomol NMR* 1995;6:153–162.
43. Babu MM, Sankaran K. DOLOP-database of bacterial lipoproteins. *Bioinformatics* 2002;18:641–643.
44. DeLano WLT. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA: DeLano Scientific; 2002.
45. Kuang Z, Yao S, Keizer DW, Wang CC, Bach LA, Forbes BE, Wallace JC, Norton RS. Structure, dynamics and heparin binding of the C-terminal domain of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2). *J Mol Biol* 2006;364:690–704.
46. Peng JW, Wagner G. Frequency spectrum of NH bonds in Eglin c from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* 1995;34:16733–16752.
47. Lefèvre JF, Daye KT, Peng JW, Wagner G. Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry* 1996;35:2674–2686.
48. Pearl F, Todd A, Sillitoe I, Dibley M, Redfern O, Lewis T, Bennett C, Marsden R, Grant A, Lee D, Akpor A, Maibaum M, Harrison A, Dallman T, Reeves G, Diboun I, Addou S, Lise S, Johnston C, Sillero A, Thornton J, Orengo C. The CATH Domain Structure Database and related resources Gene3d and DHS provide comprehensive domain family information for genome analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:D247–D251.
49. Strynadka NC, Jensen SE, Johns K, Blanchard H, Page M, Matagne A, Frere JM, James MN. Structural and kinetic characterization of a beta-lactamase-inhibitor protein. *Nature* 1994;368:657–660.
50. Strynadka NC, Jensen SE, Alzari PM, James MN. A potent new mode of beta-lactamase inhibition revealed by the 1.7 Å X-ray crystallographic structure of the TEM-1-BLIP complex. *Nat Struct Biol* 1996;3:290–297.
51. Reynolds KA, Thomson JM, Corbett KD, Bethel CR, Berger JM, Kirsch JF, Bonomo RA, Handel TM. Structural and computational characterization of the SHV-1 beta-lactamase/beta-lactamase inhibitor protein (BLIP) interface. *J Biol Chem* 2006;281:26745–26753.
52. Kang SG, Park HU, Lee HS, Kim HT, Lee KJ. New beta-Lactamase inhibitory protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and its roles on the morphological differentiation. *J Biol Chem* 2000;275:16851–16856.
53. Lim D, Park HU, De Castro L, Kang SG, Lee HS, Jensen S, Lee KJ, Strynadka NC. Crystal structure and kinetic analysis of beta-lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1 beta-lactamase. *Nat Struct Biol* 2001;8:848–852.
54. Rodríguez-Herva JJ, Ramos-Gonzalez MI, Ramos JL. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J Bacteriol* 1996;178:1699–706.

M.M.T. Vanini et al.

55. Clavel T, Germon P, Vianney A, Portalier R, Lazzaroni JC. TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol Microbiol* 1998;29:359–367.
56. Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy T, Kahne D. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 2005;121:235–245.
57. Chatterjee S, Sonti RV. *rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 2002;15:463–471.
58. Subramoni S, Sonti RV. Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae fur* mutant in rice leaves is rescued by ascorbic acid supplementation. *Mol Plant Microbe Interact* 2005;18:644–651.
59. Duan K, Lafontaine ER, Majumdar S, Sokol PA. RegA, iron, and growth phase regulate expression of the *Pseudomonas aeruginosa tol-oprL* gene cluster. *J Bacteriol* 2000;182:2077–2087.
60. Llamas MA, Rodríguez-Herva JJ, Hancock RE, Bitter W, Tommasen J, Ramos JL. Role of *Pseudomonas putida tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* 2003;185:4707–4716.

AQ1



Author Proof

## CAPÍTULO II :

### **ANÁLISE FUNCIONAL DO LÓCUS *omlA-fur* E DA PROTEÍNA OMLA DE *Xac***

#### INTRODUÇÃO

Paralelamente aos estudos estruturais da proteína OmlA, buscou-se realizar a sua caracterização funcional no contexto do locus *omlA-fur* (XAC1516-1517). A co-localização dos genes *omlA* e *fur* no genoma de *Xac*, sendo divergentemente transcritos a partir de promotores presumidamente sobrepostos, sugeria uma possível associação funcional e/ou regulatória entre estes genes. Consequentemente, uma vez que *fur* codifica o principal regulador transcricional de genes envolvidos na captação de ferro, a proteína OmlA poderia estar relacionada à homeostase do metal na célula. O fato da proteína Fur exercer sua autoregulação em muitas bactérias (Van Vliet *et al.*, 2000; Delany *et al.*, 2003) também fornecia outros indícios de que, de alguma forma, a expressão de *fur* e os níveis intracelulares de ferro poderiam afetar a expressão de *omlA*.

Neste contexto, foram realizados experimentos para obtenção de mutantes *omlA* e *fur* em *Xac* a partir de estratégias semelhantes a dos mutantes obtidos já descritos na literatura para estes genes. Também foram confeccionadas construções repórteres fusionando os promotores às proteínas fluorescentes. As bactérias transformadas foram submetidas a diversos tratamentos para avaliação da expressão gênica através da observação em microscópio de fluorescência. Buscando-se obter informações adicionais sobre a regulação da expressão de *omlA*, realizou-se o ensaio de monohíbrido, usando o promotor *omlA* como isca.

Uma vez finalizada a estrutura tridimensional em solução, revelou-se que o enovelamento da proteína OmlA assemelha-se ao da proteína BLIP, um inibidor de  $\beta$ -lactamases considerado modelo de estudo de interações proteína-proteína. Com isso, foram realizados ensaios *in vivo* para testar a atividade inibitória de  $\beta$ -lactamase da proteína OmlA e, posteriormente, experimentos de *pull-down* e co-imunoprecipitação para buscar um possível parceiro de interação com OmlA. Apresentamos a seguir estes experimentos complementares e os seus resultados, discutidos no âmbito dos dados disponíveis na literatura e das informações obtidas a partir da análise estrutural.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Confeção de Mutantes *omlA* e *fur***

A partir do sucesso de Ochsner e colaboradores (1999) na obtenção dos únicos mutantes para o locus *omlA* até então relatados no momento de planejamento desse trabalho, foi utilizada uma estratégia similar para o *knockout* dos genes *omlA* e *fur* em *Xanthomonas citri*, baseada na recombinação homóloga simples. Os primers utilizados na obtenção dos mutantes e genes repórteres encontram-se descritos na Tabela 1, assim como os vetores confeccionados nestas etapas estão listados na tabela 2.

#### **- Mutante *omlA***

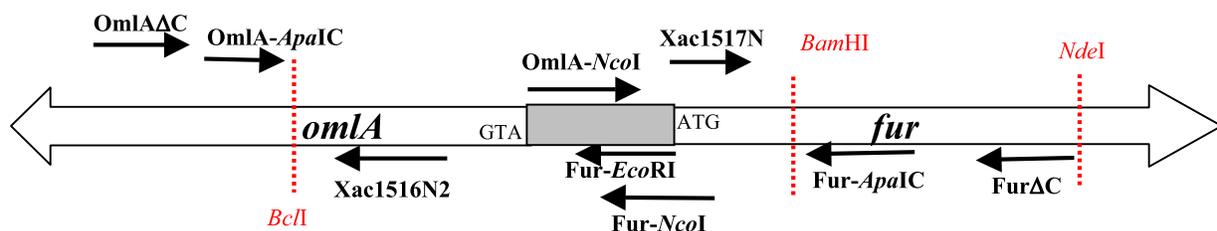
Foi amplificado um fragmento de 258 pb (*Omla* $\Delta$ N $\Delta$ C) correspondente a uma porção interna do gene *omlA* usando-se os *primers* Xac1516N2 e *Omla* $\Delta$ C, que inclui as bases para um *stop-códon* prematuro, conforme o esquema representado na Figura 4. Como *template* foi utilizado o vetor pGEM-*OmlA*. O fragmento foi clonado em vetor pGEM-t para gerar o plasmídeo pGEM-*Omla* $\Delta$ N $\Delta$ C e confirmado por sequenciamento. Após digestão com *SalI* e *NdeI*, o fragmento *Omla* $\Delta$ N $\Delta$ C foi clonado em pET28a (*Novagen*), gerando o clone pET28a-*Omla* $\Delta$ N $\Delta$ C. O plasmídeo pET28a-*Omla* $\Delta$ N $\Delta$ C foi utilizado em diferentes concentrações para transformar alíquotas de 40  $\mu$ L de células de *Xac* 306 previamente preparadas para eletroporação de acordo com protocolo convencional, sendo adicionadas mais etapas de lavagem (Ausubel *et al.*, 1998). Também foi utilizado o vetor suicida linearizado através de digestão com *PstI*. Imediatamente após pulso de 2.48 kV e 50  $\mu$ F de capacitância e 100  $\Omega$  de resistividade em cubeta de 0.2 cm, as células foram diluídas em 1 mL de LB sem sal e transferidas para tubo de vidro de 5 mL. As culturas foram mantidas a 28 °C sob agitação a 200 rpm de 2 h a 3 h e 30 min e plaqueadas em diferentes densidades em meio LB sem sal contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. Como controle negativo para possível integração do vetor sem regiões homólogas no cromossomo bacteriano, as células foram transformadas com plasmídeo pET28a sem insertos.

**Tabela 1:** Primers para as construções da Análise Funcional

CONSTRUÇÕES	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSO
Mutante <i>OmlA</i> <sup>-</sup>	<b>Xac1516N2</b> 5'-CATATGGCTGGCTCCGGCATCATC-3'	<b>OmlAΔC</b> 5'-GTCGACTTCTCAGCGCACGAC -3'
Mutante <i>Fur</i> <sup>-</sup>	<b>Xac1517N</b> 5'-CCATGGAAACCCACGACCTG-3'	<b>FurΔC</b> 5'CATATGGTTTCAGGTGACCG-3'
Reporter <i>omlA</i> : PomlA-EGFP	<b>OmlA-NcoI</b> : 5'-CCATGGGGGATTAAGTGCTG-3'	<b>Fur-ApaIC</b> : 5'-GGGCCCCGCACGCGGTAGACC3'
Reporter <i>fur</i> : Pfur-EGFP	<b>OmlA-ApaIC</b> : 5'-GGGCCCAGCAACGCGCTGAC-3'	<b>Fur-NcoI</b> : 5'-CCATGGGTTCTCCGTTTCATT-3'
Reporter <i>omlA-fur</i> : EGFP-PomlA-fur- DsRed	<b>OmlA-NcoI</b> 5'-CCATGGGGGATTAAGTGCTG-3'	<b>Fur-EcoRI</b> : 5'-GAATTCTCCGTTTCATTGG-3'
Gene DsRed	<b>Red-EcoRI</b> 5'-GAATTCATGGTGCCTCCTCCAA-3'	<b>Red-HindIII</b> 5'-GAAGCTTAAGCTCGAGATC-3'

**Tabela 2:** Vetores confeccionados para a Análise Funcional

<b>pGEM-OmlA</b>	vetor pGEM com seqüência mutada da <i>orf</i> XAC1516 para expressão de proteína OmlA sem peptídio sinal
<b>pGEM-OmlAΔNΔC</b>	vetor pGEM contendo seqüência de 258 pb da <i>orf</i> XAC1516 truncada nas porções N e C terminal e incluindo um <i>stop-códon</i> prematuro
<b>pET28a-OmlAΔNΔC</b>	vetor pET28a contendo seqüência OmlAΔNΔC
<b>pGEM-FurΔC</b>	vetor pGEM contendo seqüência de 260 pb da <i>orf</i> XAC1517 truncada na porção C terminal incluindo um <i>stop códon</i> prematuro
<b>pET28a-FurΔC</b>	vetor pET28a contendo seqüência FurΔC
<b>pGEMpxf115GFP</b>	vetor pGEM contendo o gene da EGFP sob controle do promotor XF0767 da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> (Barbosa & Benedetti, 2007)
<b>pKX33-PomlA-EGFP</b>	vetor pKX33 contendo o gene da EGFP sob controle do promotor <i>omlA</i> estendido que inclui seqüência codante do gene <i>fur</i>
<b>pKX33-Pfur-EGFP</b>	vetor pKX33 contendo o gene da EGFP sob controle do promotor <i>fur</i> estendido que inclui seqüência codante do gene <i>omlA</i>
<b>pKX33-EGFP-PomlA-fur-DsRED</b>	vetor pKX33 contendo o gene da EGFP e da DsRed sob controle da seqüência intergênica <i>omlA-fur</i> na direção <i>omlA</i> e <i>fur</i> , respectivamente



**Figura 4:** Representação do cromossomo de *Xac* na região correspondente às *orfs* XAC1516-XAC1517 (*omlA-fur*) com posição dos primers a serem utilizados nas construções da análise funcional, além de alguns sítios de restrição da seqüência.

### **- Mutante *fur***

Para obtenção do mutante *fur*, a estratégia adotada foi a mesma seguida para confecção de mutantes *omlA*. Amplificou-se um fragmento (Fur $\Delta$ C) do gene XAC1517 com os *primers* Xac1517N e Fur $\Delta$ C, que inclui as bases para um *stop-códon* prematuro. O fragmento de 260pb foi clonado em vetor pGEM-t (pGEM-Fur $\Delta$ C). O vetor pGEM-Fur $\Delta$ C foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I e o fragmento Fur $\Delta$ C foi inserido no vetor pET28a previamente digerido com *Bam*HI e *Nde*I. Células de *X. citri* foram transformadas com o plasmídeo pET28a-Fur $\Delta$ C para produção de mutantes *fur*<sup>-</sup> através de recombinação homóloga, conforme descrito previamente.

### **Confecção e Ensaios com Genes Repórteres para os Promotores *PomlA* e *Pfur***

Além da infecção em *Citrus sinensis* descrita no artigo científico (Capítulo I, Artigo II), as construções repórteres dos genes *omlA* e *fur* foram submetidas a diversos outros tratamentos para análise da atividade dos promotores. Após os tratamentos, as células de *Xac* contendo os vetores pKX33-PomlA-EGFP e pKX33-Pfur-EGFP foram observadas em microscópio de fluorescência Eclipse E600 (Nikon) utilizando filtro B-2E/C FITC. Como controle negativo da fluorescência foram utilizadas células de *X. citri* selvagens e como controle positivo foram utilizadas células BL21pLysS transformadas com o vetor pGEMpxf115GFP, contendo a EGFP sob controle do promotor XF0767 da bactéria *Xylella fastidiosa*, constitutivo em *E. coli* (Barbosa & Benedetti, 2007).

Foram feitos ensaios na presença de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e com culturas em meio LB ON contendo, separadamente, mesilato de desferroxamina, peróxido de hidrogênio, ácido benzóico, diferentes pHs e diferentes antibióticos. Também foram realizados ensaios com culturas submetidas a crescimento em meio XMV2 (Astua-Monge *et al.*, 1995). Estes tratamentos foram preparados conforme descrito a seguir.

### **- Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>**

Foram feitos ensaios com Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> para tentar avaliar efeito da presença de Fe<sup>+2</sup> na atividade dos genes *omlA* e *fur*. Uma vez que o Fe<sup>+2</sup> oxida-se rapidamente a Fe<sup>+3</sup> e o metal neste estado provoca o *quenching* da fluorescência da EGFP, a solução de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> foi

diretamente adicionada à suspensão de células oriundas das diferentes culturas com  $DO_{600nm}$  igual a 0,6 no momento anterior ao preparo das lâminas. As concentrações utilizadas de  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$  foram de 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM. As células contendo as diferentes construções foram então observadas no microscópio de fluorescência.

