



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Rosicler Lázaro Barbosa

**“ANÁLISE FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA BigR
DE *Xylella fastidiosa* ENVOLVIDA NA REGULAÇÃO DO
OPERON Xf0768-0764”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Rosicler Lázaro Barbosa
Celso Eduardo Benedetti
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: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Campinas, 2008

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

B234a

Barbosa, Rosicler Lázaro

Análise funcional e estrutural da proteína BigR de *Xylella fastidiosa* envolvida na regulação do operon XF0768-0764 / Rosicler Lázaro Barbosa. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti.

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

1. Proteína BigR. 2. *Xylella fastidiosa*. 3. Biofilme. 4. Fator de transcrição. 5. Regulação da expressão gênica. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Functional and structural analysis of the BigR protein from *Xylella fastidiosa* involved in the regulation of XF0768-0764 operon.

Palavras-chave em inglês: BigR protein; *Xylella fastidiosa*; Biofilm; Transcriptional factor; Gene expression regulation.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Celso Eduardo Benedetti, Marilis do Valle Marques, Luiz Roberto Nunes, Alessandra Alves de Souza, Anete Pereira de Souza.

Data da defesa: 29/01/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 29 de janeiro de 2008

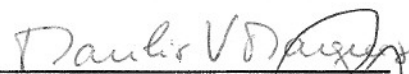
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Marilis do Valle Marques



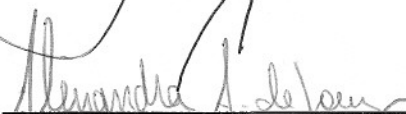
Assinatura

Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes



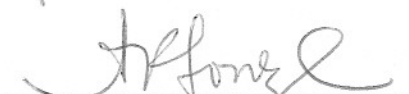
Assinatura

Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza



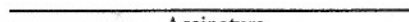
Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



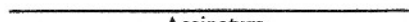
Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia



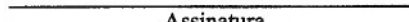
Assinatura

Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Rita e Djalma, pela dedicação e apoio que sempre deram aos meus estudos, e pelo exemplo de que nada se conquista sem esforço e trabalho.

Ao Celso pela orientação, amizade e conhecimentos adquiridos ao longo destes anos. Foi um prazer e uma grande honra ser sua aluna.

Ao Rubinho, pelo amor, carinho e por sempre me mostrar o outro lado mais divertido e feliz da vida.

Aos meus irmãos, Régis e Ricardo, e cunhadas, Paula e Dani, pessoas que me dão muito orgulho e são também pontos de apoio que sei que sempre posso contar. E claro, por me darem sobrinhos lindos que amo muito.

Aos amigos do grupo, Luciana Camillo, Marina, Andrés, Luli, Tiago, Natália, Mariane, Bruna, Aline e André, pelo convívio, ajuda e momentos de descontração.

Aos demais colegas do laboratório pelas sugestões, bom humor e disposição em ajudar.

A todas as técnicas do laboratório, por serem sempre tão prestativas e eficientes no trabalho.

A Dra. Beatriz Gomes Guimarães, ao quase Dr. Fábio Cupri Rinadi e a Celisa Tonoli pela ajuda e colaboração nas tentativas de resolução de estrutura.

Ao Dr. Shaker Chuck Farah pelo vetor pOK, Dra. Heloisa S. S. Araújo pelo auxílio na produção de anti-soro, Dr. Wellington de Araújo pelas bactérias endofíticas, Dra. Alessandra Alves de Souza pelas dicas na obtenção de biofilme, Elaine Martins do Fundecitros pela ajuda na transformação de *Xylella* e Dr. Sérgio Oyama pela modelagem molecular.

A Dra. Anete Pereira de Souza e Dr. João Alexandre Barbosa pela participação e contribuição na avaliação da banca prévia.

As Dras. Marilis de Araújo Marques, Alessandra Alves de Souza, Anete Pereira de Souza e Beatriz Gomes Guimarães e aos Drs. Luiz Roberto Nunes, Ivan Godoy Maia e Michel Georges Albert Vincentz pela disposição em participar da defesa deste trabalho.

Aos demais pesquisadores, funcionário e alunos do LNLS pelo convívio e ao LNLS pela infraestrutura fornecida.

À FAPESP pelo apoio financeiro

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- <i>Xylella fastidiosa</i>	1
1.2- Projeto Genoma e SmolBnet.....	2
1.3- Domínio HTH: Famílias ArsR/SmtB e AraC.....	3
1.4- Proteína BigR.....	6
1.5- Operon XF0768-0764.....	7
1.6- Proteína BLH.....	9
1.7- Conservação do Operon.....	11
2- OBJETIVOS.....	13
3- RESULTADOS.....	14
3.1- Capítulo I.....	14
Artigo I.....	16
Ensaio Funcionais Complementares.....	27
3.2- Capítulo II.....	42
Tentativas de Resolução de Estrutura.....	43

Artigo II.....	50
3.3- Capítulo III.....	54
Estudos Estruturais Complementares.....	55
4- DISCUSSÃO.....	65
4.1- Caracterização Funcional.....	65
4.2- Caracterização Estrutural.....	69
5- CONCLUSÕES.....	71
6- PERSPECTIVAS.....	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oclusão dos vasos de xilema e sintomas da CVC.....	2
Figura 2. Esquema da proteína SmtB com regiões de ligação ao metal e DNA.....	4
Figura 3. Alinhamento seqüencial das proteínas SmtB, ArsR e BigR.....	5
Figura 4. Alinhamento seqüencial da proteína BigR de <i>Xylella</i> e <i>Agrobacterium</i>	7
Figura 5. Esquema do operon XF0768-0764 e sua região promotora.....	9
Figura 6. Alinhamento de parte da região promotora do operon XF0768-0764.....	9
Figura 7. Esquema mostrando a conservação do operon XF0768-0764.....	12
Figura 8. Ensaios de ligação a metal.....	34
Figura 9. <i>Northern blot</i> com RNA total de <i>Xylella</i> crescida na presença de metais.....	35
Figura 10. SDS-PAGE e <i>Western blot</i> de proteínas totais de <i>Xylella</i> e <i>Agrobacterium</i>	36
Figura 11. EMSA com a proteína ΔBigR na presença de diferentes compostos.....	37
Figura 12. Esquema indicando <i>knock out</i> dos genes BLH e BigR de <i>Agrobacterium</i>	38
Figura 13. Confirmação do <i>knock out</i> dos genes BLH e BigR.....	39
Figura 14. <i>Southern blot</i> utilizando o gene NPT como sonda.....	39
Figura 15. Culturas de <i>Agrobacterium</i> selvagem e mutante em diferentes condições.....	40
Figura 16. Antibiógrama com células selvagem e mutante.....	41
Figura 17. Purificação e dicroísmo circular a proteína BigR-his.....	45
Figura 18. SDS-PAGE da proteína his-ΔBigR antes e após clivagem com trombina.....	46
Figura 19. Purificação e dicroísmo circular da forma nativa da proteína BigR.....	47
Figura 20. SDS-PAGE com resultado da purificação da proteína ΔBigR.....	48
Figura 21: Cristais da proteína BigR inteira e truncada no N-terminal.....	49
Figura 22. Predição da estrutura secundária da proteína BigR.....	57
Figura 23. Modelo estrutural da proteína BigR gerado com estrutura SmtB.....	58
Figura 24. Testes para checar a multimerização de BigR.....	60
Figura 25. Estudos de dicroísmo circular.....	62
Figura 26. Representação esquemática de promotores com domínio HTH.....	64
Figura 27: Cristais da proteína ΔBigR sozinha e em complexo com DNA.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nome e descrição dos vetores utilizados neste trabalho.....	29
Tabela 2. Lista dos <i>primers</i> utilizados para as clonagens e como sondas para EMSA.....	30
Tabela 3. Sequências promotoras com alteração no BigRbox de <i>Xylella</i> e <i>Agrobacterium</i>	30
Tabela 4. Nome e concentração de compostos utilizados no crescimento dos mutantes.....	32
Tabela 5. Lista dos antibióticos utilizados para teste de sensibilidade.....	32

LISTA DE ABREVIACÕES

AHL	Acil-homoserinalactona
AT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BigR	Proteína repressora associada ao crescimento de biofilme (<i>biofilm growth-associated repressor</i>)
ΔBigR	Proteína BigR truncada no décimo terceiro resíduo da região N-terminal
BL	Butirolactona
BLH	Proteína hidrolase semelhante as beta-lactamases (<i>beta-lactamase-like hydrolase</i>)
CD	Dicroísmo circular (<i>circular dichroism</i>)
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
CVC	Clorose Variegada dos citros
DLS	Espalhamento de luz dinâmica (<i>dynamic light scattering</i>)
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	1,4 ditioneitol
DUF	Domínio de função desconhecida (<i>domain of unknown function</i>)
EMSA	Ensaio de Retardamento de Mobilidade Eletroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
GFP	Proteína de Fluorescência Verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GloB	Domínio estrutural característico das hidrolases dependentes de metal, incluindo glioxalases II e beta-lactamases
HTH	Domínio estrutural helix-turn-helix
IPTG	Isopropil beta-D-galactopiranosídeo
LB	Meio de cultura de bactérias “Luria Bertani”
MG	Metilglioxal
NPT	Neomicina fosfotransferase (<i>neomycin phosphotransferase</i>)
OD₆₀₀	Densidade ótica a 600 nanômetros
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
pBLH	promotor do operon formado pelos genes XF0768-0764
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)

PDB	Banco de dados de estrutura de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetalsulfonila (<i>phenylmethanesulphonylfluoride</i>)
PSIPRED	Servidor de predição de estrutura secundária de proteínas (<i>Protein Structure Prediction Server</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
SD	Shine-Dalgarno
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil-sulfato de sódio (<i>sodium duodecyl-sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SeMet	Selenometionina
SLG	S-lactoilglutathione
SmolBnet	Rede de Biologia Molecular Estrutural (<i>Structural Molecular Biology Network</i>)
TS	Tampão de ressuspensão Tris-salina
XF	<i>Xylella fastidiosa</i>

RESUMO

O gene XF0767 de *Xylella fastidiosa* está localizado num operon composto por mais quatro genes classificados como proteínas hipotéticas (XF0768-XF0767-XF0766-XF0765-XF0764). Este operon está conservado em uma série de bactérias associadas a plantas, incluindo *Agrobacterium tumefaciens*, *Mezorhizobium loti* e *Sinorhizobium meliloti*. A região *upstream* ao códon de iniciação deste operon possui seqüências canônicas correspondentes a sítios -35 e -10 de regiões promotoras reguladas por fatores sigma70. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o sistema de regulação do operon pela proteína XF0767, nomeada BigR (*biofilm growth-associated repressor*), visando à compreensão deste sistema e sua importância para a bactéria.

A proteína BigR se liga na seqüência repetida invertida (9-4-9) localizada na região -10 do promotor do operon XF0768-0764, denominada BigR*box*. BigR inibe a atividade do operon reprimindo a expressão do gene repórter GFP em *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Xylella fastidiosa*. Mutações no BigR*box* dos promotores de *Xylella* e *Agrobacterium* afetam a ligação do repressor e abole a transcrição do gene repórter. Esses dados indicam, portanto, que BigR compete com a RNA polimerase pelo mesmo sítio de ligação ao DNA, revelando assim o mecanismo de regulação do operon.

BigR apresenta similaridade com fatores transcricionais de bactérias contendo domínio HTH (*helix-turn-helix*) de ligação ao DNA. Apesar de BigR ter sido inicialmente classificada como uma proteína da família SmtB/ArsR, as quais regulam operons relacionados à resistência a metais, nossos dados indicam que BigR não atua como sensor de metal. A adição de cádmio, ferro e cobre na mistura de ligação causam uma aparente dissociação do complexo DNA/BigR, entretanto, estudos *in vivo* na presença de metais não evidenciaram nenhuma alteração na expressão do gene repórter. Mutantes deficientes em BigR também não apresentam diferença de crescimento na presença de metais.

O gene XF0768 codifica uma proteína nomeada BLH (*beta-lactamase-like hydrolase*) por pertencer à superfamília das metalo-beta-lactamases. Dada a presença de BigR e BLH no operon de *Xylella* e *Agrobacterium*, a atividade do operon foi analisada em diferentes condições como crescimento das células repórter *in planta*, co-cultivo com bactérias endofíticas e deficiência nutricional. Entretanto, uma maior atividade do operon em *Xylella* e *Agrobacterium* foi detectada

apenas na condição de biofilme. Células de *Agrobacterium* aderidas em raiz de tabaco também apresentaram maior expressão do gene repórter quando comparadas às células em suspensão.

Mutantes de *Agrobacterium* deficientes em BigR (*bigR*⁻) apresentam maior expressão do gene repórter, confirmando que BigR age como o repressor transcricional do operon. A quantificação da formação de biofilme das células mutante e selvagem revelou uma maior densidade de biofilme no mutante *bigR*⁻ em superfície de vidro e também maior quantidade de células aderidas em raiz de tabaco, indicando que o operon pode estar envolvido com o processo de adesão ou desenvolvimento do biofilme bacteriano.

Do ponto de vista estrutural, foi mostrado que a proteína BigR truncada no N-terminal (Δ BigR) encontra-se estruturada na forma de trímero, diferindo do observado para as proteínas com domínio HTH que em geral formam dímeros e monômeros. BigR é estável termicamente, começando a perder estrutura à 74°C, mas retendo um sinal residual de α -hélice até 90°C. Tratamentos com altas concentrações de (NH₄)₂SO₄ interferiram na ligação da proteína ao DNA alvo e no conteúdo de estrutura secundária sem alterar, contudo, sua estabilidade térmica.

A purificação e cristalização da proteína Δ BigR resultou na coleta de alguns conjuntos de dados da proteína nativa e derivada, através de *soaking* ou marcada com SeMet. Apesar dos dados obtidos serem de boa qualidade, até o momento, não foi possível a resolução da estrutura cristalográfica desta proteína.

ABSTRACT

The XF0767 gene from *Xylella fastidiosa* is located in an operon composed by a set of genes (XF0768-XF0767-XF0766-XF0765-XF0764) of unknown function. This operon is conserved in a number of plant-associated bacteria including *Agrobacterium tumefaciens*, *Mezorhizobium loti* e *Sinorhizobium meliloti*. The DNA region upstream of the operon has canonical sequences corresponding to -35 and -10 elements found in sigma70-regulated promoters. The aim of this work was to elucidate the biological function of the protein encoded by XF0767, named BigR (biofilm growth-associated repressor), as a transcriptional regulator and its importance to the bacteria.

BigR binds to an inverted repeat sequence (9-4-9) located in the -10 region of the XF0768-0764 operon promoter. This sequence was named BigRbox. BigR repressed transcription of its own operon upon binding to the BigRbox in *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. Mutations in the BigRbox significantly affected the repressor binding and abolished transcription of the reporter gene in both bacteria, indicating that BigR compete with the RNA polymerase for the same promoter site.

BigR is similar to HTH transcriptional factors of the SmtB/ArsR family, which control tolerance and detoxification of heavy metals in prokaryotes. Despite the similarities, BigR does not appear to function as a metal sensor, as initially predicted. Although binding of BigR to its target DNA was diminished in the presence of cadmium, copper and iron, operon regulation in response to metals was not demonstrated *in vivo*. In addition, *Agrobacterium* mutants deficient in BigR did not show changes in growth rates in the presence of metals.

BLH is an unusual beta-lactamase-like hydrolase coded by the XF0768 gene. To gain insights into the possible function of the operon, the activity of reporter cells was observed in the presence of different compounds and conditions including *in planta* growth, effect of endophytic competition and nutrient deficiency. Significantly, an increased operon activity was observed in *Xylella* and *Agrobacterium* biofilms. *Agrobacterium* cells attached to tobacco roots also showed high levels of reporter gene expression in comparison to cells in suspension.

A. tumefaciens mutants deficient in the BigR showed constitutive expression of the operon, confirming that BigR acts as a transcriptional repressor. Biofilm quantification showed

increased biofilm formation in glass surfaces as well as in tobacco roots, indicating that the operon may play a role in cell adherence or biofilm development.

Structurally, the truncated BigR protein (Δ BigR) is a trimer in solution, as opposed to most HTH regulators known, which are usually found as dimers or monomers. BigR is stable at high temperatures (74°C); however, treatments with high concentrations of ammonium sulfate interfere with the protein secondary structure and its DNA binding capacity, without affecting its thermal stability.

Good quality X-ray diffraction data were collected for the native and derivative Δ BigR protein; however, structure resolution was not possible probably due to problems with the crystals.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa restrita ao xilema das plantas hospedeiras e ao canal alimentar dos insetos vetores. A bactéria é responsável por diversas doenças economicamente importantes em culturas nas regiões de clima tropical e subtropical (Wells *et al.*, 1987). Entre as doenças causadas encontram-se a clorose variegada do citros (CVC), o mal de Pierce da videira, a doença do pessegueiro, a requeima da folha do café, entre outras (Chang *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1978; de Lima *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1981).

No Brasil, a CVC foi identificada oficialmente em 1987 em pomares do triângulo mineiro e norte e noroeste do estado de São Paulo, maior produtor de laranja (Rossetti *et al.*, 1990). Embora essas sejam as regiões mais afetadas até hoje, a doença já está presente em quase todas as áreas citrícolas do país, com intensidades diferentes (Tubelis *et al.*, 1993). A doença é transmitida através de insetos vetores comumente conhecidos como cigarrinhas, que através de seu aparelho bucal perfurador/sugador alimentam-se da seiva do xilema e transmitem a bactéria de plantas doentes para plantas saudáveis (Purcell *et al.*, 1979). A bactéria coloniza os vasos de xilema e causa oclusão vascular destes vasos (Figura 1A) levando a um estresse hídrico, falta de nutrientes e conseqüentemente a manifestação da doença (Chang *et al.*, 1993; Brlansky *et al.*, 1983). Os principais sintomas da doença são o surgimento de manchas amarelas nas folhas que progridem para toda sua extensão levando à necrose (Figura 1B), os frutos amadurecem mais cedo, produzindo assim frutos duros e com menor quantidade de suco (Figura 1C) (Machado, 2001).

Os mecanismos moleculares que envolvem o desenvolvimento dos sintomas da CVC não são bem conhecidos, porém a oclusão vascular dos vasos de xilema pela formação de biofilme bacteriano é a hipótese mais aceita atualmente (Newman *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004).



Figura 1: A- Vaso de xilema obstruído por células de *Xylella fastidiosa*. B- Folha de planta com sintomas de CVC, manchas amareladas na face superior da folha. C- Fruto de planta sadia e doente, com tamanho reduzido devido à doença. (Fotos do Fundecitrus. <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>)

Os biofilmes bacterianos são agregados de bactérias associados a superfícies sólidas ou em contato com outros microrganismos. A formação do biofilme é dividida em diferentes estágios, iniciando-se pela adesão na superfície, crescimento bacteriano e produção de substâncias extracelulares, maturação e dispersão (Sauer, 2003). As células dentro do biofilme são fisiologicamente distintas das células crescidas em cultura dispersa, modulando seu metabolismo através de uma comunicação célula-célula (*quorum - sensing*). Bactérias em biofilme também exibem elevada tolerância a antimicrobianos e outros tipos de estresse, tornando seu estudo importante para área industrial, médica e agrícola (Ramey *et al.*, 2004).

1.2- Projeto Genoma e SmolBnet

Devido à importância econômica e social da citricultura, e aos danos causados pela CVC no Brasil, foi implementado um programa de pesquisa envolvendo o sequenciamento completo do genoma da cepa 9a5c de *Xylella fastidiosa* isolada de uma planta de laranja doce afetada pela CVC (Simpson *et al.*, 2000). A finalização deste projeto revelou um genoma contendo 2.848 *open reading frames* (ORFs) divididas entre o DNA cromossomal e dois plasmídeos, pXF51 com 64 ORFs e pXF1.3 com 2 ORFs. De todas as ORFs anotadas no genoma aproximadamente 46% possuíam função biológica conhecida. Os restantes dos genes foram classificados como possíveis codificadores de

proteínas hipotéticas conservadas e proteínas hipotéticas sem similaridade (Simpson *et al.*, 2000).

A *Xylella fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter o seu genoma completamente seqüenciado, o que faz dela um importante modelo para o entendimento do mecanismo de patogenicidade de bactérias de plantas. Uma importante ferramenta para auxiliar no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos neste sistema é o estudo estrutural e funcional de proteínas. Esses estudos possibilitariam, além do entendimento mais detalhado do metabolismo do organismo, o desenvolvimento de estratégias de controle da CVC.

Com o objetivo de estimular e aumentar as pesquisas na área de biologia estrutural no país, o programa Genoma Estrutural FAPESP criou a Rede de Biologia Molecular Estrutural (SmolBnet). Como integrante da rede SmolBnet, nosso laboratório, no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CeBiME) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), selecionou várias *open reading frames* (ORFs) de *X. fastidiosa*, visando análises estruturais e funcionais dessas proteínas. As ORFs escolhidas codificam proteínas com massas moleculares que variam de 9 a 35 kDa com prováveis funções em mecanismos regulatórios como, transcrição de genes envolvidos na patogenicidade e virulência, produção de toxinas e sistemas de detoxificação. Neste trabalho, serão apresentadas as análises de estrutura e função de uma das proteínas selecionadas, um fator de regulação da transcrição contendo um domínio helix-turn-helix (HTH).

1.3- Domínio HTH: Famílias ArsR/SmtB e AraC

O domínio HTH encontra-se largamente distribuído entre fatores de transcrição basais e específicos de diversos organismos procarióticos e eucarióticos. Em termos funcionais, o domínio HTH tem sido observado em uma grande variedade de funções como regulação transcricional, que inclui reparo de DNA e replicação, metabolismo de RNA e interação proteína-proteína em diversos contextos de sinalização. Além destes papéis básicos na mediação de interações de macromoléculas, o domínio HTH também foi incorporado em domínios catalíticos de diversas enzimas (Aravind *et al.*, 2005). Em termos estruturais, o domínio HTH apresenta uma arquitetura simples compreendida por três estruturas de α -hélices com configuração parcialmente aberta. Esta configuração

básica desenvolveu diferentes variações como as configurações “tetra-helical bundle”, “winged-helix” e “ribbon-helix-helix” (Aravind *et al.*, 2005). Em procariotos, o número total de domínios HTH por genoma revela a grande conservação desta arquitetura em microrganismos, onde em geral se relaciona ao controle da transcrição. Dois exemplos de famílias de proteínas com domínio HTH e função reguladora em bactérias são as famílias ArsR/SmtB e AraC.

Os membros da família ArsR/SmtB são proteínas metaloregulatórias que participam na regulação de genes envolvidos na resposta a concentrações tóxicas de metais pesados, como zinco e cádmio em *Synechococcus* ou arsênio em *Salmonella typhimurium* (Robinson *et al.*, 1998; VanZile *et al.*, 2002). Tem sido mostrado que membros dessa família agem como fatores repressores. A ligação entre o íon metal e o fator de transcrição produz uma mudança conformacional que causa a dissociação da proteína com seu sítio de ligação na região promotora do DNA, permitindo a transcrição dos genes em resposta a presença de metais (Rosen, 1999; Thelwell *et al.*, 1998).

A proteína SmtB é capaz de se ligar a íons cobre, zinco e cádmio. A estrutura cristalográfica da proteína apo-SmtB revela que sua estrutura quaternária é constituída por um homodímero, sendo que cada monômero contém cinco α -hélices e duas folhas- β antiparalelas, arranjadas na conformação $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\alpha R-\beta 1-\beta 2-\alpha 5$. Nesta estrutura o domínio de ligação ao DNA HTH é formado pelas hélices $\alpha 3$ e αR (Cook *et al.*, 1998) (Figura 2). A coordenação com o metal zinco na proteína SmtB é realizada pelos resíduos Asp104 e His106 da hélice $\alpha 5$ de um monômero e His117 e Glu120 da hélice $\alpha 5$ do outro monômero compondo o chamado sítio $\alpha 5$. Além disso, um segundo sítio de ligação a metal, denominado $\alpha 3$, é composto pelos resíduos Cys14, Cys61 e Cys121 (Eicken *et al.*, 2003) (Figura 2 e 3).

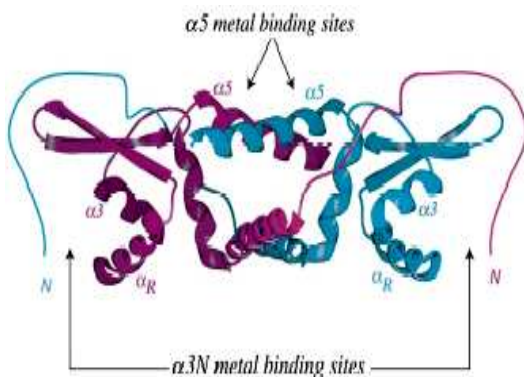


Figura 2: Estrutura dimérica da proteína SmtB. Cada monômero está representado por uma cor (azul ou lilás). A região N-terminal (N) e as hélices αR , $\alpha 3$ e $\alpha 5$ estão indicadas. O domínio HTH é formado pelas hélices αR e $\alpha 3$. A localização dos dois sítios de ligação ao metal estão indicados pelas setas. (VanZile *et al.*, 2002)

Estudos de espectroscopia de raio-X de AsIII-ArsR revelam que o metal arsênio é coordenado por três cisteínas dentro da provável hélice $\alpha 3$, sendo que dois destes resíduos são derivados do motivo ELCV[C/G]D, conservado em várias proteínas metaloregulatórias (Shi *et al.*, 1996). Na estrutura cristalográfica de SmtB verifica-se que o motivo ELCV[C/G]D está presente na hélice $\alpha 3$ como parte do domínio $\alpha 3$ - αR de ligação ao DNA (Cook *et al.*, 1998). Esses dados evidenciam, portanto, a existência de dois sítios de ligação distintos dentro da mesma família de proteína (Figura 3).



Figura 3: Alinhamento entre as proteínas BigR de *Xylella fastidiosa* (XF0767), SmtB de *Staphylococcus aureus* (P30340) e ArsR de *Escherichia coli* (P15905) gerado através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>). Os resíduos conservados encontram-se marcados por asteriscos. As regiões de estrutura secundária da proteína SmtB encontram-se destacadas por barras vermelhas para α -hélice e azul para folha- β . Os sítios $\alpha 3$ e $\alpha 5$ de ligação a metal da proteína SmtB encontram-se destacados em verde e lilás, respectivamente, assim como, o sítio de ligação a metal da proteína ArsR encontra-se em amarelo. As hélices $\alpha 3$ e αR formam o domínio HTH de ligação ao DNA.

A família AraC compreende proteínas que se ligam ao DNA e regulam processos celulares envolvidos com metabolismo de carbono, virulência e resposta a estresse (Gallegos *et al.*, 1997). As proteínas MarA, integrantes da família AraC, são ativadores transcricionais que regulam a transcrição de genes envolvidos no aumento da resistência a antibióticos (Aleksun and Levi, 1997; Aleksun *et al.*, 2001). A expressão de MarA é regulada pelo repressor MarR, também integrante da família AraC com domínio HTH. MarA não parece se ligar a drogas, mas ativa a expressão de aproximadamente 60 genes, incluindo genes das bombas MDR (*Bacterial Multidrug Resistance*), assim como o regulon *mar* (Aleksun and Levy, 1997). A proteína MarA foi o primeiro membro da

família AraC a ter sua estrutura resolvida em complexo com sítio de ligação *mar* do promotor. Estes estudos mostram que a proteína MarA se liga ao DNA alvo como um monômero com a interação de duas regiões do domínio HTH e dois segmentos adjacentes do sulco maior do DNA (Rhee *et al.*, 1998).

1.4- Proteína BigR

Uma das ORFs selecionadas para estudos estruturais e funcionais, XF0767, foi anotada como um regulador transcricional pertencente à família ArsR (Simpson *et al.*, 2000). Essa proteína foi nomeada BigR (biofilm growth-associated repressor), pelo fato de que a mesma influencia a formação de biofilme em bactérias (Barbosa and Benedetti, 2007, Artigo I- Capítulo I). A sequência de aminoácidos desta proteína possui massa molecular teórica de 13 kDa e um domínio estrutural conservado HTH de ligação ao DNA.

A proteína BigR de *Xylella fastidiosa* possui cerca 23% e 28% de identidade com as proteínas SmtB e ArsR de *Synechococcus elongatus* e *Salmonella typhimurium*, respectivamente. Entretanto, na sequência primária destas proteínas, nota-se que as cisteínas vicinais Cys32-Cys34 importantes para a ligação do íon arsênio na proteína ArsR (Shi *et al.*, 1996) não estão presentes em BigR. Da mesma forma, os resíduos necessários para a ligação do zinco da proteína SmtB (VanZile *et al.*, 2002 e Sun *et al.*, 2001), também não encontram correspondência na proteína BigR (Figura 3). Portanto, se BigR funcionar como um sensor de metal, um mecanismo de ligação ao metal distinto deve existir na proteína.

BigR possui maior similaridade com um vasto grupo de proteínas não caracterizadas encontradas em patógenos de plantas e simbiontes, patógenos humanos e bactérias de vida livre. Apesar de grande parte destas proteínas terem sido anotadas como fatores transcacionais da família ArsR é possível que elas representem um novo grupo de proteínas HTH, uma vez que não possuem os sítios de ligação a metais já caracterizados e sua similaridade com as proteínas ArsR e SmtB se restringem apenas ao domínio HTH (Figura 1- Artigo I). Além disso, BigR também possui certa identidade com as proteínas MarA, compartilhando 12% de seus aminoácidos. Uma vez que estas identidades são

baixas, seria importante a caracterização estrutural desta proteína para o conhecimento de sua função.

É interessante notar também o fato de que BigR não possui ortólogos em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, um importante patógeno de citros bastante relacionado a *Xylella* por compartilharem 74% de seus genes (da Silva *et al.*, 2002). Por outro lado, BigR possui grande similaridade com proteínas encontradas em outras bactérias, em especial com uma proteína de *Agrobacterium tumefaciens* com 62% de identidade a BigR (Figura 4).

```

BigR  ---MVNEMRDDTRPHMTREDMEKRANEVANLLKTLSPVRLMLVCTLVEGEFSVGELEQQ 57
AT    MVTETPLEKPLDIGEIPLEAMEKRATEVAILLKTLAHPARIMLAETLAQGEFSVGELEAK 60
      .      :      .:.      *****.*  *****:*  *****.*  :***** :

BigR  IGIGQPTLSQQLGVLRESGIVETRRNIKQIFYRLTEAKAAQLVNALYTIFCAQEKQA 114
AT    LDIRQPTLSQQLGVLREAGIVDTRREARQIFYRLAEDKAARLIEALYAIFFCAPEENL 117
      :.* *****:***:***: *****:*  ***:~::~***:**** *::

```

Figura 4: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína BigR de *X. fastidiosa* (XF0767) e *A. tumefaciens* (AAK89928), denominada AT. Em amarelo estão indicados os resíduos idênticos entre as duas sequências e em verde evidenciam-se dois resíduos de cisteínas. O alinhamento foi realizado no programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>).