#### **- Mesilato de Desferroxamina**

Foram realizados experimentos na presença droga *Desferal* (mesilato de desferroxamina- *Novartis*), quelante específico de  $Fe^{+3}$ , como estratégia para avaliar o efeito da ausência deste metal na atividade dos genes em estudo. As células repórteres provenientes de culturas saturadas foram inoculadas numa  $DO_{600nm}$  inicial igual 0,6 em meio líquido contendo kanamicina e aproximadamente 0 mM, 0.4 mM, 2 mM, 9 mM e 18 mM de Desferal (Pericone *et al.*, 2003). Após diferentes tempos de incubação, alíquotas foram coletadas e observadas no microscópio, como descrito no item anterior.

#### **- Peróxido de Hidrogênio**

As construções repórteres também foram submetidas a crescimento na presença de  $H_2O_2$ . As culturas saturadas foram inoculadas numa  $DO_{600nm}$  inicial igual a 0,6 em meio líquido contendo kanamicina e 10mM de  $H_2O_2$  (Pericone *et al.*, 2003; Subramoni & Sonti, 2005) e após os diferentes períodos de incubação, alíquotas foram coletadas para a observação em microscópio, como descrito.

#### **- Ácido Benzóico**

Células de *Xac* contendo as diferentes construções repórteres foram pré-inoculadas a 28°C até a fase de saturação. O pré-inóculo foi transferido para meio líquido contendo 50  $\mu g/mL$  de kanamicina e 0 mM, 5 mM, 10mM e 15mM de ácido benzóico, numa  $OD_{600nm}$  inicial igual 0,6 (Reva *et al.*, 2006). Após 1 h, 2h e 3 h, alíquotas das células foram coletadas, centrifugadas, lavadas com TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5 e 150mM NaCl) (Sambrook & Russel, 2001) e ressuspensas em água estéril para observação em microscópio de fluorescência.

### **- Meio LB ON em diferentes pHs**

Para testar o efeito do pH na regulação do locus *omlA-fur* utilizando as construções repórteres, previamente foi testado o efeito do pH sobre a fluorescência da EGFP. Aliquotas de EGFP purificada e concentrada foram transferidas a soluções tampão em diferentes pHs e os *eppendorfs* contendo as misturas foram observados sob luz UV a 365 nm. Posteriormente, as construções repórteres foram crescidas em 5 ml de meio de cultura LB ON a 28°C por 24 h na presença dos antibióticos kanamicina e ampicilina. Um ml de cada pré-inóculo foi transferido para 25 ml de LB ON contendo os antibióticos e preparados nos pHs 7.0, 6.5, 6.0 (equilibrados com tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 5.8) e 5.5 e 5.0 (equilibrados com tampão acetato de sódio 0.1 M pH 5.0). Aliquotas das diferentes culturas foram retiradas em diferentes tempos e tratadas para observação em microscópio de fluorescência, como procedido para os outros experimentos.

### **- Crescimento em meio XMV2**

As células repórteres também foram submetidas a crescimento em meio rico conhecido como XMV2, considerado mimético do ambiente dos espaços intercelulares das plantas (Astua-Monge *et al.*, 2005). Pré-inóculos das *Xac* repórteres foram submetidos a crescimento no meio descrito em diferentes tempos, assim como foi feito o pré-inóculo diretamente neste meio. Aliquotas das culturas foram coletadas e as células foram observadas em microscópio de fluorescência.

### **- Antibiograma**

Discos contendo diferentes antibióticos (*Cefar Diagnóstica* e *Oxoid*) foram utilizados na realização de antibiogramas para estudar a possível ativação dos genes *omlA* e *fur* na presença de compostos de diferentes classes através da observação em microscópio de fluorescência.

Foram utilizados ao todo 24 antibióticos. Placas foram preparadas com meio LB ON com volume de 60 mL. Inóculos de *Xac* contendo as construções repórteres com DO<sub>600nm</sub> igual a 0.05 foram plaqueados de forma homogênea no meio sólido e os discos de antibiótico foram dispostos a uma distância mínima de 4 cm. Após 48 horas de crescimento em estufa à 30°C, as placas foram fotografadas em captador de imagem sob luz UV a 365 nm para

observação da fluorescência e seleção prévia das células a serem observadas no microscópio. Posteriormente, células próximas aos alos de inibição dos antibióticos selecionados foram coletadas, lavadas com TBS e ressuspensas em água para observação da fluorescência em microscópio. A Tabela 3 mostra a relação de todos os antibióticos utilizados com a sigla e concentração de cada um.

**Tabela 3.** Lista dos antibióticos utilizados para ensaios com os genes repórteres

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
AMI30	Amicacina 30mg	IPM10	Imipeno 10mg
AMP10	Ampicilina 10mg	MER10	Meropeno 10mg
SBA20	Ampicilina + Sulbactano 20mg	NET30	Netilmicina 30mg
AMC30	Amoxicilina + Ac. Clavulâmico 30mg	PPT110	Piperacilina + Tazobactano 110mg
ATM30	Aztreonam 30mg	TOB	Tobramicina 10 mg
CFL30	Cefalotina 30mg	CPM30	Cefepime 30mg
CFO30	Cefoxitina 30mg	AMO10	Amoxicilina 10mg
CRO30	Ceftriaxona 30mg	GEN10	Gentamicina 10mg
CTX30	Cefotaxima 30mg	CFC30	Ceflacor 30mg
CIP5	Ciprofloxacina 5mg	NEO30	Neomicina 30mg
CLO30	Cloranfenicol 30mg	NIT300	Nitrofurantaina 300mg
CAZ30	Ceftazidina 30mg	TET30	Tetraciclina 30mg

### **Confecção e Ensaios com Gene Repórter Bidirecional para o Promotor *PomLA-fur***

Além das construções repórteres descritas, foi confeccionado um repórter bidirecional duplo, contendo o gene EGFP sob o controle da seqüência promotora de *omlA* e o gene DsRed (*red fluorescent protein*) sob o controle da seqüência promotora de Fur. A seqüência intergênica de *fur/omlA* foi fusionada aos genes EGFP e DsRed, conforme etapas a seguir.

O gene EGFP do plasmídeo pGEMpxf115GFP (Barbosa & Benedetti, 2007) foi removido com as enzimas *NcoI* e *NotI* e subclonado no vetor pET28a. Esta construção foi digerida com *XbaI* e *NotI* e o gene EGFP subclonado no vetor pBlueScript. O promotor *fur/omlA*, amplificado a partir do DNA genômico de *Xac* com os primers *OmlA-NcoI* e *Fur-EcoRI*, foi clonado em vetor pGEM-t (pGEM-*Pomla-fur*). O plasmídeo pGEM-*Pomla/fur* foi

digerido com *Nco*I e *Eco*RI para subclonar o fragmento *Pomla-fur* no pBlueScript-EGFP, obtendo-se o promotor *Pomla/fur* fusionado ao gene da EGFP na direção *omla* (pBlueScript-EGFP-*Pomla-fur*). Para inserção do gene da DsRed na direção *fur*, o gene DsRed foi amplificado do vetor pDsRed1-C1 (*Clontech*) com os primers Red-*Eco*RI e Red-*Hind*III. O fragmento clonado em pGEM (pGEM-DsRed) foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III e subclonado no plasmídeo pBlueScript-EGFP-*pomla/fur*, gerando pBlueScript-EGFP-*Pomla/fur*-DsRed. O cassette EGFP-*Pomla/fur*-DsRed foi removido do vetor pBlueScript e inserido no vetor pKX33, usando-se os sítios *Sac*I e *Kpn*I. Células competentes *Xac* selvagens foram transformadas com a construção pKX33-EGFP-*Pomla/fur*-DsRed. Os transformantes foram crescidos em meio LB ON com os antibióticos apropriados e utilizados para infectar folhas de *Citrus senensis*, conforme descrito. Após 5 a 10 dias, folhas com sintomas do cancro foram coletadas, seccionadas e incubadas em água estéril para recuperação das bactérias e observação em microscópio, utilizando células cultivadas em meio de cultura como controle .

### **Detecção da Proteína OmlA em *Xac* submetida a diferentes tratamentos**

#### **- Crescimento na presença de Ácido Benzóico, Desferal e FeCl<sub>3</sub>**

Uma cultura saturada de *Xac* 306 foi inoculada em LB ON acrescido de 15mM de ácido benzóico, 17.8 mM desferal (concentração final de 10 mg/mL) e 200  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, separadamente. A DO<sub>600nm</sub> das culturas foi ajustada para 0,6 e após 1 h, 2 h, 3 h, 6 h e 14 h de crescimento, alíquotas referentes aos diferentes tratamentos foram coletadas. As células foram lavadas com TBS e centrifugadas para estocagem à -20°C. As amostras foram ressuspensas em tampão de corrida SDS-PAGE, fervidas à 95°C e aplicadas em gel SDS-PAGE 13%. As amostras foram primeiramente separadas e visualizadas em gel corado com *coomassie-blue* para adição de quantidades semelhantes de extratos protéicos dos tratamentos. Posteriormente, as alíquotas ajustadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 11% para detecção da proteína OmlA nos diferentes tempos e tratamentos por *western blot*. Os géis foram submetidos à transferência para membranas PVDF (Millipore) com tampão de transferência (48mM Tris.base, 39mM Glicina, 0.037% SDS e 20% metanol) por 1 hora a 80 mA. As membranas previamente bloqueadas em TBS com 5% de leite em pó foram incubadas com soro anti-OmlA (1:5000) a temperatura ambiente por 1 h e lavadas com tampão. Após 3 lavagens de 10

min as membranas foram incubadas com anticorpo secundário *anti-rabbit IgG-peroxidase* (Amersham Biosciences) em diluição 1:3000 por mais 1 hora, seguida de lavagens com TBS. A detecção foi realizada utilizando o *kit* ECL, de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences).

### **Ensaio de Mono-híbrido**

No ensaio de mono-híbrido realizado buscou-se identificar fatores que se ligassem à sequência promotora estendida do gene *omlA* (*PomlA*), ou seja, que compreende a região intergênica entre as ORFs *omlA* e *fur* mais trecho que compreende a região codante de *fur* (correspondente à mesma sequência fusionada ao gene EGFP, utilizada nos experimentos anteriores, vide figura 4). Para tanto, utilizamos a biblioteca genômica de *Xac* gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Chuck Farah e o *kit* para ensaio de mono-híbrido da *Clontech* (*MACHTMAKER One Hybrid System*). Para execução deste ensaio, contamos com a colaboração do graduando da UFRJ Guilherme de Oliveira, bolsista do “Programa de Verão” do LNLS.

A biblioteca genômica de *Xac* dispõe os fragmentos do genoma da bactéria fusionados ao domínio de ativação GAL4 no vetor pOAD, e o *kit* baseia-se no gene repórter HIS3 do vetor pHISi, que pode ser ativado pelo domínio GAL4. Assim, colônias plaqueadas em meio sem histidina só crescerão se o gene HIS3 for ativado. Para reduzir o efeito da ativação do HIS3 a partir do promotor mínimo presente na sequência, certas quantidades de 3-AT (3-amino-1,2,3-triazol), um inibidor do HIS3, devem ser usadas. As colônias que crescerem na presença do 3-AT deverão ter uma expressão significativa do HIS3 e mais dificilmente se tratarão de falsos positivos.

Para realização do ensaio, foram seguidas as seguintes etapas descritas a seguir.

#### **- Preparação do vetor pHISi contendo a sequência alvo *PomlA***

Primeiramente, a sequência *PomlA* foi inserida no vetor pHISi nos sítios *SacI* e *SacII* para direcionar a expressão do repórter sob controle do *PomlA*. Insetos *PomlA* foram ligados em vetor pGEM-t para seleção da direção apropriada do inserto. Os clones foram selecionados partir de PCR com os *primers* FurApaIC e T7 e os plasmídeos pGEM-*PomlA* e pHISi foram

submetidos à digestão dupla *SacI/SacII*. A construção *pHISi-PomIA* (*SacI/SacII*) foi confirmada por sequenciamento e posteriormente submetida à digestão com *XhoI* (Promega) para linearização do plasmídeo.

#### **- Preparação de YM4271 competentes para transformação e integração do vetor *pHISi-PomIA***

As leveduras foram preparadas de acordo com protocolo para transformação pelo método PEG-LiAc (*Yeast Protocol Handbook, Clontech*). As leveduras competentes foram transformadas com cerca de 1 µg de vetor *pHISi-PomIA* seguindo as recomendações do *kit* e do protocolo mencionado e plaqueadas em meio YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) sem histidina e sem uracila (-his -ura). Após cerca de 4 a 5 dias, clones recombinantes com o vetor integrado ao genoma e expressando o HIS3 basalmente foram selecionados através das marcas de seleção nutricional do vetor *pHISi*.

#### **- Screening de YM4271-*pHISi-PomIA* com 3-AT**

Os clones YM4271-*pHISi-PomIA* selecionados foram repicados em meio mínimo SD (*synthetic defined*) -his -ura primeiramente contendo 0, 20, 40 e 60 mM de 3-AT e posteriormente contendo 0, 60, 80, 90 e 100 mM de 3-AT. O crescimento dos clones foi avaliado ao longo dos dias e a concentração adequada para conter a expressão basal do HIS3 assim como os clones mais sensíveis ao 3-AT foram selecionados.

#### **- Transformação de YM4271-*pHISi-PomIA* com biblioteca genômica de *Xac***

Primeiramente, foram testados protocolos de transformação de leveduras mais eficientes para obter um ensaio de mono-híbrido o mais representativo possível. Utilizando o vetor *pOAD* purificado para teste, foi adotado o protocolo *High Efficiency* (Gietz & Woods, 2002). O clone YM4271-*pHISi-PomIA* selecionado foi preparado de acordo com protocolo mencionado e cerca de 200 ng de DNA da biblioteca genômica de *Xac* foram utilizados para transformar a linhagem recombinante, num total de 10 reações. Cada reação foi dividida em 2 placas e os produtos foram plaqueados em meio SD -leu (sem leucina, marca do *pOAD*) -his -ura adicionado de 100 mM de 3-AT, em placa de 60 mL. Após cerca de 4 a 5 dias as colônias mais proeminentes foram selecionadas.

### **- Extração de DNA plasmidial, transformação em DH10B e sequenciamento**

As colônias selecionadas da transformação com a biblioteca foram repicadas em meio SD -leu -his -ura e sem 3-AT. Em seguida foram inoculadas separadamente em meio líquido SD -leu -his -ura em placa de 96 poços mantida sob agitação a 30°C, 300rpm, por 16h, seguindo o protocolo de Sambrook & Russel (2001). A placa foi centrifugada a 2700 rpm a 4°C por 5 min. e o sobrenadante descartado. Duzentos µl de *rescue buffer* foram adicionados e a placa foi agitada, novamente centrifugada e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 0.5 µl de liticase (2mg/ml) e 10 µl de RNase (0.2 mg/ml), incubando-se por 1 h a 37° C. Adicionou-se 5 µl de SDS 10%, agitou-se e incubou-se a temperatura ambiente por 5 min. Foram então adicionados 20 µl de acetato de potássio 3M e a placa mantida a -80°C por 15 minutos. Após descongelar, a placa foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e 24 µl do sobrenadante foram transferidos para outra placa de 96 poços. Foram adicionados 84 µl de isopropanol, agitou-se e manteve-se por 5 min. a temperatura ambiente. Em seguida centrifugou-se a 4000 rpm por 30 min. e o pellet foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 10 µl de tampão TE 1x. A solução de DNA plasmidial foi utilizada para transformação de células de *E. coli* DH10B através de choque térmico e os plasmídios foram novamente purificados através de kit convencional de *miniprep* (*Qiagen*) para serem submetidos a sequenciamento. As seqüências gênicas da biblioteca de *Xac* foram inseridas no vetor pOAD no sítio da endonuclease *PvuII*, localizado logo após o sítio *EcoRI*. Para nossas análises, consideramos o sítio da enzima *EcoRI* como ponto de partida e frame +1. As seqüências dos clones foram analisadas no programa *Chromas Pro* e foram lançadas no *Genebank* com o intuito de encontrarmos ORFs para proteínas regulatórias do locus *omlA-fur*.

### **Ensaio de Co-Expressão OmlA e β-Lactamase**

#### **- Co-transformação de BL21pLysE com pGEM e pET28-OmlA**

Com o intuito de verificar se a superexpressão da proteína OmlA afeta a atividade da β-lactamase na resistência ao antibiótico betalactâmico ampicilina, células de *E. coli* BL21pLysE foram co-transformados com os vetores pBlueScript, contendo o gene da β-lactamase apenas, e pET28-OmlA, contendo a mesma seqüência para expressão da proteína

OmlA recombinante estudada. Colônias BL21pLysE-pBlueScript-pET28-OmlA obtidas foram pré-inoculadas em meio LB contendo os antibióticos apropriados e o pré-inóculo foi posteriormente diluído para uma densidade ótica a 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) igual a 0,025. Cem  $\mu$ L desta cultura foram aplicados em placas com 20 mL de LB sólido contendo 40  $\mu$ g/mL de kanamicina e 10, 20, 40, 80 e 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, na presença e na ausência de 0.4 mM de IPTG para indução ou não da super-expressão da proteína OmlA. Como controle, células BL21pLysE foram co-transformadas com os vetores pBlueScript e pET28 não dispondo de nenhuma ORF sob controle do promotor T7.

### **- Antibiógramas**

Discos contendo diferentes antibióticos foram utilizados na realização de antibiógramas para estudar o efeito da super-expressão da proteína OmlA na resistência a diferentes antibióticos relacionados, ou não, à atividade da  $\beta$ -lactamase. Foram utilizados ao todo 21 antibióticos divididos em placas por grupos de  $\beta$ -lactâmicos 1,  $\beta$ -lactâmicos 2 e inibidores de  $\beta$ -lactamase, e aminoglicosídeos, sendo este último grupo utilizado como controle negativo. As placas foram preparadas com 60 mL de meio LB, na presença e na ausência de 0,2 mM de IPTG para indução ou não da super-expressão da proteína OmlA. Inóculos de BL21pLysE-pBlueScript-pET28-OmlA com  $OD_{600nm}$  de 0,025 foram plaqueados de forma homogênea no meio sólido e os discos de antibiótico foram dispostos a uma distância mínima de 4 cm. As culturas foram crescidas em estufa à 37°C por 24 h. A tabela 4 mostra a relação por grupo de todos os antibióticos utilizados com a sigla e concentração de cada um.

Os testes também foram realizados na presença de lactose para indução da expressão da proteína OmlA, utilizando os discos dos grupos betalactâmicos 1 e aminoglicosídeos. Culturas de BL21pLysE-pBlueScript-pET28-OmlA e de BL21pLysE-pBlueScript-pET28 foram espalhadas nas placas, que desta vez foram preparadas para uma quantidade final de 20 mM de lactose ao invés de IPTG.

Para verificação da expressão da proteína OmlA, amostras das culturas plaqueadas foram coletadas e ressuspensas em tampão SDS-PAGE para corrida de eletroforese em gel de acrilamida 13 %.

**Tabela 4.** Lista dos antibióticos utilizados para teste de efeito da superexpressão de OmlA na sensibilidade aos mesmos

Sigla	Nome	Sigla	Nome
<b>BETALACTÂMICOS 1</b>			
AMP10	Ampicilina 10mg	CFO30	Cefoxitina 30mg
AMO10	Amoxicilina 10mg	CRO30	Ceftriaxona 30mg
CFL30	Cefalotina 30mg	CTX30	Cefotaxima 30mg
CFC30	Ceflacor 30mg	CAZ30	Ceftazidina 30mg
<b>BETALACTÂMICOS 2 E INIBIDORES</b>			
CPM30	Cefepime 30mg	AMC30	Amoxicilina + Ac. Clavulâmico 30mg
IPM10	Imipeno 10mg	SBA20	Ampicilina + Sulbactano 20mg
MER10	Meropeno 10mg	PPT110	Piperacilina + Tazobactano 110mg
ATM30	Aztreonam 30mg		
<b>AMINOGLICOSÍDEOS</b>			
NEO30	Neomicina 30mg	CLO30	Cloranfenicol 30mg
GEN10	Gentamicina 10mg	NET30	Netilmicina 30mg
AMI30	Amicacina 30mg	TOB 10	Tobramicina 10 mg

### **Experimentos de *PullDown***

Os ensaios de *pulldown* foram realizados como estratégia para buscar um possível parceiro de interação com a proteína OmlA proveniente do extrato protéico total de *Xanthomonas*. A proteína OmlA foi purificada conforme protocolo estabelecido descrito em artigo científico (capítulo I, artigo II), eliminando-se a etapa de clivagem da cauda de histidina. Cerca de 1,5 mg de proteína OmlA recombinante pura contendo cauda 6XHIS na sua porção N-terminal foram utilizados para saturar 250  $\mu$ L de resina NiNTA (Qiagen) pré-equilibrados com tampão Tris-salina para *pulldown* com 20 mM de Imidazol. O tampão contendo 25 mM de Tris-base e 100 mM de sal em pH 7.5 foi utilizado para ao mesmo tempo evitar a interação inespecífica com a resina e a inibição de interações proteína-proteína. A proteína foi incubada com a resina em tubo *ependorf* a 4 °C sob agitação delicada por cerca de 16 h. A mistura foi então aplicada em coluna de gravidade e submetida à lavagem com 10 volumes de coluna com tampão Tris-salina para *pulldown* com 20 mM de Imidazol. O extrato protéico total de *Xanthomonas* foi preparado a partir de uma cultura de 500 mL em meio LB sem sal contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina com  $DO_{600nm}$  0.6. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com tampão TBS pH 7.5 e ressuspensas em 20 mL de tampão Tris-salina para *pulldown* com 20 mM de Imidazol. Foram adicionados 100  $\mu$ g/mL de

lisozima e 0,5 % de Nonidet P-40 (*USB Biochemicals*) e após 30 min de incubação no gelo adicionou-se 1mM de PMSF. As células foram sonicadas em 20 pulsos de 20 secs e o material insolúvel ou não lisado foi separado por centrifugação a 18000 g por 30 min. O extrato solúvel foi filtrado a 0.45 µm e aplicado primeiramente numa coluna de afinidade a níquel contendo 2 mL de resina NiNTA (*Qiagen*) pré-equilibrada com 10 volumes de coluna de tampão Tris-salina para *pulldown* contendo 20 mM de Imidazol. Após passagem do extrato pela coluna num fluxo de 0.3 ml/mim, o volume coletado foi aplicado na coluna saturada com a proteína OmlA-HIS num fluxo de 0.3 ml/mim. Esta 2ª coluna foi então lavada com 30 volumes de coluna de tampão Tris-salina para *pulldown* contendo 20 mM de imidazol, seguida de lavagem com 15 volumes de coluna com tampão contendo 50 mM de imidazol e eluição em 8 volumes de coluna com tampão contendo 300 mM de imidazol. As amostras coletados durante as etapas do procedimento foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE 13 %. As frações correspondentes à co-eluição da proteína OmlA com outras proteínas foram concentradas em *speed vac* e submetidas à corrida eletroforética. Após análise do gel, as bandas de interesse foram excisadas e submetidas a tratamento com tripsina, seguindo o método clássico de digestão em gel (Rosenfeld *et al.*, 1992) para posterior identificação de peptídeos através de espectrometria de massas. Os peptídeos foram analisados pelo sistema MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption and ionization – time of flight*) em colaboração com o laboratório de Espectrometria de Massas do LNLS.

### **Experimentos de coimunoprecipitação**

Ensaio de co-imunoprecipitação também foram realizados afim de buscar possíveis parceiros de interação com a proteína OmlA. Foram seguidos diferentes protocolos, descritos por Sklar *et al.* (2007), que descreve a co-imunoprecipitação do complexo YaeT de *E. coli*, Tsai *et al.* (2002) e Lee *et al.* (2000), que co-imunoprecipitaram proteínas de membrana de *Xanthomonas*, e do fabricante *Bethyl Labs*, que descreve um protocolo básico do procedimento ([www.bethyl.com](http://www.bethyl.com)). Para cada protocolo foram utilizados 200 mL de cultura de *Xac* com DO<sub>600nm</sub> igual a 0.6, cujas células foram centrifugadas e lavadas 3X com PBS pH 7.5.

Num primeiro procedimento (Tsai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000), as células foram ressuspendidas em 4 mL de tampão TBS pH 7.4, incubadas com 100 µg/mL de lisozima e

mantidas no gelo por 25 min. Após adição de 1 mM de PMSF as células foram rompidas com 10 pulsos de 10 secs em sonicador e o material não lisado foi separado por centrifugação a 4300 g por 10 min. O sobrenadante foi centrifugado a 20000 g por 1 h para precipitação das membranas e o pellet foi ressuspensão em 20 mM de tampão fosfato de sódio pH 7.4 contendo 2 % de Triton X-100, 150 mM de NaCl e 20 % de glicerol e incubado por 45 min a 4°C sob agitação delicada. A suspensão foi centrifugada a 20000 g por 45 min e ao sobrenadante, dividido em 2 alíquotas, foram adicionados soro de coelho anti-OmlA (1:500) e soro de coelho pré-imune (1:500). A reação foi incubada a 4°C por aproximadamente 16 h sob agitação delicada.

Outra alíquota de cultura de *Xac* foi tratada de acordo com Sklar *et al.* (2007). As células foram ressuspensas em 4 mL de tampão TBS pH 7.4 contendo 1 % de *zwittergent* (ZW3-12, Sigma), 100 µg/mL de lisozima, 50 µg/mL de DNaseI e 50 µg/mL de RNaseI e incubadas no gelo por 25 min. Após a adição de 1 mM de PMSF, as células foram rompidas por sonicação em 10 pulsos de 10 secs e o lisado centrifugado a 18000 g por 5 min. O sobrenadante foi dividido em 2 alíquotas e incubado com soro de coelho anti-OmlA (1:500) e soro de coelho pré-imune (1:500) por aproximadamente 16 h a 4°C, sob agitação delicada.

De acordo com o terceiro protocolo (*Bethyl Labs*), as células de *Xac* foram ressuspensas em 4 mL de tampão de lise contendo 50 mM de Tris pH 8.0, 25 mM de NaCl, 5mM de EDTA pH 8.0 e 0,5 % de Nonidet P40 (*Sigma*) e incubadas no gelo por 25 min após adição de 100 µg/mL de lisozima. Adicionou-se 1mM de PMSF e as células foram rompidas por sonicação. O material solúvel foi recuperado por 5 min de centrifugação a 10000 g e dividido em duas alíquotas para incubação com soro anti-OmlA e soro pré-imune, da mesma forma que para os outros procedimentos.

Às reações de imunoprecipitação foi adicionada proteína A conjugada com resina (*Protein A Sepharose beads*, Amershan) previamente lavada, equilibrada e preparada a 20 % com os respectivos tampões de lise. A proteína conjugada foi adicionada às reações numa razão 1:5 entre solução de proteína A e volume de reação de imunoprecipitação. As reações foram incubadas por cerca de 2 h e 30 min a 4°C sob agitação delicada e lavadas 5x com os respectivos tampões de lise, sendo que Tsai *et al.* (2002) e Lee *et al.* (2000) utilizam um tampão de lavagem (tampão fosfato de sódio pH 8.0, 0,5 % de Triton X-100 e 10 % de glicerol). Após as lavagens, as amostras foram ressuspensas em cerca de 50 µL de tampão

para SDS-PAGE e submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 13 %. Foram feitos géis em duplicata para coloração com *coomassie-Blue* e para confirmação da precipitação da proteína OmlA através de *Western Blot* (Sambrook & Russel, 2001). As bandas de interesse foram excisadas do gel de acrilamida corado com *coomassie-blue* para tratamento e identificação das proteínas por espectrometria de massas, conforme descrito anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Confecção de Mutantes

As análises funcionais de um gene em geral requerem o isolamento de mutantes por *knockouts* específicos, que são empregados na confirmação do papel fisiológico dos prováveis produtos gênicos de uma determinada *orf*. Com as construções para promover recombinação homóloga entre porções truncadas das sequências *omlA* e *fur* e seus respectivos genes selvagens em *Xac*, esperava-se obter mutantes com alto potencial informativo para estes genes. No entanto, após inúmeros experimentos de transformação para gerar os *knockouts*, nenhum mutante foi selecionado, apesar da disponibilidade de plasmídeos suicidas em alta concentração e de protocolo de eletroporação eficiente, não havendo dificuldade, por exemplo, para inserção dos vetores tipo pKX33 nas células de *Xac*.

A aplicação de técnicas de substituição gênica em espécies do gênero *Xanthomonas* tem se restringido a poucas linhagens ou *patovars*, como por exemplo *X. campestris* e, em muitos casos, as outras espécies são muitas vezes aparentemente refratárias à transformação com DNA plasmidial exógeno (Atkins *et al.* 1987, White & Gonzales 1991, Ferreira *et al.*, 1995). No entanto, em outros laboratórios a obtenção de mutantes em *Xac* tem apresentado sucesso através de estratégias de dupla recombinação aliadas à seleção baseada na sensibilidade à sacarose por meio da marca *sacB* (Katzen *et al.*, 1999; Prof. Dr. S. C. Farah, comunicação pessoal). Assim, considerando que a frequência de recombinação diminui à medida que a região de homologia também diminui, as curtas sequências de homologia inseridas nos vetores suicidas podem ter contribuído para o nosso insucesso na obtenção dos mutantes.

No entanto, os primeiros mutantes *omlA* relatados na literatura foram gerados em *Pseudomonas aeruginosa* a partir de uma estratégia semelhante e com o uso de sequências de 291 pb (Ochsner *et al.*, 1999). O único mutante *fur* descrito para o gênero *Xanthomonas* também foi produzido através de recombinação homóloga simples em *X. oryzae* pv. *oryzae*, utilizando um fragmento interno à *orf* compreendendo 268 pb. E recentemente foi relatada a obtenção de um mutante para o locus *omlA* em *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

utilizando um plasmídeo suicida contendo um fragmento de apenas 170 pb como região de homologia (Fuangthong *et al.*, 2007).

Até o momento não existe uma explicação clara para o entendimento da dificuldade de transformação da linhagem de *Xac* 306, mas a presença de sistemas de restrição e modificação capazes de degradar DNA exógeno tem sido relatada para o caso de outras espécies de *Xanthomonas* (de Feyter & Gabriel, 1991). Além disso, estudos prévios falharam na obtenção de mutantes para o gene *fur* em *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus ducreyi* e *Neisseria gonorrhoea* (Carson *et al.*, 1996; Prince *et al.*, 1993; Thomas & Sparling, 1996), indicando que para muitas bactérias *fur* é essencial para a sobrevivência.