1.5- Operon XF0768-0764

Vários processos celulares necessitam de íons metais como cofatores para reações enzimáticas ou como componentes estruturais de proteínas. No entanto, mesmo íons metais essenciais podem ser limitantes para a viabilidade da célula quando estão em concentrações acima do normal. Além disso, alguns íons metais são tóxicos para células bacterianas em qualquer concentração. Assim, existem sistemas de detoxificação e resistência que empregam uma variedade de mecanismos que tiram a célula destas condições potencialmente letais (Silver and Phung, 1996). Neste sentido, operons que conferem resistência a metais pesados podem estar localizados em plasmídeos ou transposons que contém operons de múltipla resistência ou detoxificação, no entanto eles também podem ser encontrados integrados em cromossomos bacterianos (Silver, 1992). Usualmente, os operon que conferem resistência a metais codificam proteínas como bombas de efluxo de metais (ATPases P), transportadores de membranas, metais

redutases, proteínas transportadoras de metais citoplasmáticas ou periplasmáticas, ou proteínas seqüestradoras de metais. Eles também codificam pelo menos um regulador transcricional sensível a metal para regular o operon (Busenlehner *et al.*, 2003; Rosen, 1996).

A análise do mapa cromossômico de *X. fastidiosa* mostra que o gene XF0767 está inserido no *cluster* gênico XF0768-XF0767-XF0766-XF0765-XF0764 que compõe um provável operon (Figura 5A). Como inicialmente anotado, as ORFs XF0768, XF0766 e XF0765 codificam proteínas hipotéticas conservadas, enquanto que as ORFs XF0767 e XF0764 codificam proteína de membrana e proteína regulatória, respectivamente (Simpson *et al.*, 2000). Portanto, este operon aparentemente não possui os elementos usualmente encontrados nos operons relacionados com resistência a metais. Curiosamente, a seqüência de aminoácidos da proteína XF0768, nomeada como BLH (beta-lactamase-like hidrolase), possui um domínio GloB conservado com similaridade a hidrolases da superfamília metalo-beta-lactamase. As proteínas desta família estão relacionadas com uma grande variedade de funções biológicas (Daiyasu *et al.*, 2001) e apesar de serem dependentes de metais, elas não fazem parte dos operons relacionados com resistência a metais descritos até o momento. Uma vez que BigR possui cerca de 12% de identidade com as proteínas MarA, que regulam a transcrição de genes associados à resistência a antibióticos, a hipótese deste operon estar relacionado com resistência a antibióticos também foi testada.

A região *upstream* ao códon de iniciação do primeiro gene do operon (XF0768) contém seqüências canônicas correspondentes às regiões -35 e -10 (região rica em AT), além de dois palíndromes designados pali1 e pali2 (Figura 5B). A comparação desta seqüência promotora com as regiões de ligação descritas para as proteínas ArsR e MarA mostra similaridade entre elas (Figura 6). Novamente, esses dados indicam que o operon XF0768-0764 possui características de ambos os tipos de operons, justificando estudos de determinação de estrutura e função em mecanismos de resistência a metais ou antibióticos.

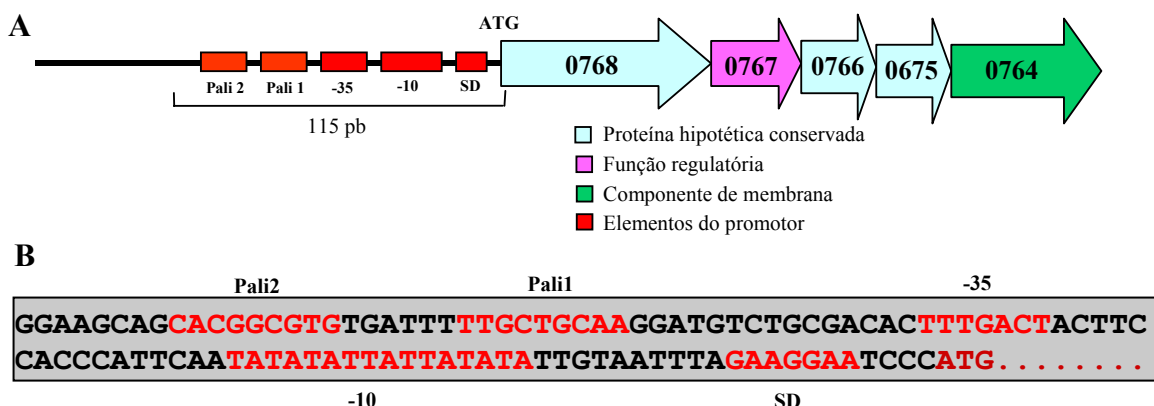


Figura 5: Operon XF0768-0764 e sua região promotora. **A-** Mapa cromossômico de *Xylella* mostrando um *cluster* com 5 genes (XF0768-XF0767-XF0766-XF0765-XF0764) e a região *upstream* ao códon de iniciação do gene XF0768 contendo os elementos típicos de uma região promotora. **B-** Sequência de nucleotídeos da região promotora evidenciando duas sequências repetidas invertidas (Pali2 e Pali1) e as regiões -35, -10 e Shine-Dalgarno (SD).



Figura 6: Alinhamento de parte da região promotora do operon XF0768-0764 de *Xylella* com os sítios de ligação das proteínas ArsR e MarA. Em azul, estão representadas as sequências repetidas invertidas (Pali1 e Pali2) e a região -35. As sequências de ligação das proteínas ArsR e MarA estão apresentadas em vermelho. Os asteriscos indicam os nucleotídeos idênticos entre as sequências do promotor de BigR com ArsR e MarA.

1.6- Proteína BLH

A proteína BLH, codificada pelo gene XF0768, apresenta similaridade com beta-lactamases e glioxalases II, pertencentes à superfamília das metalo-beta-lactamases, que contém um domínio de ligação a zinco HxHxDH, também presente na proteína BLH.

Ao longo do tempo, as bactérias desenvolveram diferentes estratégias para escapar da atividade dos antibióticos. Neste sentido, as proteínas beta-lactamases inativam antibióticos à base de beta-lactanos por hidrólise das pontes peptídicas, característica dos anéis de beta-lactanos, proporcionando resistência ao microrganismo (Majiduddin *et al.*,

2002). As beta-lactamases estão divididas em diferentes classes baseadas em sua sequência primária e mecanismo catalítico. BLH possui maior similaridade com a classe B das beta-lactamases que necessitam de um íon divalente (Zn^{2+}) para catalisar a hidrólise do beta-lactano (Majiduddin *et al.*, 2002).

As glioxalases II participam do sistema glioxalase, que consiste de duas enzimas, a lactoilglutationa liase (glioxalase I) e a hidroxiacilglutationa hidrolase (glioxalase II). Em animais e plantas, o sistema glioxalase desempenha diversas funções que incluem a regulação da divisão e proliferação celular e proteção contra a toxicidade de oxoaldeídos. As enzimas glioxalases são importantes para a detoxificação de metilglioxal formado primariamente como um produto do metabolismo de lipídios e carboidratos. Neste sistema, a glioxalase I forma S-lactoilglutationa a partir de glutatona e metilglioxal. As glioxalases II catalisam a hidrólise do tioéster de S-lactoglutationa restituindo a glutatona e liberando ácido láctico (Maiti *et al.*, 1997; Singla-Pareek *et al.*, 2003). Em bactérias, a produção de metilglioxal deve ser mantida em balanço com a capacidade de detoxificação e proteção contra este eletrófilo, pois a produção excessiva de metilglioxal leva a morte celular (Ferguson, 1999).

Uma característica interessante da proteína BLH é que ela possui na sua porção N-terminal um domínio DUF442 fusionado ao domínio GloB. A presença deste domínio DUF de função desconhecida diferencia a proteína BLH das glioxalases II e beta-lactamases descritas até o momento. O alinhamento da sequência N-terminal da proteína BLH, contendo o domínio DUF, mostra similaridade com proteínas metil-hidrolases, indicando que a proteína BLH pode ser uma proteína modular, e o domínio DUF pode ter alguma influência na função do outro domínio presente na proteína. Além disso, esta fusão encontra-se presente em um grupo restrito de bactérias, entre elas, a *Xylella* e as bactérias da família *Rhizobiaceae*, sugerindo que BLH deva exercer uma nova atividade hidrolítica ligada ao estilo de vida destas bactérias associadas a plantas (Studholme *et al.*, 2005 e Artigo I). Mais recentemente, o genoma de outros dois organismos, *Ochrobactrum anthropi* e *Rhizobium leguminosarum*, também revelou a conservação da fusão destes domínios. Apesar de *Ochrobactrum anthropi* não estar diretamente envolvida com plantas, ela é uma bactéria de solo, que pode causar infecções oportunistas, e está relacionada a bactérias da família *Rhizobiaceae*.

1.7- Conservação do Operon

Recentemente, a comparação dos genomas de bactérias fitopatogências tem sido uma importante ferramenta para se deduzir a relevância e importância de genes específicos e famílias gênicas em organismos (Van Sluys *et al.*, 2002). Análises de *microarray* também têm sido realizadas para comparar a expressão gênica de *Xylella* em diferentes condições de crescimento, como na formação do biofilme e no processo de infecção (Souza *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2004). Em nenhum destes estudos foram citadas as proteínas que constituem o operon XF0768-0764. Além disso, estudos realizados em *Synorhizobium meliloti* mostram que células crescidas em vida livre, nódulos, meio rico ou meio mínimo não possuem alteração na expressão dos genes correspondentes aos do operon XF0768-0764 (Barnett *et al.*, 2004).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas contidas no operon XF0768-0764 e a comparação do locus gênico de diferentes bactérias revelam sua conservação em uma classe relativamente restrita de microrganismos, que em geral são patógenos de plantas ou bactérias de solo e raiz. Assim, o operon apresenta correlação de genes e mostra a mesma organização cromossômica nas bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Mezorhizobium loti* e *Sinorhizobium meliloti*, exceto que em *A. tumefaciens* o gene correspondente ao XF0764 está localizado em um locus diferente e pode não ser co-regulado pelo repressor (Figura 7). Além destes, outros operons, com algumas variantes em suas composições gênicas também foram observados, por exemplo, no patógeno de tomate *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e na bactéria de vida livre *Nitrossomonas europaea*. Outros patógenos animais, como *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Vibrio cholerae*, também possuem relativa conservação do operon, apesar da ausência do domínio DUF na seqüência de BLH (Figura 7).

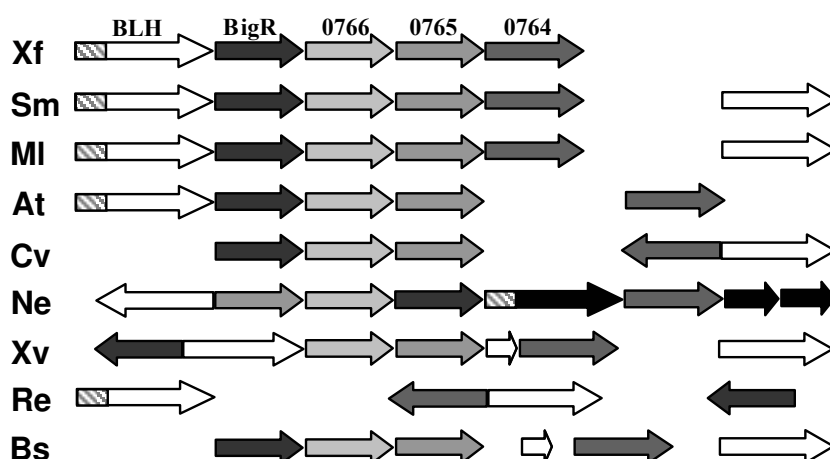


Figura 7: Esquema mostrando a conservação do operon XF0768-0764 de *X. fastidiosa* em diferentes genomas microbianos (Sm- *Sinorhizobium meliloti*, Ml- *Mesorhizobium loti*, At- *Agrobacterium tumefaciens*, Cv- *Chromobacterium violaceum*, Ne- *Nitrosomonas europaea*, Xv- *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Re- *Rhizobium etli*, Bs- *Brucella suis*). Cada seta representa uma ORF dentro do mesmo *cluster* ou em *lôcus* diferente. Os retângulos e setas contendo listras diagonais representam o domínio DUF442. Setas com listras verticais indicam ORFs únicas presentes em Ne, enquanto, a seta pontuada indica a presença de uma outra hidrolase fusionada ao domínio DUF.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar e determinar o sistema de regulação do operon XF0768-0764 pela proteína BigR, visando a melhor compreensão desse sistema e sua importância na patogenicidade ou mecanismo de resistência da bactéria. Para tanto, priorizou-se a realização de:

- 1- Expressão e purificação da proteína BigR, para os estudos funcionais e estruturais.
- 2- Ligação de DNA-proteína através de ensaios de *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) com diferentes sondas, e na presença ou ausência de metais, antibióticos e outros possíveis ligantes.
- 3- Determinação do sítio específico de ligação de BigR na sequência de DNA promotora e determinação do sítio de início de transcrição.
- 4- Análises de alterações na estrutura secundária da proteína BigR através do uso de Dicroísmo Circular (CD) com os complexos DNA-proteína.
- 5- Ensaios funcionais *in vivo* através da construção de um gene repórter com o gene da *green fluorescent protein* (GFP) controlada pelo promotor do operon XF0768-0764 (pBLH).
- 6- Obtenção de mutantes de *Agrobacterium* pelo *Knock out* dos genes BigR e BLH e analisar a resposta destes mutantes quanto à tolerância a metais pesados e outros compostos orgânicos, como antibióticos.
- 7- Resolução da estrutura cristalográfica e estudos estruturais da proteína BigR.

3. RESULTADOS

3.1- CAPÍTULO I: Caracterização funcional do operon BigR

Este primeiro capítulo mostra os resultados obtidos através dos estudos funcionais de BigR e seu operon. Parte deste trabalho, principalmente ao que se refere à determinação do sítio de ligação e mecanismo de regulação da proteína BigR, além de alguns estudos para determinação da função do operon, encontram-se apresentados na forma de artigo científico publicado na revista *Journal of Bacteriology*.

Demais estudos que não foram publicados nesse artigo, mas que são relevantes para a melhor compreensão deste sistema, estão sendo apresentados em sequência como resultados complementares. Juntos, esses dados mostram que o produto do gene XF0767 codifica uma proteína repressora da transcrição nomeada BigR. Esta proteína se liga a um elemento palindrômico TATA (*BigRbox*) localizado na região -10 do promotor do primeiro gene do operon (BLH) reprimindo sua transcrição em células de *Xylella fastidiosa*.

Mutações na sequência *BigRbox* afetam não somente a ligação da proteína ao DNA como também a ligação do fator sigma da RNA polimerase, indicando que o mecanismo de regulação do operon envolve a competição destas duas proteínas pelo mesmo sítio de ligação ao DNA.

BigR apresenta uma grande identidade com um grupo de proteínas não caracterizadas encontradas em patógenos de plantas, simbiontes, patógenos humanos e outras bactérias. Em particular BigR possui 62% de identidade com seu ortólogo em *Agrobacterium tumefaciens*. Porém, observa-se uma maior conservação na estrutura e composição gênica desse operon apenas em bactérias relacionadas com plantas, incluindo várias *Rhizobiaceae*. Assim, os estudos de caracterização funcional de BigR de *Xylella* foram também realizados em *A. tumefaciens*. Estes resultados mostram que a proteína BigR de *A. tumefaciens* também age como um forte repressor transcricional, com semelhante sistema de regulação e sítio de ligação ao DNA. Entretanto, BigR não parece funcionar como sensor de metal ou de antibiótico, como predito originalmente (Simpson *et al.*, 2000). Apesar de diferentes possibilidades terem sido testadas, a função biológica

do operon regulado por BigR permanece desconhecida e ainda não está claro qual sinal seria necessário para ligar BigR e desreprimir a transcrição. É interessante notar, entretanto, que o crescimento de células de *A. tumefaciens* e *X. fastidiosa* em condições de biofilme bacteriano causa desrepressão do operon. Células mutantes de *A. tumefaciens* deficientes em BigR também apresentam atividade aumentada do operon e maior formação de biofilme, tanto em lâmina de vidro como em raiz de tabaco. Uma vez que *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* necessitam de adesão à superfície de plantas para iniciar a colonização é possível que este operon esteja envolvido com aderência celular ou formação de biofilme.

ARTIGO I:

**BigR, a Transcriptional Repressor from Plant-Associated Bacteria,
Regulates an Operon Implicated in Biofilm Growth**

Rosicler L. Barbosa and Celso E. Benedetti

Journal of Bacteriology (2007) 189: 6185-6194

BigR, a Transcriptional Repressor from Plant-Associated Bacteria, Regulates an Operon Implicated in Biofilm Growth[▽]

Rosicler L. Barbosa and Celso E. Benedetti*

Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, São Paulo, CP6192, Brazil

Received 5 March 2007/Accepted 15 June 2007

Xylella fastidiosa is a plant pathogen that colonizes the xylem vessels, causing vascular occlusion due to bacterial biofilm growth. However, little is known about the molecular mechanisms driving biofilm formation in *Xylella*-plant interactions. Here we show that BigR (for “biofilm growth-associated repressor”) is a novel helix-turn-helix repressor that controls the transcription of an operon implicated in biofilm growth. This operon, which encodes BigR, membrane proteins, and an unusual beta-lactamase-like hydrolase (BLH), is restricted to a few plant-associated bacteria, and thus, we sought to understand its regulation and function in *X. fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. BigR binds to a palindromic AT-rich element (the BigR box) in the *Xylella* and *Agrobacterium blh* promoters and strongly represses the transcription of the operon in these cells. The BigR box overlaps with two alternative –10 regions identified in the *blh* promoters, and mutations in this box significantly affected transcription, indicating that BigR competes with the RNA polymerase for the same promoter site. Although BigR is similar to members of the ArsR/SmtB family of regulators, our data suggest that, in contrast to the initial prediction, it does not act as a metal sensor. Increased activity of the BigR operon was observed in both *Xylella* and *Agrobacterium* biofilms. In addition, an *A. tumefaciens bigR* mutant showed constitutive expression of operon genes and increased biofilm formation on glass surfaces and tobacco roots, indicating that the operon may play a role in cell adherence or biofilm development.

Xylella fastidiosa is a plant pathogen that displays a broad host range and causes diseases in various economically important plants including citrus variegated chlorosis, Pierce’s disease of grapevines, and leaf scorch of coffee (4, 9, 11). The bacterium is transmitted from plant to plant by specific insect vectors and colonizes the xylem vessels, leading to water and nutrient stress (2). The molecular mechanisms involved in the development of citrus variegated chlorosis symptoms are not well understood, but it is currently assumed that symptoms are caused by vascular occlusion of the xylem vessels due to bacterial biofilm formation (12, 20).

A molecular approach to better understanding of the complex biological behavior of *X. fastidiosa* and its interaction with citrus plants began with the sequencing of its genome (26). However, despite the availability of several *X. fastidiosa* genomes, the understanding of *X. fastidiosa* pathogenicity is still limited, in part by the fact that half of the *Xylella* genes encode hypothetical proteins (26). In addition, *X. fastidiosa* requires special growth conditions, and most strains that are pathogenic to citrus are not amenable to genetic manipulations. Thus, the structural and functional characterization of *Xylella* proteins with no assignable functions has gained increased attention in recent years.

The genome analysis of the citrus 9a5c strain identified a number of transcriptional factors with functions possibly associated with adaptation and pathogenicity (26). One of these factors is the XF0767 gene product, annotated as a “transcriptional regulator of the ArsR family” (26). Members of this family are metal sensors with a helix-turn-helix (HTH) DNA-binding domain that

control metal resistance in bacteria (3). Interestingly, the XF0767 gene is located in an operon comprising four other open reading frames (ORFs) (26), none of which, nevertheless, appears to encode proteins related to metal reductases, thionins, or metal efflux pumps, normally found in bacterial metal detoxification operons (3). Instead, the *Xylella* operon encodes putative membrane proteins (XF0766 to XF0764) and a hydrolase (XF0768) belonging to the metallo-beta-lactamase superfamily, here designated beta-lactamase-like hydrolase (BLH).

We were interested in studying the operon comprising XF0768 to XF0764 because this gene cluster is found conserved in only four plant-associated bacteria, including *Agrobacterium tumefaciens*, and it appears to share features of both metal and antibiotic resistance operons; however, its biological function is unknown. The XF0767 protein shows identity to metal sensors and MarA (23), a transcriptional regulator for multiple antibiotic resistance (17, 25), whereas BLH, although similar to beta-lactamases, is an unusual protein in the sense that it carries a domain of unknown function (DUF442) fused to a beta-lactamase domain. This DUF442-beta-lactamase domain architecture is restricted to BLHs and is exclusively found in the operons of *Xylella* and related *Rhizobiaceae*, which suggests that BLH may have a novel hydrolytic activity that would be connected to a plant-associated lifestyle (27).

As a first approach to characterizing this gene cluster, we describe its regulation by the XF0767 protein. In this study we show that the product of the XF0767 gene, which we named BigR (for “biofilm growth-associated repressor”), encodes a novel HTH repressor that binds to a palindromic AT-rich sequence spanning the –10 region of the *blh* promoter and blocks transcription of the operon in both *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens*. Although the biological role of the BigR operon is

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, R. Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, São Paulo, CP6192, CEP 13084-971, Brazil. Phone: 55 19 35121111. Fax: 55 19 35121006. E-mail: celso@lnls.br.

[▽] Published ahead of print on 22 June 2007.

currently unknown, we present evidence indicating that BigR affects bacterial biofilm growth.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial growth conditions. *Escherichia coli* cells were grown in LB (24) at 37°C with the appropriate antibiotics. *X. fastidiosa* strains 9a5c and J1a12 were grown in PW medium (10) at 28°C, whereas *A. tumefaciens* (C58) was grown in YEP or M9 medium (24) at 28°C in the presence of the required antibiotics.

Cloning of BigR in bacterial expression vectors. The XF0767 gene (NP_298057) was amplified from *Xylella* genomic DNA with primers 5'-CCATGGTGAACGAAATGCGAG-3' and 5'-CTCGAGTACGCGCTGTTCTC-3'. PCR products were subcloned into pET28a (Novagen) for native BigR expression. The reverse oligonucleotide 5'-CTCGAGCGCCTGTTCTCCTGTGC-3' was used to create the pET28-BigR6his construct. To obtain the 12-amino-acid N-terminal deletion (Δ BigR), pET28-BigR and pET28-BigR6his were cut with NdeI/XhoI and inserted into pET29a (Novagen), generating Δ BigR and Δ BigR6his.

PCR amplification of promoter regions and reporter gene construction. A 400-bp fragment upstream of the first ATG codon of *Xylella blh* was cloned into pGemT, linearized with ApaI, and religated, generating the 115-bp *blh* promoter (pxf115). A shorter fragment, amplified from pGem-pxf115 with primer SP6 and 5'-GATTTTGTCTGCAAGGATG-3', was also cloned (pGem-pxf90). To obtain the reporter genes for *E. coli* assays, an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene was inserted into pGem-pxf115 with NcoI/NotI, generating pGem-pxf115GFP. Similarly, a 145-bp fragment upstream of *A. tumefaciens blh* was amplified from C58 genomic DNA with primers 5'-GGGCCCGCCTCTAGAA TCTC-3' and 5'-CTTACGGCCTCCATGGCTTC-3' and was cloned upstream of EGFP (pGem-pat145GFP).

The reporter plasmids used in *Xylella* and *Agrobacterium* cells were prepared as follows. The pxf115GFP fragment cut with ApaI/SalI was inserted into the pSP3 vector (8), generating pSP-pxf115GFP, whereas pat145GFP cut with XbaI/SacI was inserted into pBI121 (Clontech), generating pBI-pat145GFP. To produce reporter plasmids carrying mutations in the *blh* promoters, complementary oligonucleotides carrying mutations within the BigR box (see Fig. 6A) were annealed and cloned in fusion with EGFP. All constructs were verified by DNA sequencing.

Protein expression and purification. *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pET constructs were grown at 37°C under agitation, and proteins were expressed by the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.4 mM) and purified by standard nickel affinity chromatography. For the expression of native BigR and Δ BigR, cell extracts were loaded in a Q-Sepharose FF column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) and 0.5 M dithiothreitol (DTT). The proteins were eluted with a linear gradient of 0 to 1 M NaCl in the same buffer. Ammonium sulfate at a final concentration of 1 M was added, and the mixture was loaded into a phenyl-Sepharose HP column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.5 M DTT, and 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The proteins were eluted in a linear gradient of 1 to 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the same buffer. Δ BigR was further purified on a Superdex G75-16/60 column (Amersham Biosciences). The eluted proteins were concentrated and dialyzed against appropriate buffers, and their purity was estimated to be >97% by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

EMSA. Five DNA probes, named 115, 90, 80, 60, and TATA, were prepared for electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The promoter fragments of 115 bp and 90 bp were excised from the plasmids and labeled by a 3'-end-filling reaction (24). The 80-bp probe was amplified by PCR and labeled with the Klenow fragment, whereas the 60-bp probe and the wild-type and mutated TATA probes were prepared by annealing and subsequent labeling of the complementary oligonucleotides (24).

Purified proteins (40 pmol) were incubated on ice for 15 min in the binding buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 0.025 U poly(dI-dC), 2.5% glycerol]. Each probe (30 fmol) was added, and the final mixture was incubated for a further 15 min on ice and resolved on a 6% acrylamide gel (24).

DNase I footprint analysis. The 115-bp promoter fragment of pGem-pxf115 was amplified using the *blh* reverse primer (5'-GATGTCTACTATTCCTCATG G-3') and a T7 primer labeled with [γ - ^{32}P]ATP. The purified fragment was incubated with different amounts of BigR6his under the same conditions described for EMSA. The DNase I footprint reaction was performed according to standard procedures (24). A sequencing reaction of pGem-pxf115 was carried out using the T7 sequencing kit (Amersham Biosciences), and the samples were separated in a denaturing sequencing gel (24).

CD spectroscopy. Circular dichroism (CD) measurements of purified BigR and the TATA probe were carried out on a JASCO J-810 spectropolarimeter at 22°C. The spectra were recorded in a 1-mm optical path cell with a wavelength range from 190 to 320 nm, a bandwidth with a step size of 0.5 nm, and a 50-nm $\cdot$ min $^{-1}$ scan speed. Purified BigR (2 nmol) and the TATA probe (1 nmol) were dissolved separately in 0.2 mM HEPES (pH 8.0)–5 mM NaCl or were combined at the same ratio. For each measurement, the mean values for four spectra were taken to improve the signal-to-noise ratio, and each spectrum was corrected against the blank and analyzed by using the software provided by JASCO.

Transcription start site mapping. The transcription start sites of the *Xylella* and *Agrobacterium blh* promoters were determined by rapid amplification of 5' cDNA ends (5' RACE) (13). Total RNA extracted with RNeasy (QIAGEN) was treated with DNase I and reverse transcribed with specific *blh* internal primers. After PCR amplifications, several independent RACE products were cloned and sequenced.

Fluorimetric assays and fluorescence microscopy. Bacterial cells were pelleted by centrifugation and lysed in 0.5 ml of B-Per reagent (Pierce) containing lysozyme (100 μ g) and DNase I (5 U). The suspension was incubated at room temperature for 10 min and centrifuged to remove insoluble materials. The protein concentration in the supernatant was measured with the bicinchoninic acid reagent (Pierce). The supernatant was analyzed in an AMINCO Bowman fluorimeter with the excitation and emission wavelengths set at 465 nm and 510 nm, respectively. Alternatively, bacterial cells were washed in sterile water and visualized with a Nikon Eclipse E600 fluorescent microscope using the B-2E/C fluorescein isothiocyanate filter.

Bacterial biofilms were grown on the surfaces of glass coverslips placed vertically inside test tubes. Cells were inoculated at an initial optical density (OD) of 0.05 into YEP medium and then incubated at 100 rpm and 30°C for 24 or 36 h. Coverslips were removed, stained by incubation in a 0.1% crystal violet solution for 1 min, and rinsed twice in fresh water. Stained biofilms were solubilized with dimethyl sulfoxide, and absorbance at 600 nm (A_{600}) was measured. The amount of biofilm was estimated by the ratio of the absorbance of the stained biofilm to the turbidity (OD at 600 nm [OD_{600}]) of the planktonic culture (A_{600}/OD_{600}) (22).

Plant inoculations. Sweet orange (*Citrus sinensis*) leaves were infiltrated with suspensions (1.5 OD_{600} units) of *Xylella* J1a12 carrying pSP-pxf115GFP, whereas tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves were infiltrated with suspensions (0.8 OD_{600} unit) of *Agrobacterium* C58 carrying pBI-pat145GFP. Bacterial cells were recovered from the infiltrated leaf sectors at different times after bacterial infiltration and were visualized by fluorescent microscopy. For virulence assays, a crown gall-inducing *A. tumefaciens* strain transformed with pBI-pat145GFP was applied to the base of detached *Kalanchoe linearifolia* leaves kept at 25°C under fluorescent light and high relative humidity. After 20 days, tissues with induced crown galls were sliced and analyzed by fluorescent microscopy.

Agrobacterium C58 cells were attached to roots by using tobacco seedlings germinated in Murashige and Skoog (MS) medium (Sigma). Roots from 3-week-old seedlings were excised and incubated in M9 medium containing *Agrobacterium* C58 reporter cells at a final OD_{600} of 0.05 for 24 h at 28°C. The roots were washed in sterile water prior to visualization by fluorescence microscopy. To estimate the number of cells that remained attached to the root surfaces, washed roots were sonicated in water for 5 min and plated on YEP medium in serial dilutions.

Generation of *A. tumefaciens* insertion mutants and quantitative PCR (qPCR). BigR (NCBI no. AAK89928) and BLH (AAK89929) genes from *A. tumefaciens* (C58) and the neomycin phosphotransferase gene from pBI121 were cloned into pGem-T and sequenced. The neomycin phosphotransferase gene was inserted into the internal NcoI/SalI sites of *bigR* and the SphI site of *blh*. The constructs were subcloned into the pOK1 suicide plasmid (15) and moved into C58 cells. Bacterial cells were grown on kanamycin (50 mg/liter) and subsequently on 5% sucrose to select double recombination mutants, which were verified by PCR and Southern blotting (24).

DNase I-treated RNA from wild-type and *bigR* mutant cells were reverse transcribed with primers specific to the gene for membrane protein 1. The expression levels of *blh* were measured by qPCR using an *A. tumefaciens gapdh* gene as an internal control. Reactions were performed in triplicate using the SYBR green mix, and the results were analyzed with 7500 System software (Applied Biosystems) using the relative quantification mode.