Devido às dificuldades em se obter os mutantes para o locus *omlA-fur*, decidiu-se realizar a análise funcional deste locus através de outros meios. As estratégias alternativas basearam-se na utilização de genes repórteres assim como de anticorpos contra a proteína OmlA para avaliar os possíveis sinais desencadeadores da ativação da expressão destes genes.

### **Análise da Atividade dos Promotores *PomlA* e *Pfur* Através dos Genes Repórteres**

A proteína fluorescente verde EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) do organismo *Aequorea victoria* é amplamente utilizada como um marcador fluorescente não invasivo para expressão gênica, localização celular e direcionamento de proteínas intracelulares (Chalfie *et al.*, 1994; Gerdes & Kaether, 1996). Uma vez que não foram obtidos mutantes para os genes *omlA* e *fur*, a fusão dos promotores destes genes à proteína EGFP constituiu-se como uma das principais ferramentas para os estudos funcionais. As células de *Xac* transformadas com os vetores pKX33-PomlA-EGFP e pKX33-Pfur-EGFP foram submetidas a diferentes tratamentos para estudar a atividade dos genes *omlA* e *fur*.

Como previamente descrito (capítulo I, artigo II), em condições de crescimento em meio de cultura estes promotores estão pouco ativos. Após a infecção nas folhas de *Citrus*, as bactérias recuperadas contendo as construções repórteres mostram um aumento significativo na atividade de ambos os promotores (figura 2C do artigo II no capítulo I). O dado sugere que os genes são co-ativados e que as proteínas OmlA e Fur devem ter um papel importante durante o processo de infecção e estabelecimento do patógeno na planta. Uma vez que ambos

genes foram expressos durante a infecção na planta, buscou-se estudar que tipo de sinal presente no tecido hospedeiro induz a expressão de *omlA* e *fur*.

A hipótese inicial sugeria o envolvimento direto do locus *omlA-fur* na homeostase de ferro, uma vez que a proteína Fur é o principal regulador do metabolismo deste metal em diversas bactérias (Escolar *et al.*, 1999; Ratledge & Dover, 2000; Fuangthong & Helmann, 2003). Considerando que a disponibilidade de ferro em tecidos hospedeiros é considerada limitada (Neidlands, 1995) e nos locais de interação entre plantas e micróbios é muito baixa (Loprasert *et al.*, 1999), a escassez de ferro foi inicialmente testada como o potencial desencadeador da ativação dos genes durante a infecção na planta. A baixa disponibilidade de ferro foi mimetizada através do crescimento das bactérias repórteres em meio de cultura na presença de Desferal. A droga contém desferroxamina, um quelante utilizado para remover o excesso de ferro do organismo, capaz de formar complexos com íons trivalentes do metal. A presença de diferentes concentrações do quelante em meio de cultura, no entanto, não resultou num aumento da fluorescência da EGFP em comparação com as culturas sem adição de Desferal, indicando que a escassez de ferro não promove a ativação da expressão de *omlA* e *fur* em *Xac* (não mostrado).

O paradigma clássico de atuação do fator Fur descreve que a proteína sob condições de suficiência de ferro associa-se ao metal e na sua forma complexada reprime os promotores que regula. A insuficiência de ferro na célula deve ocasionar a desrepressão destes promotores, em geral de genes envolvidos na captação do metal. Nestas condições, portanto, não há necessariamente um aumento na expressão da proteína Fur. A proteína OmlA, por sua vez, deveria apresentar um aumento na sua expressão caso exercesse algum papel na aquisição do metal, o que não foi indicado pelos resultados.

Foram então realizados ensaios na presença de excesso de ferro como meio para avaliar a correspondência da regulação por Fur em *Xac* ao panorama clássico, no qual altas concentrações de ferro induzem a expressão de Fur para ligação aos promotores que reprime. Os experimentos para simular condições de excesso de ferro estavam condicionados à limitação do repórter utilizado devido ao fenômeno de *quenching* da fluorescência. Por esta razão, foi utilizada solução de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  para evitar que o  $\text{Fe}^{+3}$  “apagasse” a fluorescência. Nestes tratamentos também não se observou a ativação dos promotores fusionados à EGFP, indicando que o gene *fur* em *Xac* não parece estar diretamente associado à

repressão dos sistemas de captação de ferro e que o gene *omlA* tão pouco parece fazer parte dos sistemas de estocagem ou efluxo do metal (não mostrado).

Em contraste com o paradigma clássico que descreve a atividade repressora dos sistemas de captação de ferro, a regulação gênica mediada pelo fator Fur descrita na literatura é bastante complexa e diversificada. Fur regula a expressão tanto de promotores reprimidos quanto ativados pelas concentrações de ferro (Delany *et al.*, 2001), podendo atuar positivamente na regulação de outros promotores (Niederhoffer *et al.*, 1990; Hall & Foster, 1996) e promover sua autoregulação (Delany *et al.*, 2002; Delany *et al.*, 2003). Além disso, Fur regula a transcrição não apenas de genes associados ao metabolismo de ferro, mas também de genes de resposta ao estresse oxidativo (Hasset *et al.*, 1996), de fatores de virulência (Litwin & Calderwood, 1993), tolerância a acidez (Bijlsma *et al.*, 2002) e expressão de fatores sigma alternativos (Ochsner & Vasil, 1996).

O único mutante *fur* descrito no gênero *Xanthomonas* foi produzido em *X. oryzae* pv. *oryzae* (Subramoni & Sonti, 2005). Este mutante apresenta baixa virulência e hipersensibilidade a peróxido de hidrogênio. A deficiência no processo de infecção em folhas de arroz por parte deste patógeno parece ocorrer devido à sensibilidade ao estresse oxidativo. Tratamentos na presença de mesmas quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas em *X. oryzae* foram realizados em *Xac* contendo as construções repórteres, mas também não resultaram na ativação dos promotores *fur* e/ou *omlA* (não mostrado).

Outro fator relacionado à complexa regulação gênica mediada pelo fator Fur é o estresse ácido induzido pelo pH (Bijlsma *et al.*, 2002). O efeito do pH ácido na regulação do locus *omlA/fur* foi avaliado através da exposição das culturas repórteres a diferentes pHs e em diferentes tempos. No entanto, o estresse ácido não exerceu um efeito na atividade destes promotores, uma vez que não foi detectado um aumento na fluorescência da EGFP através da observação em microscópio (não mostrado).

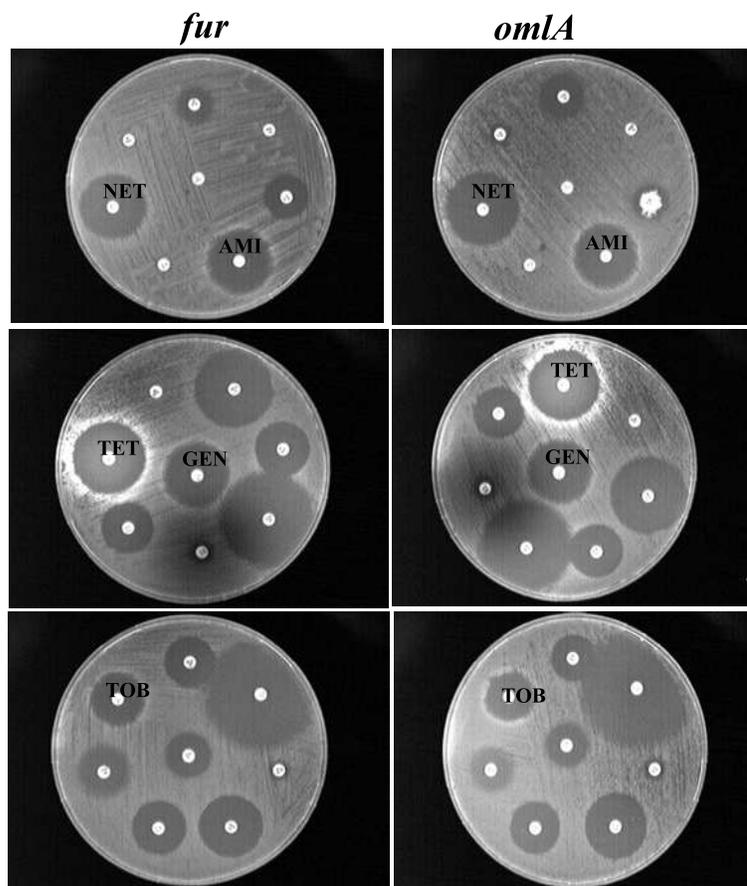
Em paralelo, foi recentemente identificado através de sensibilidade ao estresse ácido-orgânico por benzoato, um mutante *omlA* em *Pseudomonas putida* (Reva *et al.*, 2006). O benzoato de sódio é um ácido orgânico comumente utilizado na conservação de alimentos. Ácidos orgânicos controlam a proliferação de microorganismos pois penetram facilmente no citoplasma onde liberam prótons e acidificam o pH, causando morte celular (Comes & Beelman, 2002). Curiosamente, a produção de ácido benzóico pode ser induzida em plantas

após a infecção por patógenos (Chong *et al.*, 2001) e os compostos fenólicos produzidos em plantas sob condições de infecção podem atuar como defensivos antimicrobianos e sinais para o desenvolvimento de resistência (Dixon, 2001). É interessante notar que Reva e colaboradores (2006) detectaram outro mutante que apresentava sensibilidade ao ácido benzóico. Trata-se de um mutante *fepA*. A proteína de membrana FepA (*ferric enterobactin receptor*) de *E. coli* é um transportador de enterobactina - um sideróforo específico de *E. coli* que quela íons  $Fe^{+3}$  de forma altamente eficiente (Buchanan *et al.*, 1999). O fato de ambos mutantes apresentarem o mesmo fenótipo sugeria mais uma vez a possível associação da proteína OmlA com a captação ou efluxo de compostos relacionados ao metabolismo de ferro. Neste contexto, o ácido benzóico foi testado em culturas de *Xac* contendo as células repórteres, mas o estresse ácido-orgânico também não provocou a ativação dos promotores (não mostrado).

O primeiro mutante *omla* descrito na literatura, por sua vez, apresentou maior susceptibilidade a vários antibióticos, incluindo ácido nalidíxico, rifampicina, novobiocina e cloranfenicol (Ochsner *et al.*, 1999). As células repórteres foram então crescidas na presença de alguns destes antibióticos, dentre vários outros. A figura 9 mostra as placas com as bactérias repórteres crescidas na presença dos discos de diferentes antibióticos identificados por siglas (vide tabela 3, Material e Métodos). As células dos alos referentes aos antibióticos amicaxina, netilmicina, tobramicina e gentamicina que, no caso de ambos os repórteres, pareciam apresentar alguma fluorescência, foram selecionadas para observação no microscópio. A tetraciclina é um antibiótico que normalmente fluoresce dentro da célula, por isso, as células crescidas na presença deste antibiótico não foram consideradas. A observação no microscópio mostrou que as células submetidas ao tratamento com os antibióticos não floresceram diferente do controle e que portanto a presença deste compostos não está relacionada à ativação dos genes em estudo.

Uma vez que até então a ativação dos promotores foi detectada apenas durante o processo de infecção em folhas de citrus, as células repórteres também foram submetidas ao crescimento no meio de cultura XMV2. Este meio é descrito como sendo mimetizador do ambiente dos espaços intercelulares da planta (Astua-Monge *et al.*, 2005). As células foram submetidas a crescimento em XMV2 por um período de até 24 a 28 horas, mas tão pouco nestas condições se detectou um aumento na fluorescência das células repórteres (não

mostrado). De fato, Astua-Monge e colaboradores (2005) não relacionam os genes *omlA* ou *fur* dentre aqueles que são superexpressos ou reprimidos na sua análise por *microarray* da cultura de *Xac* crescida em XMV2.



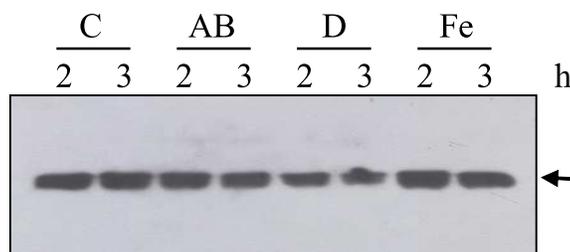
**Figura 5.** Culturas de *Xac* transformadas com os genes repórteres em placas de LB ON contendo discos de diferentes antibióticos (para as siglas verificar tabela 3) fotografadas sob luz UV a 365 nm.

### Análise da Expressão da Proteína OmlA em *Xac*

Paralelamente aos experimentos com os genes repórteres, realizamos a análise da expressão da proteína OmlA através de *Western Blot*. Uma vez que os níveis de atividade do promotor *omlA* são relativamente baixos e por isso a fluorescência do gene repórter não é muito intensa, buscamos facilitar a análise através da detecção da proteína OmlA em culturas

de *Xac*. Além disso, experimentos envolvendo excesso de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , inviáveis com os genes repórteres devido ao fenômeno de *quenching* da fluorescência pelo ferro, foram possibilitados.

A figura 6 mostra os resultados da detecção da proteína OmlA em culturas de *Xac* submetidas a crescimento na presença de ácido benzóico, desferal e cloreto de ferro. A expressão da proteína OmlA por *Xac* na presença de ácido benzóico e  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  aparentemente não difere da expressão em condições de crescimento em meio LB ON. No entanto, a indisponibilidade de ferro promovida pela presença do quelante Desferal parece diminuir os níveis de proteína. O resultado deve estar relacionado a um efeito do Desferal na diminuição do metabolismo celular como um todo. A análise mostra que a expressão da proteína não é aumentada sob as condições estudadas, reforçando a idéia que a proteína OmlA não está envolvida nos mecanismos de captação, estocagem ou efluxo de ferro ou de compostos como o benzoato.



**Figura 6:** *Western blot* contra a proteína OmlA de *Xac* utilizando extratos protéicos totais de células de *Xac* crescidas em diferentes números de horas (h). Os tratamentos foram em LB ON (C), e LB ON adicionado de 15 mM de ácido benzóico (AB), 17,8 mM de Desferal (D) e 200  $\mu\text{M}$  de cloreto de ferro (Fe).

Os resultados obtidos estabelecem que os genes *omla* e *fur* são expressos em níveis basais em condições de crescimento em meio de cultura, sendo ambos ativados durante o processo de infecção em *Citrus* e que, portanto, devem ter papel importante na patogenicidade de *Xac*. *fur* e *omla*, no entanto, não são ativados na presença de elementos relacionados à homeostase de ferro, nem em condições sob as quais, em alguns organismos, estes genes parecem estar envolvidos. Assim, não foi possível identificar os fatores que regulam positivamente o promotor e o tipo de sinal que deve desencadear a ativação dos genes em *Xac* durante o processo de infecção. Por outro lado, os dados parecem sugerir que talvez em *Xac* este cluster não esteja diretamente envolvido com o metabolismo de ferro.

Os resultados aparentemente contrastantes são, na realidade, consistentes com os dados disponíveis na literatura. As funções associadas aos genes *omlA* e *fur* até então descritas são, na sua maioria, derivadas dos fenótipos observados nas cepas mutantes com deleções para estes genes. O mutante *omlA* em *P. aeruginosa* foi submetido a diversos tratamentos e apresentou maior susceptibilidade a detergentes aniônicos e a antibióticos estruturalmente não relacionados (Ochsner *et al.*, 1999). Mas neste estudo também foi utilizada uma construção repórter fusionando o promotor *omlA* ao gene *lacZ*. Esta construção foi submetida às várias condições já avaliadas através dos mutantes, inclusive à presença dos detergentes e antibióticos. Curiosamente, assim como foi observado para o genes repórteres de *omlA* e *fur* em *Xac*, também não foi constatada uma regulação positiva do promotor e tão pouco foi detectada uma resposta estresse-específica que induzisse a ativação do repórter.

A expressão de *omlA* e *fur* também foi monitorada no nível transcricional em *P. aeruginosa* através de ensaios de *RNase protection* por Ochsner e colaboradores (1999). Os resultados obtidos são ainda mais relevantes quando comparados com o nosso estudo, pois em condições de excesso ou escassez de ferro os níveis de RNAm de ambos genes em *P. aeruginosa* se mostraram inalterados ao longo do tempo. Além disso, Ochsner e colaboradores (1999) relatam que as concentrações celulares de ambas proteínas OmlA e Fur permaneceram constantes ao longo do crescimento bacteriano e não responderam às mudanças de temperatura, tensão de oxigênio ou concentração de ferro. Os genes mostram uma expressão constitutiva mas, a partir dos dados de uma série de fusões com *lacZ*, os autores sugerem que os mesmos devem estar associados a um sistema de regulação positiva, com a atuação de ativadores transcricionais. No caso de *Xac*, estes ativadores poderiam estar desempenhando seu papel durante a infecção em citrus.

É importante ressaltar, por outro lado, que Fur é descrito como regulador transcricional em resposta a ferro em *P. aeruginosa* (Ochsner & Vasil, 1996). Portanto, o fato de um regulador de transcrição não apresentar maiores níveis celulares em resposta a determinadas condições aparentemente não exclui a sua participação na regulação deste estresse. Sabe-se que a concentração intracelular da proteína Fur é normalmente alta e que o gene Fur é em geral muito expresso (Watnick *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1999), o que está de acordo com o padrão de fluorescência observado para o nosso repórter *fur*, sempre maior quando comparado com o repórter *omlA* (figura 2B do artigo II, capítulo I). Em última instância, portanto, a

regulação por Fur não dependeria de maiores níveis de expressão da proteína. Num modelo de atuação mais global, em contraste com o paradigma clássico de Fur, é o *status* da proteína com seu co-fator metálico, o que está invariavelmente associado às concentrações intracelulares de ferro, que regula uma mudança entre conformações com afinidades alteradas a diferentes operadores sequência-específicos (Delany *et al.*, 2001; 2002). Assim, de maneira geral, quando complexado a ferro, Fur liga-se a operadores do tipo reprimidos por ferro, enquanto que quando está desassociado de ferro liga-se a operadores do tipo ativados por ferro. Por outro lado, a proteína Fur e as concentrações intracelulares de ferro devem possuir uma série de atividades regulatórias que não necessariamente se sobrepõem, uma vez que além do sistema clássico de repressão dependente de ferro associado ao fator Fur são observados padrões de regulação variados, incluindo a indução da expressão gênica por ferro e Fur, regulação por ferro independente de Fur e, por outro lado, regulação por Fur independente de ferro (Mey *et al.*, 2006).

Além disso, no estudo em *P. aeruginosa*, Ochsner *et al.* (1999) concluem que não há associação entre os genes *omlA* e *fur*, apesar da organização genômica nesta bactéria, semelhante a *Xac*, sugerir uma correlação funcional ou regulatória entre estes genes. Os genes *omlA* e *fur* de *P. aeruginosa* são expressos simultaneamente de maneira constitutiva, apesar do curto espaçamento intergênico, e os níveis das proteínas OmlA e Fur não exercem influência na expressão de *omlA* e *fur*, excluindo a possibilidade de regulação cruzada do tipo *trans* entre *omlA* e *fur* nesta bactéria.

Esta abordagem também é respaldada por Fuangthong e colaboradores (2007), num artigo que foi publicado durante a finalização do nosso trabalho. O grupo obteve um mutante *omlA* em *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, o primeiro para o gênero *Xanthomonas*, e também buscou determinar se Fur regulava a expressão de *omlA*. Assim como o mutante *omlA* em *P. aeruginosa*, este mutante *omlA* em *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentou sensibilidade a uma série de compostos não relacionados: antibióticos de diferentes grupos e SDS, além do composto oxidante menadiona. Análises de *primer extension* em *X. campestris* pv. *phaseoli* indicaram que região intergênica *omlA-fur* contém promotores sobrepostos nos quais os sítios de iniciação da transcrição separam-se por apenas 27 pb. A inativação ou superexpressão de *fur*, assim como a presença de quelantes de ferro, não afetou a transcrição de *omlA*, como indicaram os níveis de RNAm de *omlA* medidos num mutante *fur*, no tipo selvagem contendo

um plasmídeo superexpressando *fur* e no tipo selvagem na presença de quelantes de ferro (a obtenção do mutante *fur* é relatada, mas a descrição do mesmo não está publicada até o presente momento).

Um mutante *smpA* – homólogo *omlA* em *E. coli* – foi também recentemente relatado (Sklar *et al.*, 2007). Este mutante não afetou a viabilidade da bactéria no meio de cultura mas apresentou, da mesma forma, deficiências associadas ao comprometimento da integridade da membrana. Em *E. coli*, no entanto, a co-localização *omlA-fur* não se observa no genoma, assim, o aspecto de associação funcional ou regulatória entre estes genes não foi avaliado. Sklar e colaboradores (2007), por outro lado, identificaram a proteína SmpA como um novo membro do complexo protéico YaeT, previamente caracterizado pela presença da proteína integral de membrana externa YaeT e associação das lipoproteínas YfgL, YfiO e NlpB (Wu *et al.*, 2005). O complexo, fundamental para sua sobrevivência bacteriana, está envolvido na inserção de proteínas do tipo barril- $\beta$  na membrana externa bacteriana (Wu *et al.*, 2005). O fragmento periplasmático do componente principal do complexo, a proteína YaeT, ela própria uma proteína integral de membrana do tipo barril- $\beta$ , teve recentemente sua estrutura cristalográfica elucidada (Kim *et al.*, 2007). A estrutura da porção periplasmática sugere que o conjunto de domínios associados a transporte de polipeptídios (*POTRA domains*) de que é constituído o fragmento, se dispõe de forma a proporcionar uma arquitetura para a organização das lipoproteínas componentes da maquinaria (Kim *et al.*, 2007). A proteína SmpA, homóloga à OmlA, apesar de não ser essencial, desempenha importante papel na estabilidade e função do complexo através da interação com outras proteínas do complexo – YfiO e NlpB. Apenas as proteínas YaeT e YfgL são amplamente observadas nas bactérias, e em *Xac* não há um homólogo da proteína NlpB, um dos membros do complexo que em *E. coli* se liga diretamente justamente à SmpA. Mas é importante ressaltar que mutantes duplos em *smpA* e qualquer outro membro do complexo tornam a bactéria inviável (Sklar *et al.*, 2007).

A hipersensibilidade dos mutantes *omlA* a antibióticos com diferentes mecanismos de ação, SDS (Ochsner *et al.*, 1999; Fuangthong *et al.*, 2007) e menadiona (Fuangthong *et al.*, 2007) está de acordo com esta recente descoberta e deve estar associada a um papel geral da proteína OmlA na manutenção da integridade da membrana externa.

Apesar do sucesso na realização dos *knockouts*, infelizmente Fuangthong *et al.* (2007), assim como Ochsner *et al.* (1999), não avaliam a performance dos mutantes *omlA* durante o

processo de estabelecimento dos patógenos nos seus hospedeiros. Sabe-se, inclusive, que os homólogos *OmlA* de bactérias que infectam animais estão associados ao processo de infecção, sendo frequentes alvos para o desenho de vacinas (Alcon *et al.*, 2003; Bunka *et al.*, 1995 Gerlach *et al.*, 1993). Além disso, a regulação positiva da *OmlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sob a indução de fluido da lavagem bronquealveolar fornece indícios do envolvimento da proteína na virulência (Jacobsen *et al.*, 2005).

Apesar da indisponibilidade de mutantes, os nossos resultados, por sua vez, indicam que em *Xac* tanto *fur* quanto *omlA* exercem um importante papel durante o desenvolvimento da bactéria na planta e que durante a infecção eles são co-regulados por um sistema independente de ferro. A sua importância para a sobrevivência do patógeno na planta deve estar associada ao envolvimento deste genes numa rede mais ampla de respostas ligadas ao estresse que, particularmente, são ativadas durante o processo de infecção.

### **Ensaio com Gene repórter de *PomlA-fur* ou Pbidirecional**

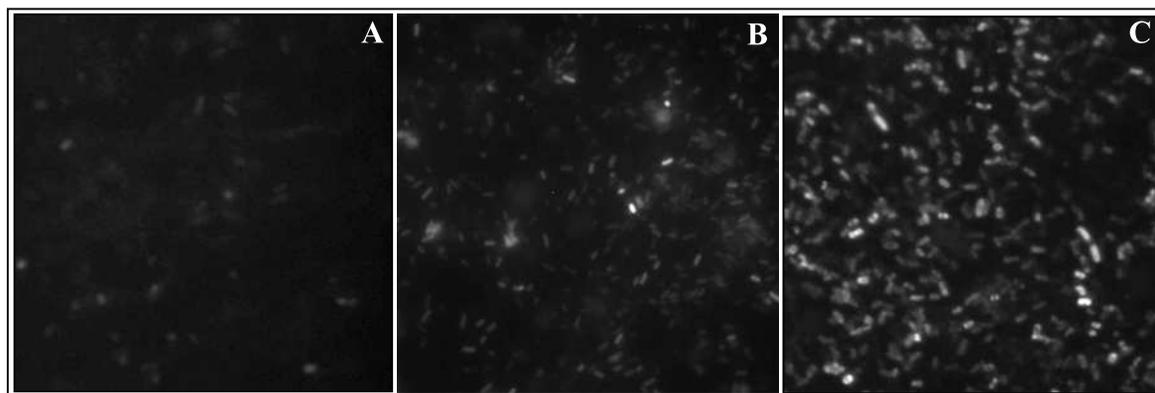
Os promotores *omlA* (*PomlA*) e *fur* (*Pfur*) ativados durante a infecção de *Xac* em citrus continham, além da porção intergênica *omlA/fur*, sequências codantes dos genes *fur* e *omlA*, respectivamente. Com o intuito de verificar a participação das regiões flanqueadoras que correspondem às regiões internas das *orfs* na regulação do locus *omlA-fur*, assim como a atividade deste promotor mínimo, utilizamos um repórter bidirecional contendo a curta sequência intergênica fusionada à EGFP na direção da transcrição de *omlA*, e à DsRed, na direção de *fur*.

Em relação à atividade do promotor mínimo na direção *omlA*, medida pela EGFP, as células do meio de cultura apresentaram um padrão de fluorescência semelhante ao já observado no caso do repórter com o promotor estendido. No entanto, ao contrário do esperado, não foi observada nenhuma fluorescência no comprimento de onda específico da proteína DsRed, sendo que já havia sido constatada uma maior atividade do *Pfur* em relação ao *PomlA*, mesmo em condições de crescimento em meio de cultura. O repórter bidirecional recuperado de folhas de citrus infectadas também não apresentou fluorescência da DsRed,

enquanto que maior nível de expressão da EGFP em relação ao controle foi observado, como esperado (Figura 7 A e B).

Pode-se concluir que a proteína DsRed obtida do vetor pDsRed1-C1 (*Clontech*) não é um repórter adequado para *Xac* e provavelmente para outras bactérias. A sua fluorescência não deve ter sido detectada muito provavelmente porque a proteína não foi enovelada ou expressa adequadamente na célula bacteriana. De fato, não se atentou para o fato da DsRed proveniente do vetor em questão tratar-se de uma proteína tetramérica, adequada para expressão em células de mamíferos.

No entanto, notou-se que os níveis de fluorescência da EGFP no caso do repórter com promotor mínimo foram inferiores se comparados ao repórter com *PomlA* estendido (Figura 7 B e C). É provável que o promotor mínimo seja suficiente para a atividade do *locus*, mas sequências internas às *orfs*, sobretudo no caso do *PomlA*, devem exercer um papel na ativação deste promotor.



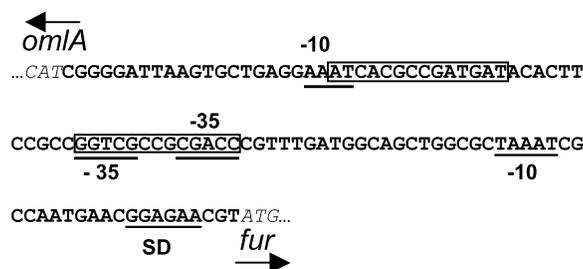
**Figura 7.** Microscopia de fluorescência de células de *Xac* contendo o repórter pKX33-EGFP-PomlA-*fur*-DsRed e cultivadas em meio de cultura (A) ou recuperadas de folhas de citrus (B), e células de *Xac* contendo o repórter pKX33-PomlA-EGFP recuperadas de folhas de citrus.

Consistentemente, em *P. aeruginosa* Ochsner *et al.* (1999) obtiveram resultados semelhantes através do repórter *lacZ* sob controle da sequência intergênica *omlA/fur* fusionada a porções de diferentes tamanhos da *orf fur* adjacente. A expressão ótima do gene *omlA* em *P. aeruginosa* requer a presença de cerca de 250 pb *upstream* ao elemento  $-35$  mapeado neste promotor. Com isso, os autores sugerem mais uma vez a existência de domínios de ativação

*cis* para a expressão de *omla*, e também de *fur*, que estão localizados dentro das sequências codantes do respectivo gene adjacente.

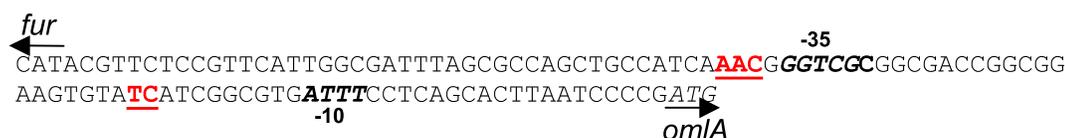
Os genes *fepA* e *fes* de *E. coli*, envolvidos na captação de sideróforo, possuem promotores sobrepostos de forma similar a *omla-fur* e são regulados por Fur (Hunt *et al.*, 1994). Curiosamente, apesar do nível de atividade entre os promotores ser diferente, o estudo da sua regulação sugere que a distribuição espacial dos elementos regulatórios dentro da curta sequência intergênica permite a ligação simultânea da RNA polimerase a ambos promotores e promove a sua regulação coordenada (Escolar *et al.*, 1998). Assim, a atividade destes promotores é totalmente independente, mas a mudança entre ativação e repressão da transcrição ocorre em ambos os genes coordenadamente.

A análise da região intergênica XAC1516-1517 mostra com maior detalhe a sobreposição dos promotores *omla* e *fur* em *Xac* (figura 8). Nesta porção foi possível identificar a presença de dois palíndromes. Curiosamente, um deles compreende os prováveis elementos – 35 de ambos os promotores, mas as buscas em bancos de dados não o assemelham a nenhuma sequência regulatória conhecida. O outro, próximo à provável região – 10 do promotor *omla*, se assemelha à sequência de ligação do repressor  $\omega$  que controla o número de cópias de uma família de plasmídeos estavelmente mantidos em bactérias Gram-positivas (Weihofen *et al.*, 2006), o que parece funcionalmente bastante distante. No entanto, a ligação de um repressor nesta sequência poderia explicar a menor atividade do *Pomla* em relação ao *Pfur*, mas contraria a hipótese da regulação positiva através de ativadores.