RESULTS

BigR is a novel HTH protein that binds to the DNA region upstream of the *Xylella* XF0768-XF0764 operon. Protein sequence alignment shows that the predicted product of the XF0767 gene (BigR), identified from a conserved operon in *X.*

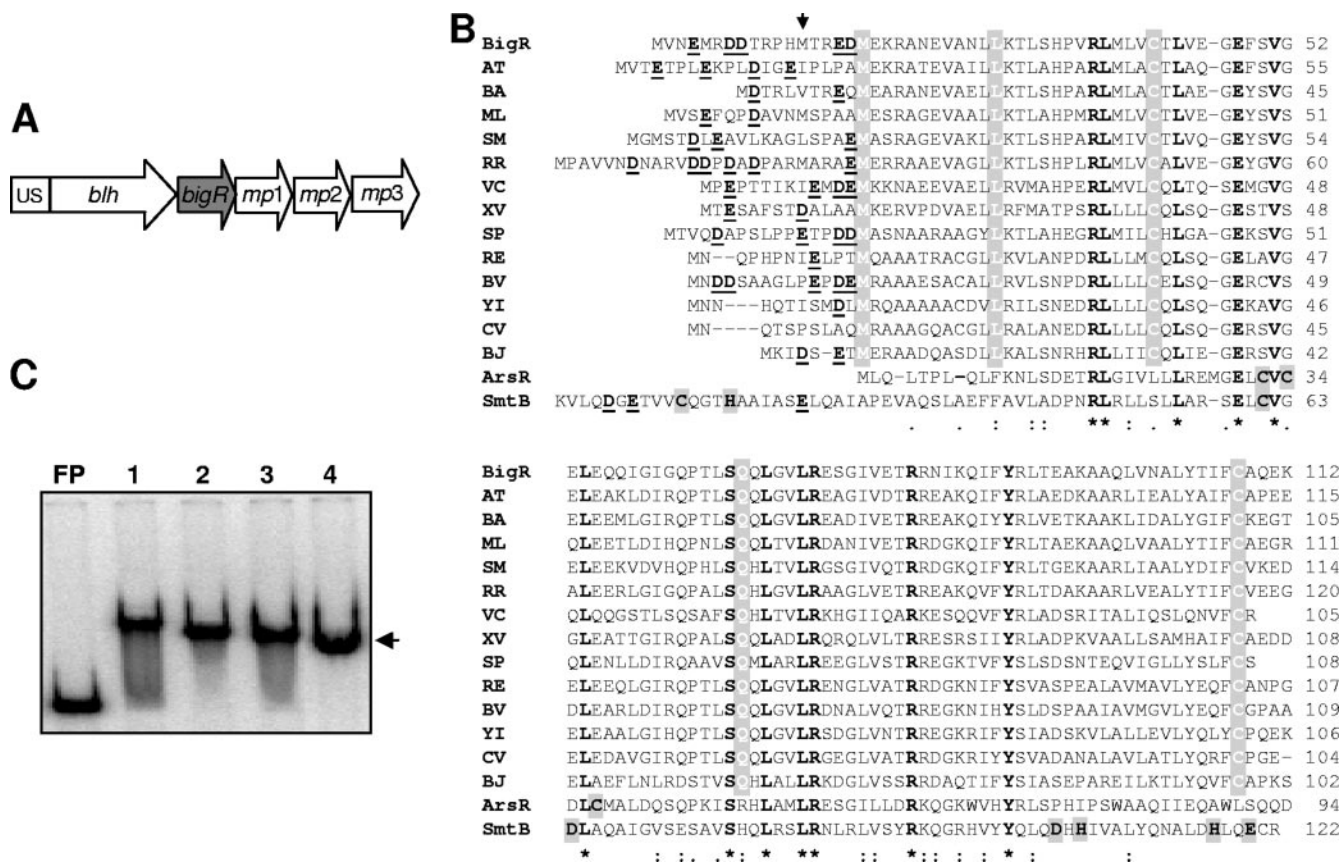


FIG. 1. BigR is homologous to prokaryotic HTH transcriptional factors and binds to upstream sequences (US) of its own operon. (A) Schematic view of the *Xylella* XF0768-XF0764 operon, including genes encoding BigR, putative membrane proteins 1 through 3, and a hydrolase (*blh*). (B) Sequence alignment between BigR and putative members of the ArsR/SmtB family, generated by ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>). BA, *Brucella abortus* (NCBI no. AAX76167); ML, *Mesorhizobium loti* (NP_103569); SM, *Sinorhizobium meliloti* (NP_435817); AT, *Agrobacterium tumefaciens* C58 (AAK89928); RR, *Rhodospirillum rubrum* (ZP_00268696); VC, *Vibrio cholerae* (NP_233031); XV, *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (YP_364177); RE, *Ralstonia eutropha* (ZP_00171423); BV, *Burkholderia vietnamiensis* (ZP_00422748); YI, *Yersinia intermedia* (ZP_00831742); CV, *Chromobacterium violaceum* (NP_899754); BJ, *Bradyrhizobium japonicum* (NP_772413); SP, *Silicibacter pomeroyi* (YP_165254). ArsR is from *Escherichia coli* (P15905), and SmtB is from *Synechococcus elongatus* (P30340). Invariable residues are boldfaced; asterisked residues are restricted to the HTH domain. Amino acids that are conserved only in the uncharacterized members of the ArsR/SmtB family (all except ArsR and SmtB) are shaded with white letters. Acidic residues in the N termini are boldfaced and underlined, and the residues responsible for metal coordination in ArsR and SmtB are shaded with boldface letters. The arrow points to the initial methionine of Δ BigR. (C) EMSA showing that BigR (lanes 1 and 2) and Δ BigR (lanes 3 and 4), with (lanes 1 and 3) or without (lanes 2 and 4) the His₆ tag, recognize the US of the *blh* gene. Arrow indicates shifted bands. FP, free probe.

fastidiosa (26) (Fig. 1A), is homologous to prokaryotic HTH transcriptional regulators of the ArsR/SmtB family (Fig. 1B). BigR is 26% identical to ArsR and SmtB, and the greatest similarity to ArsR/SmtB is found within the HTH core, which includes several invariable residues (Fig. 1B). On the other hand, BigR shows stronger identity to a large group of uncharacterized proteins found in plant pathogens and symbionts, human pathogens, and other bacteria. In particular, BigR is 64% identical to its *A. tumefaciens* homolog (Fig. 1B). Although most of these proteins have been annotated as transcriptional factors of the ArsR family, it is likely that they represent a new HTH subfamily of ArsR regulators. This assumption is based on the fact that BigR and the uncharacterized ArsR/SmtB-like proteins whose sequences are shown in Fig. 1B have an acidic N terminus and a number of conserved residues (M18, L29, C42, Q67, and C108 of BigR) not found in ArsR or SmtB.

Recombinant BigR proteins were purified for functional studies. To analyze the requirement of the acidic N terminus for protein activity, a shorter version of BigR lacking the first 12 nonconserved residues, designated Δ BigR (Fig. 1B), was made. Since the predicted function of BigR was to repress transcription, we anticipated that it might bind to regulatory elements located upstream of the *blh* gene (Fig. 1A). Gel shift assays showed that both variants of recombinant BigR bound to the DNA fragment corresponding to the *blh* promoter, indicating that the N-terminal deletion in Δ BigR or the His₆ tag in the C terminus was not required for DNA interaction (Fig. 1C), which is consistent with the idea that the region responsible for DNA binding lies within the HTH domain.

BigR binds to an AT-rich palindrome, and this binding alters its secondary structure. To finely map the region of the *blh* promoter that interacted with BigR, a series of promoter fragments for the EMSA experiments was generated. In addi-

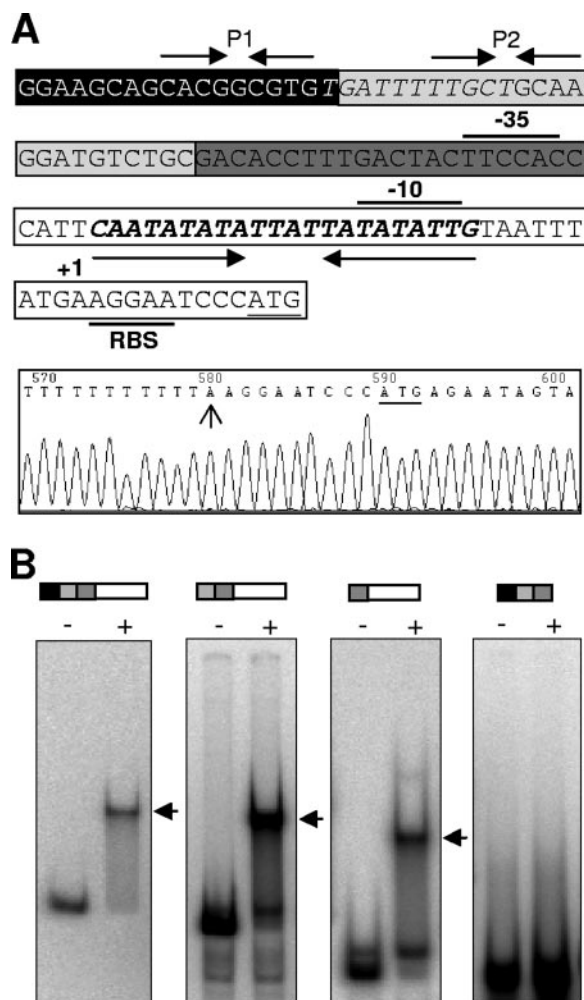


FIG. 2. BigR binds to an AT-rich element spanning the -10 region of the *Xylella blh* promoter. (A) Nucleotide sequence of the promoter showing the -35 and -10 elements, the putative ribosome-binding site (RBS), and the initial ATG codon (underlined). The transcription start site determined by RACE is indicated by the arrow in the DNA sequencing electropherogram. The -10 region overlaps with the dyad symmetry sequence (bold italics) of an imperfect palindrome (opposing arrows), the BigR box. Two additional palindromes, P1 and P2, are indicated by opposing arrows. P2 overlaps with a sequence (italics) that is similar to regulatory elements bound by MarA and ArsR (23, 29). (B) EMSA experiments with BigR6his (+) and the different DNA probes, represented by bars corresponding to the promoter elements shown in panel A (black, P1; light gray, P2; dark gray, -35 element; white, -10 element plus RBS), showing that the protein binds to the promoter fragments harboring the AT-rich sequence. Shifted bands (arrows) and the free probe (-) are indicated.

tion, the transcription start site of the *Xylella blh* promoter was determined, allowing the location of the -10 and -35 regions (Fig. 2A). EMSA performed with the different promoter fragments showed that BigR interacted with DNA probes containing the AT-rich sequence spanning the -10 region (Fig. 2B). Surprisingly, this sequence shows the dyad symmetry of a long, imperfect palindrome (CAATATATATTATTATATATTG) that incorporates two adjacent TATATATT elements, one of which overlaps with the -10 region (Fig. 2A). A footprint assay further revealed that BigR binds exactly to the palin-

dromic AT-rich element, termed the "BigR box" (Fig. 3A). In addition, a double-stranded DNA corresponding to the BigR box sequence (TATA probe) was shifted by BigR, and this binding was abolished when the unlabeled probe was used in a competition EMSA, thus confirming that BigR binds to the BigR box (Fig. 3B).

The interaction of BigR with the TATA probe was further evidenced by CD. The CD spectrum of BigR shows two minimum points at 208 and 222 nm, indicating high contents of α -helices, consistent with an HTH domain in the protein. When BigR was mixed with the TATA probe, the resulting spectrum differed significantly from the theoretical sum of the protein and DNA spectra measured separately, showing that BigR changes its secondary structure upon interaction with DNA (Fig. 3C). In fact, the signal increases at 208 and 222 nm in the presence of DNA clearly show that BigR gained secondary structure when in a complex with DNA (Fig. 3C).

The BigR box is conserved in promoters of homologous operons from plant-associated bacteria. The BigR operon is conserved in *X. fastidiosa*, *A. tumefaciens*, *Mesorhizobium loti*, and *Sinorhizobium meliloti*; however, related operons with different gene compositions and synteny are also found in other bacterial species (Fig. 4A). The upstream sequences of *blh* genes from related operons were aligned, and a consensus sequence for the BigR box was derived (Fig. 4B). Interestingly, the consensus shows two invariable TATA elements spaced by 8 to 10 nucleotides (Fig. 4B), and one of them matches the -10 region of the *Xylella blh* promoter (Fig. 2A), suggesting that these conserved elements are important for operon regulation. In agreement with this idea, two -10 regions were mapped within the BigR box in the *A. tumefaciens blh* promoter, and both closely coincide with the two invariable TATA elements of the consensus (Fig. 4C). Although a single transcription start site was identified in the *Xylella* promoter, an additional site similar to the *Agrobacterium* promoter is predicted, since a putative -35 region (TTGACT) is separated by 20 nucleotides from the upstream TATA element that does not overlap with the mapped -10 region (Fig. 2A). Taken together, the results indicate that at least in *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens*, the operon is similarly regulated. Accordingly, the *Xylella* BigR protein binds to the *Agrobacterium blh* promoter under the same conditions under which it binds to the *Xylella* promoter (Fig. 4D).

BigR functions as a transcriptional repressor. To investigate the in vivo role of BigR as a transcriptional repressor, *E. coli* cells were transformed with reporter plasmids carrying an EGFP gene under the control of the *Xylella* or the *Agrobacterium blh* promoter. These cells exhibited high levels of EGFP expression, indicating strong activity of both native promoters in the absence of BigR. However, fluorescence was remarkably reduced when BigR was expressed in the cells, indicating that the protein acts as a repressor in vivo (Fig. 5A). The fact that BigR down-regulated EGFP expression driven by the *Agrobacterium blh* promoter is consistent with its ability to bind this promoter in vitro (Fig. 4D).

When *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens* cells were transformed with the reporter plasmids, low levels of EGFP fluorescence were detected relative to the levels observed in *E. coli* carrying the reporters but lacking the repressor (Fig. 5B). The low transcriptional activities of the *blh* promoters detected in

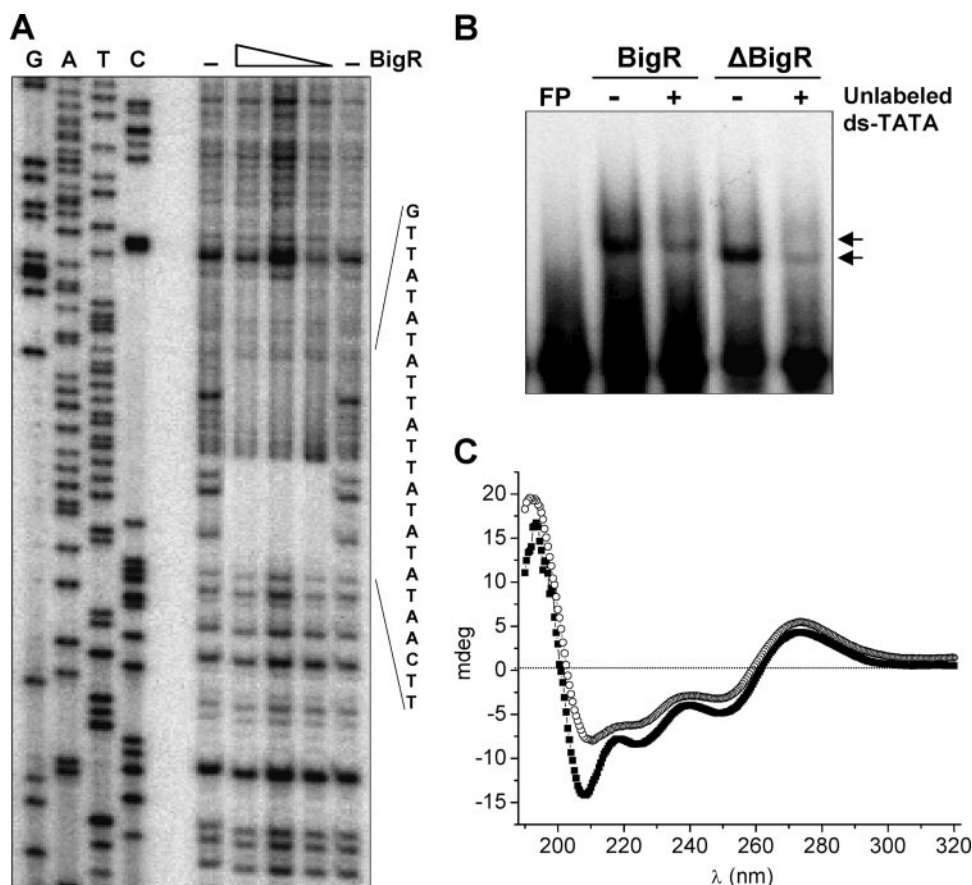


FIG. 3. BigR binds to the palindromic AT-rich sequence, and this alters its secondary structure. (A) Footprint analysis of the *Xylella blh* promoter in the presence of decreasing amounts of BigR relative to that with a no-protein control (–). The footprinted area is read from the sequencing reaction on the left. (B) Gel shift using the double-stranded (ds) TATA probe (the BigR box sequence). A 10-fold excess (+) of the unlabeled ds-TATA probe was able to displace the labeled probe shifted by both BigR and Δ BigR (arrows). FP, free probe. (C) CD analysis of BigR in the presence of the ds-TATA probe. The resulting spectrum of the mixed protein and DNA (filled squares) differs from the theoretical sum (open circles) of the spectra measured separately, indicating changes in the secondary structure of the protein upon interaction with the DNA. The two minimum points at 208 and 222 nm also indicate that BigR has a high content of α -helices.

X. fastidiosa and *A. tumefaciens* are consistent with the presence of the repressor in these cells.

Mutations in the BigR box affected repressor binding and transcription from *blh* promoters. Since the BigR box overlapped with the –10 regions in both the *Xylella* and the *Agrobacterium blh* promoter, we tested its requirement for promoter activity in vivo. Indeed, nucleotide substitutions or deletions in the conserved TATA elements of both promoters (Fig. 6A) significantly affected transcription of the reporter genes in *E. coli*. The promoter mutants that retained one of the –10 elements still showed residual transcriptional activity similar to that of promoters lacking the full BigR box, suggesting that both invariable TATA elements are required for promoter activity (Fig. 6B). As expected, the mutations also affected repressor binding (Fig. 6C), supporting the idea that the BigR box is required for BigR and RNA polymerase binding.

The BigR operon is transcribed in bacterial biofilms. Due to similarities found between BLH and bacterial beta-lactamases, glyoxalases II (GloB), and lactonases, the *Xylella* and *Agrobacterium* reporter cells were grown in the presence of several beta-lactams, S-lactoylglutathione, or acyl-homoserine lactone

(AHL), without, however, any significant changes in cell fluorescence (data not shown). In addition, the fluorescence levels of the reporter cells were not affected by treatments with different metal ions (data not shown), indicating that the operon is not involved in metal resistance. We noticed, nevertheless, that both *Xylella* and *Agrobacterium* reporter cells grown as biofilms showed increased fluorescence relative to that of cells that remained in suspension (Fig. 7). To determine whether bacterial cells attached to a plant surface would show a similar response, the *Agrobacterium* reporter cells were allowed to adhere to tobacco roots. Cells adherent to the root surfaces also showed increased fluorescence relative to that of cells remaining in suspension (Fig. 7).

Disruption of the *A. tumefaciens bigR* gene altered biofilm growth. To further analyze the biological function of the operon, *bigR* and *blh* were mutated by homologous replacement with a copy of the genes interrupted by a kanamycin resistance gene. Due to difficulties in obtaining insertion mutants in *Xylella*, only *Agrobacterium* mutants were isolated. Independent mutants were shown to have identical single-kanamycin-cassette insertions within the *bigR* or *blh* gene by PCR

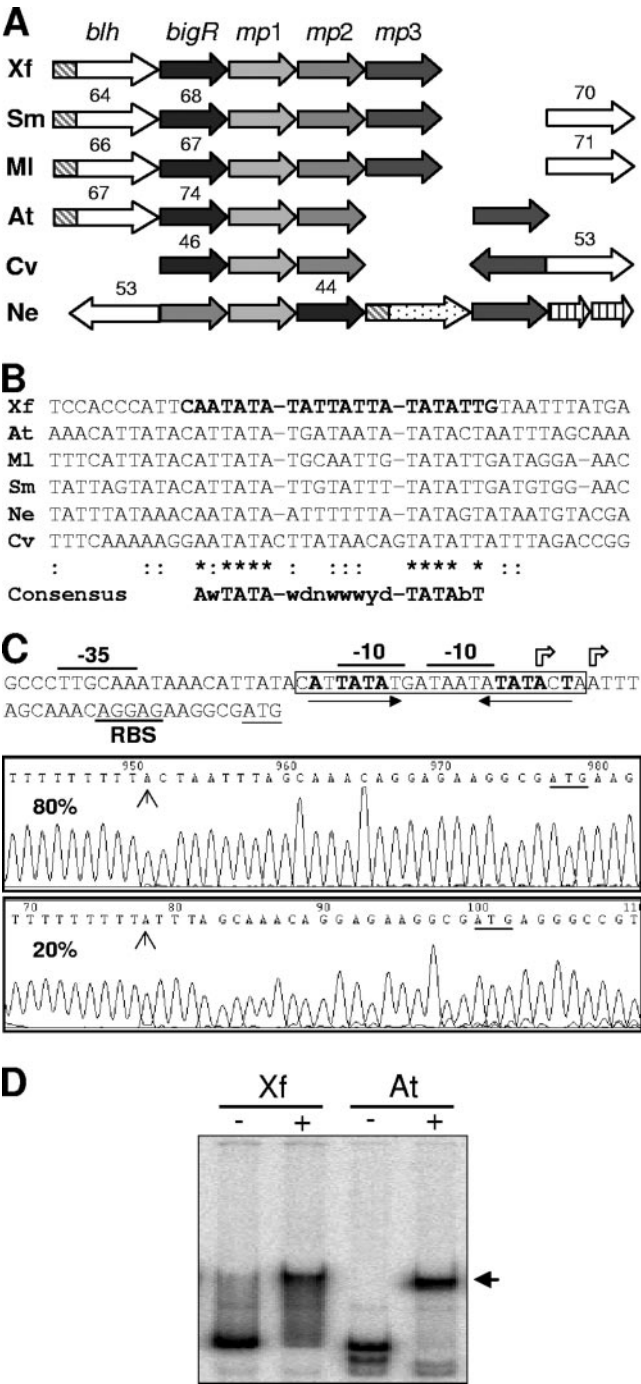


FIG. 4. The BigR box is conserved in promoters of related operons found in plant-associated bacteria. (A) Schematic view of BigR operons from *X. fastidiosa* (Xf), *A. tumefaciens* (At), *S. meliloti* (Sm), *M. loti* (Ml), *Chromobacterium violaceum* (Cv), and *Nitrosomonas europaea* (Ne). Joined arrows represent ORFs clustered into operons, and arrows with the same shading indicate orthologous ORFs. Open arrows fused to hatched rectangles (DUF442) represent conserved *blh* genes, whereas *blh* without DUF442 is shown by open arrows only. Striped arrows, ORFs unique to the *N. europaea* operon, which also harbors a DUF442 hydrolase (stippled arrow). Numbers above ORFs are the percentages of identity between the *Xylella* BLH/BigR proteins and their orthologs. (B) Nucleotide sequence alignment of upstream sequences of the *blh* genes showing the BigR box consensus. (C) Nucleotide sequence of the *A. tumefaciens blh* promoter showing two transcription start sites (arrows) and other promoter elements, including

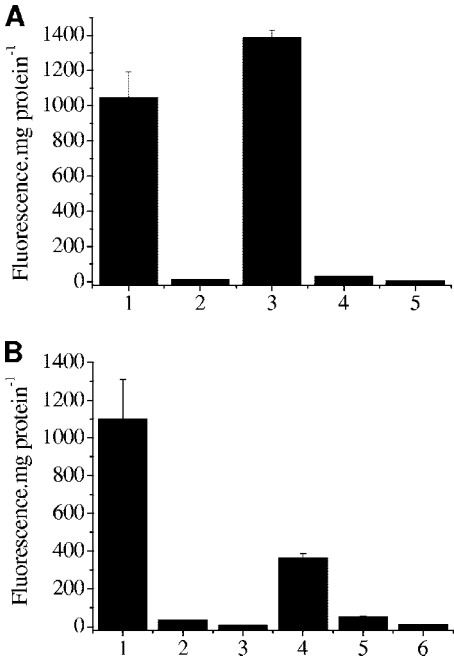


FIG. 5. BigR functions as a transcriptional repressor. (A) EGFP fluorescence in cell extracts of *E. coli* carrying the *Xylella* pGem-pxf115GFP (bars 1 and 2) or the *Agrobacterium* pGem-pat145GFP (bars 3 and 4) reporter plasmid. Cells carrying the reporters and the pET28-BigR plasmid (bars 2 and 4) showed a reduction in EGFP fluorescence relative to that for nontransformed cells (bar 5). (B) EGFP fluorescence in *E. coli* cells carrying the *Xylella* pSP-pxf115GFP (bar 1) or the *Agrobacterium* pBI-pat145GFP (bar 4) reporter plasmid relative to fluorescence levels driven by the same reporters in *Xylella* (bar 2) and *Agrobacterium* (bar 5) cells, respectively. The background fluorescence of nontransformed *Xylella* (bar 3) and *Agrobacterium* (bar 6) cells is shown. Results are means from three independent samples.

and Southern blotting (data not shown). The effects of these insertions were further evidenced with the reporter gene. The *bigR* insertion mutant exhibited sixfold-higher EGFP expression than controls (Fig. 8A), a finding that indicates a lack of repressor activity and thus confirms that BigR functions as a repressor. Accordingly, the expression level of *blh*, measured by qPCR, was much higher for the *bigR* insertion mutant (Fig. 8A). The *blh* mutant also showed a small (twofold) but significant increase in operon activity, indicating that disruption of the first ORF of the operon influenced the synthesis of the repressor (Fig. 8A).

To know whether these mutations would affect bacterial growth in suspension or in biofilms, growth curves in liquid medium and biofilm formation on glass coverslips and tobacco roots were compared for the mutants and wild-type cells. While the *bigR* and *blh* mutants displayed normal growth in suspension (Fig. 8B), the *bigR* mutant showed altered biofilm

the BigR box (boxed) and its AT-rich palindrome (opposing arrows). The frequencies of the two transcription start sites are given in the sequencing run diagrams. (D) EMSA performed with BigR (+) and the *X. fastidiosa* or *A. tumefaciens blh* promoter probe, showing the BigR shifted bands (arrow).

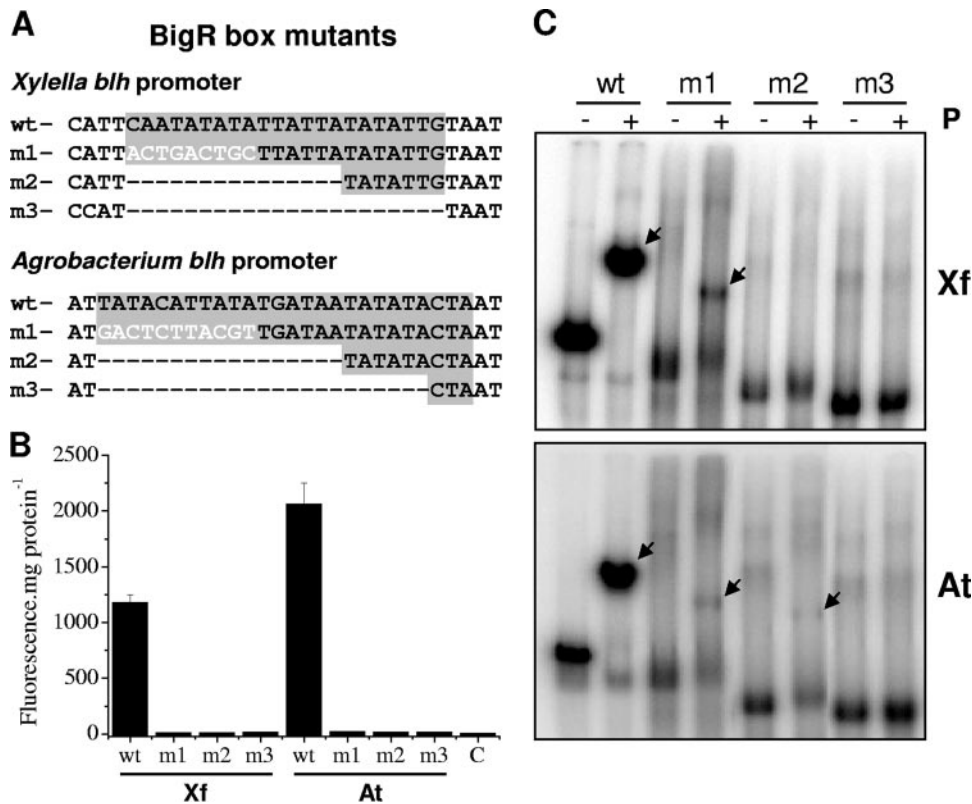


FIG. 6. Mutations in the BigR box affected repressor binding and transcription from *blh* promoters. (A) Mutations within the BigR boxes of the *Xylella* and *Agrobacterium blh* promoters represented by m1, m2, and m3 (negative controls) relative to the wild-type (wt) sequences. In the m1 mutant, the first half of the palindrome was replaced by an unrelated sequence (white letters), but one of the -10 elements and the spacing between the -10 and -35 regions were maintained, whereas in the m2 and m3 mutants, deletions were made in the BigR box. (B) EGFP fluorescence of cell extracts of *E. coli* transformed with the *X. fastidiosa* (Xf) or *A. tumefaciens* (At) reporter plasmid carrying a wt or mutated promoter, relative to the background fluorescence of untransformed cells (control [C]). Results are means from four independent samples. (C) EMSA using the wt probe or a mutant probe from the *X. fastidiosa* or *A. tumefaciens* promoter in the presence (+) or absence (–) of BigR protein (P), showing loss of DNA binding activity with the mutated sequences. Arrows point to shifted bands.

formation on glass surfaces and tobacco roots (Fig. 8C and D). On glass surfaces, the *bigR* mutant exhibited a significantly greater biofilm mass than the *blh* mutant or wild-type bacteria at 24 and 36 h of growth (Fig. 8C). Similarly, *bigR* mutants formed more biofilm mass on the surfaces of tobacco roots than wild-type or *blh* mutant cells (Fig. 8D). This finding is consistent with the increased operon activity in *A. tumefaciens* cells attached to the root surface (Fig. 7).

DISCUSSION

Nearly half of the *X. fastidiosa* genes encode proteins of unknown function (26). Here we describe the first molecular and functional characterization of a novel HTH factor from *X. fastidiosa* that controls the transcription of an operon also found in *A. tumefaciens* and other plant-associated bacteria. We demonstrate that BigR, initially assigned as a transcriptional regulator of the ArsR family (26), indeed functions as a transcriptional repressor but displays properties significantly different from those of ArsR proteins. We present evidence showing that the BigR binding site carries two conserved TATA elements that coincide with two alternative -10 regions in the *Xylella* and *Agrobacterium blh* promoters. Mutations in the BigR box significantly affected transcription and the DNA-

binding activity of the repressor, suggesting that BigR represses transcription by competing with the sigma 70 factor for the same promoter site, a mechanism of action common to many bacterial repressors (18).