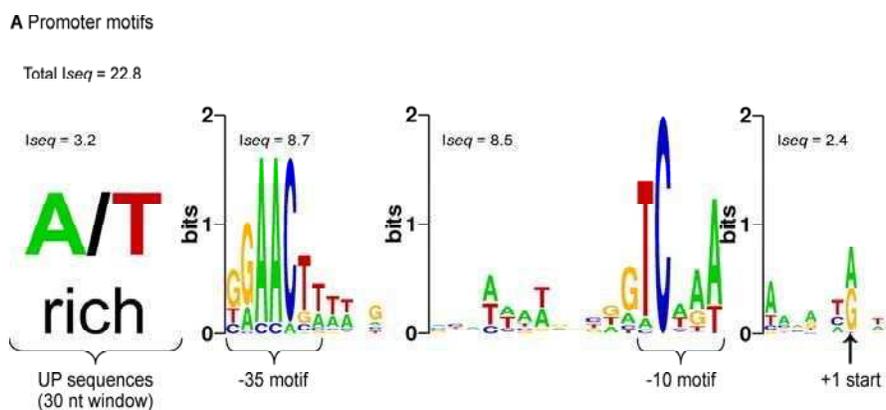


**Figura 8.** Sequência de nucleotídeos do promotor bidirecional *omla-fur* com as prováveis regiões -10, -35 (sublinhadas) e Shine Dalgarno (SD). Os ATGs iniciais estão em itálico e a direção da transcrição de ambos os genes está indicada por setas. Nas caixas estão indicados os palíndromes identificados.

Curiosamente, como pode-se observar melhor na figura 9, que dispõe o *Pomla* na direção 5'–3', nos prováveis elementos –35 e –10 se encontram sequências semelhantes ao modelo de promotor ativado pelo fator sigma E ( $\sigma^E$ ) validado para *E. coli* (Rhodius *et al.*, 2006). O modelo, extraído de Rhodius *et al.* (2006), pode ser visualizado na figura 10. Apesar de não apresentar os motivos na sua sequência completa, nos prováveis elementos do *PomLA* de *Xac* se observam os nucleotídeos de maior consenso do modelo.



**Figura 9.** Sequência de nucleotídeos do promotor/sequência intergênica *omla-fur* na direção de transcrição de *omla*. Estão identificados os ATGs de cada gene na sua direção de transcrição, os elementos –35 e –10 hipotéticos em itálico e negrito, e em vermelho e sublinhado as sequências semelhantes ao modelo de promotor reconhecido pelo fator sigmaE em *E. coli* (Rhodius *et al.*, 2006), que pode ser observado na figura 10.



**Figura 10.** Logotipo do modelo de promotor reconhecido pelo fator sigmaE em *E. coli*, com os motivos característicos identificados (extraído de Rhodius *et al.*, 2006).

O fator  $\sigma^E$ , juntamente com outras vias de transdução de sinal, controla a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse do envelope celular (Dartigalongue *et al.*, 2001). Sob condições de alterações na estabilidade estrutural de proteínas de membrana, o fator  $\sigma^E$  é liberado no citoplasma onde interage com a RNA polimerase, direcionando a expressão do

*regulon*  $\sigma^E$  (Dartigalongue *et al.*, 2001). A indução de fatores sigma alternativos é uma importante estratégia em bactérias para a sobrevivência diante do estresse ambiental. Estima-se, inclusive, que haja uma correlação entre o número de fatores sigma alternativos numa bactéria e a complexidade do seu *habitat*. Assim em *Mycoplasma* sp, patógenos intracelulares obrigatório, não há fatores sigma alternativos, em *E. coli*, que habita um ambiente relativamente constante, mas também sobrevive *in vitro*, há 6, e *Streptomyces coelicolor*, que habita o solo, ambiente hostil e sujeitos a constantes mudanças, possui 62 fatores sigma alternativos (Rhodius *et al.*, 2006).

Curiosamente, todos os membros do complexo YaeT de *E. coli*, exceto o gene *smpA*, homólogo de *omlA*, foram identificados através do perfil de transcrição da bactérias superexpressando o fator  $\sigma^E$  (Rhodius *et al.*, 2006). De acordo com Rhodius e colaboradores, *smpA* está dentre aqueles genes que apresentam o promotor modelo, mas não são significativamente regulados por  $\sigma^E$ . Mas em estudos prévios, *smpA* já foi identificado como membro do *regulon*  $\sigma^E$  (Rezuchova *et al.*, 2003).

A participação de *omlA* e *smpA* no *regulon*  $\sigma^E$  estaria de acordo com os fenótipos apresentados por mutantes nestes genes, uma vez que os principais membros do *regulon*  $\sigma^E$  identificado em *E. coli* estão envolvidos nas vias de formação e inserção de proteínas de membrana externa na bicamada (Rhodius *et al.*, 2006). Comparando o modelo proposto em outros genomas organismos, é muito interessante ressaltar que este estudo também conclui que a maioria dos genes potencialmente regulados por  $\sigma^E$  entre diferentes bactérias compartilham um tema comum: a adaptação do organismo às condições encontradas quando a bactéria interage com seu hospedeiro.

### **Ensaio de Mono Híbrido**

O sistema de mono-híbrido é um ensaio genético *in vivo* que fornece as ferramentas necessárias para o isolamento de novos genes que codificam proteínas capazes de ligar a uma determinada seqüência alvo no DNA. Esse sistema se baseia na descoberta de que diversos ativadores transcricionais em eucariotos são formados por domínios de ligação ao DNA e domínios de ativação. O sistema mono-híbrido se assemelha ao sistema de duplo híbrido que

identifica proteínas que interagem entre si, no entanto, ele se baseia numa interação do tipo DNA-proteína para ativar o gene repórter. Dessa forma, qualquer seqüência regulatória do DNA pode ser utilizada como isca para a detecção de proteínas que possuam domínios de ligação que reconheçam essas seqüências.

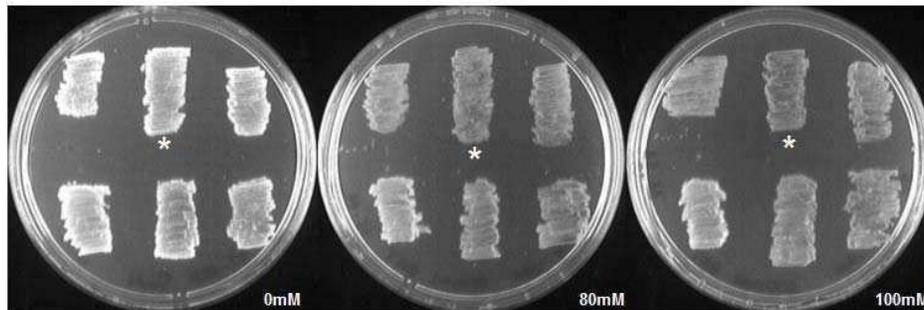
Assim, este ensaio pode fornecer informações valiosas sobre potenciais fatores regulatórios de seqüências de DNA específicas, sobretudo daquelas sobre as quais se dispõe de pouca informação funcional, como é o caso do promotor *omlA*. As análises com os genes repórteres sugeriram que este promotor poderia ser regulado por ativadores transcricionais ou poderia ser alvo de fatores sigma alternativos associados a respostas a condições de estresse.

Esta técnica, no entanto, implica num rigoroso controle, através do inibidor 3-AT, da expressão basal do gene HIS3 integrado ao seu promotor mínimo e à seqüência de DNA isca, para evitar que falsos positivos mascarem os resultados.

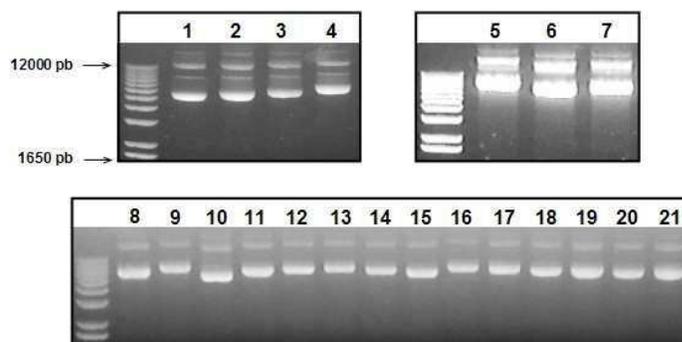
No ensaio realizado, após obtermos as linhagens recombinantes de YM4271 contendo o vetor pHISi-*PomlA* integrado ao genoma, os clones selecionados foram submetidos ao *screening* com 3-AT para se definir a concentração ideal do inibidor que barrasse a expressão basal do gene HIS3. Os resultados mostraram que mesmo em altas concentrações do inibidor 3-AT, ao contrário do esperado, o HIS3 permanece ativo. A estringência do *screening* foi aumentada e os clones selecionados deste foram submetidos a crescimento na presença de até 100 mM de 3-AT, quantidades superiores às recomendadas pelo fabricante do *kit* (Figura 11).

Ainda assim, decidiu-se selecionar um clone para submeter à transformação com a biblioteca genômica de *Xac*. A linhagem recombinante YM4271-pHISi-*PomlA* selecionada e competente foi transformada com a biblioteca e a reação gerou muito mais clones do que o esperado, caracterizados, na sua maioria, por colônias de formato pequeno que foram surgir cerca de 4 dias após o plaqueamento. Paralelamente, a reação controle plaqueada em meio sem 3-AT gerou menos clones do que o esperado a partir do protocolo estabelecido.

Os resultados pareceram indicar que as colônias recombinantes selecionadas com 3-AT se tratavam de falsos positivos. Ainda assim, decidiu-se selecionar as colônias mais proeminentes e que surgiram primeiro para dar prosseguimento ao experimento. O DNA total extraído de parte dos clones selecionados foi diretamente utilizado na transformação de células de *E. coli*, a partir das quais, então, foi possível recuperar o vetor pOAD de 21 dos 40 clones (figura 12).



**Figura 11.** *Screening* com 3-AT dos clones recombinantes YM 4271-pHISi-Pom1A mostrando placas com meio SD-his-ura e quantidades crescentes de 3-AT, asteriscos indicam clone selecionado.



**Figura 12:** Gel de agarose 0.8 % com padrão eletroforético de plasmídios pOAD contendo biblioteca de *Xac* oriundos de YM4271-pHISi-Pom1A

Após a análise de todos os clones seqüenciados, não conseguimos nenhuma *orf* que codificasse uma proteína regulatória potencial para o locus *om1A-fur*. Na realidade, não foi encontrada nenhuma *orf* completa e no mesmo *frame* de leitura do vetor pOAD, comprovando que os clones selecionados tratavam-se de falsos positivos.

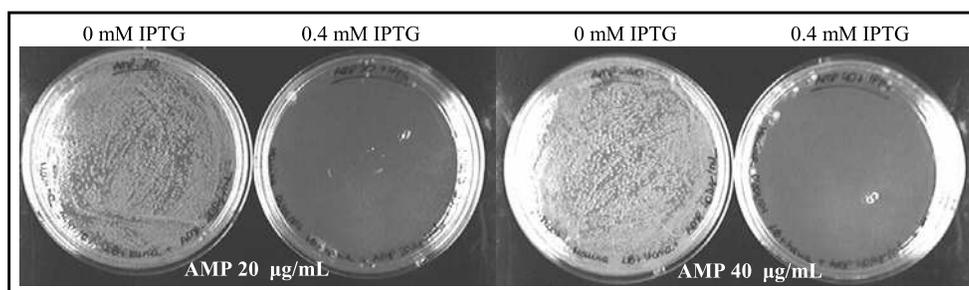
O sistema mono-híbrido empregado sob controle do *Pom1A* apresentou problemas pois esta seqüência de DNA transativou fortemente o gene repórter HIS3, o qual não foi satisfatoriamente inibido com o uso do 3-AT. Aliado a isso, a baixa eficiência de transformação tornou remota as chances de se isolar um possível regulador da seqüência alvo.

## Análise de Inibição da $\beta$ -lactamase pela Proteína Omla

A estrutura obtida por RMN para a proteína OmlA revelou características muito interessantes (artigo II, capítulo I). Dentre elas, o *core* enovelado da OmlA se mostrou semelhante aos domínios da proteína *beta lactamase inhibitory protein* (BLIP) que se liga especificamente à proteína  $\beta$ -lactamase, responsável pela resistência a antibióticos betalactâmicos. A princípio, a revelação mostrou-se paradoxal, uma vez que a bactéria *Xac* é resistente a ampicilina e outros antibióticos betalactâmicos. Por outro lado, a BLIP complexada a TEM-1  $\beta$ -lactamase constitui um dos modelos mais estudados de interação proteína-proteína (Reichman *et al.*, 2005). A estrutura em solução da proteína OmlA, assim, sugere que a molécula interaja com outra(s) proteína(s), não atuando como inibidor de  $\beta$ -lactamase.

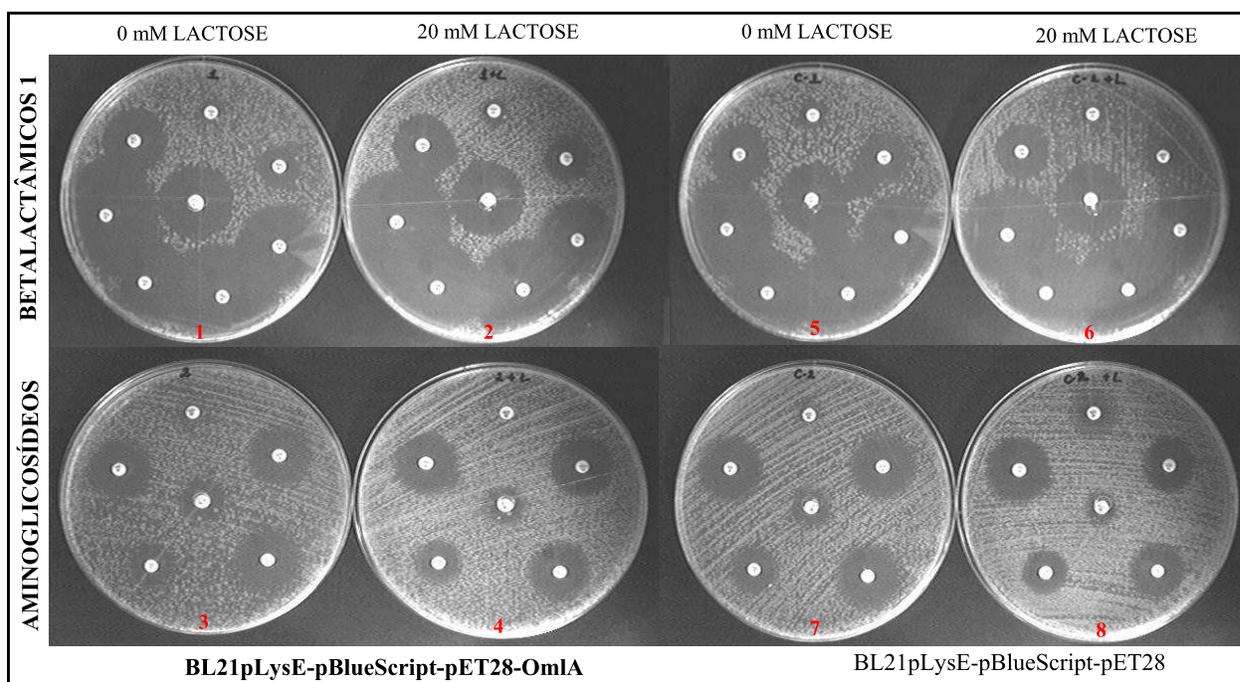
Como ensaio preliminar *in vivo* para verificar se a proteína OmlA de *Xac* apresentava uma possível atividade inibitória de  $\beta$ -lactamase, células expressando beta-lactamase e super-expressando OmlA foram produzidas. De acordo com nossa hipótese, esperava-se que o efeito da super-expressão da OmlA não afetasse a atividade da  $\beta$ -lactamase e a resistência à ampicilina.