Although the biological function of BigR is to repress transcription, it is not clear at this point whether a ligand is required to displace the repressor from DNA to allow transcription or whether the acidic N-terminal region of BigR would play a role in the binding of such a ligand, since this region is common to many BigR homologs and is not necessary for DNA binding. The hypothesis that BigR could function as a metal sensor similarly to ArsR/SmtB was investigated; however, several lines of evidence indicate that it probably does not function as such. For instance, BigR shares relatively low sequence identity with ArsR/SmtB, and the operon it regulates does not encode proteins related to metal resistance. In addition, the DNA-binding activities of BigR detected by EMSA, the in vivo activities of the operons, and the growth of the *bigR* and *blh* mutants were not influenced by metal ions (data not shown). Nevertheless, we cannot rule out the possibility that BigR is a metal ligand protein, and the roles of M18, C42, and C108, which are conserved in this group of repressors (Fig. 1B), deserve further study. These features and the existence of

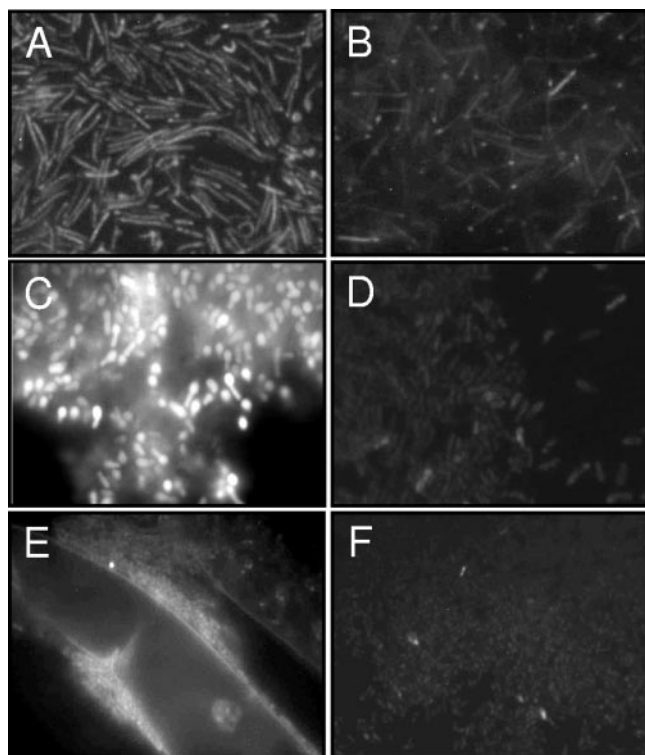


FIG. 7. EGFP fluorescence of bacterial reporter cells grown as biofilms compared to that of cells in suspension. *X. fastidiosa* (A and B) and *A. tumefaciens* (C and D) reporter cells were grown on the surfaces of glass slides (A and C) and washed in sterile water before visualization under the fluorescence microscope at $\times 1,000$ magnification. Planktonic cells (B and D) were pelleted and resuspended in a small volume of water prior to visualization to obtain a density of bacterial cells comparable to that of the biofilms. *A. tumefaciens* reporter cells attached to tobacco roots (E) showed increased EGFP fluorescence relative to that of nonattached cells (F) at $\times 100$ magnification.

BigR homologs in several bacterial species suggest that BigR and related proteins form a new HTH subfamily of ArsR regulators, in which BigR could become the founding protein, since it is the first member to be characterized.

The BigR operon is restricted to a few plant-associated bacteria, and curiously, it is missing in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, an important citrus pathogen most closely related to *X. fastidiosa* (7). Considering that almost 74% of the *Xylella* genes have homologs in *X. axonopodis* pv. citri (19), it is reasonable to suppose that the BigR operon might confer some kind of adaptation on *Xylella* that would be related to its lifestyle or mechanism of pathogenicity. It is particularly interesting that a related BigR operon is found in *Brucella suis*, an animal pathogen with a genome remarkably similar to those of *A. tumefaciens* and *M. loti* (21). *B. suis* is predicted to have the capacity to utilize plant-derived compounds and to survive in the soil for long periods (21). Thus, whether or not the BigR operon in *B. suis* is important for bacterial survival in the soil or in contact with plant material remains to be investigated.

Another interesting feature of the BigR operon is that some of its ORFs are unique to this gene cluster (Fig. 4A). For instance, the occurrence of DUF442 fused to the beta-lactamase/glyoxalase II domain is restricted to *X. fastidiosa*, *A. tu-*

mefaciens, *S. meliloti*, *M. loti*, *Rhizobium etli*, and *Rhizobium leguminosarum*. Thus, the unique combination of these protein domains might confer on BLH a new hydrolytic activity that would be particular to these bacteria (27). BLH also contains a zinc-binding motif (HxHxDH) that is conserved in members of the metallo-beta-lactamase superfamily (6), including GloB and lactonases. GloB participates in the detoxification of methylglyoxal, whereas lactonases are required for AHL hydrolysis and have been implicated in the quorum-quenching phenomenon (5, 28). We tested whether the substrates of these enzymes would activate the operon or displace BigR from DNA but obtained no positive results. In addition, both the *bigR* and the *blh* mutant exhibited growth similar to that of controls in the presence of AHL or at high cell densities (data not shown), an indication that BLH is not involved in a quorum-quenching phenomenon.

The idea of BLH functioning as an ordinary beta-lactamase was investigated by testing several beta-lactams for the activation of the operon, and antibiogram assays were performed to evaluate the sensitivities of the *bigR* and *blh* mutants to different classes of antibiotics, again with no positive results. Although the involvement of the operon in antimicrobial resistance cannot be ruled out, the available information suggests that BLH is not a typical beta-lactamase.

To test whether the operon would be active in response to a plant signal, the *Xylella* and *Agrobacterium* reporter cells were infiltrated into plant leaves; however, cells recovered from the infiltrated tissues exhibited less fluorescence than cultured cells (data not shown). Also, a crown gall-inducing strain of *A. tumefaciens* carrying the reporter plasmid showed no fluorescence in developed galls induced in *Kalanchoe* leaves, suggesting that the operon is not activated during infection. These results are consistent with the observation that the corresponding operon in *S. meliloti* (loci SMA1057 to SMA1050) is tightly repressed during nodulation in the host *Medicago truncatula* (1).

The fact that the operon is up-regulated in bacterial biofilms and in cells attached to root surfaces indicates that it may be important for cell adherence or biofilm development. This is consistent with the observation that the *bigR*-null mutant formed more biofilm mass than wild-type cells on both glass and root surfaces. Interestingly, one of the characterized *A. tumefaciens* mutants whose surface interactions are affected has a mutation in the *sinR* gene, an HTH transcriptional regulator of the FNR family. *sinR* is required for normal maturation of biofilms on both inert surfaces and plant surfaces (22). Curiously, *sinR* is located adjacent to a gene encoding a putative metal-dependent hydrolase containing an HxHxDH motif similar to BLH.

In *X. fastidiosa*, a number of mutations have recently been identified and shown to affect biofilm formation and cell aggregation (14, 16, 20). The *rpff* gene, for instance, is required for the synthesis of a diffusible signal molecule that mediates cell-cell signaling (20). The facts that biofilm formation by *rpff* mutants was affected in the insect foregut but not in the xylem (20) and that other factors such as type I pili (16) and adhesins (14) are also required for normal biofilm growth indicate that biofilm formation in *Xylella* depends on multiple components and is under very complex control mechanisms.

Surprisingly, biofilm growth was not affected in the *blh* mutant under the conditions tested. Since other regulatory pro-

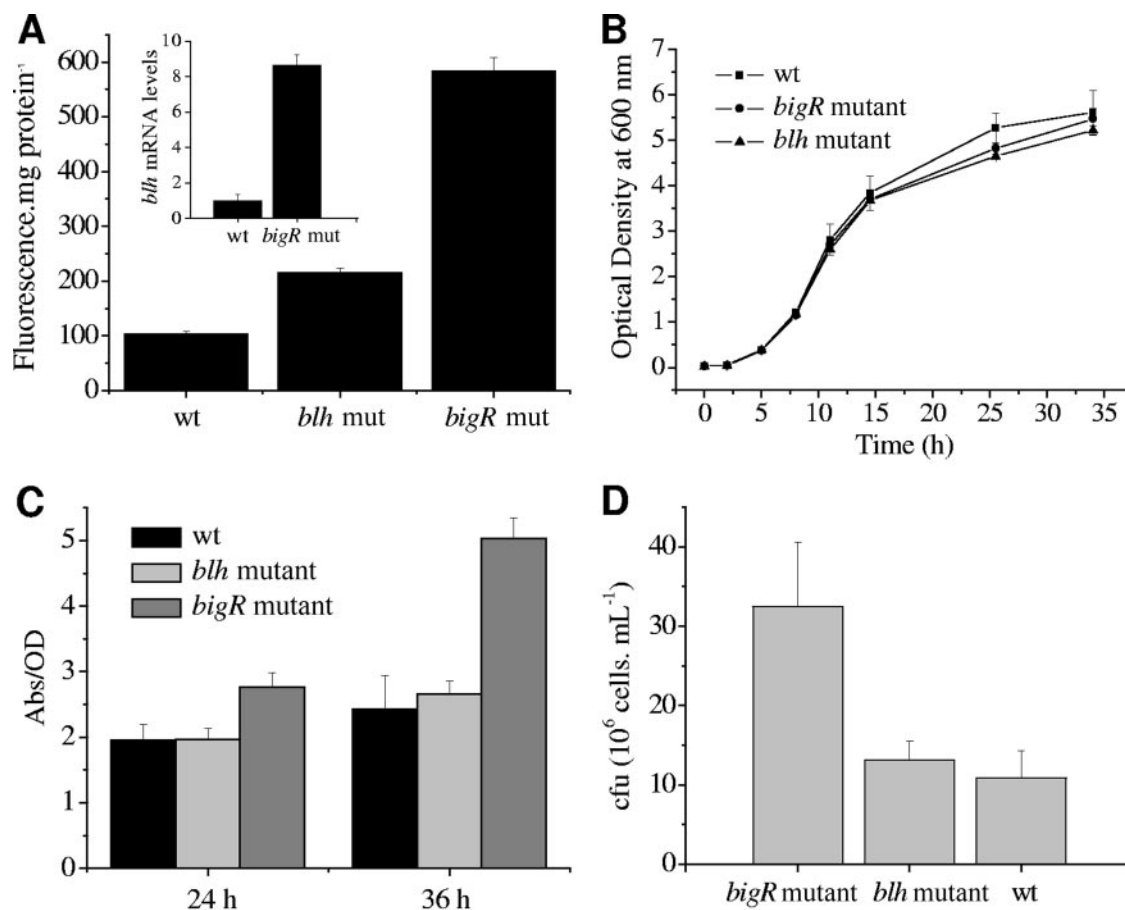


FIG. 8. Effects of *bigR* and *blh* gene disruption on operon activity and bacterial growth. (A) EGFP fluorescence levels measured in *A. tumefaciens* wild-type (wt), *blh* mutant (mut), and *bigR* mutant cells carrying the reporter plasmid. (Inset) Expression of *blh* in wt and *bigR* mutant cells, measured by qPCR. (B) Bacterial growth curves of wt, *blh* mutant, and *bigR* mutant cells grown in suspension, monitored by measuring the OD₆₀₀. (C) Comparison of biofilm formation by the *blh* or *bigR* mutant with that by wt cells, measured by the ratio of the *A*₆₀₀ of the stained biofilm to the turbidity (OD₆₀₀) of the planktonic culture (Abs/OD). Results are means from five independent samples. (D) Average number of *A. tumefaciens* cells (expressed in CFU) recovered from tobacco roots after bacterial coinoculation. Results are means from three independent replicates.

teins may influence biofilm formation in *A. tumefaciens* (22), it is possible that a *blh* mutant biofilm phenotype could not be clearly observed because of functional redundancy or an interplay of genes controlling biofilm growth and maturation. Further studies on the architecture and development of *bigR* and *blh* mutant biofilms may provide new insights into the function of the BigR operon.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marilis V. Marques for providing the pSP3 vector and Zildene G. Correa for DNA sequencing. We also thank Elaine Martins for helping with *X. fastidiosa* transformation and Jörg Kobarg for critical review of the manuscript.

This work was supported by FAPESP grants (03/08316-5, Smolbnet 00/10266-8, and Cepid 98/14138-2). Rosicler L. Barbosa and Celso E. Benedetti received fellowships from FAPESP and CNPq, respectively.

REFERENCES

- Barnett, M. J., C. J. Toman, R. F. Fisher, and S. R. Long. 2004. A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 16636–16641.
- Brlansky, R. H., I. W. Timmer, W. J. French, and R. E. McCoy. 1983. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. *Phytopathology* **73**:530–535.
- Busenlehner, L. S., M. A. Pennella, and D. P. Giedroc. 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:131–143.
- Chang, C. J., M. Garnier, L. Zreik, V. Rossetti, and J. M. Bové. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **27**:137–142.
- Chevrot, R., R. Rosen, E. Haudecoeur, A. Cirou, B. J. Shelp, E. Ron, and D. Faure. 2006. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:7460–7464.
- Daiyasu, H., K. Osaka, Y. Ishino, and H. Toh. 2001. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* **503**:1–6.
- da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. A. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergro, L. P. Ciapina, R. M. B. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. S. Ferreira, R. C. C. Ferreira, M. I. T. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, Jr., E. G. M. Lemos, M. V. F. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. B. N. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. M. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. M. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, Jr., A. Rossi, J. A. D. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. F. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. D. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P.

- Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459–463.
8. da Silva Neto, J. F., T. Koide, S. L. Gomes, and M. V. Marques. 2002. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**:105–110.
 9. Davis, M. J., A. H. Purcell, and S. V. Thomson. 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* **199**:75–77.
 10. Davis, M. J., B. C. Raju, R. H. Brlansky, R. F. Lee, L. W. Timmer, R. C. Norris, and R. E. McCoy. 1983. Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. *Phytopathology* **73**:1510–1515.
 11. de Lima, J. E. O., V. S. Miranda, J. S. Hartung, R. H. Brlansky, A. Coutinho, S. R. Roberto, and E. F. Carlos. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* **82**:94–97.
 12. de Souza, A. A., M. A. Takita, H. D. Coletta-Filho, C. Caldana, G. M. Yanai, N. H. Muto, R. C. de Oliveira, L. R. Nunes, and M. A. Machado. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**:341–353.
 13. Frohman, M. A., M. K. Dush, and G. R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8998–9002.
 14. Guilhabert, M. R., and B. C. Kirkpatrick. 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:856–868.
 15. Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas. 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* **29**:1379–1390.
 16. Li, Y., G. Hao, C. D. Galvani, Y. Meng, L. De La Fuente, H. C. Hoch, and T. J. Burr. 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* **153**:719–726.
 17. Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee, and J. L. Rosner. 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol. Microbiol.* **34**:431–441.
 18. Molina-Henares, A. J., T. Krell, M. Eugenia Guazzaroni, A. Segura, and J. L. Ramos. 2006. Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:157–186.
 19. Moreira, L. M., R. F. de Souza, N. F. Almeida, Jr., J. C. Setúbal, J. C. Oliveira, L. R. Furlan, J. A. Ferro, and A. C. R. da Silva. 2004. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**:163–184.
 20. Newman, K. L., R. P. Almeida, A. H. Purcell, and S. E. Lindow. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:1737–1742.
 21. Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, W. C. Nelson, B. Ayodeji, M. Kraul, J. Shetty, J. Malek, S. E. Van Aken, S. Riedmuller, H. Tettelin, S. R. Gill, O. White, S. L. Salzberg, D. L. Hoover, L. E. Lindler, S. M. Halling, S. M. Boyle, and C. M. Fraser. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13148–13153.
 22. Ramey, B. E., A. G. Matthyssse, and C. Fuqua. 2004. The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilm. *Mol. Microbiol.* **52**:1495–1511.
 23. Rhee, S., R. G. Martin, J. L. Rosner, and D. R. Davies. 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10413–10418.
 24. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 25. Schneiders, T., T. M. Barbosa, L. M. McMurphy, and S. B. Levy. 2004. The *Escherichia coli* transcriptional regulator MarA directly represses transcription of *purA* and *hdeA*. *J. Biol. Chem.* **279**:9037–9042.
 26. Simpson, A. J. G., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. C. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, M. H. Barros, E. D. Bonaccorsi, S. Bordin, J. M. Bové, M. R. S. Briones, M. R. P. Bueno, A. A. Camargo, L. E. A. Camargo, D. M. Carraro, H. Carrer, N. B. Colauto, C. Colombo, F. F. Costa, M. C. R. Costa, C. M. Costa-Neto, L. L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorri, A. P. Facincani, A. J. S. Ferreira, V. C. A. Ferreira, J. A. Ferro, J. S. Fraga, S. C. França, M. C. Franco, M. Frohme, L. R. Furlan, M. Garnier, G. H. Goldman, M. H. S. Goldman, S. L. Gomes, A. Gruber, P. L. Ho, J. D. Hoheisel, M. L. Junqueira, E. L. Kemper, J. P. Kitajima, J. E. Krieger, E. E. Kuramae, F. Laigret, M. R. Lambais, L. C. C. Leite, E. G. M. Lemos, M. V. F. Lemos, S. A. Lopes, C. R. Lopes, J. A. Machado, M. A. Machado, A. M. B. N. Madeira, H. M. F. Madeira, C. L. Marino, M. V. Marques, E. A. L. Martins, E. M. F. Martins, A. Y. Matsukuma, C. F. M. Menck, E. C. Miracca, C. Y. Miyaki, C. B. Monteiro-Vitorello, D. H. Moon, M. A. Nagai, A. L. T. O. Nascimento, L. E. S. Netto, A. Nhani, Jr., F. G. Nobrega, L. R. Nunes, M. A. Oliveira, M. C. de Oliveira, R. C. de Oliveira, D. A. Palmieri, A. Paris, B. R. Peixoto, G. A. G. Pereira, H. A. Pereira, Jr., J. B. Pesquero, R. B. Quaggio, P. G. Roberto, V. Rodrigues, A. J. de M. Rosa, V. E. de Rosa, Jr., R. G. de Sá, R. V. Santelli, H. E. Sawasaki, A. C. R. da Silva, A. M. da Silva, F. R. da Silva, W. A. Silva, Jr., J. F. da Silveira, M. L. Z. Silvestri, W. J. Siqueira, A. A. de Souza, A. P. de Souza, M. F. Terenzi, D. Truffi, S. M. Tsai, M. H. Tsuhako, H. Vallada, M. A. Van Sluys, S. Verjovski-Almeida, A. L. Vettore, M. A. Zago, M. Zatz, J. Meidanis, and J. C. Setubal. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**:151–157.
 27. Studholme, D. J., J. A. Downie, and G. M. Preston. 2005. Protein domains and architectural innovation in plant-associated proteobacteria. *BMC Genomics* **6**:17.
 28. Wang, L. H., L. X. Weng, Y. H. Dong, and L. H. Zhang. 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J. Biol. Chem.* **279**:13645–13651.
 29. Xu, C., W. Shi, and B. P. Rosen. 1996. The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a *trans*-acting metalloregulatory protein. *J. Biol. Chem.* **271**:2427–2432.

ENSAIOS FUNCIONAIS COMPLEMENTARES:

Material e Métodos:

-Ensaio *in vitro*: EMSA, Northern e Western blot com de possíveis ligantes

Os ensaios de EMSA na presença de metais ou outros possíveis ligantes foram realizados utilizando a sonda de 115 pb seguindo o mesmo protocolo descrito no artigo I deste capítulo. Os géis foram desidratados e expostos em tempos variáveis, dependendo da eficiência da marcação da sonda, em membrana IP (Imaging plate – Fuji Film), para posterior visualização em analisador FujiFilm BSA-1800II. Nos ensaios de ligação com metal foram adicionados 2,5 mM de CdSO₄, ZnCl₂, CuSO₄, NiSO₄, MnCl₂, Fe(NH₄)₂(SO₄) e CoCl₂ na mistura de ligação. Outros compostos que poderiam estar envolvidos direta ou indiretamente na função do operon BigR também foram adicionados à mistura de ligação numa concentração final de 1 mM. São eles: (NH₄)₂SO₄, celulose, butirrolactona (BL), acil-homoserinalactona (AHL), metilglioxal (MG), S-lactoilglutaciona (SLG), penicilina, cefotaxina e carbenicilina. Para se tentar detectar alterações em nível de RNA e proteína, bactérias crescidas na presença de metal também foram utilizadas em ensaios de *Northern* e *Western blot*, segundo Ausubel e colaboradores (1998). O protocolo de obtenção dos anticorpos contra a proteína recombinante BigR está descrito em detalhes no capítulo III.

-Ensaio com gene repórter

Estes ensaios foram realizados utilizando três transformantes diferentes: *E. coli* (BL21pLysS) pGEM-pxf115GFP/pET28-BigR, *X. fastidiosa* (J1a12) pSP-pxf115GFP e *A. tumefaciens* (C58) pBI-pat145GFP. A descrição de todos os vetores utilizados neste trabalho está resumida na Tabela 1 e as seqüências dos *primers* utilizados para diferentes clonagens e ensaios de EMSA encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Para as medidas de fluorescência na presença de possíveis indutores, células de *E. coli* com densidade ótica de 0,6 a 600 nm (OD₆₀₀) foram incubadas em meio LB (Sambrook and Russel, 2001), acrescido de 1 mM de IPTG e 0,5 mM de cada metal utilizado (CdSO₄, ZnCl₂, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ e CuSO₄), por 2 horas à 37°C e agitação de 200 rpm. As células de *X. fastidiosa* foram incubadas em meio PW (Davis *et al.*, 1981)

com 100 μM de metal durante 1, 3, 6, e 12 horas à 28°C e 80 rpm. As células de *A. tumefaciens*, por sua vez, foram incubadas em meio YEP (Peptona 10 g/L, Extrato de Levedura 10 g/L, NaCl 5 g/L) na presença de 1 mM de CdSO_4 , 5 mM de ZnCl_2 , 10 mM de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ou 6 mM de CuSO_4 por 0,5; 1,5 ou 5 horas à 30°C e 200 rpm de agitação. A concentração de cada metal utilizada em *Agrobacterium* foi definida pela concentração inibitória encontrada através do crescimento bacteriano em placa. Além disso, para esta cepa, os experimentos realizados com meio YEP foram repetidos em meio mínimo M9 (Sambrook e Russel, 2001). Nestas células, também foram tentados diferentes compostos como: MG (3 mM), SLG (1 mM), H_2O_2 (0,5 M), ampicilina (1 $\mu\text{g/mL}$), cabenicilina (1 $\mu\text{g/mL}$), cefotaxina (0,05 $\mu\text{g/mL}$), penicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), tetraciclina (100 $\mu\text{g/mL}$), cloranfenicol (100 $\mu\text{g/mL}$), higromicina (100 $\mu\text{g/mL}$), acil homoserinalactona (AHL) (10 mM), butirolactona (BL) (10 mM), MgSO_4 (10 mM); NaCl (300 mM); lactose (50 mM), glutamina (50 mM), glicina (50 mM), glicerol (30%), sacarose (2,5%) e hipóxia.

Nos testes de deficiência nutricional, as culturas de *Agrobacterium* (C58) foram crescidas em 50 mL de meio YEP ou M9 até a fase de saturação. A densidade ótica da cultura foi medida a cada 3 horas de crescimento e alíquotas de 2 mL foram coletadas durante diferentes fases de crescimento com OD_{600} de 0,5; 1,0; 2,2; 4,4; 6,2; 7,3; 7,5 e 6,8; e armazenadas à -20°C. As células coletadas foram solubilizadas diretamente em tampão de corrida, fervidas durante 5 minutos à 95°C e sonicadas em banho por 15 minutos. Estas amostras foram aplicadas em gel de acrilamida e utilizadas para ensaios de *Western blot* para detecção da proteína BigR e verificação de possíveis alterações de expressão.

Os ensaios de co-cultivo foram realizados de duas maneiras diferentes. Na primeira, foram utilizadas duas espécies de bactérias endofíticas que co-habitam com *Xylella* em vasos de xilema de plantas (Lavaca *et al.*, 2004). As bactérias endofíticas utilizadas, *Curtobacterium flaccumfaciens* e *Methylobacterium extorquens*, foram cedidas pelo Dr. Wellington de Araújo do Departamento de Genética da ESALQ, USP. As bactérias foram crescidas separadamente em meio SPW (Hartun *et al.*, 1994). Culturas com OD_{600} de 0,6 foram centrifugadas e o filtrado foi utilizado para crescer células de *Agrobacterium* C58 contendo o plasmídeo repórter. Além do crescimento em meio líquido, o co-cultivo também foi realizado em placas. As bactérias endofíticas

foram crescidas por 24 horas e em seguida as células repórter foram plaqueadas perpendicularmente a cultura endofítica, gerando uma zona de competição.

TABELA 1. Nome e descrição dos vetores utilizados durante o trabalho

PLASMÍDEO	DESCRIÇÃO
pGEMt- <i>Easy</i>	Promega
pET28a	Novagen
pET28-BigR	Gene XF0767 clonado no vetor pET28a (<i>NcoI-XhoI</i>) sem fusão com cauda de histidina.
pET28-BigR6his	Gene XF0767 clonado no vetor pET28a (<i>NcoI-XhoI</i>) em fusão com cauda de histidina na região C-terminal.
pET28-6hisΔBigR	Gene XF0767 clonado no vetor pET28a (<i>NdeI-XhoI</i>) em fusão com cauda de histidina na região N-terminal e sítio de clivagem com trombina.
pET29a	Novagen
pET29-ΔBigR	Gene XF0767 com deleção de 36 nucleotídios da porção N-terminal em vetor pET29a (<i>NdeI-XhoI</i>) sem fusão com cauda de histidina.
pET29-ΔBigR6his	Gene XF0767 com 36 nucleotídios da porção N-terminal deletados em vetor pET29a (<i>NdeI-XhoI</i>) em fusão com cauda de histidina.
pGEM-pxf442	Seqüência entre os genes Xf0768 e Xf0769 de 442 pb clonada em vetor pGEMt.
pGem-pxf115	Região promotora pBLH de <i>Xylella</i> de 115 pb clonada em vetor pGEMt.
pGem-pxf90	Fragmento da região promotora pBLH de <i>Xylella</i> de 90 pb clonado em vetor pGEMt.
pGem-pxf115GFP	Região promotora pBLH de <i>Xylella</i> de 115 pb fusionada ao gene da EGFP (<i>NcoI-NorI</i>) clonado em vetor pGEMt.
pGem-pat145GFP	Região promotora pBLH de <i>Agrobacterium</i> de 145 pb (<i>ApaI-NcoI</i>) fusionada ao gene EGFP no vetor em vetor pGEMt.
pSP3	da Silva <i>et al.</i> , 2002
pSP-pxf115GFP	Região promotora pBLH de <i>Xylella</i> fusionada ao gene EGFP (<i>ApaI-SalI</i>) em vetor pSP3.
pBI121	Clontech
pBI-pat145GFP	Região promotora pBLH de <i>Agrobacterium</i> fusionada ao gene EGFP em vetor pBI121 (<i>XbaI-SacI</i>).
pGem-pxfm1GFP	Sítio TATA de <i>Xylella</i> com alteração m1* (<i>ApaI-NcoI</i>) fusionada a EGFP em vetor pGEMt.
pGem-pxfm2GFP	Sítio TATA de <i>Xylella</i> com alteração m2* (<i>ApaI-NcoI</i>) fusionada a EGFP em vetor pGEMt.
pGem-pxfm3GFP	Sítio TATA de <i>Xylella</i> com alteração m3* (<i>ApaI-NcoI</i>) fusionada a EGFP em vetor pGEMt.
pGem-patm1GFP	Sítio TATA de <i>Agrobacterium</i> com alteração m1* (<i>XbaI-NcoI</i>) fusionada a EGFP em vetor pGEMt.
pGem-patm2GFP	Sítio TATA de <i>Agrobacterium</i> com alteração m2* (<i>XbaI-NcoI</i>) fusionada a EGFP em vetor pGEMt.
pGem-patm3GFP	Sítio TATA de <i>Agrobacterium</i> com alteração m3* (<i>XbaI-NcoI</i>) fusionada a EGFP em vetor pGEMt.
pBI-patm1GFP	Sítio TATA de <i>Agrobacterium</i> com alteração m1* fusionada a EGFP em vetor pBI121 (<i>XbaI-SacI</i>).
pBI-patm2GFP	Sítio TATA de <i>Agrobacterium</i> com alteração m2* fusionada a EGFP em vetor pBI121 (<i>XbaI-SacI</i>).
pBI-patm3GFP	Sítio TATA de <i>Agrobacterium</i> com alteração m3* fusionada a EGFP em vetor pBI121 (<i>XbaI-SacI</i>).
pOK	Huguet <i>et al.</i> , 1998
pOK-atBigRNPT	Seqüência At0767 interrompida pelo gene NPT (<i>NcoI-SalI</i>) na região central clonado em vetor pOK (<i>SmaI</i>).
pOK-atBLHNPT	Seqüência At0768 interrompida pelo gene NPT (<i>SphI</i>) na região central clonado em vetor pOK (<i>SmaI</i>).
pBI-pat145GFPCAM	Região promotora pBLH de <i>Agrobacterium</i> fusionada ao gene EGFP em vetor pBI121 com gene de resistência a cloranfenicol do vetor pLyS (<i>XbaI</i> e <i>SphI</i>).

* As alterações m1, m2 e m3, encontram-se descritas na Tabela 2.

TABELA 2. Sequências de oligonucleotídeos contendo as alterações realizadas no BigRbox de *Xylella* e *Agrobacterium*.

XF	wt	TGCTGCAAGGATGTCTGCGACACCTTTGACTACTTCCACCCATTCAATATATATTATTATATATTGTAATTTATGAAGGAAT
	m1	TGCTGCAAGGATGTCTGCGACACCTTTGACTACTTCCACCCATTACTGACTGCTTATTATATATTGTAATTTATGAAGGAAT
	m2	TGCTGCAAGGATGTCTGCGACACCTTTGACTACTTCCACCCATTATATTGTAATTTATGAAGGAAT
	m3	TGCTGCAAGGATGTCTGCGACACCTTTGACTACTTCCACCCATTTAATTTATGAAGGAAT
AT	wt	CACGACGGCAATTTTCAGCCCTTGCAAATAAACATTATACATTATATGATAATATATACTAATTTAGCAAACAGGAGAAG
	m1	CACGACGGCAATTTTCAGCCCTTGCAAATAAACATGACTCTTACGTGATAATATATACTAATTTAGCAAACAGGAGAAG
	m2	CACGACGGCAATTTTCAGCCCTTGCAAATAAACATTATATACTAATTTAGCAAACAGGAGAAG
	m3	CACGACGGCAATTTTCAGCCCTTGCAAATAAACATCTAATTTAGCAAACAGGAGAAG

* Vermelho indica a parte do sítio de ligação de BigR mantida em cada promotor.

TABELA 3. Lista dos *primers* utilizados para as clonagens e como sondas para EMSA.

PRIMER	SEQUÊNCIA
N767	5'- CCATGGTGAACGAAATGCGAG – 3'
C767	5'- CTCGAGCGCCTGTTTCTCCTGTGC – 3'
N768stop	5'- CTCGAGTCACGCCTGTTTCTC – 3'
0768RNcoI	5'- GATGTCTACTATTCCCATGG – 3'
0769F	5'- ATCGATGGATACACCGGTTGA – 3'
Pali1F	5'- GATTTTGTCTGCAAGGATG – 3'
-35F	5'- GACACCTTTGACTACTTCC – 3'
-35R	5'- GGAAGTAGTCAAAGGTGTC – 3'
60F	5'- AAGCAGCACGGCGTGTGATTTTGTCTGCAAGGATGTCTGCGACACCTTTGACTACTTCCA3'
60R	5'- TGGAAGTAGTCAAAGGTGTGCGCAGACATCCTTGCAGCAAAATCACACGCCGTGCTGCTT3'
TATA-F	5'- TAAATTACAATATATAATAATATATATTGAATGG – 3'
TATA-R	5'- CCATTCAATATATATTATTATATATTGTAATTT – 3'
pAgroF	5'- GGGCCCGCCTCTAGAATCTC – 3'
pAgroR	5'- CTTACGGCCTCCATGGCTTC – 3'
At0768F	5'- CATATGAAGGCCGTAAGGATCAAC – 3'
At0768R	5'- GGGCCCGTCACCATGTGCTGC – 3'
At0767F	5'- GAGCTCGCCCTTCCCGAC – 3'
At0767R	5'- GGGCCCATGATGCCGTGAC – 3'
NPTF	5'- GCATGCGTCGATACTATGTTATACG – 3'
NPTR	5'- GCATGCTTGCGCCACATCTAGG – 3'

Um outro experimento para verificar a expressão do operon BigR em competição com outros microrganismos foi realizado utilizando uma população de microrganismos associados a raízes de plantas. Pedacos de raízes extraídos de plantas de feijão foram esterilizados com 1% de hipoclorito de sódio e lavados em água estéril. As raízes foram picotadas e a suspensão plaqueada em meio SPW. Após um crescimento inicial, foi plaqueada sobre essa cultura uma camada de agarose 0,7% contendo uma cultura de

Agrobacterium com OD₆₀₀ de 0,2 (*overlay*). Após um dia de incubação as placas foram analisadas para verificar possíveis áreas de inibição e diferença na expressão de GFP.

-Confirmação do *Knock out* e ensaios com *Agrobacterium* mutante

A confirmação do *knock out* dos genes alvos foi realizada através de reação de PCR utilizando a enzima *taq platinum* (Promega) e uma combinação de *primers* que permitisse a observação da inserção do gene NPT (neomicina fosfotransferase) nas seqüências alvo. Como DNA molde, foram utilizados DNAs genômicos das cepas mutantes *bigR*⁻ e *blh*⁻ extraídos através do método CTAB (Ausubel *et al.*, 1998). Outro teste realizado para confirmar o *knock out* dos genes *bigR* e *blh* foi realizado através de *Northern blot*; para isso, 5 µg de cada DNA genômico foi digerido com 2 unidades das enzimas *EcoRI* e *HindIII*, separadamente por 16 h à 37°C. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e posteriormente transferidas para membrana de nylon por 16 h em tampão SSPE 0,5X. Foi utilizada como sonda a seqüência do gene NPT marcada com o nucleotídeo [α -³²P] dATP através da enzima *klenow* (*Megaprime DNA labelling system* – Amersham Biosciences), de acordo com o indicado pelo fabricante. A detecção foi realizada seguindo o protocolo descrito por Ausubel e colaboradores (1998).

Inicialmente, os ensaios funcionais para as bactérias mutantes foram realizados em placas contendo compostos possivelmente envolvidos com a atividade do operon XF0768-0764. Assim, as cepas selvagem e mutantes, *blh*⁻ e *bigR*⁻, foram crescidas em meio YEP na presença dos metais cádmio, zinco, cobre e ferro, e de compostos orgânicos como MG, AHL e BL. Foram utilizadas diferentes concentrações de cada composto de acordo com a Tabela 4. Estas concentrações foram escolhidas baseando-se nos ensaios de gene repórter já realizados anteriormente com a cepa selvagem.

Para a realização do antibiograma, discos contendo diferentes antibióticos foram utilizados para comparar a sensibilidade entre as cepas selvagem e mutante. As placas foram preparadas com meio YEP em igual volume. Um inóculo com OD₆₀₀ de 0,05 foi plaqueado de forma homogênea e os discos de antibiótico foram dispostos a uma distância mínima de 4 cm. Ao todo foram utilizados 30 antibióticos (Tabela 5). Após 48 horas de crescimento à 30°C, as placas foram fotografadas e o alo de inibição entre a cultura selvagem e os mutantes *blh*⁻ e *bigR*⁻ foi comparado.

Tabela 4. Nome e concentração de cada compostos utilizado no crescimento dos mutantes.

CdSO₄	0,5mM	0,75mM	1mM	2mM	MG	3mM	4mM	5mM
ZnCl₂	4mM	4,5mM	5mM	6mM	BL	5mM	10mM	15mM
Fe(NH₄)₂SO₄	5mM	7,5mM	10mM	15mM	AHL	5mM	10mM	15mM
CuSO₄	4,5mM	5mM	6mM	7mM	-	-	-	-

Tabela 5. Lista dos antibióticos utilizados para teste de sensibilidade.

Sigla	Nome	Sigla	Nome
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	POL300	Polimixina B 300mg
CFL30	Cefalotina 30mg	SUT25	Sulfazotrina 25mg
CPM30	Cefepime 30mg	TIC75	Ticarcilina + Ac. Clavulâmico 75mg
CFO30	Cefoxitina 30mg	AMO10	Amoxicilina 10mg
CRO30	Ceftriaxona 30mg	OFX5	Ofloxacilina 5mg
CTX30	Cefotaxima 30mg	CFC30	Ceflacor 30mg
CIP5	Ciprofloxacina 5mg	NEO30	Neomicina 30mg
CLO30	Cloranfenicol 30mg	NIT300	Nitrofurantaina 300mg
CAZ30	Ceftazidina 30mg	TET30	Tetraciclina 30mg
ETP10	Ertapeno 10mg	NOR10	Norfloxacina 10mg
GEN10	Gentamicina 10mg	NAL5	Ac. Nalidixico 5mg

Resultados

-BigR aparentemente não funciona como um sensor de metal

Como citado inicialmente, o grau de identidade entre BigR e os sensores de metal ArsR e SmtB é relativamente baixo, além disso, o operon BigR aparentemente não codifica proteínas relacionadas à tolerância e detoxificação de metal. Apesar destes indicativos, o possível envolvimento de BigR em resposta a metais pesados foi avaliado através de EMSA, ensaios de gene repórter e crescimento de células mutantes.

Os ensaios de EMSA foram realizados na presença de íons metais, como descrito para a proteína ArsR (Xu *et al.*, 1996). Assim, foram testados: sulfato de cádmio (CdSO₄), cloreto de zinco (ZnCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de níquel (NiSO₄), cloreto de manganês (MnCl₂), sulfato de ferro amoniacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂) e cloreto de cobalto

(CoCl₂). Estes metais se dissociam em água formando cátions divalentes (CdII, ZnII, CuII, NiII, MnII, FeII e CoII). Também foram utilizadas quatro diferentes construções da proteína (BigR-his, BigR, ΔBigR-his e ΔBigR), tornando possível a análise da interferência da cauda de histidina e da região N-terminal na ligação ao metal. Os resultados obtidos mostram que a presença da cauda de histidina permite uma interação inespecífica com os metais níquel e cobalto. Já a ausência da região N-terminal da proteína não causou nenhuma alteração na atividade de ligação ao DNA, indicando que esta sequência não é importante para a interação proteína/DNA (Figura 8A). Neste ensaio, porém, foi observado que a ligação de BigR com seu DNA alvo foi parcialmente abolida por cádmio, cobre e ferro (Figura 8A), indicando uma possível interação da proteína com estes metais. Entretanto, a atividade *in vivo* dos genes repórter, em ambas *Xylella* e *Agrobacterium*, não foi significativamente alterada em resposta aos metais testados (Figura 8B). De fato, uma pequena diminuição na fluorescência da GFP foi observada com cobre e ferro, o que possivelmente reflete o efeito inibitório destes metais no crescimento bacteriano. Além disso, a perda de repressão do gene repórter em *E. coli* expressando BigR não ocorreu na presença de níveis aumentados de cádmio, cobre ou ferro (dados não apresentados). Estes resultados, portanto, sugerem que BigR não funciona como um sensor de metal *in vivo*.

Outra característica da proteína que suporta esta hipótese é que BigR não possui nenhum sítio de ligação a metal como caracterizado nas proteínas SmtB e ArsR (Busenlehner *et al.*, 2003), mostrado na Figura 3. Apesar de BigR ter um par de cisteínas conservadas que poderiam coordenar um íon metal com outro resíduo da cadeia principal, estas cisteínas não são vicinais (Figura 3 e 4), tornando improvável que elas representem um sítio de coordenação a metal. Neste sentido, a resolução da estrutura de BigR poderá revelar se de fato BigR apresenta sítio de ligação a metal.

Outro teste para avaliar a influência de metais na transcrição do operon em *Xylella* foi o ensaio de *Northern blot*, realizado utilizando a sequência de BigR como sonda. Neste ensaio é possível evidenciar bandas, referentes aos RNAs ribossômicos 16S e 23S correspondentes a 1,5 e 2,9 kb, respectivamente (Figura 9). Esta hibridização também identificou uma banda de baixo peso molecular fora do tamanho esperado para o RNA policistrônico do operon compreendendo os genes XF0768-XF0764, teoricamente com

3,2 kb. Neste caso, mesmo que a banda observada seja oriunda de uma reação específica, não houve diferença de intensidade nas bandas detectadas entre os tratamentos com os metais (Figura 9).

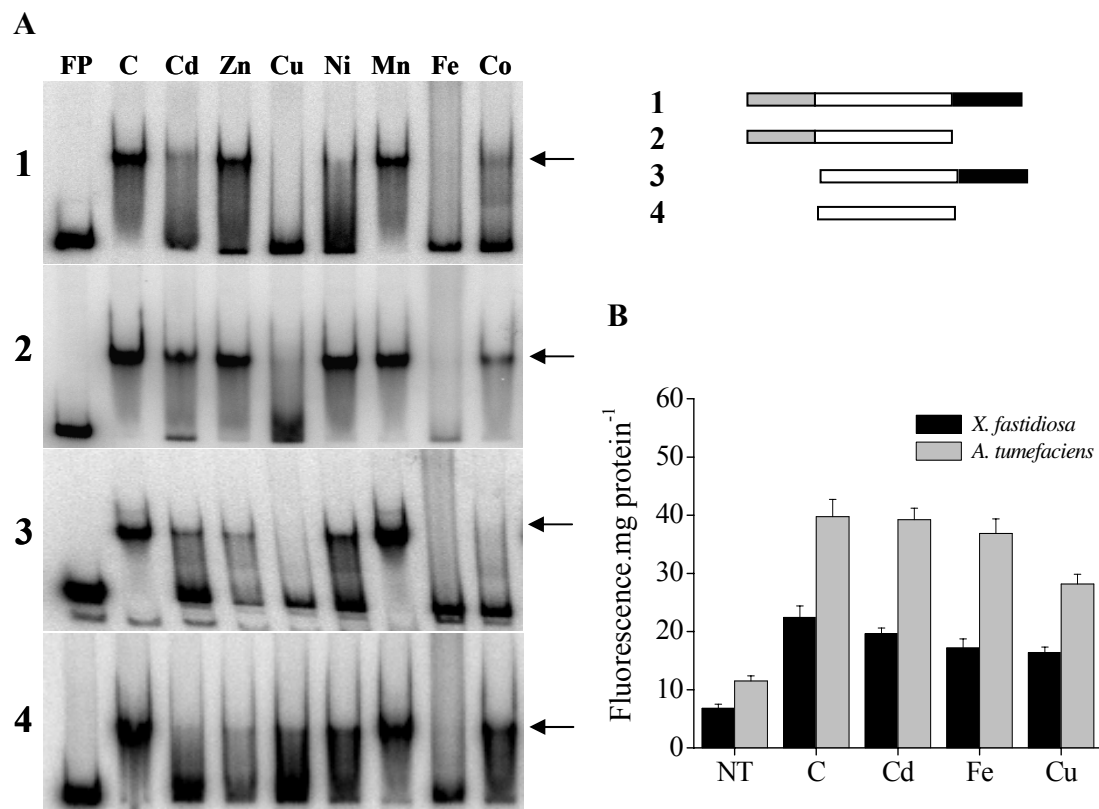


Figura 8: Ensaios de ligação a metal. Esquema acima representa as diferentes construções da proteína BigR utilizadas neste ensaio. 1- BigR em fusão com cauda de histidina (BigR-his), 2- BigR sem fusão, 3- BigR truncada no N-terminal em fusão com cauda de histidina (Δ BigR-his) e 4- BigR truncada no N-terminal sem fusão com cauda de histidina (Δ BigR). **A-** Ensaio de EMSA com diferentes formas de BigR na presença de 2.5 mM de cádmio (Cd), zinco (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), manganês (Mn), ferro (Fe) e cobalto (Co). FP, representa sonda livre C e a seta, o complexo DNA/BigR. **B-** Quantificação da fluorescência da GFP em extratos celulares de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* na presença de íons cádmio (Cd), ferro (Fe) e cobre (Cu). As células controle contendo o plasmídeo repórter (C) e as células não transformadas (NT) foram crescidas na ausência de metal.

Para avaliar uma possível regulação pós traducional, foram realizados ensaios de *Western blot*. Nestes ensaios, o soro anti-BigR detectou várias proteínas de alto peso molecular no extrato de *Xylella*. Inicialmente, a banda esperada correspondente à proteína

BigR inteira, de aproximadamente 13 kDa, não foi observada no extrato protéico de *Xylella* (Figura 10). O aumento da concentração do extrato protéico e do tempo de exposição dos *blots* durante a revelação evidenciou a presença de uma banda de tamanho correspondente a BigR, entretanto, não foram observadas diferenças na intensidade dessa banda nos extratos protéicos das células tratadas com metal (Figura 10).

Nos extratos de *Agrobacterium*, o anticorpo produzido contra a proteína BigR de *Xylella* aparentemente não foi capaz de detectar a proteína BigR de *Agrobacterium*, pois nenhuma banda foi observada neste extrato protéico (Figura 10).

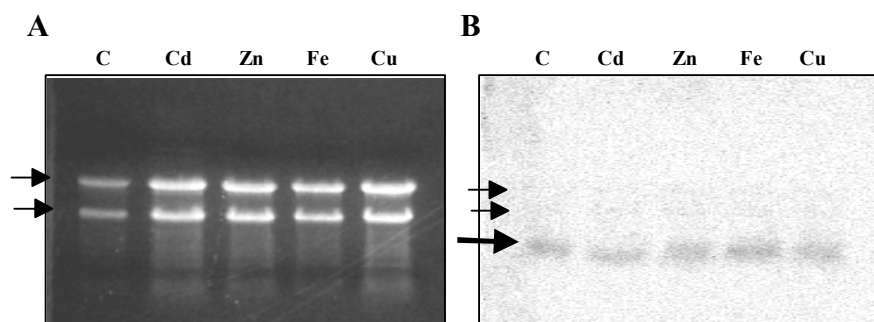


Figura 9: Northern blot com RNA total de *Xylella fastidiosa* crescida na presença de 1 mM de cádmio (Cd), zinco (Zn), ferro (Fe) e cobre (Cu). C, representa o controle sem metal. **A-** Gel de formaldeído mostrando os RNAs ribossômicos 16S e 23S (setas menores) corados com brometo de etídio. **B-** Resultado da hibridização do RNA total com a sonda BigR. A seta maior indica a banda correspondente à hibridização.

-Compostos Orgânicos e Diferentes Condições de Estresse Não Alteram a Atividade do Operon

Para tentar encontrar a função do operon, as células repórter de *Xylella* e *Agrobacterium* foram crescidas na presença de diferentes compostos. Assim, baseados na similaridade da proteína BLH com as metalo-beta-lactamases, glioxalases II e lactonases, foi avaliado se algum substrato para estas enzimas, incluindo penicilina, ampicilina, carbenicilina, cefotaxina, metilglioxal, S-lactoilglutathione, acil-homoserinalactona e butirolactona, poderia ativar o operon. Entretanto, nenhum destes compostos causou alteração na fluorescência de células repórter em diferentes concentrações (dados não apresentados).

Alguns destes compostos também foram utilizados para ensaios de EMSA sem causar nenhuma alteração na formação do complexo sonda/proteína (Figura 11). Além

disso, diferentes condições de crescimento foram testadas. Para isso, as bactérias foram submetidas a condições de estresse oxidativo, hipóxia e deficiência nutricional, porém, novamente não foram observadas alterações na expressão do gene repórter (dados não apresentados).

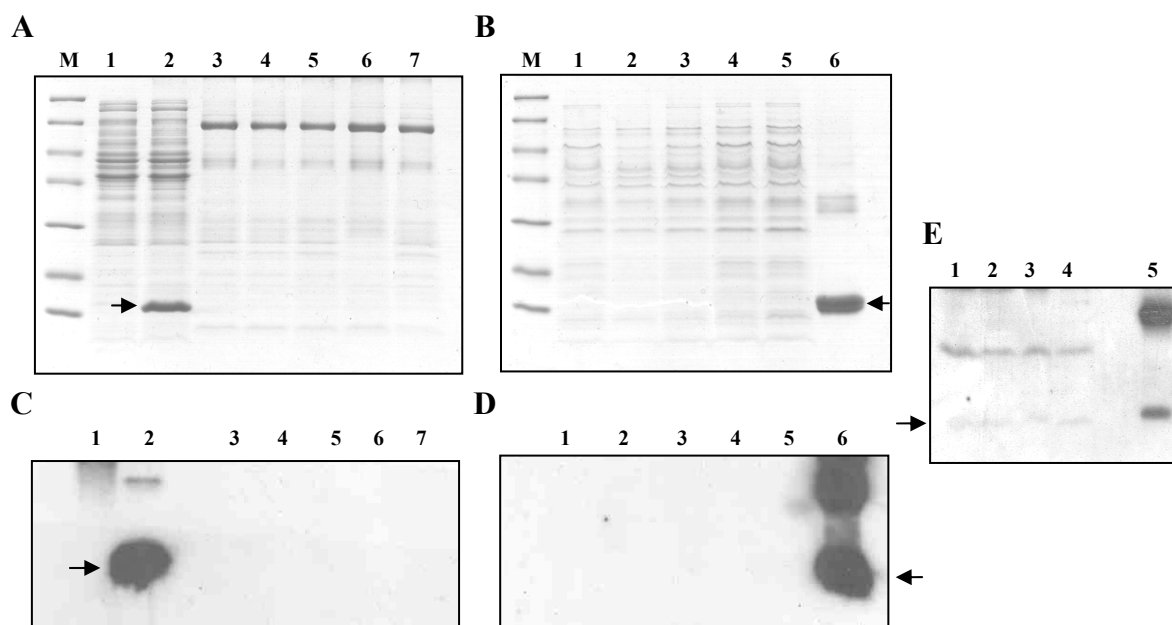


Figura 10: SDS-PAGE (A e B) e *Western blot* (C, D e E) de proteínas totais de *Xylella* (A, B e E) e *Agrobacterium* (B e D), realizado com anticorpo contra BigR. **A** e **C**- 1, extrato protéico de *E.coli* (controle negativo); 2, extrato protéico de *E. coli* com expressão de BigR (controle positivo); 3 a 7, extratos protéicos de *Xylella* sem metal ou tratadas com 1 mM de cádmio, zinco, ferro ou cobre, respectivamente. **B** e **D**- 1 a 5, células de *Agrobacterium* controle e tratadas com 1 mM de cádmio, zinco, ferro, e cobre, respectivamente; 6, proteína BigR purificada. **E**- Maior concentração de extrato protéico de *Xylella* e maior tempo de exposição; 1 a 4, células tratadas com cádmio, zinco, ferro e cobre, respectivamente; 5, controle BigR purificada. As setas indicam a posição da proteína BigR e M representa massa molecular.

Para testar a atividade de fitoalexinas secretadas pela planta na presença de patógenos, as células repórter de *Xylella* e *Agrobacterium* foram infiltradas em folhas de plantas, recuperadas e analisadas por microscopia de fluorescência em comparação com células de meio de cultura. Aparentemente, as células recuperadas das plantas exibiram o mesmo padrão de fluorescência que as células do meio de cultura (dados não apresentados). A monitoração da fluorescência do repórter durante a infecção de

Agrobacterium na formação da galha também foi avaliada e encontra-se descrita nos resultados do artigo I deste capítulo.

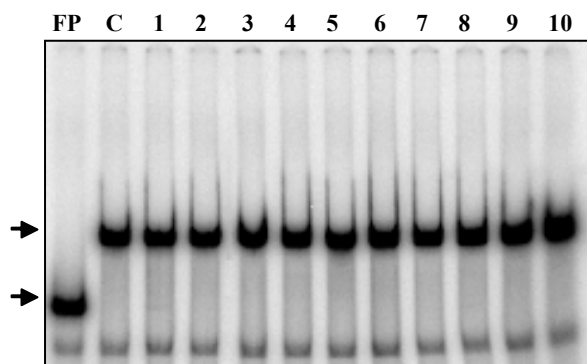


Figura 11: Gel *shift* com a proteína Δ BigR e sonda de 115 pb do promotor pBLH de *Xylella*. A seta inferior indica a migração da sonda livre e a seta superior do complexo DNA/BigR. As reações foram realizadas na presença de 1- extrato total com expressão de Δ BigR, 2- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3- celulose, 4- butirrolactona, 5- acil-homoserine-lactona, 6- metilglioxal, 7- s-lactoilglutationa, 8- penicilina, 9- cefotaxina, 10- carbenicilina. FP representa a sonda livre, e C controle positivo da proteína purificada.

Tem sido demonstrado que a presença de bactérias endofíticas interfere nos sintomas da CVC e no crescimento da *Xylella in vitro* (Lavaca *et al.*, 2004). Além disso, bactérias endofíticas podem sintetizar substâncias, como antimicrobianos em competição com outros organismos (Strobel *et al.*, 2004). Assim, foram realizados testes de co-cultivo na presença de duas bactérias endofíticas isoladas do xilema de citros (*Curtobacterium flaccumfaciens* e *Methylobacterium extorquens*) e com bactérias ligadas a raízes de plantas de feijão, para avaliar o comportamento do operon BigR em competição com outros organismos. Novamente, não foi possível observar diferenças na expressão da GFP das células repórter em contato com endofíticas isoladas de xilema e de raiz (dados não apresentados).

-Mutantes de *Agrobacterium* Não Apresentam Crescimento Diferenciado com Antibióticos, Metais e Outros Compostos

A metodologia utilizada para a obtenção dos mutantes foi descrita no artigo I deste capítulo, entretanto, neste ítem, a estratégia está sendo descrita mais detalhadamente. Para a realização do *knock out* dos genes BLH e BigR, foi utilizado o

plasmídeo pOK (Huguet *et al.*, 1998). Este plasmídeo possui uma marca de seleção negativa (sensibilidade à sacarose) para sua integração no genoma da bactéria, permitindo a seleção positiva apenas dos clones com dupla recombinação e conseqüente inserção da marca de resistência nos genes alvos (Figura 12).

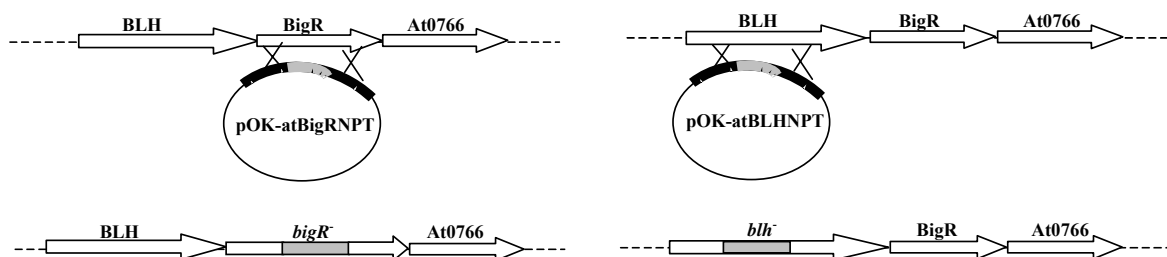
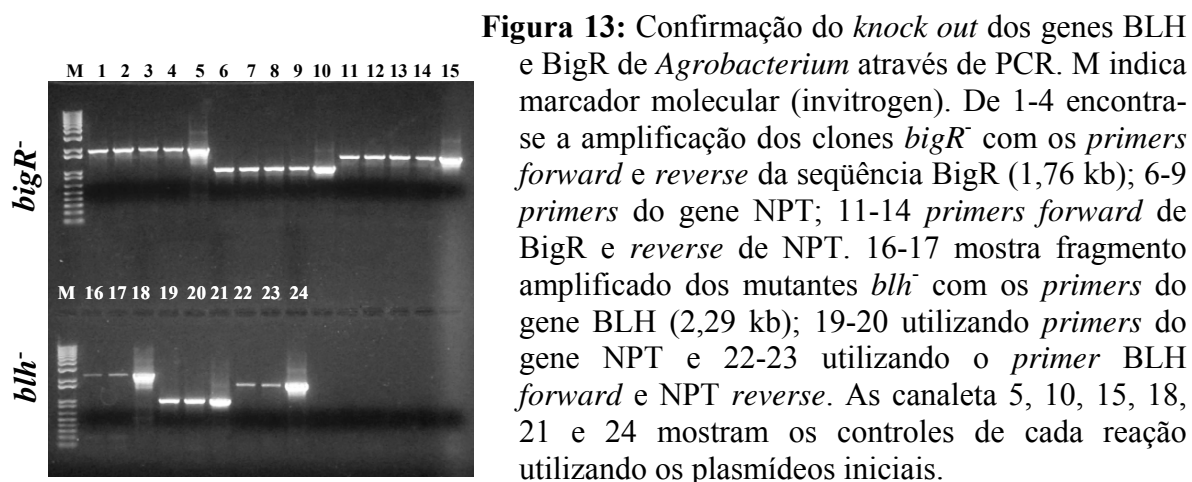


Figura 12: Esquema indicando estratégia utilizada para *knock out* dos genes BLH e BigR de *Agrobacterium tumefaciens*. O gene de resistência NPT foi inserido nas seqüências alvo através de dupla recombinação homóloga.

A seqüência alvo da recombinação homóloga foi analisada através de PCR, e confirmou a inserção do gene de resistência a kanamicina nas regiões desejadas (Figura 13). Nesta figura é possível observar que o tamanho dos produtos amplificados (2,29 e 1,76 kb) diferem do tamanho original de cada fragmento selvagem (1,3 e 0,95 kb para os genes BLH e BigR, respectivamente). Ainda para confirmar o *knock out* e o número de inserções da marca de resistência, foi realizado um *Southern blot*. O resultado desta hibridização mostrou a presença de apenas uma banda detectada pela sonda NPT (neomicina fosfotransferase) (Figura 14), indicando que esta seqüência está presente em um único locus do DNA cromossômica de *A. tumefaciens*. Para os ensaios funcionais seguintes, um novo plasmídeo repórter foi construído utilizando o gene de resistência a cloranfenicol como marca (pBI-pat145GFPCAM), uma vez que as células mutantes já são resistentes a kanamicina pela presença do gene NPT.



As células de *Agrobacterium tumefaciens* deficientes para as proteínas BigR e BLH foram utilizadas em diferentes testes com o objetivo de se encontrar algum fenótipo envolvido com a função do operon BigR. Desta forma, as bactérias mutantes *blh*⁻ e *bigR*⁻ foram crescidas na presença de cádmio, ferro, zinco e cobre, que foram os metais que “descolaram” a proteína do DNA alvo *in vitro*, e compostos orgânicos como MG, substrato para a atividade de glioxalase II, e BL e AHL, substratos para a atividade de lactonase. A Figura 15 mostra alguns destes resultados, onde é possível observar que não houve diferença de crescimento entre os mutantes deficientes em BigR e BLH e a célula selvagem de *Agrobacterium*, nas condições testadas. Este resultado indica que operon XF0768-0764 não deve estar relacionado com processos de sinalização ou detoxificação destes compostos.

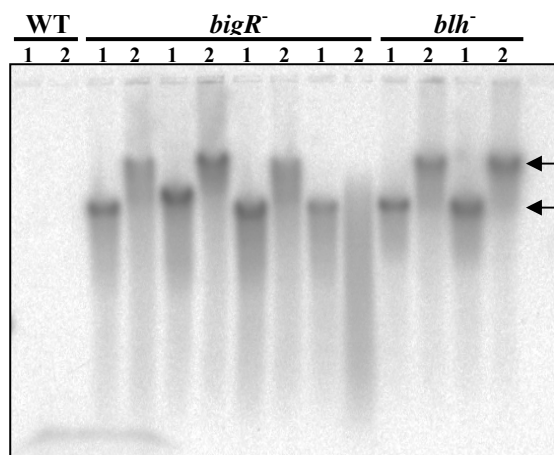


Figura 14: Southern blot utilizando o gene NPT como sonda. A hibridização obtida no DNA genômico digerido com a enzima *EcoRI* está apresentado na canaleta 1 e com a enzima *HindIII* na 2. As setas indicam as bandas obtidas para o tipo selvagem (WT) e os mutantes deficientes em BLH (*blh*⁻) e BigR (*bigR*⁻).

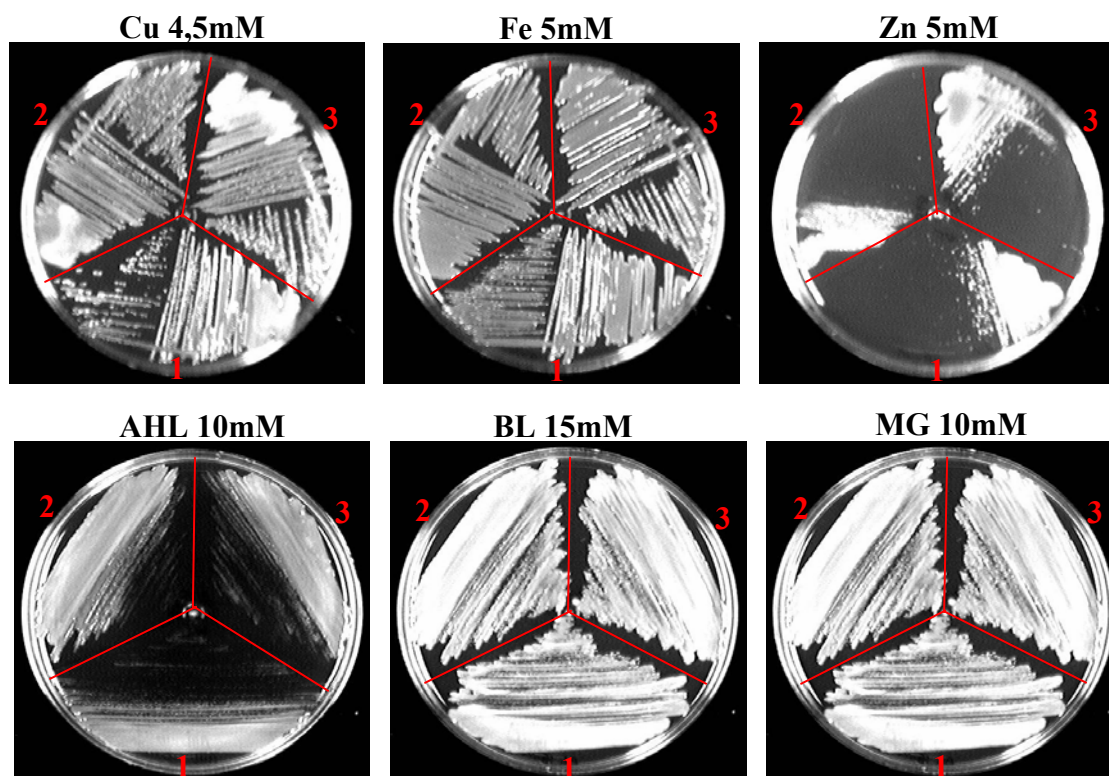


Figura 15: Culturas de *Agrobacterium* selvagem (1) e mutantes *blh*⁻ (2) e *bigR*⁻ (3) crescidas em placas contendo cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), acil-homoserinalactona (AHL), butirolactona (BL) ou metilglioxal (MG).

Além destes testes, para avaliar a possível atividade de beta-lactamase da proteína BLH, foi realizado um antibiograma com as células selvagem e mutante. Assim, foram utilizados 30 antibióticos pertencentes à família dos beta-lactanos e aminoglicosídeos (Tabela 5). A Figura 16 mostra o resultado obtido para 21 dos antibióticos utilizados. Neste teste, é possível notar que os alos de inibição não evidenciam nenhuma diferença na sensibilidade das células mutantes, *blh*⁻ e *bigR*⁻, em relação às células selvagens de *Agrobacterium*. A falta de um fenótipo relacionado com antibióticos indica que o operon não deve estar envolvido com a degradação destes compostos. Por outro lado, os antibióticos amicacina (AMI) e neomicina (NEO), ambos da família dos aminoglicosídeos, apresentam diferentes tamanhos de alos. Sabe-se que o gene NPT causa resistência a kanamicina e neomicina (Goldenstein *et al.*, 2005), e que amicacina é um antibiótico semi-sintético derivado da kanamicina (Price *et al.*, 1974). Uma vez que o

gene NPT foi a marca utilizada para o *knock out* dos genes BLH e BigR, concluímos que estas diferenças de sensibilidade, apresentadas pela neomicina e amicacina, se devem a expressão do gene NPT e não estão relacionadas com a deficiência das proteínas BigR e BLH.