A figura 13 mostra células de BL21pLysE-pBlueScript-pET28-OmlA crescidas sob diferentes concentrações de ampicilina, na presença e na ausência de IPTG. A figura indica que, a princípio, a expressão de OmlA aumenta a sensibilidade à ampicilina de células que expressam também a  $\beta$ -lactamase. Aparentemente, o dado contrariou a nossa hipótese e sugeriu que a superexpressão de OmlA afetou a atividade da  $\beta$ -lactamase.

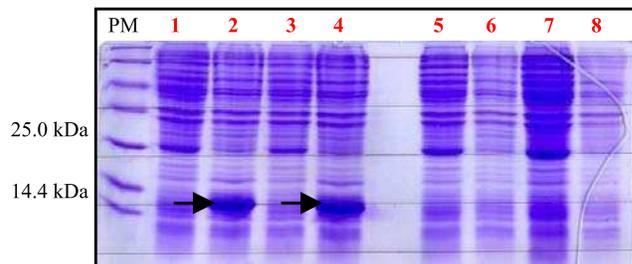


**Figura 13:** Células BL21pLysE-pBlueScript-pET28-OmlA crescidas na presença de 20 e 40  $\mu$ g/mL de ampicilina com ou sem 0.4 mM de IPTG

Utilizando discos de antibióticos, o clone foi então crescido na presença de outros compostos não  $\beta$ -lactâmicos e o mesmo efeito de maior susceptibilidade quando a OmlA é super-expressa sob indução de IPTG foi observado (não mostrado). A partir disso, deduziu-se que as concentrações de IPTG em meio sólido é que deveriam estar afetando o crescimento inicial da cultura. O mesmo experimento foi realizado na presença de 20 mM de lactose como indutor da expressão de OmlA, utilizando como controle uma cepa BL21pLysE-pBlueScript-pET28. A figura 14 mostra os resultados deste experimento e comprova que a expressão da OmlA não exerce efeito na atividade da beta-lactamase, uma vez que os halos de susceptibilidade são equivalentes, independentemente da cepa expressar ou não a OmlA e mesmo no caso de antibióticos não beta-lactâmicos. Além disso, através do gel de SDS-PAGE (figura 15) comprovou-se que a OmlA de fato estava sendo super-expressa na presença de lactose, mas realmente isso não afetou a susceptibilidade aos antibióticos.



**Figura 14.** *E. coli* co-expressando OmlA e beta-lactamase na presença de antibióticos betalactâmicos e aminoglisídicos: células super-expressando OmlA (pET28-OmlA) ou não (pET28) sob indução de 20 mM de lactose crescidas em meio LB a 37°C contendo discos de diferentes antibióticos; os algarismos referem-se às canaletas do gel da figura 15.



**Figura 15.** Gel SDS-PAGE 13 % com perfil de expressão protéica de células referentes ao experimento de co-expressão OmlA e  $\beta$ -lactamase. Os números 1 a 8 se referem às células das diferentes placas, identificadas na figura 14. As setas indicam a banda referente à proteína OmlA.

Os experimentos realizados e os seus resultados mostraram que a proteína OmlA não possui atividade de inibição da  $\beta$ -lactamase. Assim, propomos que a semelhança estrutural entre OmlA e BLIP está relacionada à presença de um motivo estrutural que favorece a interação entre proteínas.

BLIP é uma proteína exocelular de 17.5 kDa produzida pelo organismo *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria Gram-positiva filamentosa de solo, conhecida por sua capacidade de produzir metabólitos com propriedades antibióticas e inibitórias de  $\beta$ -lactamases (Wendy *et al.*, 2001). Sabe-se que a proteína BLIP inibe a enzima  $\beta$ -lactamase TEM de forma não covalente (Doram *et al.*, 1990), mas outras funções relacionadas à BLIP são ignoradas. Uma vez que as  $\beta$ -lactamases são naturalmente encontradas no periplasma das bactérias Gram-negativas, elas são inacessíveis a proteínas exocelulares e, por isso, não podem ser os alvos naturais das BLIPs. Por outro lado, o fato das BLIPs formarem complexos estáveis com  $\beta$ -lactamases implica que os seus alvos ou parceiros naturais são estruturalmente semelhantes a estas enzimas, como sugerem Lim *et al.* (2001).

Curiosamente, os estudos com mutantes *blip* relacionam estas proteínas com elementos da parede celular. Os fenótipos indicam um papel destas proteínas no processo de esporulação, podendo funcionar como componentes de uma via de sinalização para iniciar o processo de esporulação (Kang *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2001). A similaridade entre as estruturas 3D da beta-lactamase TEM-1 e das proteínas ligadoras de penicilina (*penicillin binding protein* - PBP), é apontada como indício de que as PBPs poderiam ser um alvo da proteína BLIP, uma vez que as PBPs regulam a síntese da parede celular e portanto sua inibição poderia ser necessária durante a esporulação (Lim *et al.*, 2001). No entanto, a interação BLIP-PBP nunca

foi demonstrada, mas estas informações reforçam a idéia de que a proteína OmlA esteja envolvida em interações com outras proteínas.

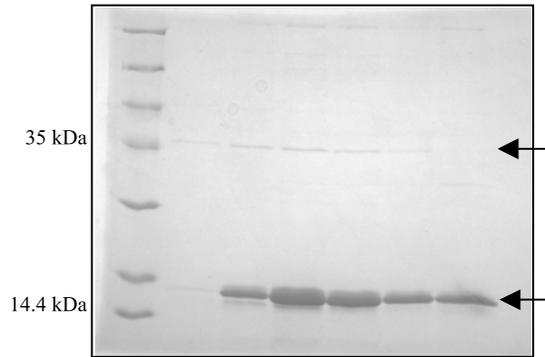
### **Pull Down e Coimunoprecipitação**

A hipótese sugerida pela semelhança estrutural entre as proteínas BLIP de OmlA, que se demonstrou através da determinação da sua estrutura, levou à busca por possíveis parceiros de interação com OmlA no extrato protéico de *Xac*. Para tanto, realizamos experimentos de *pulldown* e coimunoprecipitação. Estas metodologias poderiam, com uma relativa eficiência, fornecer resultados rapidamente, mas nenhuma proteína foi identificada através das técnicas empregadas.

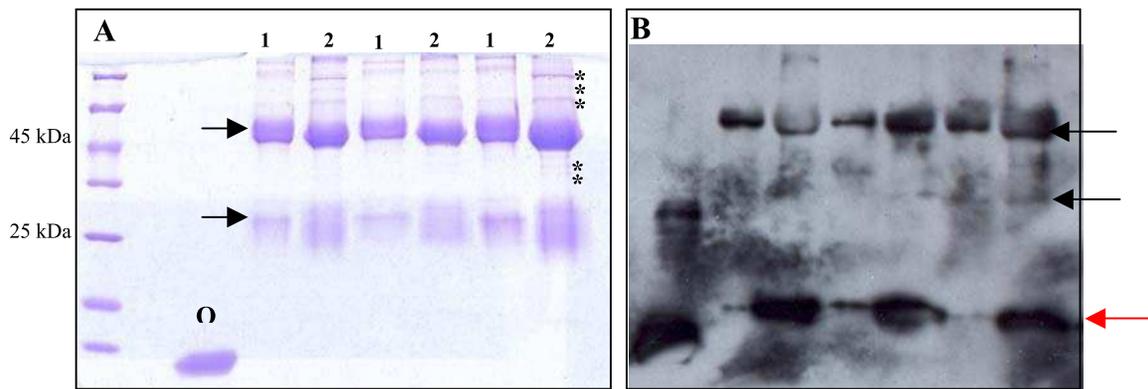
Em ambos ensaios foi possível isolar candidatos a partir dos géis de acrilamida que separaram as proteínas do extrato total de *Xac* recuperadas pelas técnicas (figuras 16 e 17). No ensaio de *pulldown*, destacou-se uma banda de cerca de 35 kDa que co-purificou com a proteína OmlA, e foi submetida à análise por espectrometria de massa, sendo identificada como uma frutose bifosfato aldolase. Trata-se de uma enzima da via glicolítica cujo sítio ativo é estabilizado por um íon  $Zn^{+2}$  (Hall *et al.*, 1999) e portanto, consideramos como um falso positivo, devido à sua afinidade a cátion divalentes e, provavelmente, ao  $Ni^{+2}$  da resina. Uma série de outras bandas de baixa intensidade foram coletadas, mas após o tratamento para identificação por espectrometria de massas, a análise não reconheceu nenhuma provável proteína de *Xac* com *score* confiável.

Através da coimunoprecipitação foi possível isolar a proteína OmlA a partir do extrato total da bactéria, como foi comprovado pelo *western blot* (figura 17A). No entanto, as bandas isoladas provenientes deste ensaio também não foram identificadas.

Consideramos que a impossibilidade de identificação das bandas está associada ao fato de ter sido utilizado o extrato protéico total de *Xac* cultivada em meio de cultura. Sabendo-se que a proteína OmlA de *Xac* é pouco expressa nestas condições, é provável que seus parceiros também sejam, tornando remota a chance de recuperá-los partir das técnicas utilizadas. Não excluimos a possibilidade de que o processo de tratamento das bandas para a espectrometria de massa tenha apresentado falhas e inviabilizado a identificação das bandas, pois a técnica é extremamente sensível.



**Figura 16.** Gel de SDS-PAGE das frações referentes à co-eluição da proteína OmlA (seta próxima a 14.4 kDa) com proteínas do extrato total de Xac em ensaio de *pull down*. Setas próximas a 35 kDa indica proteína posteriormente identificada como a frutose bifosfato aldolase.



**Figura 17:** A) Gel de SDS-PAGE 11 % das diferentes reações de coimunoprecipitação utilizando o soro anti-OmlA (1) para imunoprecipitar e o seu soro pré-imune (2) como controle. Na primeira canaleta (O) refere-se à proteína OmlA purificada. As setas próximas a 45 kDa e 25 kDa referem-se às cadeias pesada e leve da imunoglobulina do anticorpo, respectivamente. Os asteriscos (\*) indicam as bandas excisadas para tentativa de identificação por espectrometria de massas. B) *Western Blot* contra proteína OmlA de duplicata do gel descrito em A. A seta vermelha na porção inferior corresponde à proteína OmlA e as setas pretas na porção superior às cadeias da imunoglobulina.

A abordagem típica para identificação de interações proteína-proteína baseia-se no sistema de duplo híbrido ou *phage display*, técnicas mais sensíveis porém mais dispendiosas (Phizicky & Fields, 1995). A utilização do *pull down* e da IP em geral se aplica à confirmação das interações previamente observadas. No entanto, todas estas técnicas são mais adequadas às interações proteínas-proteína fortes (com constantes de dissociação baixas), enquanto que para interações proteína-proteína fracas (com constante de dissociação mais altas), as dificuldades técnicas para a caracterização das interações é muito maior (Vaynberg & Qin, 2006).

Interações proteína-proteína fracas, que já foram identificadas por ensaios especiais de duplo-híbrido de alta sensibilidade, podem não ser confirmadas por *pulldown* e IP, como já foi relatado (Tu *et al.*, 1998; Velyvis *et al.*, 2003). Por isso, este tipo de interação permanece pouco caracterizado, apesar do fato de ser considerado importante em processos celulares fundamentais, entre eles, a formação transitória de complexos protéicos.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A função da proteína OmlA permanece desconhecida, mas a resolução da sua estrutura tridimensional e a análise das suas características dinâmicas, aliada aos dados da literatura recente referentes aos homólogos em *P. aeruginosa* (Ochsner et al, 1999), *X. campestris phaseoli* (Fuangthong et al., 2007) e *E. coli* (Sklar et al., 2007), sugere que ela esteja envolvida na manutenção da integridade do envelope celular através da interação com outras proteínas nesta organela.

Não foi possível determinar se existe uma associação funcional entre Fur e OmlA, porém, a co-ativação de *omlA* e *fur* durante a infecção de *Xac* em folhas de citrus indica que a co-localização entre estes genes, observada amplamente no genoma de diversos membros das  $\beta$  e  $\gamma$ -Proteobacteria, não deve ser fortuita. A co-regulação entre um fator de transcrição associado à resposta global ao estresse em várias bactérias e uma proteína possivelmente envolvida na integridade da superfície de interação patógeno-planta devem ser importantes para o estabelecimento do patógeno no hospedeiro.

Os aspectos regulatórios do locus *omlA-fur* ainda poderiam ser explorados através da detecção de possíveis fatores de ligação aos promotores por meio de técnicas de mono-híbrido. Estes ensaios, no entanto, deveriam se basear num outro tipo de repórter, que permitisse a detecção de repressores transcricionais. O gene de sensibilidade à sacarose, por exemplo seria um candidato adequado a um ensaio de mono-híbrido alternativo.

Além disso, ensaios de duplo híbrido utilizando a proteína OmlA como isca poderiam indicar possíveis parceiros de interação com esta proteína. Uma vez que se dispõe da atribuição dos deslocamentos químicos da proteína OmlA, a interação com o(s) candidato(s) poderia ser simples e elegantemente confirmada por RMN, fornecendo informações estruturais em alta resolução.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcón VL, Foldvari M, Snider M, Willson P, Gomis S, Hecker R, Babiuk LA, Baca-Estrada ME (2003). Induction of protective immunity in pigs after immunisation with CpG oligodeoxynucleotides formulated in a lipid-based delivery system (Biphaxix). *Vaccine* 21:1811-4

Althaus EW, Outten CE, Olson KE, Cao H, O'Halloran TV (1999). The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 38(20):6559-69.

Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27(2-3):215-37.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (1998). *Current Protocols in molecular Biology*. New York: John Wiley.

Atkins DT, Barber CF, Daniels MJ (1987). Transformation of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* with plasmid DNA. *J Gen Microbiol* 133:2727-2731

Atkinson RA & Saudek V (2002). The direct determination of protein structure by NMR without assignment. *FEBS Letters* 510:1-4.

Astua-Monge G, Freitas-Astua J, Bacocina G, Roncoletta J, Carvalho SA, Machado MA. (2005). Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 187(3):1201-5.

Babu MM, Sankaran K (2002). DOLOP – database of bacterial lipoproteins. *Bioinformatics* 18(4): 641-43.

Bagg A, Neilands JB (1987a). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochem. J* 246: 5471-5477

Bagg A, Neilands JB (1987b). Molecular mechanisms of regulation of siderophore mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* 51: 509-518

Barbosa RL, Benedetti CE (2007). BigR, a transcriptional repressor from plant-associated bacteria, regulates an operon implicated in biofilm growth. *J Bacteriol* 189(17):6185-94.

Bertrand KP, Postle K, Wray LV Jr, Reznikoff WS (1983). Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene* 23(2):149-56.

Bijlsma JJ, Waidner B, Vliet AH, Hughes NJ, Hag S, Bereswill S, Kelly DJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Kusters JG (2002). The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* 70: 606-611

Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol.* 6(1):56-63

Braun V, Hantke K, Koster W (1998). Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. *Met Ions Biol Syst* 35: 67-145.

Bunka S, Christensen C, Potter AA, Willson PJ, Gerlach GF (1995). Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun.* 63: 2797-800.

Cavanagh J., Fairbrother WJ, Palmer AG & Skelton NJ (1996). *Protein NMR Spectroscopy. Principles & Practice.* Academic Press, New York.