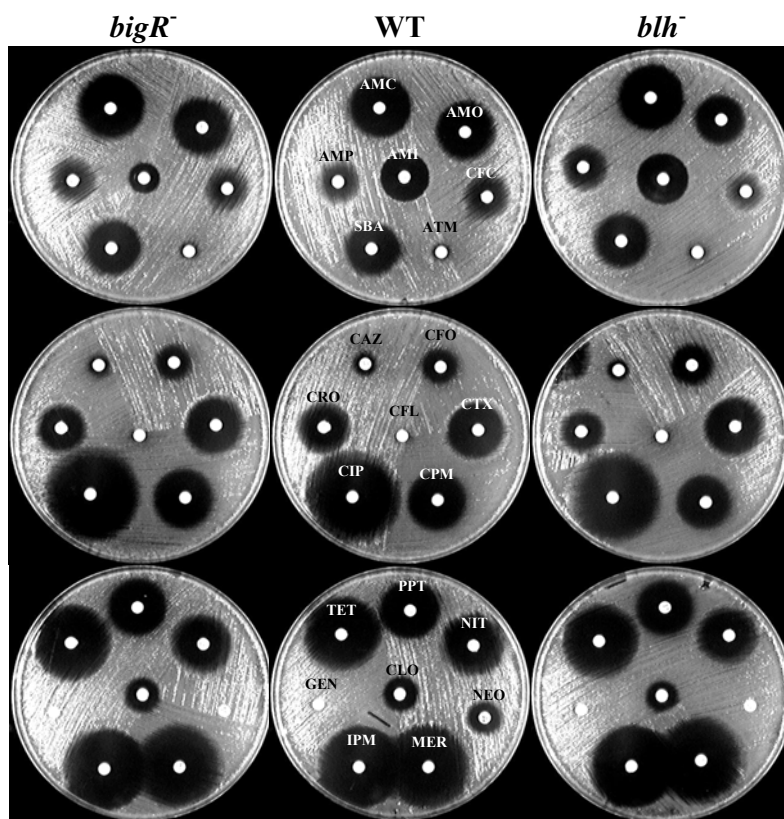


Figura 16: Antibiograma realizado para comparar sensibilidade entre as cepas mutantes *bigR*⁻ e *blh*⁻ e selvagem WT a diferentes antibióticos. As siglas de cada antibiótico encontram-se ao lado do disco. A lista dos antibióticos contendo as respectivas siglas e concentrações estão presentes na Tabela 5.

3.2- CAPÍTULO II: Purificação, Cristalização e Resolução da Estrutura de BigR de *Xylella fastidiosa*.

O estudo da estrutura tridimensional de proteínas é uma importante ferramenta para o real conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na função biológica dessas moléculas. Neste sentido, houve um grande interesse em se conhecer a estrutura terciária de BigR, principalmente para investigar a provável função desta proteína envolvida com formação de biofilme. O presente capítulo mostra os estudos realizados desde a clonagem e purificação até a cristalização e tentativas de resolução da estrutura de BigR.

O capítulo encontra-se dividido em duas partes: 1- Tentativas iniciais de resolução de estrutura e 2- Artigo Científico II. A primeira parte mostra a purificação de diferentes formas da proteína BigR e as tentativas iniciais de cristalização que resultaram na coleta dos primeiros conjuntos de dados de difração. Uma vez que não foi possível resolver a estrutura da proteína através da técnica de substituição molecular, foram realizadas tentativas de *soaking* na presença de metais pesados para a obtenção de dados derivados, os quais também não foram adequados à resolução da estrutura. Para resolver esta questão, a proteína foi novamente expressa de forma a incorporar a um resíduo marcado de selenometionina (SeMet) na cadeia peptídica da molécula. O artigo apresentado no segundo item deste capítulo mostra a cristalização da proteína marcada com SeMet, a coleta e o processamento inicial dos dados de difração. Apesar de diversas tentativas, até o momento, não foi obtido um bom mapa de densidade eletrônica do cristal de BigR. É possível que alguma imperfeição intrínseca do cristal não permita a definição correta de seu grupo espacial dificultando a resolução de sua estrutura.

TENTATIVAS DE RESOLUÇÃO DE ESTRUTURA

Material e Métodos:

-Clonagem, Purificação e Cristalização de Diferentes Construções de BigR

Inicialmente foram realizadas duas construções da proteína em fusão com cauda de histidina. A sequência inicial foi amplificada a partir do DNA genômico da cepa 9a5c de *Xylella*, em reação de PCR utilizando os *primers* N767 e C767 (Tabela 2). O produto de amplificação foi clonado em vetor pGEMt-*Easy* e subclonado em vetor de expressão pET28a. A clonagem foi confirmada através de PCR de colônia e sequenciamento de DNA. Após confirmação, o vetor de expressão foi inserido em células de *E. coli* BL21 (DE3) para produção da proteína recombinante BigR inteira e fusionada a uma cauda de histidina na região C-terminal (BigR-6his). Para a realização da segunda construção, a sequência Δ BigR foi liberada do plasmídeo pET29- Δ BigR (Artigo I – Capítulo I) e religada em vetor pET28a com a utilização das enzimas *Nde*I e *Xho*I (Tabela 1). Esta clonagem possibilitou a expressão da proteína BigR truncada na região N-terminal, fusionada a cauda de histidina e com sítio de clivagem para trombina (6his- Δ BigR). A expressão destas duas proteínas, juntamente com a clonagem, expressão e purificação das construções BigR e Δ BigR sem fusão, encontra-se descrita no artigo II deste capítulo.

A purificação das proteínas produzidas em fusão com cauda de histidina foi realizada utilizando cromatografia de afinidade por níquel. Neste sistema, os extratos protéicos foram aplicados em coluna de gravidade contendo 1 mL de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) pré-equilibrada com tampão TS (20 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 300 mM de NaCl) com fluxo de 0,3 mL/min. A lavagem da coluna e a eluição da proteína foi realizada em tampão TS com quantidades crescentes de imidazol: 30 mM, 50 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM e 200 mM. As frações que continham maior quantidade de proteína foram concentradas em filtro Centriplus YM10000 (Millipore) por centrifugação a 5000 rpm e dialisadas em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 para a remoção de imidazol e sais.

Após a primeira purificação, a proteína 6his- Δ BigR foi quantificada em espectrofotômetro e clivada com trombina em duas concentrações diferentes: 500 μ g ou 100 μ g de proteína para cada unidade de enzima. A clivagem ocorreu na presença de 2,5

mM de CaCl_2 à 25° C. A reação de digestão foi interrompida com a adição de 1 mM de PMSF e foram coletadas alíquotas após 0, 2, 5 e 16 horas de incubação. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 13% e submetidas a uma segunda etapa de purificação para eliminar resíduos de histidina e proteínas não clivadas. Nesta purificação, a amostra foi submetida a uma coluna de níquel com TS-20 e fluxo lento (0,2 mL/min). O *flow through*, que continha a proteína de interesse, foi coletado e analisado em gel SDS-PAGE 13%.

Os ensaios de cristalização foram realizados com aproximadamente 13 mg/mL de proteína, através de difusão de vapor com gota pendente. As gotas foram preparadas com 2 μL de proteína e 2 μL da solução precipitante em um reservatório contendo 300 μL . Foram utilizados para os *screenings* iniciais os kits *Crystal Screen* (CS) I e II (Hampton Research), *Wizard* I e II (Emerold BioStructures) e *JB Screen* (Jena Bioscience). Os refinamentos, quando necessários, foram realizados variando-se a concentração do precipitante e o pH das soluções.

-Coleta e Processamento dos Dados

Os dados de difração foram coletados na linha de difração de raios X (D03B-MX1) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em colaboração com a Dra Beatriz Gomes Guimarães do Laboratório de Cristalografia de Proteínas do LNLS. As coletas foram realizadas em temperatura criogênica (100 K) a fim de evitar danos no cristal causado pela radiação. Os dados da coleta e processamento da proteína BigR e ΔBigR estão sendo apresentados no artigo II deste capítulo. Entretanto, outras coletas e processamento de dados de outros cristais foram também realizados. Neste sentido, foram coletados dados dos cristais da proteína ΔBigR após *soaking* com diferentes concentrações de metais. O *soaking* rápido (*quick-cryo-soaking*) dos cristais foi realizado diretamente na solução crioprotetora contendo concentrações de 500, 250 e 100 mM de CsCl_2 ou NaI. Os cristais foram incubados durante 1 minuto e então submetidos à difração de raios X. O *soaking* lento foi realizado com a adição de 0,5 μL das soluções de CsCl_2 , NaI ou GdCl_3 para concentração final de 5, 10 ou 50 mM. Os metais foram adicionados diretamente na gota de cristalização e incubados por 12, 30 ou 48 horas antes da coleta dos dados de difração de raios X. Após *soaking* lento, foram coletados 3

conjuntos de dados sendo um com 5 mM de NaI, outro com 5 mM de GdCl_3 e por último com 10 mM de CsCl_2 . As imagens foram coletadas num detector *MARCCD* com distância de 140 mm entre o cristal e o detector, com intervalos de rotação de 0,8 grau para o cristal com CsCl_2 e 1 grau para os demais.

Resultados:

-Diferentes Formas de BigR São Eficientemente Purificadas e Possuem Estrutura Secundária

Com o objetivo de se conhecer a estrutura cristalográfica da proteína BigR, testes de cristalização com diferentes construções foram realizados. Estes testes foram inicialmente feitos com a proteína BigR em fusão C-terminal com cauda de histidina (BigR-his). A proteína foi purificada através de coluna de afinidade apresentando satisfatório grau de pureza em uma única etapa cromatográfica (Figura 17A). A análise da estrutura secundária desta proteína mostra um espectro com picos negativos a 208 e 222 nm, típico de proteínas predominantemente constituídas em estrutura de α -hélice (Kelly and Price, 2000) (Figura 17B). Os *screenings* iniciais de cristalização, feitos com essa proteína, não apresentaram a formação de cristais em nenhuma condição; assim, outras construções foram testadas.

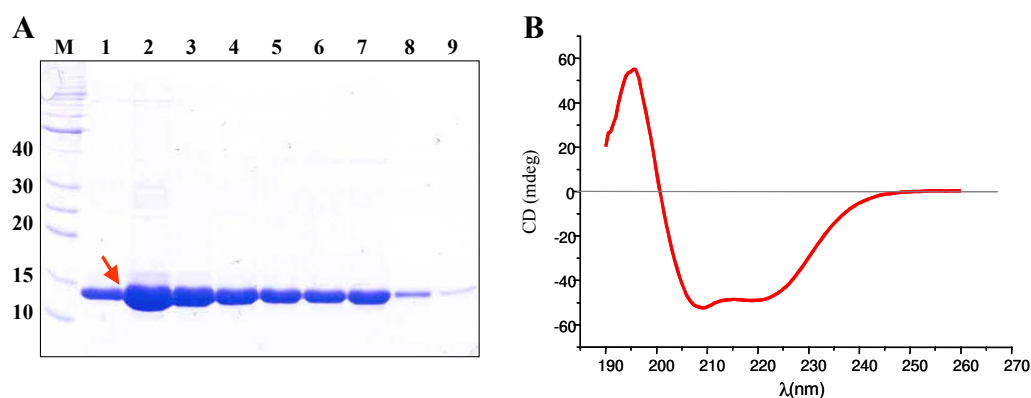


Figura 17: Purificação e dicroísmo circular da proteína BigR-his. **A-** SDS-PAGE 13% mostrando as frações protéicas eluídas da coluna Ni-NTA (1 a 9). A seta mostra a proteína BigR-his com massa molecular de 13,9 kDa (M= marcador molecular [invitrogen]). **B-** Espectro de CD da proteína BigR-his apresentando picos negativos centrados em 208 nm e 222 nm e pico positivo ao redor de 195 nm.

Após esta primeira tentativa, outra forma da proteína foi expressa, desta vez utilizando uma sequência truncada na terceira metionina da cadeia em fusão N-terminal com cauda de histidina e sítio de clivagem com trombina (his- Δ BigR). Esta proteína foi expressa em grande quantidade e mostrou-se bastante pura após a primeira etapa de purificação em coluna de afinidade ao níquel (Figura 18A). Para se eliminar a cauda de histidina, foi realizada uma etapa de clivagem com trombina. Entretanto, apesar da clivagem apresentar grande eficiência, após a segunda purificação, para eliminação da cauda, houve a formação de uma banda de menor massa molecular (Figura 18B). As tentativas de eliminação do subproduto da digestão através de colunas de troca iônica não foram bem sucedidas, inviabilizando a utilização deste protocolo na produção de grandes quantidades de proteína purificada para testes de cristalização.

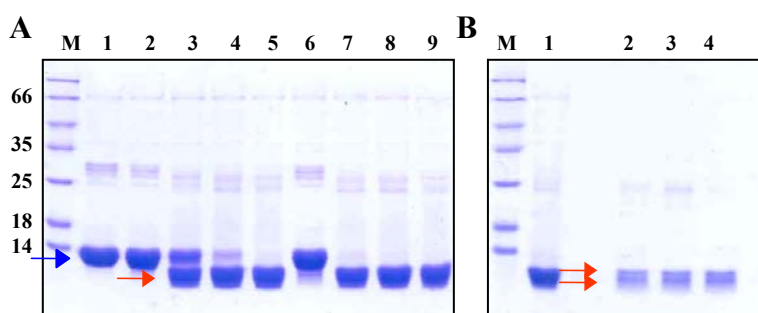


Figura 18: Gel SDS-PAGE 13% da proteína his- Δ BigR. **A-** 1, proteína his- Δ BigR purificada; 2-5, proteína clivada com trombina (500 μ g de proteína/unidade de enzima) nos tempos 0, 2, 5 e 16 horas de digestão, respectivamente; 6-9, proteína clivada com trombina (100 μ g de proteína/unidade de enzima) nos tempos 0, 2, 5 e 16 horas de digestão, respectivamente. **B-** Repurificação da proteína após clivagem; 1, proteína clivada não re-purificada; 2-4, frações eluídas da coluna. A seta azul indica a proteína his- Δ BigR e a seta vermelha indica a proteína Δ BigR clivada (M= massa molecular).

As proteínas BigR e Δ BigR sem fusão com cauda de histidina foram purificadas após duas e três etapas cromatográficas, respectivamente (Figura 19 e 20). A medida de CD destas proteínas, como era esperado, mostra que as mesmas são ricas em estruturas do tipo α -hélice (Figura 19D e 20D). Estas construções tiveram maior sucesso na formação de cristais e os resultados mais detalhados destes experimentos encontram-se descritos no artigo II presente neste capítulo.

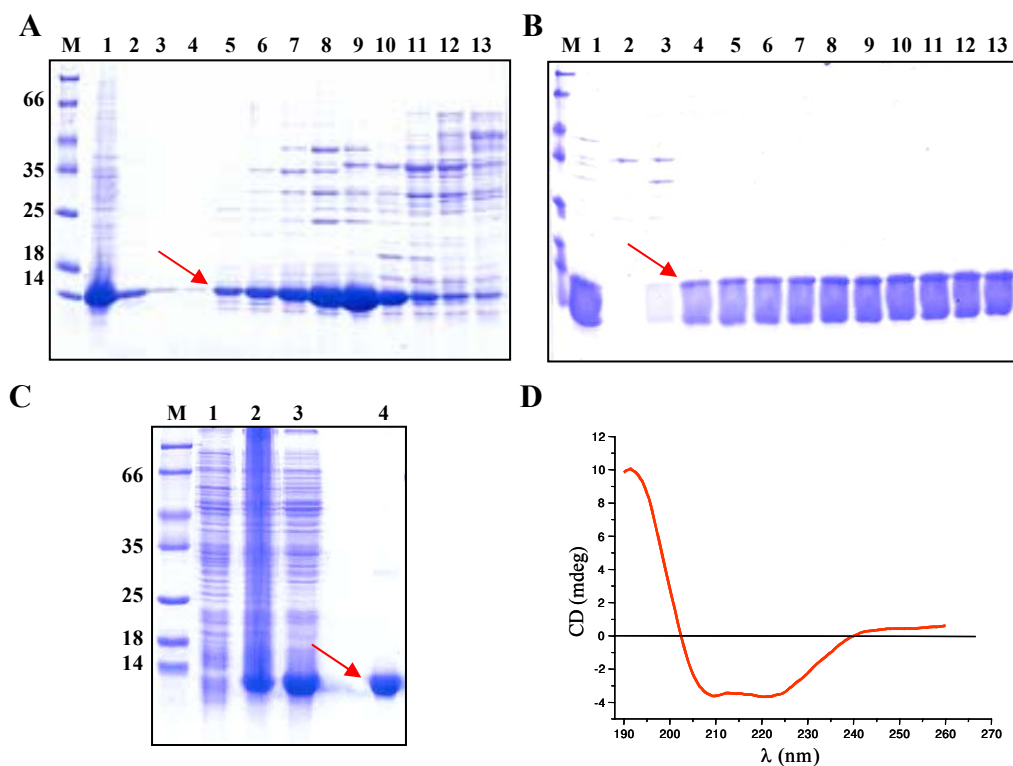


Figura 19: Expressão, purificação e dicroísmo circular da forma nativa da proteína BigR. **A-** Primeira etapa de purificação. 1, extrato protéico total de *E.coli*; 2 a 13, frações eluídas da coluna de troca aniônica com gradiente crescente de sal. **B-** Segunda etapa de purificação. 1, amostra inicial após adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 2 a 13, amostras eluídas da coluna de interação hidrofóbica com gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As setas indicam a migração da proteína BigR. **C-** SDS-PAGE mostrando em 1, extrato total de *E. coli* não induzido; 2, extrato total após 1 hora de indução; 3, extrato total após 3 horas de indução; 4, proteína BigR purificada. As setas indicam a proteína BigR de 13 kDa. M, indica o padrão de peso molecular. **D-** Espectro de CD da proteína BigR purificada na forma nativa indicando picos negativos nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm.

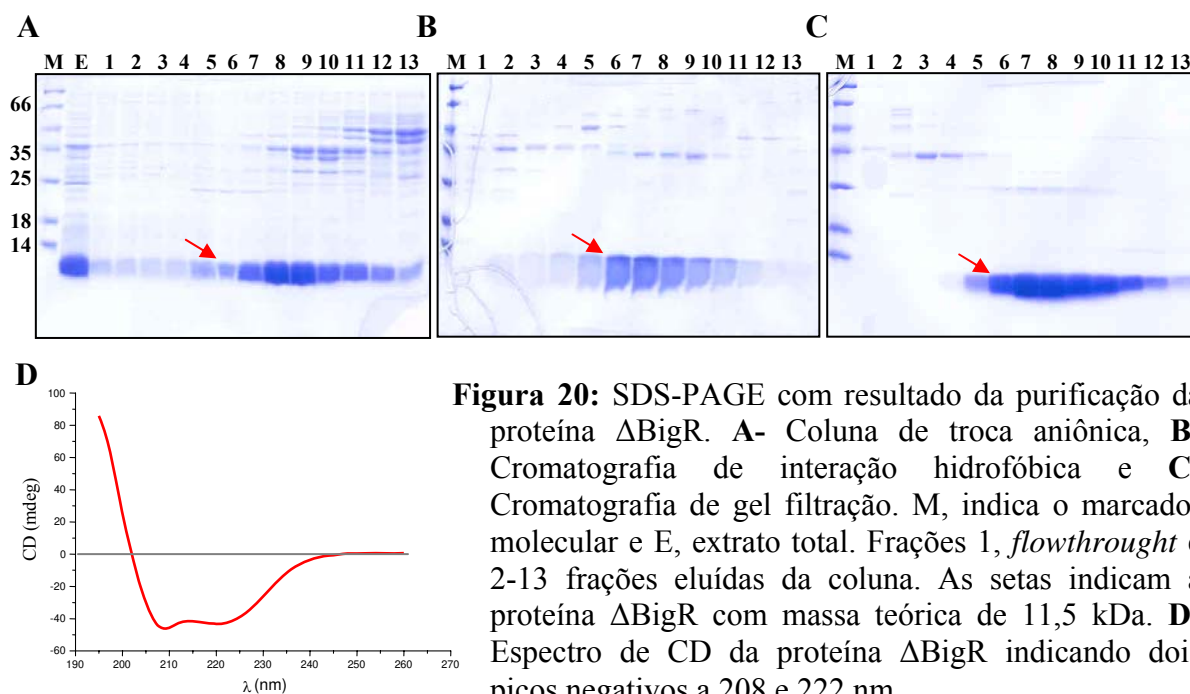


Figura 20: SDS-PAGE com resultado da purificação da proteína Δ BigR. **A-** Coluna de troca aniônica, **B-** Cromatografia de interação hidrofóbica e **C-** Cromatografia de gel filtração. M, indica o marcador molecular e E, extrato total. Frações 1, *flowthrough* e 2-13 frações eluídas da coluna. As setas indicam a proteína Δ BigR com massa teórica de 11,5 kDa. **D-** Espectro de CD da proteína Δ BigR indicando dois picos negativos a 208 e 222 nm.

-Cristais de Δ BigR Não Incorporam Metal

Os cristais obtidos com a proteína BigR inteira não tiveram um bom padrão de difração (Figura 21A), enquanto que os cristais obtidos com a proteína Δ BigR tiveram seus dados coletados à 1,95 Å de resolução. Os resultados obtidos para este conjunto de dados nativo encontram-se apresentados no item seguinte deste capítulo (Artigo II). Entretanto, como não foi possível à resolução desta estrutura através da técnica de substituição molecular outras tentativas foram realizadas, como a incorporação de SeMet na molécula e *soaking* com metais pesados. Estes dados permitem a resolução da proteína através das técnicas de MIR (*Multiple Isomorphous Replacement*), MIRAS (*Multiple Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering*), SIRAS (*Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering*), SAD (*Singlewavelength Anomalous Diffraction*) ou MAD (*Multiwavelength Anomalous Diffraction*). Os cristais da proteína marcada com SeMet (Figura 21B), apresentaram bom padrão de difração e seus dados estão sendo apresentados no artigo II deste capítulo.

Outros dados de cristais derivados foram coletados após *soaking* com metal pesado. Para as tentativas de *soaking*, foram utilizados sais de Iodo, Gadolínio e Césio através, principalmente de uma reação lenta. Nesta reação o metal foi aplicado

diretamente na gota de cristalização. Esta metodologia foi adotada devido à fragilidade dos cristais durante a realização do *quick-cryo-soaking* que perdiam resolução ou desmanchavam mesmo com incubações de apenas 1 minuto. Com a utilização da técnica de *soaking* lento foi possível a coleta de 3 conjuntos de dados de difração. Os dados coletados foram de cristais submetidos a *soaking* com 5 mM de NaI durante 30 minutos, 5 mM de GdCl₃ durante 30 minutos e por último 10 mM de CsCl₂ durante 18 horas de incubação. As análises dos dados mostram que os cristais derivados difrataram até 3,0 Å de resolução e, assim como os dados nativos, pertencem ao grupo espacial P321. Os parâmetros resultantes da coleta e processamento dos dados mostram que a relação entre os valores de R_{meas} e R_{meas0} apresenta sinal anômalo baixo sendo difícil utilizá-lo para determinar a estrutura tridimensional da proteína (dados não apresentados). Apesar do sinal isomorfo da amostra ser alto, ele provavelmente está sendo causado pela falta de isomorfismo perfeito entre os dados do cristal nativo e derivado, ocasionado pela baixa qualidade dos cristais derivados, dificultando ainda mais a utilização destes dados na resolução da estrutura.

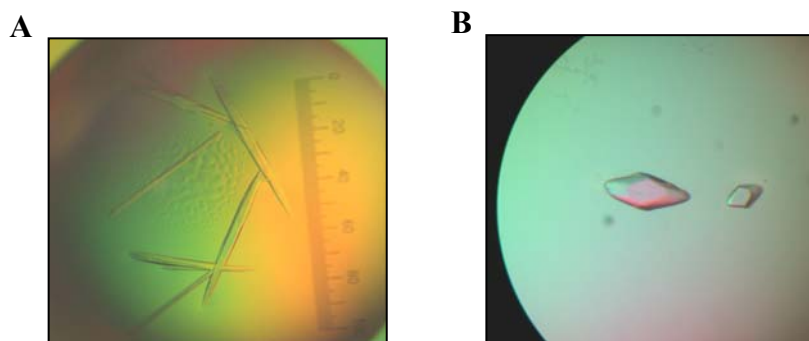


Figura 21: Cristais obtidos com a proteína BigR inteira e truncada na região N-terminal. A- Cristais de BigR após refinamento em solução contendo 0,1 M Tris-HCl, pH 8,25 e 30% de PEG 1000. B- Cristal de Δ BigR marcada com SeMet. A condição de crescimento foi 18% de ETOH e 0,1 M CAPS, pH 10,75.

ARTIGO II:

Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of BigR, a
Transcriptional Repressor from *Xylella fastidiosa* Involved in
Biofilm Formation

**Rosicler L. Barbosa, Fábio C. Rinaldi, Beatriz G. Guimarães and Celso
E. Benedetti**

Acta Crystallographica Section F (2007) F63: 596-598

**Rosicler Lázaro Barbosa,
Fábio Cupri Rinaldi,
Beatriz Gomes Guimarães* and
Celso Eduardo Benedetti***

Center for Molecular and Structural Biology,
Brazilian Synchrotron Light Laboratory,
Campinas, SP, CP 6192, CEP 13083-970, Brazil

Correspondence e-mail: beatriz@lnls.br,
celso@lnls.br

Received 17 April 2007
Accepted 12 June 2007

Crystallization and preliminary X-ray analysis of BigR, a transcription repressor from *Xylella fastidiosa* involved in biofilm formation

BigR (biofilm growth-associated repressor) is a novel repressor protein that regulates the transcription of an operon implicated in biofilm growth in both *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. This protein binds to a palindromic TA-rich element located in the promoter of the BigR operon and strongly represses transcription of the operon. BigR contains a helix–turn–helix (HTH) domain that is found in some members of the ArsR/SmtB family of metal sensors, which control metal resistance in bacteria. Although functional studies have suggested that BigR does not act as a metal sensor, the presence of two cysteines and a methionine in its primary structure raised the possibility of BigR being a metal–ligand protein. In order to gain new insights into the protein structure and its possible interaction with a metal ion or effector ligand, BigR from *X. fastidiosa* was crystallized in native and selenomethionine (SeMet) labelled forms using the hanging-drop vapour-diffusion method. X-ray diffraction data were collected from native and SeMet crystals to resolutions of 1.95 and 2.2 Å, respectively. Both crystals belong to space group *P*321 and contain one molecule per asymmetric unit.

1. Introduction

Xylella fastidiosa is a plant pathogen that causes economically important diseases in citrus plants, grapevines and coffee (Davis *et al.*, 1978; Chang *et al.*, 1993; De Lima *et al.*, 1998). The bacterium, which is transmitted from plant to plant by specific insect vectors, colonizes the xylem vessels, leading to water and nutrient stress (Brlansky *et al.*, 1983). The development of the symptoms of the disease is currently thought to be caused by vascular occlusion of the xylem vessels arising from bacterial biofilm formation (Newman *et al.*, 2004). The process of biofilm formation in the *Xylella*–plant interaction is not very well understood, but recent studies have shown that an operon that is conserved in several plant bacterial species is activated during bacterial biofilm growth (Barbosa & Benedetti, unpublished work). This operon encodes proteins of unknown function and BigR, a transcriptional factor that represses transcription of the operon through binding to an operator sequence located at the –10 region of the operon promoter (Barbosa & Benedetti, unpublished work).

BigR contains a central HTH domain that is commonly found in members of the ArsR/SmtB protein family, which control metal tolerance in bacteria (Busenlehner *et al.*, 2003). These transcriptional repressors have conserved metal-binding sites and function as metal sensors. The transcriptional control of metal-resistant genes by this class of repressors depends on the repressor metal-binding status. Although functional studies have suggested that BigR does not act as a metal sensor, the presence of two cysteines and a methionine that are conserved in various BigR homologues raised the possibility of BigR being a metal–ligand protein. To gain insight into the three-dimensional structure of BigR and to investigate the possibility of this protein interacting with a metal ion or a nonmetal effector ligand, we have crystallized the *X. fastidiosa* repressor for X-ray diffraction and structure determination.

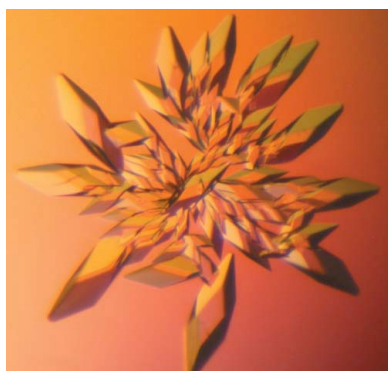


Table 1

Data-collection statistics.

Values in parentheses are for the outer resolution shell.

Data set	Native	SeMet		
		Peak	Inflection	Remote
Wavelength (Å)	1.43	0.9795	0.9797	0.9282
Space group	<i>P</i> 321	<i>P</i> 321	<i>P</i> 321	<i>P</i> 321
Unit-cell parameters (Å)	$a = b = 33.68$, $c = 139.07$	$a = b = 34.23$, $c = 140.78$	$a = b = 34.23$, $c = 140.81$	$a = b = 34.23$, $c = 140.78$
Resolution limits (Å)	29.17–1.95 (2.06–1.95)	29.64–2.20 (2.32–2.20)	29.64–2.25 (2.37–2.25)	29.64–2.25 (2.37–2.25)
Completeness (%)	93.0 (93.0)	98.2 (98.2)	98.4 (98.4)	98.4 (98.4)
Multiplicity	17.8 (18.4)	11.2 (11.7)	11.2 (11.8)	11.2 (11.8)
R_{sym} (%)	5.6 (37.5)	5.9 (33.3)	6.8 (39.4)	7.2 (42.1)
Mean $I/\sigma(I)$	9.5 (2.0)	34.9 (7.3)	31.7 (6.4)	30.4 (6.3)
Anomalous completeness (%)	—	98.9 (98.5)	99.0 (98.3)	99.1 (98.5)
Anomalous multiplicity	—	6.3 (6.2)	6.3 (6.2)	6.3 (6.2)
CC_{anom} (overall)	—	0.626	0.499	0.494
Resolution limit of anomalous signal† (Å)	—	2.6	2.8	3.0

† Resolution to which the correlation of the anomalous differences is larger than 0.4.

2. Materials and methods

2.1. Cloning, expression and purification

The XF0767 gene (NP_298057) was amplified from *X. fastidiosa* genomic DNA with primers 5'-CCATGGTGAACGAAATGCGAG-3' and 5'-CTCGAGTCACGCCTGTTTCTC-3'. PCR products were cloned into pGEMt (Promega), sequenced and subcloned into pET28a (Novagen) for expression of native BigR. To obtain the 12-amino-acid N-terminal deletion (Δ BigR), pET28a-BigR was cut with *NdeI/XhoI* and the corresponding BigR fragments were inserted into pET29a (Novagen).

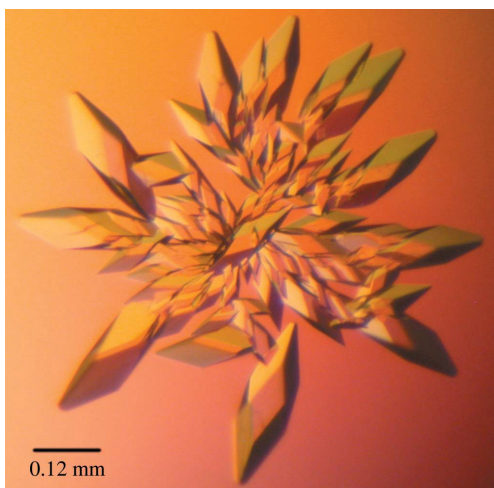
Recombinant BigR was produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells transformed with pET28a and pET29a (Novagen) containing the BigR and Δ BigR sequence, respectively. Cells were grown at 310 K under agitation and proteins were produced by the addition of IPTG (0.4 mM) after the optical density of the culture reached 0.6 at 600 nm. After 3 h induction in LB medium, cells were disrupted by sonication. The selenomethionine-substituted protein (SeMet- Δ BigR) was produced in the same *E. coli* strain BL21 (DE3) as used for nonlabelled protein expression. Cells were grown in 1.5 l M9 minimum media (Sambrook & Russell, 2001) containing 50 μ M FeCl₃, 10 μ M MnCl₂, 10 μ M ZnSO₄, 2 μ M CoCl₂ and 2 μ M NiSO₄ at 303 K under agitation until the optical density of the culture reached

0.6 at 600 nm. The culture was then supplemented with 150 mg lysine, 150 mg phenylalanine, 150 mg threonine, 75 mg isoleucine, 75 mg valine and 90 mg selenomethionine 15 min before induction with 0.4 mM IPTG for 7 h at 303 K and 200 rev min⁻¹.

Cell extracts containing BigR were loaded onto a Q-Sepharose FF column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 7.0 and 0.5 mM DTT. The protein was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in the same buffer. Ammonium sulfate was added to the protein fraction to a final concentration of 1 M and the protein fraction was then loaded onto a Phenyl-Sepharose HP column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.5 mM DTT and 1 M ammonium sulfate. The protein was eluted with a linear gradient of 1–0 M ammonium sulfate in the same buffer. Δ BigR and Δ BigR-SeMet were purified using the same protocol as described above, except that the pH of the buffer was 7.7 and an additional gel-filtration step was performed after the hydrophobic adsorption chromatography. In this step, Δ BigR and Δ BigR-SeMet were loaded onto a Superdex G75-16/60 column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM DTT and 50 mM ammonium sulfate. All proteins were concentrated and dialyzed against the same buffer containing 10 mM ammonium sulfate. Selenomethionine incorporation was confirmed by mass spectrometry, which indicated that the three methionines of Δ BigR were replaced by selenomethionines.

2.2. Crystallization

Initial crystallization trials were performed with native BigR protein at 10 mg ml⁻¹ using screens from Hampton Research (Crystal Screens I and II), Emerald BioStructures (Wizard I and II) and Jena Bioscience (JB I and II). Crystals were obtained using the hanging-drop vapour-diffusion method at 293 K, but despite extensive optimization trials they only diffracted to low resolution (~6 Å). In an attempt to improve the crystal quality, Δ BigR protein was submitted to crystallization trials using the same screens. Crystals were observed 24 h after mixing 2 μ l protein solution (7 mg ml⁻¹) with 2 μ l reservoir buffer containing 15% ethanol and 0.1 M CHES pH 9.5. Crystals were optimized by varying the ethanol concentration and the buffer pH around the initial condition. The best Δ BigR crystals were obtained in 18% ethanol and 0.1 M Tris-HCl pH 9.5. Δ BigR-SeMet protein was submitted to the same refinement screen and the best crystals were grown in 17% ethanol and 0.1 M Tris-HCl pH 8.5. Δ BigR crystals reached dimensions of approximately 0.3 × 0.1 × 0.1 mm after one week (Fig. 1).

**Figure 1**

BigR crystals from *X. fastidiosa* obtained by hanging-drop vapour diffusion. The maximum crystal dimensions are approximately 0.3 × 0.1 × 0.1 mm.

2.3. Data collection and processing

X-ray diffraction data from a native crystal were collected at the D03B-MX1 beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. Crystals were cryoprotected with 15% 2-methyl-2,4-pentanediol prior to flash-cooling in a 100 K nitrogen-gas stream. A complete data set was collected using a MAR CCD detector and an oscillation width of 0.8° per image. The beamline wavelength was set to 1.43 Å. Data from a Δ BigR-SeMet crystal were collected at the W01A-MX2 beamline of the LNLS at various wavelengths (peak, inflection, remote) derived from a scan of the Se *K* absorption edge. Diffraction data were processed with *MOSFLM* (Leslie, 1992) and *SCALA* (Kabsch, 1988; Blessing, 1995) from the *CCP4* package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

3. Results and discussion

BigR crystallization trials using the complete protein resulted in crystals of poor diffraction quality. In order to obtain better crystals, an N-terminally truncated form of the protein beginning at residue 13 (Δ BigR) was produced. Δ BigR (11.5 kDa) crystals diffracted to 1.95 Å resolution and belong to space group *P*321, with unit-cell parameters $a = b = 33.68$, $c = 139.07$ Å. Matthews coefficient calculation (Matthews, 1968) indicated the presence of one monomer in the asymmetric unit and a solvent content of 35.8%. Table 1 summarizes the data-collection statistics.

Extensive attempts to solve the Δ BigR structure by molecular-replacement methods using HTH protein models deposited in the Protein Data Bank were unsuccessful. The sequence identity to the search models varied from 15% to 25% and the models were used intact or trimmed to account for insertions and deletions. Polyalanine models were also used without success.

As an alternative to the molecular-replacement approach, selenomethionine-labelled Δ BigR was produced. Mass spectrometry showed that all three methionines of Δ BigR were substituted by selenomethionines, thus allowing the use of the MAD technique. SeMet crystals diffracted to 2.20 Å and belong to space group *P*321,

with unit-cell parameters that are very similar to those of the native crystal (Table 1). Two selenium sites were found using the program *SHELXD* (Schneider & Sheldrick, 2002) and initial phase calculation was carried out with *autoSHARP* (Vonnrhein *et al.*, 2006). Electron-density map analysis and model building are currently in progress.

In conclusion, we have crystallized both native and SeMet-labelled *X. fastidiosa* BigR protein and expect that the three-dimensional structure of BigR will provide insight into its possible interaction with metal ions or other effector ligands.

This work was supported by FAPESP grants (03/08316-5, Smolbnet 00/10266-8 and Cepid 98/14138-2). RLB and FCR received PhD fellowships from FAPESP (02/12329-2 and 03/12875-0). CEB received a fellowship from CnPq.

References

- Blessing, R. H. (1995). *Acta Cryst.* **A51**, 33–38.
- Brlansky, R. H., Timmer, I. W., French, W. J. & McCoy, R. E. (1983). *Phytopathology*, **73**, 530–535.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2003). *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143.
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. & Bové, J. M. (1993). *Curr. Microbiol.* **27**, 137–142.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Davis, M. J., Purcell, A. H. & Thomson, S. V. (1978). *Science*, **199**, 75–77.
- De Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Brlansky, R. H., Coutinho, A., Roberto, S. R. & Carlos, E. F. (1998). *Plant Dis.* **82**, 94–97.
- Kabsch, W. (1988). *J. Appl. Cryst.* **21**, 916–924.
- Leslie, A. G. W. (1992). *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Crystallogr.* **26**.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E. (2004). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 1737–1742.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 1772–1779.
- Vonnrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. (2006). *Macromolecular Crystallography Protocols*, edited by S. Doublié, Vol. 2, pp. 215–230. Totowa, NJ, USA: Humana Press.

3.3- CAPÍTULO III: Estudos Estruturais Complementares

Apesar de presentes em uma grande variedade de organismos, o domínio HTH é encontrado principalmente em bactérias, onde está envolvido com ligação ao DNA, participando em atividades como reparo de DNA e metabolismo de RNA, além da regulação da transcrição. Entretanto, existem trabalhos que mostram a adaptação do domínio HTH em diferentes atividades biológicas como mediador de interações proteína-proteína ou como unidade estrutural de grandes domínios enzimáticos. Pouco se conhece sobre as características funcionais e estruturais de BigR, porém, sua sequência de aminoácidos mostra uma grande conservação do domínio HTH encontrado em repressores transcricionais. Durante a realização dos estudos apresentados até aqui, algumas características estruturais de BigR foram observadas e mereceram mais investigação, auxiliando no maior conhecimento da proteína BigR.

Neste capítulo, estão sendo apresentados alguns resultados complementares em relação à caracterização estrutural da proteína BigR. Desta forma, foram realizados estudos de biofísica molecular para se determinar o grau de oligomerização, estabilidade térmica e alterações estruturais da proteína que pudessem estar relacionadas com sua atividade biológica. Para isso, foi construído um modelo estrutural de BigR. A análise deste modelo não mostrou nenhuma correspondência com os sítios de metal encontrados na molécula alvo, além disso, o modelo indica que a formação do dímero é causada por interações hidrofóbicas e não por pontes dissulfeto. Apesar da similaridade com as proteínas SmtB, que formam dímero, os ensaios de gel filtração analítica e *dynamic light scattering* (DLS) mostraram que a proteína BigR em solução possui massa molecular compatível com a formação de trímero.

O tratamento da proteína com altas concentrações de sulfato de amônio causaram alterações na estrutura secundária, mostrando menor conteúdo de α -hélice sem alterar sua estabilidade térmica em ensaio de CD. Após tratamento com este sal a proteína também não foi capaz de se ligar ao DNA eficientemente. Aparentemente, a redução ou oxidação das cisteínas presentes na molécula não interferiu na ligação com DNA, e o tratamento com sulfato também não alterou o padrão de oxidação ou oligomerização da molécula.

ESTUDOS ESTRUTURAIS COMPLEMENTARES

Materiais e Métodos

-Modelagem Molecular

O modelo tridimensional da proteína BigR foi construído a partir das coordenadas da estrutura cristalográfica da proteína SmtB de *Synechococcus* Pcc7942 (código de acesso no PDB: 1smt) (Cook *et al.*, 1998). A construção e análise dos modelos foram realizadas numa estação de trabalho Compaq AlphaServer ES 40 em colaboração do Dr. Sérgio Oyama Júnior (LNLS). Os modelos por homologia foram gerados pelo programa MODELLER (Sali and Blundell, 1993) e suas características estereoquímicas foram analisadas no programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). A visualização e análise do modelo foram realizadas através do programa InsightII (Accelrys Inc.).

-Purificação Parcial do Extrato Protéico de *X. fastidiosa*, Preparação do Anticorpo anti-BigR e Western Blot.

Células de uma cultura saturada da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* foram coletadas, ressuspensas em tampão Tris-HCl pH 7,7; lisadas por sonicação com 20 pulsos de 20 segundos e centrifugadas para remoção do material insolúvel. O extrato protéico foi submetido à cromatografia em coluna Q-Sepharose FF de 1 mL (Amersham Biosciences). Foram utilizados os mesmos tampões e gradiente da purificação da proteína BigR recombinante, já descrita no artigo I do capítulo I, objetivando a coleta de frações com maior concentração da proteína BigR nativa de *Xylella*. As frações eluídas da coluna foram coletadas e armazenadas à 4°C para realização de *Western blot*.

Os anticorpos policlonais foram obtidos contra a proteína BigR-6his purificada com o auxílio e colaboração da Dra. Heloísa S. S. Araújo, da Universidade Federal de São Carlos. A proteína (0,6 mg/mL) em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 40 mM de NaCl foi misturada com o adjuvante completo de Freund (Sigma) em proporção de 1:1. Uma alíquota de 0,1 mL desta mistura (aproximadamente 30 µg de proteína) foi injetada intraperitonealmente em camundongos de 4 semanas de idade, com uma imunização secundária após 45 dias. A sangria dos animais foi realizada 30 dias após a imunização secundária e um soro não imune foi coletado de camundongos não

injetados. Para detecção da proteína BigR, os extratos de interesse foram transferidos para membrana PVDF (Millipore), seguindo o procedimento padrão (Sambrook and Russel, 2001). As membranas bloqueadas foram incubadas com anticorpo primário anti-BigR (1:1000) por 1 h à temperatura ambiente, lavada em TBS e incubada por 1 h com anticorpo anti-mouse secundário do kit ECL com diluição de 1:3000. A detecção foi realizada utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante.

-Gel filtração, DLS e Determinação do Conteúdo de Grupos Sulfidríla

Para determinar o grau de oligomerização da proteína Δ BigR em solução, a proteína purificada (3mg) foi aplicada a uma coluna de gel filtração Superdex G75-10/30 previamente calibrada com Blue-Dextran 2000, Ribonuclease A, Chimotripsinogênio A, Ovalbumina e Albumina. Cada padrão foi corrido separadamente de acordo com as instruções do fabricante do *Gel Filtration Calibration kit* (Amersham Biosciences). Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL/min e uma curva de calibração relacionando os volumes de eluição (K_{av}) com o log das respectivas massas moleculares foi calculada. As medidas de DLS de Δ BigR foram realizadas com uma concentração de 2,5 mg/mL de proteína em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Foram feitas 30 acumulações em temperatura ambiente utilizando um DynaPro Reader com a versão 6.2 do software Dynamics.

A determinação do conteúdo de grupos sulfidríla presentes em BigR foi realizada com a utilização do reagente de Ellman (Pierce). Para isso, foram utilizadas alíquotas da proteína com concentração de 80 μM pré-tratadas por 24 horas à 4° C com agente oxidante (t-BOOH com estequiometria de 17:1 de oxidante/proteína) ou redutor (100 mM de DTT). O excesso de oxidante e redutor foi removido através de diálise e a determinação dos grupos tióis livres foram determinados através do reagente de Ellman (DTNB) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Pierce).

-Ensaio de Dicroísmo Circular

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-810 (JASCO) em cubeta de 1 mm de caminho óptico utilizando 43,5 pmols de proteína. Foram

Entre cinco modelos estruturais de BigR gerados no MODELLER, selecionou-se um que mostrou os melhores valores estereoquímicos. A sobreposição dos modelos de BigR e SmtB não mostrou correspondência aos sítios de ligação de metal da proteína SmtB (Cook *et al.*, 1998; Eicken *et al.*, 2003). Por outro lado, o modelo permitiu observar a posição das duas cisteínas que são conservadas em proteínas homólogas a BigR (Figura 4 e Figura 1 – Artigo I) e que não estão presentes na SmtB ou ArsR (Figuras 23). É interessante notar que as cisteínas da mesma cadeia polipeptídica estão separadas espacialmente e provavelmente não fazem ponte dissulfeto entre si. Além disso, as cisteínas entre cadeias também não se encontram em posições favoráveis à formação de pontes S-S (Figura 23). O modelo ainda mostra que o dímero é estabilizado principalmente por interações hidrofóbicas.

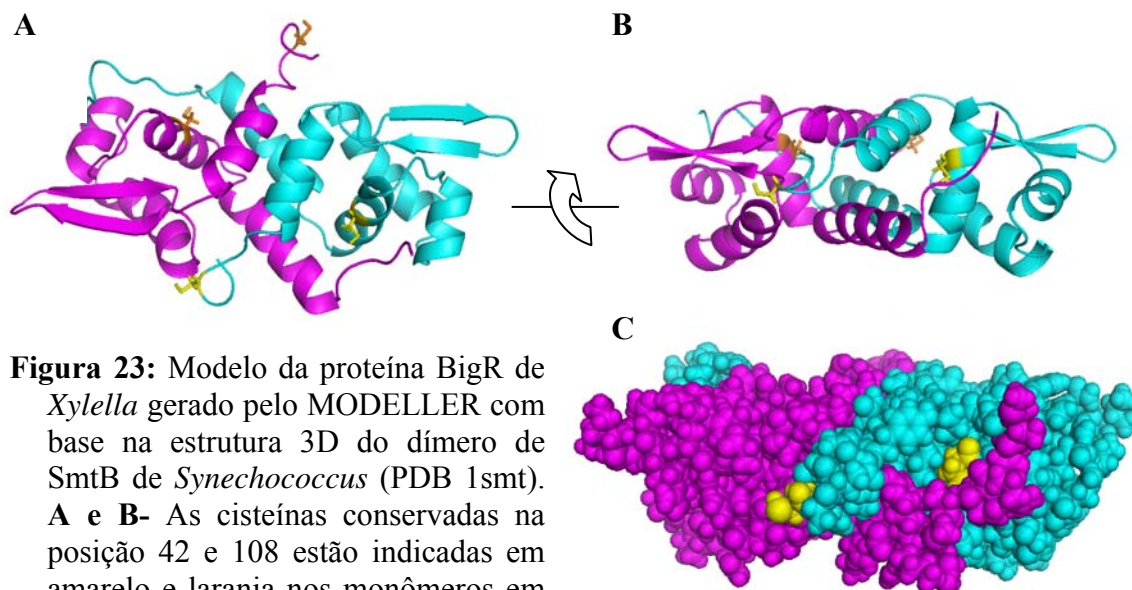


Figura 23: Modelo da proteína BigR de *Xylella* gerado pelo MODELLER com base na estrutura 3D do dímero de SmtB de *Synechococcus* (PDB 1smt). **A e B-** As cisteínas conservadas na posição 42 e 108 estão indicadas em amarelo e laranja nos monômeros em azul e lilás, respectivamente. **C-** Modelo espaço cheio mostrando a posição das duas cisteínas da mesma cadeia (amarelo).

-Proteína Multimeriza em Solução e Forma Complexos Maiores com DNA

Análises estruturais mostram que a maior parte dos fatores de transcrição com domínio HTH de procariotos são homodímeros, embora monômeros, trímeros, tetrâmeros e hexâmeros possam interagir com o DNA (Ni *et al.*, 1999; Cícero *et al.*, 2001 e Huffman and Brennan 2002). Foi observado que a proteína BigR-6his purificada (~14 kDa) quando analisada por gel de eletroforese denaturante (SDS-PAGE) apresentava uma banda de ~30 kDa (Figura 24A), sugerindo uma oligomerização mesmo na presença de agentes redutores. Esta banda foi confirmada através de *Western blot* que detectou três bandas majoritárias na amostra com massas moleculares correspondentes ao monômero, dímero e trímero da proteína (Figura 24A). É interessante notar que as bandas de dímero e trímero, que não são muito visíveis em SDS-PAGE, são mais fortemente reconhecidas pelo anticorpo anti-BigR, comparada com a banda do monômero, mais abundante na amostra. Uma vez que o anticorpo foi feito com a proteína BigR purificada na ausência de agentes redutores, estes resultados indicam que BigR oligomeriza em dímeros e trímeros. O mesmo foi verificado com a proteína Δ BigR (~11,5 kDa) que oligomerizou-se em dímeros e trímeros em condições denaturantes e não denaturantes, na ausência de SDS (Figura 24B). Novamente, estas bandas foram detectadas pelo anticorpo mais fortemente que a banda do monômero presente em maior quantidade na amostra (Figura 24B), confirmando que em condições nativas a proteína forma dímero e trímero.

O padrão de oligomerização de Δ BigR foi posteriormente analisado através de gel filtração e DLS, pois esta forma da proteína produz melhores cristais que as formas BigR e BigR-his (Artigo II, Capítulo II), sugerindo que a construção truncada seja mais homogênea e estável que a proteína inteira. As medidas de DLS indicam o caráter monodisperso da amostra Δ BigR, que produziu um único pico correspondente a uma proteína de 32 kDa (Figura 24C), evidenciando sua oligomerização. Esta massa molecular calculada está próxima do valor esperado para um homotrímero desta construção que é de 34,5 kDa. Além disso, no ensaio de gel filtração, Δ BigR foi eluída da coluna em um único pico com massa molecular estimada em 36,2 kDa (Figura 24D), novamente compatível com a massa de um homotrímero. Juntos, estes resultados fortemente indicam que Δ BigR é predominantemente um homotrímero em solução.

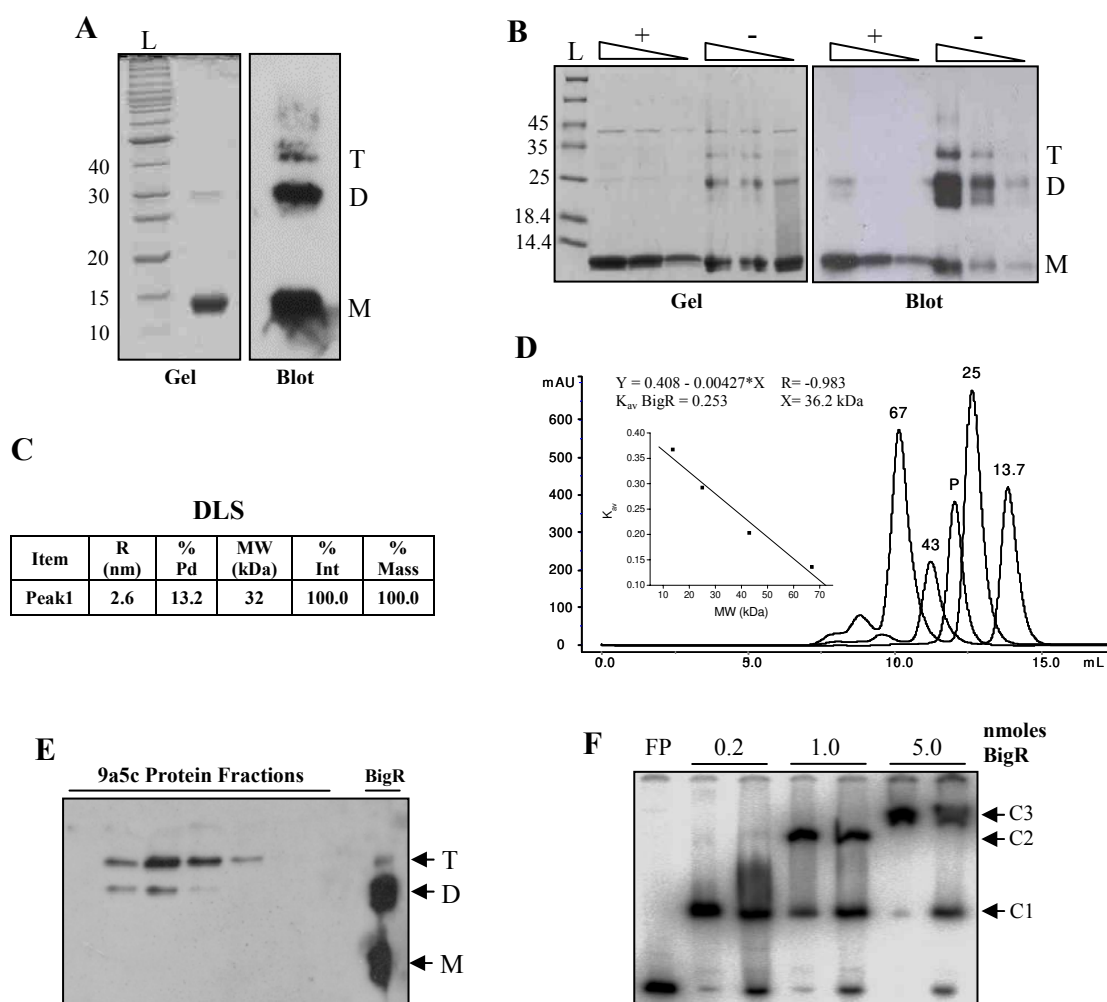


Figura 24: BigR multimeriza em solução e forma complexos moleculares maiores com o DNA. **A-** Gel de SDS-PAGE da proteína BigR-his purificada (~14 kDa) corada com *commasie blue* e o *Western blot* correspondente marcado com o anticorpo anti-BigR. As bandas de proteínas possuem massa molecular consistente com monômeros (M), dímeros (D) e trímeros (T) da proteína. **B-** SDS-PAGE e *Western blot* da proteína Δ BigR corridos na presença (+) e na ausência (-) de DTT e SDS no tampão de amostra. As bandas predominantemente marcadas pelo antisoro em condições não redutoras têm massas moleculares consistentes com dímero e trímero. **C-** Medida de DLS de Δ BigR mostrando que a amostra é monodispersa com massa molecular calculada em 32 kDa e raio de giro de 2,6 nm. **D-** Ensaio de gel filtração analítica onde Δ BigR (P) foi eluída em um único pico com massa molecular estimada em 36,2 kDa. **E-** *Western blot* das proteínas de *Xylella* 9a5c fracionadas por cromatografia de troca iônica seguindo protocolo utilizado para a BigR recombinante. O anticorpo anti-BigR detectou bandas de aproximadamente 28 e 38 kDa que migraram em posições relativas as bandas de dímero e trímero de BigR. **F-** EMSA com aumentos de 5 vezes na molaridade de BigR resultando na formação de complexos moleculares massa aumentada (C2 e C3) na ligação ao DNA.

O soro anti-BigR foi utilizado para detectar BigR em extratos totais de células de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens*. Consistente com o estado reprimido do operon, inicialmente, a proteína BigR não foi detectada. Para tentar obter um extrato mais concentrado, o protocolo de purificação definido para a proteína recombinante BigR foi utilizado para fracionar proteínas do extrato celular de *Xylella*. As frações protéicas que possivelmente continham o repressor foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por *Western blot* utilizando o soro anti-BigR. Intrigantemente, o antisoro não detectou a banda monomérica de aproximadamente 13 kDa sob condições denaturantes, mas detectou duas proteínas de aproximadamente 28 e 38 kDa, que migraram em posições similares às bandas de dímero e trímero da proteína recombinante BigR. (Figura 24E).

Para testar se BigR pode formar complexos de maior massa molecular com DNA, ensaios de EMSA com o promotor BLH de *Xylella* foram realizados na presença de concentrações aumentadas de BigR (Figura 24F). Os resultados mostram que complexos de DNA/proteína com massas moleculares maiores são formados a medida que a concentração de BigR aumenta, sugerindo que BigR se liga ao DNA em diferentes estados de oligomerização.

-Sulfato Altera Ligação da Proteína com DNA e Conteúdo de α -hélice Sem Alterar Padrão de Oxidação das Cisteínas Consevadas

Foi observado que a proteína BigR purificada após etapa de interação hidrofóbica, utilizando altas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, não se ligava eficientemente ao DNA (dados não apresentados). Assim, foram realizados ensaios, através de CD, para avaliar as alterações estruturais causadas por este tratamento.

Os espectros de CD obtidos com a proteína BigR antes e após tratamento com alta concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostram picos negativos a 222 e 208 nm típicos de proteínas ricas em estrutura de α -hélice. A sobreposição destes dois dados, em igual concentração, mostra que após tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a proteína perde conteúdo de α -hélice em sua estrutura secundária, uma vez que apresenta picos menos negativos (Figura 25A). É possível que esta diminuição de estrutura seja responsável pela diminuição da capacidade de ligação ao DNA da proteína tratada em comparação com a proteína não tratada.

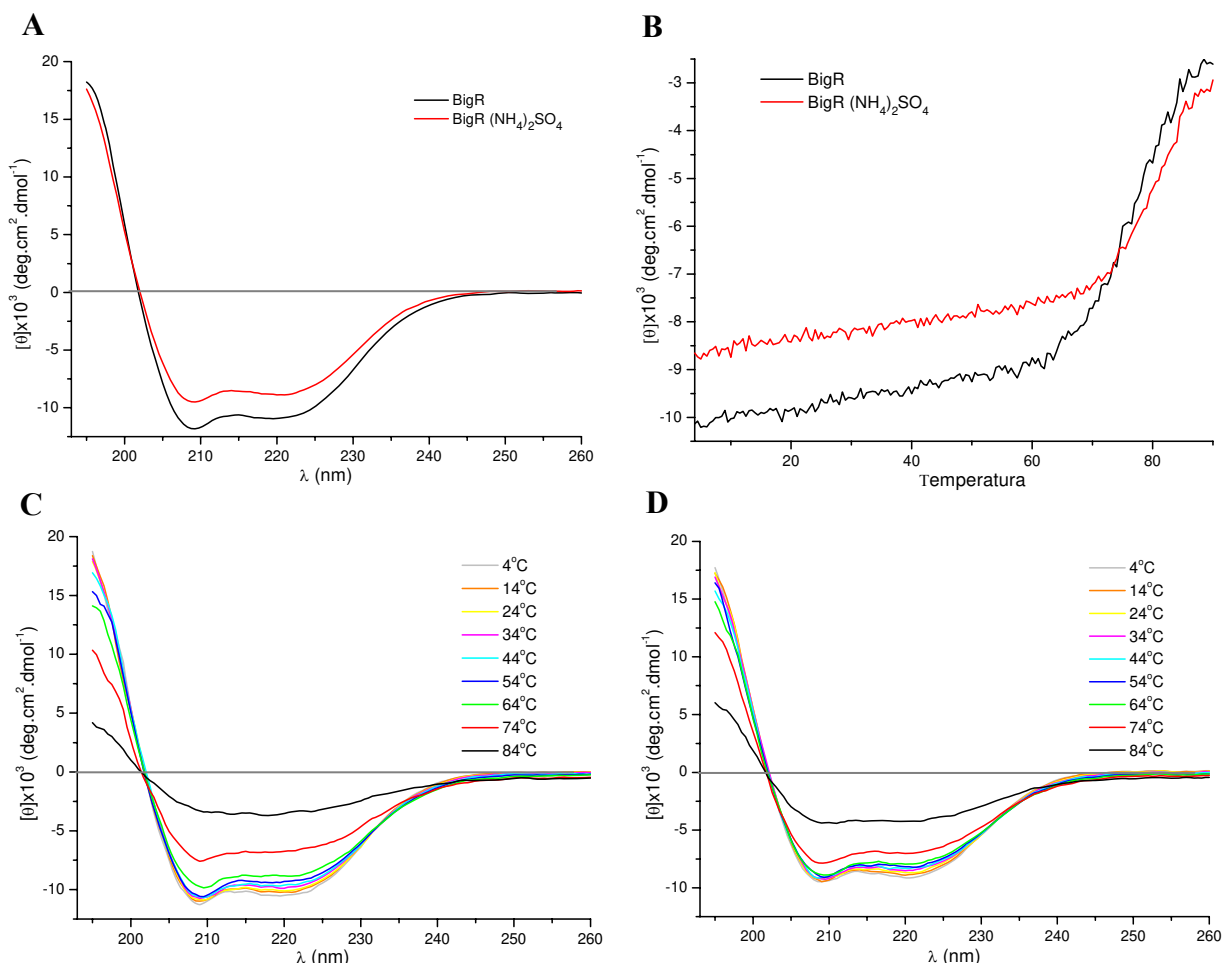


Figura 25: Espectros de CD obtidos com 43,5 μM de proteína BigR purificada antes e após tratamento com sal. **A-** Sobreposição dos espectros da proteína com e sem a presença de sal, indicando perda de estrutura secundária. **B-** Curva de desnaturação térmica de BigR antes e após adição de sal. **C-** Espectros totais da proteína BigR em diferentes temperaturas. **D-** Espectros da proteína BigR após tratamento com 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido de diálise para eliminar o excesso de sal.

Para melhor avaliar esta alteração foi realizada uma curva de estabilidade térmica. Nesta análise, foi possível notar que a proteína BigR possui uma alta estabilidade térmica, apresentando pouca variação conformacional até a temperatura de 74°C (Figura 25C e D). Tanto a proteína sem como a proteína com sulfato, começam a perder estrutura secundária após 74°C, mas ainda mantém o espectro de α -hélice até 84°C (Figura 25C e D). A comparação entre o desenovelamento térmico de 4 a 90°C a 222 nm das proteínas com e sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, revela que ambas possuem o mesmo padrão de desenovelamento com T_m ao redor de 79°C (Figura 25B). Desta forma, observa-se que a diferença

apresentada pela proteína nos dois tipos de purificação, com e sem sulfato de amônio, se baseia na menor proporção de estrutura secundária da proteína com sulfato.

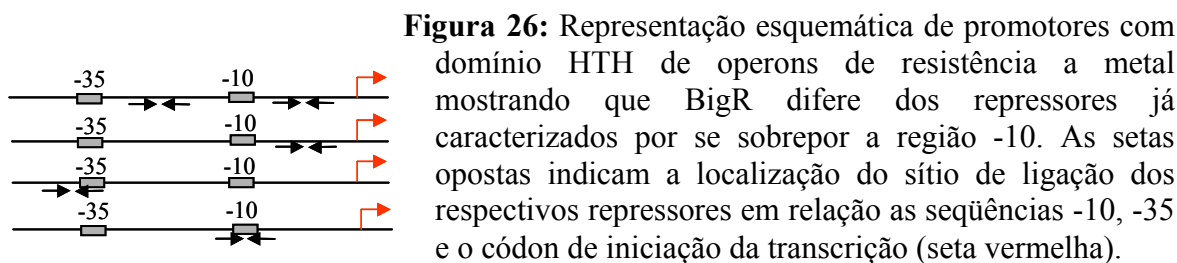
A comparação da sequência de aminoácidos de BigR e suas homólogas indicam a conservação das cisteínas 42 e 108 (Cys42 e Cys108) em *Agrobacterium* (Figura 4) e outros ortólogos (Figura 1- Artigo I). Assim, a possível função e disponibilidade destas cisteínas na interação com ligantes foram avaliadas através da reação de Ellman. Estes dados mostram que 50% das cisteínas presentes na proteína podem ser reduzidas, podendo participar de algum tipo de interação, enquanto a outra metade encontra-se oxidada e não acessível aos agentes redutores (dados não apresentados). O tratamento com sulfato de amônio não alterou o padrão de oxidação da molécula. Da mesma forma, a utilização de altas concentrações de agentes redutores e oxidantes não alterou a ligação da proteína com DNA em ensaios de EMSA, indicando que as cisteínas não são importantes para esta ligação (dados não apresentados).

4. DISCUSSÃO

4.1- Caracterização Funcional

Pouco mais que a metade dos genes presentes em *Xylella fastidiosa* codifica proteínas hipotéticas e a maioria das ORFs com função assinalada, baseada em homologia de sequência, espera por experimentação para validar seu papel biológico. Neste trabalho nós demonstramos que BigR, o produto do gene XF0767, originalmente classificado como um regulador transcricional da família ArsR, apesar de funcionar como repressor transcricional, possui propriedades significativamente diferentes das apresentadas pelas proteínas ArsR/SmtB.

O mecanismo pelo qual BigR reprime a transcrição é através da ligação com um elemento rico em AT, *BigRbox*, localizado no promotor do operon XF0768-0764. O *BigRbox* se sobrepõem ao sítio de ligação da subunidade sigma 70 da RNA polimerase. Desta forma, na ausência do sinal de indução, BigR encontra-se fortemente ligada ao promotor evitando a ligação da maquinaria de transcrição. Para nosso entendimento, este é o primeiro repressor transcricional procariótico de domínio HTH caracterizado com tal especificidade de ligação. A maioria dos membros conhecidos da família ArsR/SmtB, por exemplo, reconhece sequências de DNA distintas, que estão localizadas *upstream* a região -35, *dowstream* da região -10 ou entre estas duas regiões, mas nenhuma sobrepõe a região -10 (Figura 26) (Busenlehner *et al.*, 2003). BigR também parece regular exclusivamente o operon XF0768-0764 uma vez que pequenas alterações na sequência *BigRbox* interferem na especificidade de ligação da proteína, e que o consenso *BigRbox* não é encontrado em outras regiões dos genomas de *Xylella* e *Agrobacterium*.



Existem várias características interessantes sobre BigR que chamam a atenção para uma maior investigação da função biológica do operon XF0768-0764. Primeiramente, o operon parece dividir similaridades com operons de resistência a metal e antibióticos. Por exemplo, BigR mostra maior identidade com proteínas ArsR/SmtB e MarA e o promotor do operon também possui seqüências similares aos sítios de ligação de ArsR e MarA (Figura 6). O operon inclui uma hidrolase diferenciada (BLH) com um domínio de função desconhecida (DUF442) fusionado a um domínio GloB, e três prováveis permeases de membrana (Figura 5), que juntos sugerem que o operon promova a detoxificação de alguma molécula pequena. A maior conservação do operon em patógenos de plantas ou organismos que podem aproveitar-se de compostos de plantas para sobreviverem no solo, também sugere que o operon deve conferir adaptação relacionada ao estilo de vida destes organismos.

A função biológica do operon XF0768-0764 ainda não é conhecida e não é claro qual sinal seria necessário para ligar BigR e ativar a transcrição do operon. A hipótese de que BigR poderia funcionar como um sensor de metal, similar às proteínas SmtB e ArsR, foi investigada, entretanto, os resultados indicam que BigR não possui esta função. BigR não interage com o sítio de ligação ArsR localizado no promotor alvo. BigR não possui os sítios de ligação a metal conservados nos membros da família ArsR/SmtB e apesar dos metais cádmio, cobre e ferro interferirem na ligação ao DNA *in vitro*, estes metais não são capazes de ativar os genes repórter *in vivo*, além de não interferirem no crescimento das células de *Agrobacterium* deficientes em BigR e BLH. Apesar de íons Mg^{+2} terem sido adicionados na reação de EMSA para evitar interações DNA-metal, a eliminação do complexo DNA/BigR causada pelo metal pode ter sido proporcionada pela interação inespecífica do metal com o DNA.

Outra característica interessante do operon XF0768-0764 é a fusão do domínio DUF442 ao domínio GloB, que é única neste tipo de operon e restrita aos genomas de *X. fastidiosa*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *M. loti*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* e *Ochrobactrum anthropi*. Entretanto, em *R. etli* BLH contendo DUF442 não está em cluster no mesmo operon. Em *X.c. pv vesicatoria*, por outro lado, o domínio DUF 442 está fisicamente separado da ORF BLH mas é encontrado constituindo uma ORF no mesmo operon (Thieme *et al.*, 2005), enquanto que em *B. suis* ela aparece em um locus

diferente (Figura 7). É interessante notar que DUF442 encontra-se também fusionado em outras prováveis hidrolases como dienolactona hidrolase em *Zymomonas mobilis*, hidrolase NAD/FAD-dependente em *N. europaea* e sulfito hidrolase (flavocitocromo c) em *Brucella melitensis* que, aparentemente, não estão relacionadas função de metalo-beta-lactamases. Studholme e colaboradores (2005) sugerem que esta diferente combinação dos domínios DUF442 e GloB pode conferir a BLH uma nova atividade hidrolítica associada ao estilo de vida destas bactérias.

A sequência primária de BLH revela a presença de um motivo HxHxDH de ligação a zinco conservado em membros da super família das metalo-beta-lactamase, incluindo as beta-lactamases, glioxalases II e lactonases (Majiduddin *et al.*, 2002). As lactonases são necessárias para o mecanismo de *quorum-quenching* de bactéria, neste sistema elas hidrolisam AHL e derivados, os mais conhecidos auto-indutores de *quorum-sensing*, causando a inibição deste sistema (Wang *et al.*, 2004). Como a proteína BLH possui maior similaridade com glioxalases II e a beta-lactamases, substratos para estas enzimas foram testados quanto à ativação do gene repórter. SLG, tão pouco metilglioxal, o substrato inicial para glioxalase I, alteraram a expressão da GFP das células repórter. É pouco provável que BLH funcione como uma glioxalase II também pelo fato de melhores candidatos para esta função existirem em *X. fastidiosa* (XF2160) e *A. tumefaciens* (AAL44426). A utilização de vários antibióticos a base de beta-lactanos também não causou alterações na expressão do gene repórter nem no crescimento de células mutantes, indicando que BLH não deve funcionar como uma beta-lactamase típica.

Apesar de um melhor candidato para a enzima lactonase existir em *Xylella* (XF1361) e duas lactonases, attM e aiiA, terem sido caracterizadas em *A. tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2002; Carlier *et al.*, 2004), a possibilidade de BLH agir como uma lactonase foi avaliada pelo crescimento das células repórter e mutantes na presença de quantidades aumentadas de AHL e BL. Entretanto, nenhuma alteração foi observada.

Outras possibilidades para a função do operon não tão evidentes também foram avaliadas. Neste sentido, o operon poderia conferir resistência a exudato de plantas (van Overbeek *et al.*, 1995) ou a substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias endofíticas e microorganismos de solo. Recentemente, alguns estudos descrevem interações entre bactérias endofíticas de plantas de citros e *X. fastidiosa* (Lacava *et al.*,

2004). Uma associação de *Methylobacterium extorquens* com *X. fastidiosa* foi observada em plantas afetadas pela CVC, enquanto que em plantas assintomáticas a ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* com *X. fastidiosa* foi mais freqüente (Lacava *et al.*, 2004). Para testar se o crescimento destes dois endofíticos poderia influenciar na atividade do operon, células repórter de *Xylella* e *Agrobacterium* foram crescidas na presença de *M. extorquens* e *C. flaccumfaciens* em placas de sobreposição. Entretanto, nenhuma zona de inibição ou alteração significativa na expressão da GFP em reposta a esses endofíticos foi observada.

É conhecido que as plantas podem se beneficiar de antibióticos produzidos pela comunidade microbiana associada ao sistema de raiz (Strobel *et al.*, 2004). A incorporação destes componentes através do sistema vascular de plantas acentua os efeitos bactericidas de sua seiva possibilitando proteção contra patógenos e bactérias oportunistas. Neste sentido, extratos de folhas de *Citrus sinensis* e células repórter recuperadas de folhas infiltradas foram testadas para ativação do operon, mas sem resultado positivo. Apesar das dificuldades metodológicas na medida de expressão de GFP em *Xylella* crescida em planta, nós não podemos descartar a possibilidade do operon estar ativo durante a colonização do xilema, principalmente pelo fato do operon ser mais ativo durante a formação do biofilme (Figura 7- Artigo I).

Para tentar superar esta limitação, foi utilizada uma cepa patogênica de *Agrobacterium tumefaciens* causadora de galha como um repórter para ensaio de infecção, mas novamente não foi observada alteração de fluorescência durante a formação da galha em plantas de *kalanchoe*. Estes resultados são consistentes com a observação de que o operon correspondente em *S. meliloti* (lôcus Sma1057-1050) não foi ativado durante a formação do nódulo na planta hospedeira *Medicago truncatula* (Barnet *et al.*, 2004), e que em *S. meliloti* o operon encontra-se fortemente reprimido. Neste caso, foi observado que os genes Sma1056 (BigR) e Sma1050 (XF0764) foram expressos acima do limite de detecção, mas com sinal muito baixo, enquanto Sma1057 (BLH), Sma1053 (XF0766) e Sma1052 (XF0765) não foram detectados na maior parte do tempo e nenhum padrão de expressão em relação às condições testadas foi observado (Barnet *et al.*, 2004). Além disso, as proteínas codificadas pelo operon XF0768-0764 também não foram detectadas em análises proteômicas de extratos celulares de *X. fastidiosa*, cepa

9a5c, crescida em meio BCYE (Smolka *et al.*, 2003). Assim, estes resultados estão em concordância com nossos dados que mostram o operon XF0768-0764 estando fortemente reprimido na maioria das condições testadas.

Nossa observação de que o operon é ativado em biofilme bacteriano e em células aderidas em raiz indicam sua importância para a aderência celular e formação de biofilme. Apesar de não ter sido encontrado, até o momento, um fenótipo ligado à deficiência da BLH em *Agrobacterium*, o mutante BigR evidencia uma atividade ligada à formação de biofilme, uma vez que na sua ausência o operon é superexpresso.

É interessante notar que um mutante de *A. tumefaciens* que apresenta fenótipo alterado em interações de superfície, possui mutação no gene *sinR*, um regulador transcricional HTH da família FNR necessário para a maturação do biofilme em superfícies inertes e em planta (Ramey *et al.*, 2004). Similar a BigR, SinR controla sua própria expressão, mas seus genes alvos ainda não foram identificados (Ramey *et al.*, 2004). Curiosamente, SinR está localizado adjacente ao gene (NP_355347) que codifica para uma provável hidrolase dependente de metal, contendo inclusive o motivo HxHxDH relacionado com as proteínas da família metalo-beta-lactamase.

A atividade do operon XF0768-0764 em biofilmes de *Xylella* não foi tão pronunciada quanto em biofilmes de *Agrobacterium* (Figura 7- Artigo I). Além disso, em ensaio de micro arranjo de DNA com células de *X. fastidiosa* aderidas à superfície sólida, os genes do operon XF0768-0764 não foram detectados como super regulados (Souza *et al.*, 2004). Uma possibilidade para explicar estas discrepâncias é que a transcrição do operon pode ser finamente regulada por um sinal transiente relacionado ao estágio de desenvolvimento do biofilme. Assim, a transcrição do operon pode variar através das fases de maturação do biofilme. Alternativamente, os genes do operon podem ser expressos apenas durante a fase inicial de aderência.

4.2- Caracterização Estrutural

A especificidade de ligação de BigR com o DNA, a ausência de sítios óbvios de coordenação com metal e a existência de ortólogos distribuídos em várias espécies de bactérias, sugerem que BigR e as proteínas relacionadas com ela integram uma nova subfamília de domínio HTH, onde BigR pode ser a proteína fundadora, uma vez que é o primeiro membro a ser caracterizado. Consistente com a existência de uma nova subfamília é o fato de que Δ BigR predominantemente forma homotrímero em solução. A maioria dos fatores de transcrição procarióticos com domínio HTH descritos no *protein data bank* são homodímeros ou monômeros. A sobreposição com o sítio de ligação ao fator sigma 70 da RNA polimerase também é outro fator peculiar a esta subfamília (Figura 6- Artigo I), assim como a presença de uma região N-terminal rica em resíduos ácidos (Figura 1B- Artigo 1).

Foi observado que altas concentrações de sais de sulfato de amônio utilizados no protocolo de purificação da proteína diminuem a interação de BigR com seu DNA alvo. Assim, foram realizadas comparações entre as proteínas com e sem sulfato. Os espectros de CD mostraram alterações no conteúdo de estrutura secundária da proteína, sendo possível que estas alterações sejam responsáveis pela perda da interação DNA/proteína. O desenovelamento térmico mostra que BigR possui grande estabilidade térmica, sendo que esta estabilidade não é alterada pelo tratamento com sal.

Duas cisteínas conservadas nas seqüências de BigR e suas ortólogas foram também investigadas. Esses ensaios mostraram que essas cisteínas não devem estar envolvidas na ligação da proteína ao DNA, uma vez que sua oxidação e redução não interferiram na interação com o DNA. Observou-se ainda que uma das cisteínas não pode ser reduzida, indicando que ela estaria protegida no interior da estrutura quaternária do complexo. Entretanto, no modelo estrutural de BigR (Figura 23) nota-se que ambas cisteínas encontram-se na superfície do dímero e estariam expostas ao solvente. Embora BigR foi detectado na forma de dímero em gel de SDS-PAGE, os ensaios de gel filtração e DLS mostraram que a proteína é um trímero em solução, o que inviabiliza teorizações baseadas no modelo gerado.

Os resultados apresentados até o momento indicam de forma clara que a proteína BigR apresenta características distintas dos demais fatores de transcrição com domínio

HTH já caracterizados. Neste sentido, a determinação da estrutura tridimensional de BigR poderá ajudar nesta caracterização e classificação, além de prover um melhor entendimento da sua função biológica. Apesar de diferentes conjuntos de dados de difração de raios X terem sido coletados e analisados, não foi possível a determinação da estrutura desta proteína, uma vez que o grupo espacial do cristal não foi determinado. É possível que este cristal seja do tipo considerado *twining*, uma rede cristalina constituída de dois grupos espaciais diferentes, e por isso sua estrutura não pode ser resolvida.

5. CONCLUSÕES

- A proteína BigR é um fator de transcrição que regula negativamente o operon XF0768-0764 por se ligar à região -10 do gene BLH e assim bloquear o sítio de ligação da RNA polimerase.
- O operon XF0768-0764 é conservado em uma série de bactérias relacionadas com plantas, sendo que o sítio de ligação de BigR também se encontra conservado nestes promotores.
- A proteína BigR e o operon por ela regulado possuem características distintas dos operons regulados pelas proteínas da família SmtB e ArsR.
- BigR não age como um sensor de metal ou antibiótico, como inicialmente previsto, mas está associada à formação de biofilme.
- Mutantes de *Agrobacterium* deficientes em BigR possuem maior capacidade de formar biofilme e maior adesão em células de raiz.
- BigR oligomeriza-se na forma de trímero em solução.
- Sulfato de amônio causa uma diminuição na estrutura secundária de BigR porém não altera sua estabilidade térmica.
- BigR e seus ortólogos possuem duas cisteínas conservadas em sua sequência primária. Apenas uma destas cisteínas pôde ser reduzida, porém, a oxidação ou redução desta cisteína não altera a ligação da proteína ao DNA.

6. PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi realizada a caracterização de uma proteína inicialmente anotada como pertencente a família ArsR e SmtB de proteínas metaloregulatórias. Nossos estudos mostram que BigR regula a atividade de um operon envolvido com adesão ou desenvolvimento de biofilme. Entretanto, até o momento não foi possível a identificação de uma molécula ou um sinal efetor que se ligue a BigR para desreprimir a expressão do operon XF0768-0764. Existe muita dificuldade na obtenção de células mutantes de *Xylella fastidiosa*, entretanto, a conservação do operon em outros organismos fitopatogênicos permite este estudo em outras bactérias. Neste sentido, os mutantes obtidos para os genes *blh* e *bigR* em *Agrobacterium tumefaciens* podem ser ainda estudados com maior detalhe para a identificação do possível sinal que ativa o operon.

Uma outra abordagem deste projeto foi o estudo estrutural de BigR. Apesar dos protocolos iniciais de purificação da forma truncada da proteína apresentarem cristais com bons dados de difração, ainda não foi possível a resolução da estrutura tridimensional desta proteína. Desta forma, um novo *screening* de cristalização foi realizado utilizando a proteína Δ BigR obtida através de outro protocolo de purificação sem a etapa de interação hidrofóbica, que necessita da adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na amostra. Esta nova preparação de proteína apresentou resultados promissores, uma vez que, Δ BigR formou cristais em condições diferentes das anteriores (Figura 27A). Estes cristais iniciais foram submetidos à linha de raios X, mostrando bons padrões de difração. As análises preliminares destes dados mostram que o cristal difrata a até 2.4 Å e pertence ao grupo espacial P2. É provável que um problema na determinação do grupo espacial dos cristais anteriores tenha sido o motivo da dificuldade na resolução desta estrutura. Assim, como este cristal pertence a outro grupo espacial é possível que desta vez sua estrutura possa ser elucidada.

Outros dados promissores em relação à caracterização estrutural de BigR é que a sequência de DNA mínima de ligação a BigR foi sintetizada e utilizada para tentativas de cocristalização do complexo DNA/proteína. Os *screenings* iniciais deste complexo foram realizados e também apresentaram os primeiros cristais (Figura 27B). Estes dados foram submetidos ao feixe de raios X e apresentaram bom padrão de difração, porém com baixa

resolução (aproximadamente 3 Å). Como estes são ainda ensaios preliminares, a continuação deste trabalho com o refinamento das condições iniciais poderá gerar bons resultados futuros. Juntos, os dados funcionais e a determinação da estrutura de BigR isolada ou complexada ao DNA, poderão fornecer novas idéias quanto à função de BigR e seu operon ligada à formação de biofilme.

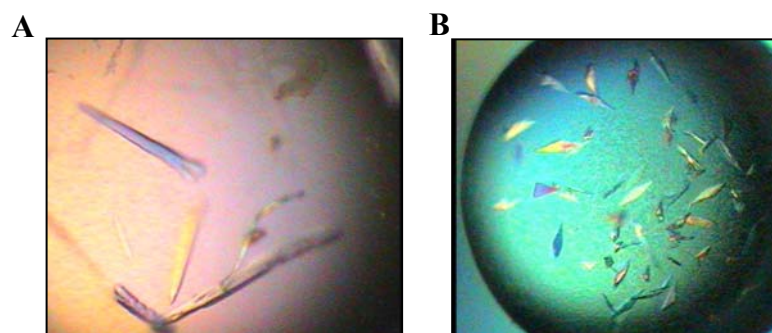


Figura 27: Cristais da proteína Δ BigR purificada em coluna de heparina sem sulfato de amônio. Fotos de cristais da proteína sozinha (A) e em associação com o DNA alvo (B).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alekshun, M. N. and Levy, S. B. (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2067-2075
- Alekshun, M. N., Levy, S. B., Mealy, R. M., Seaton, B. A. and Head, J. F. (2001). The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Structural Biology.* **8 (8)**: 710-714
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Mohan Babu, M. and Iyer, L. M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 231-262
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmen, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, N.Y.
- Barnett, M. J., Toman, C. J., Fisher, R. F. and Long, S. R. (2004) A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *PNAS.* **101**: 16636-16641
- Brlansky, R. H., Timmer, I. W., French, W. J. and McCoy, R. E. (1983) Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. *Phytopathology.* **73**: 530-535
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. and Giedroc, D. P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 131-143
- Carlier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y., and Faure, D. (2004) The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acetyl-homoserine lactone signal. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 951-957
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. and Bové, J. M. (1993) Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **27**: 137-142
- Cícero, M. P., Hubl, S. T., Harrison, C. J., Littlefield, O., Hardy, J. A. and Nelson, H. C. (2001) The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1715-1723
- Cook, W. J., Kar, S. R., Taylor, K. B. and Hall, L. M. (1998) Crystal Structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: A model for metalloregulatory proteins. *J. Mol. Biol.* **275**: 337-346

- Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y. and Toh, H. (2001) Expansion of zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEMS Letters*. **503**: 1-6
- Davis, M. J., Purcell, A. H. and Thomson, S. V. (1978) Pierce's disease of grapevines: isolation of the casual bacterium. *Science*. **199**: 75-77
- Davis, M. J., French, W. J. and Scaad, N. W. (1981) Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scalf. *Current Microbiology*. **6**:309-314
- Davis, M. J., Raju, B. C., Bransky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W., Norris, R. C. and McCoy, R. E. (1983) Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. *Phytopathol.* **73**: 1510-1515
- da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., *et al.* (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. **417**: 459-463
- de Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Bransky, R. H., Coutinho, A., Roberto, S. R. and Carlos, E. F. (1998) Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* **82**: 94-97
- Eiken, C., Pennella, M. A., Chen, X., Koshlap, K. M., VanZile, M. L., Sacchettini, J. C. and Giedroc, D. P. (2003) A Metal-Ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins. *J. Mol. Biol.* **333**: 683-695
- Ferguson, G. P. (1999) Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*. **7 (6)**: 242-247
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. and Ramos, J. L. (1997). AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 393-410
- Goldstein, D. A., Tinland, B., Gilbertson, L. A., Staub, J. M., Bannon, G. A., Goodman, R. E., McCoy, R. L. and Silvanovich, A. (2005) Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. *Journal of Applied Microbiology*. **99**: 7-23
- Hartung, J. S. Beretta, J., Bransky, R. H., Spisso, J. and Lee, R. F. (1994) Citrus Variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*. **84**: 1510-1515
- Huffman, J. L. and Brennan, R. G. (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 98-106

- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. and Bonas, U. (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* **29**: 1379-1390
- Kelly, S. M. and Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science.* 1(4): 349-384
- Lavaca, P. T., Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, Jr and Azevedo, J. L. (2004) Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology.* **39**: 55-59
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**: 283-291
- Machado, M.A. (2001) *Xylella fastidiosa* and the citrus variegated chlorosis (CVC), a new destructive citrus disease in Brazil. <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/home/mmachado.html>
- Maiti, M. K., Krishnasamy, S., Owen, H. A. and Makaroff, C. A. (1997) Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology.* **35**: 471-481
- Majiduddin, F. K., Mateeron, I. C. and Palzkill, T. G. (2002) Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int. J. Med. Microbiol.* **292** (2): 127-137
- Moreira, M. L., Souza, R. F., Almeida jr, N. F., Setúbal, J. C., Oliveira, J. C. F., Furlan, L. R., Feroo, J. A. and Silva A. C. R. (2004) Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **42**: 163-184
- Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. and Lindow, S. E. (2004) Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. USA.* **101**: 1737-1742
- Ni, J., Sakanyan, V., Charlier, D., Glansdorff, N. and Van Duyne, G. D. (1999) Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 427-432
- Oliveira, R. C., Yanai, G. M., Muto, N. H., Leite, D. B., Souza, A. A., Coletta Filho, H. D., Machado, M. A., Nunes, L. R. (2002) Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. *FEMS Microbiology letters.* **216**: 15-21

- Price, K. E., Pursiano, T. A., Defuria, M. D. and Wright, G. E. (1974) Activity of BB-K8 (Amikacin) Against Clinical Isolates Resistant to One or More Aminoglycoside Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **5**: 143-152
- Purcell, A. H., Finlay, A. H. and McLean, D. L. (1979) Pierce's disease bacterium: Mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science*. **206**: 839-841
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., von Bodman, S. B. and Fuqua, C. (2004) Biofilme formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*. **7**: 602-609
- Rhee, S., Martin, R. G., Rosner, J. L., Davies, D. R. (1998) A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 10413-10418
- Robinson, N. J., Bird, A. J. and Turner, J. S. (1998) in Metal ions in gene regulation (Silver, S. and Walden, W., Eds.) pp372-397, *Chapman and Hall*, New York.
- Rosen, B. P. (1996) Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *J. Biol. Inorg. Chem*. **1**: 273-277
- Rosen, B. P. (1999) Families of arsenic transporters. *Trend in Microbiology*, **7 (5)**: 207-210
- Rossetti, V., Garnier, M., Beretti, M. J. G., Teixeira, A. R. R., Quaggio, J. A., Battaglia, O. C., Gomes, M. P. and De Negri, J. D. (1990) Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Summa Phytopathol*. **16**:13
- Sali, A. and Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of special restraints. *Journal of Molecular Biology*, **234**: 779-815
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, Ed 3. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*
- Sauer, K. (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, **4**: 219-223
- Shi, W., Wong, M. D., Scott, R. A., Ksenzenko, M. Y. and Rosen B. P. (1996) The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the *ars* operon. *J. Biol. Chem*. **271**: 9291-9297
- Silver, S. (1992) Plamid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. *Plasmid*. **27**: 1-3
- Silver, S. and Phung, L. T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol*. **50**: 753-789

- Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. *et al.* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*. **406**, 151-157
- Singla-Pareek, S. L., Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2003) Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *PNAS*, **100** (25): 14672-14677
- Smolka, M. B., Martins, D., Winck, F. V., Santoro, C. E., Castellari, R. R., Ferrari, F., Brum, I. J., Galembeck, E., Della Coletta Filho, H., Machado, M. A., Marangoni, S., and Novello, J. C. (2003) Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* **3**: 224-237
- Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Caldana, C. Yanai, G. M. Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nines, L. R. and Machado, M. A. (2004) Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**: 341-353
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Haper, J. (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**: 257-268
- Studholme, D. J., Downie, J. A. and Preston G. M. (2005) Protein domains and architectural innovation in plant-associated proteobacteria. *BMC Genomics*. **6**: 17
- Sun, Y., Wong, M. D. and Rosen, B. P. (2001) Role of cysteinyl residues in sensing Pb(II), Cd(II) and Zn(II) by the plasmid pI258 CadC repressor. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(18): 14955-14960
- Thelwell, C., Robinson, N. J. and Turner-Cavet, J. S., 1998. An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a sinc exporter. *Genetics*. **95**:10728-10733
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L. *et al.* (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* **187**: 7254-7266
- Tubelis, A., Barros, J. C. and Leite, R. M. V. B. C. (1993) Difusão da clorose variegada dos citrus em pomares comerciais de laranja no Brasil. *Laranja*. **14**: 239-254
- van Overbeek, L. S., and van Elsas, J. D. (1995) Root exudates-induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 890-898

- Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P. and Simpson, A. J. (2002) Comparative Genomic Analysis of Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 169-189
- VanZile, M. L., Chen, X. and Giedroc, D. P. (2002) Structural Characterization of Distinct α 3N and α 5 Metal Sites in the Cyanobacterial Zinc Sensor SmtB. *Biochemistry*, **41**: 9765-9775
- Wang, L.H., Weng, L.X., Dong, Y.H., and Zhang, L. H. (2004) Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J. Biol. Chem.* **279**: 13645-13651
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelcopaul, L. and Brenner, D. J. (1987) *Xylella fastidiosa* gen.nov.,sp. Nov: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 136-143
- Xu, C., Shi, W. and Rosen, B. P. (1996) The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a *trans*-acting metalloregulatory protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 2427-2432
- Zhang, H.B., Wang, L.H., and Zhang, L.H. (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 4638-4643

DECLARAÇÃO

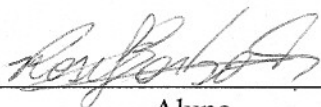
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada:
Análise Funcional e Estrutural da Proteína BigR de *Xylella fastidiosa* Envolvida na
Regulação do Operon XF0768-0764.

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a
bioética e biossegurança.

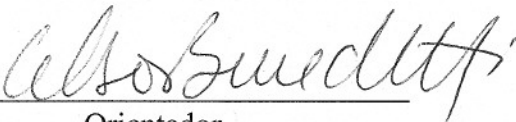
(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº CEB 2.01), intitulado Análise
funcional e estrutural da proteína BigR de *Xylella fastidiosa*.

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo
nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?)
(Protocolo nº _____).



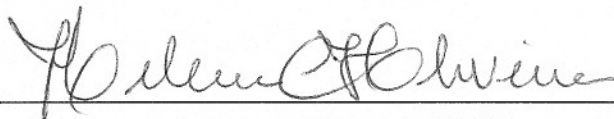
Aluno



Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido



Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA

Nome:

Presidente

Função:

Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP

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:

Análise funcional e estrutural da proteína BigR de *Xylella fastidiosa*

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

Experimentador: **Rosicler Lázaro Barbosa**

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 caracterização funcional e estrutural da proteína BigR de *Xylella fastidiosa*. A proteína BigR será produzida em células de *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade e troca iônica. Proteína purificada será usada em ensaios de ligação de DNA, usando-se seqüências de DNA alvo de *X. fastidiosa*. As propriedades de fator de transcrição de BigR também serão estudadas através de ensaios de dicroísmo circular e atividade de genes repórter, os quais serão usados para medir a transcrição do operon BigR na presença de metais ou antibióticos. Anticorpos contra a proteína BigR serão produzidos e usados para a detecção da proteína recombinante ou da proteína nativa em *X. fastidiosa*. A proteína BigR será produzida em larga escala para obtenção de cristais protéicos. Os cristais serão refinados e usados para a obtenção de padrões de difração de raios-X e resolução de sua estrutura tridimensional.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia 27-08-2007.

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