Calderwood SB, Mekalanos JJ (1988). Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J. Bacteriol* 170: 1015-1017.

Carson SD, Thomas CE, Elkins C (1996). Cloning and sequencing of a *Haemophilus ducreyi* fur homolog. *Gene* 176(1-2):125-9.

Cha JY, Lee JS, Oh JI, Choi JW, Baik HS (2008). Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. *Biochem Biophys Res Commun* 366(2):281-7

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.

Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. (1999). Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol* 7: 493-99.

Chong J, Pierrel MA, Atanassova R, Werck-Reichhart D, Fritig B, Saindrenan P (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol* 125(1):318-28.

Comes JE, Beelman RB (2002). Addition of fumaric acid and sodium benzoate as an alternative method to achieve a 5-log reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in apple cider. *J Food Prot.* 65(3):476-83.

Cordier F & Grzesiek S (1999). Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue <sup>3</sup>hJNC' Scalar Couplings. *J Am Chem Soc* 121: 1601–1602.

Cornilescu G, Hu J-S & Bax A (1999). Identification of the hydrogen bonding network in a protein by scalar couplings. *J Am Chem Soc* 121:2949-2950.

Crosa, JH (1997). Signal transduction and Transcriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria. *Microbiol and Mol Biol Rev* 61(3): 319-336

Da Silva, ACR et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.

Dartigalongue C., Missiakas D, & Raina S. (2001). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276(24): 20886-75.

de Feyter R & Gabriel DW (1991). Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv *malvaccarum*. *J Bacteriol* 173: 6421-6427.

De Lorenzo V, Wee S, Herrero M, Giovannini F, Neilands JB (1987). Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (Fur) repressor. *J Bacteriol* 169: 2624-2630.

Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V (2001). The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 42(5):1297-309

Delany I, Gunther S, Pacheco ABF, Ieva R, Alaimo C, Rappuoli R, Scarlato V (2002) Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol Microbiol* 46: 1107-1122.

Delany I, Ieva R, Alaimo C, Rappuoli R, Scarlato V (2003). The iron responsive regulator Fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 185(20) 6032-6041.

Delany I, Rappuoli R, Scarlato V (2004). Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 52(4):1081-90.

Delany I, Grifantini R, Bartolini E, Rappuoli R, Scarlato V (2006). Effect of *Neisseria meningitidis* fur mutations on global control of gene transcription. *J Bacteriol* 188(7):2483-92.

Dixon RA (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-7

Doran JL, Leskiw BK, Aippersbach S, Jensen SE (1990). Isolation and characterization of a beta-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J Bacteriol*. 172(9):4909-18.

Duan YP, Castaneda A, Zhao G, Erdos G and Gabriel DW (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant Micr Interac* 12(6): 556-560.

Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V (1998). Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* 283(3):537-47.

Escolar L, Pérez-Martín J & de Lorenzo V (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181: 6223-6229.

Evans JNS (1995). *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, United Kingdom.

Ferentz AE, Wagner G (2000). NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure. *Quart Rev Biophys* 33: 29-65.

Fernández C & Wüthrich K (2003). NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles. *FEBS Lett.* 555: 144-50.

Ferreira H, Barrientos FJA, Baldini RL, Rosato YB (1995). Electrotransformation of three *Xanthomonas campestris* pathovars. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 651-655.

Fittipaldi N, Broes A, Harel J, Kobisch M, Gottschalk M (2003). Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *J Clin Microbiol* 41(11):5085-93.

Fuangthong M, Helmann JD (2003). Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185: 6348-57.

Fuangthong M, Sallabhan R, Atichartpongkul S, Rangkadilok N, Sriprang R, Satayavivad J, Mongkolsuk S. (2007). The *omlA* gene is involved in multidrug resistance and its expression is inhibited by coumarins in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Arch Microbiol*: in press.

Gerlach GF, Anderson C, Klashinsky S, Rossi-Campos A, Potter AA, Willson PJ (1993). Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* 61: 565-72

Gerdes HH, Kaether C (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* 389(1):44-7.

Gietz RD, Woods RA (2002). Transformation of yeast by the *liac/ss* carrier dna/peg method. *Methods in Enzymology* 350: 87-96.

Guntert P (1998). Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q Rev Biophys* 31(2): 145-237.

Hall DR, Leonard GA, Reed CD, Watt CI, Berry A, Hunter WN (1999). The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J Mol Biol* 287(2):383-94.

Hall HK, Foster JW (1996). The role of *fur*: the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* 178: 5683-91

Hamza I, Hassett R, O'Brian MR (1999). Identification of a functional *fur* gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 181(18):5843-6.

Hantke K, Braun V (1973). Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem* 34(2):284-96.

Hasset DJ, Sokol PA, Howell ML, Ma JF, Schweizer HT, Ochsner U, Vasil ML (1996). Ferric uptake regulator Fur mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake altered aerobic growth and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* 177: 6881-6893.

Hunt MD, Pettis GS, McIntosh MA (1994). Promoter and operator determinants for fur-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. *J Bacteriol.* 176(13):3944-55.

Inouye S, Wang S, Sekizawa J, Halegoua S, Inouye M. (1997) Amino acid sequence for the peptide extension on the lipoprotein of *Escherichia coli* outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1004-08.

Ishima R, Torchia DA (2000). Protein Dynamics from NMR. *Nat. Struct. Biol.* 7:740-43.

Jacobsen ID, Meens J, Baltus N, Gerlach GF (2005). Differential expression of non-cytoplasmic *Actinobacillus pleuropneumoniae* proteins induced by addition of bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Microbiol* 109: 245-56.

Kang SG, Park HU, Lee HS, Kim HT, Lee KJ (2000) New beta-lactamase inhibitory protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and its roles on the morphological differentiation. *J Biol Chem* 275(22):16851-6.

Katzen F, Becker A, Ielmini MV, Oddo CG, Ielpi L (1999). New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv *campestris* gum operon. *Appl Environ Microbiol* 65: 278-82.

Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317(5840):961-4.

Kim S, Szyperski T (2003). Free Full Text GFT NMR, a new approach to rapidly obtain precise high-dimensional NMR spectral information. *J Am Chem Soc.* 25(5):1385-93.

Kitphati W, Ngok-Engam P, Suwanmaneerat S, Sukchawalit R, Mongkolsuk (2007). *Agrobacterium tumefaciens fur* has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence. *S Appl Environ Microbiol* 73(15):4760-8.

Lamzin VS, Perrakis A (2000). Current state of automated crystallographic data analysis. *Nat Struct Biol* 7 Suppl:978-81.

- Lee HM, Wang KC, Liu YL, Yew HY, Chen LY, Leu WM, Chen DC, Hu NT (2000). Association of the cytoplasmic membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the type II protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* 182(6): 1549-57.
- Lim D, Park HU, De Castro L, Kang SG, Lee HS, Jensen S, Lee KJ, Strynadka NC (2001). Crystal structure and kinetic analysis of beta-lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1 beta-lactamase. *Nat Struct Biol* 8(10):848-52.
- Litwin CM, Calderwood SB (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6: 137-149
- Loprasert S, Sallabhan R, Atichartpongkul S, Mongkolsuk S (1999). Characterization of a ferric uptake regulator (*fur*) gene from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* with unusual primary structure, genome organization and expression patterns. *Gene* 239: 251-258
- Lowe CA, Asghar AH, Shalom G, Shaw JG, Thomas MS (2001). The *Burkholderia cepacia* *fur* gene: co-localization with *omlA* and absence of regulation by iron. *Microbiol.* 147: 1303-1314
- Marques S, Gallegos MT, Manzanera M, Holtel A, Timmis KN, Ramos JL (1998). Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 180(11):2889-94.
- Masuda K, Matsuyama S, Tokuda H (2002) Elucidation of the function of lipoprotein-sorting signals that determine membrane localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11):7390-5.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16(4):404-5.
- Mey AR, Wyckoff EE, Kanukurthy V, Fisher CR, Payne SM. (2005). Iron and *fur* regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. *Infect Immun.* 73(12):8167-78
- Moseley HN & Montelione GT (1999). Automated analysis of NMR assignments and structures for proteins. *Curr Opin Struct Biol* 9(5):635-42.
- Mumenthaler C & Braun W (1995). Automated assignment of simulated and experimental NOESY spectra of proteins by feedback filtering and self-correcting distance geometry. *J Mol Biol* 254(3):465-80.
- Neilands JB. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270: 26723-26726
- Niederhoffer EC, Naranjo CM, Bradley KL, Fee JA (1990). Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* 172: 1930-1938.

Nilges M (1995). Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol* 245(5):645-60.

Ochsner UA, Vasil ML (1996). Gene repression by ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4409-4414

Ochsner UA, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML (1999) *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA. *J Bacteriol* 181: 1099-1109.

Palmer AG (2004). NMR characterization of the Dynamics of Biomacromolecules. *Chem Rev* 104:3623-3640.

Pericone CD, Park S, Imlay JA, Weiser JN (2003). Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J Bacteriol* 185(23):6815-25.

Phizicky EM, Fields S (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59(1):94-123.

Prince RW, Cox CD, Vasil ML (1993). Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene. *J Bacteriol* 175(9):2589-98.

Ratledge C, Dover LG (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 54: 881-941.

Réglier-Poupet H, Frehel C, Dubail I., Beretti JL, Berche P, Charbit A, Raynaud C (2003). Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem* 278(49): 49469-77.

Reichmann D, Rahat O, Albeck S, Meged R, Dym O, Schreiber G (2005). The modular architecture of protein-protein binding interfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1):57-62

Reva ON, Weinel C, Weinel M, Bohm K, Stjepandic D, Hoheisel JD , Tummler B (2006). Functional Genomics of Stress Response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* 188 (11): 4079-4092.

Rezuchova B, Miticka H., Homerova D., Roberts M. & Kormanec J. (2003). New members of the *Escherichia coli* sigmaE regulon identified by a two-plasmid system

Rhodiou VA, Suh WC, Nonaka G, West J, Gross CA (2006). Conserved and variable functions of the sigma e stress response in related genomes. *Plos Biology* 4(1):e2: 43-59.

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* 203: 173-9.

Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 4(1):57-66.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning Laboratory Manual* Ed. 3. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sander P, Rezwani M, Walker B, Rampini SK, Kroppenstedt RM, Ehlers S, Keller C, Keeble JR, Hagemeyer M, Colston MJ, Springer B, Boettger EC (2004). Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*

Sankaran K, Wu HC (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 269: 19701-706.

Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW (1996). Discovering high affinity ligands for proteins: SAR and NMR. *Science* 274: 1531-34.

Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ (2007). Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(15):6400-5.

Subramoni S, Sonti RV (2005). Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* fur mutant in rice leaves is rescued by ascorbic acid supplementation. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 644-651.

Sutcliffe IC, Russell RR (1995). Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 177(5):1123-8.

Swarup S, De Feyter R, Brlansky RH, Gabriel DW (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. *Phytopathology* 81: 802-809.

Terada M, Kuroda T, Matsuyama SI, Tokuda H (2001). Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276(50):47690-4.

Thomas CE, Sparling PF (1996). Isolation and analysis of a fur mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 178(14):4224-32.

Tjandra N & Bax A (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* 278(5340):1111-4. Erratum in: *Science* 278(5344):1697

Todd JD, Wexler M, Sawers G, Yeoman KH, Poole PS, Johnston AW (2002). RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 148(Pt 12):4059-71.

Tokuda H, Matsuyama S. (2004). Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 1693(1):5-13.

Touati D (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 373:1-6

Tsai RT, Leu WM, Chen LY, Hu NT (2002). A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Biochem J* 367(Pt 3):865-71.

Tu Y, Li F, Wu C (1998). Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell* 9(12):3367-82.

Vaynberg J, Qin J (2006). Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol* 24(1):22-7.

Velyvis A, Vaynberg J, Yang Y, Vinogradova O, Zhang Y, Wu C, Qin J (2003). Structural and functional insights into PINCH LIM4 domain-mediated integrin signaling. *Nat Struct Biol.* 10(7):558-64.

Van Vliet AH, Rock JD, Madeleine LN, Ketley JM (2000). The iron-responsive regulator Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. *FEMS Microbiol Lett* 188(2):115-8.

Watnick PI, Eto T, Takahashi H, Calderwood SB. (1997). Purification of *Vibrio cholerae* fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol.* 179(1):243-7.

Weihofen WA, Cicek A, Pratto F, Alonso JC, Saenger W (2006). Structures of omega repressors bound to direct and inverted DNA repeats explain modulation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 34(5):1450-8.

Wendy T, Ashish SP, Susan EJ (2001). Construction and analysis of  $\beta$ -lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 147, 325-335.

Wexler M, Todd JD, Kolade O, Bellini D, Hemmings AM, Sawers G, Johnston AW (2003). Fur is not the global regulator of iron uptake genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 149(Pt 5):1357-65.

White TJ, Gonzales, CF (1991). Application of electroporation for efficient transformation of *Xanthomonas campestris* pv *oryzae*. *Phytopathology* 81: 521-524.

Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D. (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 121(2):235-45.

Wuthrich K (1986). NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Yamaguchi K, Yu F, Inouye M (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in E. coli. *Cell* 53(3):423-32.

Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G (1999). OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol.* 181(15):4639-43.

Zgurskaya HI, Nikaido H (2000). Multidrug resistance mechanism: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* 37: 219-25.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: **CEB01/01**

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

Título do projeto:

**Resolução da estrutura tridimensional da proteína OmlA de *Xanthomonas citri* por ressonância magnética nuclear**

Pesquisador responsável: **Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti**

Experimentador: **Marina Marques Vanini**

Nível do treinamento do experimentador:

- Iniciação científica
- mestrado
- doutorado
- doutorado direto
- pós-doutorado
- nível técnico
- outro, especifique: \_\_\_\_\_

**Resumo do projeto:**

O presente projeto visa a resolução da estrutura tridimensional da proteína OmlA (outer membrane lipoprotein) da bactéria *Xanthomonas citri*, responsável pelo cancro cítrico. A proteína OmlA será clonada e expressa em larga escala em bactérias *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade e troca iônica. Proteínas recombinantes também serão marcadas com isótopos <sup>15</sup>N e <sup>13</sup>C para a realização dos experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN). Proteínas marcadas e purificadas serão previamente analisadas por difração circular e RMN monodimensional para ajustes das condições experimentais de coleta de dados por RMN. Dados de RMN bi tri-dimensionais serão processados e após a atribuição das ressonâncias, serão realizados experimentos para obtenção de distâncias inter-atômicas que permitirão a geração dos modelos estruturais da proteína. Ensaio funcionais da proteína OmlA incluirão a análise de sua expressão em *X. citri* crescidas em meio de cultura ou a partir de lesões do cancro em folhas de laranja doce.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia 27.8.2007.

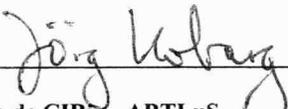
- Parecer final:
- projeto aprovado
  - projeto recusado
  - projeto com deficiências, favor comentários abaixo:

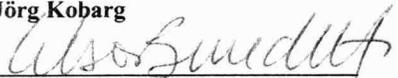
Comentários:

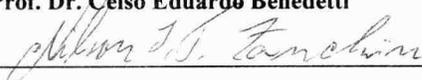
---

---

---

  
\_\_\_\_\_  
Presidente de CIBio - ABTLuS  
Prof. Dr. Jörg Kobarg

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

  
\_\_\_\_\_  
Presidente de CIBio - ABTLuS  
Jörg Kobarg  
Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin