

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

BRUNA MEDÉIA DE CAMPOS RAMOS

“Análise estrutural e funcional das proteínas CsCyp (Ciclofilina) e CsTdx (Tioredoxina) e caracterização da interação entre a proteína PthA de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e uma Cisteína Protease de *Citrus sinensis*”

“Structural and functional analyzes of CsCyp (Cyclophilin) and CsTdx (Thioredoxin) from sweet orange and interaction studies between PthA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and a Cysteine Protease from *Citrus sinensis*”

CAMPINAS, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

BRUNA MEDÉIA DE CAMPOS RAMOS

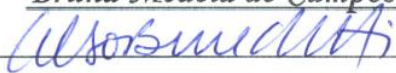


**“Análise estrutural e funcional das proteínas CsCyp (Ciclofilina) e CsTdx
(Tioredoxina) e caracterização da interação entre a proteína PthA de
Xanthomonas axonopodis pv. *citri* e uma Cisteína Protease de *Citrus sinensis*”**

**“Structural and functional analyzes of CsCyp (Cyclophilin) and CsTdx
(Thioredoxin) from sweet orange and interaction studies between PthA from
Xanthomonas axonopodis pv. *citri* and a Cysteine Protease from *Citrus
sinensis*”**

Este exemplar corresponde à redação final da TESE
defendida pela candidata

Bruna Medéia de Campos Ramos


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.

Doctorate thesis presented to the Genetics and
Molecular Biology Postgraduation Programme
of the Biology Institute of the University
of Campinas to obtain the Ph.D. grade in
Genetics of microorganisms.

Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

CAMPINAS, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C157a Campos, Bruna Medéia, 1986-
Análise estrutural e funcional das proteínas CsCyp (Ciclofilina) e CsTdx (Tioredoxina) e caracterização da interação entre a proteína PthA de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e uma cisteína protease de *Citrus sinensis* / Bruna Medéia de Campos Ramos. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti.

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

1. Ciclofilinas. 2. Proteína PthA. 3. Oxirredução. 4. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 5. *Citrus sinensis*. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Structural and functional analyzes od CsCyp (Cyclophilin) and CsTdx (Tioredoxin) from sweet orange and interaction studies between PthA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and a cysteine protease from *Citrus sinensis*

Palavras-chave em inglês:

Cyclophilins

PthA protein

Oxidation-reduction

Xanthomonas citri pv. *citri*

Citrus sinensis

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Celso Eduardo Benedetti [Orientador]

Shaker Chuck Farah

Márcio José da Silva

Márcio Vinicius Bertacini Dias

Júlio César Borges

Data de defesa: 23-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 23 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Celso Eduardo Benedetti (orientador)



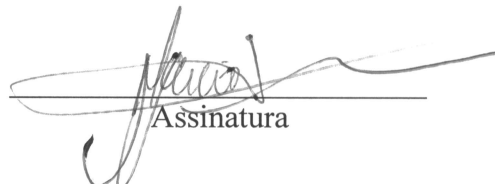
Assinatura

Dr. Shaker Chuck Farah



Assinatura

Dr. Márcio José Da Silva



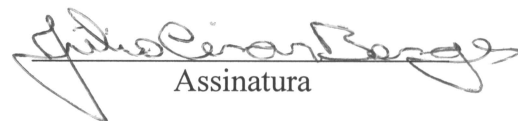
Assinatura

Dr. Marcio Vinicius Bertacini Dias



Assinatura

Dr. Júlio César Borges



Assinatura

Dr. Paulo Sérgio Lopes De Oliveira



Assinatura

Dr. Ivan De Godoy Maia



Assinatura

Dr. Jörg Kobarg



Assinatura

RESUMO

O cancro cítrico, causado pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), constitui uma doença que afeta todos os cultivares comerciais de citros e é uma ameaça para a citricultura brasileira. A doença é caracterizada pela formação de pústulas, devido à hiperplasia e hipertrofia induzidas pela bactéria. A patogenicidade de Xac é dependente do sistema secretório tipo III, que transloca proteínas efetoras pertencentes à família AvrBs3/PthA para dentro da célula hospedeira. Estudos recentes mostram que PthAs funcionam como fatores de transcrição no hospedeiro, transativando genes específicos da planta que irão beneficiar a bactéria ou desencadear uma resposta de defesa.

Com o objetivo de entender melhor o mecanismo de ação de PthAs como ativadores da transcrição, nosso laboratório identificou, através da técnica de duplo-híbrido, várias proteínas de laranja (*Citrus sinensis*) que interagiram com diferentes PthAs. Entre elas, destacamos uma ciclofilina (CsCyp), que realiza isomerização de resíduos de prolina, uma proteína com domínio tioredoxina (CsTdx), relacionada com interação proteína-proteína e redução de pontes dissulfeto e uma cisteína protease (CsCP), envolvida na resposta de defesa da planta.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização estrutural e funcional de CsCyp. A resolução da estrutura de CsCyp mostrou que CsCyp pertence ao grupo de ciclofilinas divergentes que possuem um loop adicional (KSGKPLH), duas cisteínas invariáveis (C40 e C168) e um glutamato (E83) conservado. Este último interage com resíduos do loop, estabilizando-o. A função destes elementos era desconhecida até o momento e o trabalho visou elucidar sua atuação na regulação da atividade PPIase da proteína.

Neste trabalho, verificamos que C40 e C168 formam uma ponte dissulfeto. Dados de modelagem e simulação suportaram a hipótese de que a formação da ponte dissulfeto induz mudanças conformacionais que quebram a interação do E83 com o loop divergente, levando ao fechamento do sítio ativo de CsCyp. O estudo descreveu portanto um mecanismo de regulação redox, que controla a atividade PPIase da proteína. Adicionalmente, mostrou-se que CsTdx interage com CsCyp através dos resíduos conservados C40 e C168, sendo críticos para tal interação. Foi mostrado também que CsCyp interage com o domínio C-terminal (CTD) da RNA Polimerase II (RNA Pol II), especificamente com a repetição YSPSAP.

Surpreendentemente, através da transformação de plantas com construções para silenciamento e superexpressão de CsCyp, verificamos que plantas de citros com níveis reduzidos de CsCyp apresentaram um aumento dos sintomas do cancro cítrico quando infiltradas com Xac, enquanto que plantas com níveis aumentados de CsCyp apresentaram sintomas reduzidos quando infiltradas com Xac, indicando que CsCyp tem papel importante no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico.

Este trabalho também mostra a expressão e purificação das proteínas CsTdx e CsCP e a comprovação de que CsCP interage com PthAs 2 e 3 através de ensaios de duplo-híbrido.

ABSTRACT

Citrus canker, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), is a disease that affects most species of the genus *Citrus* and represents a threat to the Brazilian citrus industry. The disease is characterized by the formation of pustules due to hyperplasia and hypertrophy induced by the bacteria. Xac pathogenicity is dependent on a type III secretory system that translocates effector proteins which belongs to AvrBs3/PthA family inside the host cell. Recent studies showed that these proteins work as transcriptional factors that transactivate specific plant genes which will either benefit the bacteria or trigger defense response.

To gain insights into PthA mechanism of action as transcription activators, our laboratory identified that PthA targeted the citrus protein complex comprising the thioredoxin CsTdx, ubiquitin-conjugating enzymes CsUev/Ubc13 and cyclophilin CsCyp. Also, we showed previously that the CsCyp binds the citrus thioredoxin CsTdx and the C-terminal domain of RNA Polymerase II (CTD), and that CsCyp complements the function of Cpr1 and Ess1, two yeast prolyl-isomerases that regulate transcription by the isomerization of proline residues of the regulatory C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II.

In this work we solved the 3D structure of CsCyp in complex with its inhibitor cyclosporine A (CsA), showing that CsCyp is a divergent cyclophilin that carries the additional loop KSGKPLH, invariable cysteines C40 and C168, and conserved glutamate E83. Despite the suggested roles in ATP and metal binding, the function of these unique structural elements remains unknown. Here we show that the conserved cysteines form a disulfide bond that inactivates the enzyme, whereas E83, which belongs to the catalytic loop and is also critical for enzyme activity, is anchored to the divergent loop to maintain the active site open. In addition, we demonstrate that C40 and C168 are required for the interaction with CsTdx and that CsCyp binds the citrus CTD YSPSAP repeat. Our data support the model where formation of the C40-C168 disulfide bond induces a conformational change that disrupts the interaction of the divergent and catalytic loops, via E83, causing the active site to close. This suggests a new type of allosteric regulation in divergent cyclophilins, involving disulfide bond formation and a loop displacement mechanism.

Moreover, we present evidence that PthA2 inhibits the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) activity of CsCyp in a similar fashion as CsA, and that silencing of CsCyp, as well as treatments with CsA, enhance canker lesions in Xac-infected leaves. Given that CsCyp appears to function as a negative regulator of cell growth and that Ess1 negatively regulates transcription elongation in yeast, we propose that PthAs activate host transcription by inhibiting the PPIase activity of CsCyp on the CTD.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
AGRADECIMENTOS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIACÕES	XIX
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	12
CAPÍTULO II – FUNÇÃO, ESTRUTURA E REGULAÇÃO DA CICLOFILINA DE <i>Citrus sinensis</i> ..	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	83
APÊNDICE I – ESTUDO DA PROTEÍNA Tdx DE <i>Citrus sinensis</i>	85
1. INTRODUÇÃO	85
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	88
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	92
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	98
APÊNDICE II – ESTUDO DA PROTEÍNA CISTEÍNA PROTEASE DE <i>Citrus sinensis</i>	99
1. INTRODUÇÃO.....	99
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	102
3. MATERIAIS E MÉTODOS	103
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	105
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
7. ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO EM JULHO DE 2012 NA REVISTA PLOS ONE, NO QUAL PARTICIPO COMO CO-PRIMEIRA AUTORA.	123

8. ANEXO II – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM MAIO DE 2013 NA REVISTA PLANT PHYSIOLOGY, NO QUAL PARTICIPO COMO PRIMEIRA AUTORA.	135
9. ANEXO III – ARTIGO PUBLICADO EM MARÇO DE 2011 NA REVISTA JBC (JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY), NO QUAL PARTICIPO COMO QUARTA AUTORA.	149

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, por me apoiar, pela paciência, pelo incentivo, compreensão, amor e carinho durante todo esse período.

Aos meus pais por todo apoio, incentivo e esforços para minha formação e educação, durante toda a minha vida.

Aos meus queridos irmãos por todo o amor e companhia.

A minha família, por toda a força e incentivo que me deram.

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti, meu orientador, primeiro pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo o apoio, confiança, incentivo e orientação durante os 4 anos e meio de trabalho. Pela ajuda nas dificuldades e reconhecimento nas conquistas.

Aos meus colegas de trabalho, Adriana, Mariane, Nayara, Valéria, Jaqueline Silva, Jackeline Zanella e Caio, pela amizade, conselhos, ajuda e pelos momentos descontraídos. Aos meus colegas que já deixaram o grupo, Júlio, Malu, Luãna e Uli. Aos outros amigos do laboratório, Priscila Papa, Marcos Alborghetti, Malu Nogueira e Patricia pelas idéias e conversas.

Aos colaboradores, Adriana Paes Leme e sua equipe, Ana Zeri, Maurício Sforça, Mario Murakami, André Ambrósio, Carlos Perez, Tatiana Brasil, João Alexandre Barbosa por toda a ajuda para conclusão do meu trabalho.

A Dr. Sara Whittaker por me receber no seu laboratório em Birmingham, Inglaterra, por todos os ensinamentos e auxílio com os experimentos realizados.

Aos pesquisadores Dr. Fábio Papes e Dr. Ricardo Aparício pelas valiosas sugestões e críticas oferecidas durante a apresentação na Pré-Banca.

Aos membros titulares da Banca de Defesa: Dr. Pelas valiosas sugestões e críticas, e aos demais membros, Dr. Júlio César Borges, Dr. Shaker Chuck Farah, Dr. Márcio Vinicius Bertacini Dias e Dr. Márcio José da Silva, pela disponibilidade e críticas durante o exame de defesa de tese.

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

A FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro (processo nº 08/09514-9), que permitiu o desenvolvimento deste trabalho e meu aprimoramento profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira (Dr. Marcos Machado) pelas sementes de citro cedidas para os experimentos de transformação genética e pelo EST do Domínio C-terminal da RNA Polimerase II.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: SINTOMAS DO CANCRO CÍTRICO E CICLO DA DOENÇA	3
FIGURA 2: MODELO DE EVOLUÇÃO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM PLANTAS.	5
FIGURA 3: MODELO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA EFETORA PTHA.....	6
FIGURA 4: MODELO DO MECANISMO DE AÇÃO DA PROTEÍNA EFETORA AVRBS3	8
FIGURA 5: ESTRUTURA PRIMÁRIA DE PTHA2	9
FIGURA 6: ESQUEMA REPRESENTANDO A ISOMERIZAÇÃO CIS-TRANS DE LIGAÇÕES PEPTÍDICAS.....	13
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DA CICLOSPORINA A	14
FIGURA 8: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE CSCYP E CYPS DE PLANTAS, LEVEDURAS E HUMANO.	16
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SUBUNIDADE MAIOR DA RNA POLIMERASE II.....	17
FIGURA 10: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE CsCTD COM O CTD HUMANO.....	18
FIGURA 11: VETOR DE CLONAGEM PHANNIBAL (CSIRO).	30
FIGURA 12: VETOR PHANNIBAL COM A CONSTRUÇÃO PARA O SILENCIAMENTO DE CSCYP.	31
FIGURA 13: VETOR DE CLONAGEM PCAMBIA 1303	31
FIGURA 14: VETOR PHANNIBAL COM A CONSTRUÇÃO PARA A SUPEREXPRESSÃO DE CSCYP.....	32
FIGURA 15: PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CSCYP.....	35
FIGURA 16: ESPECTRO DE CD DA PROTEÍNA CSCYP.....	36
FIGURA 17: ESPECTROS DE CD DA TITULAÇÃO DA PROTEÍNA CSCYP COM CSA.....	37
FIGURA 18: GRÁFICOS DO ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DO TRIPTOFANO DA TITULAÇÃO DA PROTEÍNA CSCYP COM CSA.	38
FIGURA 19: GRÁFICO DO DLS DA PROTEÍNA CSCYP	39
FIGURA 20: GRÁFICO DO ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PPIASE PARA CSCYP NA PRESENÇA DE CSA ...	40
FIGURA 21: GRÁFICO REPRESENTANDO O ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PPIASE DE CSCYP NA PRESENÇA DE PTHA2	41
FIGURA 22: WESTERN BLOT COM OS ANTICORPOS ANTI-PTHA E ANTI-GST REPRESENTANDO AS INTERAÇÕES DE CSCYP COM PTHA2	42
FIGURA 23: ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO DAS INTERAÇÕES DE CSCYP COM CsCTD.....	43
FIGURA 24: WESTERN BLOT COM OS ANTICORPOS ANTI-CYP E ANTI-GST DAS INTERAÇÕES DE CSCYP COM CsCDT	44
FIGURA 25: WESTERN BLOT DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CsCTD E CSCYP.	45
FIGURA 26: MODELO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA	45
FIGURA 27: ESPECTRO ¹ H- ¹⁵ N HSQC DA PROTEÍNA CSCYP PARA ATRIBUIÇÃO SEQUENCIAL	46
FIGURA 28: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS ¹ H- ¹⁵ N HSQC DE CSCYP E CSCYP + CSA	48
FIGURA 29: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS ¹ H- ¹⁵ N HSQC DE CSCYP E CSCYP + PEPTÍDEOS.....	50
FIGURA 30: DINÂMICA DE LIGAÇÃO DE CSCYP COM OS PEPTÍDEOS YSPSAP E FGPDLP.	52
FIGURA 31: GRÁFICO DO ITC DE CSCYP TITULADO COM CSA.....	52

FIGURA 32: ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR ENTRE O HEXAPEPTÍDEO YSPSSP E CsCYP.	53
FIGURA 33: CRISTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DE CsCYP E PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIO X.	54
FIGURA 34: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CYP DE <i>CITRUS SINENSIS</i>	56
FIGURA 35: RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS QUE COMPÕE O SÍTIO ATIVO DE CsCYP	56
FIGURA 36: INTERAÇÕES ENTRE CsCYP E CSA.	57
FIGURA 37: DETALHES DA ESTRUTURA DE CsCYP E CICLOFILINAS DIVERGENTES.....	58
FIGURA 38: ESQUEMA DAS HIPÓTESES PARA A FUNÇÃO DO LOOP DIVERGENTE E DAS CISTEÍNAS E GLUTAMATO CONSERVADOS.....	59
FIGURA 39: ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA ELUCIDAR SE P-LOOP TEÓRICO LIGA ATP.....	59
FIGURA 40: P-LOOP TEÓRICO NA ESTRUTURA DE CsCYP.....	60
FIGURA 41: ENSAIO COM GAMA-ATP	60
FIGURA 42: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS ^1H - ^{15}N HSQC DE CsCYP E CsCYP + ATP	62
FIGURA 43: ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA ELUCIDAR SE CsCYP POSSUÍ UM SÍTIO DE COORDENAÇÃO DE METAL	63
FIGURA 44: GRÁFICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PPIASE DE CsCYP NA PRESENÇA DE METAIS	64
FIGURA 45: FLUORESCÊNCIA DE RAIO X DE CsCYP E MUTANTES.....	65
FIGURA 46: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS $^2\text{J}_{\text{NH}}$ DE CsCYP E MUTANTE COM ADIÇÃO DE AGENTES QUELANTES E METAIS.	66
FIGURA 47: ILUSTRAÇÃO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA ELUCIDAR SE CsCYP SOFRE REGULAÇÃO REDOX.	67
FIGURA 48: ESPECTROS PROVENIENTES DA ESPECTROMETRIA DE MASSA	69
FIGURA 49: VALIDAÇÃO MANUAL DOS PEPTÍDEOS REDUZIDOS E DA PONTE DISSULFETO EM CsCYP.....	71
FIGURA 50: GRÁFICOS DO ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PPIASE DE CsCYP E MUTANTES CYS.....	72
FIGURA 51: WESTERN BLOT COM OS ANTICORPOS ANTI-CYP E ANTI-GST DAS INTERAÇÕES DE CsCYP E SEUS MUTANTES COM CSTDx	73
FIGURA 52: GRÁFICOS DO ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PPIASE DE CsCYP E MUTANTES E83.....	74
FIGURA 53: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS ^1H - ^{15}N HSQC DA CsCYP COM O MUTANTE CYP E83A E ^1H - ^{15}N HETERONUCLEAR NOE	76
FIGURA 54: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO 2-CYS ENVOLVIDO NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CICLOFILINAS DIVERGENTES.....	78
FIGURA 55: GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DE ^1H - ^{15}N HETERONUCLEAR NOE DE CsCYP NA PRESENÇA DE AUSÊNCIA DE DTT E GSSG E MUTANTES CYP C40S E CYP C40S/C168S.	79
FIGURA 56: EFEITO DE CSA NO DESENVOLVIMENTO DO CANCRO CÍTRICO.....	80
FIGURA 57: WESTERN BLOT COM ANTICORPO ANTI-CYP DO EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DAS PLANTAS TRANSFORMADAS COM A CONSTRUÇÃO RNAi E PLANTAS TRANSFORMADAS INFILTRADAS COM XAC	81

FIGURA 58: PLANTAS TRANSFORMADAS COM A CONSTRUÇÃO PARA SUPEREXPRESSÃO DE CYP, WESTERN BLOT COM ANTICORPO ANTI-CYP DO EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DAS PLANTAS TRANSFORMADAS COM A CONSTRUÇÃO DE SUPEREXPRESSÃO E PLANTAS TRANSFORMADAS INFILTRADAS XAC.....	82
FIGURA 59: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CsTDX COM TDX DE PLANTAS	85
FIGURA 60: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DO DOMÍNIO TRX DE <i>C. SINENSIS</i> COM TRX DE PLANTAS PROCIMAMENTE RELACIONADAS	86
FIGURA 61: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO TPR DE CsTDX COM O DOMÍNIO TPR DE TDX DE PLANTAS E PROTEÍNA TPR DE <i>HOMO SAPIENS</i> E <i>MUS MUSCULUS</i>	86
FIGURA 62: ENSAIOS DE DUPLO-HÍBRIDO DA INTERAÇÃO DE CsCYP COM CsTDX.....	87
FIGURA 63: TESTES DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CsTDX.....	92
FIGURA 64: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CsTDX NO VETOR PMT-BiP-V5-HIS EM CÉLULA DE INSETO S2	93
FIGURA 65: PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO TPR	94
FIGURA 66: PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO TRX	95
FIGURA 67: ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE CsTDX E DOMÍNIO TPR.....	96
FIGURA 68: GRÁFICO DO DLS DO DOMÍNIO TPR.....	97
FIGURA 69: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE CsCP COM CISTEÍNA PROTEASE DE PLANTAS E REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA MOSTRANDO OS DOMÍNIOS CsCP	100
FIGURA 70: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE CP EM PLANTAS DE LARANJA DOCE E LIMÃO GALEGO INFECTADAS COM XAC OU XAA.....	101
FIGURA 71: ESQUEMA DE AÇÃO DO KIT PROTEASE ASSAY UTILIZADO PARA O ENSAIO ENZIMÁTICO DA PROTEÍNA CsCP.....	104
FIGURA 72: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CsCP EM FUSÃO COM 6xHis.....	105
FIGURA 73: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CPPEP EM FUSÃO COM 6xHis	106
FIGURA 74: PURIFICAÇÃO DESNATURANTE DAS PROTEÍNAS CsCP E CPPEP.....	106
FIGURA 75: ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE CsCP E CPPEP.....	107
FIGURA 76: ENSAIO ENZIMÁTICO DAS PROTEÍNAS CsCP E CPPEP.	108
FIGURA 77: ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO DAS INTERAÇÕES DE CsCP E CPPEP COM PTHA1 A 4.....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ÓLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA EM CsCYP	22
TABELA 2: PRIMERS UTILIZADOS NAS CLONAGENS DE SILENCIAMENTO E SUPEREXPRESSÃO DE CsCYP.....	30
TABELA 3: TITULAÇÃO DA CsCYP COM CSA PARA ENSAIOS DE RMN	48
TABELA 4: TITULAÇÃO DA CsCYP COM OS PEPTÍDEOS PARA ENSAIOS DE RMN	49
TABELA 5: ESTATÍSTICAS DA COLETA DE DADOS E REFINAMENTO DA RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO COMPLEXO CsCYP : CSA	55
TABELA 6: TITULAÇÃO DA CsCYP COM ATP + Mg^{2+} PARA ENSAIOS DE RMN	61
TABELA 7: VALORES DE K_{CAT}/K_M CALCULADOS PARA O ENSAIO PPIASE NA PRESENÇA DE METAIS	64
TABELA 8: PREDIÇÃO DE FRAGMENTOS GERADOS DA DIGESTÃO DE CsCYP COM TRIPSINA	68
TABELA 9: VALORES DE K_{CAT}/K_M DO ENSAIO PPIASE DOS MUTANTES CYS	72
TABELA 10: VALORES DE K_{CAT}/K_M DO ENSAIO PPIASE DOS MUTANTES E83	74
TABELA 11: QUANTIDADE DE PROTEÍNA NAS AMOSTRAS DO ENSAIO ENZIMÁTICO DAS PROTEÍNAS CsCP E CPPEP.	108

LISTA DE ABREVIações

3-AT – 3-aminotriazole

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

ϵ – Coeficiente de absorvidade molar

ADD – *Acidic activation domain*

Ade – Adenina

AIB - Ácido indol-3-butírico

Amp – Ampicilina

ANA - Ácido naftaleno acético

avr – Genes de virulência do patógeno

BSA – Albumina do soro bovino

CD – Dicroísmo Circular

CLD – Domínio *Cyclophilin-like*

CsA – Ciclosporina A

CsCyp – Ciclofilina de *Citrus sinensis*

CsCP – Cisteína Protease de *Citrus sinensis*

CsTdx – Tiorredoxina de *Citrus sinensis*

CsUbc13 – Enzima de conjugação a ubiquitina de *Citrus sinensis*

CsUev – Enzima de conjugação a ubiquitina variante de *Citrus sinensis*

CTD – Domínio C-terminal da RNA Pol II

CsCTD - Domínio C-terminal da RNA Pol II de *Citrus sinensis*

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

DTT – Ditioneítrito

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EST – Expressed sequence Tags

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

gus – Gene da β -glucuronidase

GST – Glutathione-S-transferase

His – Histidina

HR – *Hypersensitive reaction*

hrp – *hypersensitive response and pathogenicity genes*

IPTG – Isopropyl β -D-1 thyogalactopiranoside

ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica

Kana – Canamicina

Kb – Kilobase

kDa – Kilo-Dalton

Leu – Leucina
 LRR – *Leucine Rich Repeat*
 NB – *nucleotide binding*
 NLS – *Nuclear localization signal*
 OD – Densidade óptica
 ORF – *Open Reading frame*
 PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
 pb – Par de base
 PBS – Tampão salino de fosfato
 PCR – *Polimerase Chain Reaction*
 P-loop – Sítio conservado de ligação ao ATP
 PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride*
 pOAD – vetor do duplo-híbrido que contém domínio de ativação de GAL4
 pOBD – vetor do duplo-híbrido que contém domínio de ativação de GAL4
 PPIase – Peptidil-prolil *cis-trans* isomerase
 PTI – *PAMPs-Triggered Immunity*
 PVDF – Difluoreto de polivinila
R – genes específicos de resistência da planta
 RD2 ou ID2 – Domínio Central de PthA2 com 15,5 repetições de 34 aminoácidos
 RMN – Ressonância Magnética Nuclear
 RNA Pol II ou Pol II – RNA Polimerase II
 RPM – Rotação por minuto
 SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
 Suc-AAPF-pNA – *N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide*
 TAL – *Transcription activator-like*
 TBT-T – Tampão salino Tris contendo Tween 20
 TCEP – *3,3',3''-Phosphanetriyltripropanoic acid*
 TPR – *Tetratricopeptide repeat*
 Trp – Triptofano
 TRX – Domínio tioredoxina
 TTSS – *Type III Secretion System*
 UPA-Box – *up-regulated by AvrBs3*
 Xaa – *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*
 Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
 X-Gal – *Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside*
 X-Gluc – *5-Bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl β -D-glucopyranosiduronic acid*

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Cancro cítrico

O Brasil é um dos maiores produtores mundial de frutas cítricas, sendo responsável por mais de 50% da produção mundial de suco de laranja, exportando 98% de sua produção, o que corresponde a uma participação de 85% no mercado mundial de exportação de suco concentrado (Rodrigues Neto & Baldini Ribeiro, 2002; Neves et al., 2010). A citricultura no país, em 2012, gerou divisas superiores a dois bilhões de dólares (CitrusBR – Associação Nacional dos Exportadores de Suco Cítrico) e estima-se que cerca de 14 bilhões de dólares sejam movimentados anualmente em toda a cadeia produtiva de suco cítrico, gerando cerca de 200 mil empregos no setor (Neves et al., 2010)

Apesar de ser o maior produtor e exportador de suco de laranja, o Brasil vem enfrentando dificuldades que comprometem a produção e exportação do suco de laranja, entre eles a queda do consumo do suco de laranja frente a outras bebidas – o suco de laranja perde 1,6% de participação no mercado de venda de bebidas para outros produtos, como néctares (Neves, 2010). Além da competição com outros produtos, a barreira tarifária, que leva a flutuação dos preços, alto custo de produção associado a fertilizantes, irrigação, mão de obra e pragas dos pomares afetam a produtividade brasileira, tornando o agronegócio uma atividade de alto risco no Brasil. As pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nos últimos 10 anos, sendo que a mortalidade aumentou de 4,5 para 7,3% neste período (Neves et al., 2010). Estes dados mostram a necessidade de medidas de controle de doenças como aquisição de mudas sadias, descontaminação dos materiais de colheita, pulverização com agro-químicos, entre outros métodos rápidos de erradicação. Concomitantemente, estudos que venham a contribuir para controle e eliminação de pragas são altamente relevantes.

Entre as doenças que afetam os citros, o cancro cítrico se destaca pela necessidade de manutenção de um controle rígido da doença, principalmente no estado de São Paulo que é responsável por 83% da produção brasileira de suco concentrado. A doença dissemina-se facilmente e pode atacar todas as variedades comerciais de citros, impondo fortes perdas aos citricultores. As árvores contaminadas devem ser erradicadas e queimadas, uma vez que não existe método curativo para a doença. As perdas econômicas para o cancro consistem também no fato de que as propriedades contaminadas ficam proibidas de comercializar sua produção até que o trabalho de erradicação esteja totalmente concluído devido à legislação internacional que regulamenta o comércio de frutas cítricas, sucos concentrados e seus derivados. Não adotar as medidas de erradicação impede o comércio dos produtos para países livres da doença (FUNDECITRUS).

Ainda que o comércio de frutas cítricas seja regulamentado por leis que exigem rigor no controle da doença, uma nova resolução Estadual levou a um afrouxamento na legislação, que isenta o citricultor da obrigação de erradicar o talhão caso a contaminação não ultrapasse o limiar de 0,5% de plantas infectadas.

Anteriormente, a lei exigia que se o índice de contaminação ultrapassasse 0,5%, todas as plantas de um talhão deveriam ser erradicadas. Atualmente, deve-se erradicar a planta doente e todas ao seu redor em um raio de 30 metros do foco de contaminação. Após a mudança da lei, a incidência do cancro cítrico aumentou, chegando, em 2012, a 1,39% dos talhões contaminados, contra 1% em 2011 e 0,14% em 2009, no estado de São Paulo, mostrando a necessidade de controle mais rígido na prevenção e inspeção dos pomares (fonte: FUNDECITRUS – www.fundecitrus.com.br). Esses dados mostram que o afrouxamento na legislação teve impacto negativo na produção de laranja e no controle da doença nos últimos 2 anos.

Existem tipos distintos de cancrose, causados pelas variantes da bactéria *X. axonopodis*. A separação dessas formas se dá no tipo de hospedeiro e características genéticas e fenotípicas das cepas, devido à similaridade dos sintomas (Graham et al., 2004). A cancrose A é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (grupo Asiático), renomeado recentemente para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (Schaad et al., 2006). É a forma mais severa da doença, com ampla ocorrência e que afeta praticamente todas as variedades de citros comerciais, sendo a mais relevante do ponto de vista sócio-econômico e chamada de cancro cítrico. As cancroses B e C são causadas pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa) (grupo da América do Sul). A cancrose B afeta principalmente o limão verdadeiro (*Citrus limon*), e a cancrose C, o limão Galego (*Citrus aurantifolia*) (Brunings & Gabriel, 2003; Graham et al., 2004). A cancrose E é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (*X. citrumelo*), descoberta na Flórida, nos Estados Unidos e afeta o citrumelo “Swingle” (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) (Graham & Gottwald, 1991). Foram também isoladas duas novas cepas da espécie *citri* – denominados de A* e A^W, que infectam apenas *Citrus aurantifolia*, estando limitados ao sudeste asiático e à Flórida, respectivamente (Vernière et al., 1998; Sun et al., 2004).

A bactéria é disseminada por chuvas fortes e penetra no hospedeiro através dos estômatos ou pequenos ferimentos na epiderme de folhas, frutos e ramos, sendo que a disseminação local também pode ocorrer através de podas com ferramentas contaminadas e pode ser facilitada por insetos herbívoros, como é o caso da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), que gera galerias nas folhas (Belasque Jr. et al., 2001). Dentro do hospedeiro, a bactéria cresce abundantemente no espaço intercelular. A doença é caracterizada pela formação de lesões circulares (*water soaked*) nas folhas, frutos e galhos da planta (Figura 1A e B). As lesões formadas são resultado da intensa divisão (hiperplasia) e crescimento (hipertrofia) celular induzidos pela bactéria. (Swarup et al., 1991; Duan et al., 1999; Brunings & Gabriel, 2003). Após a proliferação da bactéria, o patógeno é liberado na superfície da planta através do rompimento da epiderme ou através dos estômatos (Figura 1C), estando disponível para iniciar um novo ciclo de infecção (Figura 1D).

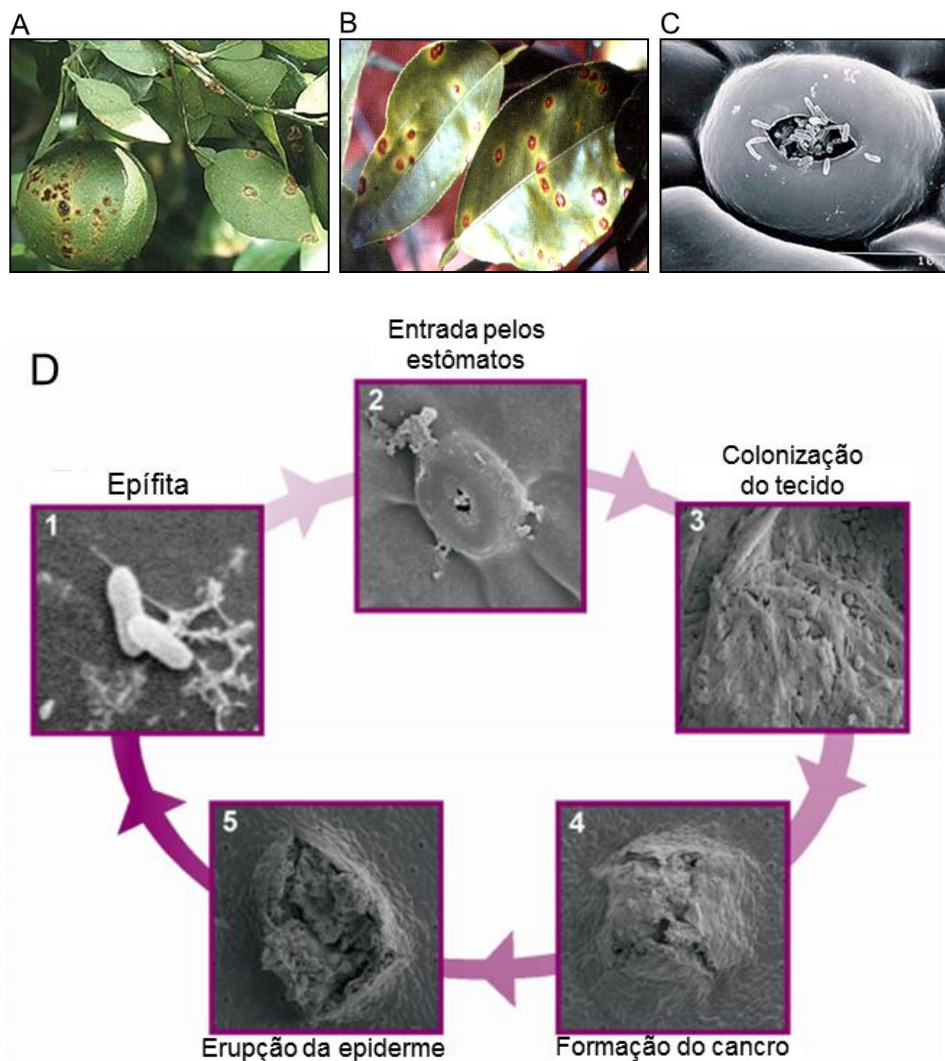


Figura 1: (A) Sintomas do cancro cítrico em frutos. Extraído de Gottwald et al., 2002. (B) Sintomas do cancro cítrico em folhas. Extraído de Rodrigues Neto & Baldini Ribeiro, 2002 (C) Microscopia eletrônica mostrando bactérias Xac sendo liberadas através de uma abertura estomatal na superfície da planta. Extraído de Graham et al., 2004. (D) Ciclo de infecção do cancro cítrico. (1) Bactéria persiste como epífita na superfície da planta. (2) Penetração se dá através dos estômatos e feridas. (3) A bactéria coloniza o apoplasto e a infecção é visualizada como pontos circulares na face abaxial das folhas. (4) Lesões começam a crescer, gerando os sintomas característicos do cancro. (5) O rompimento da epiderme é o resultado da hiperplasia induzida pelo patógeno, permitindo a liberação das bactérias para o meio externo, iniciando um novo ciclo de infecção. Extraído de Gottig et al., 2010.

Interação planta patógeno e mecanismos de defesa em plantas

Plantas são organismos constantemente expostos a micróbios e para que estes causem alguma doença, a maioria destes micróbios devem conseguir acessar o interior da planta. Após penetrar no interior da planta, os micróbios enfrentam outro obstáculo: a parede celular, que apresenta receptores

extracelulares localizados na superfície das células e que reconhecem padrões moleculares associados a microrganismos/patógenos (MAMPs/PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), que incluem flagelina e lipopolissacarídeos, presentes na membrana do patógeno. O reconhecimento dessas moléculas através destes receptores leva a uma resposta imune basal desencadeada por PAMPs (PTI – *PAMPs-Triggered Immunity*) e que geralmente para a infecção antes que o microrganismo invada a planta (Figura 2A), através da ativação de uma cascata de sinalização por MAP quinases, levando a transcrição de genes de defesa e produção de espécies reativas do oxigênio, além da deposição de calose para reforçar a parede celular, com a intenção de prevenir a infecção (Chisholm et al., 2006).

No entanto os patógenos desenvolveram a capacidade de suprimir a resposta PTI através da interferência no reconhecimento da membrana plasmática ou secretando proteínas efetoras no citosol da célula da planta para alterar a sinalização da resposta de defesa (Figura 2B). As bactérias Gram-negativas adquiriram um sistema de secreção tipo III (TTSS – *Type III Secretion System*) (Figura 2D), que consiste em aproximadamente 25 proteínas, que formam uma estrutura em formato de agulha e muitas sendo homólogas a componentes do sistema flagelar de bactérias (Blocker et al., 2003; Tampakaki et al., 2004). Este conjunto de proteínas secreta ou transloca proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira (Galán & Collmer, 1999; Brunings & Gabriel, 2003; Blocker et al., 2003; Chisholm et al., 2006).

Entretanto, a co-evolução planta-patógeno levou à expressão de genes de resistência (R) na planta hospedeira. Esses genes são responsáveis por codificar proteínas NB-LRR, que contêm domínios de ligação a nucleotídeos (NB – *nucleotide binding*) e domínios ricos em leucina (LRR – *leucine rich repeat*). O LRR está envolvido aparentemente na formação de interações proteína-proteína e no reconhecimento de proteínas efetoras (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Dangl & Jones, 2001; Chinchilla et al., 2006; Chisholm et al., 2006; Altenbach & Robatzek, 2007; Chinchilla et al., 2007). A resposta de defesa é então ativada quando da associação de um efector com proteína R correspondente (Figura 2C) e a resistência ao patógeno manifestada através da morte celular programada no local da infecção, inibindo o crescimento do patógeno. Na ausência da interação entre efector e seu cognato, o resultado é a proliferação do patógeno na planta hospedeira e desenvolvimento da doença. Curiosamente, ao invés de desenvolver novas formas de resistência, patógeno e planta estão presos a um conflito co-evolucionário envolvendo modificações nos efetores e proteínas R (Chisholm et al., 2006).

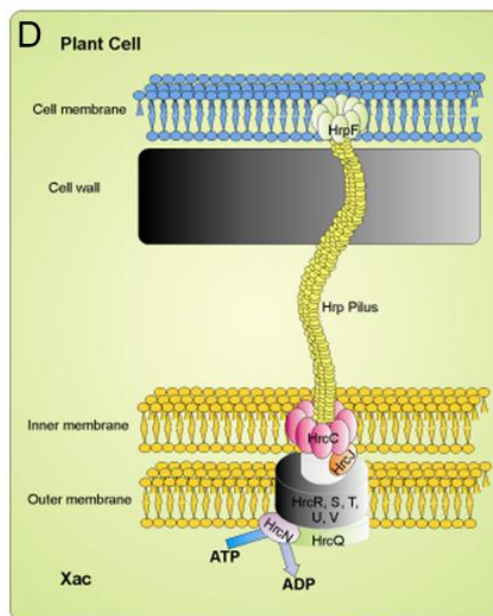
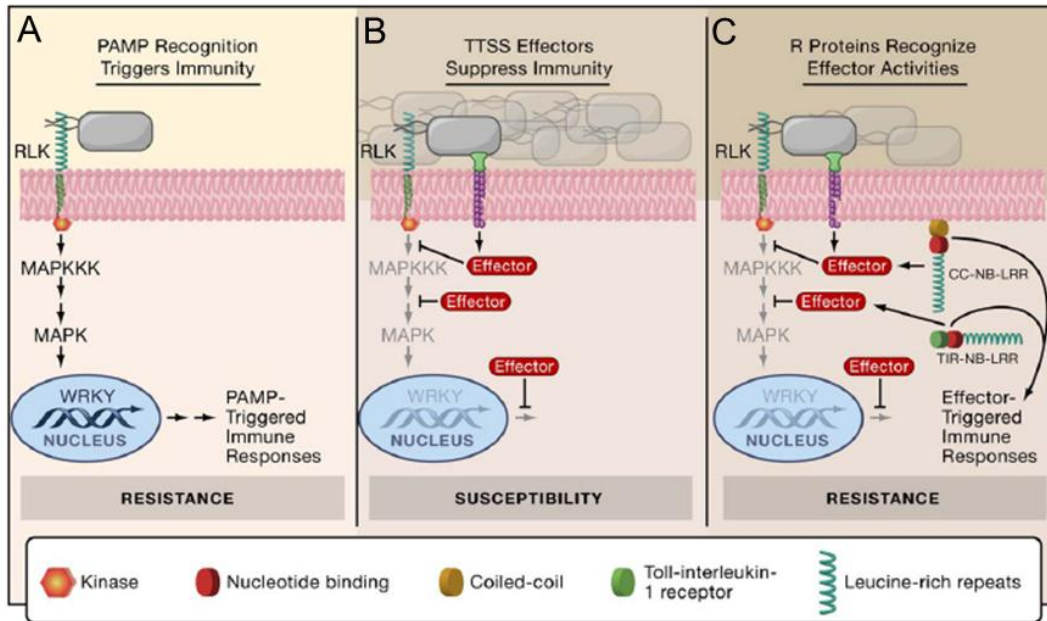


Figura 2: Modelo para a evolução da resistência bacteriana em plantas. (A) Reconhecimento de PAMPs, como flagelina por receptores extracelulares tipo quinase (RLKs), que desencadeiam a resposta imune basal, que requer a ativação da sinalização por MAP quinases e reprogramação da transcrição por fatores de transcrição WRKY. (B) Bactéria patogênica utiliza o sistema de secreção tipo III para transferir efetores para a célula hospedeira, com a finalidade de suprimir a resposta imune basal. (C) Plantas resistentes apresentam proteínas que reconhecem os efetores da bactéria e restauram a resistência através da resposta imune associada ao efector. Extraído de Chisholm et al., 2006. (D) Representação esquemática do sistema secretório tipo III de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e sua interação com a célula da planta. Extraído de Gottig et al., 2010.

Efetores tipo TAL

Existem diversos efetores translocados pelo TTSS, entre eles os efetores tipo TAL (*Transcription Activator-Like*) são altamente estudados por modularem diretamente a transcrição do hospedeiro através do reconhecimento e ativação de genes específicos da planta (Boch et al., 2009; Kay & Bonas, 2009; Boch & Bonas, 2010). Dentro desta classe de efetores tipo TAL, os membros da família AvrBs3/PthA são os mais estudados e largamente distribuídos no gênero *Xanthomonas* e compreendem um grande número de proteínas conservadas evolutivamente. A proteína PthA de Xac e AvrBs3 de *X. vesicatoria* (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) apresentam identidade superior a 95% (Bonas et al., 1989; Swarup et al., 1991; Schornack et al., 2006).

Os efetores tipo TAL são caracterizados por apresentarem um sinal de translocação via TTSS na região N-terminal, um sinal de localização nuclear (NLSs – *Nuclear Localization Signals*) e um domínio ácido de ativação transcricional (AAD – *Acidic Transcription Activation Domain*) na região C-terminal (Kay et al., 2007), típicos de fatores de transcrição. Possuem também um domínio central, que difere os membros da família AvrBs3/PthA e é composto por vários domínios de repetições (14-17) em tandem quase idênticos de 34/35 aminoácidos, ricos em leucina, que correspondem a ~15% do total de aminoácidos (Figura 3) (Yang & Gabriel, 1995; Szurek et al., 2001; Marois et al., 2002; Szurek et al., 2002; Kay & Bonas, 2009; Römer et al., 2009). Foi demonstrado que esta região é crítica na interação proteína-proteína e importante para a especificidade da patogenicidade/avirulência (Yang et al., 1994; Domingues et al., 2010), pois a dimerização da proteína, que ocorre no citoplasma, depende desse domínio central e é necessária para disparar a HR (*hypersensitive reaction*) na planta (Yang & Gabriel, 1995; Gürlebeck et al., 2005; Gürlebeck et al., 2006). A região N-terminal é necessária para o reconhecimento e transporte da proteína pelo sistema de secreção tipo III e a região C-terminal está ligada à ativação da expressão gênica na célula hospedeira e deve interagir com proteínas transativadoras (Swarup et al., 1992; Yang & Gabriel, 1995; Büttner & Bonas, 2002).



Figura 3: Modelo esquemático da proteína PthA, com 1086 aminoácidos. A região N-terminal tem 290 aa, enquanto a região central tem 520 aa e a região c-terminal 286 aa. O domínio rico em leucina (LRR), os sinais de localização nuclear (NLS) e domínio de ativação (AAD) estão indicados.

O modelo de interação *Xanthomonas* – Planta melhor caracterizado é aquele entre *X. vesicatoria* e seus hospedeiros, plantas de pimentão e tomate. Nesse modelo, a proteína efetora AvrBs3 é translocada para o interior da célula hospedeira (Figura 4), onde forma homodímeros através do domínio central, e interage com a proteína α -importina através do sinal de localização nuclear, sendo transportado para o

núcleo da célula, alterando o estado transcricional do tecido infectado (Marois et al., 2002). Após sua translocação, a proteína AvrBs3 se liga a sequência específica de DNA, UPA box (*up-regulated by AvrBs3*), através do seu domínio central induzindo a transcrição de vários genes, os quais codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento de hiperplasia e hipertrofia celular em plantas susceptíveis (Kay et al., 2007) ou genes de resistência em plantas resistentes (Römer et al., 2009). No caso de *X. vesicatoria*, em plantas resistentes a este patógeno, AvrBs3 transativa o gene *bs3* que codifica uma flavina monooxigenase que confere resistência à bactéria (Römer et al., 2007).

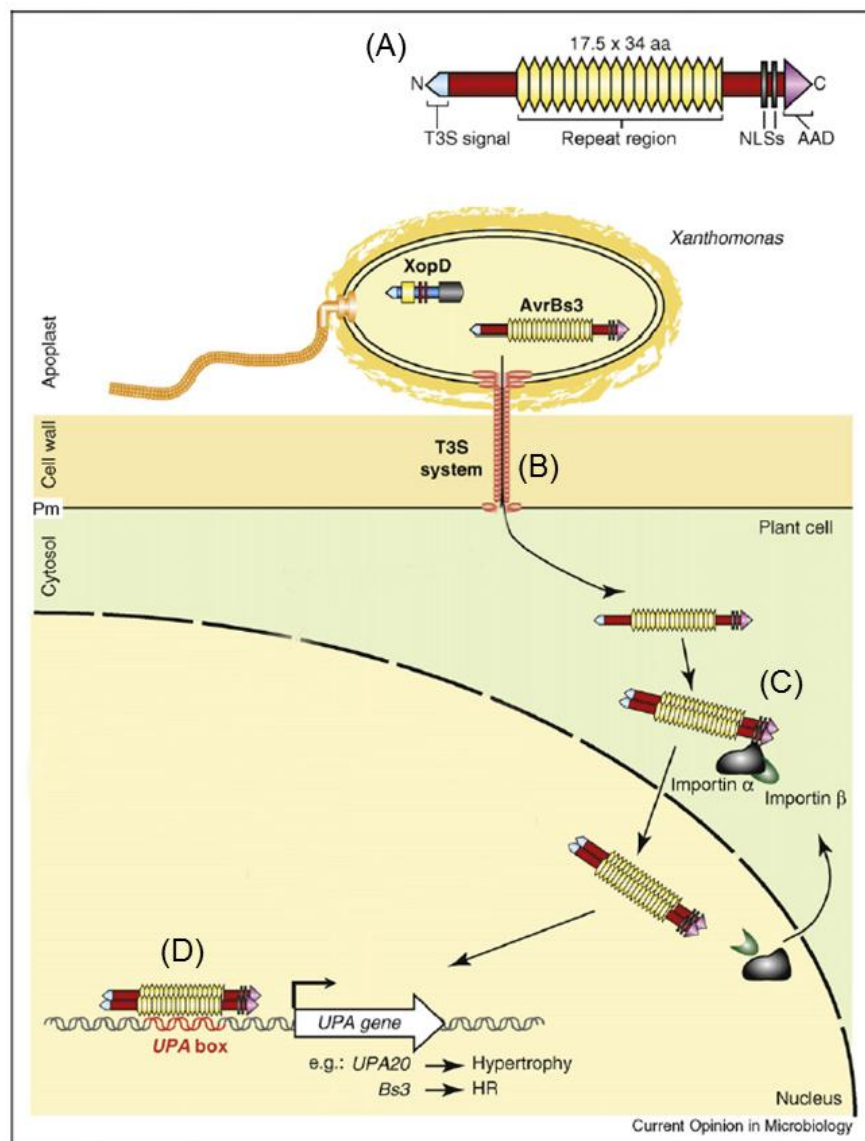


Figura 4: Modelo do mecanismo de ação da proteína efetora AvrBs3. (A) Estrutura do AvrBs3. (B) Translocação da proteína efetora para o citoplasma da célula hospedeira através do sistema de secreção tipo III. (C) Dimerização de AvrBs3 e interação com a α -importina através dos sinais de localização nuclear de AvrBs3. (D) AvrBs3 se liga diretamente a uma sequência específica do DNA, denominada UPA box, através de seu domínio de repetições, levando a ativação da transcrição de vários genes, entre eles o UPA 20. Extraído de Kay & Bonas (2009).

Recentemente, em estudos do mecanismo de ligação de AvrBs3 ao DNA, um código de reconhecimento específico foi encontrado e denominado código TAL (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Esse código mostrou que os efetores TAL possuem resíduos de aminoácidos variáveis nas posições 12 e 13 dentro de cada repetição do domínio central (Figura 5A). Cada resíduo de aminoácido variável se liga a um único nucleotídeo do DNA, conferindo especificidade de ligação para as sequências

de DNA dos promotores alvos (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009; Boch & Bonas, 2010) (Figura 5B)

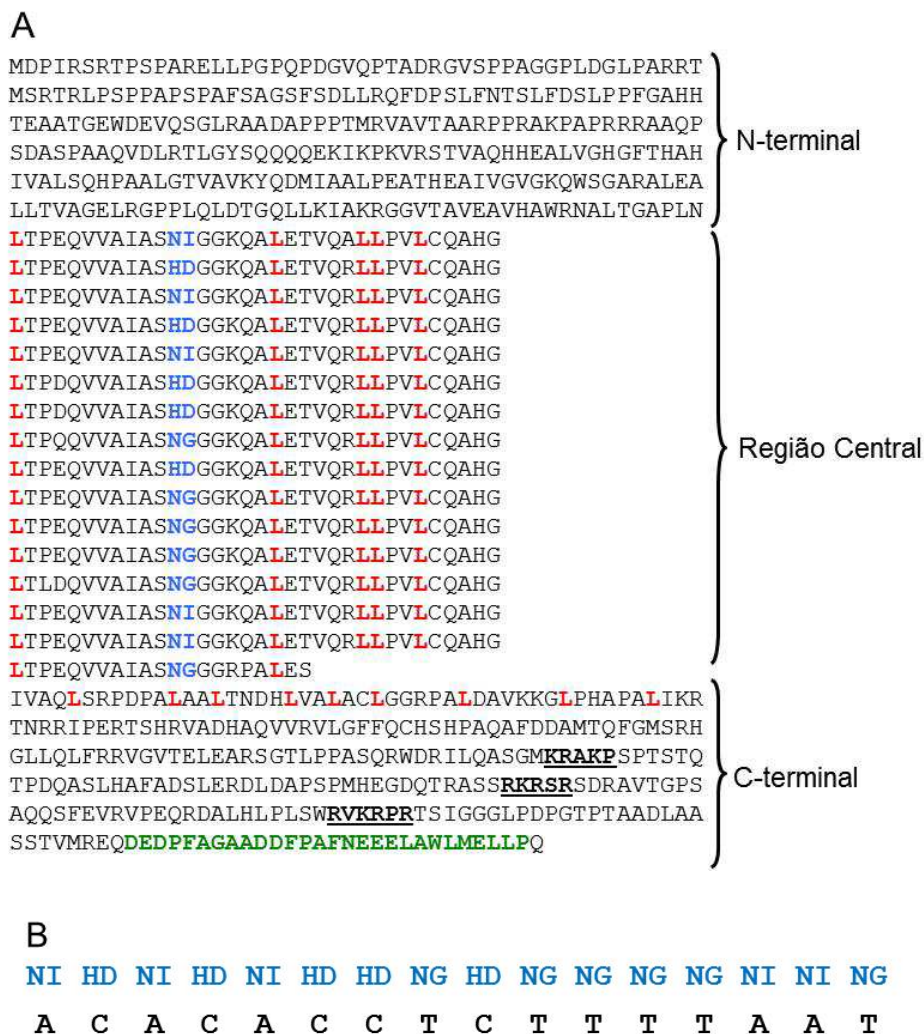


Figura 5: (A) Estrutura primária de PthA2, destacando as três porções principais da proteína. A porção N-terminal é essencial para a transfecção através do TTSS; Região central compreende 15,5 repetições de 34 resíduos, ricos em leucina (vermelho), responsáveis pela ligação ao DNA; Em azul, os resíduos variáveis (RVDs) que se ligam ao DNA; Região C-terminal, composta pelos sinais e localização nuclear (negrito e sublinhado) e pelo domínio ácido de ativação (verde). (B) Sequência de DNA predita como alvo de ligação de PthA2 de acordo com o código TAL (Boch et al., 2009; Moscou e Bogdanove, 2009).

Proteína Efetora PthA de *Xanthomonas citri*

A bactéria Xac infecta a laranja doce (*C. sinensis*) e utiliza o sistema de secreção tipo III para translocar proteínas efetoras TAL para dentro do hospedeiro. A proteína PthA (Figura 5A) é o efetor mais estudado. O gene *pthA* foi um dos primeiros genes de avirulência (*avr*) para o qual se demonstrou uma função no

desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro, sendo necessário à bactéria para causar os sintomas do cancro cítrico. Quando expresso transitoriamente em folhas de citros, por bombardeamento ou por agro-transfecção, é suficiente para causar lesões do tipo cancro, incluindo ruptura da epiderme, indicando que a proteína PthA é o fator principal de indução de hipertrofia celular e hiperplasia em citros (Duan et al., 1999; Swarup et al., 1991). Por outro lado, a expressão transitória de pthA em plantas não hospedeiras como tabaco, feijão e algodão levam à formação de uma reação tipo HR (Duan et al., 1999). Quando PthA foi inserido nas cepas *X. phaseoli* e *X. campestris* pv. *malvacearum*, os transformantes permaneceram não patogênicos ao citros, entretanto levaram a HR em plantas de feijão e algodão (Swarup et al., 1992). Evidências adicionais confirmam o papel de PthA na patogenicidade de Xac: mutações nos genes *hpr* (*hypersensitive response and pathogenicity*) (Yang & Gabriel, 1995) ou *pthA* levaram a perda da habilidade de induzir câncer hiperplásico, lesões circulares e habilidade do patógeno crescer *in planta* (Swarup et al., 1991). Portanto, até o momento, PthA é considerado o principal fator de patogenicidade de Xac.

A linhagem de Xac 306 (da Silva et al., 2002) apresenta 4 variantes de PthA, que diferem entre si pelo número de repetições do domínio central e pelos resíduos polimórficos encontrados dentro das unidades repetitivas: PthA1 possui 16,5 repetições de 34 aminoácidos, PthA2 e PthA3, 15,5 repetições e PthA4, 17,5 repetições e que é a forma correspondente à descrita por Brunings & Gabriel (2003) e considerada a variante essencial para indução de hiperplasia e hipertrofia (Al-Saadi et al., 2007; Domingues et al., 2010).

Como dito anteriormente, o domínio central parece ser essencial para interações proteína-proteína e proteína-DNA (Gürlebeck et al., 2005; Murakami et al., 2010). Em 2010, nosso grupo publicou o primeiro dado estrutural de um domínio repetitivo de PthA (Murakami et al., 2010). Através das técnicas de RMN e SAXS, a estrutura correspondente a 1,5 repetições do domínio central do PthA2 (RD2) foi determinada e corrobora o modelo teórico que prediz uma estrutura de superhélice TPR (*tetratricopeptide repeat*) para o domínio central e que RD2 passa por rearranjos conformacionais na presença de DNA (Murakami et al., 2010). Recentemente a estrutura do domínio central do efector TAL PthXo1 (de *Xanthomonas oryzae*), em complexo com DNA alvo foi determinada e confirma os dados publicados pelo nosso grupo de que as repetições de 34 aminoácidos se associam para formar uma superhélice em torno do sulco maior do DNA e que cada repetição forma uma estrutura tipo *helix-loop-helix* onde os resíduos variáveis 12 e 13 se encontram no *loop* ligados ao DNA (Mak et al., 2012; Deng et al., 2012).

Estudos tem mostrado que folhas de *C. sinensis* infiltradas com Xac apresentaram alteração na transcrição de diversos genes associados ao remodelamento e crescimento celular, incluindo genes envolvidos na biogênese de ribossomos, remodelamento de parede celular, tráfego de vesículas, síntese e mobilização de auxinas e giberelinas, além de uma cisteína protease (CsCP), que teria papel na resposta de defesa contra o patógeno (Cernadas et al., 2008; Cernadas & Benedetti, 2009). Esses dados são consistentes com o fato de que PthA2 expressos transientemente em epicótilos de *C. sinensis* provocou mudanças transcricionais idênticas às desencadeadas pela infecção com Xac e aumento da expressão de

genes envolvidos na sinalização de auxinas e giberelinas, dois hormônios necessários para o desenvolvimento do cancro cítrico (Cernadas & Benedetti, 2009).

Domingues et al (2010) mostrou que PthAs formam homo e heterodímeros entre si através das repetições e que também interagem com a proteína α -importina de citros. Além da interação com a α -importina, foram identificadas outras proteínas alvo do hospedeiro que interagem com PthA, entre elas CsCyp, uma ciclofilina, CsTdx, uma tioredoxina e o heterodímero CsUev/CsUbc13, envolvido na ubiquitinação dependente de K63 e reparo de DNA e que formam um complexo (Domingues et al, 2010; Domingues et al. 2012). O trabalho realizado nesta tese tem, portanto, como alvo as proteínas CsCyp, CsTdx e CsCP, todas identificadas em estudos realizados pelo nosso grupo.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A citricultura é de grande importância para a economia do Brasil e a grande vulnerabilidade a pragas e doenças, em especial o cancro cítrico tornam de grande importância estudos realizados com esta doença.

O objetivo principal deste trabalho foi contribuir no entendimento da doença através do estudo de proteínas do hospedeiro que foram identificadas como parceiras de interação de PthA, o principal fator de patogenicidade de Xac e que tem papel no crescimento celular e desenvolvimento da doença, além do entendimento da regulação da atividade destas proteínas.

CAPÍTULO II – FUNÇÃO, ESTRUTURA E REGULAÇÃO DA CICLOFILINA DE *Citrus sinensis*

1. INTRODUÇÃO

As ciclofilinas (Cyps) constituem uma família de proteínas ubíquas encontradas em todos os compartimentos subcelulares (Galat, 1999). Este grupo de proteínas contém em comum um domínio de 109 aminoácidos conhecido como CLD (*cyclophilin-like domain*) e apresentam atividade peptidil-prolil *cis-trans* isomerase (PPlase) *in vitro* (Figura 6), ou seja, catalisam, estabilizam e aceleram a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas que precedem resíduos de prolina durante o enovelamento de proteínas (Fisher et al., 1989; Ke & Huai, 2004; Wang & Heitman, 2005). Essas enzimas agem como chaperonas ou foldases e estão envolvidas em diversos processos biológicos como maturação de proteínas, divisão celular, apoptose, regulação da transcrição, processamento de RNA, tolerância a estresse, entre outros (Fisher and Schmid, 1990; Schimd et al., 1993; Rassow et al., 1995; Wang and Heitman, 2005; Gullerova et al., 2006; Gupta and Tuteja, 2011; Trivedi et al., 2012). As Cyps também tem papel importante na interação vírus:hospedeiro e no processo de maturação do vírus tanto em células animais como vegetais (Luban et al., 1993; Franke et al., 1994; Thali et al., 1994; Nagy et al., 2011).

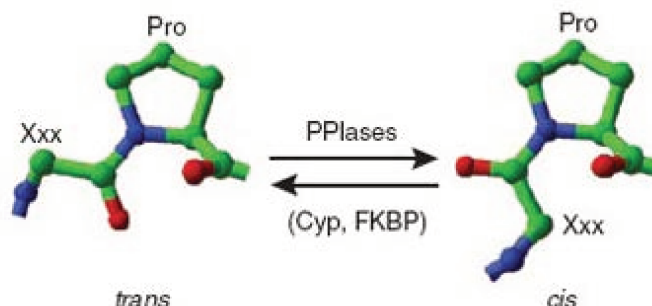


Figura 6: Esquema representando a isomerização cis-trans de ligações peptídicas precedentes de resíduos de prolina, catalisada por PPlases. Extraído de Lu et al., 2007.

As ciclofilinas pertencem ao grupo das imunofilinas, que inclui também as proteínas FK-506 e parvulinas. Essas proteínas foram encontradas em mamíferos, plantas, insetos, fungos e bactérias, possuem estrutura conservada evolutivamente e todas possuem atividade de PPlase. Humanos possuem um total de 16 ciclofilinas, *Drosophila*, pelo menos 9 ciclofilinas, *Arabidopsis*, 29 ciclofilinas, *Saccharomyces*, 8 ciclofilinas (Wang & Heitman, 1995; Kumari et al., 2013).

A primeira ciclofilina identificada foi a CypA, isolada de timócitos de bovino, como uma proteína com alta afinidade pela droga imunossupressora ciclosporina A (CsA) (Figura 7) (Handschumacher et al., 1984). Em mamíferos, o complexo Cyp-CsA se liga e inibe a calcineurina (fosfatase específica serina/treonina ativada por cálcio-calmodulina) levando a um bloqueio da translocação de fatores nucleares de células T do citosol para o núcleo e consequentemente, impedindo a transcrição de genes que codificam citocinas,

como a interleucina-2 (Wang & Heitman, 2005; Gullerova et al., 2006). No fungo *Cryptococcus neoformans*, a inibição da calcineurina impede o seu crescimento em altas temperaturas (Wang & Wheatman, 2005).

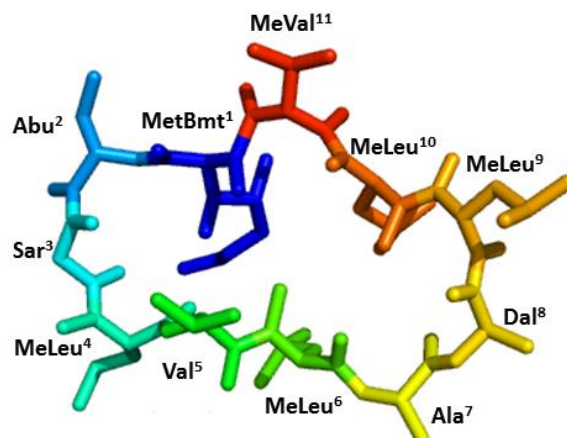


Figura 7: Representação da estrutura molecular da Ciclosporina A (CsA), um peptídeo cíclico, com peso molecular de 1202,6 Da e composta por 11 aminoácidos, sendo que cada aa é representado por uma cor diferente – MeBmt1 (N-metil-(4R)-4-[(E)-2-butenil]-4-metil-L-treonina), Abu2 (L-o-ácido-aminobutírico), Sar3 (sarcosina ou N-metil-glicina), MeLeu4 (N-metil-Leucina), Val5, MeLeu6, Ala7, D-Ala8, MeLeu9, MeLeu10 e MeVal11 (N-metil-valina). A Ciclosporina A (CsA) é uma droga imunossupressora isolada do fungo *Tolypocladium inflatum*, que habita o solo. Foi descoberta em 1972, nos laboratórios da Sandoz (hoje, Novartis), na Suíça. Os estudos iniciais mostraram que CsA era extremamente eficaz em prevenir rejeição de transplantes e poderia ter alguma importância no tratamento de doenças auto-imunes (Laupacis et al., 1982).

Em plantas, Cyps controlam transcrição, silenciamento gênico e sinalização por hormônios, e afetam diretamente o desenvolvimento da planta e sua interação com patógenos. (Li & Luan, 2001; Iki et al., 2012; Bannikova et al., 2013; Kang et al., 2013). ROC1, uma das ciclofilinas mais estudadas de *Arabidopsis thaliana*, foi descrita como um ativador eucariótico da proteína efetora AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae*, além de afetar a sinalização hormonal e de fitocromos (Coaker et al., 2005; Trupkin et al., 2012; Ma et al., 2013).

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

Algumas Cyps pertencem a uma subfamília denominada de ciclofilinas divergentes, por apresentarem um loop adicional, composto por 7 resíduos de aminoácidos, com a sequência consenso **GK*LH, sendo que o loop é mantido no local por uma rede específica de pontes de hidrogênio com a cadeia lateral de um resíduo de glutamato, que é altamente conservado em posição equivalente nestas ciclofilinas. Foi

observado também que a grande maioria das ciclofilinas divergentes apresenta duas cisteínas conservadas (Taylor et al., 1998; Dornan et al., 1999; Peterson et al., 2000; Ellis et al., 2000; Taylor et al., 2001; Sekhon et al., 2013). Ainda não se sabe exatamente a função desse loop divergente em ciclofilinas, mas foram postuladas três hipóteses diferentes: na primeira, o loop seria parte de sítio conservado de ligação ao ATP (P-loop) (Dornan et al., 1999). A segunda, supõe que a histidina do loop, juntamente com as cisteínas conservadas formaria um sítio de coordenação de metal; e a terceira opção seria que as cisteínas poderiam, através da formação de ponte dissulfeto, regular a atividade de PPlase por um mecanismo redox.

Os P-loops são compostos pelas sequências A e B de Walker, encontradas comumente em muitas proteínas que ligam nucleotídeos (Sato et al., 1996 e Deyrup et al., 1998). O Motivo A (também chamado de P-loop) consiste nas sequências consensos - (G/A)XXXXGK(T/S), GXXGXXK, GXXXXGKS ou GXXGXGKS (X podendo ser qualquer aminoácido) - sendo que os fosfatos β - e γ - do ATP se ligam aos resíduos de Lys e Thr e o motivo B consiste na sequência consenso ZZZZD (sendo Z um resíduo hidrofóbico), responsável por interagir com o íon Mg^{2+} (Sato et al., 1996 e Deyrup et al., 1998).

Além disso, Gullerova et al. (2006) descreveu que uma ciclofilina de *A. thaliana* tem importante papel na regulação da atividade da RNA Polimerase II (RNA Pol II) e no processamento de pré-mRNA através da modulação do estado de fosforilação do domínio C-terminal (CTD) da RNA Pol II. Coincidentemente, foi descrito também que Cpr1 e Ess1, duas prolil-isomerases de levedura afetam o remodelamento da cromatina, através da interação com dois complexos de histona-deacetilases, a transcrição basal através da isomerização de resíduos de prolina do domínio C-terminal (CTD) da RNA polimerase II, regulando a elongação e o término da transcrição em leveduras, além de regular silenciamento gênico e controlar a meiose (Hani et al., 1999; Morris et al., 1999; Wu et al., 2000; Wu et al., 2003; Arévalo-Rodríguez et al. 2000; Arévalo-Rodríguez & Heitman, 2005; Krishnamurthy et al., 2009; Singh et al., 2009).

A ciclofilina de citros (CsCyp) foi identificada como um parceiro de interação de PthA (Domingues et al., 2010). CsCyp é uma ciclofilina de 18 kDa, contendo um único CLD. CsCyp apresenta uma sequência de aminoácidos adicional compatível com o loop divergente e também os resíduos de glutamato e cisteínas conservados (Figura 8A), característicos de ciclofilinas divergentes, provavelmente pertencendo a este grupo. CsCyp é similar às ciclofilinas divergentes de *A. thaliana* ROC3, *Triticum aestivum* CypA-1 e *Caenorhabditis elegans* Cyp3, compartilhando 85, 83 e 76% de identidade, respectivamente. Ainda assim, compartilha ~70% de identidade com CypA de humanos e Cpr1 de levedura, que carecem do loop divergente, Glu conservado e uma das cisteínas também conservadas (Figura 8A). Uma análise filogenética mostrou que CsCyp forma um ramo com diversas Cyps de plantas (Figura 8B) ainda não caracterizadas e que pertencem ao grupo dicotiledôneas. É interessante ressaltar que CsCyp não é aparentada com a Cyp59 de *A. thaliana* (Figura 8), a única ciclofilina de planta a ser conhecida por interagir com o CTD da RNA Pol II (Gullerova et al., 2006).

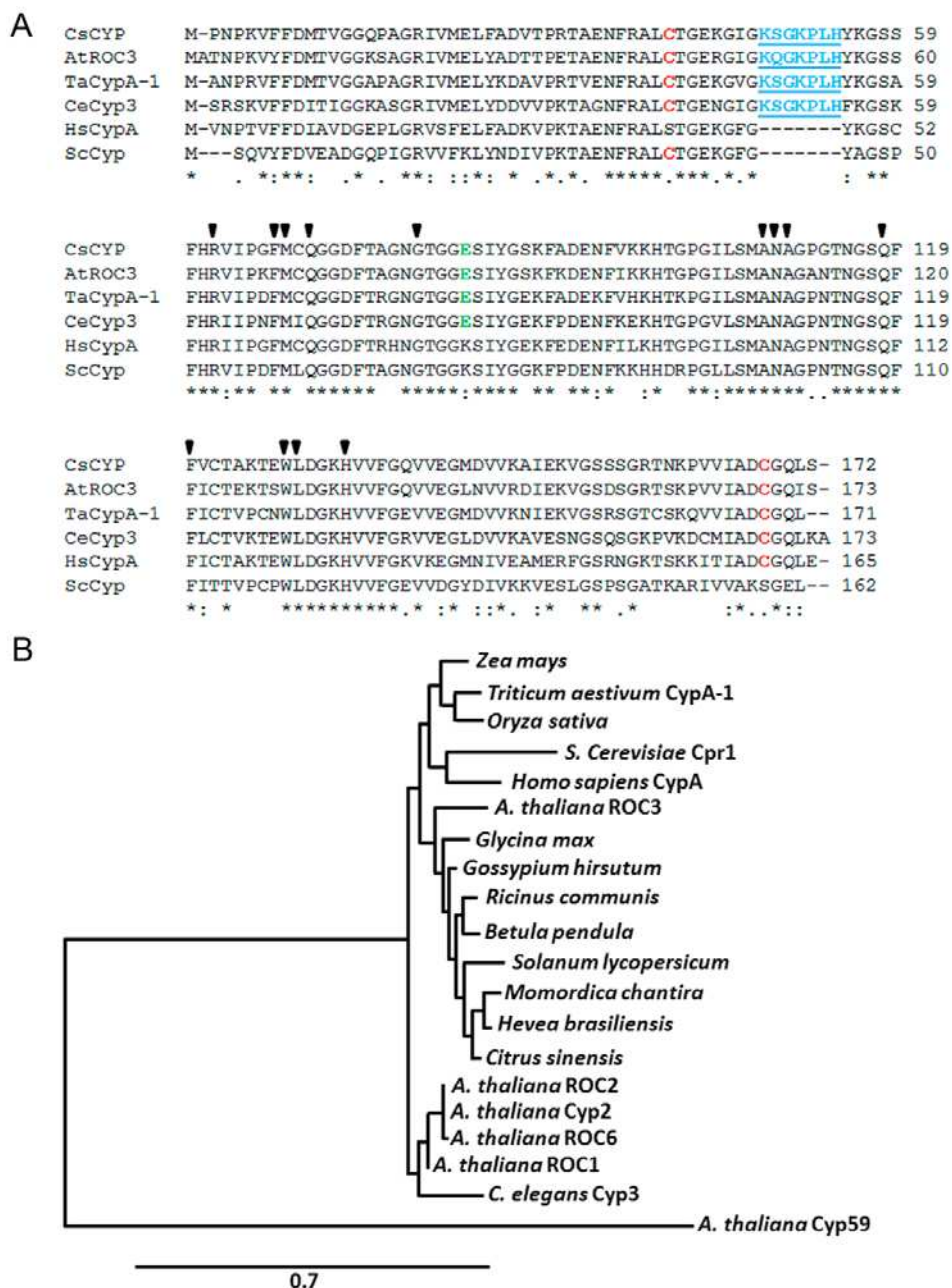


Figura 8: (A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de CsCyp com as proteínas AtROC3, TaCypA-1, CeCyp3, HsCypA e ScCpr1, realizado com o programa Clustal W. As setas indicas os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo e responsável por ligar CsA. Os resíduos que compreendem o loop divergente estão em azul e sublinhado, enquanto os resíduos de cisteínas em vermelho e glutamato conservado em verde. (B) Análise filogenética de ciclofilinas de plantas (mono e dicotiledôneas), humano, nematoides e leveduras, mostrando que CsCyp forma um ramo com Cyps de plantas dicotiledôneas ainda não caracterizadas. CsCyp não é aparentada a Cyp59 de *A. thaliana*. Apenas o domínio PPlase de AtCyp59 foi utilizado no alinhamento. O alinhamento foi realizado com o programa <http://www.phylogeny.fr/> (Edgar, 2004; Dereeper et al., 2008).

Dados recentes mostram que a CsCyp complementa os mutantes $\Delta ess1$ e $\Delta cypA$ de levedura (Domingues et al., 2012), sugerindo então que CsCyp poderia ter papel na regulação da transcrição, através da isomerização dos resíduos de prolina do domínio C-terminal da RNA polimerase II (Meinhart et al., 2005; Gullerova et al. 2006; Xu & Manley, 2007; Poschmann et al., 2011).

Domínio C-terminal da RNA Polimerase II

O CTD da RNA Pol II consiste em repetições em tandem da sequência consenso YSPTSPS (Figura 9), que tem importante papel na transcrição (Meinhart et al., 2005; Buratowsky, 2009; Jasnovidova & Stefl, 2013). O número de repetições do heptapeptídeo e sua conservação variam entre os diferentes organismos – leveduras, por exemplo, possuem 26 repetições e é um dos mais conservados, com apenas 6 das 26 repetições sendo diferentes da sequência consenso. Já em humanos, apenas 23 das 52 repetições encontradas são conservadas (Jasnovidova & Stefl, 2013).

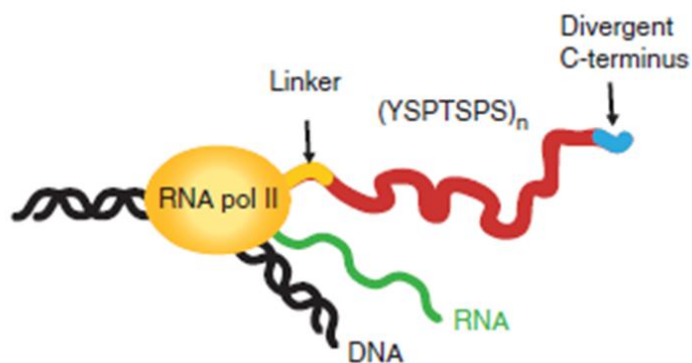


Figura 9: Representação esquemática da subunidade maior da RNA Polimerase II. Extraído de Jasnovidona & Stefl (2013).

O funcionamento do CTD é dependente de modificações pós-traducionais, sendo a fosforilação a mais frequente, realizada por quinases específicas. Entretanto, a isomerização dos resíduos de prolina também é importante, pois cria tipos de populações de peptídeos com conformação específica, estabelecendo diferentes interações proteína-proteína. As PPlases são importantes para controlar a interação proteína-proteína com isômeros específicos (Meinhart et al., 2005; Buratowsky, 2009; Krishnamurthy et al., 2009; Jasnovidova & Stefl, 2013).

Diferentes padrões de modificações em diferentes estágios do ciclo de transcrição altera a ligação de fatores de transcrição, regulando assim, o progresso da transcrição (Meinhart et al., 2005; Sobennikova et al., 2007; Buratowsky, 2009; Krishnamurthy et al., 2009).

O CTD da RNA Pol II de *Citrus sinensis* (CsCTD) apresenta 38 repetições em tandem, das quais 15 são conservadas (Figura 10) e possui 76% de identidade com CTD de humanos.

[illegible]

Com base no exposto acima, este trabalho teve, portanto, como objetivo principal testar qual das hipóteses de regulação sugeridas seria a responsável por controlar a atividade PPlase de CsCyp. Concomitantemente, elucidar o mecanismo de interação entre CsCyp e CsCTD.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Resolver a estrutura tridimensional da proteína CsCyp;
- Confirmar atividade PPlase de CsCyp;
- Realizar ensaios espectroscópicos com a proteína CsCyp: Dicroísmo Circular (CD), Dynamic Light Scattering (DLS) e Fluorescência Intrínseca do Triptofano;
- Estabelecer a função do loop divergente;
- Realizar mutagênese sítio dirigida nas cisteínas e glutamato conservados com a finalidade de descobrir sua importância na atividade PPlase de CsCyp;
- Elucidar o mecanismo de controle da atividade PPlase de CsCyp;
- Confirmar a interação de CsCyp com CsCTD através de ensaios de duplo-híbrido e GST-Pull Down;
- Realizar ensaios de RMN com peptídeos baseados nas repetições do CsCTD para confirmar interação;
- Realizar silenciamento e superexpressão do gene *cyp* em *Citrus*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Várias das construções que foram utilizadas nesse trabalho já estavam disponíveis em nosso laboratório, entre elas, pGEX4T-1-CsTdx, pOBD-CsCyp, pET28a-6xHis-PthAs (6xHis N-terminal), pET28a-6xHis-PthA-5.5rep+CT2 (uma forma truncada contendo parte do domínio central com 5.5 repetições de 34 aa, seguido da região C-terminal), pET28a-6xHis-RD2 (Domínio Interno do PthA2).

3.1. Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli*

3.1.1. CsCyp em pET28a

A ORF foi amplificada a partir da biblioteca de cDNA de *C. sinensis* (disponível em nosso laboratório), com os primers Cyp_F (*Nde*I: 5'-CATATGCCAAACCCCAAGTGTTC-3') e Cyp_R (*Not*I: 5'-GCGGCCGCTGATGATGGCGATC-3'), contendo sítios de restrição para facilitar a clonagem nos vetores de expressão. A amplificação da ORF foi realizada através de uma reação de PCR utilizando-se 200 ng de cDNA de *C. sinensis*, 20 pmoles de cada primer Cyp_F e Cyp_R; 0,25 mM de dNTPs; 1 mM de MgCl₂ e Taq Platinum (1 U/μL), para volume final de reação de 40 μL. Foram realizados 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto e 5 minutos a 72°C. Uma única banda foi amplificada com tamanho ao redor de 600 pb, correspondendo a CsCyp, que possui 519 pb. Esta banda foi extraída do gel de agarose (1%), purificada com o Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligada em vetor pGEM-T Easy (Promega) por 1 hora na temperatura ambiente. A ligação foi então transformada em células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico e plaqueada em meio LB seletivo com 100 μg/mL Amp (pGEM-T – resistência a ampicilina), 40 μg/mL X-Gal e 0,4 mM IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) e incubadas em estufa 37°C por 16 horas. Os clones transformantes foram selecionados realizando-se a digestão com *Nde*I/*Not*I. O inserto *Nde*I/*Not*I foi extraído do gel de agarose (1%) e purificados, como descrito acima. Foi realizada então a ligação do inserto em pET28a com T4 DNA Ligase (Fermentas) sob incubação no banho a 16°C por 16 horas. A ligação foi então transformada em células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico e plaqueada em meio LB seletivo com 50 μg/mL Kana (pET28a – resistência a canamicina). Com a finalidade de selecionar os clones transformantes, foi realizado um PCR de colônia com 5 clones isolados com os primers T7 e pET-Rev. Os clones positivos foram confirmados posteriormente por sequenciamento de DNA. Em seguida, cresceu-se cultura em meio líquido LB Kana e os plasmídeos foram purificados por *miniprep* (Qiagen). Estes plasmídeos foram então transformados em células competentes de *E. coli* para expressão, BL21(DE3), por choque térmico.

A construção foi expressa em meio LB Kana na temperatura de 30°C sob agitação constante de 200 rpm. A cultura foi crescida até atingir a fase logarítmica – OD (optical density) a 600 nm entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância e a síntese de proteína recombinante foi induzida por 3 horas com a adição de 0,4 mM de IPTG.

A proteína recombinante foi então purificada por cromatografia de afinidade em resina TALON (Clontech). Os tampões utilizados foram: A (lise) - 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol,

20% Glicerol; B (lavagem) – tampão A com 15 mM Imidazol; C (eluição) – tampão A com 200 mM Imidazol. A lise das células foi realizada com 20 mL de tampão A + lisozima (1 mg/mL) e sonicação (20 pulsos de 20s), a fim de aumentar a eficiência da lise. A suspensão foi centrifugada, após sonicação, a 4°C, 17.000 rpm por 50 minutos. A fração solúvel foi filtrada (0,45 µm) e incubada com a resina TALON. Após eluição, a cauda 6xHis foi clivada com trombina (1u trombina por 1 mg proteína), por 12 a 16 horas a 25°C. A proteína clivada foi então concentrada em Centricon a 1500 g, 10°C até volume final de 1,5 mL. A proteína concentrada foi submetida a uma cromatografia por exclusão de peso molecular, em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) e novamente concentrada para volume final de 1 mL. A concentração final da proteína foi determinada pela absorbância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar obtido na ferramenta ProtParm, no site ExPASy (<http://us.expasy.org/>). A indução, solubilidade e todos os passos de purificação foram avaliados por gel de poliacrilamida (13%) SDS-PAGE e coloração com o corante Coomassie Blue.

3.1.2. CsCTD

O fragmento de DNA correspondente ao domínio C-terminal da RNA Pol II de citros foi amplificado a partir do EST de laranja doce, cedido pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira, utilizando os primers CTD_F (*Nde*I: 5'-CATATGCCTTATGTTGGTGGGAATGGCCTTC-3') e CTD_R (*Not*I: 5'-GCGGCCGCTTAACGTGAGCTCTTGTCACC-3') e clonado em vetor pGEM-T. Após confirmação por sequenciamento, foi realizada a subclonagem em vetor pGEX-4T-1 (proteína em fusão com GST) ou vetor pOAD, seguindo os mesmos protocolos descritos no item 3.1.1. Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo foi transformado em duas cepas de células competentes de *E.coli* para expressão: BL21 (DE3) e BL21 ΔSlyD pRARE, por choque térmico.

3.1.3. PthAs em pET28a e Formas Truncadas de PthA de Xac

PthAs de Xac e suas formas truncadas pET28a-PthA-RD2 e pET28a-PthA-5.5rep+CT2 foram expressas a 25°C, 200 rpm, por 3 horas com adição de 0,4 mM IPTG. As purificações por afinidade foram realizadas em resina de níquel (Ni-NTA Agarose – Qiagen) ou TALON (Clontech). Os seguintes tampões foram utilizados: A (de lise) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT; B (de lavagem) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 15 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT e C (de eluição) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT. A lise das células foi feita com 15 mL de tampão A e 1 mg/mL de lisozima e sonicação (20 pulsos de 10 segundos). As suspensões foram centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 1 hora. O extrato solúvel lisado e filtrado (0.45 µm) foi aplicado em coluna de gravidade contendo 600 µL de resina pré-equilibrada com tampão A e fluxo de 0,3 mL/min. Foram feitas 3 lavagens com 2 volumes de coluna cada (tampão B) e 6 eluições com 1 volume de coluna cada (tampão C). A indução, solubilidade e todos os passos de purificação foram avaliadas por gel de poliacrilamida (13%) SDS-PAGE e coloração com o corante Coomassie Blue.

3.2. Mutagênese Sítio Dirigida

Foram desenhados óligos específicos para a mutação dos resíduos Cys 40, Cys168 e Glu83 de CsCyp de acordo com as instruções do manual QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit da Stratagene (Tabela 1).

Tabela 1: Óligonucleotídeos utilizados para a mutagênese sítio dirigida em CsCyp

Mutação	Óligo
Cys40 → Ser (C40S)	F – GAGAACTTCCGCGCCCTCTCCACCGGCGAGAAAGGCATC R – GATGCCTTTCTCGCCGGTGGAGAGGGCGCGGAAGTTCTC
Cys168 → Ser (C168S)	F – CCCGTCGTGATCGCTGATTCCGGTCAATTGTCTTAGATT R – AATCTAAGACAATTGACCGGAATCAGCGATCACGACGGG
Glu83 → Ala (E83A)	F – GGAAACGGAACCGGAGGCGCATCAATCTACGGCTCAAAA R – TTTTGAGCCGTAGATTGATGCGCCTCCGGTTCCGTTTCC
Glu83 → Ser (E83S)	F – GGAAACGGAACCGGAGGCTCATCAATCTACGGCTCAAAA R – TTTTGAGCCGTAGATTGATGAGCCTCCGGTTCCGTTTCC
Glu83 → Gln (E83Q)	F – GGAAACGGAACCGGAGGCCAATCAATCTACGGCTCAAAA R – TTTTGAGCCGTAGATTGATTGGCCTCCGGTTCCGTTTCC

A PCR foi realizado de acordo com instruções do kit do fabricante (Stratagene). Após a PCR, as amostras foram resfriadas até 37°C e incubadas com 1 µL da enzima *DpnI* (10 U/µL) por 1 hora a 37°C. A seguir, 10 µL de cada amostra foram transformados em células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico. Os clones positivos foram confirmados por sequenciamento e transformados em células competentes para expressão *E. coli* BL21 (DE3).

3.3. Ensaios de GST Pull-Down

As proteínas recombinantes (CsCyp, CsTdx e CsCTD) expressas em fusão com GST foram ressuspendidas em 1 mL de tampão de lise (PBS 1X pH 7,4; 1 mM de DTT), lisadas e as frações solúveis obtidas foram incubadas separadamente com 50 µL de resina “*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*” (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com tampão de ligação (igual ao de lise), por 1 hora e 30 minutos sob leve agitação a 4°C. Após o período de incubação, a resina foi lavada com tampão de ligação (30 volumes de coluna), para remoção de amostra não ligada. Em seguida, esta resina foi incubada com 1 mL CsCyp-6xHis, Cyp C40S-6xHis, Cyp C168S-6xHis, Cyp C40S/C168S-6xHis, ou PthA2-6xHis previamente expressas e purificadas por afinidade em resina Ni-NTA ou TALON (como descrito no item 3.1.1 e 3.1.3). A incubação foi realizada por 2 horas sob leve agitação a 4°C. As amostras foram centrifugadas e a resina lavada com tampão de ligação (40 volumes de coluna). As proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de amostra SDS sendo fervidas por 15 minutos a 95°C e fracionadas em gel SDS-PAGE 10 ou 13% para coloração com corante *Coomassie blue* e visualização por *Western blot* com os anticorpos Anti-GST, Anti-PthA e Anti-Cyp, como será descrito no item 3.4. Como controle negativo foi realizado o mesmo procedimento para a proteína GST sozinha presa à resina e incubada separadamente com as mesmas proteínas purificadas mencionadas acima.

O ensaio de interação entre GST-Cyp e 6xHis-PthA2 foi realizado também na presença do seu inibidor, CsA (SANDIMMUN® - NOVARTIS), na proporção 1 proteína: 2 CsA. GST imobilizada na resina foi utilizada como controle.

3.4. Western Blot

As análises de Western blot foram realizadas a partir de géis de acrilamida 10 e 13%. As proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinila) em tampão de transferência (48 mM de Tris-base; 39 mM de glicina; 0,037% de SDS e 20% de metanol). A transferência foi realizada a 350 mA por 1 hora. Após a transferência a membrana foi incubada em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado em 1X TBS-T - 20 mM de Tris-base; 150 mM de NaCl, pH 7,5; 0,05% de Tween 20) por 1 hora. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo primário em solução bloqueadora. Depois da incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes de 10 minutos cada, sob leve agitação em solução TBS-T, e incubada com o anticorpo secundário (ECL Kit – Amersham Biosciences) por 1 hora. A membrana foi novamente lavada três vezes de 10 minutos em solução TBS-T. A detecção foi feita utilizando-se o método de quimioluminescência do Kit ECL (Amersham Biosciences).

Foi utilizado o anticorpo primário Anti-GST (Sigma), na diluição de 1:5000, os anticorpos policlonais Anti-PthA (1:5000) e Anti-Cyp (1:3000) produzidos pela empresa Célula B – Serviço de Produção de Anticorpos Mono e Policlonais - e anticorpos secundários correspondentes Anti-mouse ou Anti-rabbit (ambos 1:3000).

3.5. Ensaio de Atividade PPlase de Ciclofilina

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

Para este experimento foi utilizada a proteína recombinante CsCyp e os 6 mutantes purificados como descrito no item 3.1.1. Foram realizados ensaios na presença de ligantes, inibidores e possíveis proteínas com as quais CsCyp poderia interagir, a fim de verificar qual a alteração na atividade da proteína. A proteína PthA foi purificada de acordo com o item 3.1.3. A proteína BSA (*Bovine Serum Albumine*) foi utilizada como controle negativo, para mostrar que não é qualquer proteína com resíduos de prolina que interage com CsCyp. Todas as proteínas usadas foram dialisadas em tampão 50 mM HEPES pH 8,0, 100

mM NaCl, utilizando membrana de 6-8.000 Da. As amostras foram mantidas sob leve agitação a 4°C por 16 a 18 horas.

As reações foram feitas em triplicata utilizando 15 nM de proteína, sendo o volume final da reação de 1 mL. A proteína juntamente com o tampão da reação foi colocada em cubeta de quartzo, com comprimento óptico de 1 cm, dentro do espectro e a temperatura, estabilizada em 10°C durante 5 minutos. Em seguida, proteína e tampão foram incubados com 1 mg da protease α -quimiotripsina e imediatamente após, com 100 μ M do substrato Suc-AAPF- ρ NA. A catálise então se inicia logo após adição do substrato e a absorbância a 390 nm foi monitorada, em espectrofotômetro UV/visível, de 5 em 5 segundos durante 5 minutos. Foi então feita uma média entre as triplicatas e os valores, plotados em gráficos da absorbância no 390 nm em função do tempo em segundos.

Os dados foram processados usando a equação de primeira ordem ($A_{390} = A_1 + A_0 e^{-kt}$, com k como constante) e a constante (k_{obs}) derivada como descrito por Motohashi et al. (2003). Os valores k_{cat}/K_m foram calculados de acordo com a equação $k_{cat}/K_m = (k_{obs} - k_0)/[PPI]$, na qual k_0 é a constante de primeira ordem para a isomerização *cis-trans* espontânea (Motohashi et al., 2003).

3.6. Ensaio de Cristalização e Resolução da Estrutura Tridimensional de CsCyp

A proteína CsCyp purificada foi incubada com seu inibidor CsA na proporção de 1CsCyp:2CsA. Os ensaios de cristalização foram realizados com aproximadamente 11 mg/mL de proteína, utilizando-se a técnica de sitting drop com difusão de vapor. As gotas foram feitas pelo robô Honeybee Pipettor e os screenings iniciais foram realizados com 6 kits, totalizando 544 condições. As placas de cristalização foram mantidas em um laboratório de cristalografia à 18°C e visualizadas manualmente em microscópios.

3.6.1. Coleta e Processamento dos Dados

Os dados de difração foram coletados na linha de difração de raios X (D03B-MX2) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As coletas foram realizadas em temperatura criogênica (100 K) a fim de evitar danos no cristal causado pela radiação. As imagens foram coletadas num detector *MAR CCD* com distância de 110 mm entre o cristal e o detector, com intervalos de rotação de 1 grau. Quando a resolução do padrão de difração obtida não foi ideal para a resolução da estrutura da proteína, foi realizado um refinamento a partir das condições iniciais, para melhora da qualidade do cristal.

Os dados foram processados com o MOSFILM (Leslie, 1992) e SCALA (Evans, 2005). A estrutura do complexo CsCyp:CsA foi determinada através de substituição molecular, com o programa Phaser, utilizando a estrutura da Cyp3 de *C. elegans* como modelo (PDB 1DYW). A estrutura foi refinada através do programa Phenix e a geração do mapa de densidade eletrônica usando o Coot. Todos os dados foram refinados para gerar R_{free} e $R_{factors}$ finais e parâmetros geométricos satisfatórios. A estrutura de CsCyp em complexo com CsA foi depositada no PDB (código de acesso 4JJM).

3.7. Co-Imunoprecipitação

Folhas de laranja doce foram maceradas em tampão de lise – PBS pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 10 mM EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), contendo inibidores de proteases (0,1 mM PMSF, 1 mg/mL aprotinina, 1 mg/mL pepstatina e 1 mg/mL leupeptina). O lisado de células foi imunoprecipitado com anticorpo policlonal Anti-Cyp (1:50), anticorpo monoclonal Anti-RNA Pol II de humano, clone 8WG16 (1:40, Santa Cruz Biotecnologia) ou com sêrum pré-imune como controle. Proteínas imobilizadas em beads de Proteína A Sepharose (PIERCE) foram separadas por gel de poliacrilamida de SDS-PAGE e imunodetectadas com Anti-Cyp (1:3000) ou Anti-RNA Pol II (1:200).

3.8. Ensaio com γ -ATP

Para testar se a proteína CsCyp ligaria ATP, foi realizado um ensaio com γ -ATP, marcado com ³²P, no qual 10 μ M CsCyp foi incubada com tampão (20 mM Tris HCl pH8.0, 30 mM NaCl, 0,4% Glicerol) na presença ou ausência de 20x ATP radioativo e MgCl₂. Para controle, foi utilizado BSA, na presença ou ausência de γ -ATP e também γ -ATP sozinho. Após incubar a temperatura ambiente, as reações foram aplicadas em membrana de PVDF, que foi lavada 3x com tampão e posteriormente foi realizada a autoradiografia.

3.9. Ressonância Magnética Nuclear

3.9.1. Expressão Proteína Marcada

A proteína CsCyp e seus mutantes foram produzidos com marcação isotópica, ou seja, enriquecidos em isótopos estáveis (não radiativos) de carbono (¹³C) e nitrogênio (¹⁵N). Para marcação isotópica, a proteína foi expressa em meio mínimo M9 modificado contendo ¹⁵N-sulfato de amônia e ¹³C-glicose, conforme descrito por Li et al. (2002). A indução foi realizada com 0,4 mM IPTG por 4 horas a 37°C. A proteína contendo marcação isotópica foi purificada como descrito no item 3.1.1.

3.9.2. Coleta de Dados RMN

Os espectros de RMN foram adquiridos a 25°C, em dois espectrômetros diferentes: parte dos experimentos foram adquiridos em espectrômetro Agilent/Varian Inova operando na frequência de 599,887 MHz para o próton (campo magnético de 14,1 T), equipado com sonda criogênica de ressonância tripla (HCN), do grupo de RMN do LNBio (Laboratório Nacional de Biociências). Outra parte dos experimentos, em espectrômetro Varian Unity Inova 900 MHz, com sonda criogênica de ressonância tripla, do grupo de HWB-NMR da Universidade de Birmingham, Inglaterra, em parceria com a Dra. Sara Whittaker. Os espectros de RMN foram analisados com um conjunto de programas de acesso aberto disponíveis no LNBio [NMRPipe (Delaglio et al., 1995), NMRView (Johnson & Blevins, 1994), SmartNotebook (Slupsky et al., 2003)]. A atribuição sequencial foi feita utilizando a amostra duplamente marcada e utilizando experimentos padrões de HNCACB; CBCA(CO)NH; HNCO e HN(CA)CO (Sattler et al., 1999). Como a

estrutura tridimensional foi resolvida através de difração de raios X, com os cristais obtidos, a utilização da técnica de RMN para essa finalidade não foi necessária.

No LNBio os experimentos de RMN tiveram a finalidade fazer a atribuição sequencial da proteína e identificar, através de experimentos de ^1H - ^{15}N -HSQC, se CsCyp interage com ATP e com os hexapeptídeos desenhados com base nas repetições do CTD da RNA Polimerase II de citros, visando elucidar de forma mais detalhada o mecanismo de interação entre CsCyp e CsCTD e se há preferência por alguma dessas repetições pela CsCyp. Em Birmingham, devido a maior sensibilidade do equipamento, foram realizados experimentos de relaxação ^1H - ^{15}N -NOE heteronuclear com a proteína selvagem (CsCyp), na presença ou ausência de agentes redutores (DTT) ou oxidantes (GSSG), e com seus mutantes (Cyp C40S, Cyp C40S/C168S e Cyp E83A).

Para investigar a possibilidade de CsCyp ligar Zn^{2+} , espectros ^1H - ^{15}N -SOFAS-HMQC foram adquiridos no espectrômetro 900 MHz com as amostras CsCyp, CsCyp + DTT e EDTA, CsCyp + ZnCl_2 , CsCyp + ZnCl_2 + EDTA e Cyp C40S/C168S. A sequência de pulsos padrão, sofastNhmqc.c, da biblioteca de pulsos Biopack foi utilizada. Um espectro mais amplo na dimensão ^{15}N (16400 Hz) com um deslocamento de 192 ppm, uma constante de acoplamento J_{NH} de 22.7 Hz e um ângulo de excitação Ernst de 120° foram utilizados para uma ótima detecção do acoplamento da dupla ligação J_{NH} da região do imidazol das histidinas no espectro (~ 160 ppm, ~ 260 ppm).

Os espectros foram processados usando o programa NMRPipe e analisados usando o CcpNmr análise (Vranken et al., 2005). Precedendo a transformada de Fourier, uma função co-seno foi aplicada em ambas as dimensões, assim como na predição linear na dimensão indireta.

3.10. Análise de Espectrometria de massa

CsCyp purificada foi separada em gel SDS-PAGE 13% sob condição não desnaturante e foi digerido com tripsina, conforme descrito por Aragão et al. (2012). A mistura de peptídeos resultante foi reconstituída em 0,1% de ácido fórmico e analisada em um Espectrômetro de Massas ETD enabled LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) acoplado à cromatografia líquida (LC-MS/MS) por um sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem) através de uma fonte de ionização nanoeletrospray Proxeon.

Os peptídeos foram separados em um gradiente de acetonitrila (2-90%) em 0,1% de ácido fórmico usando uma coluna analítica PicoFrit (20 cm X id 75 μm , 5 μm particle size) a um fluxo de volume de 300 nL/min por 65 min. A voltagem do nanoelectrospray foi ajustada para 2.2 kV e a temperatura da fonte para 275°C . Todos os métodos de instrumentos para o LTQ Velos Orbitrap foram ajustados no modo de aquisição de dados dependente. A verificação completa dos espectros de MS (m/z 300-1.600) foi adquirida no analisador do Orbitrap após acumulação de um valor alvo de $1e^6$. A resolução foi ajustada para $r = 60.000$ e os 5 íons de peptídeos mais intensos com o estado de carga ≥ 2 foram sequencialmente isolados para um valor alvo de 80.000 e fragmentados em HCD com energia de colisão normalizada de 40%, com a resolução do Orbitrap ajustada para $r = 7.500$ para MS/MS. O limiar de sinal para desencadear um evento

MS/MS foi ajustado para 80.000 contagens e o tempo de ativação de 0,1 ms foi utilizado. Exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de exclusão de tamanho de 400 e a duração da exclusão de 60 segundos, com repetição de contagem de 2. Para a identificação da proteína, uma lista de picos (msf) foi gerada a partir dos arquivos de dados raw usando o Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) com a ferramenta de busca Sequest e a busca contra o banco de dados NCBI restrito para *Citrus* (1.430 sequências, 673.637 resíduos) utilizando carbamidometilação (+57.021 Da) como modificação fixada, oxidação de metionina (+15.995 Da) como modificação variável, uma clivagem perdida por tripsina e uma tolerância de 10 ppm por precursor e 0,02 Da por íons fragmentados e filtrado usando Xcorr cutoffs (+1 > 1,8, +2 > 2,5 e +3 > 3,5).

Para a análise de cross-link, os arquivos de dados raw gerados pelo Xcalibur v2.1 (Thermo Fisher Scientific) foram convertidos em um formato de lista de picos (mgf) usando Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific). Os arquivos mgf foram analisados no software MassMatrix (www.massmatrix.net) (Xu & Freitas, 2007) para procurar automaticamente contra a sequência de ciclofilina gi|260401128|gb|ACX37092.1| (*Citrus sinensis*) de acordo com as instruções do software. Os parâmetros para análise de pontes dissulfeto foram carbamidometilação (+57.021 Da) como modificação fixada, oxidação de metionina (+15.995 Da) como modificação variável, procura de cross linkage com Cys-Cys, quatro clivagens perdidas por tripsina e uma tolerância de 10 ppm por precursor e 0,02 Da por íons fragmentados. Resultados da busca com alta confiança (MassMatrix pp score >70) e potenciais peptídeos com *cross-link* foram validados manualmente para íons série b e y contendo as cadeias α e β .

3.11. Docking Molecular e Simulação

Os estudos de docking molecular entre CsCyp e os peptídeos (YSPSAP e YSPSSP) foram realizados utilizando o programa Rosetta FlexPepDock (London et al., 2011). Os peptídeos foram fortemente encaixados no sítio ativo de CsCyp, baseado no modelo de ligação da proteína CypA com HIV-1 CA (Howard et al., 2003) e então submetidos a um protocolo de *docking* peptídeo-proteína de alta resolução, no qual a cadeia do peptídeo e a orientação de corpos rígidos foram otimizados por Monte-Carlo com abordagem de minimização. Além disso, o complexo foi refinado em 200 simulações independentes no FlexPepDock e ranqueadas baseado em uma pontuação genérica de energia total do átomo.

3.12. Ensaio de Duplo-Híbrido

Foram realizados os ensaios de duplo-híbrido para testar a interação da proteína CsCTD (clonada no vetor pOAD, (presa) com CsCyp, clonada no vetor pOBD (isca).

As construções em pOBD e pOAD citadas acima foram separadamente transformadas em cepas de *E. coli* DH5 α por choque térmico, plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB – 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio) seletivo com 100 μ g/mL de Amp (ambos os vetores, pOBD e pOAD possuem resistência a ampicilina) e crescidas em estufa a 37°C por 16 horas. Os clones foram repicados em meio líquido seletivo LB + Amp, a 37°C por 14-16 horas. As células foram coletadas

e o DNA plasmidial purificado utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O mesmo procedimento foi realizado para os vetores pOAD e pOBD vazios, ou seja, sem insertos, que foram utilizados como controle para confirmação das interações. Os plasmídeos das iscas (pOBD) e presas (pOAD) purificados foram utilizados na transformação de leveduras competentes no ensaio de Duplo-Híbrido.

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

A linhagem PJ69-4A de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa, *trp1-901*, *leu2-3*, 122, *ura3-52*, *his3-200 gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* : : *GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2* : : *GAL7-lacZ*; James & Craig et al., 1996) foi usada para confirmar as interações por ensaio de duplo-híbrido. A transformação desta linhagem de leveduras utilizou o protocolo descrito por Gietz & Woods (2002). Primeiramente, a levedura foi estriada em meio YPD sólido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% D-glicose, 2% Bacto-ágar) e incubada por 48 horas em estufa 30°C. Foram preparados inóculos contendo a levedura selvagem (*wild-type*) em meio YPD líquido incubados por 16 horas a 30°C em *shaker* com agitação constante de 220 rpm. As células foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm. Aos pellets foi adicionado um mix de transformação contendo 240 µL PEG 3350 50% w/v; 30 µL LiAc 1 M; 50 µL ssDNA de esperma de salmão (2 mg/mL) fervido por 5 minutos e resfriado em banho de gelo; 5 µL de plasmídeo pOBD-isca e água para completar o volume final de 360 µL. As células foram ressuspensas com esse mix, submetidas à choque térmico à 42°C por 2 horas e novamente centrifugadas. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de água, então, alíquotas de 100 µL foram usadas para plaquear em meio sólido SC +Ade +His +Leu -Trp (0,66% base nitrogenada sem aminoácidos; 2% glicose; 0,008% histidina; 0,008% leucina; 2% Bacto-ágar) e incubadas em estufa 30°C por 4 dias. Foram crescidos inóculos a partir desta placa contendo pOBD-isca e então transformados novamente como o procedimento descrito, mas desta vez adicionando os plasmídeos pOAD-presas (5 µL). Estes duplo-transformantes foram então crescidos em meio SC +Ade +His -Leu -Trp e incubados em estufa 30°C por 4 dias.

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

A linhagem de levedura utilizada contém três promotores (*GAL1*, *GAL2* e *GAL7*) que direcionam a expressão dos genes repórteres *HIS3*, *ADE2* e *lacZ*, artifício que tem se mostrado eficiente na redução de falsos-positivos. A partir das placas dos duplos-transformantes (pOBD-isca + pOAD-presas), 15 clones de cada condição foram repicados para um meio mais seletivo, agora sem histidina (marcador auxotrófico *HIS3*) e crescidos em estufa 30°C por 3 a 4 dias. Em seguida, os clones obtidos foram repicados para outro meio ainda mais seletivo que o anterior, sem os aminoácidos histidina e adenina (marcadores auxotróficos *HIS3* e *ADE2*) e com ou sem 3-aminotriazol (3-AT) nas concentrações de 0, 3 e 5 mM. Este composto foi utilizado para reduzir a ativação basal de *HIS3* quando são observadas interações fracas entre as proteínas de fusão, por ser capaz de inibir competitivamente o produto do gene *HIS3*. As placas foram incubadas na estufa a 30°C por 3 a 4 dias. Este procedimento foi repetido para cada clone isolado

sob três condições: pOBD-isca + pOAD-presa, pOBD-vazio + pOAD-presa, pOBD-isca + pOAD-vazio, sendo que as duas últimas condições citadas funcionaram como controles.

3.13. Análises Espectroscópicas da Proteína CsCyp

3.13.1. Dicroísmo Circular (CD)

Os ensaios de CD, realizados em , para verificar o conteúdo de estrutura secundária da CsCyp foi realizado com 20 μM de proteína diluída em água. Os espectros de CD foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro J-810 (JASCO), no comprimento de onda de 200 a 260 nm, com cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico.

3.13.2. Dinamic Light Scattering (DLS)

Os ensaios de DLS realizados para verificar a homogeneidade e monodispersividade da amostra, recomendado para ensaios cristalográficos, foram realizados logo após a purificação por gel filtração e utilizando-se o aparelho Protein Solutions DynaPro, na temperatura de 20°C, com 100 medidas com 10 acumulações cada e 40 μM de proteína por amostra.

3.13.3. Fluorescência Intrínseca do Triptofano

Os ensaios de fluorescência foram realizados para confirmar a interação da proteína CsCyp com seu inibidor CsA e em qual molaridade essa interação ocorre, para auxiliar nos ensaios cristalográficos. A coleta de dados foi feita no aparelho Fluorímetro KI Dual Channel da (ISS Company), com excitação a 295 nm e coleta do espectro de emissão na faixa de 310 a 420 nm, sendo que os dados foram coletados em intervalos de 2 nm.

3.13.4. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Os experimentos de ITC foram realizados no calorímetro VP-ITC-Microcal, do LNBio. Os experimentos foram realizados a 25°C, de acordo com Davis, et al. (2010). CsCyp purificada foi dialisada em tampão 50 mM HEPES pH 8,0, 200 mM NaCl. CsCyp, foi colocada na seringa, na concentração de 100 μM e o ligante – CsA, na célula, na concentração final de 5 μM , preparada no mesmo tampão que a proteína. As titulações consistiram de injeções de 5 μL de CsCyp. Os dados coletados foram analisados com o software Oring 7.

3.14. Fluorescência de Raio X

Todas as medidas de fluorescência de raio X foram realizadas na linha XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron como descrito anteriormente (Balan et al., 2006), em colaboração com o Dr. Carlos Perez. Um feixe branco de 0,1 mm de altura por 5 mm de largura foi usado para excitar amostras de CsCyp sob condições de reflexão total. Amostras foram preparadas como descritas a seguir: 5 μL de proteína em solução a 8 mg/mL foi colocada em um suporte de Perspex e seca usando lâmpada infravermelha por 15 minutos. As amostras foram medidas por 300 segundos e os espectros de fluorescência de Raio-X coletados foram avaliados usando o programa PyMCA (Solé et al., 2007).

3.15. Superexpressão e Silenciamento de Cyp de Citros

Com o objetivo de obter plantas com silenciamento e superexpressão do gene *cyp*, primers específicos (Tabela 2) foram construídos a partir da sequência do gene para clonagem em vetor pHANNIBAL (CSIRO – Figura 11). Este vetor é constituído por um promotor de expressão constitutiva 35S do vírus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), um íntron com função de auxiliar na formação do *hairpin*, e por um terminador OCS da *Agrobacterium tumefaciens*. Nas regiões entre promotor e íntron, bem como íntron e terminador, existem dois sítios de clonagem distintos o que possibilita a inserção do mesmo fragmento do gene a ser silenciado em orientação senso e antisenso, com o íntron intercalando estas sequências reverso complementares.

Tabela 2: Primers utilizados nas clonagens de silenciamento e superexpressão de CsCyp

Oligo	Sequência
CsCyp - RNAi	(<i>Xho</i> I/ <i>Xba</i> I) F: 5'-TCTAGACTGGAGATGACCGTCGGC-3' (<i>Kpn</i> I/ <i>Cla</i> I) R: 5'-ATCGATGGTACCCGCAATCAGCGATC-3'
CsCyp - Superexpressão	(<i>Bam</i> HI) F: 5'-GGATCCATGCCAAACCCCAAAGTGTTCTTC-3' (<i>Sac</i> I/ <i>Xho</i> I) R: 5'-CTCGAGCTAAGACAATTGACCGCAATC-3'

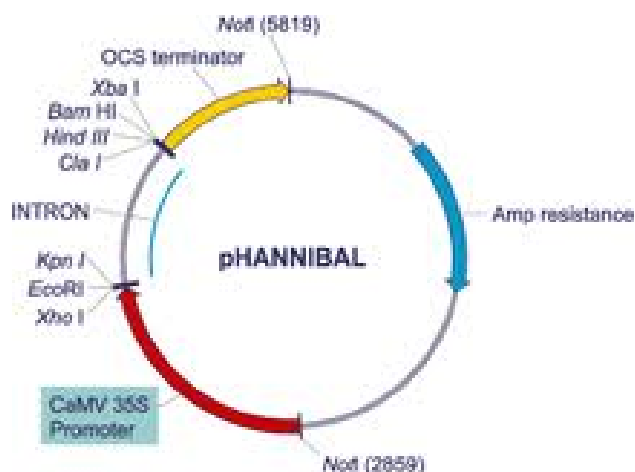


Figura 11: Vetor de clonagem pHANNIBAL (CSIRO).

3.15.1. Clonagem de CsCyp para Silenciamento

Os *primers* do silenciamento (Tabela 2) foram desenhados manualmente e sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *Xho*I/*Kpn*I (sense) e *Xba*I/*Cla*I (antisense) foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse*, respectivamente. A região amplificada pelos *primers* corresponde a 502 pb abrangendo o domínio CLD da CsCyp e utilizou-se, como molde para a reação de PCR, o plasmídeo pET28a-CsCyp. Após a amplificação do fragmento, o produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T EASY (Promega) e confirmado por sequenciamento. Em seguida, realizou-se a primeira digestão desta

construção com as enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI* e subclonagem no vetor pHANNIBAL. A seguir, a segunda digestão foi realizada com as enzimas de restrição *XbaI* e *ClaI* e consequente subclonagem no vetor pHANNIBAL já com o fragmento da primeira digestão. A clonagem está esquematizada na Figura 12.

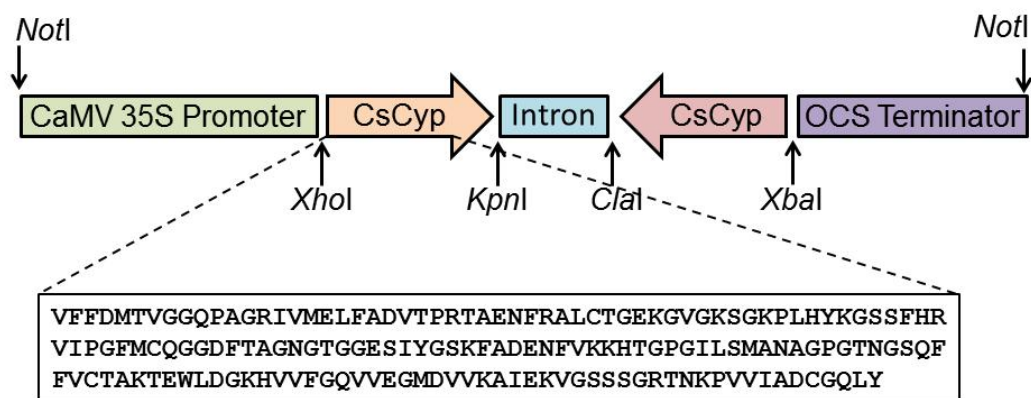


Figura 12: Vetor pHANNIBAL com a construção para o silenciamento de CsCyp.

Após a confirmação da clonagem dos fragmentos sense e antisense de CsCyp no vetor pHANNIBAL, prosseguiu-se com a digestão do pHANNIBAL com a enzima de restrição *NotI* para a liberação do cassete: Promotor CaMV35S – Cyp Sense – Intron – Cyp Antisense – Terminador OCS, que foi subclonado no vetor pFASTBac, digerido com a mesma enzima. A seguir, todo o cassete foi removido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e subclonado no vetor binário pCambia 1303, digerido com as mesmas enzimas. O vetor binário pCambia 1303 possui o gene repórter GUS (Figura 13), que permite a expressão da β -glucuronidase, importante para facilitar a seleção das plantas transformadas.

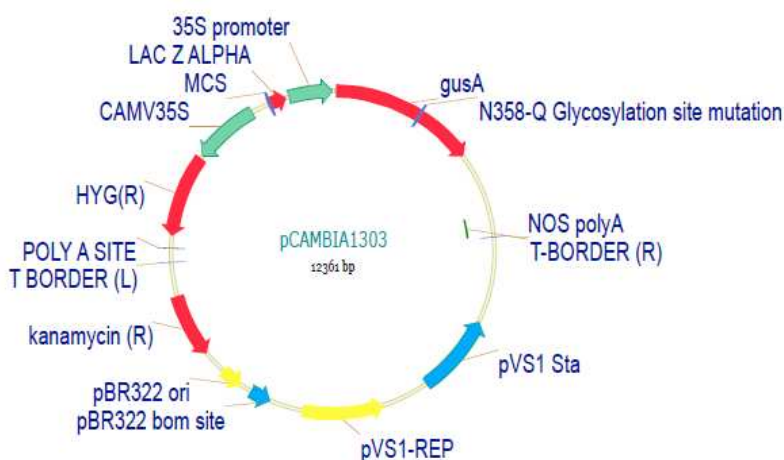


Figura 13: Vetor de clonagem pCambia 1303.

3.15.2. Clonagem de CsCyp para Superexpressão

A clonagem para a construção da superexpressão de CsCyp foi realizada utilizando os primers com sítio para as enzimas de restrição *Bam*HI, *Sac*I e *Xho*I (Tabela 2). A região amplificada por PCR a partir do molde pET28a-CsCyp, corresponde a 530 pb abrangendo o domínio CLD de Cyp de citros (Figura 14). O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T EASY e confirmado por sequenciamento. O fragmento foi então digerido utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I e subclonado no vetor pBI 121, digerido com *Bam*HI e *Xho*I. Após confirmação da clonagem por PCR, a construção foi transferida para o vetor binário pCambia 1303, utilizando as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III, presentes tanto no vetor pBI121 quanto no vetor binário pCambia 1303.

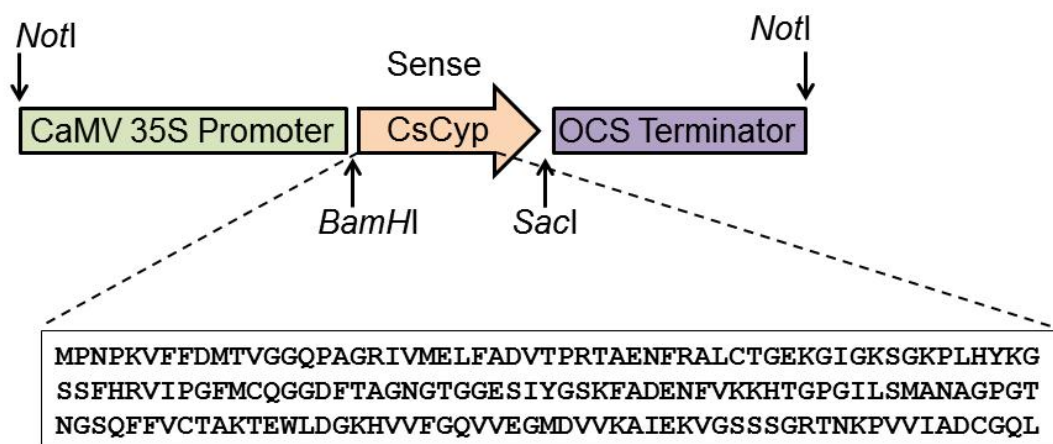


Figura 14: Vetor pHANNIBAL com a construção para a superexpressão de CsCyp.

3.15.3. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Todos os experimentos de transformação genética foram executados utilizando-se a estirpe de *A. tumefaciens* EHA 105, já disponível em nosso laboratório, transformadas com os vetores binários obtidos. A transformação foi feita pela técnica de eletroporação, na qual foram utilizadas cubetas de 0,2 cm de espessura contendo 40 µL de células descongeladas e 1 µL de DNA plasmidial. A eletroporação ocorreu nas condições de 2.500 volts, 25 mFD de capacidade e 200 OHM's (Gene Pulser da BIO-RAD). Logo após a transformação, adicionou-se 1 mL de meio YEP às células, que ficaram sob agitação constante a 150 rpm por 3 horas a 28°C e posteriormente foram plaqueadas em meio YEP contendo estreptomicina 100 mg/L e higromicina 5 mg/mL. As placas foram incubadas por três dias a 28°C. Após esse período, colônias de *A. tumefaciens* transformadas foram selecionadas para a extração do DNA plasmidial e PCR para confirmação da clonagem.

3.15.4. Origem e preparação do material vegetal

Sementes de laranja doce, variedades “Hamlin”, obtidas no Centro APTA Citros Sylvio Moreira / IAC foram lavadas em água corrente e secas por 24 horas em temperatura ambiente, em seguida, foram

retirados seus tegumentos externos e desinfetadas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) e Tween-20 0,1% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, lavadas em água destilada e esterilizada (três vezes) e incubadas *in vitro* em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura para germinação, contendo metade da concentração dos minerais nutrientes do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), consistindo de 100 mg/L de mio-inositol, 25 g/L de sacarose e 6,5 g/L de ágar.

Após a inoculação das sementes, as culturas foram incubadas à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz, por um período de quatro semanas e mais 2 semanas com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, estando prontas para a retirada de explantes para os experimentos de transformação.

3.15.5. Transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*

A preparação do inóculo de *A. tumefaciens* consistiu na coleta de uma colônia isolada cultivada em meio YEP suplementado com os antibióticos para seleção da bactéria, por 48 horas, a 28°C e inoculada em 50 mL de meio YEP líquido suplementado com antibióticos higromicina (0,5 mg/mL) e rifampicina (50 mg/L) e incubada sob agitação a 200 rpm, 28°C , por 16 horas. A suspensão bacteriana foi quantificada em espectrofotômetro (600 nm), ajustada para a concentração de 10^8 - 5×10^8 ufc/mL, centrifugada a 3.500 rpm, à temperatura ambiente por 5 minutos e o pellet foi ressuspenso em meio de cultura MS líquido (Murashige e Skoog, 1962).

Segmentos de epicótilo (1 cm) derivados das sementes germinadas *in vitro* cortados transversalmente foram incubados em suspensão bacteriana por 15 minutos. Após este período, os explantes foram colocados em papel-filtro estéril para a retirada do excesso de *Agrobacterium* e, em seguida, transferidos para o meio de co-cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) semi-sólido acrescido de 100 μM de acetoseringona (Sigma-Aldrich). Após 2 dias de co-cultivo a 27°C , mantidos no escuro, os explantes foram transferidos para meio seletivo de indução de gemas e brotos, suplementados com BAP, Higromicina e Timentin®, sendo estes repicados a cada duas semanas. Os explantes que não apresentaram crescimento foram descartados. Após a fase de indução (60 dias), as brotações foram transferidas para frascos contendo 40 mL de meio MS suplementado com ANA, AIB, Espermidina e Timentin® para enraizamento.

3.15.6. Aclimação das Plantas

Quando as plântulas apresentaram sistema radicular bem desenvolvido, foram retiradas do meio de cultura e transferidas para substrato agrícola (Bioplant) estéril e mantidas por mais 10 dias nas mesmas condições. Após esse período, o material foi aclimatado em condições de laboratório em um sistema de prateleiras sob iluminação, com fotoperíodo de 12 horas de luz, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40 W. As plantas foram mantidas por um período de aproximadamente duas semanas em irradiância de 32-46 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e posteriormente, mantidas em irradiância de 54-86 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas permaneceram no laboratório por cerca de 30 dias e após este período, foram mantidas em casa de vegetação.

3.15.7. Análise Molecular das Plantas

3.15.7.1. Reações de Polimerização em Cadeia (PCR)

Folhas de plantas transformadas foram coletadas para extração de DNA. A extração foi realizada utilizando o Kit REDEExtract-N-Amp Plant PCR (Sigma) seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi usado em experimentos de PCR, com os primers GUS-F e GUS-R específicos para o gene *gus*, para detectar a sua presença na planta transformada e consequentemente, o sucesso da transformação.

3.15.7.2. Ensaio enzimático GUS

Ensaio enzimático para o gene *gus* também foram realizados submergindo discos foliares de 0,60 cm de diâmetro em 1 mM X-Gluc, 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,0 e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi retirado o reagente e adicionado etanol 70% para retirada da clorofila dos discos foliares. A coloração azul indica atividade de gene repórter *gus*.

3.15.7.3. Extração de proteínas totais de citros e análise por Western Blot

Foram coletados 6 discos foliares de 0,6 cm de diâmetro cada. Estes foram então macerados em 400 µL tampão de amostra 2X SDS-PAGE com corante azul de bromofenol (100 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol e 50 mM Tris-HCl pH 6,8) e as amostras aquecidas a 95°C por 10 minutos. Proteínas na fração solúvel e insolúvel foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente, resolvidas em gel de poliacrilamida 13% SDS-PAGE corados com Comassie blue e detectadas por Western blot, como descrito no item 3.4, com o anticorpo Anti-Cyp.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CsCyp possui atividade PPlase

A proteína CsCyp clonada em pET28a em fusão com 6xHis apresenta um peso molecular de 20 kDa (Figura 15) (CsCyp possui 18 kDa, acrescido de 2 kDa da 6xHis).

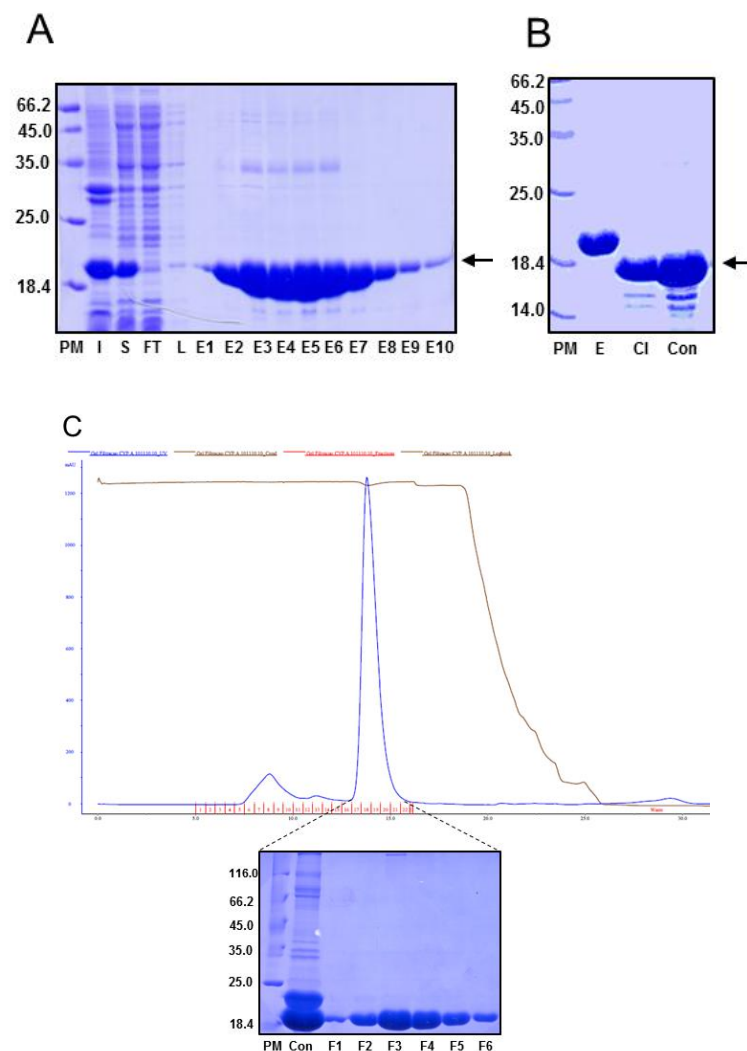


Figura 15: Géis de poliacrilamida 13% SDS-PAGE representando a purificação da proteína CsCyp. A seta indica a proteína CsCyp solúvel com cauda 6xHis, com peso molecular total de 20 kDa. (A) Purificação por afinidade da proteína CsCyp. (B) Gel da clivagem da cauda 6xHis com trombina. (C) Purificação da proteína CsCyp por gel filtração na coluna Superdex 75 10/300 GL. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); I = amostra insolúvel; S = amostra solúvel; FT = Flow through; L = Lavagem; E1 a E10 = Eluições da amostra; E = amostra eluída da resina TALON; CI = amostra clivada com trombina; Com = amostra clivada concentrada para gel filtração. F1 a F6 = Frações coletadas de CsCyp.

Análise de dicroísmo circular foi realizada para determinar se a proteína recombinante está enovelada, através do seu conteúdo de estrutura secundária. A Figura 16 mostra o resultado do CD (Figura 16A) e da deconvolução do espectro pelo site DICHROWEB (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) (Figura 16B). A análise indicou que CsCyp apresenta 43% de estrutura secundária tipo fitas β , 38,5% estrutura desordenada e 17,5% de α -hélice.

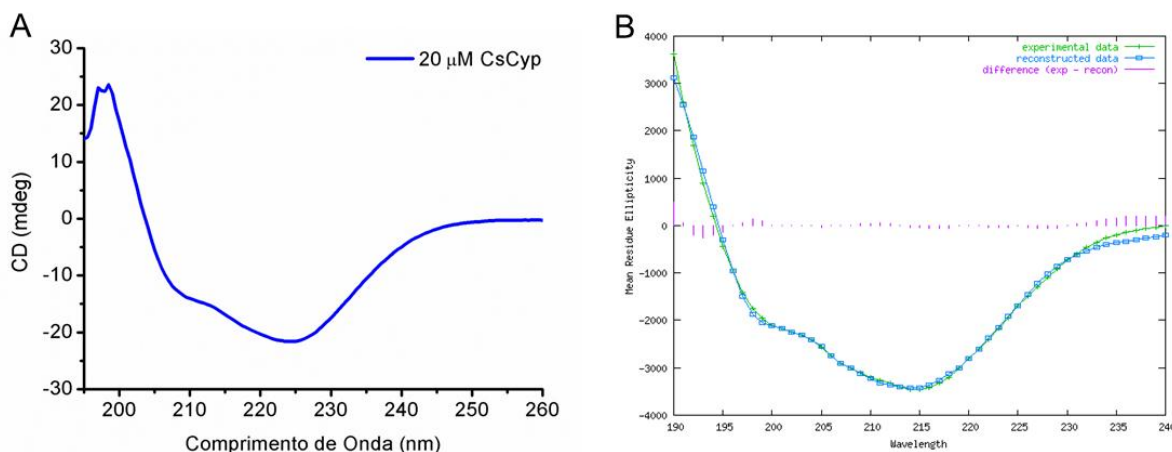


Figura 16: Espectro de CD da proteína CsCyp. (A) Espectro de Dicroísmo circular de 20 μ M de CsCyp em água, coletado na faixa de 195-260 nm, 10 acumulações. (B) Deconvolução do espectro de CD de CsCyp (Figura 16A) pelo algoritmo CDSSTR disponível no site DICHROWEB. Os brancos foram subtraídos dos espectros coletados.

A seguir, CsCyp foi submetida ao ensaio de CD na presença de seu inibidor CsA, nas proporções de 1 CsCyp : 1 CsA e 1 CsCyp : 2 CsA, para ver o comportamento da estrutura secundária mediante a interação com o inibidor (Figura 17). Pode-se observar que a interação com o inibidor levou a uma leve alteração na estrutura secundária de CsCyp, principalmente nos picos de 209 e 225nm.

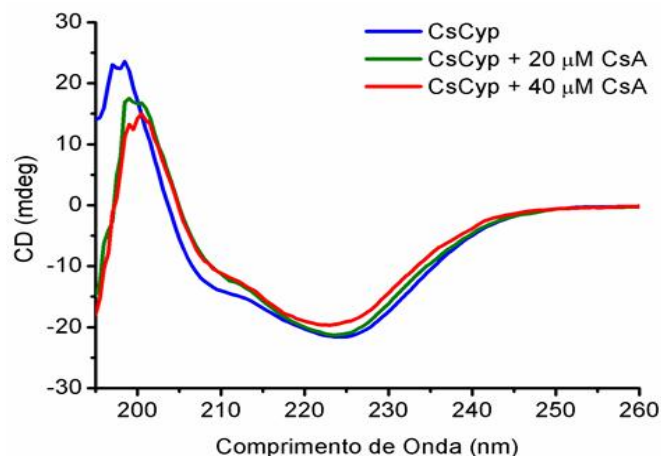


Figura 17: Espectros de CD da titulação da proteína CsCyp (20 μ M) com CsA (0 a 40 μ M), em água, coletados na faixa de 195-260 nm, 10 acumulações. Os brancos foram subtraídos dos espectros coletados.

Na sequência, ensaios de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizados, aproveitando a característica de emissão de fluorescência de aminoácidos aromáticos. Outra vantagem de se utilizar esta técnica é que CsCyp apresenta um único resíduo de triptofano, W128, localizado no sítio ativo de CsCyp, justamente no local de interação com CsA (Dornan et al., 1999). O resíduo W128 foi utilizado como sonda de interação entre CsCyp e CsA, possibilitando informações do microambiente desse aminoácido antes e após a interação da proteína com inibidor.

Os ensaios de fluorescência foram realizados para comprovar a ligação da proteína CsCyp com seu inibidor CsA e analisar em qual concentração molar isso ocorre, para facilitar os experimentos cristalográficos. Os experimentos foram realizados com 2,5 μ M de CsCyp e titulações de 0 a 6,5 μ M de CsA. Na Figura 18A, o gráfico mostra aumento da intensidade de fluorescência e deslocamento do espectro para energias maiores (menores comprimentos de onda), indicando alteração no microambiente do W128 após a interação com o inibidor. Esse efeito indica um microambiente mais apolar, portanto comprovando essa interação. A análise do gráfico também permite verificar que a proteína se liga ao inibidor na proporção molar de 1 CsCyp : 1 CsA, pois quando a titulação atinge mesma molaridade (2,5 μ M de CsCyp e 2,5 μ M de CsA), não há mais mudança na intensidade de fluorescência nem deslocamento do espectro. Quando os dados de intensidade de fluorescência normalizados são plotados vs. concentração de inibidor, (Figura 18B), pode-se observar claramente que quando a titulação atinge a concentração de 2,5 μ M de CsA, não há mais mudança na intensidade de fluorescência normalizada, comprovando a saturação de todos os sítios de ligação do inibidor na proteína.

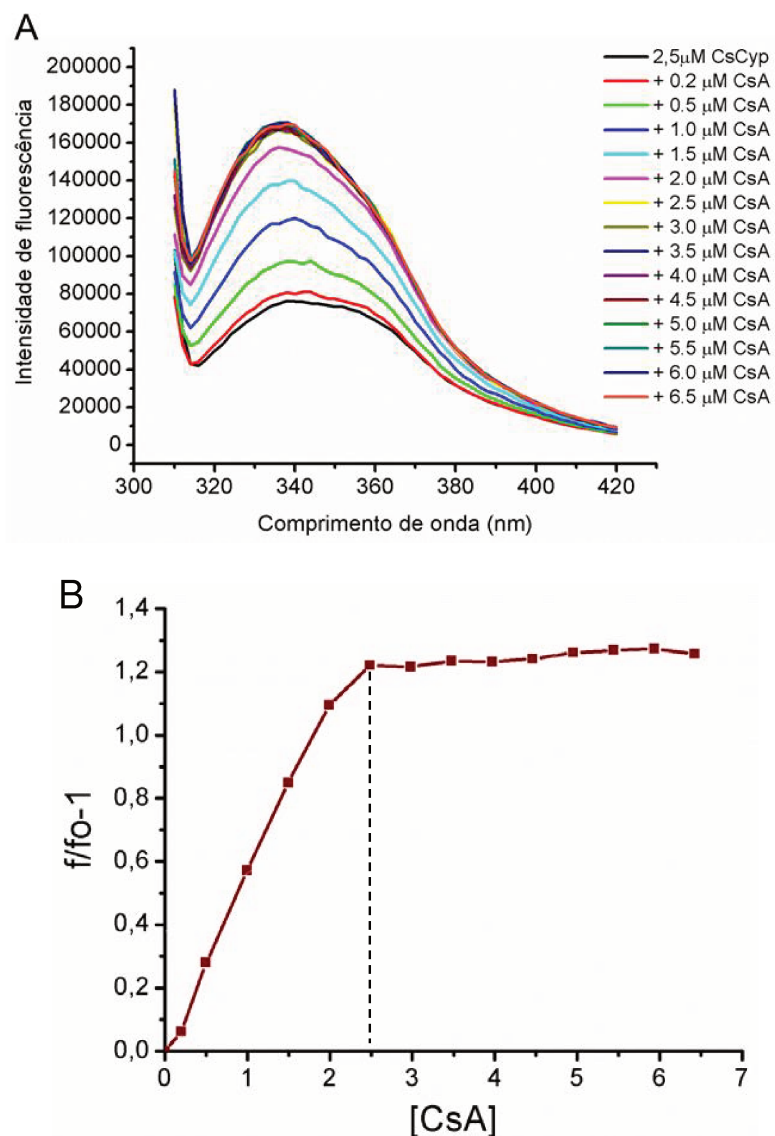


Figura 18: Gráficos do ensaio de fluorescência intrínseca do triptofano da titulação da proteína CsCyp com CsA. (A) Espectros de emissão de fluorescência de triptofano da proteína CsCyp conforme titulação com CsA. (B) Gráfico da normalização da fluorescência ($f/f_0 - 1$) pela concentração em molar de CsA. Pode-se observar a saturação da fluorescência emitida a partir da concentração de 2,5 μ M CsA, indicando a proporção estequiométrica de 1 molécula CsCyp : 1 molécula CsA. A curva de normalização representa uma média de 3 experimentos.

O ensaio de DLS também foi realizado logo após a purificação da proteína por gel filtração, mostrando que esta se encontra pura e monodispersa (Figura 19). O raio hidrodinâmico obtido foi de 2,1 nm e o peso molecular estimado foi de 20 kDa, bem próximo ao esperado para CsCyp, que seria 18 kDa. Esta análise indicou 13% de polidispersividade, sendo que o recomendado para ensaios cristalográficos é abaixo de 20%.

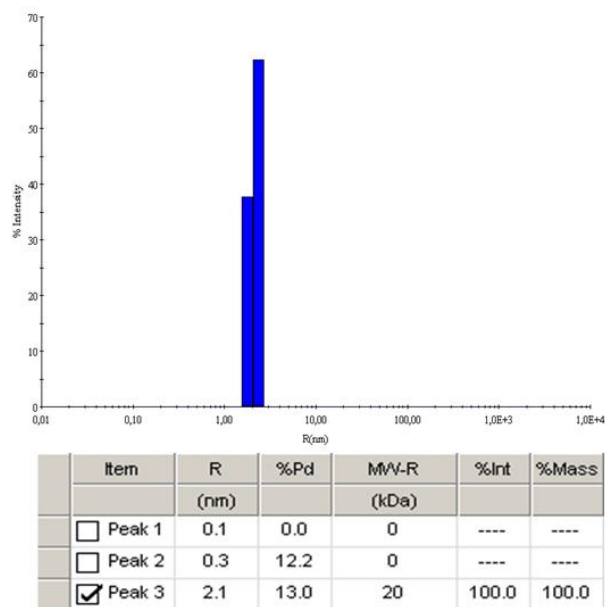


Figura 19: Gráfico do DLS da proteína CsCyp. O gráfico mostra a % intensidade vs. raio hidrodinâmico em nm (raio aproximado da proteína). A tabela indica a % de polidispersividade da amostra, o tamanho estimado das partículas presentes e % de intensidade e massa das partículas em solução.

Após verificar que CsCyp apresenta estrutura secundária e que CsA se liga a CsCyp, foram realizados os ensaios de atividade para verificar se CsCyp é uma ciclofilina com atividade de PPIase. Neste experimento utilizou-se a CsCyp recombinante purificada, com concentração final de 15 nM. Na presença de proteínas com atividade de PPIase, a ligação prolil do substrato Suc-AAPF-pNA é convertida mais rapidamente para a conformação *trans*, que é imediatamente clivada pela α -quimiotripsina, conduzindo a formação de um produto de cor amarela, o 4-nitroaniline. O gráfico abaixo mostra que CsCyp é uma PPIase ativa (Figura 20), pois obtém-se um aumento nos valores de absorbância a 390 nm na amostra com CsCyp (curva vermelha). Foi realizado também o ensaio na presença de CsA, inibidor de Cyps. O ensaio mostrou que a atividade de CsCyp é reduzida na presença de CsA (curva azul), indicando que CsA inibe a atividade de CsCyp.

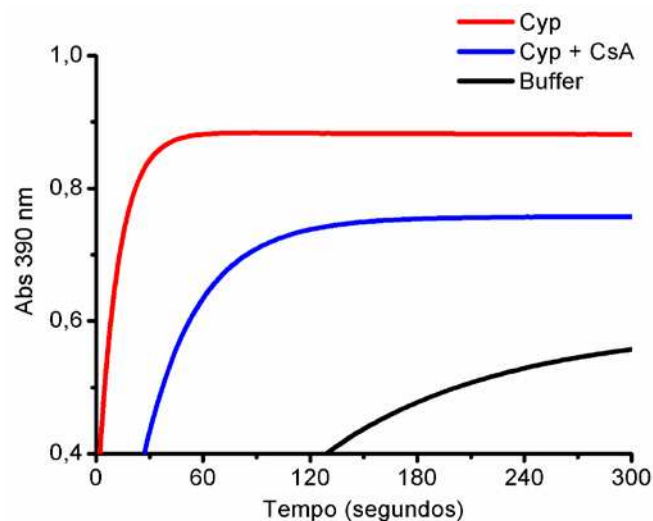


Figura 20: Gráfico obtido no ensaio de atividade enzimática PPIase pareado com α -quimiotripsina para CsCyp (curva em vermelho), na presença de CsA (curva em azul), mostrando inibição da atividade PPIase e o tampão da reação (curva em preta). O gráfico foi gerado pelo programa ORIGIN 7.

Em seguida, o ensaio enzimático foi utilizado para verificar se a presença de PthA e construções truncadas influenciariam na atividade de CsCyp. Pode-se observar que a presença das proteínas PthA2, Domínio interno (ID2) e 5.5rep+CT recombinantes purificadas reduzem a atividade de CsCyp (Figura 21 - curvas verde, vinho e roxa, respectivamente), promovendo uma queda na absorbância. Utilizou-se a proteína BSA como controle negativo neste ensaio (azul escuro) para mostrar que não é qualquer proteína contendo resíduos de prolina que são alvos de ciclofilinas ou influenciam a atividade PPIase. Estes resultados indicam que PthA não é alvo de CsCyp, como inicialmente postulado, mas sim que inibi a atividade de CsCyp.

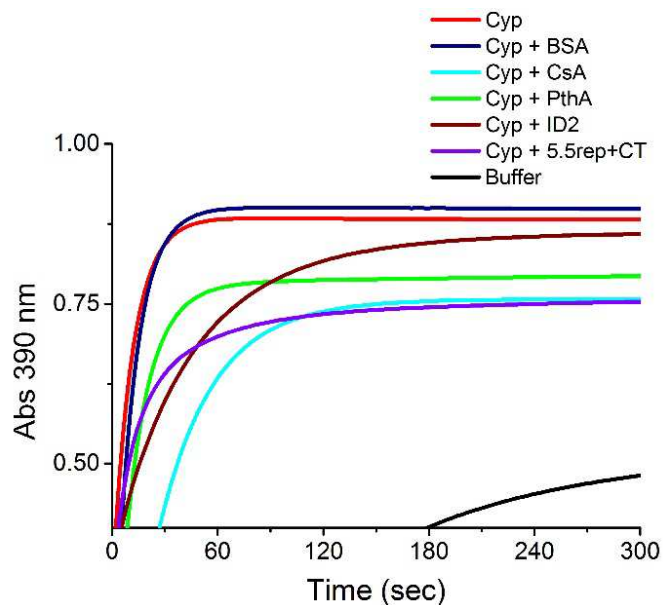


Figura 21: Gráfico representando o ensaio de atividade enzimática PPIase de CsCyp (curva vermelha), na presença de PthA2 (curva verde), ID2 (curva marrom), 5.5rep + CT (curva roxa), CsA (curva azul clara) e o tampão da reação (curva preta). A proteína BSA foi utilizada como controle (curva azul escura).

A partir dos resultados obtidos no ensaio enzimático, ensaios de interação *in vitro* de pull-down foram realizados utilizando a isca GST-CsCyp e a presa 6xHis-PthA2 (aproximadamente 100 μ M de cada proteína) purificadas na presença de 200 μ M de CsA (Figura 22). O blot com Anti-PthA mostra que quando CsA é adicionada, a interação entre CsCyp e PthA é eliminada. Sabendo-se que CsA se liga ao sítio ativo de CsCyp e a presença de CsA previne a interação entre CsCyp e PthA, é provável que a interação CsCyp – PthA ocorra através do sítio ativo de CsCyp e portanto CsA e PthA competem pela ligação ao sítio ativo de CsCyp.

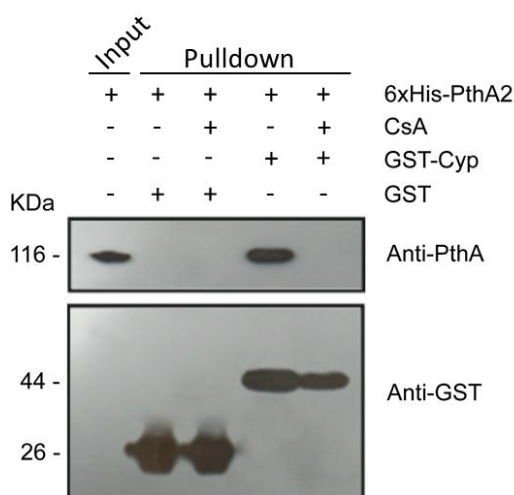


Figura 22: Western blot com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST representando os ensaios *in vitro* de pull-down da isca GST-CsCyp na presença de 6xHis-PthA2 e do inibidor CsA. A presença do inibidor interrompe a interação CsCyp-PthA2. A proteína purificada (6xHis-PthA2) e os controles estão representados nas três primeiras canaletas, respectivamente. As bandas correspondentes a GST-CsCyp possuem aproximadamente 44 kDa.

CsCyp interage com CsCTD

A partir dos relatos de que a prolil isomerase Ess1 interage com o CTD e que a prolil isomerase Cpr1 complementa o mutante Ess1, tornando-se essencial na ausência de Ess1, e de que CsCyp complementa os mutantes de levedura para essas duas ciclofilinas (Domingues et al., 2012), resolvemos investigar a interação de CsCyp com o CsCTD.

Primeiramente foi realizado um ensaio de duplo-híbrido para confirmar a interação CsCDT – CsCyp. O resultado do ensaio de duplo-híbrido (Figura 23), mostrou que CsCyp interage com CsCTD em todos os diferentes meios testados – do menos restritivo (SC +Ade –His –Leu –Trp, na ausência de 3-AT), até o mais restritivo (SC –Ade –His –Leu –Trp + 5 mM 3-AT). Foram realizados então ensaios de confirmação *in vitro* para a interação CsCyp – CsCTD.

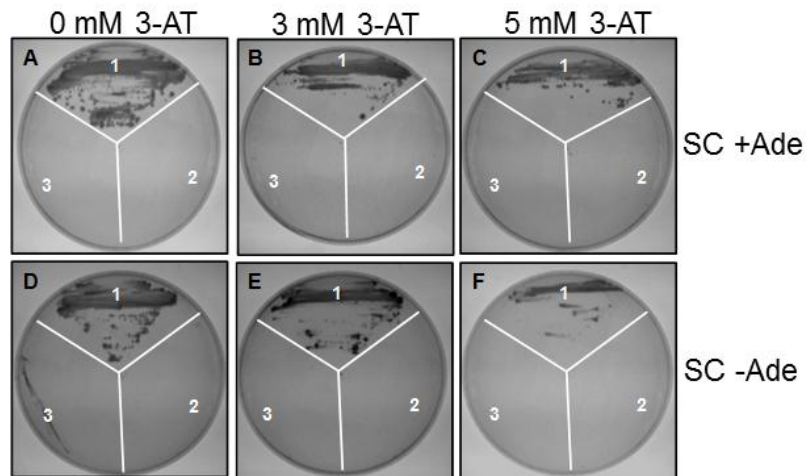


Figura 23: Interações positivas confirmadas entre CsCyp e CsCTD em meio SC – Leu – His – Trp, +Ade (Figura 23A, B e C) e – Ade (Figura 23D, E e F), nas concentrações de 0, 3 e 5 mM 3-AT. 1 – pOBD-isca + pOAD-presa (interação); 2 – pOBD-isca + pOAD-vazio e 3 – pOBD-vazio + pOAD-isca (controles).

Os experimentos de pull-down foram feitos imobilizando-se na resina de GST a proteína CsCTD (fusão com GST) e aplicando, em seguida, a CsCyp purificada. O ensaio também foi realizado na presença de CsA, com a finalidade de definir se a interação CsCyp – CsCTD se dá através do sítio ativo de CsCyp, uma vez que ciclofilinas nucleares são conhecidas por isomerizar resíduos de prolina presentes no CTD da RNA Pol II. CsCyp interage com CsCTD, mas não com o controle GST, confirmando o ensaio de duplo-híbrido (Figura 24). O ensaio também mostra que a interação CsCyp – CsCTD é eliminada na presença de CsA, o que provavelmente indica que CsCTD é um alvo de CsCyp.

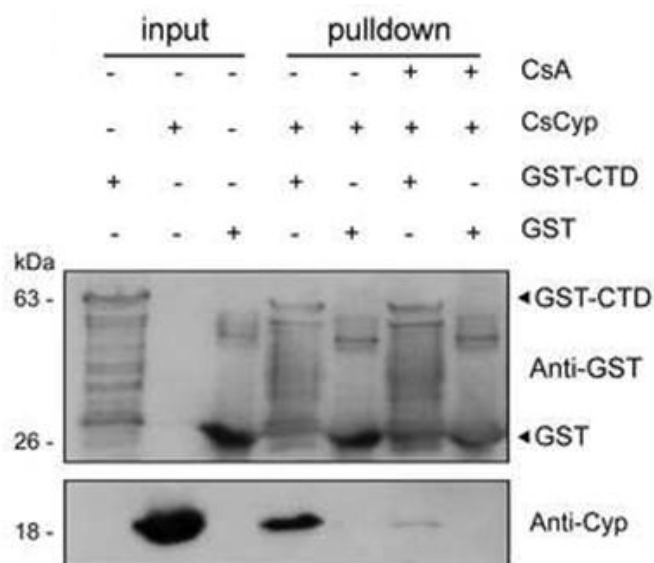


Figura 24: Western blot, com os anticorpos Anti-Cyp e Anti-GST, das interações de CsCyp purificada com CsCDT (canaleta 4) e CsCyp + CsA (canaleta 6). A proteína CsCyp purificada está indicada na canaleta 2. Os controles GST + CsCyp e GST + CsCyp + CsA estão indicados nas canaletas 5 e 7, respectivamente.

Com o objetivo de confirmar se CsCyp está associada ao CTD *in vivo* (*in planta*), foi realizado um ensaio de imunoprecipitação (IP) em colaboração com a pós-doutoranda Mariane Noronha Domingues. Foi realizada a imunoprecipitação de CsCyp de um lisado de células de folhas de laranja doce usando um soro anti-CsCyp e verificamos a interação com CsCTD com anticorpo monoclonal para a subunidade maior da RNA Pol II de humano (Anti-Pol II - Sigma), que compreende o CTD. Como mostrado na Figura 25, o anti-Pol II detectou o CsCTD recombinante e também bandas de alto peso molecular no extrato de citros, sugerindo que reconheceu a subunidade maior da RNA Pol II de citros (~200 kDa). O anti-Pol II reconheceu também uma banda majoritária de ~110 kDa, que pode corresponder a um fragmento na subunidade maior da RNA Pol II (Figura 25). Esta banda de ~110 kDa e outras de menor peso molecular foram imunoprecipitadas com o soro Anti-Cyp e o Anti-Pol II, mas não com o anticorpo pré-imune. Embora a presença de múltiplas bandas possa indicar a degradação da subunidade maior da RNA Pol II durante o IP, é possível também que o soro anti-CsCyp imunoprecipitou outros componentes da maquinaria da RNA Pol II e que são reconhecidos pelo anticorpo anti-Pol II. Similarmente, CsCyp foi detectada na fração de proteínas que foram imunoprecipitadas com os soros Anti-CsCyp e Anti-Pol II, mas não com o anticorpo pré-imune, indicando que CsCyp está associada com CsCTD *in vivo*.

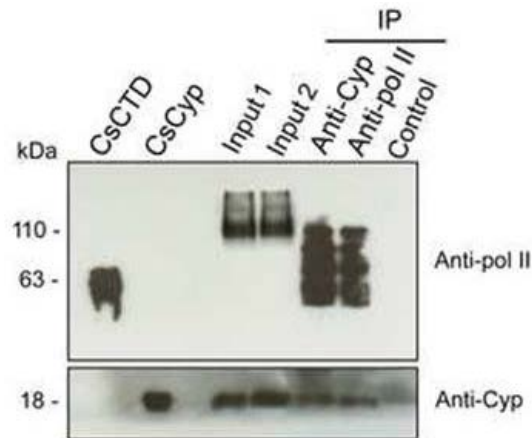


Figura 25: Western Blot da imunoprecipitação (IP) mostrando que o Anti-RNA Pol II de humanos reagiu com a CsCTD e com proteínas do extrato celular de citros tratado (Input 1) com DNase I ou não (Input 2), incluindo uma banda majoritária de ~110 kDa. O s rum Anti-Pol II detectou várias bandas na fração de proteínas que foram imunoprecipitados pelo Anti-Cyp e Anti-Pol II s rum, mas não pelo s rum pr -imune de CsCyp (controle). O s rum Anti-Cyp também detectou a CsCyp recombinante e a CsCyp que foi imunoprecipitada pelos sera Anti-Cyp e Anti-Pol II, mas não pelo s rum pr -imune de CsCyp.

A Figura 26 apresenta o modelo de interação proteína-proteína proposto com base nos resultados obtidos.

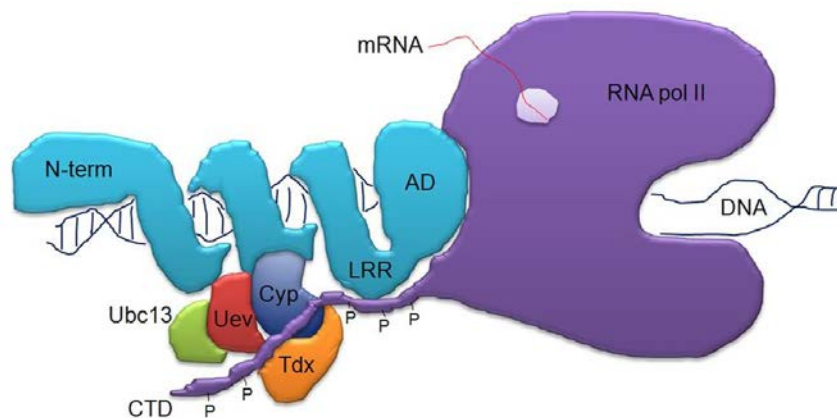


Figura 26: Modelo de interação proteína-proteína, ilustrando como efetores TAL podem estar associados com componentes da maquinaria de transcrição basal da célula hospedeira. O CTD desenovelado com heptapept deos fosforilados pode funcionar como um esqueleto para reunir um complexo multiprot ico, incluindo CsCyp, CsTdx e CsUev/CsUbc13. Quando ligado ao DNA alvo, o efector se associa ao complexo multiprot ico através do domínio de ligação ao DNA e com o CTD através do LRR. O PthA inibe a atividade PPlase de CsCyp, causando modificações no status de fosforilação do CTD, auxiliando no recrutamento de outros co-fatores, modulando a transcrição no hospedeiro.

A partir de todos os resultados indicando que CsCyp interage com CsCTD, peptídeos foram desenhados e sintetizados com base nas hepta-repetições presentes no CsCTD. Sabe-se que o CTD é composto por repetições de 7 aminoácidos, sendo que a sequência consenso é YSPTSPS e algumas repetições ocorrem em regiões específicas do CTD. Além disso, sabe-se que essas repetições sofrem isomerização em suas prolinas e fosforilação em resíduos de tirosina e serina (Meinhart et al., 2005; Buratowsky, 2009; Krishnamurthy et al., 2009; Jasnovidova & Stefl, 2013), sendo responsáveis assim por controlar as etapas da transcrição. No total foram desenhados 4 hexapeptídeos: três com base nas repetições do CsCTD – Pep1 (YSPSSP), Pep2 (YSPTSP) e Pep3 (YSPSAP). O quarto peptídeo desenhado (Pep4 - FGLDLP) foi utilizado como controle, já que foi comprovado interagir com CypA de humanos por Piotukh et al. (2005) e é encontrado em diversas proteínas, entre elas, no capsídeo do vírus HIV.

Os peptídeos desenhados foram diluídos em água e experimentos de ressonância magnética nuclear foram conduzidos com a finalidade de verificar quais as modificações que a interação com esses peptídeos causam na proteína CsCyp, através de experimentos de ^1H - ^{15}N -HSQC e se há preferência por algum peptídeo específico.

A primeira coleta de RMN realizada foi para assinalar os aminoácidos de CsCyp (Figura 27).

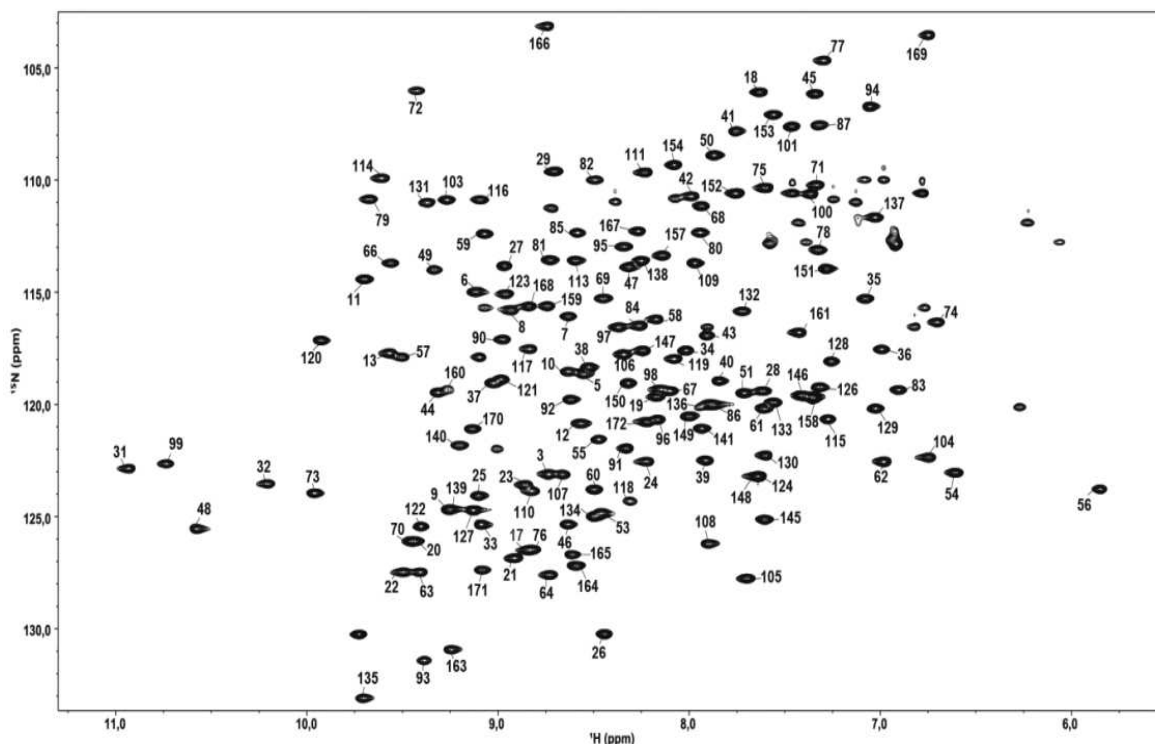


Figura 27: Espectro ^1H - ^{15}N -HSQC da proteína CsCyp com atribuição sequencial. Os números indicam o número do aminoácido correspondente ao sinal no espectro.

A seguir, como método de comparação, foi realizada a titulação (Tabela 3) de CsCyp com CsA (Figura 28), com a finalidade de obtermos as modificações nos deslocamentos químicos para a interação de CsCyp com uma molécula que se liga ao seu sítio ativo. Pode-se observar que onze dos treze aminoácidos do sítio ativo apresentaram mudança em seu deslocamento químico, inclusive os resíduos R62 e Q70, considerados importantes/essenciais para a interação proteína-ligante (Howard et al., 2003; Ke & Huai, 2004).

Tabela 3: Titulação da CsCyp com CsA para ensaios de RMN

	CsA	CsCyp	Proporção CsA : CsCyp
1	3,4 μ M	340 μ M	1 : 100
2	6,8 μ M	340 μ M	1 : 50
3	17 μ M	340 μ M	1 : 20
4	34 μ M	340 μ M	1 : 10
5	170 μ M	340 μ M	1 : 2
6	340 μ M	340 μ M	1 : 1
7	680 μ M	340 μ M	2 : 1

A

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
 MPNPKVFFDMTVGGQPAGRIVMELFADVTPTAENFRALCTGEKGIGKSGKPLHYKGSFHRVIPG
 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130
 FMCQGDFTAGNGTGESIYGSKFADENFVKKHTGPGILSMANAGPGTNGSQFFVCTAKTEWLDGK
 135 140 145 150 155 160 165 170
 HVVFGQVVEGMDVVKAIEKVGSSSGRTNKPVVIA DCGQLS

B

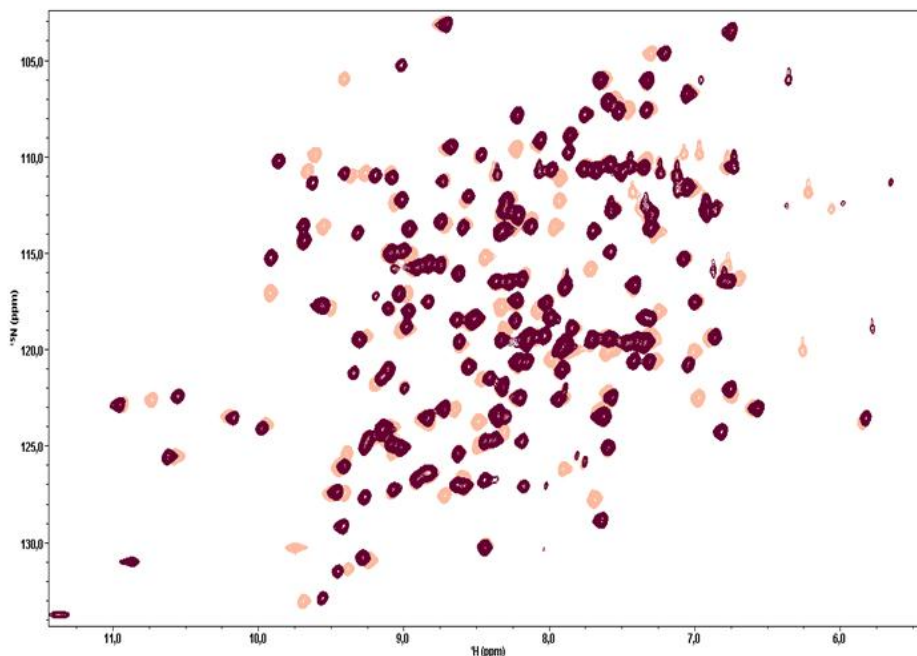


Figura 28: (A) Sequência de aminoácidos da proteína CsCyp, sendo os marcados em roxo, os resíduos que sofreram alteração conformacional devido a interação com CsA e em verde, os resíduos do sítio ativo que sofreram alteração conformacional devido a interação com CsA. **(B)** Espectro ¹H-¹⁵N-HSQC da sobreposição de CsCyp (rosa claro) com CsCyp + CsA (roxo escuro).

A seguir foram realizadas as titulações (Tabela 4) com os 4 peptídeos separadamente. A Figura 29 mostra a sobreposição dos espectros ^1H - ^{15}N -HSQC da proteína CsCyp e da interação de CsCyp com os peptídeos 01 (YSPSSP – Figura 29A e B) e 02 (YSPTSP - Figura 29C e D), nas diversas titulações. Pode-se observar que CsCyp interage fracamente com os dois peptídeos, sendo que apenas 2 aminoácidos apresentam alguma mudança no deslocamento químico (marcação em azul - Figura 29B e D).

Tabela 4: Titulação da CsCyp com os Peptídeos para ensaios de RMN

	Peptídeo	CsCyp	Proporção Peptídeo : CsCyp
1	3,7 μM	370 μM	1 : 100
2	7,4 μM	370 μM	1 : 50
3	18,5 μM	370 μM	1 : 20
4	37 μM	370 μM	1 : 10
5	74 μM	370 μM	1 : 5
6	185 μM	370 μM	1 : 2
7	370 μM	370 μM	1 : 1
8	740 μM	370 μM	2 : 1
9	1850 μM	370 μM	5 : 1

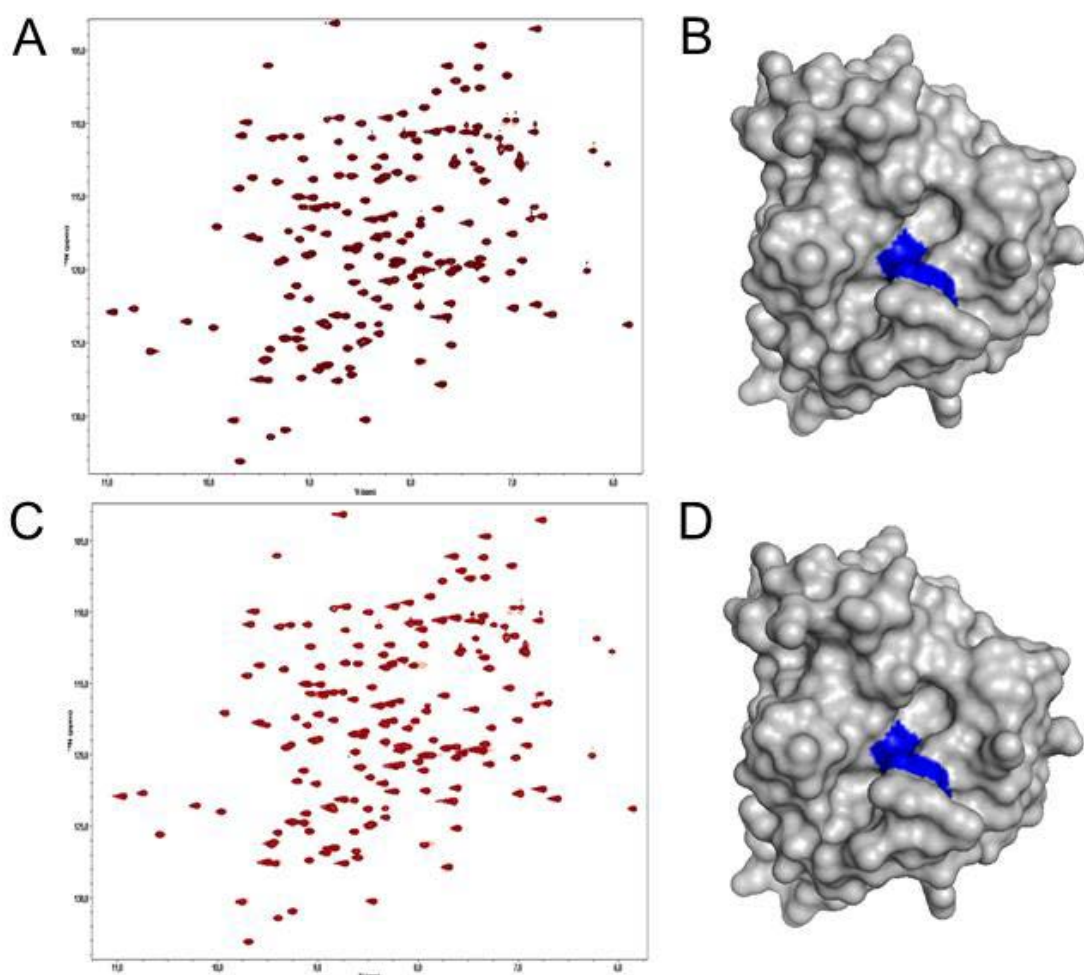


Figura 29: Espectro ^1H - ^{15}N -HSQC de CsCyp (vermelho claro) sobreposto com os espectros ^1H - ^{15}N -HSQC das titulações de CsCyp com o peptídeo. (vermelho escuro) (A) Titulação de CsCyp com Peptídeo 01. (B) Resíduos com mudança no deslocamento químico após interação com o peptídeo 01 (em azul). (C) Titulação de CsCyp com Peptídeo 02. (D) Resíduos com mudança no deslocamento químico após interação com o peptídeo 02 (em azul).

Entretanto, o peptídeo 03 (YSPSAP) e o peptídeo controle (FGPDLP) interagiram fortemente com CsCyp (Figura 30). Em ambos os casos a maioria dos resíduos que sofreram alteração pertencem ao sítio ativo da proteína. Para o peptídeo 03, o K_D da interação calculado foi de $59\ \mu\text{M}$, o que segundo Piotukh et al. (2005), pode ser considerado fisiologicamente relevante. A interação de CsCyp com o peptídeo controle teve $K_D = 104\ \mu\text{M}$, sendo que esta interação já era esperada, por ter sido descrita por Piotukh *et al.* (2005).

A interação CsCyp-CsA teve $K_D = 27\ \text{nM}$ (Figura 31), avaliada através da técnica de ITC e apresentou valor condizente com os obtidos em outros estudos de ciclofilinas com CsA (Davis et al., 2010).

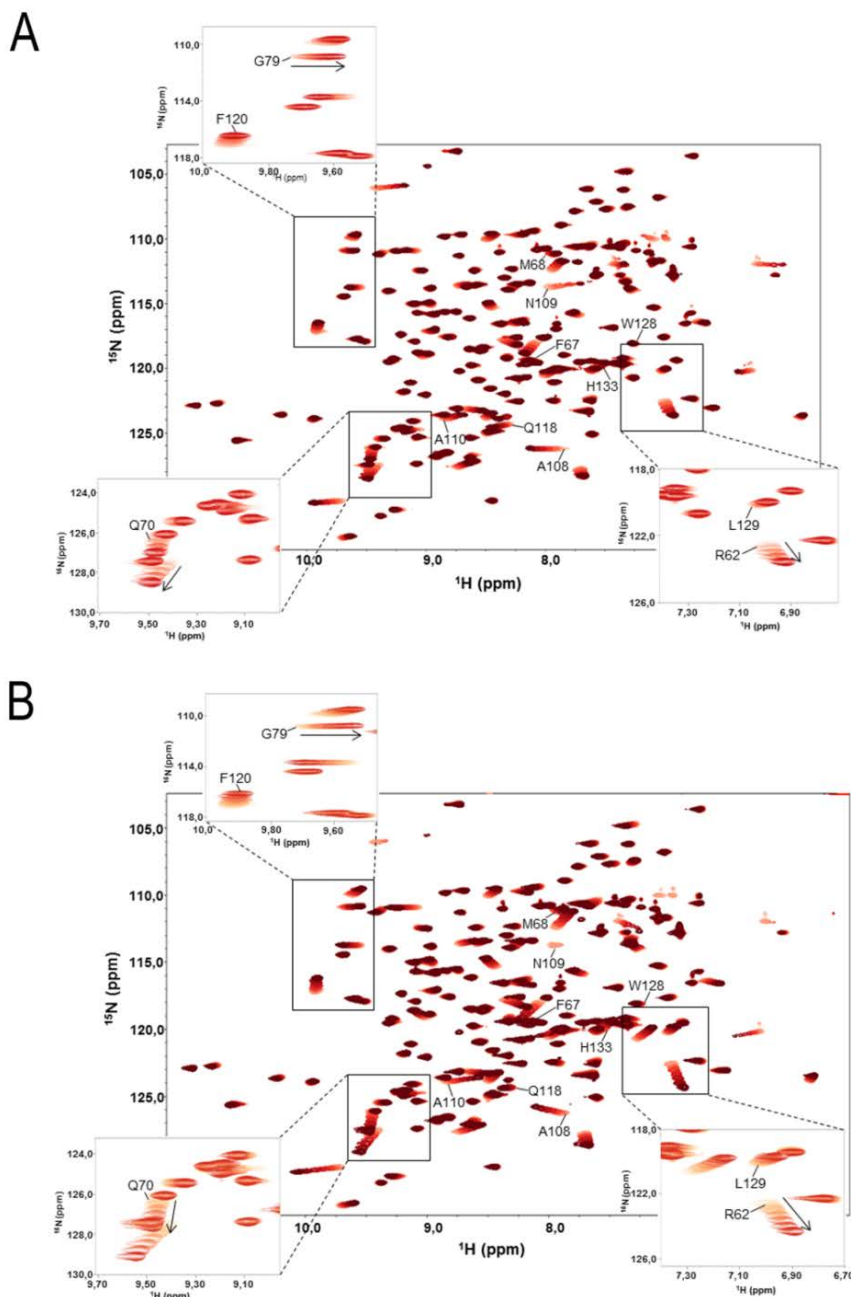


Figura 30: Titulação de CsCyp com os peptídeos YSPSAP e FGPDLP. (A) Espectro ^1H - ^{15}N -HSQC de CsCyp (vermelho claro) sobreposto com os espectros ^1H - ^{15}N -HSQC das titulações de CsCyp com YSPSAP (vermelhos mais escuros). (B) Espectro ^1H - ^{15}N -HSQC de CsCyp (vermelho claro) sobreposto com os espectros ^1H - ^{15}N -HSQC das titulações de CsCyp com FGPDLP (vermelhos mais escuros). Em ambos os espectros, as setas indicam a direção das mudanças dos deslocamentos químicos dos aminoácidos. Os aminoácidos marcados pertencem ao sítio ativo. As regiões em destaque na figura mostram o sinal de alguns aminoácidos que apresentaram mudanças no deslocamento químico e foram usados para calcular o K_D da interação.

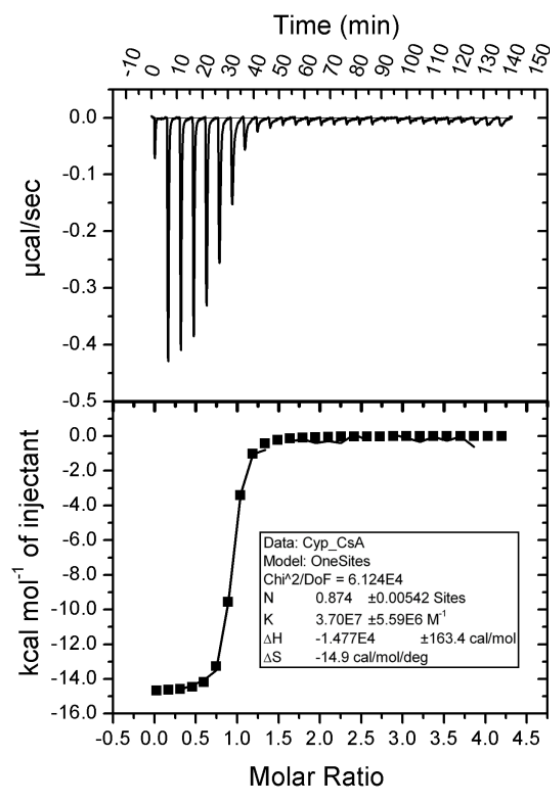


Figura 31: Interação de CsCyp com CsA avaliada através da técnica de ITC, mostrando as injeções (painel superior) e os dados integrados (painel inferior), adequado para um modelo de um único sítio de ligação.

Para investigar mais a fundo a base molecular da preferência pelo peptídeo YSPSAP, estudos de docking foram realizados. Os resultados mostraram que a substituição de alanina (YSPSAP) para serina (YSPSSP) na posição +2 é prejudicial para o reconhecimento e ligação do peptídeo devido a um microambiente hidrofóbico neste subsítio, formado pelos resíduos I64, F67 e W128 de CsCyp (Figura 32). Qualquer resíduo polar neste subsítio, como serina, é provável desfavorecer ou impedir a ligação do peptídeo ao sítio ativo da proteína. Esta idéia está em acordo com os experimento de RMN no qual CsCyp foi titulado com os peptídeos e também de acordo com os dados da literatura, que mostram que resíduos polares na posição +2 afeta negativamente a ligação de peptídeos lineares a CypA (Piotukh et al., 2005).

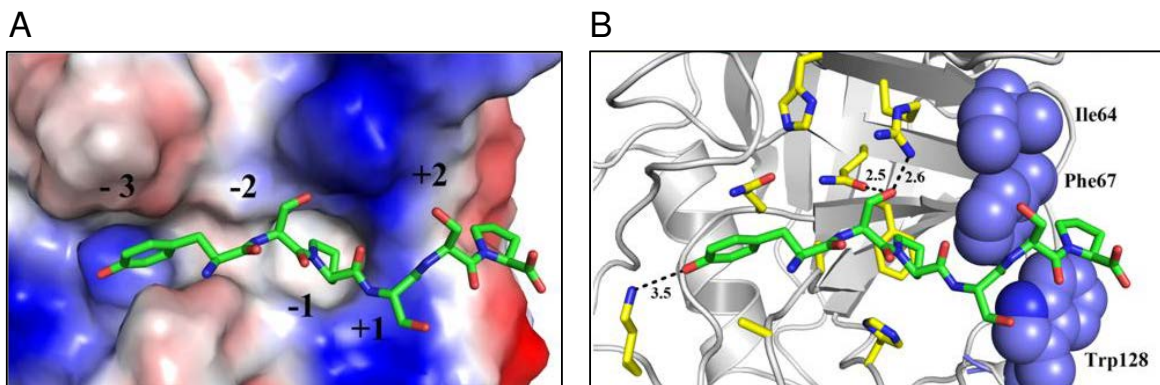


Figura 32: Estudos de Docking molecular entre o hexapeptídeo YSPSSP e CsCyp. (A) Representação da superfície eletrostática do sítio ativo com o peptídeo encaixado, ilustrando os subsítios. (B) Interação entre os resíduos do sítio ativo e o peptídeo (carbono em verde). Os resíduos hidrofóbicos que formam o subsítio +2 são representados em azul.

Foi portanto, demonstrado que CsCyp se liga com maior afinidade ao peptídeo YSPSAP em relação a peptídeos mais abundantes, como YSPTSP e YSPSSP, encontrados no CTD de citros. O valor de K_D para a ligação de YSPSAP a CsCyp é similar ao encontrado para o peptídeo FGPDLP para a CypA humana (Piotukh et al., 2005). Apesar do fato de o docking molecular oferecer uma boa explicação para a seletividade de ligação e que CypA liga preferencialmente sequência GP (Gly-Pro) (Howard et al., 2003; Piotukh et al., 2005), é importante notar que peptídeos com glicina na posição -1 se ligam a Cyps com alta afinidade e que funcionam, na verdade, como inibidores, como é o caso do peptídeo FGPDLP (Howard et al., 2003; Piotukh et al., 2005). Devido à conformação peculiar que a glicina assume na posição -1, foi sugerido que a ligação sub-ótima de sequências poderiam ser, de fato, melhores substratos para isomerização (Howard et al., 2003). Portanto, não podemos eliminar a possibilidade de os peptídeos YSPTSP e YSPSSP não serem substratos de CsCyp.

CsCyp apresenta estrutura tridimensional geral conservada

A seguir, a proteína foi então incubada com CsA, na proporção 1 CsCyp : 2 CsA e submetida aos ensaios de cristalização. Os cristais começaram a se formar após 48 horas da montagem das placas, na condição contendo 100 mM Bis-tris-propano pH 7,0, 1200 mM Citrato de sódio (Figura 33A). Como após 10 dias, não houve crescimento dos mesmos nem modificação no seu formato, eles foram então levados à linha de luz MX2 e através do padrão de difração, pode-se constatar de que se tratava de cristais de proteína, mas como não estavam bem formados, difrataram a menos de 3 Å de resolução, tornando difícil a resolução da estrutura. Foi feito então um refinamento, através da técnica de seeding, utilizando os cristais já formados, nas mesmas condições de cristalização iniciais. Após 24 horas, podia-se observar pequenos cristais, que atingiram tamanho bom para serem levados a linha de luz após 7 dias (Figura 33B e C). Os dados de difração foram coletados na linha MX2, sendo que os parâmetros utilizados na coleta

estão listados na Tabela 5. O padrão de difração (Figura 33D) obtido permitiu a coleta de todos os dados necessários para a resolução da estrutura, sendo que o cristal difratou até 2.09 Å de resolução.

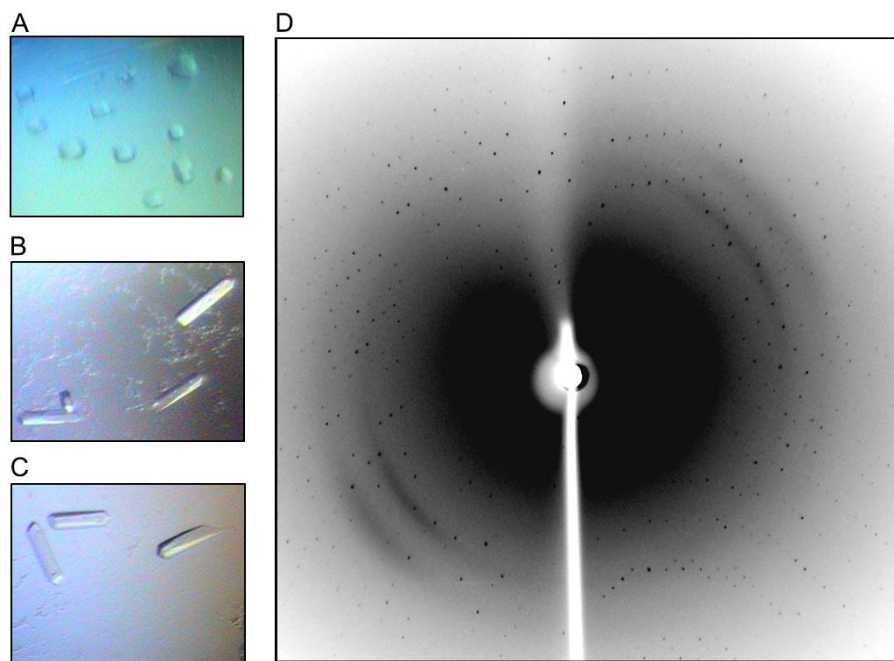


Figura 33: Cristais obtidos nos ensaios de cristalização. (A) Cristais obtidos no screening inicial, na condição 100 mM Bis-tris Propano pH 7,0, 1200 mM Citrato Na. (B) e (C) Cristais obtidos no refinamento, na mesma condição de cristalização inicial. D) Padrão de difração de raio X obtido pela difração do cristal proveniente do refinamento. Resolução máxima obtida foi de 1.88 Å.

Após a difração, os dados coletados foram processados inicialmente pelos programas MOSFILM e SCALA, sendo que as informações obtidas após o processamento se encontram na Tabela 5. A estrutura foi resolvida por substituição molecular, utilizando a estrutura da Cyp3 de *C. elegans* como modelo (PDB 1DYW), através do programa Phaser e depositada no banco de dados PDB (Protein Data Bank) sob o código de acesso 4JJM. O cristal apresenta um dímero por unidade assimétrica, sendo que cada monômero possui uma molécula de inibidor no seu sítio ativo e possui 3 dímeros por cela unitária. Os refinamentos foram realizados utilizando-se os programas Coot e Refmac5, sendo que as estatísticas do refinamento encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Estatísticas da coleta de dados e refinamento da resolução da estrutura tridimensional do complexo CsCyp : CsA

Coleta de Dados	
Grupo Espacial	P3 ₂ 21
Parâmetros de célula unitária (Å)	$a = b = 83,6, c = 85,0$
Resolução (Å)	37,52 – 2,09 (2,20 – 2,09)
Reflexões	
Medidas (<i>n</i>)	108111
Únicas (<i>n</i>)	20834
I/ σ	7,7 (2,4)
Completeza (%)	100 (100)
Redundância	5,2 (5,0)
R_{merge} (%)	19,6 (67,9)
R_{cim} (%)	9,4 (33,5)
R_{meas} (%)	21,8 (75,9)
Refinamento	
Resolução (Å)	20 – 2.09
Reflexões (R_{free})	20811 (1068)
$R_{\text{factor}} / R_{\text{free}}$ (%)	18,1 / 22,9
R.m.s.d.	
Comprimento de ligação (Å)	0,009
Ângulo de ligação (Å)	1,029
Nº moléculas/ unidade assimétrica	2
% Resíduos em	
Regiões favoráveis	93,77%
Permitidas	5,67%
Desfavoráveis	0,57%

A estrutura da Cyp de citros mostra um enovelamento típico de ciclofilinas – um barril beta composto de 8 fitas β antiparalelas, fechado por 2 α -hélices (Figura 34), apresentando também uma pequena hélice 3^{10} , que também ocorre em ciclofilinas. As fitas $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ e $\beta 6$ formam a folha $\beta 1$. Por outro lado, as fitas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 7$ e $\beta 8$ formam a folha $\beta 2$, sendo que as fitas β que compõem a folha $\beta 2$ são consideravelmente mais longas, (Figura 34). Na estrutura foi possível visualizar 3 resíduos extras na região N-terminal, provenientes da clivagem da cauda 6xHis – His, Gly e Ser.

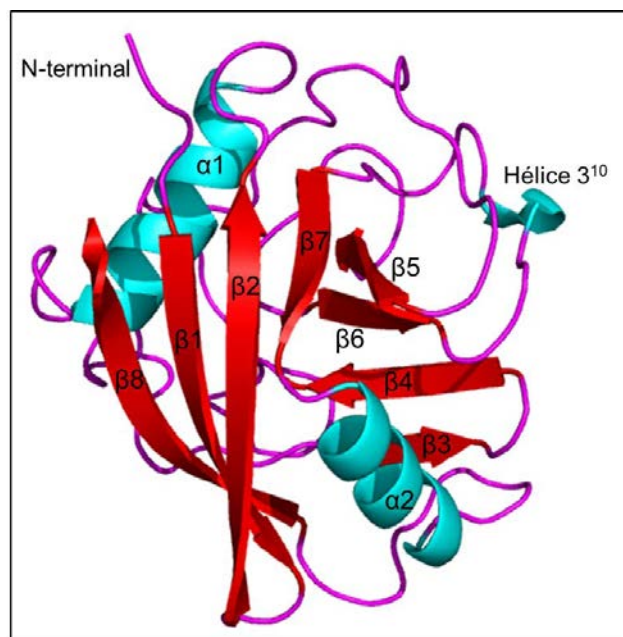


Figura 34: Estrutura Tridimensional da Cyp de *Citrus sinensis*, mostrando o barril beta formado por 8 fitas β , fechado por 2 α -hélices, sendo a folha $\beta 1$ composta pelas fitas $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ e $\beta 6$, e a folha $\beta 2$, pelas fitas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 7$ e $\beta 8$. Pode-se observar também a hélice 3^{10} .

O sítio ativo de CsCyp é totalmente conservado, como na maioria das ciclofilinas, sendo composto por 13 resíduos: Arg62, Phe67, Met68, Gln70, Gly79, Ala108, Asn109, Ala110, Gln118, Phe120, Trp128, Lys129 e His133 (Figura 35).

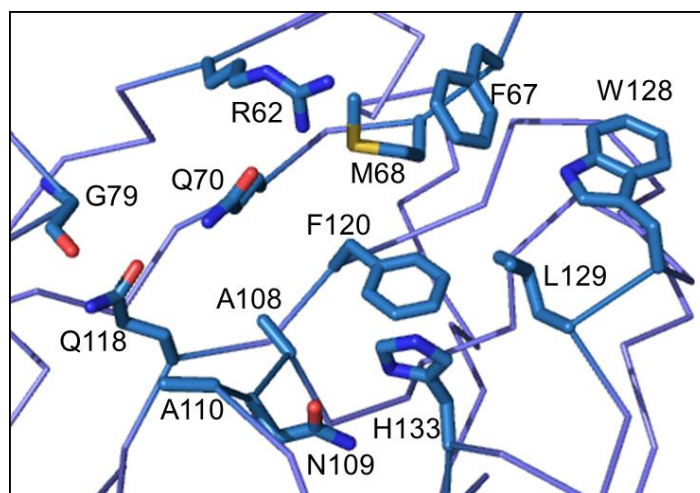


Figura 35: Resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo e o sítio de ligação a CsA de CsCyp. O sítio ativo é composto de 13 resíduos de aminoácidos, altamente conservados.

As interações com o inibidor CsA se dão principalmente por 6 pontes de hidrogênio diretas e 1 ponte salina. As pontes de hidrogênio (Figura 36), ocorrem entre Arg62 (NH1) – MLE10 (O) (Figura 36A), Arg62

(NH2) – MLE10 (O) (Figura 36A), Gln70 (NE2) – BMT1 (O) (Figura 36B), Asn109 (N) – MVA11 (O) (Figura 36C), Asn109 (O) – ABA2 (N) (Figura 36B) e Trp128 – MLE9 (Figura 36D). A ponte salina se dá entre His133 (ND1) – MVA11 (O) (Figura 36C). Ocorrem também pontes de hidrogênio indiretas, mediadas por moléculas de água presentes no sítio ativo.

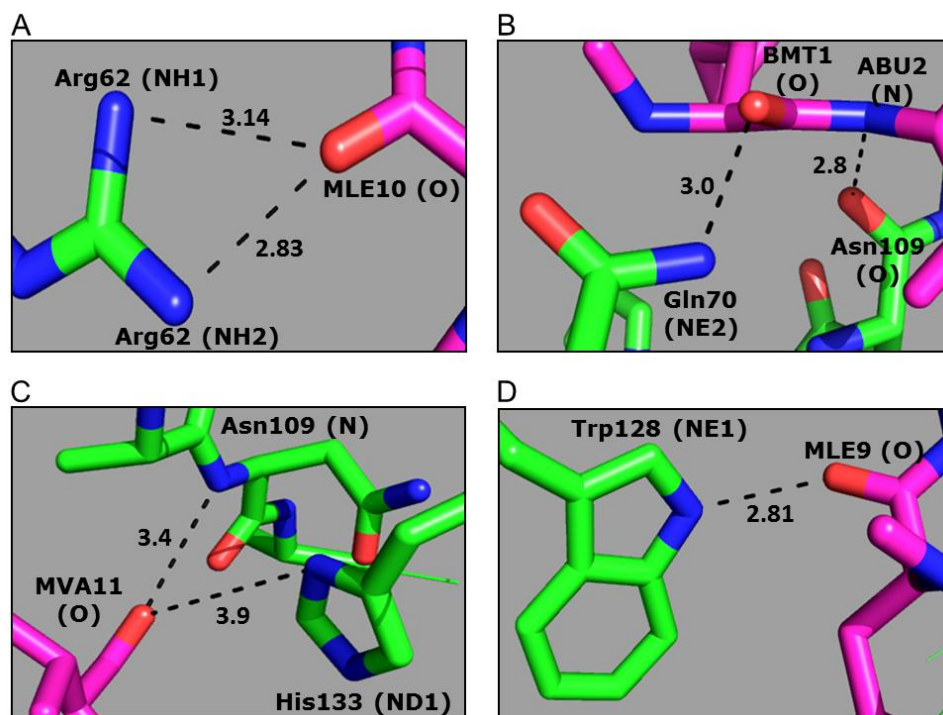


Figura 36: Interações entre CsCyp e CsA através de pontes de hidrogênio e pontes salinas. (A) Pontes de hidrogênio – Arg62 (NH1) - MLE10 (O), com 3,14 Å e Arg62 (NH2) - MLE10 (O), com 2,83 Å. (B) Ponte de hidrogênio - Gln70(NE2) - BMT1(O), com 3 Å e Asn109 (O) - ABA2 (N), com 2,79 Å. (C) Ponte de hidrogênio - Asn109 (N) - MVA11 (O) com 3,4Å e ponte salina – His133 (ND1) - MVA11 (O), com 3,9 Å. (D) Ponte de hidrogênio Trp128 (NE1) - MLE9 (O), com 2,81 Å. A linha tracejada indica a distância entre os átomos dos resíduos marcados.

CsCyp apresenta um loop divergente (Figura 37A) de 7 resíduos - ⁴⁸KSGKPLH⁵⁴ localizado acima do sítio ativo e que ocorre apenas nas ciclofilinas pertencentes ao subgrupo denominado ciclofilinas divergentes, incluindo a Cyp3 de *C. elegans* (Dornan et al., 1999), e outras Cyps de parasitas e plantas, entre elas *A. thaliana* (Dornan et al., 1999; Laxa et al., 2007) e *T. aestivum* (Sekhon et al., 2013). É interessante que proteínas que apresentam este loop apresentam também dois resíduos de cisteínas (C40 e C168 em CsCyp) e um resíduo de Glu (Glu83) altamente conservados em posição homóloga.

O loop divergente é mantido no local por uma rede específica de pontes de hidrogênio entre o grupo carboxil da cadeia lateral do E83 e os grupos amida dos resíduos K48 e S49 (2,6 e 3,2 Å, respectivamente) e o grupo hidroxil da cadeia lateral do S49 (2,3 Å) (Figura 37B). Na estrutura de Cyp3 de *C. elegans* (Dornan et al., 1999), a interação entre E83 e os átomos de nitrogênio da cadeia principal são conservados

(2,8 e 3,2 Å), entretanto, o resíduo S49 adota uma conformação diferente e forma uma ponte de hidrogênio com uma molécula de água vizinha. As cisteínas C40 e C168 se encontram na forma reduzida, mas com seus grupos tiol a uma distância de 5,4 Å (Figura 37C).

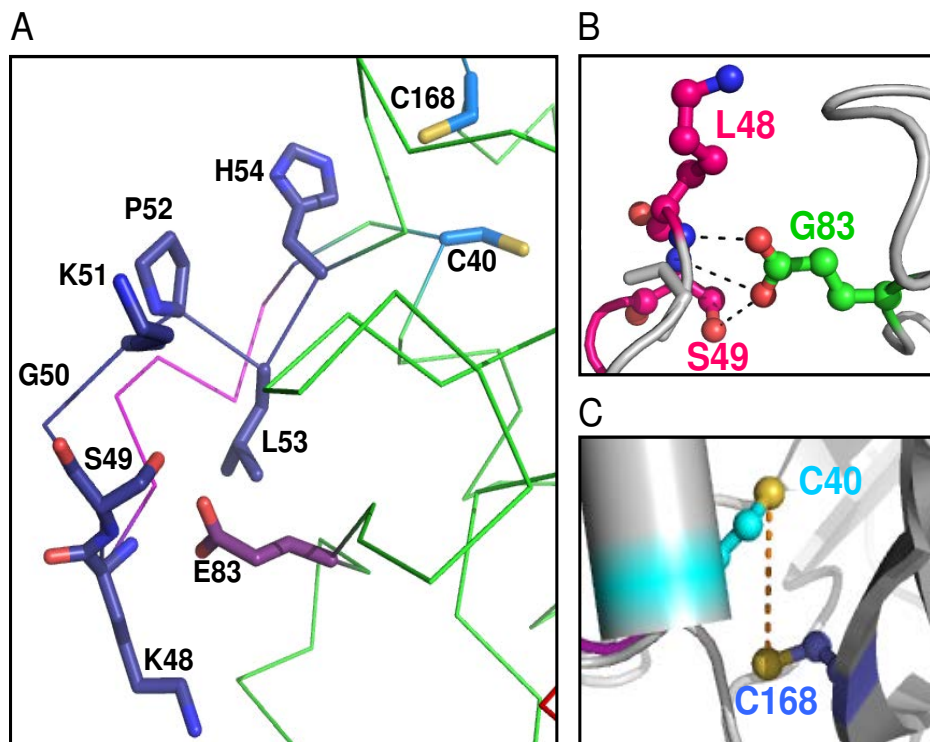


Figura 37: Detalhes da estrutura de CsCyp e ciclofilinas divergentes – em azul escuro, o loop divergente, destacando a interação entre os resíduos K48 e S49 e o E83 (roxo), invariável em ciclofilinas com loop. Em azul claro, os resíduos de cisteínas conservadas em ciclofilinas divergente: C40 e C168. (B) Pontes de hidrogênio entre E83 (verde) e K48 e S49 (rosa). (C) Distância de 5,4 Å entre C40 (azul claro) e C168 (azul escuro).

Não se sabe exatamente a função do loop divergente e resíduos conservados nas ciclofilinas divergentes, mas Dornan et al (1999) propôs três hipóteses diferentes: 1° - o loop seria parte de um sítio de ligação do ATP; 2° - as cisteínas conservadas, juntamente com o resíduo His54 do loop divergente poderiam formar um sítio de coordenação de metal e 3° - os resíduos de Cys poderiam estar relacionados com a sinalização de resposta ao estresse oxidativo, uma vez que parece ser possível a formação de pontes dissulfeto entre as cisteínas conservadas e que a ciclofilina oxidada não apresenta atividade PPlase (Dornan et al., 1999; Gourlay et al., 2007) (Figura 38).

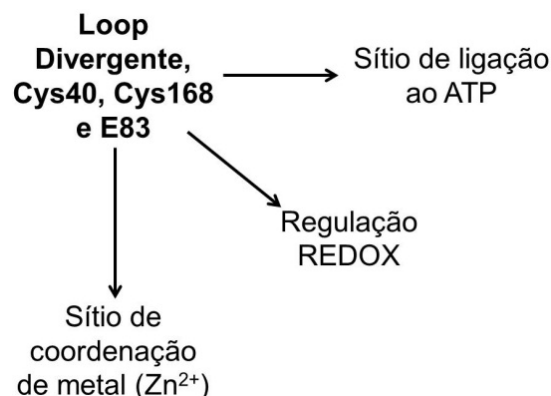


Figura 38: Esquema das hipóteses para a função do loop divergente e das cisteínas e glutamato conservados.

P-loop teórico de CsCyp não liga ATP

CsCyp possui duas sequências de aminoácidos que poderiam compor um P-loop ou sítio de ligação ao ATP. O P-loop é composto de duas sequências – os motivos A e B, sendo o primeiro responsável por ligar o ATP e com a sequência ⁴²GEKGIGKS⁴⁹ e o segundo motivo, ligaria Mg²⁺, com sequência ¹⁶³VVIAD¹⁶⁷. A Figura 39 ilustra os experimentos realizados para comprovar se CsCyp interage com ATP através do P-loop teórico.

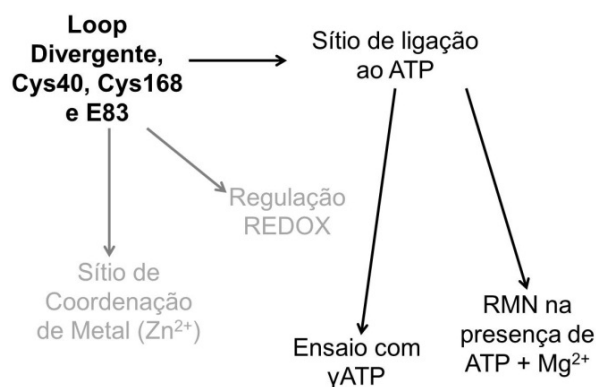


Figura 39: Esquema dos experimentos realizados para elucidar se CsCyp interage com ATP através do P-loop teórico.

A Figura 40 mostra os motivos A e B na estrutura de CsCyp. É interessante notar que o motivo A possui dois resíduos de aminoácidos que também compõe o loop divergente (K48 e S49, em marrom).

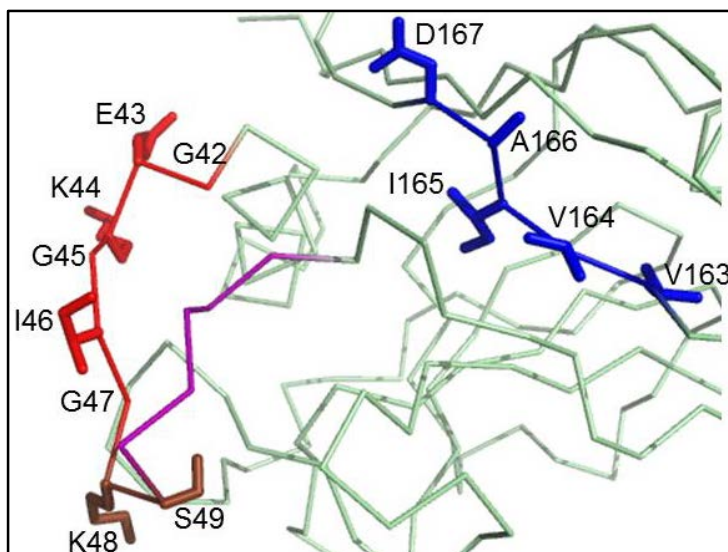


Figura 40: P-loop teórico na estrutura de CsCyp. Em vermelho e marrom os resíduos 42GEKGIGKS49 (K48 e S49 fazem parte do loop divergente), que compõe o motivo A do P-loop. Em azul os resíduos 163VVIAD167, que compõe o motivo B. Em roxo, o restante dos resíduos do loop divergente.

Foi realizado um ensaio com γ -ATP (ATP marcado com ^{32}P no fosfato gama) para verificar se CsCyp teria a propriedade de ligar ATP. Na Figura 41, pode-se observar que a proteína se ligou ao ATP tanto na presença quanto na ausência de MgCl_2 e que o ATP não interage com BSA (usado como controle negativo) e também não reage com a membrana de PVDF utilizada no experimento. Entretanto, não se pode confirmar que é uma interação específica, pois o ATP pode estar ligado a qualquer região da proteína.

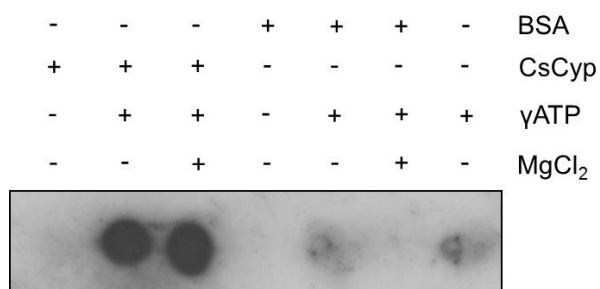


Figura 41: Ensaio com γ -ATP. Após a revelação, pode-se observar que CsCyp interagiu com o γ -ATP, tanto na presença quanto ausência de MgCl_2 .

A seguir, para confirmar os resultados do ensaio com ATP radioativo, ensaios de RMN com CsCyp titulada com ATP + Mg^{2+} foram realizados. A Tabela 6 mostra as quantidades da titulação da proteína com ATP.

Tabela 6: Titulação da CsCyp com ATP + Mg²⁺ para ensaios de RMN

	ATP + Mg ²⁺	CsCyp	Proporção ATP : CsCyp
1	6,8 µM	340 µM	1 : 50
2	34 µM	340 µM	1 : 10
3	170 µM	340 µM	1 : 2
4	340 µM	340 µM	1 : 1
5	680 µM	340 µM	2 : 1
6	1700 µM	340 µM	5 : 1
7	3400 µM	340 µM	10 : 1

A Figura 42 mostra a sobreposição dos espectros ¹H-¹⁵N-HSQC de CsCyp e da interação CsCyp com ATP, nas diversas titulações. Pode-se observar que a interação é fraca, sendo que poucos aminoácidos do sítio ativo (A108, N109, F120, W128, L129 e H133) sofreram alguma modificação no seu deslocamento químico e os resíduos R62 e Q70, que são considerados alguns dos principais resíduos responsáveis pela interação com ligantes, não apresentaram mudanças significativas no seu deslocamento químico. Os resíduos que se esperava interagir com o ATP + Mg²⁺ – ⁴²GEKGIGKS⁴⁹ e ¹⁶³VVIAD¹⁶⁷, não sofreram nenhuma modificação no deslocamento químico. Além disso, foi calculado um K_D > 1000 µM, mostrando que a interação é inespecífica. Todos esses dados descartam a hipótese de que o loop divergente poderia ser um sítio de ligação de ATP e mostram que ATP interage fraca e inespecificamente com CsCyp através de seu sítio ativo.

A

```

1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65
MPNPKVFFDMTVGGQPAGRIVMELFADVTPRTAENFRALCTGEKGIGKSGKPLHYKGSSFH RVIPG
70  75  80  85  90  95  100 105 110 115 120 125 130
FMC QGGDFTAGN GTGGESIYGSKFADENFVKK HTGPGIL SMANAGPGTNGS QFFVCTAKT EWLDGK
135 140 145 150 155 160 165 170
HV VFGQVVEGMDVVKAIEKVGSSSGRTNKPVVIADCGQLS

```

B

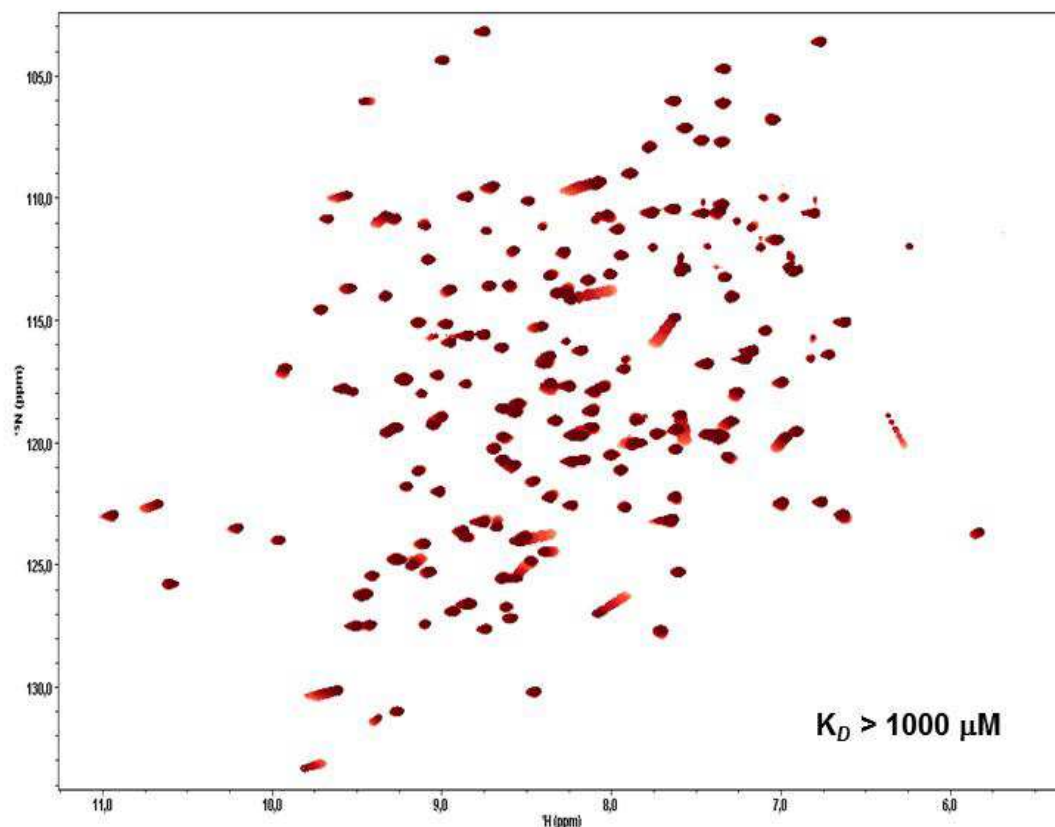


Figura 42: (A) Sequência de aminoácidos da proteína CsCyp, marcados em azul claro, os resíduos que sofreram alteração conformacional devido a interação com ATP, em verde, os resíduos do sítio ativo que sofreram alteração conformacional e em amarelo, resíduos do sítio ativo que não sofreram alterações conformacionais. B) Espectro ^1H - ^{15}N -HSQC de CsCyp (vermelho claro) sobreposto com os espectros ^1H - ^{15}N -HSQC das titulações de CsCyp com ATP (vermelhos mais escuros).

CsCyp não possui sítio de ligação de metal

A segunda hipótese levantada é de que os resíduos de cisteína 40 e 168, juntamente com o resíduo H54 formariam um sítio de coordenação de metal, que também regularia a atividade da proteína (Dornan

et al., 1999). A Figura 43 ilustra as etapas seguidas para elucidar se CsCyp possuía um sítio de ligação de metal.

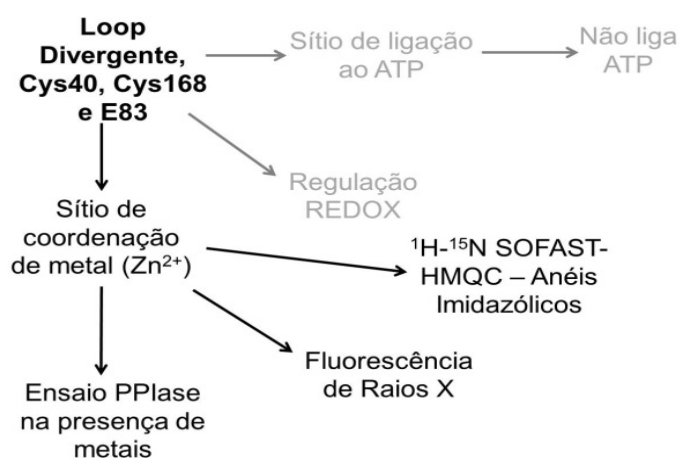


Figura 43: Esquema dos experimentos realizados para elucidar se CsCyp possui um sítio de coordenação de metal.

Com a finalidade de verificar se CsCyp seria regulada por íons de metais, os ensaio de atividade enzimática PPlase foram realizados na presença de cobre, zinco e manganês. Com a exceção do CuSO_4 (Figura 44 e Tabela 7), que inibiu a atividade de CsCyp e que é conhecido por induzir a formação de pontes dissulfeto em ciclofilinas (Motohashi et al., 2001; Gourlay et al., 2007), nenhum outro metal testado, incluindo Zn^{2+} e Mn^{2+} afetou a atividade PPlase de CsCyp (Figura 44 e Tabela 7).

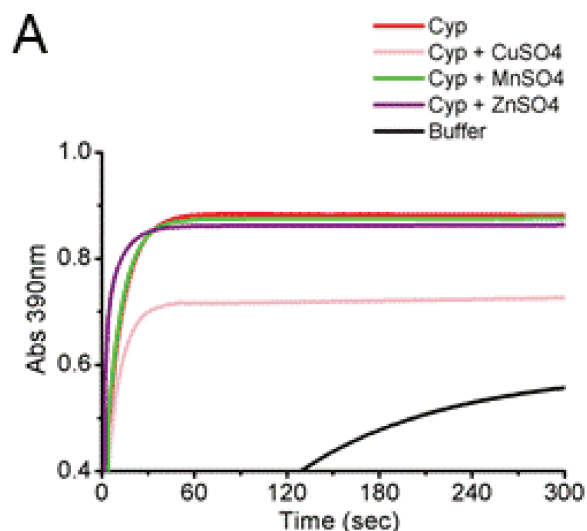


Figura 44: (A) Gráfico da atividade enzimática de PPIase de CsCyp, na ausência (vermelho) ou presença de CuSO₄ (rosa), ZnSO₄ (roxo) ou MnSO₄ (verde), mostrando que CuSO₄ inibe a atividade de CsCyp. Tampão da reação mostrado em preto.

Tabela 7: Valores de k_{cat}/K_m calculados para o ensaio PPIase na presença de metais

	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	%
CsCyp	5.68	100
Cyp + CuSO ₄	4.34	76.3
Cyp + MnSO ₄	5.49	96.6
Cyp + ZnSO ₄	5.63	99

A seguir, realizou-se fluorescência de raio X, a procura de metais que poderiam estar ligados a CsCyp. Os elementos detectados nas amostras foram cálcio, ferro, cobalto, níquel, cobre e zinco (Figura 45). Exceto o zinco e o níquel, que foram encontrados em maior e menor nível, respectivamente, no mutante Cyp C40S/C168S, nenhum pico majoritário que poderia indicar um ligante metálico específico foi encontrado na CsCyp quando comparado com os mutantes Cyp C40S, Cyp C168S, Cyp C40S/C168S ou na amostra controle, contendo BSA (Figura 45).

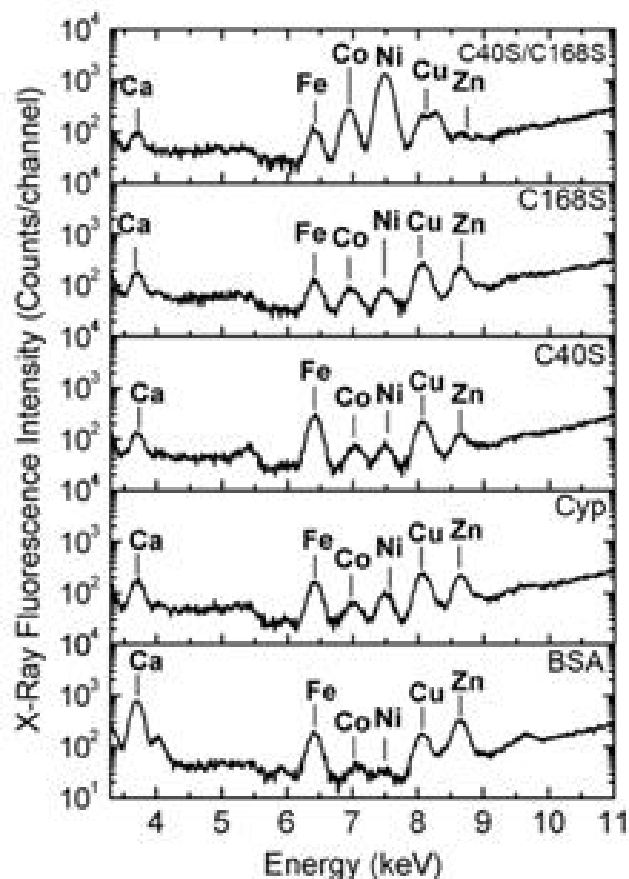


Figura 45: Fluorescência de Raio X de CsCyp purificada mostra a presença de vários elementos nas amostras. Nenhum pico majoritário foi observado na proteína selvagem em comparação com as proteínas mutantes, indicando que CsCyp não se liga a nenhum metal específico. BSA foi utilizado como controle.

Ainda tentando verificar se CsCyp ligaria metal, ensaios de ^1H - ^{15}N -SOFAS-T-HMQC foram realizados, com enfoque no imidazol da cadeia lateral dos resíduos de His com as amostras CsCyp + DTT + EDTA, CsCyp + ZnCl_2 e CsCyp + ZnCl_2 + EDTA.

A Figura 46A mostra os espectros sobrepostos e os cinco anéis imidazólicos das histidinas de CsCyp podem ser observados. O pequeno deslocamento químico observado entre as amostras é, provavelmente, em decorrência de uma diferença de pH entre as amostras ($\Delta\text{pH} \sim 0,2$). Por outro lado, os espectros se sobrepõem muito bem, sem diferenças significantes no deslocamento químico entre as amostras, indicando que Zn^{2+} não se liga aos anéis imidazol das histidinas de CsCyp. É interessante notar que um anel de histidina se encontra em um ambiente estrutural significativamente diferente dos outros, como mostrado pelo deslocamento químico no ^{15}N , ressonando a 183 ppm e 225 ppm, respectivamente. Provavelmente este anel de histidina está protonado no átomo $\text{N}^{\epsilon 2}$ do nitrogênio e coordenado com algum elemento não identificado (exceto Zn^{2+}) no átomo $\text{N}^{\delta 1}$ do nitrogênio, que não é observado no mapa de

densidade eletrônica da difração por Raios X. Nenhum dos anéis imidazólicos foram inequivocadamente sequencialmente assinalados.

A Figura 46B mostra os espectros de CsCyp e Cyp C40S/C168S sobrepostos e os cinco anéis imidazólicos das histidinas podem ser observados em ambas as amostras. Não há diferenças estruturais significativas envolvendo os anéis imidazólicos das histidinas devido a troca das cisteínas 40 e 168 por serina. Dois anéis de histidina sofreram um pequeno efeito devido às mutações, possivelmente por estarem localizados próximos aos resíduos de cisteína na estrutura. Removendo as cisteínas que formariam a tríade de coordenação de metal, este não poderia mais se ligar ao sítio de ligação de metal. Devido à falta de mudanças significativas da região dos anéis das histidinas nos dois espectros, fornecemos evidência adicional de que nenhum anel imidazólico de histidina está diretamente envolvido na ligação de metal em CsCyp, e portanto, His54 não compõe um sítio de ligação a metal, juntamente com Cys40 e Cys168, como sugerido por Dornan et al. (1999).

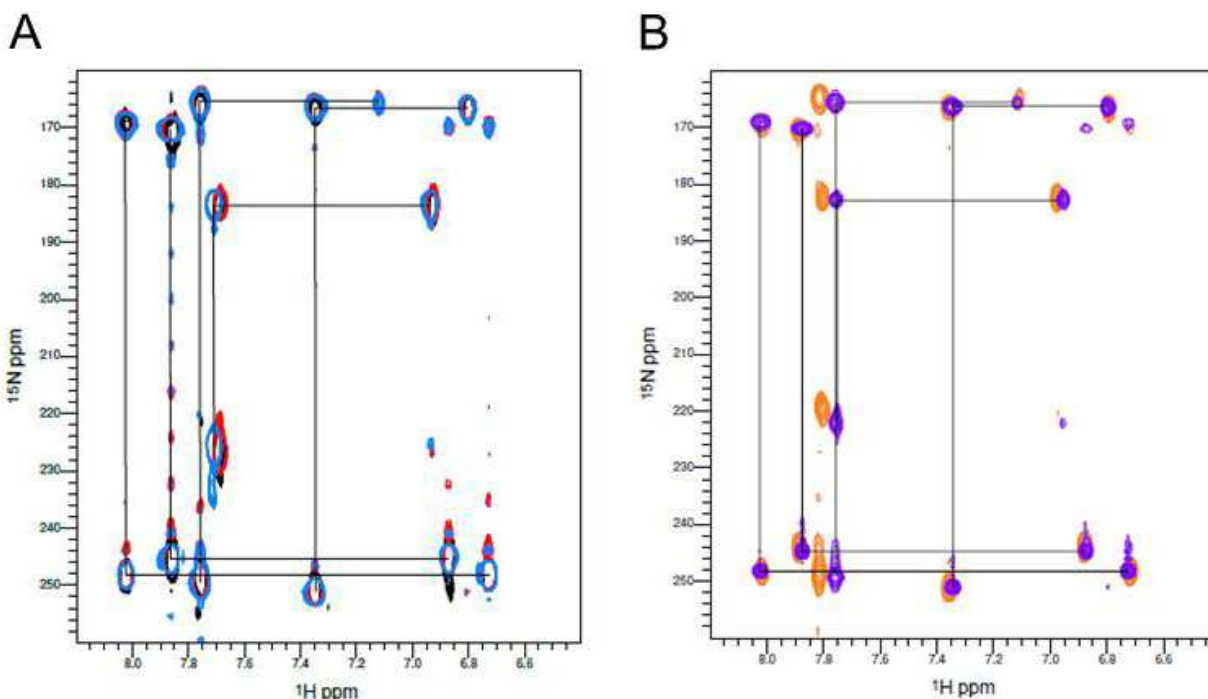


Figura 46: (A) Espectro $^2J_{NH}$ – CsCyp + DTT + EDTA (azul claro), CsCyp + Zn^{2+} (preto) e CsCyp + Zn^{2+} , seguido da adição de EDTA (vermelho). (B) Espectro $^2J_{NH}$ – CsCyp (roxo) e Cyp C40S/C168S (laranja). As linhas pretas correlacionam as ressonâncias dos átomos em um mesmo anel imidazólico. O padrão de correlação indica em qual estado tautomérico as cadeias laterais adotam (Pelton et al., 1993). O deslocamento químico secundário observado entre as duas amostras é um reflexo da diferença no ambiente estrutural e não estão relacionadas com o pH.

CsCyp possui uma ponte dissulfeto responsável por regular sua atividade

A partir dos dados obtidos com a estrutura e de dados já publicados, foram formuladas hipóteses da função do loop divergente e dos resíduos conservados. A terceira hipótese é de que os resíduos de cisteína 40 e 168, em condições oxidativas formariam uma ponte dissulfeto, levando a inatividade da proteína. A proteína reduzida estaria, portanto, ativa. Este dado é sustentado pelo fato de os resíduos estarem próximos na estrutura reduzida e por CsCyp interagir com CsTdx, que possui um domínio tioredoxina (Domingues et al., 2010), proteína conhecida por reduzir pontes dissulfeto de outras proteínas. A Figura 47 ilustra os experimentos realizados para elucidar se CsCyp sofre regulação REDOX.

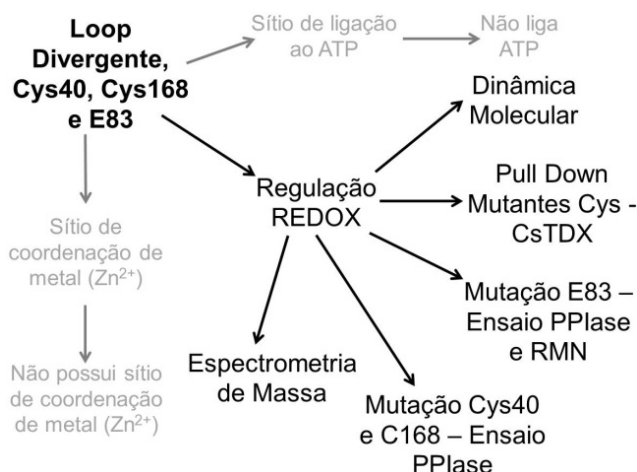


Figura 47: Ilustração dos experimentos realizados para elucidar se CsCyp sofre regulação REDOX.

Foram realizados ensaios de espectrometria de massa na tentativa de encontrar uma ponte dissulfeto entre as cisteínas. Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se o espectrômetro MALDI-TOF 'Ultraflex extreme', Bruker da Escola de Ciências do Câncer, da Universidade de Birmingham, Inglaterra, em colaboração com o Dr. Douglas Ward.

Inicialmente, foi realizada uma predição de clivagem de CsCyp com tripsina utilizando a ferramenta Peptide_Mass (expasy.org) (Tabela 8). Como se pode observar, o fragmento esperado que contém o resíduo da C40 possui massa de 721,36 Da e o fragmento contendo o resíduo C168, 1444,74Da. Caso haja formação de ponte dissulfeto entre esses resíduos, o esperado é um fragmento de ~2163,1Da.

Tabela 8: Predição de Fragmentos gerados da digestão de CsCyp com Tripsina

Massa (Da)	Posição	Sequencia dos peptídeos
2663,2704	99 – 125	HTGPGILSMANAGPGTNGSQFFVCTAK
2650,1912	63 – 89	VIPGFMCCQGGDFTAGNGTGGESIYGSK
1642,8621	133 – 147	HVVFGQVVEGMDVVK
1481,7205	6 – 19	VFFDMTVGGQPAGR
1444,7464	159 – 172	TNKPVVIADCGQLS
1390,7399	20 – 31	IVMELFADVTPR
969,4976	90 – 97	FADENFVK
929,5203	49 – 56	SGKPLHYK
867,4141	-03 – 05	GSHMPNPK
848,4148	126 – 132	TEWLDGK
737,3577	32 – 37	TAENFR
721,3549	38 – 44	ALCTGEK
690,3318	57 – 62	GSSFHR
649,3264	152 – 158	VGSSSGR

Nos espectros obtidos a partir da clivagem da CsCyp selvagem, foram localizados os fragmentos de 721,36 Da (Figura 48A) e o de 1444,74 Da (Figura 48B). Surpreendentemente, detectou-se também o fragmento de 2163,1 Da (Figura 48C). Infelizmente, devido ao tempo e limitações encontradas, não foi possível realizar a validação da ponte dissulfeto.

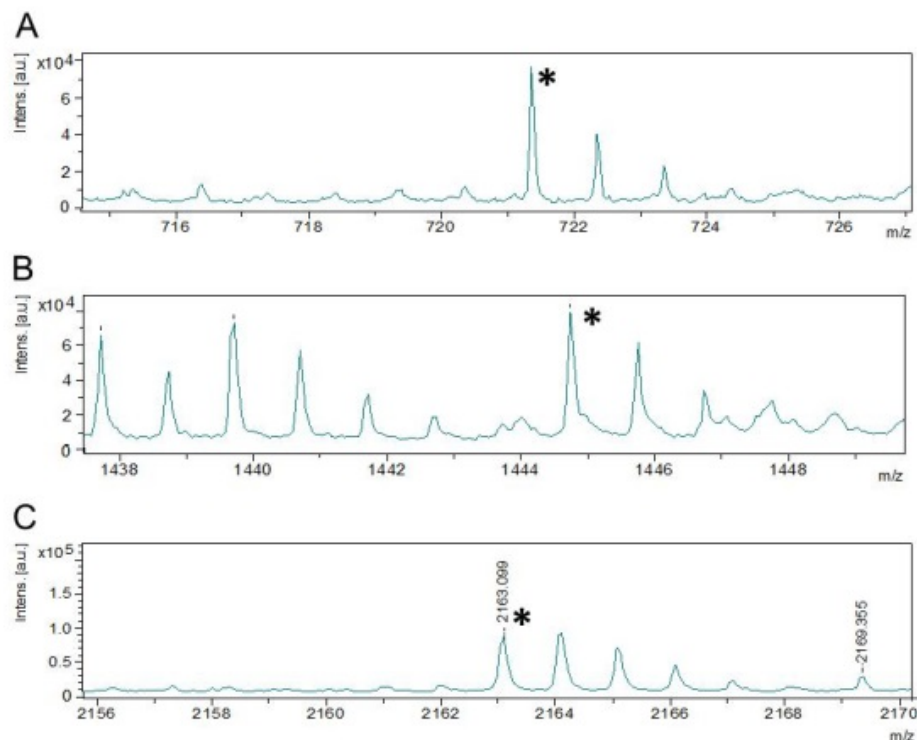


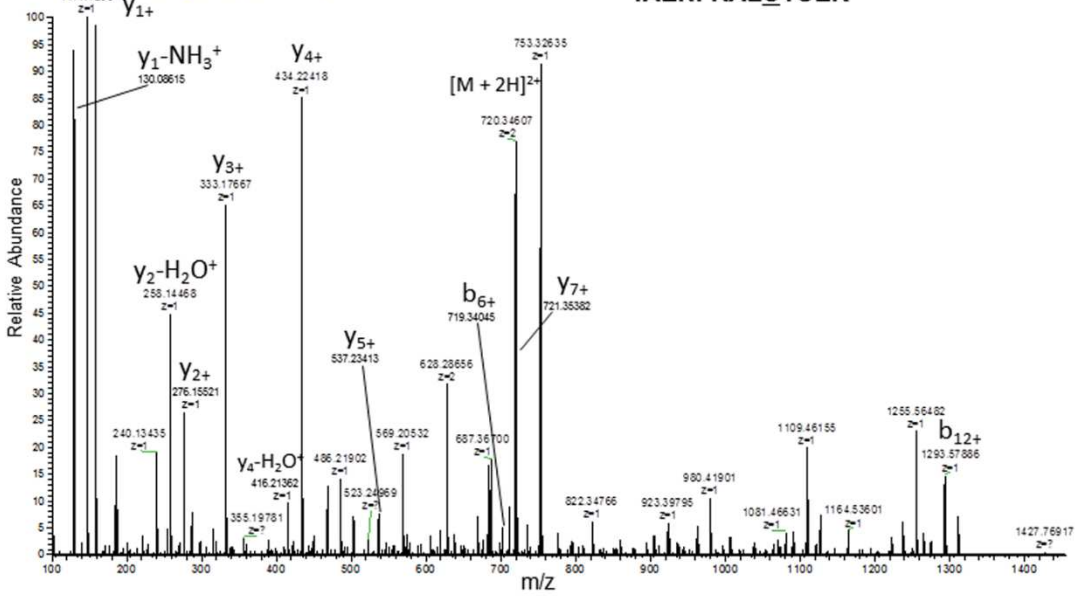
Figura 48: Espectros provenientes da espectrometria de massa com a amostra CsCyp selvagem. (A) Espectro mostrando o pico de 721,36 Da (marcado com o asterisco), correspondente ao fragmento que contém o resíduo C40. (B) Espectro mostrando o pico de 1444,74 Da (marcado com o asterisco), correspondente ao fragmento que contém o resíduo C168. (C) Espectro mostrando o pico de 2163,1 Da, correspondente à soma dos dois fragmentos contendo os resíduos C40 e C168, indicando a formação da ponte dissulfeto entre estes dois resíduos.

No retorno ao Brasil, ensaios de espectrometria de massa foram realizados no LNBio, em espectrômetro de massas ETD enabled LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Após a corrida, foi realizada uma análise de peptídeos e de Cross-link e foram identificados os peptídeos na forma reduzida, separadamente (Figura 49A e B) e a ponte entre os resíduos C40 e C168 (Figura 49C). A validação foi feita manualmente.

A

31aq Bruva cyp sem red ref #1204 RT: 9.92 AV: 1 NL: 6.51E5
T: FTMS + p NS1d Full ms2 720.34@nod40.00 [100.00-1455.00]

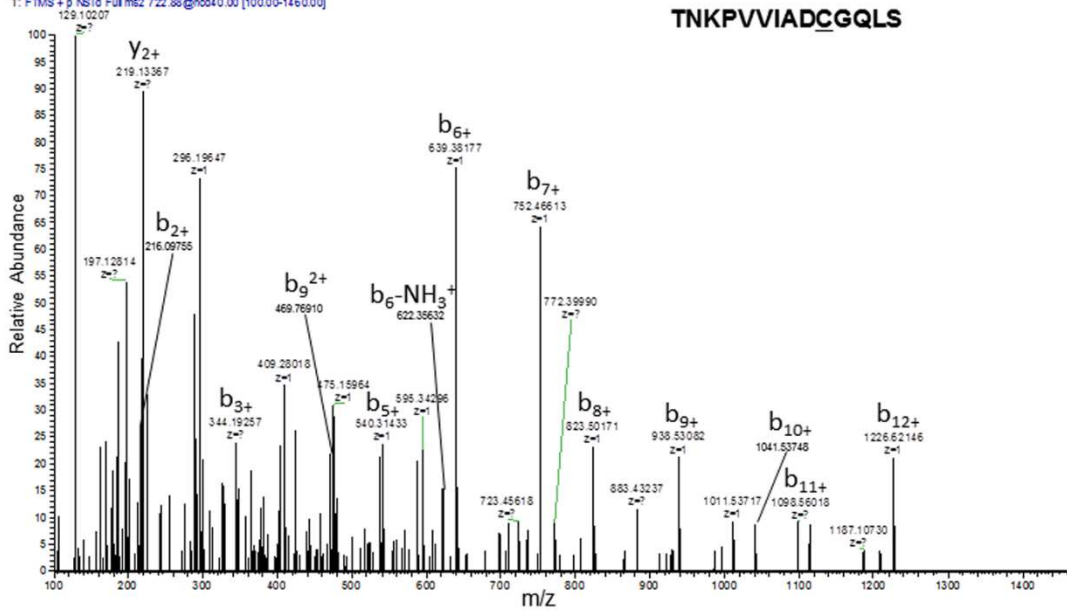
TAENFRALCTGEK



B

31aq Bruva cyp sem red ref #2680 RT: 18.38 AV: 1 NL: 4.95E5
T: FTMS + p NS1d Full ms2 722.88@nod40.00 [100.00-1460.00]

TNKPVVIADCGQLS



C

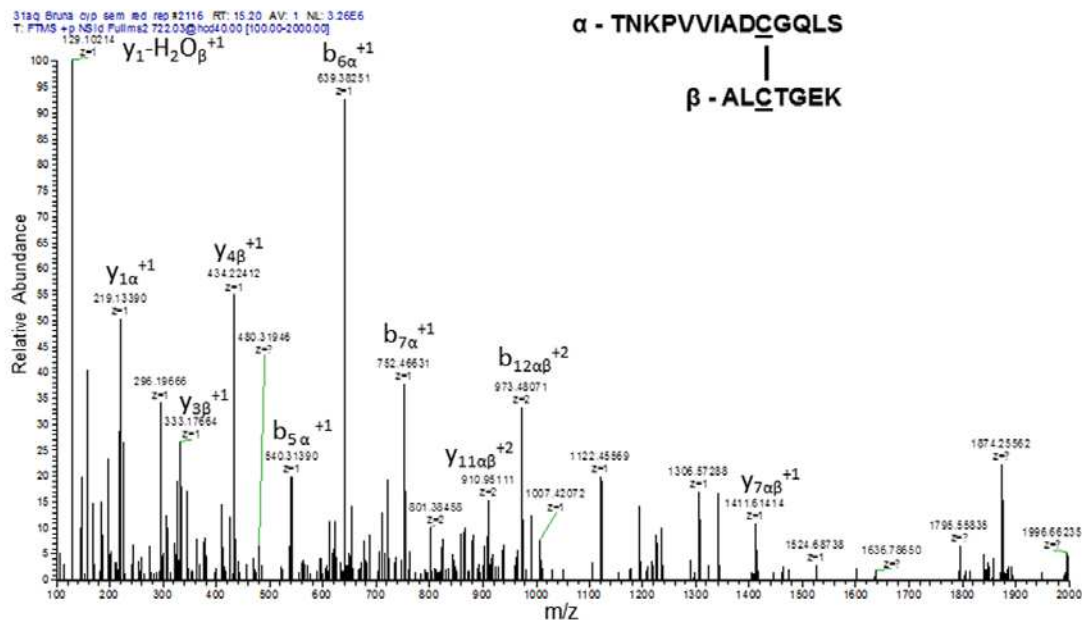


Figura 49: Espectro fragmentação iônica dos peptídeos (A,B) reduzidos e (C) cross-link. Os espectros MS/MS foram validados manualmente para as séries b e y para os peptídeos reduzidos e para as cadeias α e β.

Os dados da espectrometria de massas indicam que temos uma mistura de duas populações na amostra de CsCyp purificada – uma população na forma reduzida e outra na forma oxidada.

Mediante esses dados, procedeu-se com a mutação dos resíduos C40 e C168 para serina, gerando três mutantes: Cyp C40S, Cyp C168S e Cyp C40S/C168S. Foi realizado então o ensaio PPlase para ver se uma população homogênea levaria a mudanças na atividade PPlase encontrada anteriormente.

A Figura 50 e a Tabela 9 mostram o ensaio PPlase dos três mutantes em comparação com a amostra de CsCyp selvagem e os valores de k_{cat}/K_m calculados a partir dos dados do ensaio PPlase. Pode-se observar que nos três casos, a atividade dos mutantes é maior que a atividade da proteína selvagem, o que corrobora mais ainda a hipótese de termos uma mistura de proteína oxidada e reduzida na amostra selvagem purificada. É interessante também que o duplo mutante (Cyp C40S/C168S) possui atividade PPlase maior que todas as outras proteínas testadas, e proporcionalmente é o mais afetado na presença de CsA (Figura 50C e Tabela 9).

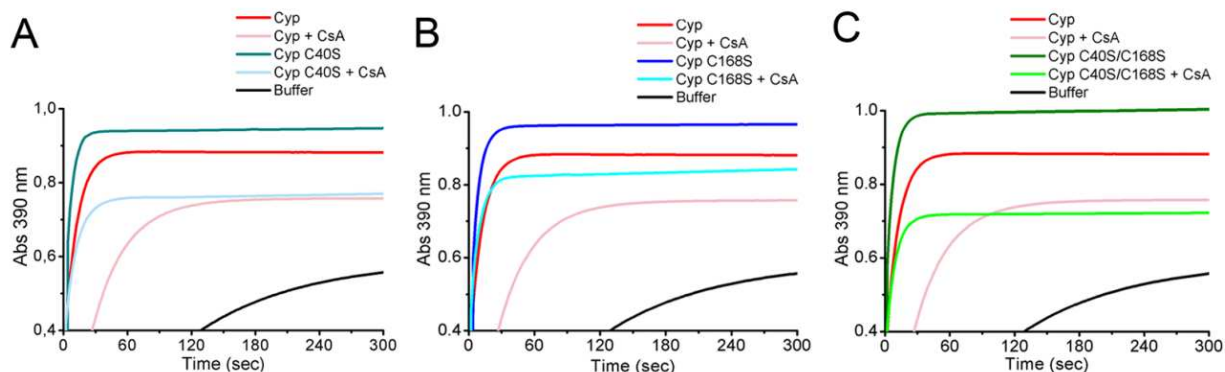


Figura 50: Gráficos obtidos no ensaio de atividade enzimática PPLase de CsCyp e mutantes Cys. (A) Cyp C40S. (B) Cyp C168S. (C) Cyp C40S/C168S. Todos os três gráficos apresentam atividade das proteínas na presença e ausência de seu inibidor CsA.

Tabela 9: Valores de k_{cat}/K_m do ensaio PPLase

	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	%
CsCyp	5.68	100
CsCyp + CsA	1.37	24.1
Cyp C40S	5.97	105
Cyp C40S + CsA	3.57	62.7
Cyp C168S	6.73	118
Cyp C168S + CsA	3.17	55.7
Cyp C40S/C168S	8.13	142.9
Cyp C40S/C168S + CsA	3.97	69.7

Mostrado então que CsCyp apresenta formação de pontes dissulfeto e que os mutantes tem atividade PPLase maior, foi realizado um ensaio de GST Pull-down com CsTdx para identificar se CsTdx interage com CsCyp através dos resíduos C40 e C168, como postulado. A Figura 51 mostra que CsTdx interage com CsCyp, mas mais fracamente com o mutante Cyp C40S e que não há interação com os mutantes C168S e com o duplo mutante, indicando que CsTdx interage sim com CsCyp através dos resíduos C40 e C168, provavelmente sendo responsável por regular a atividade de CsCyp, através da quebra da ponte dissulfeto e redução das cisteínas, ativando CsCyp.

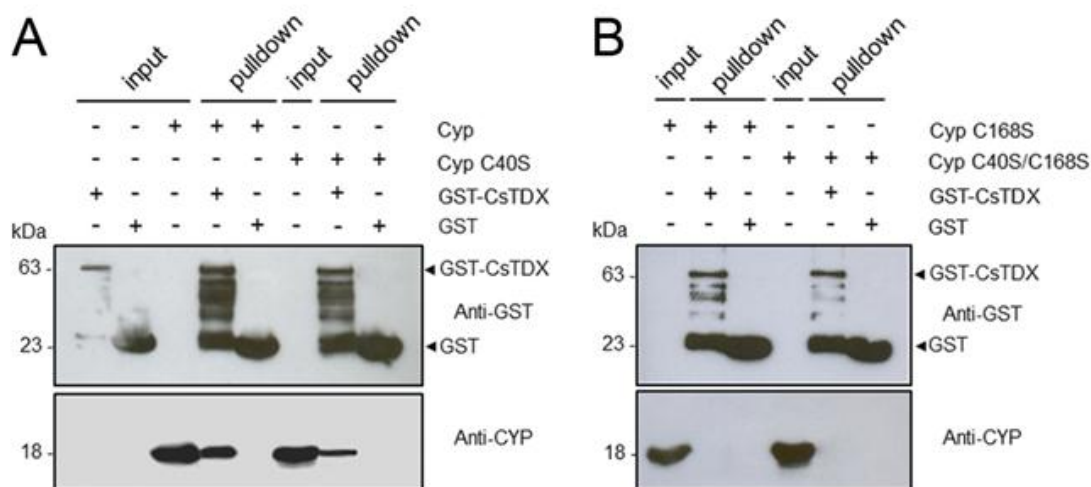


Figura 51: Western blot, com os anticorpos Anti-CYP e Anti-GST, das interações de CsCyp purificada e seus mutantes com CsTdx. (A) CsTdx + CsCyp (canaleta 4) e CsTdx + Cyp C40S (canaleta 7). As proteínas purificadas CsCyp e Cyp C40S estão indicadas nas canaletas 3 e 6, respectivamente. Os controles GST + CsCyp, GST + Cyp C40S estão indicados nas canaletas 5 e 8, respectivamente. (B) CsTdx + Cyp C168S (canaleta 2) e CsTdx + Cyp C40S/C168S (canaleta 5). As proteínas purificadas Cyp C168S e Cyp C40S/C168S estão indicadas nas canaletas 1 e 4, respectivamente. Os controles GST + Cyp C168S, GST + Cyp C40S/C168S estão indicados nas canaletas 3 e 6, respectivamente.

A partir dos dados da formação da ponte dissulfeto, passamos a olhar para o loop divergente para tentar elucidar se possui algum papel na regulação de CsCyp. Como se sabe que o E83 é altamente conservado em ciclofilinas com o loop divergente e atua estabilizando o mesmo, foi postulado que a formação da ponte dissulfeto alteraria a interação do E83 com o loop e isto causaria o fechamento do sítio ativo. Foi realizada então a mutação do resíduo E83 para alanina (E83A), serina (E83S) ou glutamina (E83Q) – as duas primeiras mutações quebrariam a interação com o loop e fechariam o sítio ativo da proteína. A mutação para glutamina mimetizaria a interação do loop com o E83, podendo ainda a proteína ter atividade PPlase.

A Figura 52 mostra os resultados do ensaio PPlase, no qual pode-se ver que o mutante E83A (Figura 52A e Tabela 10) não possui atividade PPlase e o mutante E83S (Figura 52B e Tabela 10) possui atividade PPlase bem reduzida, quase igual a CsCyp inibida com CsA, como esperado e ambos os mutantes não são afetados pela CsA, indicando que esta não consegue se ligar ao sítio ativo dos mutantes. O mutante E83Q (Figura 52C e Tabela 10) apresenta uma leve queda na atividade PPlase, em comparação com a proteína selvagem e é levemente afetado por CsA, indicando que a mutação mimetiza a situação que ocorre na proteína selvagem.

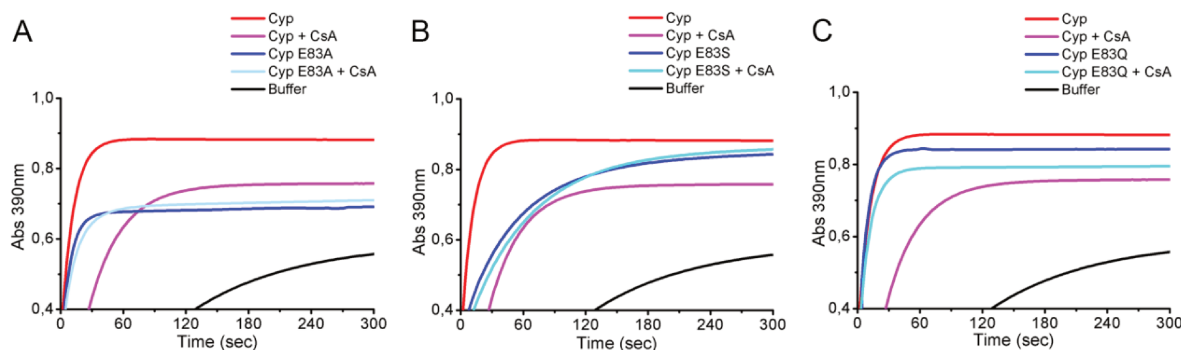
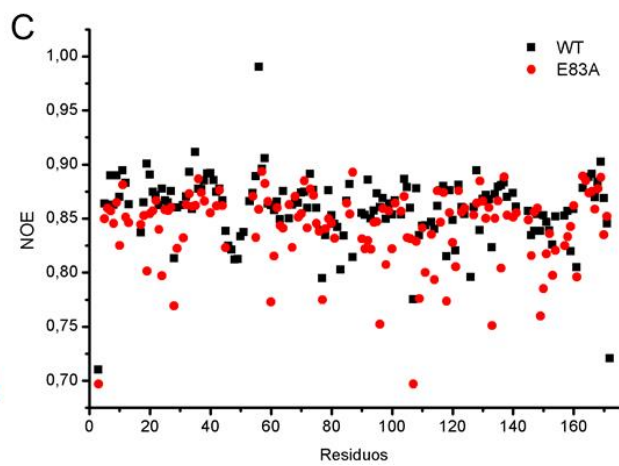
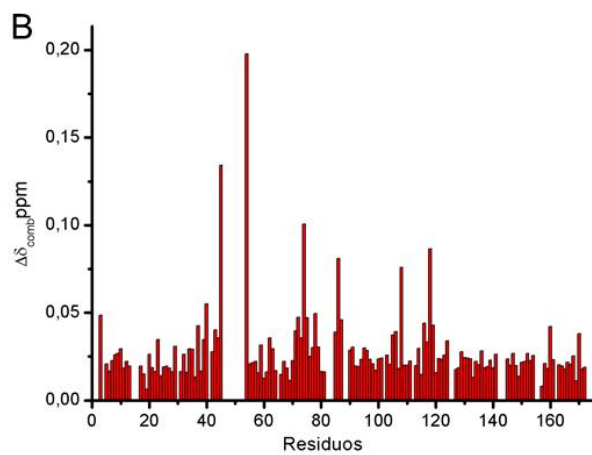
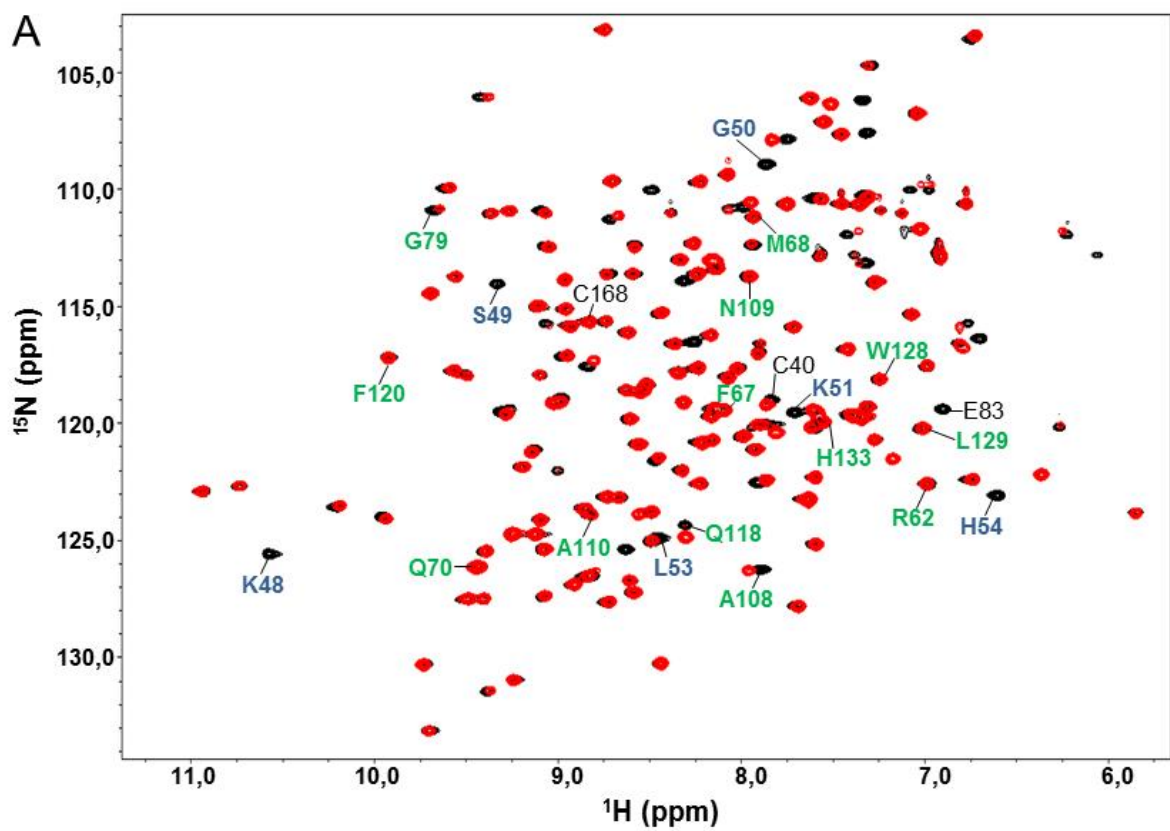


Figura 52: Gráficos obtidos no ensaio de atividade enzimática PPLase de CsCyp e mutantes. (A) Cyp E83A. (B) Cyp E83S. (C) Cyp E83Q. Todos os três gráficos apresentam atividade das proteínas na presença e ausência de seu inibidor CsA.

Tabela 10: Valores de k_{cat}/K_m do ensaio PPLase

	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	%
CsCyp	5.68	100
CsCyp + CsA	1.37	24.1
Cyp E83A	2.95	51.8
Cyp E83A + CsA	2.61	45.9
Cyp E83S	3.39	59.5
Cyp E83S + CsA	3.05	53.7
Cyp E83Q	5.06	89
Cyp E83Q + CsA	4.55	79.9

Com esses dados, e visando estabelecer quais mudanças estruturais a mutação E83A causou, realizamos ensaios de RMN (1H - ^{15}N HSQC e 1H - ^{15}N Heteronuclear NOE) para verificar mudanças no deslocamento químico dos resíduos do sítio ativo e do loop divergente (Figura 53). A sobreposição dos espectros mostra que, no mutante, os resíduos do loop divergente apresentaram mudanças no seu deslocamento químico levando até ao desaparecimento de alguns sinais, possivelmente por trocas dos núcleos HN ("Exchange contribution") em uma escala de tempo diferente, quando comparado ao loop da proteína selvagem. Também é possível observar que alguns resíduos do sítio ativo sofreram modificações no deslocamento químico, em especial os resíduos G79, A108, N109 e Q118, além da C40, indicando que a quebra da interação entre o loop divergente e o resíduo E83 levam a modificações no sítio ativo da proteína, provavelmente causando o fechamento do sítio ativo e, portanto a perda de atividade verificada no ensaio PPLase com esses mutantes. Essas modificações na proteína selvagem seriam, provavelmente, vistas quando a proteína é oxidada, ocorrendo a formação da ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína conservados.



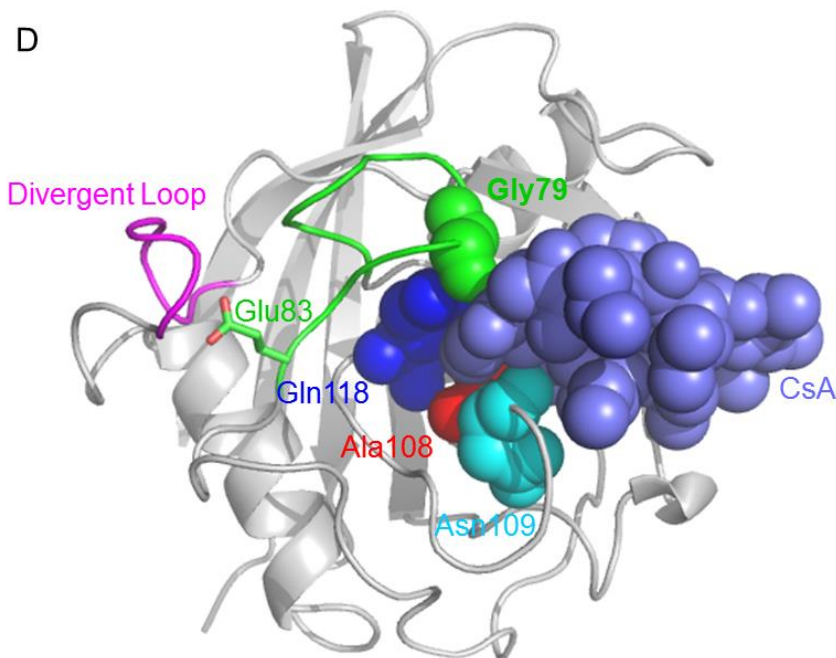


Figura 53: (A) Espectro ^1H - ^{15}N -HSQC da CsCyp (preto) sobreposto com o espectro ^1H - ^{15}N -HSQC do mutante Cyp E83A (vermelho). Os resíduos marcados correspondem a resíduos do sítio ativo, loop divergente e cisteínas e glutamato conservados. (B) Gráfico mostrando a diferença do deslocamento químico entre o mutante E83A e a proteína selvagem. A ausência de barra em alguns aminoácidos indica que estes aminoácidos não foram identificados no HSQC do mutante E83A, provavelmente por estarem além da escala de detecção do experimento. (C) Gráfico do ensaio de relaxamento ^1H - ^{15}N -NOE Heteronuclear, comparando CsCyp ao mutante E83A, mostrando que o mutante apresenta regiões mais flexíveis quando comparado com o mutante. (D) Estrutura tridimensional de CsCyp em complexo com CsA (esferas azul claras) evidenciando os resíduos de CsCyp (G79, A108, N109 e Q118 – esferas verdes) que apresentaram diferenças no seu deslocamento químico no mutante E83A, comparado com a proteína selvagem. O loop divergente (rosa) e o E83 (verde) estão destacados.

A hipótese levantada então foi que a quebra da interação entre o loop divergente e o resíduo 83 levaria a um colapso da fenda do sítio ativo, impedindo a interação de CsCyp com CsA, como observado no ensaio de PPIase.

Para verificar se a formação da ponte dissulfeto levaria ao fechamento do sítio ativo, como postulado, foram realizados ensaios de simulação. Os experimentos mostraram que o processo envolvido na formação da ponte dissulfeto parece ser um mecanismo redox conservado denominado 2-Cys, observado no ciclo catalítico de peroxiredoxinas (Hall et al., 2011). Neste grupo de enzimas, a cisteína localizada na hélice (equivalente a C40 em CsCyp) é denominada de cisteína peroxidática. Quando esta cisteína se encontra no estado reduzido, a hélice adota a conformação totalmente enovelada (Fully Folded - FF) (Figura 54A), enquanto, em condições oxidativas (ponte S-S), adota a conformação localmente desenovelada (Locally Unfolded - LU) (Figura 54B), que é necessária para a formação da ponte dissulfeto

entre a cisteína peroxidática e a outra cisteína, denominada cisteína resolvida (C168 de CsCyp). Portanto, análogo a peroxiredoxinas, a transição FF $\rightarrow$ LU em CsCyp, mediada ou estabilizada pela formação da ponte dissulfeto entre C40 e C168 causaria mudanças significantes na conformação do loop divergente, como previsto pelo nosso modelo (Figura 54C). De acordo com este modelo, a transição dos estados FF para LU levaria a uma quebra da interação entre o resíduo E83 e o loop divergente, levando o loop ao qual o resíduo E83 pertence (segmento 73-DFTAGNGTGGE-83), a causar um estreitamento do sítio ativo (Figura 54D e E). Sugerimos então, que o loop a qual o E83 pertence, funcionaria como um loop catalítico, rico em resíduos de glicina e que a remoção do ponto de ancoramento com o loop divergente, provocaria um deslocamento, alterando o canal do substrato (Figura 54D, E e F). O fato de que o mutante E83A não se liga a CsA e mostra perturbação no deslocamento químico do resíduo G79 e em três resíduos catalíticos vizinhos ao loop catalítico suporta o nosso modelo. Portanto, o modelo não apenas explica porque os mutantes E83A e E83S tem atividade PPlase reduzida e não são inibidos por CsA, mas também oferece uma explicação para o controle redox da atividade de CsCyp.

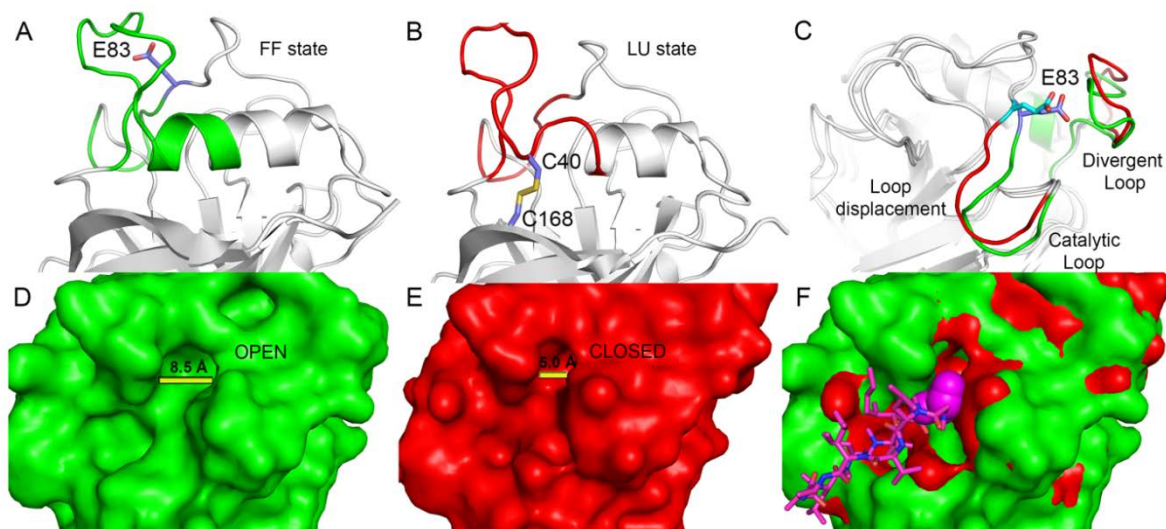


Figura 54: Representação esquemática do mecanismo 2-Cys envolvido na regulação da atividade de ciclofilinas divergentes. (A) CsCyp no estado reduzido, com a hélice que contém o resíduo C40 no estado Totalmente Enovelado (FF). (B) CsCyp no estado oxidado, com a mesma hélice no estado Desenovelado Localmente (LU), que é requerido para a formação da ponte dissulfeto. (C) Rearranjo estrutural induzido no loop divergente devido à formação da ponte dissulfeto, que causa a quebra da interação do loop com o E83, resultando em uma perturbação no loop catalítico, inativando a enzima. Área de superfície molecular indicando a fenda do sítio ativo nos estados (D) reduzido e (E) oxidado. (F) Sobreposição das áreas de superfície nos dois estados com a CsA ligada ao sítio ativo. As mudanças no canal de ligação do substrato agem como uma barreira física ao reconhecimento e ligação de CsA ou substrato.

Foram realizados também, em Birmingham, experimentos de relaxação ^1H - ^{15}N Heteronuclear NOE com a proteína selvagem (CsCyp) na presença ou ausência de agente redutor (DTT) ou oxidante (GSSG) e com seus mutantes (Cyp C40S, Cyp C40S/C168S). A Figura 55 mostra os resultados obtidos nestes experimentos. Pode-se observar que no geral, não há grandes diferenças na flexibilidade da proteína na presença de agentes oxidantes ou redutores quando comparada com os mutantes.

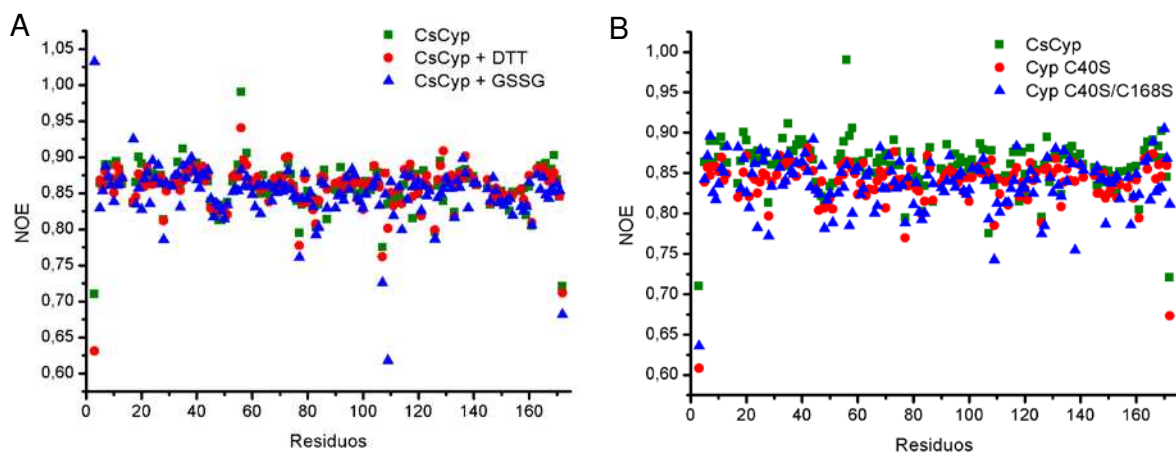


Figura 55: Gráficos dos experimentos de ^1H - ^{15}N Heteronuclear NOE. (A) CsCyp na presença de ausência de DTT e GSSG. (B) CsCyp e mutantes Cyp C40S e Cyp C40S/C168S.

CsCyp atua como regulador negativo de crescimento

Os dados de interação de CsCyp com PthA e CsCTD sugerem que a inibição de CsCyp por PthA promoveria o desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico. Com o objetivo de testar esta hipótese, folhas de laranja doce foram infiltradas com uma suspensão de Xac na presença ou ausência de CsA. Surpreendentemente, encontramos que na presença de CsA, os sintomas do cancro aumentaram em comparação com sua ausência, de maneira dose-dependente (Figura 56). Adicionalmente, as pústulas das folhas infiltradas com Xac + CsA se desenvolveram mais rapidamente (10 dias após a infiltração com a bactéria) do que as infiltradas apenas com Xac (20 a 30 dias após a infiltração). Como CsA sozinha não afetou o crescimento de Xac em meio de cultura, nossos dados mostram que CsA estimula o desenvolvimento do cancro cítrico, suportando a ideia de que PthA inibe a atividade CsCyp *in vivo*.

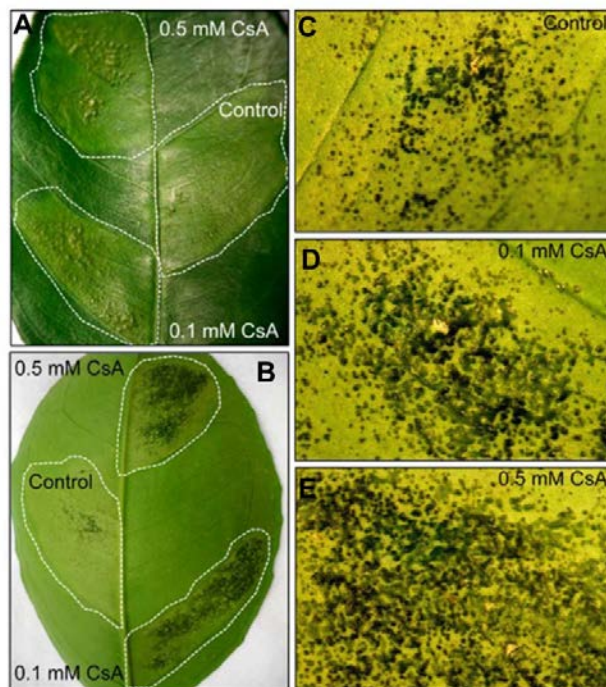


Figura 56: Efeito de CsA no desenvolvimento do cancro cítrico. Folhas de laranja doce infiltradas com Xac ($\sim 2 \times 10^4$ células) na presença ou ausência de CsA a 0,1 ou 0,5 mM. Lesões do cancro começaram a se desenvolver uma semana após a infiltração da bactéria e ficaram mais pronunciadas após 14 dias de inoculação, quando as fotos foram tiradas. (A) e (B) Folha infiltrada com suspensão de Xac + 0,1 ou 0,5 mM de CsA ou Xac sozinha (controle). CsA aumentou substancialmente a formação de pústulas e o desenvolvimento dos sintomas, quando comparado com o controle. (C), (D) e (E) O efeito de CsA no desenvolvimento do cancro é dose-dependente, devido a 0,5 mM CsA induzir maior formação de pústulas do que 0.1 mM ou na ausência de CsA. Extraído de Domingues et al., 2012.

Com o objetivo de investigar mais a fundo esta hipótese, resolvemos silenciar e superexpressar CsCyp em plantas de laranja doce. Diversas plantas transgênicas carregando a construção do silenciamento foram isoladas e analisadas por Western Blot (Figura 57A) para a presença de CsCyp. Como mostrado na Figura 57, três plantas independentes foram positivas no ensaio de GUS para a construção do silenciamento e mostram níveis significativamente mais baixos de CsCyp quando comparadas as plantas controles, não transformadas, indicando que o silenciamento foi efetivo. Mesmo crescendo normalmente e não apresentando nenhum fenótipo diferente das plantas controles, estas plantas apresentaram maior desenvolvimento dos sintomas do cancro quando desafiadas com Xac (Figura 57B e C). Estes resultados mostram que CsCyp está envolvida no desenvolvimento do cancro e funciona como regulador negativo ou atenuador de crescimento celular.

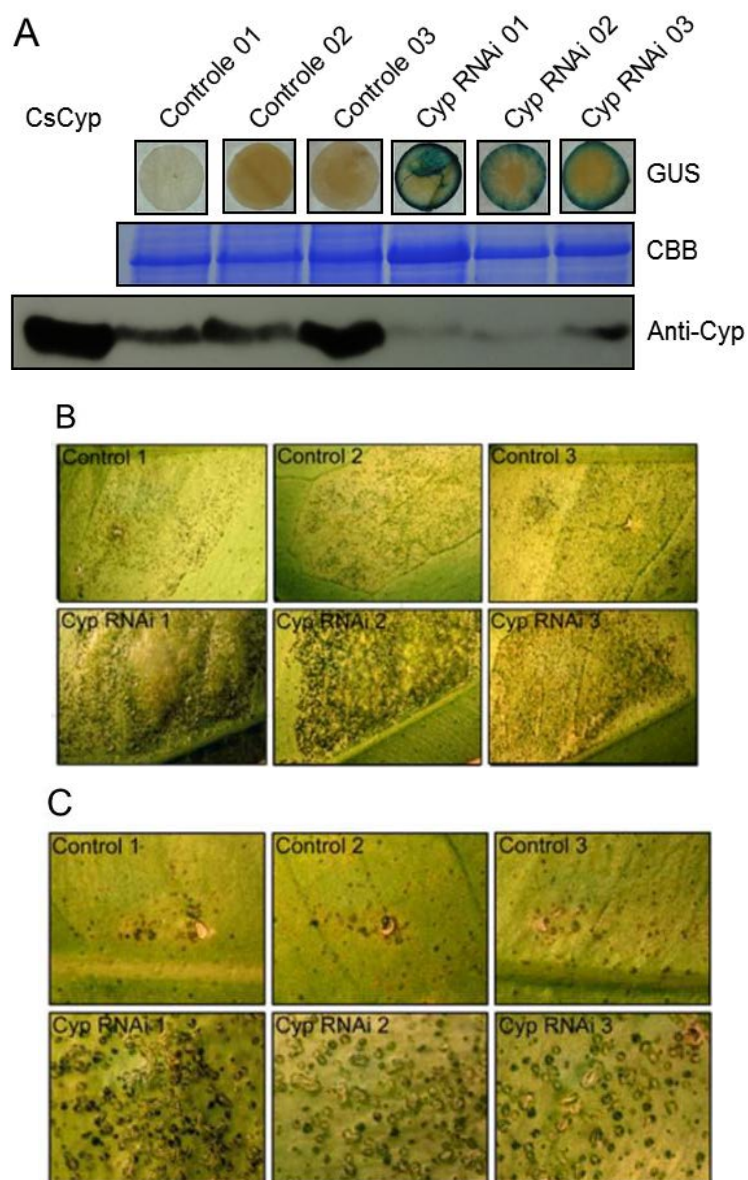


Figura 57: (A) Western Blot com anticorpo Anti-Cyp, do extrato total de proteínas das plantas transformadas. Os discos mostram as plantas identificadas como transformadas através do ensaio de GUS. Em azul, o gel corado com Comassie Blue, mostrando a quantidade de proteínas totais aplicadas no gel, baseando-se pela subunidade maior da rubisco. Como a quantidade de proteínas totais das plantas transformadas são maiores ou iguais as da planta controle, pode-se confirmar o silenciamento gênico. Por último tem-se o filme revelado, mostrando as quantidades de CsCyp produzidas pelas plantas. Controle positivo - proteína CsCyp recombinante. Controles 01 a 03 – plantas não transformadas. Plantas RNAi 01 a 03 – plantas positivas no ensaio de GUS. (B) Plantas infiltradas com 2×10^4 células do patógeno *Xac*. As plantas controle são plantas não transformadas e susceptíveis a doença. As plantas Cyp RNAi 01 a 03 são plantas identificadas como transformadas e com níveis reduzidos de Cyp. (C) Plantas infiltradas com menor densidade de células (10^3).

Ao contrário do silenciamento, as plantas transformadas com a construção da superexpressão apresentaram características fenotípicas diferentes (Figura 58A). Testes preliminares analisaram 5 plantas transformadas quanto ao nível de Cyp – três delas (plantas 02, 04 e 05) apresentaram níveis aumentados de Cyp e um desenvolvimento mais lento (Figura 58A e B) do que aquelas com níveis normais ou reduzidos de Cyp (Figura 58A e B). As plantas com níveis aumentados de CsCyp apresentaram uma redução no desenvolvimento dos sintomas do cancro quando infiltradas com Xac em comparação com a planta controle e com plantas transformadas mas com níveis normais ou reduzidos de CsCyp. Estes dados evidenciam, novamente, que CsCyp é um regulador negativo de crescimento. Dessa forma, PthAs tem papel importante na indução de hipertrofia e hiperplasia por inibir a atividade de CsCyp.

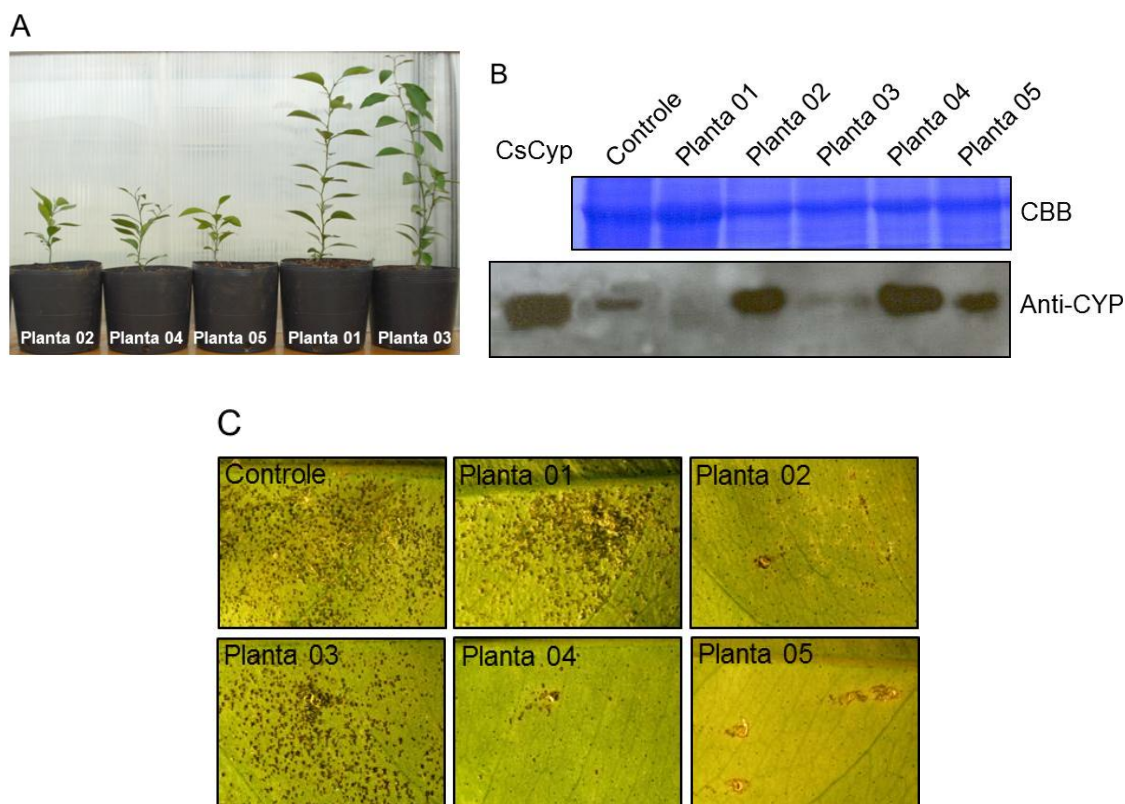


Figura 58: (A) Plantas transformadas com a construção para superexpressão de Cyp. (B) Western Blot com anticorpo Anti-Cyp, do extrato total de proteínas das plantas transformadas. Em azul, o gel corado com Comassie Blue, mostrando a quantidade de proteínas totais aplicadas no gel, baseando-se pela subunidade maior da rubisco. Como a quantidade de proteínas totais das plantas transformadas são menores ou iguais as da planta controle, pode-se confirmar a superexpressão gênica. Por último tem-se o filme revelado, mostrando as quantidades de Cyp produzidas pelas plantas. Controle positivo - proteína CsCyp recombinante. Controle – planta não transformada. Plantas 01 a 06 – plantas testadas para superexpressão. (C) Plantas infiltradas com 2×10^4 células do patógeno Xac. As plantas controle são plantas não transformadas e susceptíveis a doença. As plantas 02, 04 e 05 são plantas identificadas como transformadas e com níveis aumentados de Cyp.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O objetivo principal deste trabalho era caracterizar estrutural e funcionalmente a proteína CsCyp, que apresenta participação no desenvolvimento do cancro cítrico.

- ✓ CsCyp é uma ciclofilina clássica, apresentando atividade de PPlase e inibida por CsA;
- ✓ CsCyp pertence a subfamília chamada de ciclofilinas divergentes que apresentam um loop divergente, dois resíduos de cisteínas invariáveis e um glutamato conservado;
- ✓ As cisteínas conservadas formam uma ponte dissulfeto, responsável por regular a atividade PPlase de CsCyp;
- ✓ CsCyp interage com CsTdx através dos resíduos de cisteína conservados, visto que a mutação destes resíduos para serina eliminam a interação entre as duas proteínas;
- ✓ O loop divergente é estabilizado pela interação com o glutamato conservado;
- ✓ A formação de ponte dissulfeto causa uma alteração conformacional na proteína, desestabilizando a interação do glutamato com loop divergente, levando a um fechamento do sítio ativo e perda da atividade PPlase;
- ✓ A forma reduzida de CsCyp possui atividade PPlase, enquanto a forma oxidada, com ponte dissulfeto, se encontra inativa;
- ✓ CsCyp não apresenta sítio de ligação a metal, como anteriormente sugerido;
- ✓ CsCyp se liga ao CsCTD, com maior afinidade à repetição YSPSAP;
- ✓ PthA e CsA competem pela ligação ao sítio ativo de CsCyp, sendo que PthA inibe a atividade de CsCyp;
- ✓ Plantas de citros com níveis reduzidos de CsCyp apresentam aumento significativo das lesões do cancro quando infiltradas com Xac, enquanto plantas com níveis aumentados de CsCyp apresentam redução dos sintomas do cancro quando infiltradas com Xac, indicando que CsCyp tem participação no desenvolvimento dos sintomas;

De forma geral, nossos dados permitem concluir que CsCyp é uma ciclofilina divergente, regulada por um mecanismo REDOX e que CsTdx tem participação nessa regulação. CsCyp seria uma proteína acessória da maquinaria transcricional, sendo inibida por PthA para evitar o término precoce da transcrição e funcionando como regulador negativo da RNA Polimerase II, já descrito para Ess1 e Pin1 de levedura e humano, respectivamente, e portanto, como regulador negativo de crescimento.

APÊNDICE I – ESTUDO DA PROTEÍNA Tdx DE *Citrus sinensis*

1. INTRODUÇÃO

Tdx (Tetratricopeptide Domain-containing Thioredoxin)

Tdx (Tetratricopeptide domain-containing thioredoxin) são proteínas descritas somente em plantas (Vignols et al., 2003) e compostas por um domínio tioredoxina (TRX) no C-terminal e um domínio TPR (tetratricopeptide repeat) no N-terminal, tendo função de redutase dissulfeto e chaperona, respectivamente (Kim et al., 2010).

CsTdx é uma proteína de 37 kDa, que possui ~70% de identidade com Tdx de *A. thaliana* e *Vitis labrusca* (Figura 59). Estas duas proteínas também apresentam um domínio TRX similar ao de tioredoxina citosólicas e são responsáveis por mediar a regulação redox através da redução de grupos sulfidril (Webb et al., 2001), além de um domínio TPR (Lee et al., 2009).

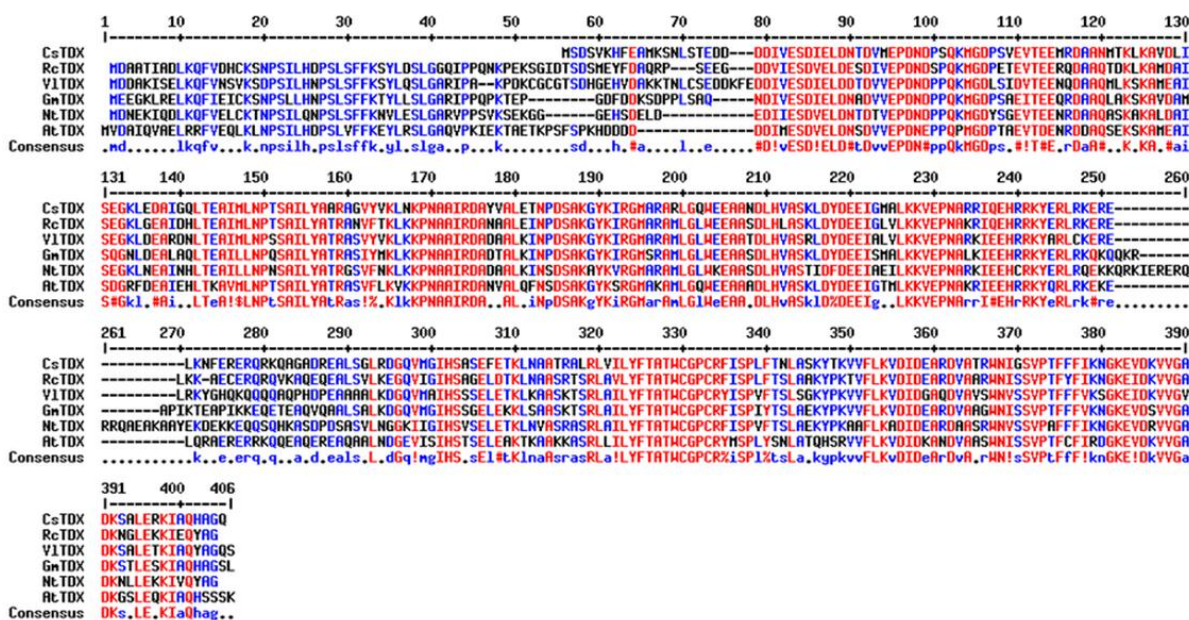


Figura 59: Alinhamento da sequência de aminoácidos de CsTdx com as proteínas Tdx de *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Glicina max*, *Vitis labrusca* e *Ricinus communis*, realizado com o programa MultiAlin (Corpet, 1988).

Tioredoxinas são proteínas pequenas responsáveis pela oxi-redução de cisteínas de proteínas, modificando a conformação destas proteínas em resposta a alterações do estado redox celular, protegendo a célula de danos oxidativos e mantendo o citoplasma no estado redox reduzido (Pan & Bardwell, 2006; Meyer et al., 2008). Possuem diversas funções na célula, entre elas de regulação de fatores de transcrição (como o NF- κ B), redução de proteínas, inibidor de apoptose e catalisador de enovelamento de proteínas (Powis & Montfort, 2001; Berndt et al., 2008). TRX possui um domínio catalítico (sítio ativo) que

catalisa a redução de pontes dissulfeto de suas proteínas alvo. Este sítio ativo é composto pela sequência conservada *Trp-Cys-X-X-Cys* (X normalmente sendo Gly, Pro ou Ala) (Watson et al., 2003; Pan & Bardwell, 2006; Berndt et al., 2008). O domínio TRX da CsTdx possui o domínio catalítico conservado (Figura 60) e compartilha ~65% de identidade com VITdx e AtTdx e AtTRX.

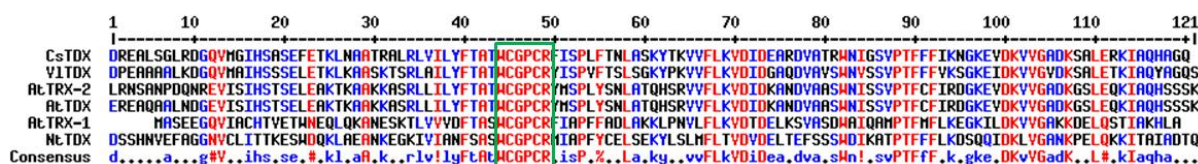


Figura 60: Alinhamento de sequência de aminoácido do domínio TRX de *C. sinensis* com TRX de plantas proximaamente relacionadas – *Vitis labrusca* Tdx, *A. thaliana* Tdx, TRX-1 e TRX-2 e *Nicotiana tabacum* Tdx. Em verde, o domínio catalítico de TRX altamente conservado.

O domínio TPR é composto por uma sequência de 34 aminoácidos presente em tandem de 3 a 16 motivos, está envolvido em diversas interações proteína-proteína e são importantes para a formação de complexos multiprotéicos, característicos de chaperonas (Das et al., 1998; Lee et al., 2009). O complexo Hsp70/90 interage domínios TPR responsáveis pela interação proteína-proteína, que atuam como co-chaperona e auxiliam no enovelamento de proteínas (Yang et al., 2005; Cliff et al., 2006). A proteína CsTdx possui 3 repetições do motivo TPR (Figura 61) (McDonough & Patterson, 2003). O domínio TPR de CsTdx possui ~70% identidade com domínios TPR de Tdx de plantas e ~56% de identidade com TPR de mamíferos.

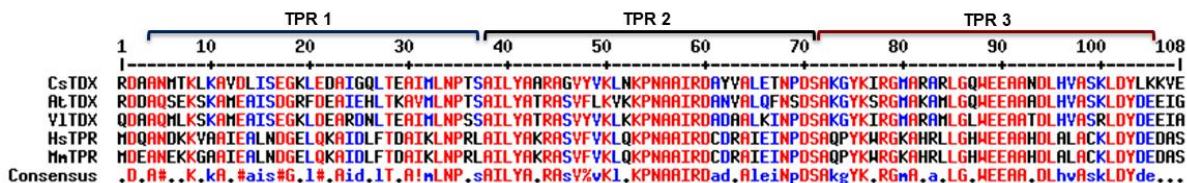


Figura 61: Alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio TPR de CsTdx com o domínio TPR de Tdx de *A. thaliana*, *Vitis labrusca* e com o domínio TPR de *Homo sapiens* e *Mus musculus*.

Considerando que CsTdx tem função de redutase dissulfeto, que CsTdx interage com CsCyp (Figura 62) e que CsCyp contém dois resíduos de cisteína (C40 e C168) que formam pontes dissulfeto, foi levantada a hipótese de que CsTdx teria o papel de reduzir as cisteínas 40 e 168 de CsCyp, quebrando a ponte dissulfeto e tornando a proteína ativa, através do sítio catalítico de redutase dissulfeto do domínio TRX.

Estes dados levantam a hipótese de que CsTdx seria, portanto, importante para regular a atividade de CsCyp, especialmente após um estresse oxidativo, auxiliando portanto no crescimento celular.

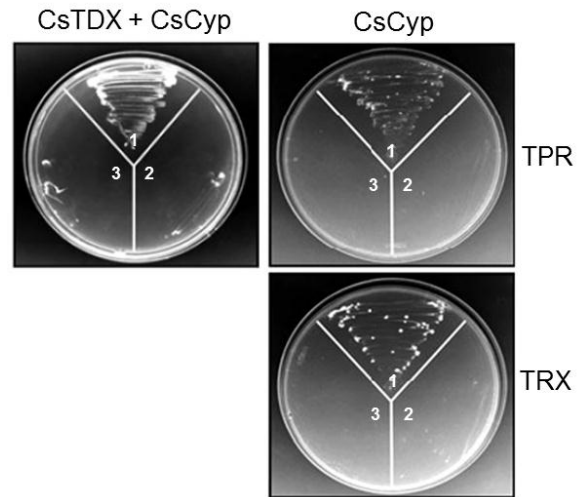


Figura 62: Interações positivas confirmadas com a isca CsCyp com as presas pOAD-CsTdx, pOAD-TPR e pOAD-TRX, em meio SC – Leu – His – Trp, – Ade e – Ade com 5 mM 3-AT. 1 – pOBD-isca + pOAD-presa (interação); 2 – pOBD-isca + pOAD-vazio e 3 – pOBD-vazio + pOAD-isca (controles). Extraído de Domingues et al., 2010.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo inicial deste projeto era resolver a estrutura da proteína CsTdx e sua participação no desenvolvimento do cancro cístico.

- Expressar e purificar a proteína CsTdx, os domínios TPR e TRX;
- Realizar ensaios espectroscópicos com a proteína CsTdx: Dicroísmo Circular (CD) e Dynamic Light Scattering (DLS);
- Resolver a estrutura de CsTdx.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli*

Várias das construções que foram utilizadas nesse trabalho já estavam disponíveis em nosso laboratório, entre elas, pET28a-CsTdx e pGEX4T-1-CsTdx.

3.1.1. CsTdx em pET28a e pGEX4T-1

O clone Tdx já se encontrava clonado nos vetores pET28a, em fusão com 6xHis, e pGEX4T-1 (GE Healthcare), o qual expressa o alvo em fusão com GST (Glutathione-S-Transferase) e transformados em *E. coli* para expressão, BL21 (DE3). As construções também foram transformadas nas cepas de *E. coli* para expressão a baixas temperaturas, Arctic Express (Agilent Technologies) e BL21 origami, cepa que não contem tioredoxinas. As construções foram expressas em 100 mL de meio LB Kana (50 µg/mL), para pET28a ou LB Amp (100 µg/mL), para pGEX4T-1 (possui resistência a ampicilina), nas temperaturas de 37, 30 e 25 e 12°C (esta última apenas para a cepa Arctic Express). As culturas foram crescidas até atingirem a fase logarítmica – OD_{600nm} entre 0,6 e 0,8 unidades de absorbância e a síntese de proteína recombinante foi induzida por 3 horas com a adição de 0,4 mM de IPTG. A exceção foi para a expressão em Arctic Express, na qual a cultura foi crescida por 3 horas a 30°C e então foi transferida para um shaker a 12°C e a síntese da proteína recombinante foi induzida por 24 horas com adição de 1 mM de IPTG.

A proteína recombinante foi então purificada – para a fusão com 6xHis, a lise das células foi realizada utilizando-se tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 20% Glicerol + lisozima (1 mg/mL) e sonicação (20 pulsos de 20s), a fim de aumentar a eficiência da lise. A suspensão foi centrifugada, após sonicação, a 4°C, 17.000 rpm por 50 minutos. A fração solúvel foi filtrada (0,45 µm) e a proteína purificada por afinidade, utilizando a resina TALON (Clontech). A seguir, a cauda 6xHis foi clivada com trombina (1 u trombina por 1 mg proteína), por 12 a 16 horas a 4°C. A proteína clivada foi então concentrada em Centricon a 1500 g, 10°C até volume final de 1.0 mL. A proteína concentrada foi submetida a diversos tipos de purificação: cromatografia por exclusão de peso molecular, em coluna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare), troca iônica nas colunas Mono S e Mono Q e cromatografia em coluna Hicap 26/10 desalting 5 mL.

As proteínas em fusão com GST foram purificadas utilizando PBS 1x (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) + Nonidet P40 1% + lisozima (1 mg/mL) e sonicação (20 pulsos de 20s) e resina GST imobilizada em PBS. A eluição foi realizada com PBS 1x com 50 mM Glutathione Reduzida. A indução, solubilidade e todos os passos de purificação foram avaliadas por gel de poliacrilamida (12%) SDS-PAGE e coloração com o corante Coomassie Blue.

3.1.2. CsTdx em pMT-BiP-V5-His

O clone Tdx foi subclonado para o vetor pMT-BiP-V5-His (Invitrogen), para expressão em células de inseto S2 (*Drosophila Schneider 2 cells* - Invitrogen), a partir do vetor pOAD, nos sítios de restrição

NcoI/NotI. Após digestão com essas enzimas, vetor e inserto foram extraídos do gel de agarose (1%), purificados com Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligados com T4 DNA ligase sob incubação no banho a 16°C por 16 horas. Esta ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico, plaqueadas em meio LB seletivo com 100 µg/mL Amp (pMT-BiP-V5-His possui resistência a Ampicilina) e incubada em estufa 37°C por 16 horas. Para selecionar clones transformantes, foi realizado um PCR de colônia com 10 clones isolados com os primers MT/BGH forward e reverse. Os clones transformantes foram então confirmados por sequenciamento de DNA. O clone foi então digerido no sítio *BglI* e purificado do gel e foi então feita uma reação com a enzima Klenow, para gerar extremidades abruptas, por 15 a 30 minutos a 37°C e a enzima foi inativada. O clone foi então religado por reação com a enzima T4 DNA ligase, transformados e os clones transformantes foram selecionados como já descrito acima. Em seguida, a cultura foi crescida em meio líquido LB Amp e o plasmídeo purificado por midiprep (kit Plasmid Maxi Kit - Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Após confirmação da clonagem, o plasmídeo foi usado para transfectar células S2 para expressão.

3.1.3. TPR em pET28a e pGEX4T-1

O DNA correspondente ao domínio TPR foi amplificado a partir de uma biblioteca de cDNA de citros e clonado no vetor pGEM utilizando os primers Tdx_F (*NdeI*: 5'-CATATGTCGCGACTCTGTAAAG-3') e TPR_R (*SalI*: 5'-GTCGACTATTCAACCTTCTTGAG-3'). O DNA foi subclonado no vetor pET28a, nos sítios de restrição *NdeI/SalI*. Após a digestão com essas enzimas, o vetor e inserto foram extraídos do gel de agarose (1%), purificados com Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligados com T4 DNA ligase sob incubação no banho a 16°C por 16 horas. A construção foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico, plaqueadas em meio LB seletivo com 50 µg/mL Kana e incubada em estufa 37°C por 16 horas. Para selecionar clones transformantes, foi realizado um PCR de colônia com 10 clones isolados com os primers T7/pETR forward e reverse. Os clones transformantes foram então confirmados por sequenciamento de DNA. Em seguida, a cultura foi crescida em meio líquido LB Kana e o plasmídeo foi purificado por miniprep (kit Plasmid Maxi Kit - Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante e então, transformado em células competentes de *E. coli* para expressão em BL21 (DE3), por choque térmico.

A construção em fusão com 6xHis foi expressa em meio LB Kana, na temperatura de 30° e purificada seguindo o protocolo descrito no item 3.1.1.

3.1.4. TRX em pET28a e pGEX4T-1

O cDNA do domínio TRX foi subclonado nos vetores pET28a e pGEX4T-1, a partir do clone Tdx em pGEX4T-1. O plasmídeo Tdx-pGEX4T-1 foi digerido com as enzimas *EcoRI/NotI*, liberando uma banda referente ao domínio TRX, que foi clonada nos vetores pGEX4T-1 e pET28a. Os passos seguintes foram os mesmos já descritos no item 3.1.3. A expressão foi realizada nas temperaturas de 37 e 30°C. A purificação da proteína recombinante seguiu o protocolo descrito no item 3.1.1.

3.2. Análises Espectroscópicas

3.2.1. Análises de Dicroísmo Circular (CD)

Os ensaios de CD, para verificar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas CsTdx e TPR foram realizados com diversas concentrações de proteína. Os espectros de CD foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro J-810 (JASCO), no comprimento de onda de 200 a 260 nm, com cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico.

3.2.2. Análise de DLS

Os ensaios de DLS realizados para verificar a homogeneidade e monodispersividade da amostra, recomendado para ensaios cristalográficos, foram realizados utilizando-se o aparelho Protein Solutions DynaPro, na temperatura de 20°C, com 100 medidas com 10 acumulações cada e 40 µM de proteína por amostra.

3.3. Transfecção em Célula S2

A transfecção foi realizada utilizando células de inseto S2 (Invitrogen) cultivadas em meio SF900II SFM ou Express V (Invitrogen), sem antibiótico, por pelo menos 10 dias, em garrafas de 75 cm². As células foram replicadas 24 horas antes da transfecção, na concentração de 1x10⁶ células em garrafa de 25 cm², em 5 mL de meio SF900II SFM ou Express V. Foram preparadas as soluções de transfecção A, com 2 µg do DNA de interesse + 0,1 µg de pCohygro (plasmídeo de seleção, resistente a higromicina), em 500 µL de meio e solução B, com 20 µL de Cellfectin Reagent (Invitrogen) em 500 µL de meio. Foram então seguidas as recomendações do protocolo de transfecção da Cellfectin Reagent. Após 48 horas da transfecção, as células foram centrifugadas e meio novo, contendo 600 µg/mL de higromicina B foi adicionado. A síntese da proteína recombinante foi então realizada utilizando sulfato de cobre, em diversas concentrações (100 µM a 1,5 mM) e acompanhada por 24 a 72 horas após a transfecção. As células foram coletadas após 72 horas de indução e então lisadas com protocolo recomendado pela Invitrogen.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Expressão e Purificação de CsTdx

A Figura 63 mostra a purificação de CsTdx em diversas condições testadas. Em todos os testes realizados, a proteína tem alto nível de degradação, dificultando sua purificação. Outros testes também foram realizados, mas em todos os casos não foi possível obter quantidades significativas de proteína pura para permitir ensaios cristalográficos. O fato de se ter alto nível de degradação pode ser devido a uma proteína de planta sendo expressa em bactéria, que não apresenta modificações pós-traducionais que podem ser essenciais para o enovelamento correto da proteína.

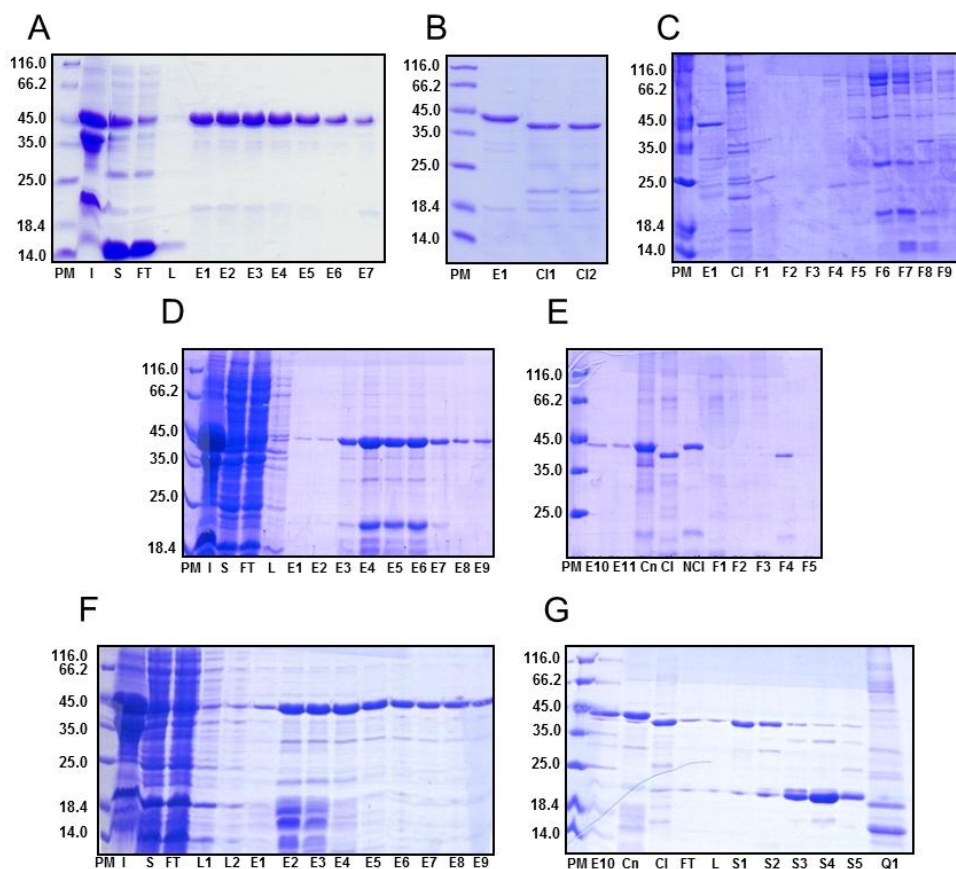


Figura 63: Testes de Purificação da proteína CsTdx. A proteína Tdx solúvel com 6xHis tem peso molecular aproximado de 39 kDa. (A) Purificação em resina TALON, da proteína expressa na cepa BL21 (DE3). (B) Clivagem do 6xHis com trombina. (C) Purificação de CsTdx por gel filtração. (D) Purificação da proteína CsTdx em resina TALON, expressa na cepa BL21 Δ SlyD pRARE. (E) Clivagem da 6xHis com trombina e Desalting. (F) Purificação da proteína Tdx em resina TALON, expressa na cepa BL21 Δ SlyD pRARE, com tampão 50 mM HEPES pH 8,5, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina, 5 μ g/mL Pepstatina, 2,5 μ g/mL Leupeptina, 2,5 μ g/mL Aprotinina, 2 mM DTT e Imidazol. (G) Clivagem da 6xHis com trombina e cromatografia de troca iônica nas colunas Mono S e Mono Q. PM = marcador de peso molecular (Unstained

Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); I = amostra insolúvel; S = amostra solúvel; FT = Flow Through; L = Lavagem; E = Eluições da amostra; Cn = Amostras concentradas; CI = clivagem da 6xHis a 16°C; S1 a S5 = Frações 10 a 14 da Troca Iônica em coluna Mono S; Q1 = Eluição da troca iônica em coluna Mono Q.

Devido a impossibilidade de conseguir proteína pura e em quantidade através da expressão em sistema bacteriano, foi feita então a clonagem do CsTdx em vetor para expressão do sistema S2 de células de inseto. Como a célula de inseto produz modificações pós-traducionais, como células de planta, poderíamos obter maiores quantidade de CsTdx e evitar as degradações obtidas no sistema bacteriano. Foram feitas várias tentativas de transfecção, mas em nenhuma delas foi observada a produção da proteína recombinante CsTdx, (Figura 64). O vetor utilizado possui um sinal para secretar a proteína quando corretamente expressa e esta deveria ser localizada no meio de cultura. Mesmo após a lise celular, não foi detectada CsTdx.

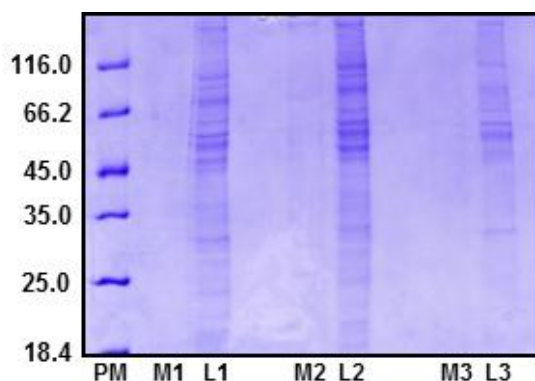


Figura 64: Expressão da proteína CsTdx no vetor pMT-BiP-V5-His na célula de inseto S2 a 27°C, com sulfato de cobre. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); M1 = amostra do meio de cultura da placa controle; L1 = amostra da lise celular da placa controle; M2 = amostra do meio de cultura da placa 01; L2 = amostra da lise celular da placa 01; M3 = amostra do meio de cultura da placa 02; L3 = amostra da lise celular da placa 02.

Expressão e Purificação dos domínios TPR e TRX

A proteína CsTdx é composta de dois domínios, como já citado anteriormente. Como não foi possível obter proteína CsTdx em grande quantidade, sem degradação ou impurezas, foi realizada a clonagem dos domínios separadamente para tentar realizar ensaios de cristalografia com os domínios separados.

O domínio TPR apresenta 23 kDa e foi expresso em BL21 (DE3) e purificado conforme descrito no item 3.1.3. A Figura 65 mostra a purificação da proteína TPR. Foi obtido cerca de 8 mg/mL de proteína TPR praticamente pura, que foi enviada para ensaios cristalográficos. Apesar de inúmeras tentativas, não conseguimos obter cristais de proteína.

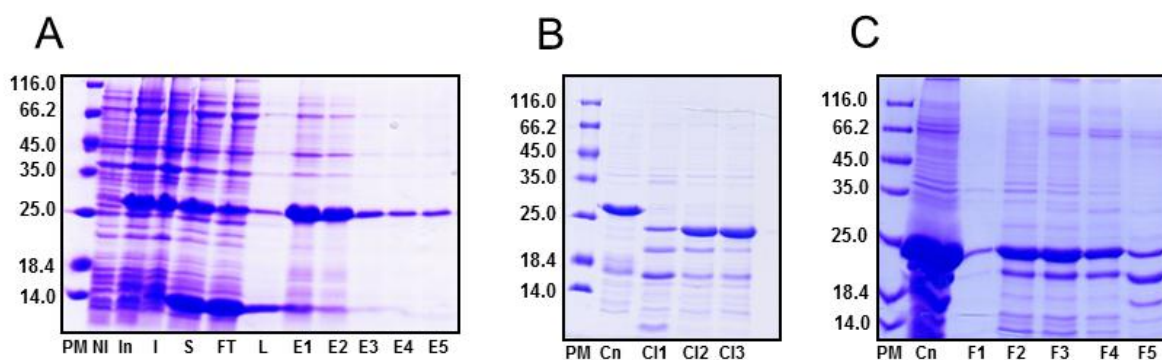


Figura 65: Purificação do domínio TPR em resina TALON. A proteína TPR solúvel com cauda 6xHis tem peso molecular aproximado de 25 kDa. (A) Purificação da proteína TPR por cromatografia de afinidade. (B) Testes de clivagem da 6xHis com trombina. (C) Gel filtração em coluna superdex 75 10/300 GL. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); NI = Amostra Não Induzida; In = Amostra induzida com IPTG; I = amostra insolúvel; S = amostra solúvel; FT = Flow Through; L = Lavagem; E1 a E5 = Eluições da amostra; CI1 = teste de clivagem a 25°C; CI2 = teste de clivagem a 16°C; CI3 = teste de clivagem a 4°C; Cn = amostra concentrada, injetada na coluna de gel filtração; F1 a F5 = frações coletadas na gel filtração.

O segundo domínio da CsTdx é o TRX, que possui aproximadamente 19 kDa. A proteína foi expressa em fusão com 6xHis (Figura 66A) e GST (Figura 66B). Em ambos os casos, não foi possível observar proteína purificada em maiores níveis. Pode-se observar ainda alto nível de degradação, mostrando a instabilidade do domínio e indicando que provavelmente este domínio é o mais instável dos dois, ou o que requer modificações pós-traducionais essenciais para seu enovelamento correto, impedindo assim tanto a purificação do domínio sozinho, quanto da proteína CsTdx como um todo.

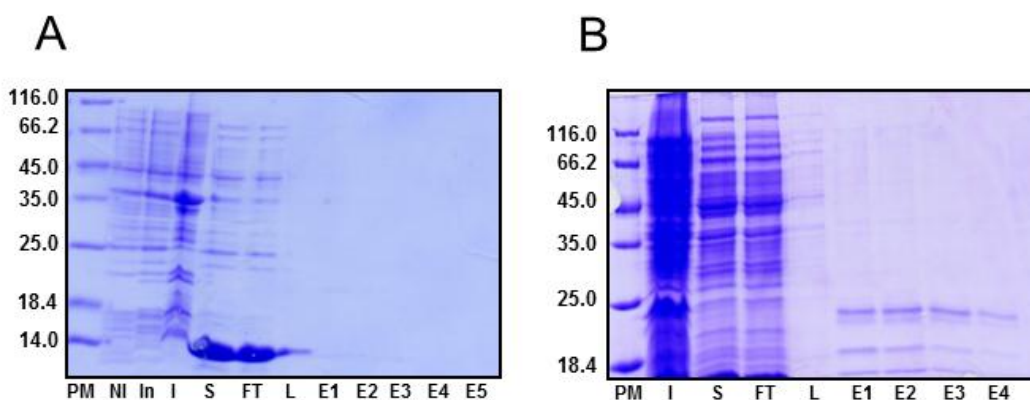


Figura 66: Purificação do domínio TRX em resina TALON. A proteína TRX solúvel com cauda 6xHis tem peso molecular aproximado de 21 kDa e em fusão com GST, 44 kDa. (A) Purificação do domínio TRX, com 6xHis, em resina TALON. Pode-se observar que a proteína quase não foi expressa. (B) Purificação do domínio TRX, com GST, em resina de glutathione. A proteína apresenta alto nível de degradação. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); NI = Amostra Não Induzida; In = Amostra induzida com IPTG; I = amostra insolúvel; S = amostra solúvel; FT = Flow Through; L = Lavagem; E = Eluições da amostra.

Análises Espectroscópicas

Dicroísmo Circular

As proteínas purificadas CsTdx e TPR foram submetidas a ensaios de dicroísmo circular e os gráficos obtidos mostram que ambas as proteínas se encontram enoveladas (Figura 67). CsTdx apresenta predominância de estrutura secundária de α -hélice (Figura 67A), o que é condizente com estruturas tridimensionais de domínios TRX e TPR, encontrados no PDB, nos quais TPR é composto por quase que exclusivamente α -hélices (Figura 67B) e TRX apresenta uma mistura de α -hélices e folhas β .

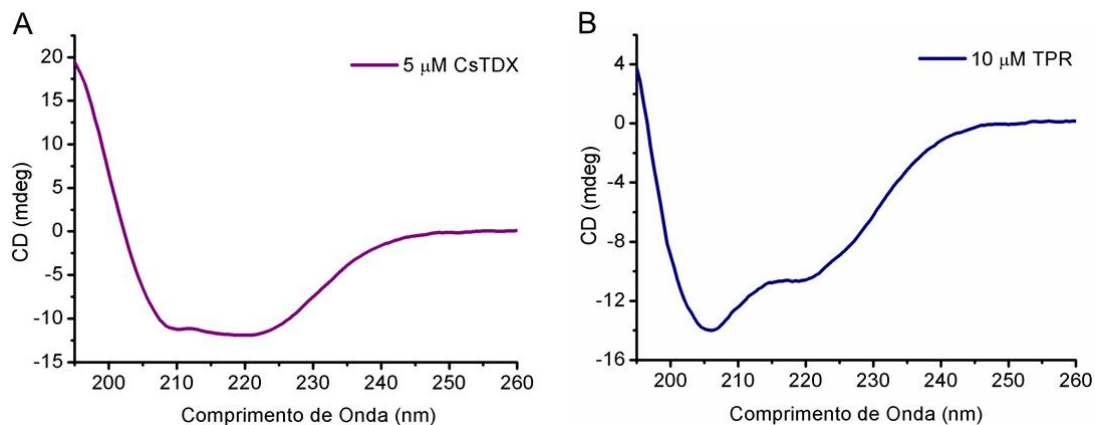


Figura 67: Espectros de Dicroísmo circular coletados na faixa de 195-260 nm, 10 acumulações. (A) CsTdx, 5 μ M em água. (B) TPR, 10 μ M em água.

DLS

O ensaio de DLS também foi realizado logo após a purificação de proteína TPR, mostrando que esta se encontrava pura e monodispersa (Figura 68). O raio hidrodinâmico obtido foi de 2,3 nm e o peso molecular estimado foi de 23 kDa, bem próximo ao esperado para o domínio TPR, que seria 18 kDa. Esta análise indicou 24,8% de polidispersividade, sendo que o recomendado para ensaios cristalográficos é abaixo de 20%. A intensidade e massa de 100% indica que, excetuando-se o tampão presente na amostra, a proteína desejada se encontra pura. Mesmo com a polidispersividade levemente acima do indicado para ensaios cristalográficos, está foi a melhor amostra obtida e optou-se por realizar os ensaios de cristalização.

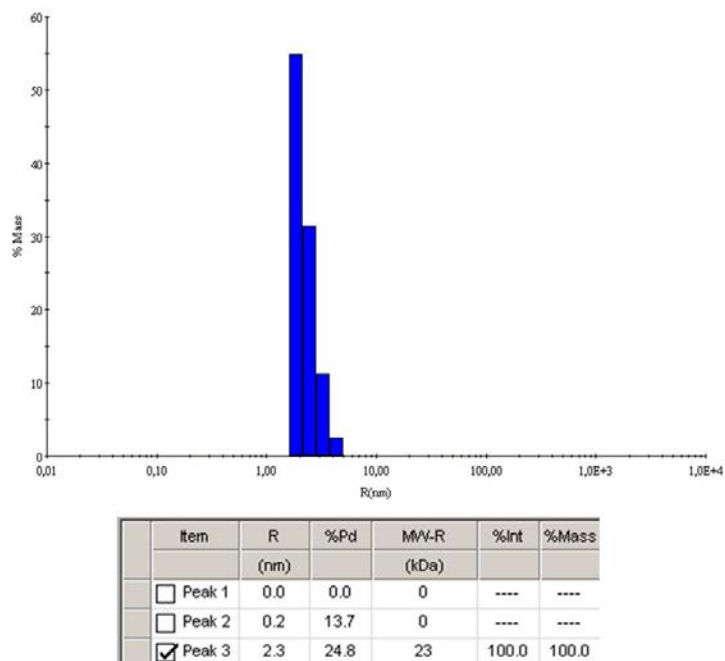


Figura 68: Gráfico do DLS do domínio TPR. O gráfico mostra a % intensidade por raio hidrodinâmico em nm (raio aproximado da proteína). A tabela indica a % de polidispersividade da amostra, o tamanho estimado das partículas presentes e % de intensidade e massa das partículas em solução.

A proteína CsTdx e seus domínios apresentaram degradação, mesmo após adição de coquetel de inibidores de proteases, impedindo assim uma análise estrutural e funcional desta proteína. Houveram tentativas de cristalizar o domínio TPR sozinho, mas não houve formação de cristais, possivelmente devido a impurezas na amostra ou concentração não ideal de proteína.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os objetivos do trabalho foram a caracterização estrutural e funcional de CsTdx e seus domínios TPR e TRX. Devido a problemas de solubilidade e degradação destas proteínas, não foi possível realizar grande parte dos experimentos propostos inicialmente. Os resultados obtidos a partir deste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- ✓ CsTdx apresenta estrutura secundária com predominância de α -hélices, resultado esperado por ser composta por dois domínios – TPR, rico em α -hélices e TRX, composto por uma mistura de α -hélices e folhas β ;
- ✓ O domínio TRX é altamente instável e apresenta altos níveis de degradação.

APÊNDICE II – ESTUDO DA PROTEÍNA CISTEÍNA PROTEASE DE *Citrus sinensis*

1. INTRODUÇÃO

Cisteínas Proteases (CPs) pertencem a um grupo de proteínas envolvidas na percepção, sinalização e ativação da resposta de defesa em plantas (Van Der Hoorn & Jones, 2004). A Cisteína protease isolada de citro, CsCP (Figura 69), pertence à família Papaína cisteína protease (C1), que usualmente possuem de 23 a 30 kDa e que utilizam um resíduo de cisteína para clivar ligações peptídicas em proteínas. O sítio catalítico é composto pela cisteína catalítica presente na fenda de ligação do substrato. Essa classe de cisteína proteases é produzida com um pró-peptídeo inibidor dobrado na fenda de ligação do substrato e que precisa ser proteoliticamente removido para ativar a protease (Taylor et al., 1995; Shindo & Van Der Hoorn, 2008).

A proteína CsCP foi primeiramente identificada em screenings de duplo-híbrido utilizando PthA3 como presa. A forma não processada e inicialmente isolada de CsCP apresenta o pro-peptídeo inibidor e 38 kDa. A forma processada (CPpep) e com atividade de protease apresenta 23 kDa. CsCP contém os resíduos de aminoácidos conservados típicos do sítio ativo de proteases eucarióticas e seis cisteínas que formam três pontes de cistinas (Figura 69A), uma tríade catalítica que é necessária para ativar a resposta de hipersensibilidade na protease Rc3 de tomate (Krüger et al., 2002; Roden et al., 2004). A CsCP possui 61, 59 e 57, 52 e 50% de identidade com *A. thaliana* CP, *Lonicera japônica* CP, *Nicotiana tabacum* CP, Rc3 de tomate e papaína, respectivamente.

A

CsCP	M-----EKSFDIIALSMIILVTYSSKMVSAGR-----SLHEPSIVEKHEKMAEHGRTYKDDLEKEMRFKIFKE
AtCP	M-----TSIVFFLLAILLSSRTSGVTSRG-----GLFEASAVEKHEQWMSRFNRVYSDDSEKTSRFEIFTN
LeRc3	MA-----MKVDLMNILITLFFVISMFNTQTRGR-----SQPKLSVSRHELWMSRHGRVYKDEVEKGERFMIFKE
LjCP	MA-----TKNQFYQISFAL-VLCGLWAFQVSS-----RTLQ-DASMHERHEQWMARYGKVYKDLQEKERFNIFQE
NtCp	MA-----FANLSQYLCIALFFIFLGVWRSQVASS---RPINYEASMRARHDCWIAHHDKVYKDLNEKEMRFKIFKE
Papain	MAPPFRLCIAISFLFMVFSLSLMSI IDYDL PADPLQSTERTEAHMMKMYEHWLVKHGKNYNAIGEKERRFEIFKD
	: : : . . . : * : * : * : * : * : * : *
CsCP	NLEYIEKANEEANRTYKLGTFNEFSDLTNEEFRASTGYRVPS---QSSSRQSTTASFKYQNLTD--VPTSMDWREKG
AtCP	NLKFVESINMNTNKTYTLDVNEFSDLTDEEFKARYTGLVPEGMTRISTTDSHETVSFRYENVGE--TGESMDWIQEG
LeRc3	NMKFIESVNKAGNLSYKLGMEFADITSQEFIAKFTGLNIPN---SYLSPSPMSSTEFKINDLSDDYMPSNLDWRESG
LjCP	NVKYIEASNNAGNKPYKLGVNQFTDLTNEKFIATRNKFKG-----HMSSSITRTITFKYENVT---APSTVDWRQEG
NtCp	NVERIEAFNAGEDKGYKLGVNKFSDLTNEKFRVLHTGYKRSH---PKVMSSSKPKTHFRYANVTD--IPPTMDWRKKG
Papain	NLRFVDEQN SVPGRTYKLGTFADLTNEEYRAMYLGAKEKK---EKLRTERSQRYLHKAGNDDD--LPSHVDWREKG
	* : . : * . * : . : * : * : * : * : * : . : : : * : * : *
CsCP	AVTPIKNQGGCGCWAFSAVAAVEGVTEISSGNLIPLSEQQILDSTDGNR-GGGGWMDNAFKYIIQNGIASEADY
AtCP	AVTSVKHQGGCGCWAFSAVAAVEGMTKANGE LVSLSSEQQLLDSTENN--GGGGIMWKAFDYIKENQGITTEDNY
LeRc3	AVTQVKHQGGCGCWAFSAVAGSLEGAYKIATGNLMFSEQLLEDSTNNY--GCGGLMTNAFDFIENGGISRESY
LjCP	AVTPVKNQGGCGCWAFSAVAATEGIHKLSTGNLVSLSSEQELVDSDTS GADQGGQGG LMDDAFKFIIQNGGLNTEAQY
NtCp	AVTPIKDQKGGCGCWAFSAVAATEGLHQ LKTGKLIPLSEQLVDSDVEGEDEGSGGLLDTAFDFILKNKGLTTEANY
Papain	AVTEVKDQGGCGCWAFSTVGSVEGINQIVTGD LLSLSSEQELVDSDK-AYNQGNGGLMDYAFEFIIKNGGIDSEADY
	** : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
CsCP	PYKEVQGTSE-DAQVKAAKISNFEDVKPNDEQALLQAVAMPVVICIEGSGPDFKSYKGGI FNRG GTQCSHAVAIV
AtCP	PYQGAQQTCE-SNHL-AAATISGYETVPQNDDEALLKAVSQQPVSAIEGSGYEFIHYSGGIFNGEGTQLTHAVTIV
LeRc3	EYLGQYQTR-SREKTAAVQISSYKVPPEG-ETSLQAVTKQPVSIGIAAS-QDLQFYAGGTYDGNADQINHAHTAI
LjCP	PYQGVDTGNTNEEVTHVATITGYEDVP SNNEQALQAVANQPI SVAIDASGSDFNQYQSGVFTGSGTQLDHGVAVV
NtCp	PYKGEDGVNKKKSALSAAKIAGYEDVPANSEKALLQAVANQPVSAIDGSSFDQFYSSGVFSGSSTWLNHAVTAV
Papain	PYRASDNMCDNRRKNAHVVTIDGYEDVPEDEE SLKQAVANQPVSAIEAGGREFQLYQSGVFTGRTGTLNLDHGVAVV
	* : * . . . * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
CsCP	GFGATEDGMKYWL IKNSWGESWGEAGYMRI LRDVEAPE-GLG IATKPSYP-VA
AtCP	GYGVSEEGIKYWL LKNSWGESWGENGYMRI RDVDS PQ-GMGLASLAYYP-VA
LeRc3	GYGTDEEGQKYWL LKNSWGT SWGENGFMIKIRD SGDP-GLGD IARMS SYPNIA
LjCP	GYGVSDGT KYWLKNSWGEDWGEEGYIRMRDVEAPE-GLGLAMQPSYPTA-
NtCp	GYGATTDTGTYWI IKNSWGSKWGDSGYMRIKRDVHEKE-GLGLAMDA SYPTA-
Papain	GYG-TENGIDYWVRNSWGPKWGESGYIRMERNVASTDTGKGLAMEASYP TKK
	* : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

B

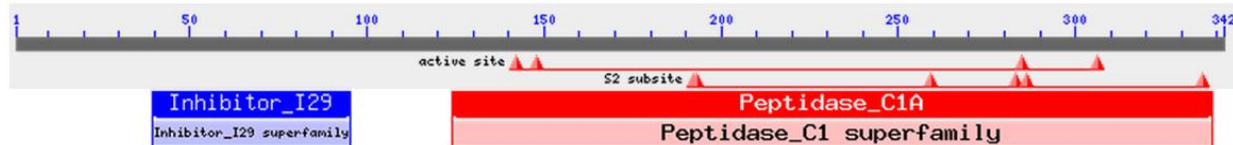


Figura 69: (A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de CsCP com cisteína protease de *A. thaliana*, *Lonicera japonica*, *Nicotiana tabacum*, Rc3 de tomate (*Licopersicon esculentum*) e Papaína da *Carica papaya*. O pro-peptídeo inibidor em negrito e sublinhado, o domínio peptidase em azul, os resíduos do sítio ativo (amarelo) e as seis cisteínas que formam a tríade catalítica (verde). (B) Representação esquemática mostrando os domínios CsCP. A proteína de *Citrus* isolada pertence à família Papaína cisteína protease, apresentando um domínio majoritário Peptidase C1 (rosa) com atividade de proteólise e peptidólise. Um domínio N-terminal (azul) inibidor I29 (cathepsin propeptide inhibitor domain) atua como um pro-peptídeo inibidor.

Segundo Cernadas et al. (2008), folhas de laranja doce infiltradas com Xac apresentaram altos níveis de expressão da CsCP (Figura 70) enquanto que as infiltradas com Xaa (não patogênica à laranja) mostraram níveis de expressão basais, como no controle (folha infiltrada com água). Por outro lado, quando o limão galego foi infiltrado com Xaa ou Xac (planta susceptível a ambos os patógenos), a expressão de CsCP foi bastante elevada se comparado com o controle (folha infiltrada com água). Portanto, a CsCP pode estar associada com o desenvolvimento dos sintomas do cancro.

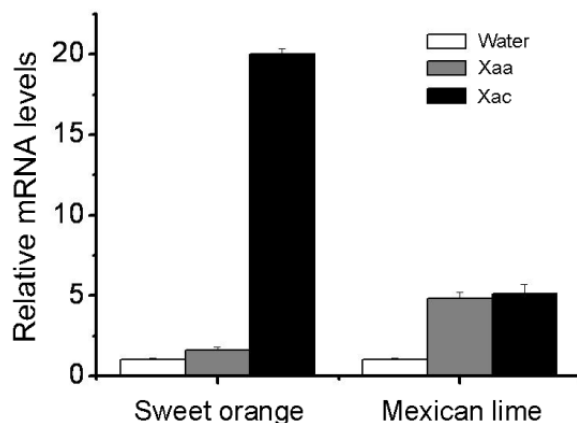


Figura 70: Níveis de Expressão de CsCP em plantas de laranja doce e limão galego infectadas com Xac ou Xaa em 48hpi, determinado por qPCR (Extraído de Cernadas et al., 2008).

Consistente com essa hipótese, CsCP é homóloga a proteína Rc3 de tomate (*Lycopersicon esculentum*), que é necessária para suprimir auto-necrose em tomate e que tem participação na resposta de defesa contra o fungo *Cladosporium fulvum* (Krüger et al., 2002). Segundo Rooney et al. (2005), a inibição da atividade da Rc3 pelo Avr2 de *C. fulvum* leva a uma resposta de hipersensibilidade, sugerindo que o aumento dos níveis de CP de citros pode estar associado com susceptibilidade à doença. Segundo Joosten & De Wit (1999), muitas proteínas de avirulência de *C. fulvum*, incluindo Avr4 e Avr9 sofrem um processamento proteolítico na planta, que poderia ser realizado por cisteínas proteases, com finalidade de ativar essas proteínas efetoras e assim, ser um fator importante para o desenvolvimento da doença.

Tem-se, portanto, duas hipóteses para a função de CsCP durante a infecção: CsCP pode ser parte do sistema de defesa de citros, ativando a resposta contra infecção ou CsCP age como ativador da proteína efetora, processando proteoliticamente a mesma após transferência para a célula da planta.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar a proteína CsCP e o domínio CPpep;
- Confirmar atividade de protease de CsCP e CPpep;
- Realizar ensaios de Dicroísmo Circular (CD) com CsCP e CPpep;
- Confirmar a interação de CsCP com PthAs 1 a 4 através de ensaios de duplo-híbrido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli*

Várias das construções que foram utilizadas nesse trabalho já estavam disponíveis em nosso laboratório, entre elas, pET28a-CsCP (6xHis N-terminal), pGEX4T-1-CsCP (GST N-terminal), pOBD-PthA1-ΔN, pOBD-PthA2-ΔN, pOBD-PthA3-ΔN, pOBD-PthA4-ΔN e pOAD-CsCP.

3.1.1. CsCP em pET28a e pGEX4T-1

O clone CsCP já se encontrava subclonado nos vetores pET28a em fusão com 6xHis, e pGEX4T-1 (GE Healthcare), em fusão com GST e transformados em *E. coli* para expressão, BL21 (DE3). As construções também foram transformadas nas cepas de *E. coli* Arctic Express e BL21 origami. As construções foram expressas e purificadas como descrito no item 3.1.2. O protocolo de expressão desta proteína seguiu os mesmos passos do item 3.1.2, mas foi realizada somente a purificação por cromatografia de afinidade. Foi realizada também uma purificação desnaturante com 7M ureia, segundo o protocolo de Bethune et al. (2006): após a expressão, a cultura foi ressuspensa em tampão de lise (200 mM Fosfato de Sódio pH 7,0, 200 mM NaCl, 2,5 mM DTT, 1,5 mM Benzamidina, 2,5 mM EDTA, 2 mg/mL Pepstatina, 2 mg/mL Leupeptina e 30% Glicerol) e adicionou-se 1 mg/mL Lisozima, sonicando a amostra na sequência. Após nova centrifugação, o pellet foi lavado 2x com água MilliQ autoclavada e na sequência ressuspensa em tampão desnaturante (50 mM Tris HCl pH 8,0, 7 M Ureia, 2 mM β-mercaptoetanol) e incubada com resina TALON por 2 horas a 4°C, sob agitação constante. A resina foi lavada e a proteína eluída com o tampão desnaturante com 200 mM Imidazol. A proteína eluída foi então dialisada *overnight* a 4°C, em tampão 100 mM Tris HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 15% Glicerol e 2 mM β-mercaptoetanol.

3.1.2. CP domínio peptidase em pET28a e pGEX4T-1 (CPpep)

A proteína CsCP apresenta dois domínios, como já especificado no item 1. Foi feita então, a subclonagem do domínio peptidase, a partir do cDNA inteiro da CsCP, nos vetores pET28a, pGEX4T-1 e pOAD, nos sítios de restrição *NdeI/NotI*, sendo o procedimento de clonagem utilizado igual ao descrito no item 3.1.3. As construções foram então transformadas nas cepas de *E. coli* para expressão, BL21 (DE3), Arctic Express e BL21 origami. As construções foram expressas e purificadas como descrito no item 3.1.1. e 3.1.5.

3.2. Ensaio de Duplo-Híbrido

Foi realizado o ensaio de duplo-híbrido para testar a interação das proteínas CsCP e CPpep (clonadas no vetor pOAD, como presa) com PthA 1 a 4, clonados no vetor pOBD. As etapas e procedimentos realizados estão descritas no Capítulo II, item 3.11.

3.3. Análises Espectroscópicas

3.3.1. Análises de Dicroísmo Circular (CD)

Os ensaios de CD, para verificar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas CsCP e CPpep foram realizados com diversas concentrações de proteína. Os espectros de CD foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro J-810 (JASCO), no comprimento de onda de 200 a 260 nm, com cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico, com as proteínas diluídas em água.

3.4. Ensaio de Atividade de CP recombinante

A atividade de protease de CsCP e CPpep foi determinada utilizando-se o Protease Assay Kit (Calbiochem®), desenvolvido para quantificar a atividade de diversas proteases através da quebra da FTC-caseína em FTC-peptídeos pela protease e a quantificação é feita por medições de absorbância (Figura 71).

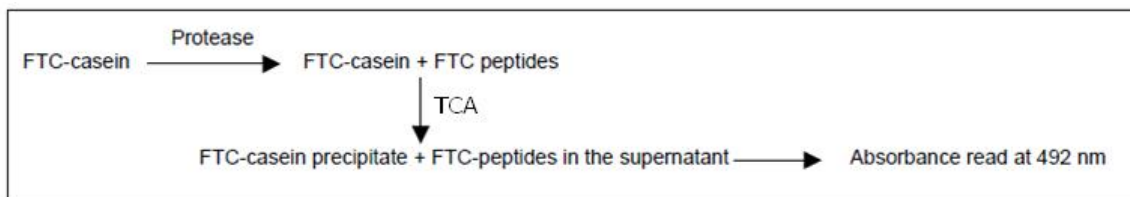


Figura 71: Esquema de ação do kit Protease Assay utilizado para o ensaio enzimático da proteína CP.

As amostras (CPpep e CsCP) foram então diluídas, quando necessário, para concentração final de 1 mg/mL. Foi preparado também Papaína, uma cisteína protease, como controle positivo, também na concentração de 1 mg/mL. Tripsina a 1 mg/mL já é fornecida juntamente com o kit, para controle positivo.

O protocolo seguiu o recomendado pelo fabricante do kit: adicionar em tubo de 1,5 mL – 50 µL FTC-caseína, 50 µL tampão de incubação (20 mM Acetato de Sódio pH 5,0, 1 mM EDTA e 5 mM Cisteína HCl – tampão recomendado para cisteínas proteases), 100 µL amostra ou H₂O (esta para o branco).

A mistura foi incubada a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi adicionado 500 µL TCA 5% (ácido tricloroacético). As amostras foram vortexadas e incubadas a 37°C por 10 minutos. O TCA foi precipitado por centrifugação, a 12000 g por 5 min. Foram coletados 400 µL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo, ao qual foi adicionado 600 µL de Assay Buffer e a absorbância foi lida a 492 nm. Foram feitas duplicatas de cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Expressão e Purificação de CsCP e CPpep

A proteína CsCP possui 38 kDa e é composta de dois domínios – um domínio peptidase, com atividade enzimática e um domínio inibidor, responsável pela inatividade da proteína quando ela não é requisitada na célula. O domínio inibidor tem capacidade de auto-clivagem que ocorre em condições propícias e libera o domínio peptidase ativo. A proteína CsCP foi expressa em diversas condições e em diferentes cepas, mas em todos os casos a proteína se apresentou na fração insolúvel (Figura 72).

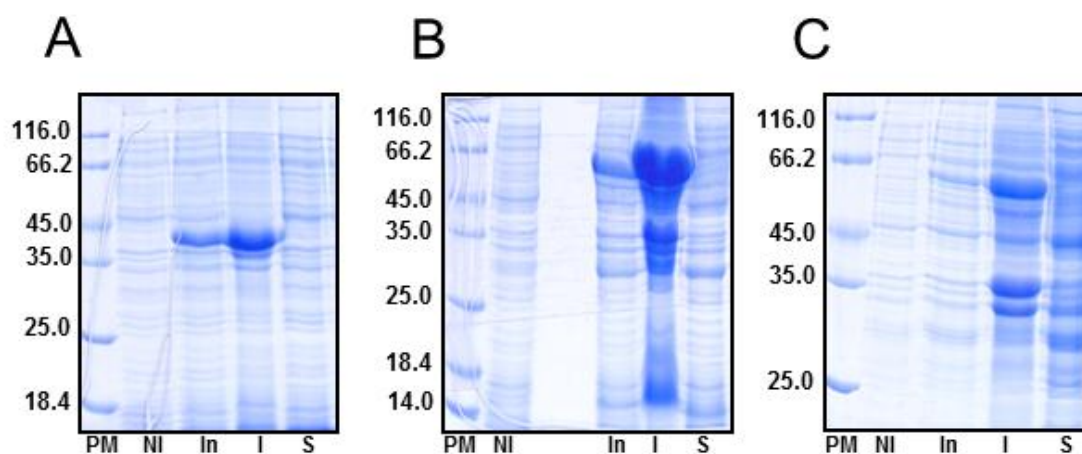


Figura 72: Expressão da proteína CsCP em fusão com 6xHis, com peso molecular de 40 kDa e em fusão com GST, com peso molecular de 66 kDa. (A) Proteína expressa a 30°C, em fusão com 6xHis. (B) Proteína expressa a 37°C, em fusão com GST. (C) Proteína expressa a 25°C, em fusão com GST. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); NI = amostra não induzida; In = amostra induzida; I = amostra insolúvel; S = amostra solúvel.

Foram então realizados testes somente com o domínio peptidase (CPpep). A Figura 73 mostra que o CPpep também se apresenta na forma insolúvel.

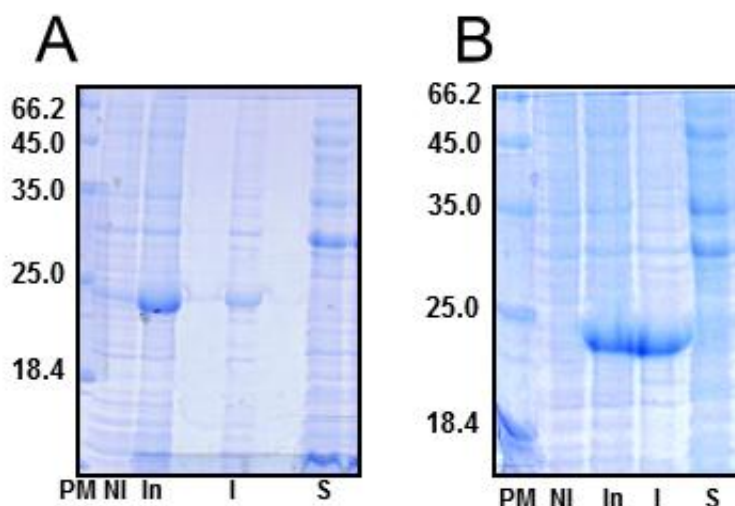


Figura 73: Expressão da proteína CPpep em fusão com 6xHis, com peso molecular de 25kDa (A) Proteína expressa a 30°C. (B) Proteína expressa a 25°C. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); NI = amostra não induzida; In = amostra induzida; I = amostra insolúvel; S = amostra solúvel.

As proteínas foram então purificadas em condições desnaturantes, na presença de 7 M de ureia, de acordo com o descrito por Bethune et al. (2006) (Figura 74).

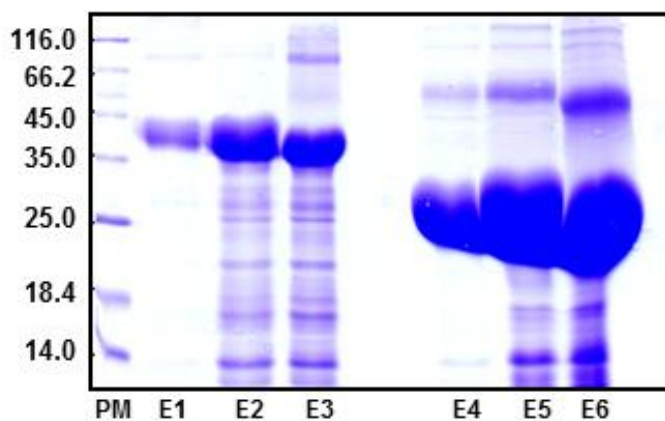


Figura 74: Purificação desnaturante das proteínas CsCP e CPpep. A proteína CsCP com 6xHis tem peso molecular total aproximado de 40 kDa e a CPpep com 6xHis tem peso molecular total aproximado de 25 kDa. PM = marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas); E1 a E3 = Eluições da proteína CsCP. E4 a E6 = Eluições da proteína CPpep.

Análises Espectroscópicas - Dicroísmo Circular

As proteínas CsCP e CPpep purificadas foram submetidas a ensaios de dicroísmo circular para verificar se a renaturação ocorreu de forma correta e a proteína foi re-enovelada. Os gráficos obtidos (Figura 75A e B) mostram que as proteínas provavelmente se encontram parcialmente enoveladas.

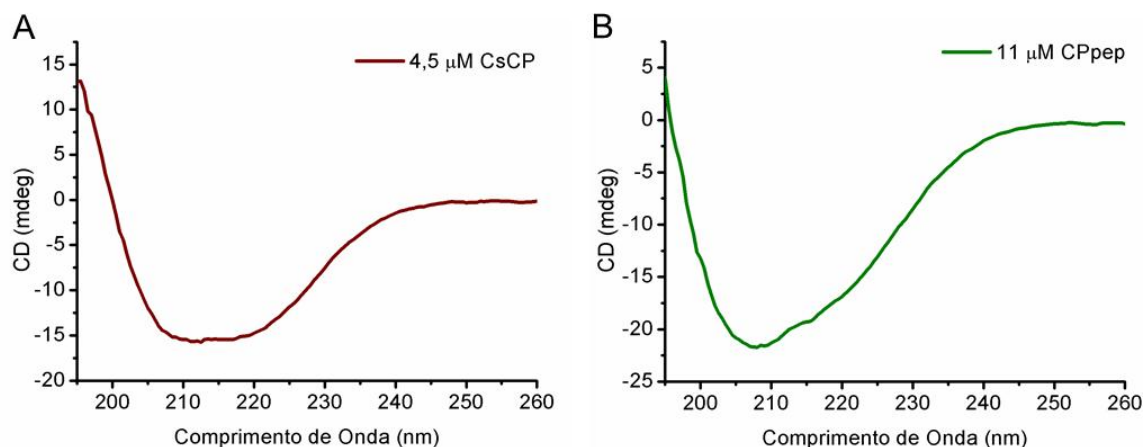


Figura 75: Espectros de Dicroísmo circular coletados na faixa de 195-260 nm, 30 acumulações (A) CsCP, 4.5 μM em água. (B) CPpep, 11 μM em água.

Ensaio Enzimático da Cisteína Protease

O ensaio enzimático foi realizado para averiguar se CsCP e CPpep possuem atividade de protease. A Tabela 11 mostra a quantidade de proteína utilizada em cada amostra do ensaio. A Figura 76 mostra os valores de absorbância encontrados para cada amostra, sendo que a média entre as duplicatas já foi estabelecida e o valor de absorbância de cada amostra já foi subtraído do branco. Pode-se observar que os reagentes do kit estão totalmente funcionais, pois as amostras com tripsina e papaína estão agindo sob o substrato. As proteínas recombinantes CPpep e CsCP não possuem praticamente nenhuma atividade, visto que sua absorbância é praticamente igual as dos brancos. Estes dados indicam que nenhuma das duas proteínas recombinantes estão ativas. Provavelmente o tampão de ativação utilizado não é o correto, levando a não-ativação da proteína, pois durante a preparação das amostras, é necessário incubar a protease com um tampão de ativação, que possui um pH ideal para que a protease esteja ativa. No caso da CsCP, este tampão também é necessário para que ocorra a auto-clivagem da proteína, liberando o pró-peptídeo inibidor e tornando, consequentemente, a proteína ativa. O tampão utilizado foi o indicado pelo fabricante do kit para cisteínas proteases e este tampão funciona para algumas cisteínas proteases, pois a Papaína mostrou atividade de protease.

Tabela 11: Quantidade de proteína nas amostras do ensaio enzimático das proteínas CsCP e CPpep

Amostra	Proteína	H ₂ O	Amostra	Proteína	H ₂ O
01 - Tripsina	1 µL	99 µL	09 - CPpep	10 µL	90 µL
02 - Tripsina	2 µL	98 µL	10 - CPpep	20 µL	80 µL
03 - Tripsina	5 µL	95 µL	11 - CPpep	50 µL	50 µL
04 - Tripsina	10 µL	90 µL	12 - CPpep	100 µL	-
05 - Papaína	10 µL	90 µL	13 - CsCP	10 µL	90 µL
06 - Papaína	20 µL	80 µL	14 - CsCP	20 µL	80 µL
07 - Papaína	50 µL	50 µL	15 - CsCP	50 µL	50 µL
08 - Papaína	100 µL	-	16 - CsCP	100 µL	-

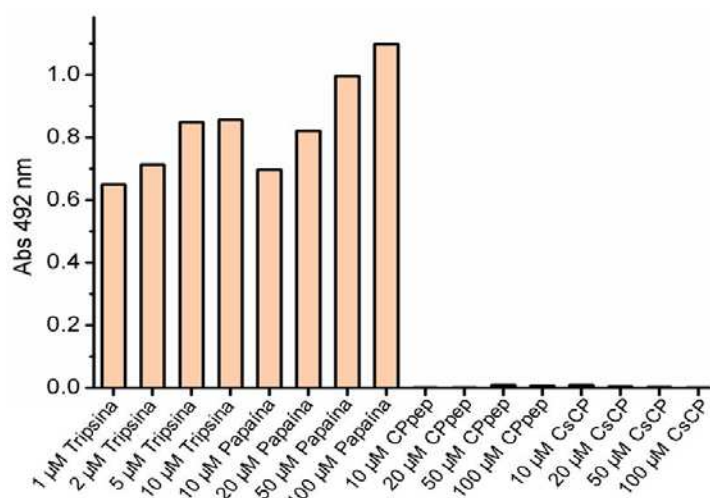


Figura 76: Ensaio enzimático das proteínas CsCP e CPpep.

Duplo-Híbrido

O ensaio de duplo-híbrido foi realizado para confirmar o screening inicial de duplo-híbrido, no qual CsCP foi identificada pela primeira vez e para verificar se CsCP e CPpep interagem com as quatro variantes de PthA. A Figura 77 mostra as interações das proteínas PthA1, 2, 3 e 4 com as presas pOAD-CsCP e pOAD-CPpep e seus respectivos controles, em meio SC – Ade – His – Trp – Leu, na ausência e presença de 3AT (3 e 5mM), após 4 dias de crescimento em estufa 30°C. A presa pOAD-CsCP mostrou interação positiva com as iscas PthA2 e PthA3, na placa com 0 mM 3-AT (Figura 77A), mas conforme a estrigência aumenta (3 e 5 mM 3-AT – Figura 77B e C), as interações vão deixando de ser estáveis. Também é possível observar que os controles negativos (1C a 5C) não estão auto-ativando os genes repórteres. Por outro lado, a proteína CPpep interagiu com a isca PthA3 (Figura 77D, E e F), em todas as condições testadas, sendo possível observar que os controles negativos (1C a 5C) não estão auto-ativando os genes repórteres. É importante notar que quando o peptídeo inibidor é retirado, a interação entre CP e PthA é mais forte, mostrando que o peptídeo inibidor realmente age inibindo a atividade da CP. Esses dados também nos remete a hipótese de que talvez PthA iniba a atividade de CsCP ou seja processada pela mesma.

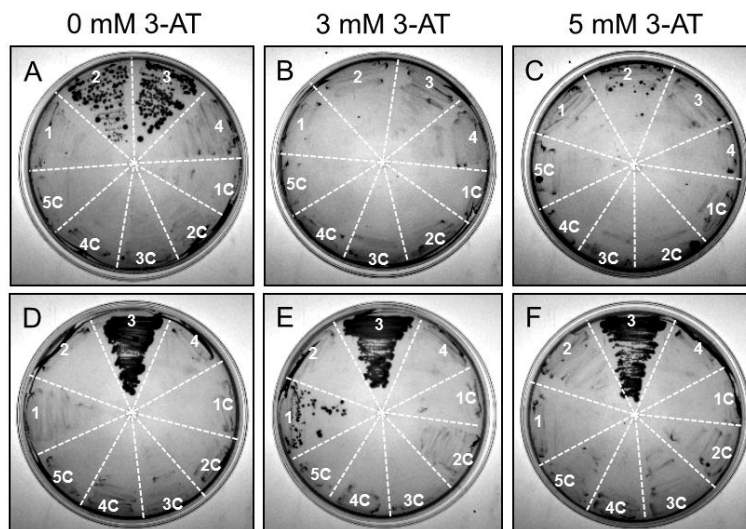


Figura 77: Interações positivas confirmadas com a isca: PthA1, PthA2, PthA3 e PthA4 com as presas – pOAD-CsCP e pOAD-CPpep em meio SC –Ade –His –Trp –Leu, nas concentrações de 0, 3 e 5 mM de 3-AT. (A), (B) e (C) – Interação dos PthAs 1 a 4 com CsCP, na presença de 0, 3 e 5 mM 3-AT. (D), (E) e (F) - Interação dos PthAs 1 a 4 com CPpep, na presença de 0, 3 e 5 mM 3-AT. Os números 1 a 4 representam as iscas PthA (1 a 4, respectivamente) interagindo com a presa. Os números 1C a 5C são os controles negativos pOBD-vazio+pOAD-Presa, pOBD-PthA1+pOAD-vazio, pOBD-PthA2+pOAD-vazio, pOBD-PthA3+pOAD-vazio, pOBD-PthA4+pOAD-vazio, respectivamente.

Devido aos problemas de solubilidade da CsCP e do domínio peptidase (CPpep) e sua inatividade mediante tentativas de reenovelamento após purificação desnaturante, os experimentos para testar se PthA seria clivado por CsCP ou se CsCP seria inibida por PthA não foram realizados.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os objetivos do trabalho eram a caracterização da interação de CsCP com as quatro variantes do PthA. Devido a problemas de solubilidade desta proteína, não foi possível realizar grande parte dos experimentos propostos inicialmente. Os resultados obtidos a partir deste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- ✓ CsCP apresenta dois domínios – um domínio peptidase e um domínio inibidor;
- ✓ CsCP interage preferencialmente com PthAs 2 e 3, enquanto que CPpep, somente com o PthA3, corroborando os dados do primeiro screening de duplo-híbrido, que detectou CsCP como parceira de interação de PthA3;
- ✓ CsCP e CPpep reenoveladas não apresentaram atividade de cisteína protease, provavelmente por estarem desenoveladas ou parcialmente enoveladas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Saadi, A.; Reddy, J.D.; Duan, Y.P.; Brunings, A.M.; Yuan, Q.; and Gabriel, D.W. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry on *pthA* homolog with 17,5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol. Plant Microbe Interactions*, 20(8):934-943, 2007.
- Altenbach, D. & Robatzek, S. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interactions*, 20(9):1031-1039, 2007.
- Aragão, A.Z.B.; Nogueira, M.L.C.; Granato, D.C.; Simabuco, F.M.; Honorato, R.V.; Hoffman, Z.; Yokoo, S.; Zeri, A.C.M.; Oliveira, P.S.L.; Sherman, N.E.; and Leme, A.F.P. Identification of Novel Interaction between ADAM17 (a Disintegrin and Metalloprotease 17) and Thioredoxin-1. *J. Biol. Chem.*, 287:43071-43082, 2012.
- Arévalo-Rodríguez, M.; Cardenas, M.E.; Wu, X.; Hanes, S.D.; and Heitman, J. Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3–Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J.*, 19:3739-3749, 2000.
- Arévalo-Rodríguez, M. and Heitman, J. Cyclophilin A is located to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 4(1):17-29, 2005.
- Balan, A.; Santacruz, C.P.; Moutran, A.; Ferreira, R.C.; Medrano, F.J.; Pérez, C.A.; Ramos, C.H.; and Ferreira, L.C. The molybdate-binding protein (ModA) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Protein Expr. Purif.*, 50:215-222, 2006.
- Bannikova, O.; Zywicki, M.; Marquez, Y.; Skrahina, T.; Kalyna, M.; and Barta, A. Identification of RNA targets for the nuclear multidomain cyclophilin atCyp59 and their effect on PPlase activity. *Nucleic Acids Res.*, 41:1783-1796, 2013.
- Belasque Jr., J.; Parra, A.L.; Chagas, M.C.M.; Behe, C.; Ayres, A.J.; Parra, J.R.P.; and Hartung, J.S. Interaction of citrus bacterial canker, citrus leaf miner and pest management. *Phytopathology*, 91(supplement):S7, 2001.
- Berndt, C.; Lillig, C.H.; and Holmgren, A. Review: Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783:641-650, 2008.
- Bethune, M.T.; Strop, P.; Tang, Y.; Sollid, L.M.; and Khosla, C. Heterologous Expression, Purification, Refolding, and Structural-Functional Characterization of EP-B2, a Self-Activating Barley Cysteine Endoprotease. *Chemistry & Biology*, 13:637-647, 2006.
- Blocker, A.; Komoriya, K.; and Aizawa, S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *PNAS*, 100(6):3027-3030, 2003.
- Boch, J.; Scholze, H.; Schornack, S.; Landgraf, A.; Hahn, S.; Kay, S.; Lahaye, T.; Nickstadt, A.; and Bonas, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959):1509-1512, 2009.

- Boch, J. & Bonas, U. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. Annu. Rev. Phytopathol., 48:419-436, 2010.
- Bonas, U.; Stall, R.E.; and Staskawicz, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene avrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet., 218(1):127-136, 1989.
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W. Review: *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Molecular Plant Pathology, 4(3):141-157, 2003.
- Buratowski, S. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. Mol. Cell, 36:541-546, 2009.
- Büttner, D. & Bonas, U. Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J., 21:5313-5322, 2002.
- Cernadas, R.A.; Camilli, L.R.; and Benedetti, C.E. Transcriptional analysis of the sweet Orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. Molecular Plant Pathology, 9(5):609-631, 2008.
- Cernadas, R.A. & Benedetti, C.E. Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Plant Sci., 177:190-195, 2009.
- Chinchilla, D.; Bauer, Z.; Regenass, M.; Boller, T.; and Felix, G. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. Plant Cell, 18(2):465-476, 2006.
- Chinchilla, D.; Zipfel, C.; Robatzek, S.; Kemmerling, B.; Nürnberger, T.; Jones, J.D.; Felix, G.; and Boller, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature, 448(7152):497-500, 2007.
- Chisholm, S.; Coaker, G.; Day, B.; and Staskawicz, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124(4):803-814, 2006.
- Cliff, M.J.; Harris, R.; Barford, D.; Ladbury, J.E.; and Williams, M.A. Conformational diversity in the TPR Domain-Mediated interaction of protein phosphatase 5 with Hsp90. Structure, 14:415-426, 2006.
- Coaker, G.; Falick, A.; and Staskawicz, B. Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by eukaryotic cyclophilin. Science, 308:548-550, 2005.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature, 411:826-833, 2001.
- Das, A.K.; Cohen, P.T.; and Barford, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. EMBO J., 17(5):1192-1199, 1998.

- da Silva, A.C.; Ferro, J.A.; Reinach, F.C.; Farah, C.S.; Furlan, L.R.; Quaggio, R.B.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Van Sluys, M.A.; Almeida, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417:459-463, 2002.
- Davis, T.L.; Walker, J.R.; Campagna-Slater, V.; Finerty, P.J.; Paramanathan Jr., R.; Bernstein, G.; MacKenzie, F.; Tempel, W.; Ouyang, H.; Lee, W.H.; Eisenmesser, E.Z.; and Dhe-Paganon, S. Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *PLoS ONE*, 8(7):e1000439, 2010.
- Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G.W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; and Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR*, 6:277-293, 1995.
- Deng, D.; Yan, C.; Pan, X.; Mahfouz, M.; Wang, J.; Zhu, J.; Shi, Y.; and Yan, N. Structural Basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL Effectors. *Science*, 335:720-723, 2012.
- Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F.; Dufayard, J.F.; Guindon, S.; Lefort, V.; Lescot, M.; Claverie, J.M.; and Gascuel, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.*, 36:W465-469, 2008.
- Deyrup, A.T.; Krishnan, S.; Cockburns, B.N.; and Schwartz, N.B. Deletion and site-directed mutagenesis of the ATP-binding motif (P-loop) in the Bifunctional murine ATP-sulfurylase/Adenosine 5'-Phosphosulfate kinase enzyme. *J. Biol. Chem.*, 273:9450-9456, 1998.
- Domingues, M.N.; Souza, T.A.; Cernadas, R.A.; Oliveira, M.L.P.; Docena, C.; Farah, C.S.; and Benedetti, C.E. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Mol. Plant Pathology*, 11:663-675, 2010.
- Domingues, M.N.; Campos, B.M.; Oliveira, M.L.P.; Mello, U.Q.; and Benedetti, C.E. TAL Effectors Target the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II (CTD) by Inhibiting the Prolyl-Isomerase Activity of a CTD-Associated Cyclophilin. *PLoS ONE*, 7:e41553, 2012.
- Dornan, J.; Page, A.P.; Taylor, P.; Wu, S.; Winter, A.D.; Husi, H.; and Walkinshaw, M.D. Biochemical and Structural Characterization of a Divergent Loop Cyclophilin from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 274(49):34877-34883, 1999.
- Duan, Y.P.; Castañeda, A.; Zhao, G.; Erdos, G.; and Gabriel, D.W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 12(6):556-560, 1999.
- Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32(5):1792-1797, 2004.

- Ellis, P.J.; Carlow, C.K.S.; Ma, D.; and Kuhn, P. Crystal Structure of the Complex of *Brugia malayi* Cyclophilin and Cyclosporin A. *Biochemistry*, 39:592-598, 2000.
- Evans, P.R. Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst Section D*, 62:72–82, 2005.
- Fisher, G.; Whittmann-Liebold, B.; Lang, K.; Kiethaber, T.; and Schmid, F.X. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337:476-478, 1989.
- Fischer, G. and Schmid, F.X. The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 29:2205-2212, 1990.
- Franke, E.K.; Yuan, H.E.H.; and Luban, J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-I virions. *Nature*, 372:359-362, 1994.
- Galán, J.E. & Collmer, A. Review: Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284:1322-1328, 1999.
- Galat, A. Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: an analysis of the cyclophilin family of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371:149-162, 1999.
- Gietz, R.D. & Woods, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.*, 350:87-96, 2002.
- Gómez-Gómez, L. & Boller, T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, 5(6):1003-1011, 2000.
- Gottig, N.; Garavaglia, B.S.; Garofalo, C.G.; Zimaro, T.; Sgro, G.G.; Ficarra, F.A.; Dunger, G.; Daurelio, L.D.; Thomas, L.; Gehring, C.; Orellano, E.G.; and Ottado, J. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Mendez-Vilas (Ed.), 196-204, 2010.
- Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; and Schubert, T.S. Citrus canker: the pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress*, 2002, doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Gourlay, L.J.; Angelucci, F.; Baiocco, P.; Boumis, G.; Brunori, M.; Bellelli, A.; and Miele, A.E., The Three-dimensional Structure of Two Redox States of Cyclophilin A from *Schistosoma mansoni* – Evidence for redox regulation of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J. Biol. Chem.*, 282(34):24851–24857, 2007.
- Graham, J.H. and Gottwald, T.R. Research perspectives on eradication of citrus bacterial canker diseases in Florida. *Plant Disease*, 75:1193-1200, 1991.
- Graham, J.H.; Gottwald, T.R.; Cubero, J.; and Achor, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.*, 5:1-15, 2004.

- Gullerova, M.; Barta, A.; and Lorkovic, Z.J. AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the TNA polymerase II. *RNA*, 12:631-643, 2006.
- Gupta, D. and Tuteja, N. Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.*, 6:232-236, 2011.
- Gürlebeck, D.; Szurek, B.; and Bonas, U. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.*, 42:175-187, 2005.
- Gürlebeck, D.; Thieme, F.; and Bonas, U. Type III effector proteins from pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, 163:233-255, 2006.
- Hall, A.; Nelson, K.; Poole, L.B.; and Karplus, P.A. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antiox. Redox Signaling*, 15:795-815, 2011.
- Handschumacher, R.E.; Harding, M.W.; Rice, J.; Drugge, R.J.; and Speicher, D.W. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226:544-547, 1984.
- Hani, J.; Schelbert, B.; Bernhardt, A.; Domdey, H.; Fischer, G.; Wiebauer, K.; and Rahfeld, J.U. Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 274:108-116, 1999.
- Howard, B.R.; Vajdos, F.F.; Li, S.; Sundquist, W.I.; and Hill, C.P. Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nature Struc. Biol.*, 10(6):475-481, 2003.
- Iki, T.; Yoshikawa, M.; Meshi, T.; and Ishikawa, M. Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J.*, 31:267-278, 2012.
- James, P.; Halladay, J.; and Craig, E.A. Genomics libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144:1425-1436, 1996.
- Jasnovidova, O. & Stefl, R. Review: The CTD code of RNA polymerase II: a structural view. *WIREs-RNA*, 4:1-16, 2013.
- Johnson, B.A. and Blevins, R.A. NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*, 4:603-614, 1994.
- Joosten, M. & De Wit, P. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: a versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37:335-367, 1999.
- Kang, B.; Zhang, Z.; Wang, L.; Zheng, L.; Mao, W.; Li, M.; Wu, Y.; Wu, P.; and Mo, X. OsCYP2, a chaperone involved in AUX/IAA degradation, plays crucial roles in rice lateral root initiation. *Plant J.*, 74(1):86-97, 2013.

- Kay, S.; Hahn, S.; Marois, E.; Hause, G.; and Bonas, U. A Bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318:648-651, 2007.
- Kay, S. & Bonas, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.*, 12(1):37-43, 2009.
- Ke, H. & Huai, Q. Crystal Structures of Cyclophilins and Its Partners. *Frontiers in Bioscience*, 9:2285-2296, 2004.
- Kim, S.G.; Chi, Y.H.; Lee, J.; Schlesinger, S.R.; Zabet-Moghaddam, M.; Chung, J.; Knaff, D.B.; Kim, S.T.; Lee, S.Y.; and Kim, S. Redox properties of a thioredoxin-like *Arabidopsis* protein, AtTDX. *BBA – Proteins and Proteomics*, 1804(12):2213-2221, 2010.
- Kofron, J.L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Colón-Bonilla, E.; and Rich, D.H. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerase by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*, 30(25):6127-6134, 1991.
- Krishnamurthy, S.; Ghazy, M.A.; Moore, C.; and Hampsey, M. Functional Interaction of the Ess1 Prolyl Isomerase with Components of the RNA Polymerase II Initiation and Termination Machineries. *Mol. Cell Biol.*, 29(11):2925-2934, 2009.
- Krüger, J.; Thomas, C.M.; Golstein, C.; Dixon, M.S.; Tang, S.; Mulder, L.; and Jones, J.D. A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science*, 296(5568):744-747, 2002.
- Kumari, S.; Roy, S.; Singh, P.; Singla-Pareek, S.L.; and Pareek, A. Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signal. and Behavior*, 8:e22734, 2013.
- Laupacis, A.; Keown, P.A.; Ulan, R.A.; McKenzie, N.; and Stiller, C.R. Therapeutic Review: Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *CMA Journal*, 126:1041-1046, 1982.
- Laxa, M.; König, J.; Dietz, K.; and Kandlbinder, A. Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl cis–trans isomerase and redox-related functions. *Biochem. J.*, 401:287-297, 2007.
- Lee, J.R.; Lee, S.S.; Jang, H.H.; Lee, Y.M.; Park, J.H.; Park, S.; Moon, J.C.; Park, S.K.; Kim, S.Y.; Lee et al. Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. *PNAS*, 106(4):5978-5983, 2009.
- Leslie, A.G. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB. Newsletter on Protein Crystallography*, 26:27–33, 1992.
- Li H. & Luan S. The cyclophilin AtCYP71 interacts with CAF-1 and LHP1 and functions in multiple chromatin remodeling processes. *Mol. Plant*, 4:748-758, 2001.

- Li, M.X.; Corson, D.C.; and Sykes, B.D. Structure determination by NMR. Isotope labeling. *Methods Mol. Biol.*, 173:255-65, 2002.
- London, N.; Raveh, B.; Cohen, E.; Fathi, G.; and Schueler-Furman, O. Rosetta FlexPepDock web server - high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, 39:w249-253, 2011.
- Lu, K.P.; Finn, G.; Lee, T.H.; and Nicholson, L.K. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature Chemical Biology*, 3:619-629, 2007.
- Luban, J.; Bossolt, K.L.; Franke, K.; Kalpana, G.V.; and Goff, S.P. Human immunodeficiency virus type I Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell*, 73:1067-1078, 1993.
- Ma, X.; Song, L.; Yang, Y.; and Liu, D. A gain-of-function mutation in the ROC1 gene alters plant architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 197:751-762, 2013.
- Mak, A.N.; Bradley, P.; Cernadas, R.A.; Bogdanove, A.J.; and Stoddard, B.L. The Crystal Structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, 335:716-719, 2012.
- Marois, E.; Ackerveken, G.V.; and Bonas, U. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hyperthrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15(7):637-646, 2002.
- Meinhart, A.; Kamenski, T.; Hoepfner, S.; Baumli, S.; and Cramer, P. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.*, 19:1401-1415, 2005.
- McDonough, H. & Patterson, C. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress & Chaperones*, 8(4):303-308, 2003.
- Meyer, Y.; Siala, W.; Bashandy, T.; Riondet, C.; Vignols, F.; and Reichheld, J.P. Review: Glutaredoxins and Thioredoxins in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(4):589-600, 2008.
- Morris, D.P.; Phatnani, H.P.; and Greenleaf, A.L. Phospho-Carboxyl-Terminal Domain Binding and the Role of a Prolyl Isomerase in Pre-mRNA 3'-End Formation. *J. Biol. Chem.*, 274(44):31583-31587, 1999.
- Moscou, M.J. & Bogdanove, A.J. A simple cipher governs TAL effector-DNA recognition. *Science*, 326:1501, 2009.
- Motohashi, K.; Kondoh, A.; Stumpp, M.T.; and Hisabori, T. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *PNAS*, 98:11224-11229, 2001.
- Motohashi, K.; Koyama, F.; Nakanishi, Y.; Ueoka-Nakanishi, H.; and Hisabori, T., Chloroplast Cyclophilin Is a Target Protein of Thioredoxin - Thiol Modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J. Biol. Chem.*, 278(34):31848-31852, 2003.

- Murakami, M.T.; Sforça, M.L.; Neves, J.L.; Paiva, J.H.; Domingues, M.N.; Pereira, A.L.A.; Zeri, A.C.; and Benedetti, C.E. The repeat domain of type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. *Proteins*, 76(16):3386-3395, 2010.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15(3):473-497, 1962.
- Nagy, P.D.; Wang, R.Y.; Pogany, J.; Hafren, A.; and Makinen, K. Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology*, 411:374-382, 2011.
- Neves, M.; Trombin, V.G.; Milan, P.; Lopes, F.F.; Cressoni, F.; Kalaki, R.O. *Retrato da Citricultura Brasileira*. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010.
- Pan, J.L. & Bardwell, J.C.A. Review: The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Science*, 15:2217-2227, 2006.
- Pelton, J.G.; Torchia, D.A.; Meadow, N.D. & Roseman, S. Tautomeric states of the active-site histidines of phosphorylated IIIGlc, a signal-transducing protein from *Escherichia coli*, using two-dimensional heteronuclear NMR techniques. *Protein Science*, 2:543-558, 1993.
- Peterson, M.R.; Hall, D.R.; Berriman, M.; Nunes, J.A.; Leonard, G.A.; Fairlamb, A.H.; and Hunter, W.N. The Three-dimension Structure of a *Plasmodium falciparum* Cyclophilin in Complex with the Potent Anti-malarial Cyclosporin A. *J. Mol. Biol.*, 298:123-133, 2000.
- Piotukh, K.; Gu, W.; Kofler, M.; Labudde, D.; Helms, V.; Freund, C. Cyclophilin A Binds to Linear Peptide Motifs Containing a Consensus that is Present in many Human Proteins. *J. Biol. Chem.*, 280:23668-23674, 2005.
- Poschmann, J.; Drouin, S.; Jaques, P-E.; El Fadili, K.; Newmarch, M.; Robert, F.; and Ramotar, D. The Peptidyl Prolyl Isomerase Rrd1 regulates the elongation of RNA Polymerase II during Transcriptional Stresses. *PLoS ONE*, 6(8):e23159, 2011.
- Powis, G. & Montfort, W.R. Properties and Biological Activities of Thioredoxins. *Annu. Biophys. Biomol. Struct.*, 30:421-455, 2001.
- Rassow, J.; Mohrs, K.; Koidl, S.; Barthelmess, I.B.; Pfanner, N.; and Tropschug, M. Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Mol. Cell Biol.*, 15:2654-2662, 1995.
- Roden, J.; Eardley, L.; Hotson, A.; Cao, Y.; and Mudgett, M.B. Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plants cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17:633-543, 2004.
- Rodrigues Neto, J. & Baldini Ribeiro, J.G. Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico, 2002. Editado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento /SDA/DDIV – Brasília.

- Römer, P.; Hahn, S.; Jordan, T.; Strauss, T.; Bonas, U.; and Lahaye, T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318:645-648, 2007
- Römer, P.; Strauss, T.; Hahn, S.; Scholze, H.; Morbitzer, R.; Grau, J.; Bonas, U.; and Lahaye, T. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol.*, 150:1697-1712, 2009.
- Rooney, H.C.; Vant Klooster, J.W.; Van Der Hoorn, R.A.; Jones, J.D.; and De Wit, P.J. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, 308(5729):1783-1786, 2005.
- Sato, K.; Mori, H.; Yoshida, M.; and Mizushima, S. Characterization of a potential catalytic residue, Asp-133, in the high affinity ATP-binding site of *Escherichia coli* SecA, Translocation ATPase. *J. Biol. Chem.*, 271(29):17439-17444, 1996.
- Sattler, M.; Schleucher, J.; and Griesinger, C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, 34:93-158, 1999.
- Schaad, N.W.; Postnikova, E.; Lacy, G.; Sechler, A.; Agarkova, I.; Strmberg, P.E.; Stromberg, V.K.; and Vidaver, A.K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2:690-695, 2006.
- Schorneck, S.; Meyer, A.; Römer, P.; Jordan, T.; and Lahaye, T. Gene-for-gene mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant Physiol.*, 163(3):256-272, 2006.
- Sekhon, S.S.; Kauer, H.; Dutta, T.; Singh, K.; Kumari, S.; Kang, S.; Park, G.; Park, B.C.; Jeong, D.G.; Pareek, A.; Woo, E.J.; Singh, P.; and Yoon, T.S. Structural and biochemical characterization of the cytosolic wheat cyclophilin TaCypA-1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 69:555-563, 2013.
- Shindo, T. & Van Der Hoorn, R.A.L. Micro-Review: Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathology*, 9(1):119-125, 2008.
- Singh, N.; Ma, Z.; Gemmill, T.; Wu, X.; Defiglio, H.; Rossetini, A.; Rabeler, C.; Beane, O.; Morse, R.H.; Palumbo, M.J.; and Hanes, S.D. The Ess1 prolyl isomerase is required for transcription termination of small non-coding RNAs via the Nrd1 pathway. *Mol. Cell*, 36:255-266, 2009.
- Slupsky, C.M.; Boyko, R.F.; Booth, V.K.; and Sykes, B.D. Smartnotebook: a semi-automated approach to protein sequential NMR resonance assignments. *J. Biomol. NMR*, 27(4):313-321, 2003.
- Sobennikova, M.V.; Shematorova, E.K.; and Shpakovskii, G.V. C-terminal domain (CTD) of the subunit Rpb1 of nuclear RNA polymerase II and its role in the transcription cycle. *Mol. Biol.*, 41:433-449, 2007.
- Solé, V.A.; Papillon, E.; Cotte, M.; Walter, Ph.; Susini, J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta Part B*, 62:63-68, 2007.

- Sun, X.; Stall, R.E.; Jones, J.B.; Cubero, J.; Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Dixon, W.N.; Schubert, T.S.; Chaloux, P.H.; Stromberg, V.K.; Lacy, G.H.; and Sutton, B.D. Detection and characterization of a new strain of citrus bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Dis.*, 88:1179-1188, 2004.
- Swarup, S.; de Feyter, E.; Bransky, R.H.; and Gabriel, D.W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology*, 81:802-809, 1991.
- Swarup, S.; Yang, Y.; Kingsley, M.T.; and Gabriel, D.W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Microbe-Plant Interact.*, 5:204-213, 1992.
- Szurek, B.; Marios, E.; Bonas, U.; and Van den Ackerveken, G. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, 26(5):523-534, 2001.
- Szurek, B.; Rossier, O.; Hause, G.; and Bonas, U. Type III dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.*, 46:13-23, 2002.
- Tampakaki, A.P.; Fadoulglou, V.E.; Grazi, A.D.; Panopoulos, N.J.; and Kokkinidis, M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.*, 6:805-816, 2004.
- Taylor, M.A.J.; Baker, K.C.; Briggs, G.S.; Connerton, I.F.; Cummings, N.J.; Pratt, K.A.; Revell, D.F.; Freedman, R.B.; and Goodenough, P.W. Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinases IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Prot. Eng.*, 8:59-62, 1995.
- Taylor, P.; Page, A.P.; Kontopidis, G.; Husi, H.; and Walkinshaw, M.D. The X-ray structure of a Divergent cyclophilin from the nematode parasite *Brugia malayi*. *FEBS Letters*, 425:361-366, 1998.
- Taylor, P.; Dornan, J.; Carrello, A.; Minchin, R.F.; Ratajczak, T.; and Walkinshaw, M.D. Two Structures of Cyclophilin 40: Folding and Fidelity in the TPR Domains. *Structure*, 9:431-438, 2001.
- Thali, M.; Bukovsky, A.; Kondo, E.; Rosenwirth, C.; Walsh, T.; Sodroski, J.; and Göttlinger, H.G. Functional association of cyclophilin A with HIV-I virions. *Nature*, 372:363-365, 1994.
- Trivedi, D.K.; Yadav, S.; Vaid, N.; and Tuteja, N. Genome wide analysis of Cyclophilin gene family from rice and *Arabidopsis* and its comparison with yeast. *Plant Signal. Behav.*, 7:1-14, 2012.
- Trupkin, S.A.; Mora-García, S.; and Casal, J.J. The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant J.*, 71:712-723, 2012.
- Van Der Hoorn, R.A.L. & Jones, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Op. in Plant Biology*, 7:400-407, 2004.

- Verniere, C.; Hartung, J.S.; Pruvost, O.P.; Civerolo, E.L.; Alvarez, A.M.; Maestri, P.; and Luisetti, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104:477-487, 1998.
- Vignols, F.; Mouaheb, N.; Thomas, D.; and Meyer, Y. Redox Control of Hsp70-Co-chaperone Interaction Revealed by Expression of a Thioredoxin-like *Arabidopsis* Protein. *J. Biol. Chem.*, 278(7):4516-4523, 2003.
- Vranken W.F.; Boucher, W.; Stevens, T.J.; Fogh, R.H.; Payon, A.; Llinas, P.; Ulrich, E.L.; Markley, J.L.; Ionides, J.; and Laue, E.D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins – Structure Function and Bioinformatics*, 59:687-696, 2005.
- Wang, P. & Heitman, J. The Cyclophilin. *Genome Biology*, 6(7):226, 2005.
- Watson, W.H.; Yang, X.; Choi, Y.E.; Jones, D.P.; and Kehrer, J.P. Review: Thioredoxin and Its Role in Toxicology. *Toxicological Sciences*, 78:3-14, 2004.
- Webb, M.A.; Cavaletto, J.M.; Klanrit, P.; and Thompson, G.A. Orthologs in *Arabidopsis thaliana* of the Hsp70 interacting protein Hip. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3):247-255, 2001.
- Wu, X.; Wilcox, C.B.; Devasahayam, G.; Hackett, R.L.; Arévalo-Rodríguez, M.; Cardenas, M.E.; Heitman, J.; and Hanes, S.D. The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.*, 19:3727-3738, 2000.
- Wu, X.; Rossetini, A.; and Hanes, S.D. The Ess1 prolyl Isomerase and Its Supressor BYE1 Interact with RNA Pol II to Inhibit Transcription Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 165:1687-1702, 2003.
- Xu, Y. & Maley, J. L. Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle. *Genes Dev.*, 21:2950-2962, 2007.
- Xu, H. & Freitas, M.A. A mass accuracy sensitive probability based scoring algorithm for database searching of tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*, 8:133, 2007.
- Yang, Y.; de Feyter, R.; and Gabriel, D.W. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of pthA and avrb6, respectively. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7:345-355, 1994.
- Yang, Y. & Gabriel, D.W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8:627-631, 1995.
- Yang, J.; Roe, S.M.; Cliff, M.J.; Williams, M.A.; Ladbury, J.E.; Cohen, P.T.W.; and Barford, D. Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J.*, 24:1-10, 2005.

7. ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO EM JULHO DE 2012 NA REVISTA PLOS ONE, NO QUAL PARTICIPO COMO CO-PRIMEIRA AUTORA.

TAL Effectors Target the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II (CTD) by Inhibiting the Prolyl-Isomerase Activity of a CTD-Associated Cyclophilin

Mariane Noronha Domingues¹, Bruna Medeira de Campos¹, Maria Luiza Peixoto de Oliveira, Uli Quirino de Mello, Celso Eduardo Benedetti*

Laboratório Nacional de Biotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brazil

Abstract

Transcriptional activator-like (TAL) effectors of plant pathogenic bacteria function as transcription factors in plant cells. However, how TAL effectors control transcription in the host is presently unknown. Previously, we showed that TAL effectors of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri*, named PthAs, targeted the citrus protein complex comprising the thioredoxin CstDx, ubiquitin-conjugating enzymes CsUev/Ubc13 and cyclophilin CsCyp. Here we show that CsCyp complements the function of Cpr1 and Ess1, two yeast cyclophilins that regulate transcription by the isomerization of proline residues of the regulatory C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II. We also demonstrate that CsCyp, CstDx, CsUev and four PthA variants interact with the citrus CTD and that CsCyp co-immunoprecipitate with the CTD in citrus cell extracts and with PthA2 transiently expressed in sweet orange epicotyls. The interactions of CsCyp with the CTD and PthA2 were inhibited by cyclosporin A (CsA), a cyclophilin inhibitor. Moreover, we present evidence that PthA2 inhibits the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity of CsCyp in a similar fashion as CsA, and that silencing of CsCyp, as well as treatments with CsA, enhance canker lesions in *X. citri*-infected leaves. Given that CsCyp appears to function as a negative regulator of cell growth and that Ess1 negatively regulates transcription elongation in yeast, we propose that PthAs activate host transcription by inhibiting the PPIase activity of CsCyp on the CTD.

Citation: Domingues MN, de Campos BM, de Oliveira MLP, de Mello UQ, Benedetti CE (2012) TAL Effectors Target the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II (CTD) by Inhibiting the Prolyl-Isomerase Activity of a CTD-Associated Cyclophilin. PLoS ONE 7(7): e41553. doi:10.1371/journal.pone.0041553

Editor: John W. Stiller, East Carolina University, United States of America

Received: May 4, 2012; **Accepted:** June 24, 2012; **Published:** July 20, 2012

Copyright: © 2012 Domingues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: celso.benedetti@lnbio.org.br

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Xanthomonas citri, the bacterial pathogen responsible for citrus canker, induces hyperplastic lesions and pustule formation on the host epidermis which result from the increased division and expansion of the plant cells at the site of infection [1]. Global transcriptional analysis of sweet orange leaves challenged with *X. citri* revealed that the bacterium induces major changes in the transcription of genes associated with cell division and growth [2]. Surprisingly, many of the *X. citri*-induced genes, including those encoding cellulases and expansins, involved in cell-wall remodeling, were found to be similarly regulated by auxin and gibberellin, but most importantly, both auxin and gibberellin were shown to be required for initial canker development [3]. Although these data support the idea that *X. citri* promotes cell division and enlargement through changes in the auxin and gibberellin signaling pathways, how exactly the bacterium reprograms transcription in the host is not entirely clear.

It has been shown that the *X. citri* PthA protein, a member of the AvrBs3/PthA family of transcriptional activator-like (TAL) effectors, is not only required for canker elicitation but sufficient to promote cell hypertrophy in citrus leaves [1,4–7]. TAL effectors of the AvrBs3/PthA protein family are translocated into the plant cell

by the type-III secretion system and targeted to the nucleus where they function as transcriptional activators [8]. These proteins have the ability to activate transcription in host and non host plants through the recognition of specific *cis*-acting elements located in the promoters of target genes [9–12]. The interaction of a TAL effector with its target DNA is mediated by the repeat domain, an internal region of the protein comprising variable, nearly identical tandem repeats of 34 amino acids that define the DNA specificity and determines pathogenicity and avirulence [13,14].

Previously, we showed that the PthA variants 1–4 from a single *X. citri* strain can form homo and heterodimers. In addition, all PthA variants were shown to interact with the citrus nuclear transporter alpha-importin and to localize to plant cell nucleus [15]. Moreover, structural data obtained for the repeat region of the PthA2 variant (RD2) indicated that this protein domain folds into a tetratricopeptide repeat (TPR) superhelix that is structurally related to pentatricopeptide repeat (PPR) motifs known to bind and stabilize mRNAs [16]. The superhelical structure of RD2 was predicted to wrap around the DNA double helix and to undergo compaction upon DNA interaction [16], an idea that was confirmed by recent studies on the three-dimensional structure of the repetitive DNA-binding domain of TAL effectors alone and in complex with DNA [17,18]. However, despite the advances in

the understanding of both the structure and function of TAL effectors, little is still known of how these proteins interact with the host basal transcriptional machinery to activate or modulate transcription.

To address this question, we performed yeast two-hybrid screenings using different PthA variants as baits and identified a number of *Citrus sinensis* (Cs) proteins implicated in protein folding, mRNA stabilization/processing, gene silencing and DNA repair [15,19]. Among the isolated proteins we started by characterizing a protein complex formed by a cyclophilin (CsCyp), a TPR-containing thioredoxin (CsTdx) and the CsUev/Ubc13 heterodimer involved in K63-linked ubiquitination and DNA repair [15]. Because CsCyp is homologous to ROC1, an *Arabidopsis* prolyl isomerase required for the activation of the bacterial effector protein AvrRpt2 inside the host cell [20], and the mammalian Uev/Ubc13 heterodimer is a component of the U-box ubiquitin ligase CHIP complex [21], we initially hypothesized that the PthA interactors CsCyp, CsTdx and CsUev/Ubc13 might be part of a chaperone complex required for the folding and/or activation of PthAs [15]. However, the fact that recombinant PthA is structured and functional [16] indicates that proline isomerization by CsCyp is not critical for PthA folding or action and that CsCyp may play a different role than that of ROC1.

CsCyp is related to yeast Cpr1, a cyclophilin that regulates gene silencing and controls meiosis through interactions with the histone deacetylase complexes Sin3-Rpd3 and Set3 [22,23]. Cpr1 also interacts with and complements the function of Ess1, another prolyl-isomerase regarded as a component of the RNA polymerase II initiation and termination machineries [24,25]. Ess1 is required for 3'-end formation of pre-mRNAs and transcription termination of small non-coding RNAs, but it also associates with promoter sites and inhibits transcription elongation in yeast [24–29].

The mechanism by which Ess1 affects transcriptional machinery involves its peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity on the proline residues of the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase (pol) II [25–27,30]. The CTD consists of multiple tandem repeats of the consensus YSPTSPS heptapeptide which play a key role in the transcriptional cycle [31,32]. The CTD undergoes conformational changes in response to serine phosphorylation and proline isomerization of its YSPTSPS repeats, and the cycling of serine phosphorylation/dephosphorylation and proline isomerization within the repeats control the recruitment and exchange of RNA processing factors that ultimately regulates the progress of transcription [25,30–32]. Given that Cpr1 interacts with Ess1 and with histone deacetylase complexes involved in gene silencing and it becomes essential in yeast cells when the Ess1 function is compromised [22–24], we decided to investigate whether CsCyp could play a similar role in the control of transcription through an interaction with the CTD of the citrus RNA pol II.

Here we show that CsCyp not only suppressed the *cpr1* and *ess1* mutations in yeast but interacted with the citrus CTD. Moreover, we found that both PthA2 and the CTD co-immunoprecipitate with CsCyp in citrus cell lysates and that PthA2 inhibited the PPIase activity of CsCyp in a similar fashion as the cyclophilin inhibitor cyclosporin A (CsA). Notably, sweet orange RNAi plants with reduced CsCyp levels produced much larger canker lesions when challenged with *X. citri*, in comparison to normal plants.

Taken together, our data provide the first direct evidence for the concept that TAL effectors influence the progress of transcription through modulation of the activity of CTD accessory proteins.

Materials and Methods

Functional complementation of yeast mutants

The cDNA encoding the CsCyp protein [15] was subcloned into the yeast pYEX4T vector (Clontech) for the expression of the glutathione-S transferase (GST)-CsCyp fusion protein upon copper induction. The yeast mutant 33513 (*cpr1Δ::kanMX4/cpr1Δ::kanMX4*) [23] was transformed with the pYEX4T-CsCyp construct or the empty vector (GST control) and the recombinant proteins were analyzed by western blot.

For sporulation assays, cells were first incubated at 30°C for 48 h in pre-sporulation medium (0.8% yeast extract, 0.3% peptone, 6% glucose and 2% agar) and subsequently transferred to sporulation medium (1% potassium acetate, 0.1% yeast extract, 0.05% glucose and 2% agar) for 72 h. Cultures were grown to an optical density of 1.0 at 600 nm and the percentage of asci was estimated by counting the number of asci in the cell population at different time points after transfer of the cells to the sporulation medium. On average, ten microscopic field images chosen randomly from each time point were inspected for the countings.

The yeast wild-type strain W303-1A (*MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 [psi+]*) and its *ess1*^{H164R} mutant derivative [24], transformed with the pYEX4T-CsCyp or the empty vector, were grown in SC-Leu-Ura plates at 30°C for 7 days.

For qualitative analysis of growth in permissive and non-permissive temperatures, liquid cultures were grown to mid-log phase in YPD medium and serial 1:5 dilutions were spotted onto plates and incubated for 24 h at 21°C or 37°C [24].

Yeast two-hybrid assays

The DNA fragment corresponding to the C-terminal domain of the *Citrus sinensis* RNA pol II was amplified from the EST EY725107 with oligos CATATGCCTTATGTTGGTG-GAATGGCCTTC and GCGGCCGCTTAACGT-GAGCTCTGTCACC and cloned into the *NdeI*/*NotI* sites of pOBD/pOAD vectors [33]. The constructs were verified by DNA sequencing and used as baits/preys in two-hybrid assays, as described previously [15]. Bait (pOBD) and prey (pOAD) constructs, including controls (empty pOBD+pOAD-prey and pOBD-bait+empty pOAD), were used to co-transform *Saccharomyces cerevisiae* strain PJ694a (*MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4D gal80D LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) [34]. The cells were grown for 5 days at 30°C on SC medium lacking tryptophan (–Trp), leucine (–Leu) and histidine (–His) in the presence or absence of adenine (–/+Ade), and containing up to 5 mM 3-aminotriazole (3AT).

Protein purification and GST-pulldown assays

The 6×His-tagged proteins including CsCyp, full length PthA2 and its truncations were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and purified by affinity chromatography, as previously described [15]. After purification, the 6×His tag was cleavage with thrombin at 16°C for 16 hours and used in the pulldown assays.

The CTD was subcloned into the *SalI*/*NotI* sites of pGEX-4T and expressed in BL21(DE3) cells after isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction for 2 h at 30°C. Cell pellets were suspended in phosphate buffered saline (PBS) containing 1 mM dithiothreitol (DTT) and lysozyme. After sonication and centrifugation, soluble fractions of GST fusions were immobilized on glutathione resin and non-bound proteins were removed with three PBS washes. Approximately 50 μM of the 6×His tagged proteins were incubated with the resins containing GST, GST-

CTD or GST-CsCyp for 2 h at 4°C in the presence or absence of 150 µM CsA. The beads were washed four times with PBS and the resin-bound proteins were resolved on 13% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred onto nylon membranes and probed with the anti-PthA (1:5000), anti-CsCyp (1:3000) or anti-GST (1:3000) sera (Sigma-Aldrich) and developed with the ECL kit (GE Healthcare).

PPIase assay

The PPIase assay was performed according to Kofron et al. [35]. PPIase activity was measured by the release of the *p*-nitroanilide, which results from the chymotrypsin cleavage of the cyclophilin chromogenic substrate *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (*N*-succinyl-AAPF-*p*-nitroanilide) after its prolyl *cis-trans* isomerization. *N*-succinyl-AAPF-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) was dissolved in 470 nM LiCl in trifluoroethanol to maximize the amount of peptide present as the *cis*-isomer. Purified CsCyp without the 6×His tag (~15 nM) was incubated in the reaction buffer (50 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl) and allowed to stabilize at 10°C for 5 min. Purified full-length PthA2, its internal repetitive DNA-binding domain (RD2), its C-terminal domain carrying 5.5 repeat units (5.5 rep+CT), CsA or bovine serum albumin (BSA), as negative control, were added to the reaction mix to a final concentration of 15 to 30 nM. The reaction started by adding 1 mg of α-chymotrypsin followed by the peptide substrate to a final concentration of 100 µM. The PPIase reaction was monitored at 390 nm for a period of 5 min.

Protein immunoprecipitation (IP)

Sweet orange epicotyls transiently expressing PthA2 [15] or citrus leaves were macerated in lysis buffer, PBS pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), containing protease inhibitors (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg.mL⁻¹ aprotinin, 1 mg.mL⁻¹ pepstatin and 1 mg.mL⁻¹ leupatin). The cell lysates were immunoprecipitated with the polyclonal anti-CsCyp (1:50), the monoclonal anti-human RNA pol II, clone 8WG16 (1:40; Santa Cruz Biotechnology), or with a pre-immune sera as control. Bound proteins immobilized in Protein A beads (PIERCE) were separated by SDS-PAGE and immunodetected with the anti-PthA (1:3000), anti-CsCyp (1:3000) or the anti-RNA pol II sera (1:200).

Co-localization assays

Nuclear co-localization of PthA and CsCyp was performed in *Nicotiana benthamiana* cells. The constructs expressing the PthA2-GFP and CsCyp-DsRed fusion proteins [15] were each inserted into the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with a suspension of both the PthA2-GFP and CsCyp-DsRed-transfected *Agrobacterium* cells, and the infiltrated leaf sectors were visually inspected by fluorescence microscopy, as described previously [15].

Citrus transformation and RNAi

A DNA region of 502 bp corresponding to the cyclophilin domain of CsCyp was amplified with oligos RNAi-F 5'-TCTAGACTCGAGATGACCGTCGGCGGTCAGCC-3' and RNAi-R 5'-ATCGATGGTACCCGCAATCAGCGATCAGACGG-3' and cloned in opposite directions in the pHANNI-BAL vector (CSIRO), as described by Wesley et al. [36]. The whole hairpin construct under the control of the 35S promoter was subcloned into the binary pCambia1303 vector (Cambia, Australia). The construct was verified by DNA sequencing and moved into the *A. tumefaciens* EHA105. Etiolated epicotyls of sweet

orange 'Natal' were transformed with the *Agrobacterium* cells carrying the CsCyp hairpin construct, as described previously [37]. Explants were selected in MS basal medium containing hygromycin (5 mg/L). Selected plants were analyzed by PCR for the presence of the transgene using oligos derived from the 35S promoter and CsCyp hairpin. Transgenic plants were also assayed for the histological beta-glucuronidase (GUS) activity [38]. Leaves of PCR and GUS positive plants were analyzed by western blot using the anti-CsCyp serum (1:3000).

Bacterial infiltration and CsA treatment

Six-month-old plants of sweet orange (*C. sinensis*) were obtained from certified nurseries and kept in a green-house with minimum and maximum temperatures of 22 to 35°C and ~70% relative humidity. *X. citri* strain 306 was grown for 48 h at 30°C on LBON medium containing ampicillin [2]. Cells were suspended in water and counted through serial dilutions and plating. Leaves were infiltrated with approximately 0.1 mL of a *X. citri* suspension (~2×10⁵.mL⁻¹ cells) in the absence and presence of CsA at 0.1 and 0.5 mM final concentrations. Leaves of the CsCyp RNAi plants were challenged with *X. citri* in the absence of CsA.

Results

CsCyp complements the yeast *cpr1* and *ess1* mutants

Because CsCyp is a nuclear protein [15] and is 64% identical to yeast Cpr1, we tested whether it could complement the *cpr1* mutation, which affects meiosis and sporulation in yeast [23]. CsCyp was expressed in the yeast *cpr1Δ/cpr1Δ* mutant [23] as a GST-fusion upon copper induction (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B, CsCyp significantly increased the rate of sporulation in the *cpr1* double mutant, compared to GST alone in copper-containing medium, suggesting that CsCyp is the functional homolog of Cpr1. In addition, because Cpr1 physically interacts with Ess1 in yeast and suppresses the *ess1* mutation, we tested whether CsCyp could also rescue the yeast *ess1*^{H164R} mutant, which shows cell cycle defects and is compromised in cell viability [22,24]. Thus, GST-CsCyp was expressed in the yeast thermo-sensitive *ess1*^{H164R} mutant [24] upon copper induction (Fig. 1A). Similar to Cpr1, CsCyp suppressed the *ess1*^{H164R} mutation and restored the growth of the *ess1* mutant at the non-permissive temperature (Fig. 1C), indicating that its PPIase activity complements that of Ess1. These results therefore suggest that CsCyp could play similar roles in citrus cells as Cpr1 and Ess1 in yeast.

CsCyp and CsTdx interact with the CTD

The fact that CsCyp complemented the yeast *cpr1* and *ess1* mutant phenotypes strongly suggested that CsCyp could physically interact with the CTD. To test this assumption, the DNA fragment corresponding to the *C. sinensis* CTD, encoding 36 heptapeptide repeats with the consensus sequence YSPXXPX, was cloned for yeast two-hybrid and GST-pulldown assays. We found that the CTD not only interacted with CsCyp but with CsTdx (Fig. 2A and B), an interacting partner of CsCyp [15]. Interestingly, a weak interaction between the CTD and CsUev, but not CsUbc13, was also noticed (Fig. 2B), indicating that the citrus protein complex comprising CsCyp, CsTdx and the CsUev/Ubc13 heterodimer identified previously as a target of PthAs [15] is associated with the CTD.

To test whether CsCyp associates with the CTD *in vivo*, we immunoprecipitated CsCyp from cell lysates of sweet orange leaves using the anti-CsCyp serum and probed the interacting partners with a monoclonal antibody directed against the largest subunit of the human RNA pol II, which comprises the CTD. As

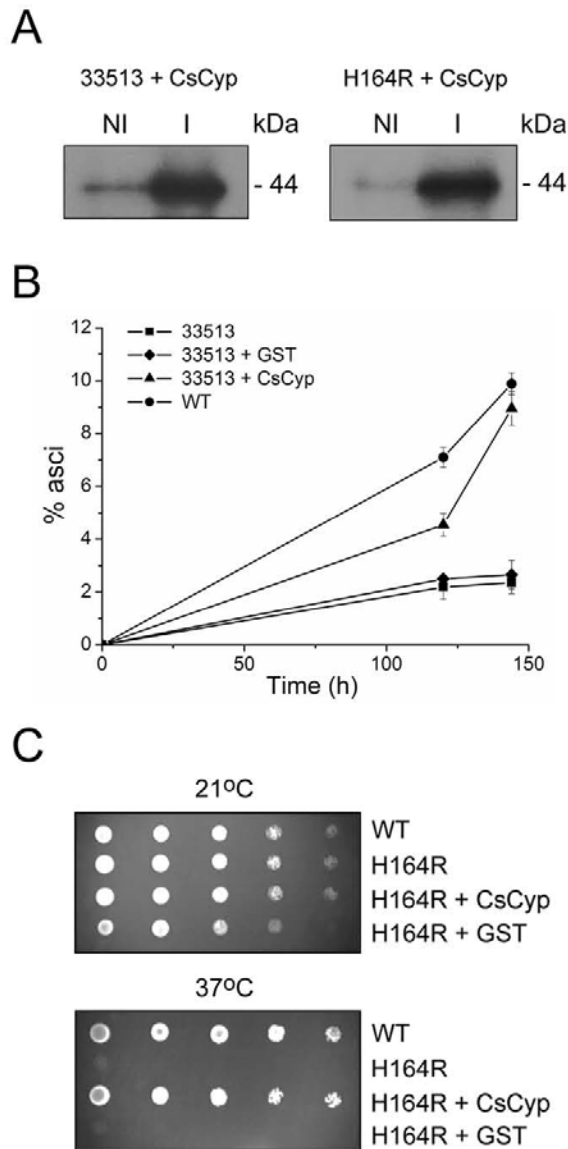


Figure 1. CsCyp complements the *cpr1Δ/cpr1Δ* and *ess1^{H164R}* yeast mutants. (A) Expression of CsCyp as a GST fusion in the yeast *cpr1Δ/cpr1Δ* (33513) and *ess1^{H164R}* mutants, under the control of a copper-induced promoter. The recombinant proteins were induced with 0.5 mM copper sulfate for 2 h and probed with the anti-GST serum. Induced (I) and non-induced (NI) samples are shown. (B) The *cpr1Δ/cpr1Δ* mutant expressing GST-CsCyp (▲) but not GST alone (◆) increased the rates of sporulation of the 33513 mutant, relative to non-transformed cells (■). Wild type cells used as reference are indicated (●). Sporulation was measured at different time points after transfer of the cells to sporulation medium and plotted as the percentage of asci formed. Measurements are the means of ten independent countings and the error bars represent standard deviations. (C) Growth of W303-1A wild-type (WT) and *ess1^{H164R}* mutant (H164R) in YPD medium supplemented with 0.1 mM copper sulfate at the permissive (21°C) and non-permissive (37°C) temperatures. Cells were grown to the mid-log phase and serial dilutions were spotted onto plates and incubated for 24 h at the indicated temperatures. The growth of the *ess1^{H164R}* mutant at 37°C was rescued by GST-CsCyp but not GST alone. Non-transformed

WT and *ess1^{H164R}* cells served as controls.
doi:10.1371/journal.pone.0041553.g001

shown in Fig. 2C, the anti-human RNA pol II antibody cross-reacted with the recombinant citrus CTD and detected higher molecular weight bands in citrus extracts suggesting that it recognizes the largest subunit of the citrus RNA pol II. The anti-human RNA pol II antibody detected a minor band of approximately the size of the largest subunit of the citrus RNA pol II (200 kDa) and a major band of ~110 kDa, which may correspond to a fragment of the RNA pol II largest subunit (Fig. 2C). This ~110 kDa and other lower molecular weight bands were immunoprecipitated with the anti-CsCyp and anti-human RNA pol II sera, but not with the CsCyp pre-immune serum (Fig. 2C). Although the presence of such multiple bands indicates degradation of the RNA pol II largest subunit during the IP procedure, it is also possible that the anti-CsCyp serum immunoprecipitated other components of the RNA pol II machinery that are recognized by the anti-human RNA pol II antibody. Similarly, CsCyp was detected in the protein fractions that had been immunoprecipitated with the anti-CsCyp and anti-human RNA pol II sera, but not with the CsCyp pre-immune serum, indicating that CsCyp is associated with the CTD *in vivo*.

The interaction of CsCyp with the CTD was further confirmed by GST-pulldown. Most significantly however, this interaction was strongly reduced by the cyclophilin inhibitor CsA (Fig. 2D), suggesting that CsCyp interacts with the CTD through its active site.

PthA variants interact with the CTD through their LRR region

The observation that the CTD interacted with CsCyp and CsTdx led us to investigate whether it would also interact with the *X. citri* PthA variants. Surprisingly, we found that the CTD physically interacts with the four PthA variants in yeast two-hybrid assays (Fig. 3A).

To map the PthA region responsible for such interactions, we performed two-hybrid assays using the repeat regions of the four PthA variants and truncated versions of PthA2 [15] as baits. We found that the variable repeat regions of PthAs, required for DNA recognition, did not interact with the CTD (Fig. 3B). However, the leucine-rich repeat (LRR) domain, which is identical to all PthAs and is located adjacently to the acidic C-terminal transactivation domain, was sufficient for the interaction (Fig. 3C). Curiously, the truncated version of PthA2 carrying 5.5 repeat units plus the C-terminal domain carrying the LRR region interacted more weakly with the CTD than the LRR region alone (Fig. 3C). The interaction between PthA2 with the CTD was also confirmed by GST-pulldown (Fig. 3D).

PthA2 binds to CsCyp in vivo and co-localizes with CsCyp in the nucleus

We next investigated whether PthA2 could bind CsCyp in citrus cells. Thus, cell lysates of sweet orange epicotyls expressing PthA2 were incubated with the anti-CsCyp serum and the immunoprecipitate was analyzed by western blot with the anti-PthA serum. Fig. 4A shows that the anti-CsCyp serum immunoprecipitated PthA2 transiently expressed in citrus cells, thereby confirming that PthA2 and CsCyp interact with each other *in vivo*. This result was further supported by the observation that PthA2 co-localizes with CsCyp in the nucleus of *Nicotiana benthamiana* cells (Fig. 4B), corroborating our previous data [15].

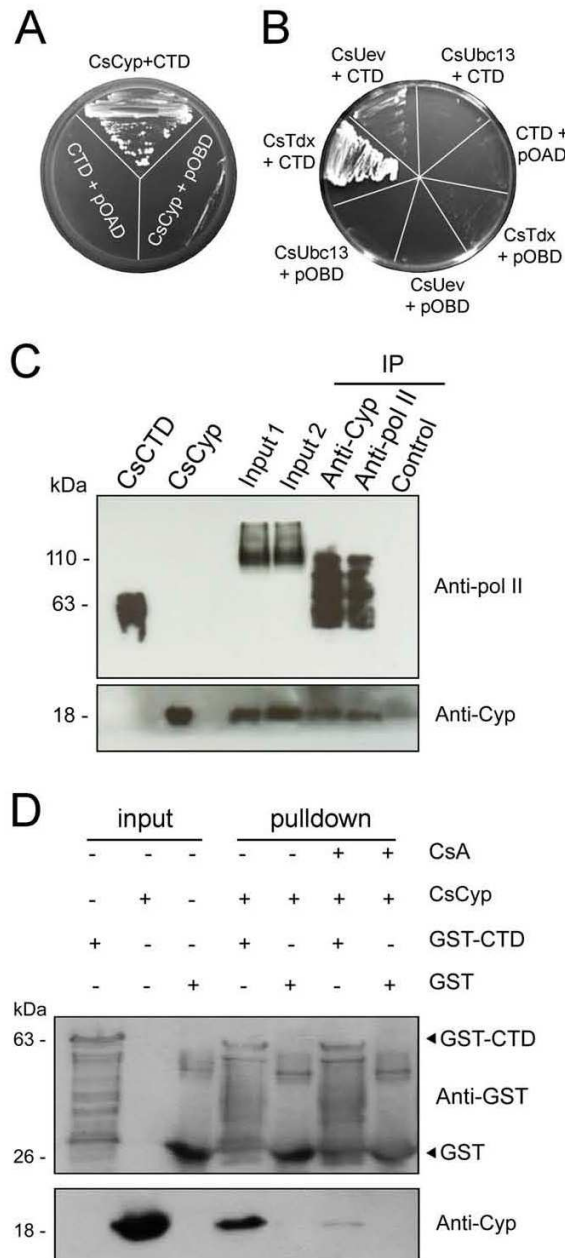


Figure 2. Interactions of the CTD of the citrus RNA polymerase II with CsCyp. (A) Yeast two-hybrid assay showing the interaction between CsCyp (pOAD-CsCyp) and the *C. sinensis* CTD (pOBD-CTD). Control yeast cells co-transformed with the bait (pOBD-CTD) plus empty pOAD or the prey (pOAD-CsCyp) plus empty pOBD are indicated. (B) Yeast two-hybrid assay showing interactions between the CTD with CsTdx (pOAD-CsTdx) and CsUev (pOAD-CsUev), but not CsUbc13 (pOAD-CsUbc13). Yeast cells were co-transformed with the bait plus empty pOAD (CTD+pOAD) or the preys CsTdx, CsUev, CsUbc13 plus empty pOBD as controls. (C) Western blot of immunoprecipitation (IP) reactions showing that the anti-human RNA pol II (anti-pol II) cross-reacted with the recombinant citrus CTD (CsCTD) and with proteins from the citrus cell extracts treated with DNase I (Input 1) or not (Input 2), including a major band of ~110 kDa. The anti-pol II serum detected

various bands in the protein fractions that were immunoprecipitated by the anti-CsCyp and anti-pol II sera, but not by the CsCyp pre-immune serum (control). The anti-CsCyp serum (Anti-Cyp) also detected the recombinant CsCyp and CsCyp that were immunoprecipitated by the anti-CsCyp and anti-pol II sera, but not by the CsCyp pre-immune serum. (D) GST-pulldown assay using the GST-CTD as bait and purified CsCyp without the 6×His tag as prey. Protein samples were electrophoresed and probed with the anti-GST and anti-CsCyp sera. CsCyp bound to the GST-CTD but not to GST alone. The cyclophilin inhibitor CsA prevented CsCyp from interacting with the CTD. Soluble cell extracts of GST-CTD, GST alone and the purified CsCyp used as inputs are indicated and the molecular sizes of the corresponding proteins are shown on the left.

doi:10.1371/journal.pone.0041553.g002

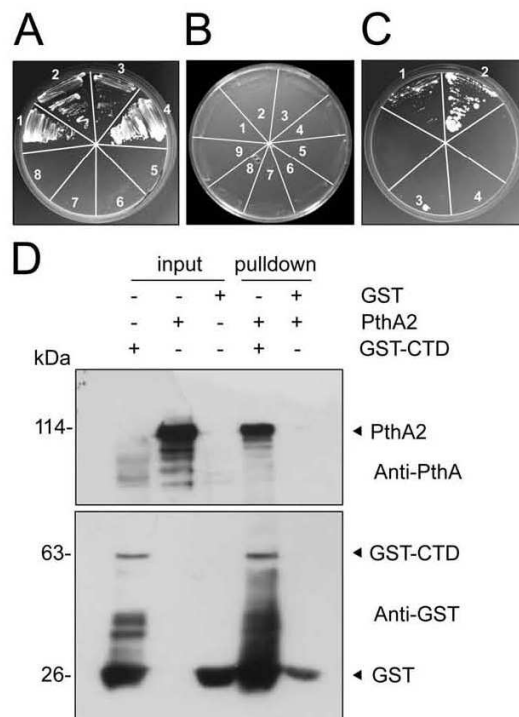


Figure 3. PthA variants interact with the CTD through their LRR region. (A) Yeast two-hybrid assay showing the interaction between the CTD and the four PthA variants (1–4, respectively). Yeast cells co-transformed with the individual pOAD-PthA 1–4 constructs plus empty pOBD (5–8, respectively) were used as controls. (B) No interactions were observed between each of the repeat domains (RDs) of the PthA variants 1–4 (1–4, respectively) with the CTD. Yeast cells co-transformed with the bait pOBD-CTD plus empty pOAD (5) or the preys pOAD-RD 1–4 plus empty pOBD (6–9, respectively), as controls, are indicated. (C) Yeast two-hybrid interactions of the CTD with the truncated version of PthA2 carrying 5.5 internal repeat units plus the C-terminal domain (1) or the LRR region alone (2). Control yeast cells co-transformed with empty pOBD plus the prey constructs pOAD-5.5rep+CT (3) and pOAD-LRR (4) are indicated. (D) GST-pulldown assay using the GST-CTD as bait and purified PthA2 as prey. Protein samples were electrophoresed and probed with the anti-GST and anti-PthA sera. PthA2 bound to the GST-CTD but not to GST alone. Soluble cell extracts of GST-CTD, GST alone and the purified PthA2 used as inputs are indicated and the molecular sizes of the corresponding proteins are shown on the left.

doi:10.1371/journal.pone.0041553.g003

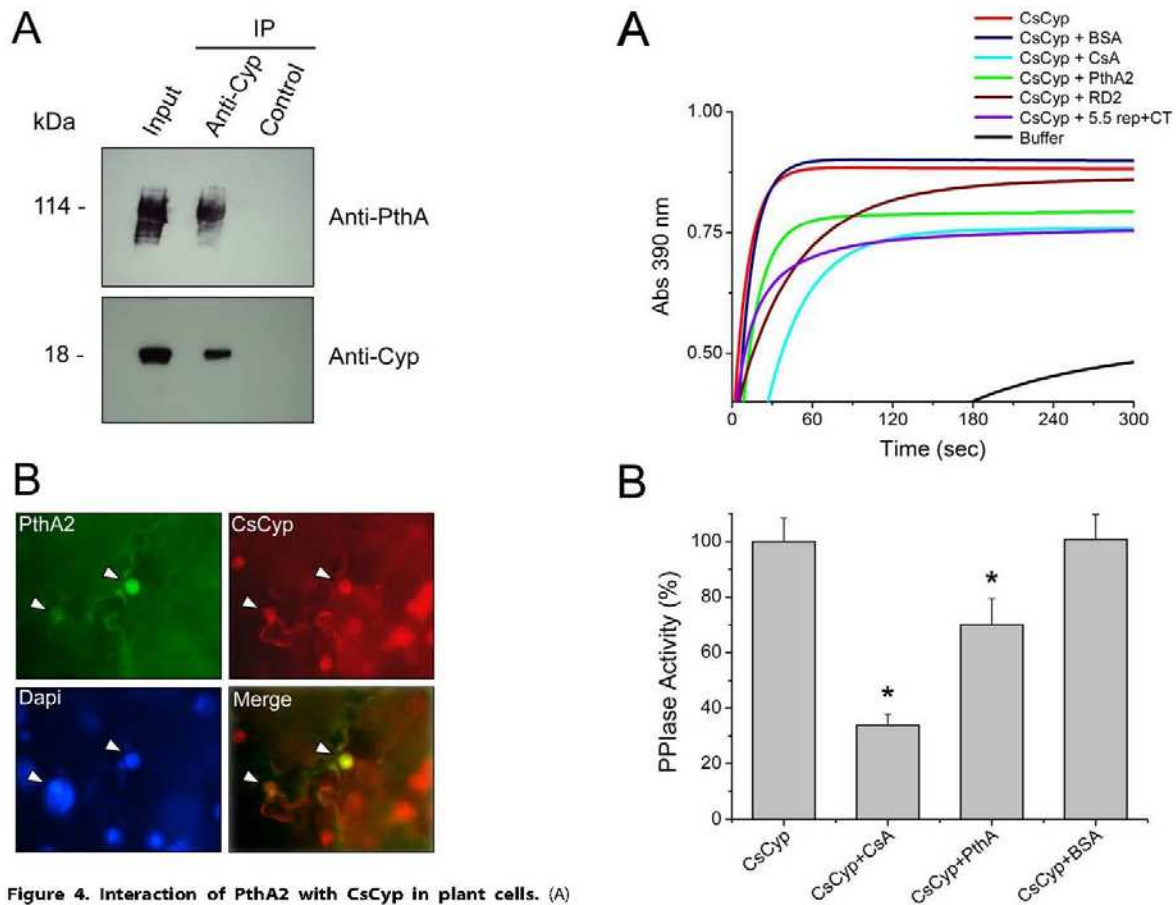


Figure 4. Interaction of PthA2 with CsCyp in plant cells. (A) Immunoprecipitation (IP) assay of PthA2 with the anti-CsCyp serum. Cell extracts of citrus epicotyls transiently expressing PthA2 (input) were incubated with the anti-CsCyp (Anti-Cyp) or the pre-immune serum (control) and protein-A Sepharose. The beads were washed and the bound proteins were resolved on a 13% SDS-polyacrylamide gel and probed with the indicated antibodies. PthA2 was detected in the IP reaction performed with the anti-CsCyp but not with the control pre-immune serum. (B) Co-localization of PthA2 and CsCyp in the nucleus of *N. benthamiana* cells (arrows). Leaf sectors transiently co-expressing PthA2-GFP (PthA2) and CsCyp-DsRed (CsCyp) were treated with Dapi for 10 min before visualization. Pictures were taken in a Nikon fluorescence microscopy at a 1,000 $\times$ magnification and merged using the software provided by the instrument.
doi:10.1371/journal.pone.0041553.g004

PthA2 inhibits the PPIase activity of CsCyp

The interaction of PthA2 with CsCyp suggested that PthA2 might affect the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity of CsCyp. To test this assumption, we first confirmed the PPIase activity of CsCyp by measuring the *cis-trans* conversion and subsequent cleavage of the *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide peptide by CsCyp and α -chymotrypsin, respectively [35]. Maximum PPIase activity was observed within 30 to 60 s after the start of the reaction (Fig. 5A). As expected, CsA strongly inhibited the PPIase activity of CsCyp. Surprisingly, addition of equimolar quantities of purified PthA2, but not BSA, into the reaction mixture caused a significant reduction in the PPIase activity of CsCyp within 30 s of reaction. However, while CsA inhibited the CsCyp activity to less than a half, PthA2 reduced it by approximately 25% (Fig. 5B).

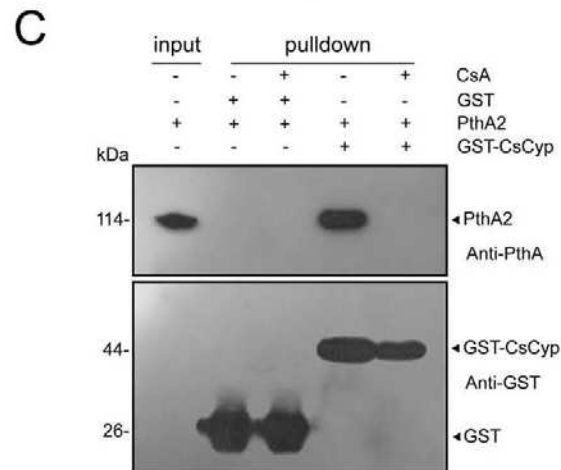


Figure 5. PthA2 inhibits the PPIase activity of CsCyp. (A) The PPIase activity of recombinant CsCyp protein was evaluated by the α -chymotrypsin-coupled assay. Enzyme activity was measured immediately after the addition of α -chymotrypsin and the substrate into the reaction mixture. The PPIase activity of CsCyp reached a plateau within 30 to 60 s after the start of the reaction (red). This activity was drastically reduced in the presence of 30 nM CsA (light blue), as compared to buffer only, as control (black). PthA2 (green), its internal

repetitive DNA-binding domain RD2 (brown), or its C-terminal domain+5.5 internal repeats (purple) but not BSA (dark blue), added into the reaction mixture reduced the PPIase activity of CsCyp in a time-course measurement. (B) PPIase activity of CsCyp in the absence and presence of CsA (30 nM), PthA2 or BSA (15 nM). Activities were the mean of three independent measurements recorded 30 s after the start of the reaction, and the asterisks indicate statistically different means relative to that of normal activity. (C) GST-pulldown assay using the GST-CsCyp as bait and purified PthA2 as prey. Protein samples were electrophoresed and probed with the anti-GST and anti-PthA sera. PthA2 bound to the GST-CsCyp only and the cyclophilin inhibitor CsA abrogated the interaction. Purified PthA2 used as input and the molecular sizes of the corresponding proteins are shown on the left. doi:10.1371/journal.pone.0041553.g005

To know which domain of PthA2 might be responsible for this inhibitory effect, the PPIase reaction was performed in the presence of the repetitive DNA-binding domain (RD2) or the C-terminal carrying 5.5 internal repeats (5.5 rep+CT) of PthA2. Interestingly, RD2 inhibited the PPIase activity of CsCyp to a much lesser extent than the full length PthA2, whereas the 5.5 rep+CT was apparently more effective than PthA2 to inhibit the CsCyp activity (Fig. 5A). This observation is in line with our previous studies on the interaction of CsCyp with RD2 and 5.5 rep+CT [15].

Given that PthA2 inhibited the CsCyp activity (Fig. 5A and B) and that CsA disrupted the CsCyp-CTD interaction (Fig. 2D), we tested whether CsA could also disrupt the PthA2-CsCyp complex. Indeed, CsA prevented PthA2 from binding to CsCyp in GST-pulldown assays (Fig. 5C), suggesting that PthA2 could also bind to the active site of CsCyp.

Silencing of CsCyp or CsA treatments enhance canker symptoms

The data shown above suggested that inhibition of CsCyp by PthA proteins could promote canker development. To test this hypothesis, sweet orange leaves were infiltrated with suspensions of *X. citri* in the presence and absence of CsA. Surprisingly, we found that CsA significantly enhanced canker lesions in a dose-dependent manner (Fig. 6). Leaf sectors infiltrated with *X. citri* plus CsA at 0.1 and 0.5 mM final concentrations showed an increased number of confluent pustules compared to leaf sectors infiltrated with *X. citri* alone (Fig. 6). In addition, pustules from leaf sectors infiltrated with *X. citri* plus CsA developed much faster (10 days after bacterial infiltration) than those infiltrated with *X. citri* only, which typically become pronounced 20 to 30 days after bacteria infiltration. Since CsA alone did not affect the growth of *X. citri* in culture medium or promoted canker in citrus leaves when infiltrated in similar amounts (not shown), our data showing that CsA have a stimulatory effect on canker development supports the idea that PthAs inhibit CsCyp activity *in vivo*.

To further investigate this hypothesis, a CsCyp hairpin construct, comprising the entire cyclophilin domain (Fig. 7A), was expressed in sweet orange plants in order to induce gene silencing [36]. Several transgenic plants carrying the CsCyp hairpin construct were isolated and analyzed by Western blot for the presence of the CsCyp protein. As shown in Fig. 7B, three independent lines of GUS positive RNAi plants showed significantly lower levels of the CsCyp polypeptide than the untransformed control plants, indicating that the hairpin-induced silencing was effective. Although these plants grew normally and showed a phenotype indistinguishable from that of control plants on a visual inspection, they developed more canker symptoms than the untransformed plants when challenged with *X. citri*. Notably, canker lesions in the RNAi plants were substantially enhanced and

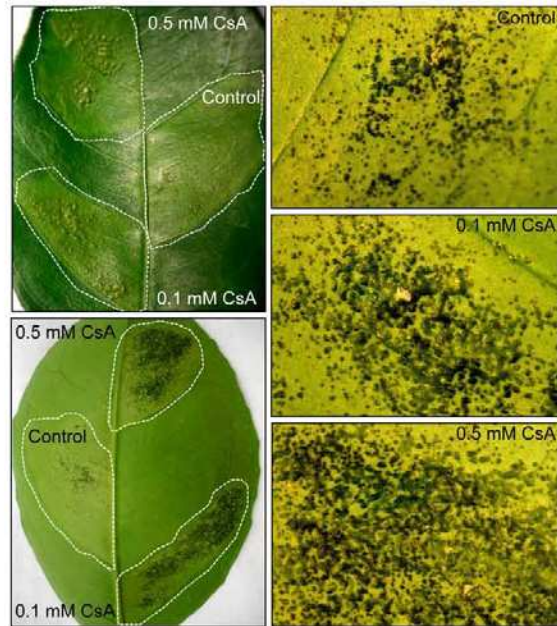


Figure 6. Effect of CsA on citrus canker development. Sweet orange leaves were infiltrated with *X. citri* (approximately 2.0×10^4 cells) in the absence or presence of CsA at 0.1 or 0.5 mM. Canker lesions started to develop one week after bacterial infiltration and were pronounced 14 days after bacterial inoculation, when the pictures were taken (20 $\times$ magnification). Left panels show representative leaf sectors that were infiltrated with water suspensions of *X. citri* plus CsA at 0.1 or 0.5 mM final concentrations, or *X. citri* alone, as control (dotted lines). CsA substantially increased pustule formation and symptom development including tissue hypertrophy and water-soaking, relative to control. The effect of CsA on canker development was dose-dependent as 0.5 mM CsA induced more confluent pustules than 0.1 mM CsA or no CsA (right panels). doi:10.1371/journal.pone.0041553.g006

marked by more confluent, denser and raised pustules (Fig. 7C). Additionally, as observed in the CsA treatment (Fig. 6), canker pustules in the CsCyp RNAi plants developed much faster and produced more rupture of the epidermis than in control plants (Fig. 7D). These results thus show that CsCyp is involved in canker development and functions as a negative regulator or attenuator of cell growth.

Discussion

Although much has been learned recently about the structure, function, target genes and DNA specificity of TAL effectors, the molecular mechanism by which TAL effectors control transcription in the host is still poorly understood. Here, we show that all variants of the effector protein PthA of a *X. citri* pathogen interact with the CTD of the citrus RNA pol II. These interactions appear to be mediated by the invariable LRR region located adjacently to the C-terminal transactivation domain of the PthAs. In addition, we show that the citrus proteins CsCyp, CsTdx and CsUev/Ubc13 heterodimer, identified previously as targets of PthAs [15], are also associated with the CTD. A cartoon depicting such interactions is shown in Fig. 8A. Similarly, protein-protein interactions involving cyclophilins and thioredoxins related to CsCyp/CsTdx were described in an Arabidopsis interactome

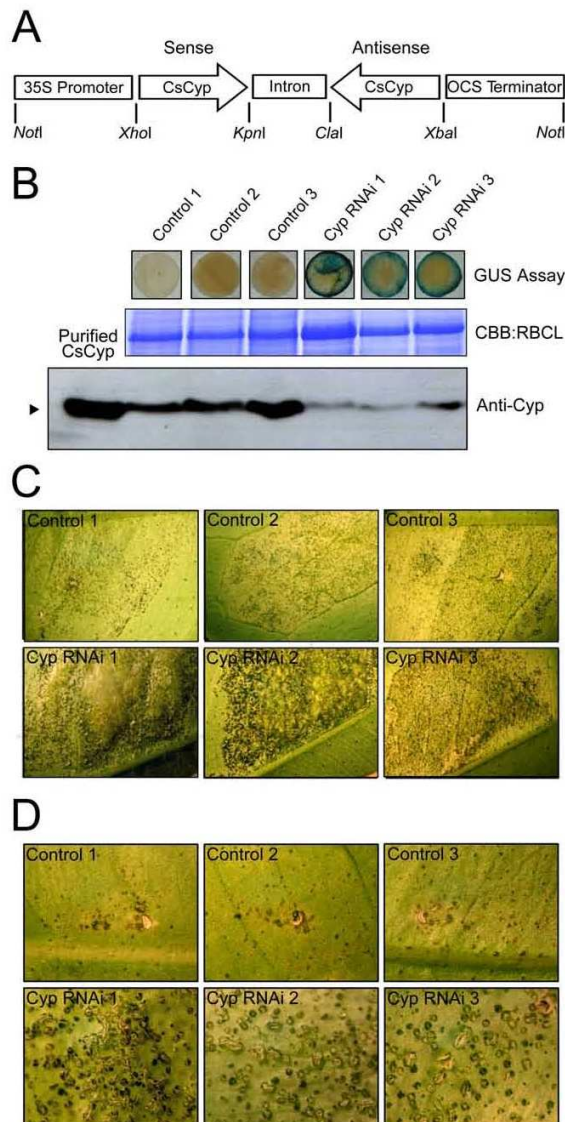


Figure 7. Silencing of CsCyp enhanced canker symptoms. (A) Schematic representation of the RNAi hairpin construct used to transform sweet orange plants. The construct carries the whole cyclophilin domain of CsCyp in an inverted orientation and separated by the intron of the pHANNIBAL vector. (B) Transgenic plants carrying the CsCyp RNAi hairpin construct were assayed for GUS activity and analyzed by western blot using the anti-CsCyp serum (Anti-Cyp). Examples of CsCyp RNAi plants (GUS positive) showing significantly lower levels of CsCyp relative to untransformed controls are shown. Protein loads were controlled by Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining of the bands corresponding to the large subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase (RBCL). Recombinant CsCyp with no tags was loaded in the first lane of the blot as a positive control. (C) Sweet orange leaves of control and three RNAi plants (Cyp RNAi) challenged with *X. citri* (approximately 2.0×10^4 cells). Pictures (10 $\times$ magnifications) were taken 14 days after bacterial infiltration. Canker lesions were substantially enhanced in the RNAi plants compared to controls. (D) Sweet orange leaves of control and RNAi plants infiltrated with *X. citri* at a lower density (approximately 10^3 cells). Canker pustules in the RNAi plants developed much faster and produced more rupture of the

epidermis than in control plants. Pictures (20 $\times$ magnifications) were taken 20 days after bacterial infiltration.
doi:10.1371/journal.pone.0041553.g007

study [39]. For instance, the prolyl-isomerases AtCyp59 and ROC4 are associated with the CTD whereas ROC4 also interact with thioredoxin H3 [39,40] (Fig. 8B).

The CTD is known to play critical roles not only in the progress of transcription initiation, elongation and termination, but in the recruitment of numerous cofactors required for chromatin modification, DNA repair and pre-mRNA processing, including capping, splicing cleavage and polyadenylation [29,32,41,44]. Surprisingly, in a study to identify specific PthA4 interactors, we found that PthAs also target several proteins implicated in mRNA stabilization/processing such as polyadenylation, translation initiation and elongation factors, as well as proteins involved in RNA cleavage, gene silencing and DNA repair, thought to play roles in mRNA deadenylation and decay [19].

The recruitment of nuclear factors by the CTD is governed by conformational changes in response to serine phosphorylation/dephosphorylation and proline isomerization of its YSPTSPS

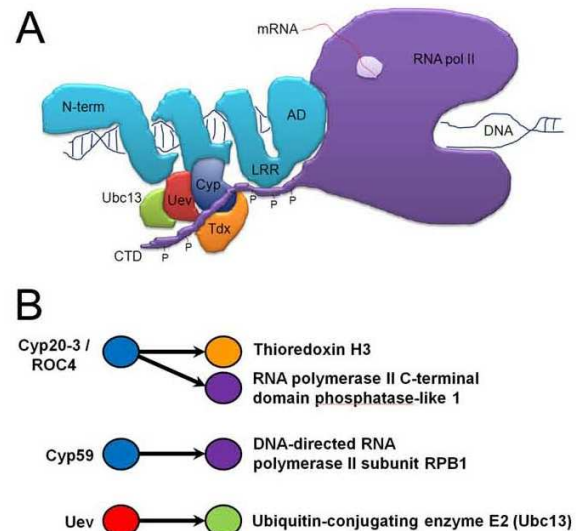


Figure 8. Protein-protein interactions involving cyclophilins and the CTD. (A) Cartoon model of protein-protein interactions illustrating how TAL effectors (PthAs) might associate with components of the host basal transcription machinery. The unfolded CTD of RNA pol II (purple) with phosphorylated heptapeptides (P) may function as a protein scaffold for the assembly of a multiprotein complex, including the citrus CsCyp (blue), CsTdx (orange) and the CsUev/Ubc13 pair (red/green). The N-terminal (N-term), DNA-binding domain, leucine-rich repeat region (LRR) and activation domain (AD) of PthA are shown in light blue. Upon binding to its target DNA, the effector protein associates with the CsCyp/CsTdx/CsUev/Ubc13 complex through its DNA-binding domain [15], and with the CTD through its LRR. The effector protein then inhibits the PPlase activity of CsCyp causing changes in the phosphorylation status of the CTD, allowing the CTD to recruit other co-factors for the progress of transcription. (B) Schematic representation of protein-protein associations found in an Arabidopsis interactome study, depicting the interactions between ROC4 (Cyp20-3) with the CTD and thioredoxin H3, and between Uev and Ubc13 [39]. The Arabidopsis AtCyp59 is also a CTD interactor [40]. Sweet orange and Arabidopsis proteins sharing similar domains are represented by the same colors in A and B.
doi:10.1371/journal.pone.0041553.g008

repeats [25,30–32]. In yeast and mammals, isomerization of the two Ser-Pro peptide bonds of the YSPTSPS repeats, which leads to changes in serine phosphorylation, are performed by the Ess1 and Pin1 prolyl isomerases, respectively [25–27,29,30,45]. In yeast, Ess1 interacts with TFIIB and regulates both the early and late stages of the transcription cycle [25]. It also interacts with and is complemented by Cpr1, which in conjunction with Ess1 regulates gene silencing [22].

Previously, we showed that PthAs are not ubiquitinated by the CsUev/Ubc13 heterodimer, but apparently inhibit K63-linked ubiquitination associated with DNA damage induced by methyl-methane sulphonate (MMS), suggesting that the CsCyp/CsTdx/CsUev/Ubc13 complex could be inhibited by PthAs [15]. Considering that i) the *ess1* mutant is sensitive to MMS-induced DNA damage, ii) the Ess1 activity is affected by Rsp5, an ubiquitin ligase that promotes K63 ubiquitination and degradation of the RNA pol II [42,46], and iii) ubiquitination and degradation of RNA pol II through the CTD occur in response to DNA damage and during transcriptional elongation arrest [42,43,47,48], we proposed that PthAs might activate transcription through modulation of the activity of the CsCyp/Tdx/Uev/Ubc13 complex on the CTD [15]. Here we demonstrate that CsCyp not only complements the function of Ess1 and Cpr1, but interacts with the citrus CTD, which binds PthAs, CsTdx and CsUev. We also show that silencing of CsCyp or treatments with CsA promote canker development and that PthA2 inhibited the PPIase activity of CsCyp in a similar fashion as CsA. These data thus support the notion that by targeting the CsCyp/CsTdx/CsUev/Ubc13 complex, PthAs might affect the stability and/or activity of the CTD. This idea is in line with the observation that i) Pin1 plays a naturally repressive role on transcription, its overexpression causes the release of the RNA pol II from the chromatin, whereas its misregulation is associated with cancer [49–51]; ii) Ess1 inhibits transcription elongation and its loss affects transcription termination and cell division [25,28,29,52]; iii) Rrd1, another yeast prolyl

isomerase, isomerizes the CTD and promotes the RNA pol II dissociation from the chromatin [53] and iv) ectopic expression of AtCyp59 also resulted in cell growth arrest and decrease in CTD phosphorylation [40].

Furthermore, because AtCyp59 has an RNA recognition motif (RRM) fused to the PPIase domain that binds RNA, it was suggested that AtCyp59 could connect transcription regulation with pre-mRNA processing via its interaction with the CTD [40]. Interestingly, most of the newly-identified PthA4 interactors, which are thought to participate in mRNA stabilization, processing and translation initiation, have single or multiple RRRMs [19]. Curiously, the DNA-binding domain of TAL effectors is structurally similar to mTERF [17,18], a protein known to play critical roles not only in transcription initiation and termination, but in ribosomal biogenesis and translation [54,55].

Taken together, our results provide strong evidence for the concept that TAL effectors act as transcriptional activators by targeting components of the basal transcriptional machinery that modulate the activity of the CTD and/or stability of the RNA pol II. Although we have not yet been able to obtain citrus plants overexpressing CsCyp, it is possible that by modulating the CsCyp activity canker development can be mitigated.

Acknowledgments

We thank Steven Hanes, Holland DeFiglio and Joseph Heitman for the yeast *cpr1* and *ess1* mutants, and Marco Takita and Marcos Machado for the citrus CTD EST.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CEB. Performed the experiments: MND BMC MLPO UQM CEB. Analyzed the data: MND BMC CEB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MND BMC MLPO UQM CEB. Wrote the paper: CEB.

References

- Brunings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Mol Plant Pathol 4: 141–157.
- Cernadas RA, Camillo LR, Benedetti CE (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolia*. Mol Plant Pathol 9: 609–631.
- Cernadas RA, Benedetti CE (2009) Auxin and Gibberellin-mediated expression of cell wall remodeling genes induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Plant Sci 177: 190–195.
- Swarup S, de Feyter R, Brilansky R, Gabriel D (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit canker-like lesions on citrus. Phytopathol 81: 802–809.
- Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW (1992) A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Mol Plant Microbe Interact 5: 204–213.
- Duan Y, Castañeda A, Zhao G, Erdos G, Gabriel D (1999) Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. Mol Plant Microbe Interact 12: 556–560.
- Al-Saadi A, Reddy J, Duan Y, Brunings A, Yuan Q, et al. (2007) All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. Mol Plant Microbe Interact 20: 934–943.
- Kay S, Bonas U (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. Curr Opin Microbiol 12: 37–43.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science 318: 648–651.
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, et al. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. Science 318: 645–648.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Wieduwild R, Bonas U (2009) Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. Plant J 59: 859–871.
- Römer P, Strauss T, Hahn S, Scholze H, Morbitzer R, et al. (2009) Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. Plant Physiol 150: 1697–1712.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, et al. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326: 1509–1512.
- Moscou M, Bogdanov A (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326: 1501.
- Domingues MN, de Souza TA, Cernadas RA, de Oliveira ML, Docena C, et al. (2010) The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. Mol Plant Pathol 11: 663–675.
- Murakami MT, Sforça ML, Neves JL, Paiva JH, Domingues MN, et al. (2010) The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. Proteins 78: 3386–3395.
- Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanov AJ, Stoddard BL (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. Science 335: 716–719.
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, et al. (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. Science 335: 720–723.
- de Souza TA, Soprano AS, de Lira NP, Quaresma AJ, Pauletti BA, et al. (2012) The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA. PLoS One 7:e32305.
- Coaker G, Falick A, Staskawicz B (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. Science 308: 548–550.
- Zhang M, Windheim M, Roe SM, Pegg M, Cohen P, et al. (2005) Chaperoned ubiquitylation crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. Mol Cell 20: 525–538.
- Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Wu X, Hanes SD, Heitman J (2000) Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. EMBO J 19: 3739–3749.
- Arévalo-Rodríguez M, Heitman J (2005) Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell 4: 17–29.
- Wu X, Wilcox CB, Devasahayam G, Hackett RL, Arévalo-Rodríguez M, et al. (2000) The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. EMBO J 19: 3727–3738.

25. Krishnamurthy S, Ghazy MA, Moore C, Hampsey M (2009) Functional interaction of the Ess1 prolyl isomerase with components of the RNA polymerase II initiation and termination machineries. *Mol Cell Biol* 29: 2925–2934.
26. Hani J, Schelbert B, Bernhardt A, Domdey H, Fischer G, et al. (1999) Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 108–116.
27. Morris DP, Phatnani HP, Greenleaf AL (1999) Phospho-carboxyl-terminal domain binding and the role of a prolyl isomerase in pre-mRNA 3'-End formation. *J Biol Chem* 274: 31583–31587.
28. Wu X, Rossetini A, Hanes SD (2003) The ESS1 prolyl isomerase and its suppressor BYE1 interact with RNA pol II to inhibit transcription elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 165: 1687–1702.
29. Singh N, Ma Z, Gemmill T, Wu X, Defiglio H, et al. (2009) The Ess1 prolyl isomerase is required for transcription termination of small noncoding RNAs via the Nrd1 pathway. *Mol Cell* 36: 255–266.
30. Werner-Allen JW, Lee CJ, Liu P, Nicely NI, Wang S, et al. (2011) cis-Proline-mediated Ser(P)5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Suw2. *J Biol Chem* 286: 5717–5726.
31. Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19: 1401–1415.
32. Buratowski S. (2009) Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36: 541–546.
33. Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, et al. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623–627.
34. James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425–1436.
35. Kofron JL, Kuzmic P, Kishore V, Bonilla-Colon E, Rich DH (1991) Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 30: 6127–6134.
36. Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, et al. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581–90.
37. de Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC (2009) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep* 28: 387–395.
38. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907.
39. Braun P, Carvunis AR, Charteaux B, Dreze M, Ecker JR, et al. (2011) Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science* 333: 601–607.
40. Gullerova M, Barta A, Lorkovic ZJ (2006) AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* 12: 631–643.
41. Palancade B, Bensaude O (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* 270: 3859–3870.
42. Jeong SJ, Kim HJ, Yang YJ, Seol JH, Jung BY, et al. (2005) Role of RNA polymerase II carboxy terminal domain phosphorylation in DNA damage response. *J Microbiol* 43: 516–522.
43. Somesh BP, Sigurdsson S, Saeki H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. (2007) Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell* 129: 57–68.
44. Lunde BM, Reichow SL, Kim M, Suh H, Leeper TC, et al. (2010) Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1195–1201.
45. Xu YX, Manley JL (2007) Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle. *Genes* 21: 2950–2962.
46. Wu X, Chang A, Sudol M, Hanes SD (2001) Genetic interactions between the ESS1 prolyl-isomerase and the RSP5 ubiquitin ligase reveal opposing effects on RNA polymerase II function. *Curr Genet* 40: 234–242.
47. Daulny A, Tansey WP (2009) Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system. *DNA Repair* 8: 444–448.
48. Somesh BP, Reid J, Liu WF, Sogaard TM, Erdjument-Bromage H, et al. (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* 121: 913–923.
49. Jouvot N, Poschmann J, Douville J, Bulet L, Ramotar D (2010) Rrd1 isomerizes RNA polymerase II in response to rapamycin. *BMC Mol Biol* 11: 92.
50. Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 658–663.
51. Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, et al. (2002) Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1335–1340.
52. Hanes SD, Shank PR, Bosian KA (1989) Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5: 55–72.
53. Chapman RD, Palancade B, Lang A, Bensaude O, Eick D (2004) The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability. *Nucleic Acids Res* 32: 35–44.
54. Roberti M, Polosa PL, Bruni F, Manzari C, Deceglie S, et al. (2009) The MTERF family proteins: mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1787: 303–311.
55. Cámara Y, Asin-Cayuela J, Park CB, Metodiev MD, Shi Y, et al. (2011) MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab* 13: 527–39.

8. ANEXO II – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM MAIO DE 2013 NA REVISTA PLANT PHYSIOLOGY, NO QUAL PARTICIPO COMO PRIMEIRA AUTORA.

A Redox 2-Cys Mechanism Regulates the Catalytic Activity of Divergent Cyclophilins^{1[W]}

Bruna Medéia Campos, Mauricio Luis Sforça, Andre Luis Berteli Ambrosio, Mariane Noronha Domin
Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza², João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa³,
Adriana Franco Paes Leme, Carlos Alberto Perez, Sara Britt-Marie Whittaker, Mario Tyago Murakam
Ana Carolina de Matos Zeri, and Celso Eduardo Benedetti*

Laboratório Nacional de Biociências (B.M.C., M.L.S., A.L.B.A., M.N.D., T.d.A.C.B.d.S., J.A.R.G.B., A.F.P.I.
T.M., A.C.d.M.Z., C.E.B.) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (C.A.P.), Centro Nacional de Pes
em Energia e Materiais, Campinas, SP CP6192, Brazil; and School of Cancer Sciences, University of
Birmingham, Birmingham B15 2TT, United Kingdom (S.B.-M.W.)

The citrus (*Citrus sinensis*) cyclophilin CsCyp is a target of the *Xanthomonas citri* transcription activator-like effector required to elicit cankers on citrus. CsCyp binds the citrus thioredoxin CsTdx and the carboxyl-terminal domain of polymerase II and is a divergent cyclophilin that carries the additional loop KSGKPLH, invariable cysteine (Cys) residues Cys-40 and Cys-168, and the conserved glutamate (Glu) Glu-83. Despite the suggested roles in ATP and metal binding functions of these unique structural elements remain unknown. Here, we show that the conserved Cys residues form a disulfide bond that inactivates the enzyme, whereas Glu-83, which belongs to the catalytic loop and is also critical for enzyme activity anchored to the divergent loop to maintain the active site open. In addition, we demonstrate that Cys-40 and Cys-168 are required for the interaction with CsTdx and that CsCyp binds the citrus carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II YSPAP repeat. Our data support a model where formation of the Cys-40-Cys-168 disulfide bond induces a conformational change that disrupts the interaction of the divergent and catalytic loops, via Glu-83, causing the active site to close. This suggests a new type of allosteric regulation in divergent cyclophilins, involving disulfide bond formation and a loop-displacement mechanism.

Cyclophilins (CyPs) are ubiquitous proteins that belong to the immunophilin superfamily, exhibiting peptidyl prolyl cis-trans-isomerase (PPIase) activity, and are targets of the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA; Wang and Heitman, 2005). Cyp proteins act as chaperones or foldases and have been implicated in a wide range of biological processes, including cell division, transcription regulation, mRNA splicing, and stress tolerance (Fischer and Schmid, 1990; Wang and Heitman, 2005). CyPs are also known to play a key role in virus replication both in animal and plant cells (Luban et al., 1993; Nagy et al., 2011).

In plants, CyPs control transcription, gene silencing and hormone signaling, affecting plant development and interaction with pathogens (Iki et al., 2006; Trupkin et al., 2012; Bannikova et al., 2013). Rota Cyp1 (ROC1), one of the best studied CyPs in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), affects plant architecture, hormone and phytochrome signaling, and is a target of the bacterial effector protein AvrRpt2 (Cai et al., 2005; Trupkin et al., 2012; Ma et al., 2013). Similarly, the citrus (*Citrus sinensis*) cyclophilin (CsCyp) was identified as a target of the bacterial effector protein I from one of the transcription activator-like effectors of *Xanthomonas citri* that is required to elicit canker on citrus (Domingues et al., 2010). CsCyp is a nuclear protein that interacts with other PthA-interacting proteins, including the CsUev/CsUbc13 heterodimer and CsTdx, a TPR domain-containing thioredoxin (Domingues et al., 2010). Importantly, in addition to PthA and CsTdx, CsCyp also binds to the C-terminal domain of citrus RNA polymerase II (CTD). Like yeast and mammalian CTDs, the citrus CTD consists of multiple tandem repeats of the consensus sequence YSPXSPX (Domingues et al., 2012), which play a key role in the transcriptional cycle (Buratowski, 2000).

In *Saccharomyces cerevisiae*, the heptad repeats of the CTD are the targets of Ess1 and Cpr1, two protein phosphatases that affect the progress of transcription and gene silencing (Arévalo-Rodríguez et al., 2006).

¹ This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (fellowship to B.M.C.) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (fellowship to C.E.B.).

² Present address: Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-Paraná, Curitiba, PR, CEP 81350-010, Brazil.

³ Present address: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil.

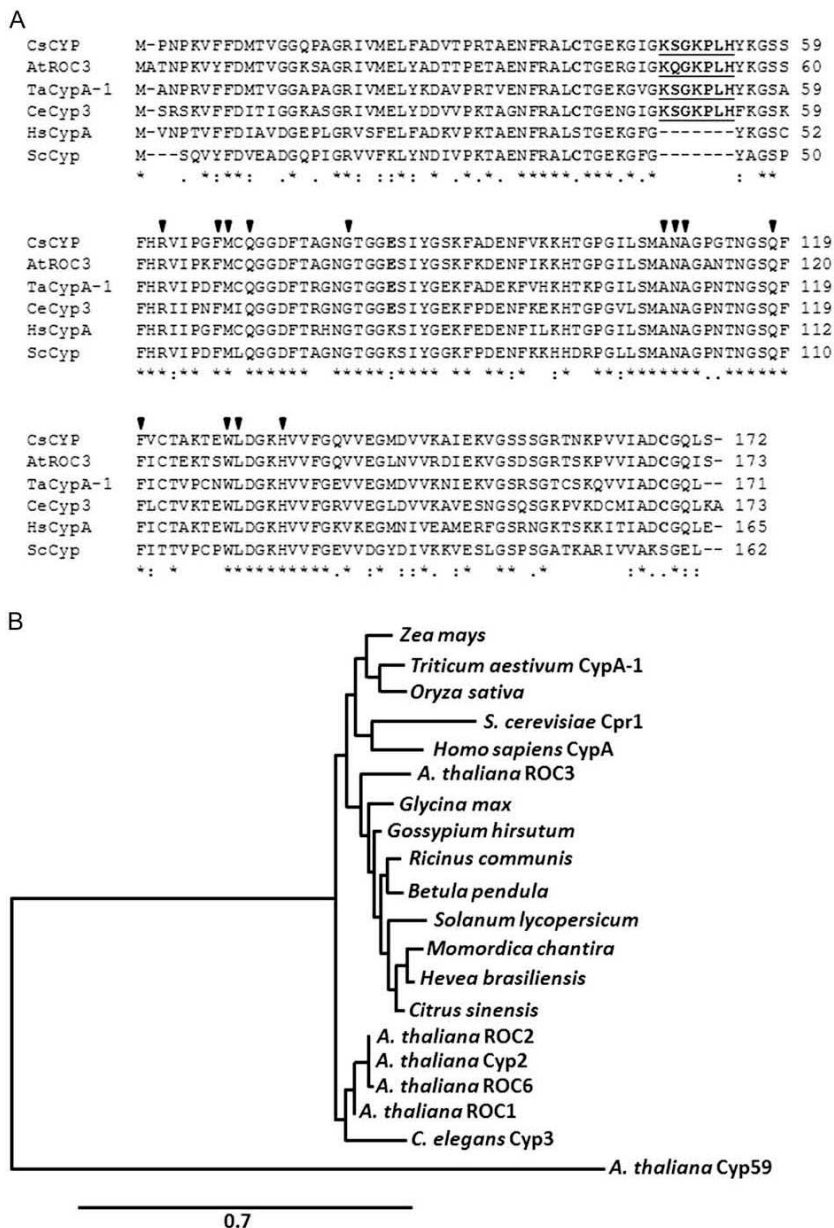
* Corresponding author; e-mail celso.benedetti@lnbio.cnpm.br.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Celso Eduardo Benedetti (celso.benedetti@lnbio.cnpm.br).

[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.218339

Figure 1. CsCyp is a member of the divergent Cyp subgroup. A, Protein sequence alignment of CsCyp with Arabidopsis ROC3 (AtROC3), wheat CypA-1 (TaCypA-1), *C. elegans* Cyp3 (CeCyp3), human CypA (HsCypA), and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cpr1 (ScCpr1) performed with ClustalW. Arrows indicate the amino acid residues that are part of the active site of CsCyp and that bind CsA. Residues comprising the divergent loop are shown in boldface underlined, whereas the conserved Cys residues (Cys-40 and Cys-168) and Glu (Glu-83) are shown in boldface. B, Phylogenetic analysis of Cyp proteins from plants (monocots and dicots), humans, nematodes, and yeast, showing that CsCyp clusters with uncharacterized Cyp proteins from dicot plants. CsCyp is not related to Arabidopsis Cyp59. Only the PPLase domain of AtCyp59 was used in the alignment.



et al., 2000; Ma et al., 2012). We showed that CsCyp complements the function of both Ess1 and Cpr1 and that PthA inhibits its PPLase activity (Domingues et al., 2012). Since the depletion of CsCyp in citrus leaves enhances canker formation, we postulated that CsCyp acts as a negative regulator of cell growth through the isomerization of Pro residues of the CTD heptad repeats (Domingues et al., 2012).

CsCyp belongs to the subfamily of the so-called divergent Cyps. Members of this subgroup of Cyps are characterized by the presence of an additional loop with the consensus sequence XXGKXLH, two invariable Cys residues and a conserved Glu (Taylor et al., 1998;

Dornan et al., 1999; Peterson et al., 2000). Previous studies have suggested that the divergent loop could mediate protein-protein interactions or be part of a P-loop or ATP-binding site, formed by residues 42-GEKIGKKS-49 and 163-VVIAD-167 (Dornan et al., 1999). In addition, due to their close proximity in the structure, it has also been postulated that the conserved Cys residues might form a disulfide bond or coordinate a metal ion via interaction with His-54 from the divergent loop (Dornan et al., 1999). Nevertheless, the function of these structural elements in protein-protein interactions or the regulation of enzyme activity has not yet been demonstrated.

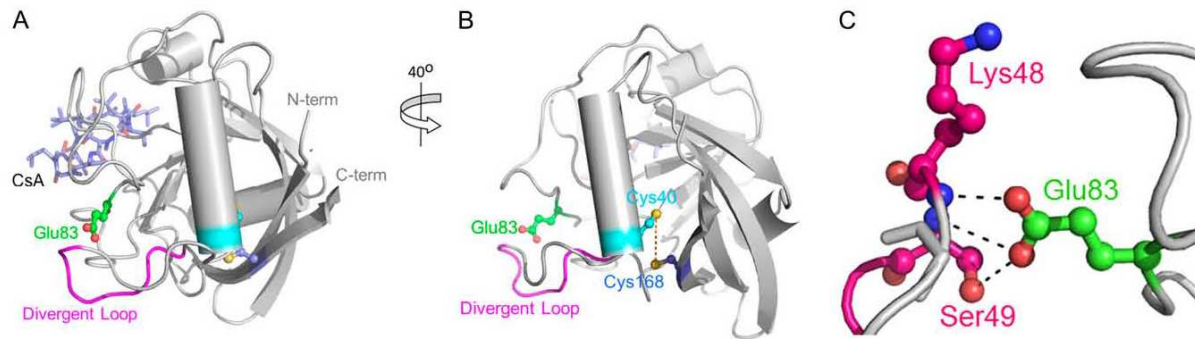


Figure 2. Overall structure of CsCyp in complex with CsA. A, Cartoon depicting the 3D structure of CsCyp (gray) showing the typical Cyp fold comprising eight β -strands that form a β -barrel closed by two α -helices. CsA is shown with light blue sticks. The divergent loop (pink) and conserved Glu-83 (green) are shown. B, A 40° rotated image showing the invariable Cys residues Cys-40 and Cys-168 (cyan and blue, respectively) and their thiol groups 5.4 Å apart (dashed yellow line). C, Detailed view of the hydrogen bond network between the side chain of Glu-83 and Lys-48 and Ser-49 of the divergent loop.

Here, we show that the conserved Cys residues (Cys-40 and Cys-168) are targets of CsTdx and form a disulfide bond that regulates the CsCyp PPIase activity. We also demonstrate that the invariable Glu (Glu-83), which connects the divergent loop to the active site, is critical for protein activity, since it stabilizes the divergent loop in a conformation that favors the active site to remain open. Furthermore, we present evidence suggesting that, instead of binding ATP, the divergent loop functions as a trigger that transmits the redox status of the Cys residues to the active site of the enzyme via interaction with Glu-83. Finally, we show that CsCyp binds to the YSPSAP sequence of the citrus CTD, suggesting that, as in yeast cells, CsCyp modulates the progress of transcription.

divergent Cyp subfamily, CsCyp also carries the divergent loop (48-KSGKPLH-54), two invariable Cys residues (Cys-40 and Cys-168), and a conserved Glu (Glu-83) that are unique to this subfamily of CyPs (Fig. 1A). CsCyp is closely related to the Arabidopsis ROC3 wheat (*Triticum aestivum*) CypA-1, and *Caenorhabditis elegans* Cyp3 proteins, yet it also shares approximately 70% identity with human CypA and yeast Cpr1, despite both lacking the divergent loop, Glu-83, and one of the invariable Cys residues (Fig. 1A). A phylogenetic analysis shows that CsCyp forms a branch with several uncharacterized plant CyPs belonging to dicot species. Interestingly, CsCyp is not related to Arabidopsis Cyp59 (Fig. 1B), the only plant Cyp, besides CsCyp known to interact with the CTD (Gullerova et al., 2006)

RESULTS

CsCyp Belongs to the Subfamily of Divergent CyPs

CsCyp is an 18-kD protein that has a single and typical PPIase domain; however, as a member of the

On the Structural (Dis)similarities between Classical and Divergent CyPs

To gain insights into the regulation of CsCyp activity, the crystal structure of CsCyp in complex with

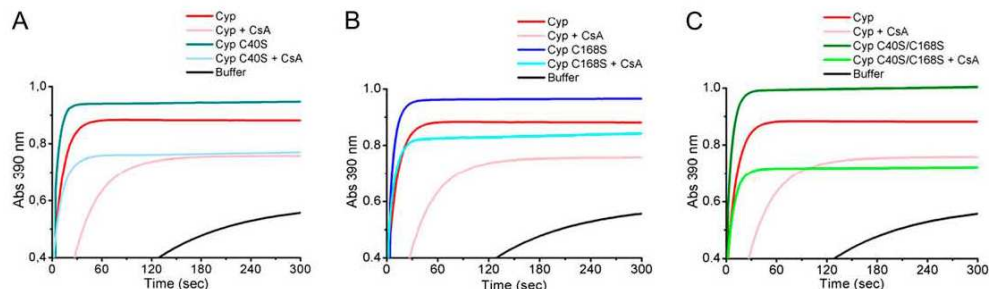


Figure 3. CsCyp is active in its reduced form. The PPIase activity of recombinant CsCyp, measured by the α -chymotrypsin-coupled assay, reaches a plateau within 30 to 60 s after the start of the reaction. The PPIase activity of wild-type CsCyp (red) is compared with those of the C40S (A), C168S (B), and C40S/C168S (C) mutants in the absence (dark cyan, blue, and green, respectively) or presence of 30 nM CsA (light blue, light cyan, and light green, respectively). The mutant proteins all show a higher PPIase activity than the wild-type CsCyp, and all are drastically inhibited by CsA. The PPIase activity of the buffer alone is shown in black.

Table 1. k_{cat}/K_m values for PPlase activity of CsCyp and mutants

Cyp	k_{cat}/K_m $s^{-1} \mu M^{-1}$	%
CsCyp	5.6	100
CsCyp + CsA	1.3	24.1
Cyp C40S	5.9	105
Cyp C40S + CsA	3.5	62.7
Cyp C168S	6.7	118
Cyp C168S + CsA	3.1	55.7
Cyp C40S/C168S	8.1	142.9
Cyp C40S/C168S + CsA	3.9	69.7
Cyp E83A	2.9	51.8
Cyp E83A + CsA	2.6	45.9
Cyp E83S	3.3	59.5
Cyp E83S + CsA	3.0	53.7
Cyp E83Q	5.0	89
Cyp E83Q + CsA	4.5	79.9
Cyp + CuSO ₄	4.3	76.3
Cyp + MnSO ₄	5.4	96.6
Cyp + ZnSO ₄	5.6	99

CsA was solved. The overall architecture of CsCyp is highly similar to that of the *C. elegans* Cyp3 and human CypA structures in complex with CsA (Pflügl et al., 1993; Ke et al., 1994; Dornan et al., 1999) and comprises an eight-stranded antiparallel β -barrel capped at either end by two α -helices (Fig. 2, A and B). The CsCyp active site, composed of 13 residues that are also responsible for CsA binding (Fig. 1A), is identical to that of Cyp3, CypA, and TaCypA-1 (Pflügl et al., 1993; Ke et al., 1994; Dornan et al., 1999; Sekhon et al., 2013). Structure alignment of CsCyp with TaCypA-1, the only other plant divergent Cyp with known three-dimensional (3D) structure, showed no major structural differences (root mean square deviation = 0.43 Å). The CsCyp divergent loop (48-KSGKPLH-54), located above the active site, is tethered by the conserved Glu-83, through hydrogen bonds between the side-chain carboxyl group of Glu-83 and the main-chain amide groups of Lys-48 and Ser-49 (2.6 and 3.2 Å, respectively), and the hydroxyl group of Ser-49 (2.3 Å; Fig. 2C). In the Cyp3 structure (Dornan et al., 1999), the interactions between Glu-83 and the main-chain amide proton atoms of Lys-48 and Ser-49 are conserved (2.8 and 3.2 Å, respectively); however, the side chain of Ser-49 adopts a different orientation and is instead hydrogen bonded through its hydroxyl group to a neighboring water molecule. In addition, and different from CsCyp, Glu-83 in Cyp3 also exhibits a distinct rotameric conformation that disables the interaction with the hydroxyl group of Ser-49. These observations strongly support the hypothesis that Glu-83 is key in anchoring the divergent loop in a particular conformation in this subgroup of CyPs, as reported previously (Dornan et al., 1999; Taylor et al., 2001). Moreover, the two invariable Cys residues (Cys-40 and Cys-168), which under the conditions studied are found to be in their reduced forms in the crystal structure, are also in close spatial proximity to one another in CsCyp, as in Cyp3 (Dornan et al., 1999),

with an interatomic sulfur-sulfur distance of 5.4 Å separating them (Fig. 2B).

The Conserved Cys-40 and Cys-168 Form a Disulfide Bridge and Are Critical for CsCyp Activity

We and others have noticed that the two conserved Cys residues, which are in the reduced form and close to each other in the tertiary structure, could form a disulfide bond under oxidizing conditions (Dornan et al., 1999; Taylor et al., 2001). In addition, Dornan et al. (1999) postulated that the proximity of His-54 to the Cys residues Cys-40 and Cys-168 could alternatively form a metal coordination site involving these residues. It was thus suggested that formation of a disulfide bond or metal binding could represent a signaling mechanism in response to oxidative stress (Dornan et al., 1999; Taylor et al., 2001). However, since we found no electron density corresponding to metal ions in the CsCyp x-ray diffraction data, we anticipated that the disulfide bridge may in fact be part of a redox mechanism that controls the enzyme activity. To test this hypothesis, mass spectrometric analysis was conducted with purified CsCyp under nonreducing conditions. Even in the absence of a specific oxidizing agent, we detected a disulfide bond between Cys-40 and Cys-168 in our protein samples through identification of the linked peptides 38-ALCTGEK-44 and 159-TNKPVIADCGQLS-172 (Supplemental Fig. S1). In addition, the same peptides were also identified in their reduced forms, suggesting that the recombinant CsCyp made in *Escherichia coli* under the conditions described in "Materials and Methods" is a mixture of reduced and oxidized forms of the protein. No alternative disulfide bridges involving either of the other two Cys residues in CsCyp were detected from our mass spectrometric analysis (Supplemental Fig. S1).

To establish the possible role of Cys-40 and Cys-168 in protein activity, the mutants C40S, C168S, and C40S/C168S were generated. We measured the PPlase activity of the mutated proteins relative to wild-type CsCyp and found that all the mutant proteins displayed a significantly higher PPlase activity than wild-type CsCyp (Fig. 3; Table I). The k_{cat}/K_m value for the wild-type CsCyp ($5.6 s^{-1} \mu M^{-1}$) is consistent with values determined for other Cyp proteins (Dornan et al., 1999; Laxa et al., 2007; Sekhon et al., 2013). In addition, while the C40S and C168S mutants were similarly inhibited by CsA, the double mutant was more strongly inhibited by CsA relative to the wild-type protein (Fig. 3; Table I), indicating that CsCyp is active in its reduced form. This is consistent with the mass spectrometric analysis that shows that the wild-type protein preparation has a mixture of oxidized and reduced CsCyp.

CsCyp Is Not a Zinc-Binding Protein

To investigate whether CsCyp activity could be regulated by a metal ion, the CsCyp PPlase activity was measured in the presence of various metal salts. With

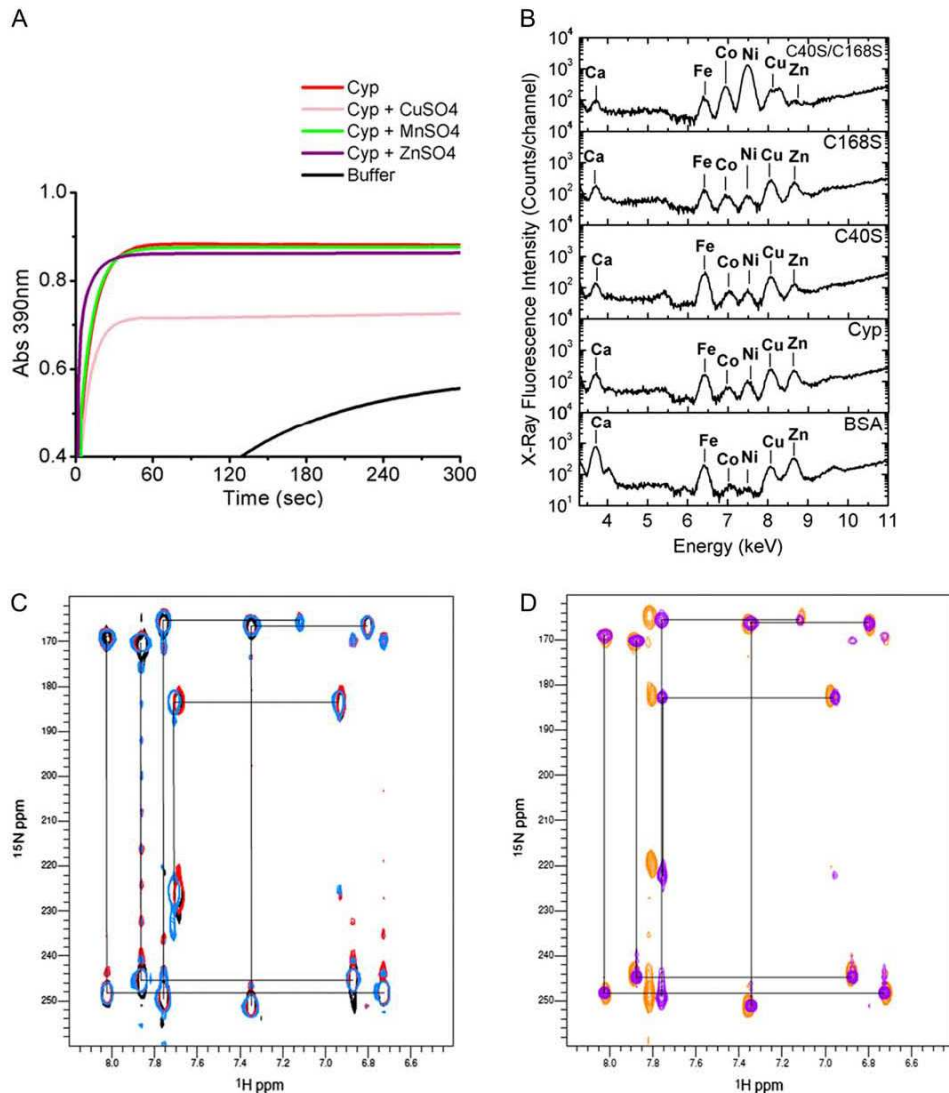


Figure 4. CsCyp is not a zinc-binding protein. A, PPIase activity of CsCyp in the absence (red) or presence of CuSO₄ (pink), ZnSO₄ (purple), or MnSO₄ (green), showing that CuSO₄ inhibits CsCyp activity. The PPIase activity of the buffer alone is shown in black. B, X-ray fluorescence of purified CsCyp and mutants showing the presence of various elements in the samples. No major peak is observed for the wild-type protein compared with the mutant proteins, indicating that CsCyp does not coordinate a specific metal ion. C, Two-bond ²J_{NH} region of ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC spectra of wild-type CsCyp in the presence of DTT and EDTA (light blue), wild-type CsCyp with Zn²⁺ (black), and wild-type CsCyp with Zn²⁺ followed by the addition of EDTA (red). Black lines correlate resonances from atoms within a given imidazole ring. The correlation pattern indicates which of the tautomeric states the His side chain adopts (Pelton et al., 1993). All five His imidazole rings of CsCyp are observed. D, Two-bond ²J_{NH} region of ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC spectra of wild-type CsCyp in the absence of DTT and EDTA (blue) and of CsCyp C40S/C168S (orange). For clarity, black lines correlating resonances from atoms within a given imidazole ring of wild-type CsCyp only are shown. For details, see text.

the exception of CuSO₄, which significantly inhibited the CsCyp activity and which was shown to induce disulfide bond formation in nondivergent Cyps (Gourlay et al., 2007), the other metal ions tested, including Zn²⁺ and Mn²⁺, did not affect enzyme activity (Fig. 4A; Table I).

We also investigated if CsCyp could bind a metal ion using x-ray fluorescence analysis. Among the elements detected, calcium, iron, cobalt, nickel, copper, and/or zinc were identified in the samples. However, with the exception of nickel and zinc in the C40S/C168S mutant, which were found at relatively higher

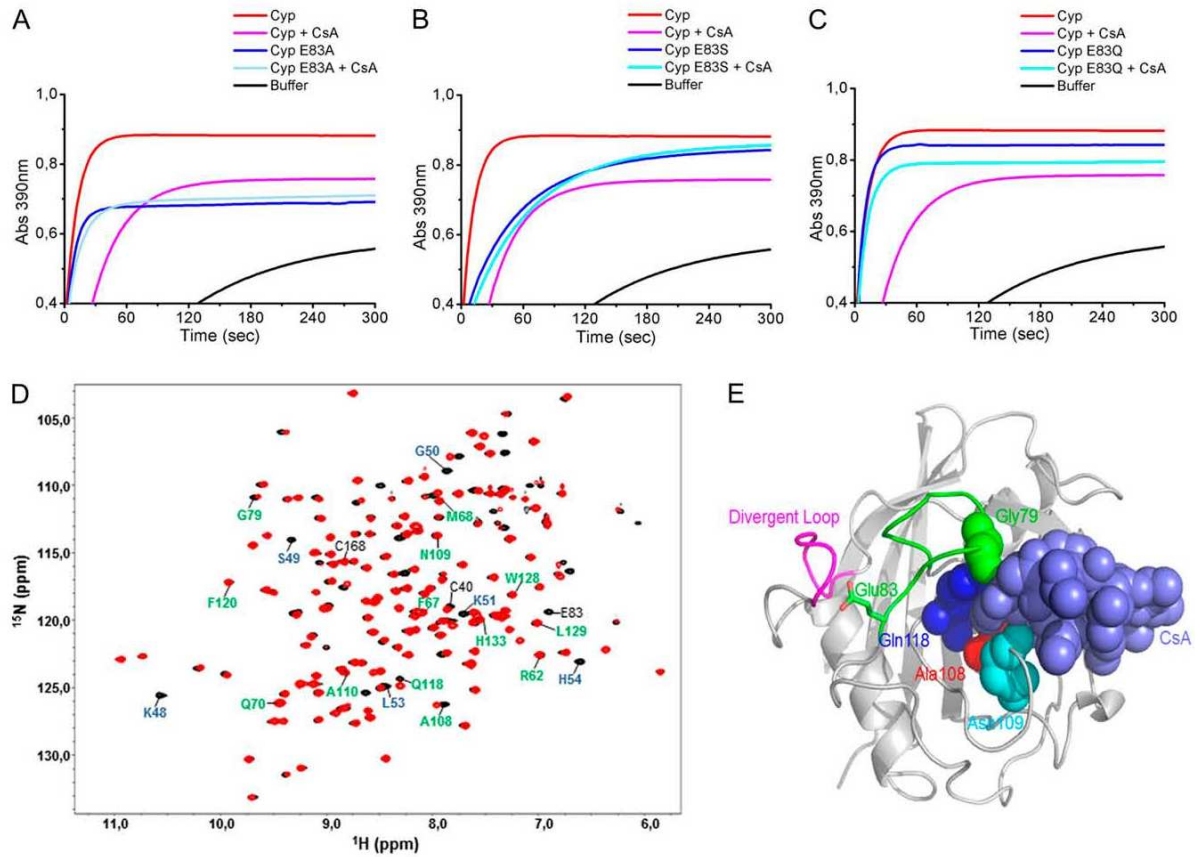


Figure 6. Mutations at Glu-83 affect the PPIase activity of CsCyp. A to C, The PPIase activity of wild-type CsCyp in the absence (red) or presence of CsA (pink) is compared with those of the E83A (A), E83S (B), and E83Q (C) mutants in the absence (blue) or presence of CsA (light blue). Substitutions of Glu-83 to Ala or Ser, but not Gln, significantly reduce the PPIase activity of CsCyp. The PPIase activity of the buffer alone is shown in black. D, Superposition of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of CsCyp (black) and the Cyp E83A mutant (red). Residues of the divergent loop (48-KSGKPLH-54) and active site are labeled in blue and green, respectively. Cys-40, Cys-168, and Glu-83 are labeled in black. E, Cartoon of CsCyp in complex with CsA (light blue spheres) depicting the CsCyp residues (Gly-79, Ala-108, Asn-109, and Gln-118, represented by spheres) that showed differences in chemical shifts in the E83A mutant relative to the wild-type protein. The divergent (pink) and Glu-83 (green) loops are shown.

lower PPIase activity than wild-type CsCyp or the E83Q mutant (Fig. 6; Table I). Interestingly, only the PPIase activity of the E83Q mutant could be still further inhibited by CsA (Fig. 6C; Table I), indicating that disruption of the hydrogen bonds between Glu-83 and the divergent loop dramatically affects the active site of CsCyp.

To investigate this further, ^1H - ^{15}N HSQC experiments were performed with the E83A mutant as with the wild-type protein. Superposition of the two spectra revealed that most of the residues of the divergent loop, including Gly-50, Lys-51, Leu-53, and His-54, showed substantial chemical shift differences, indicating that the loop adopts a new conformation as a result of the disruption of the hydrogen bonds with Glu-83 (Fig. 6D). The loss of some of the loop signals (Lys-48 and Ser-49) and the weak intensity of others (G50), most likely due to line broadening resulting from

chemical exchange, suggest a change in the dynamics of this region. Moreover, we observed changes in the chemical shifts of Gly-79, Ala-108, Asn-109, and Gln-118 of the active site and in Cys-40, indicating that loss of interaction between the divergent loop and Glu-83 affects both the active site and the Cys environment (Fig. 6D). As anticipated, some of the active-site residues whose environments are altered in the E83A mutant are the ones that make contacts with the ligand CsA at the end of the substrate pocket that is close to the Glu-83 loop (Fig. 6E), thus supporting the idea that disruption of the Glu-83 interaction with the divergent loop affects the active site of the protein.

CsCyp Binds Selectively to a CTD Heptad Repeat

Specific peptide targets of divergent Cyps have not been described; nevertheless, CsCyp was shown to

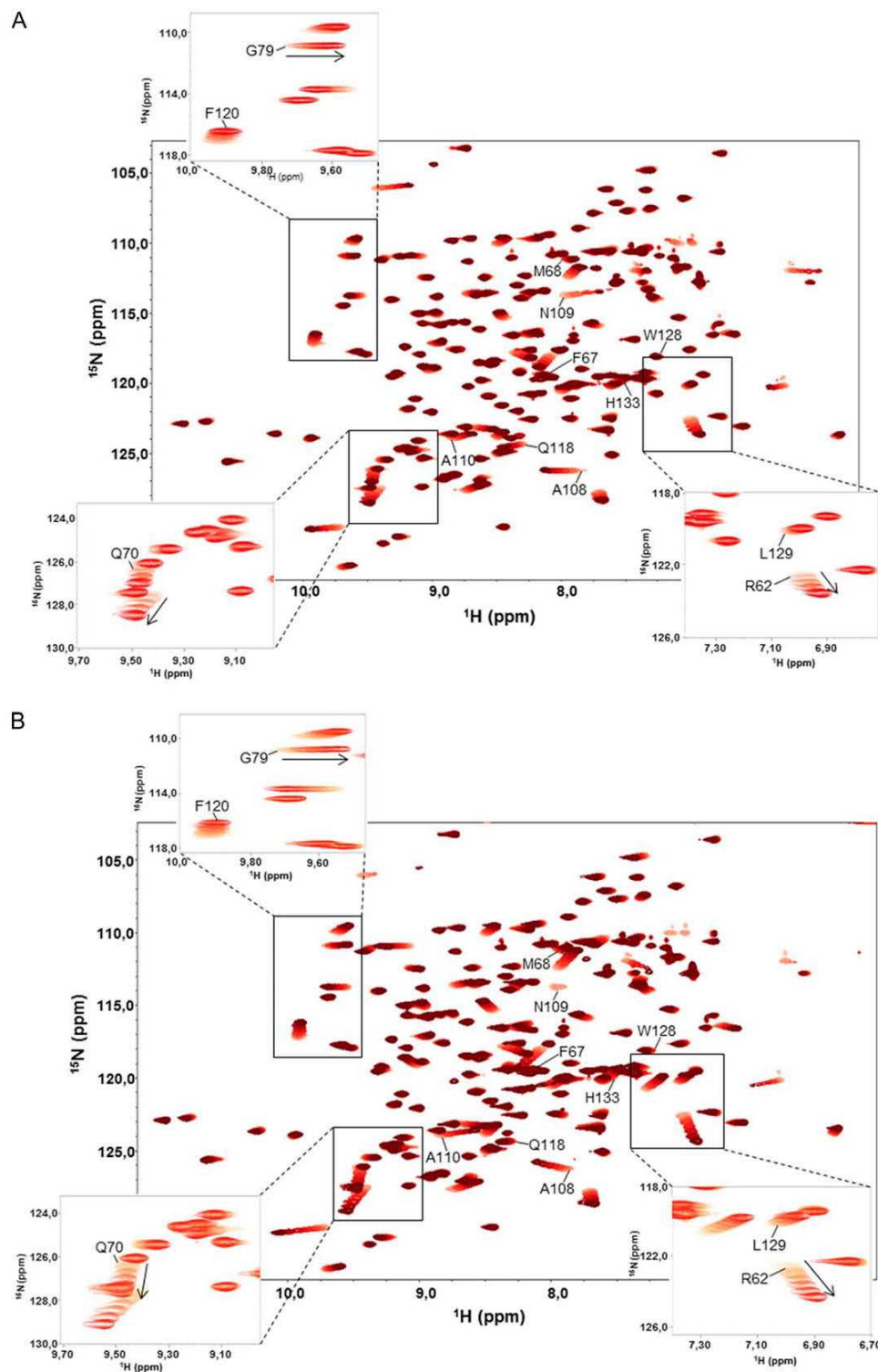


Figure 7. Binding dynamics of CsCyp to the YSPSAP and FGPDLF peptides. A, Superposition of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of free CsCyp (light red) and CsCyp titrated with peptide YSPSAP (darkening shades of red). B, Superposition of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of free CsCyp (light red) and CsCyp titrated with peptide FGPDLF (darkening shades of red). In both spectra, the arrows indicate the directions of the secondary chemical shifts of the backbone amide nuclei of the amino acids on addition of peptide. The labeled amino acids belong to the active site. The insets show signals for some of the amino acids that undergo a chemical shift perturbation and that were used to calculate the K_d of the interactions.

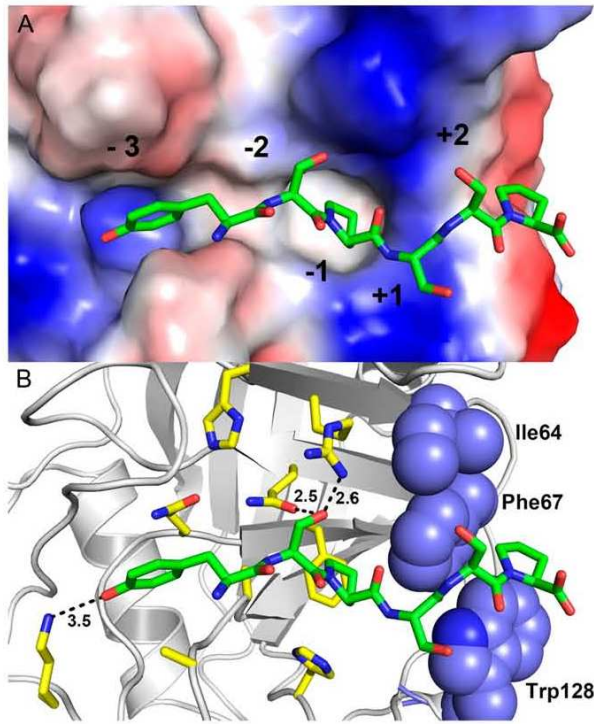


Figure 8. Molecular docking studies between the hexapeptide YSPSSP and CsCyp. A, Electrostatic surface representation of the active site with the docked peptide, illustrating the subsites. B, Interactions between the active-site residues and the peptide (carbon in green). The hydrophobic residues forming the +2 subsite are represented as blue spheres.

interact strongly with the citrus CTD, which is composed of numerous Pro-rich hepta repeats with the consensus sequence YSPXXPX (Domingues et al., 2012). To further understand this interaction and identify which repeat of the CTD CsCyp interacts preferably, we measured ^1H - ^{15}N HSQC spectra using three peptides corresponding to the major heptad repeats of the citrus CTD. We observed that the interaction of CsCyp with peptides 1 (YSPTSP) and 2 (YSPSSP) was weak, and only Ala-108 and Asn-109, which belong to the active site, showed small chemical shift changes in the HSQC spectra (data not shown). However, strong interactions were observed with peptide 3, YSPSAP (Fig. 7A), as well as with the control peptide, FGPDLF (Fig. 7B), which is known to bind human CypA with high affinity (Piotukh et al., 2005). In both cases, major changes in the chemical shifts were observed for the active-site residues, including Arg-62, Glu-70, Gly-79, Phe-120, and Leu-129 (Fig. 7). Since the off rate of the ligand binding is fast with regard to the NMR time scale, the dissociation constant (K_d) of the interaction could be determined as $K_d = 59 \mu\text{M}$ for peptide 3 and $K_d = 104 \mu\text{M}$ for peptide 4. In comparison, a K_d of approximately 27 nM was calculated for the CsCyp-CsA interaction by isothermal

titration calorimetry (Supplemental Fig. S2). Thus, the results indicate that CsCyp has a preference for the YSPSAP repeat of the citrus CTD.

To further investigate the molecular basis of such peptide preference, docking studies were employed to support our experimental data. The results show that the substitution of Ala (YSPSAP) to Ser (YSPSSP) at the +2 position is detrimental for recognition and binding of the ligand peptide due to a hydrophobic microenvironment at this subsite, which is formed by the residues Ile-64, Phe-67, and Trp-128 of CsCyp (Fig. 8). Any polar residue at this subsite, such as Ser, is likely to disfavor or preclude binding of the ligand peptide. This idea is in accord with our NMR titration experiments and is also in agreement with literature data showing that polar residues at the +2 position negatively affect the binding of linear peptides to CypA (Piotukh et al., 2005).

DISCUSSION

The 3D Structure of a Plant Cyp Is from a Revealing Divergent Cyp

In this work, we describe the 3D structure of a citrus Cyp that belongs to the divergent Cyp subfamily. Although 3D structures of divergent CyPs have been reported, the functional role of their unique structural elements (i.e. divergent loop, invariable Cys pair, and stabilizing Glu) remained unclear (Dornan et al., 1999; Taylor et al., 2001; Sekhon et al., 2013). Here, we show that, instead of coordinating a metal ion with His-54, as proposed previously (Dornan et al., 1999; Taylor et al., 2001), Cys-40 and Cys-168 form a disulfide bridge that blocks protein activity. In addition, the fact that the interaction between CsCyp and CsTdx requires the conserved Cys residues strongly indicates that the PPIase activity of CsCyp is regulated by a redox mechanism involving the thiol groups of Cys-40 and Cys-168. In fact, disulfide bond formation and interaction with thioredoxins has been reported to control the PPIase activity of nondivergent CyPs in animals and plants (Motohashi et al., 2003; Gourlay et al., 2007; Laxa et al., 2007). For instance, the activity of Arabidopsis CYP20-3 (ROC4), which links redox and light signals to Cys biosynthesis and stress responses in chloroplasts, is dependent on reduction by a thioredoxin (Motohashi et al., 2003; Dominguez-Solis et al., 2008).

It has also been suggested that the divergent loop could be part of an ATP-binding site formed by residues 42-GEKGIGKS-49 and 163-VVIAD-167 (Dornan et al., 1999). However, ^1H - ^{15}N HSQC spectral analyses showed that ATP did not interact with the proposed P-loop but weakly interacted with a few residues of the active site with $K_d > 1 \text{ mM}$, suggesting a nonspecific interaction (data not shown).

We also demonstrate that the conserved Glu-83, which connects the divergent loop to the active site of CsCyp, is critical for protein activity. Thus, since both Glu-83 and the disulfide bridge formation between

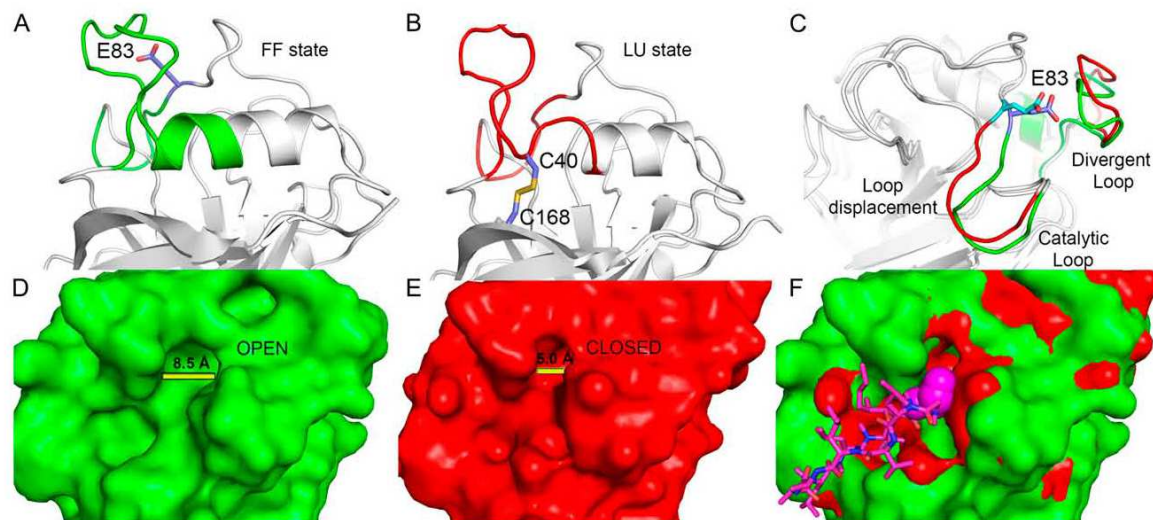


Figure 9. Schematic representation of the 2-Cys mechanism involved in the activity regulation of divergent Cyps. A, The reduced state of CsCyp with the helix containing Cys-40 in the FF state (green). B, The oxidized state of CsCyp with the same helix in the LU state (red), which is a requirement for disulfide bridge formation. C, Structural rearrangements of the divergent loop, induced by disulfide bridge formation, which disrupts the interaction with Glu-83, resulting in a perturbation of the catalytic loop, inactivating the enzyme. D and E, Molecular surface area indicating the cleft aperture in the reduced (D) and oxidized (E) states. F, Superposition of surface areas of both states with the CsA (pink) bound to the active site. The changes in the substrate-binding channel act as a physical barrier to the recognition and binding of CsA or substrate.

Cys-40 and Cys-168 regulate the PPIase activity of CsCyp, and the Cys residues are structurally connected with the active site by the interaction of Glu-83 with the divergent loop, we propose a mechanistic model for the redox regulation of divergent Cyps.

A Mechanistic Model for the Redox Regulation of Divergent Cyps

The divergent loop protrudes from the helix containing residue Cys-40, suggesting that disulfide bridge formation would promote structural rearrangements that would be transmitted to this loop. Interestingly, the process involved in such disulfide bridge formation in CsCyp seems to be a conserved redox 2-Cys mechanism observed in the catalytic cycle of peroxiredoxins (Hall et al., 2011). In this group of enzymes, a Cys referred to as peroxidatic Cys is located at the end of a helix (as Cys-40 is in divergent Cyps). When this Cys is in the reduced state, the helix adopts a fully folded (FF) conformation, whereas under oxidizing conditions (S-S bond), it adopts a locally unfolded (LU) conformation, which is required for disulfide bond formation between the peroxidatic Cys and the so-called resolving Cys located at the C terminus of the protein, just as Cys-168 is in CsCyp (Hall et al., 2011). Thus, analogously to peroxiredoxins, an FF→LU transition in CsCyp, mediated or stabilized by the disulfide bond formation between Cys-40 and Cys-168, would cause a significant change in the conformation of the divergent loop, as envisaged by our mechanistic model (Fig. 9). According to this

model, transition from the FF to the LU state would lead to the disruption of the interaction between Glu-83 and the divergent loop, causing repositioning of the Glu-83 loop (segment 73-DFTAGNGTIGGE-83) and a consequent narrowing of the active-site cleft (Fig. 9, A and B).

Table II. X-ray crystal structure data collection and refinement statistics for CsCyp: molecular replacement

Data Collection	Values
Space group	P3 ₂ 21
Cell dimensions	
Unit-cell dimensions (Å)	$a = b = 83.6$, $c = 85.0$
Resolution range (Å)	37.52–2.09 (2.20–2.09)
Reflections	
Measured (n)	108,111
Unique (n)	20,834
$I/\sigma(I)$	7.7 (2.4)
Completeness (%)	100 (100)
Average redundancy	5.2 (5.0)
R_{merge} (%)	19.6 (67.9)
R_{pim} (%)	9.4 (33.5)
R_{meas} (%)	21.8 (75.9)
Refinement	
Resolution range (Å)	37.5–2.09
Reflections used (R_{free})	20,811 (1,068)
$R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ (%)	18.1/22.9
r.m.s.d. bond lengths	0.009
r.m.s.d. bond angles	1.029
No molecules per asymmetric unit	2
Residues in (%)	
Preferred regions	93.77
Allowed regions	5.67
Outliers	0.57

The Glu-83 loop, which we suggest would function as a catalytic loop, is rich in Gly residues, and removal of its anchoring point with the divergent loop would provoke its displacement, thereby altering the substrate channel (Fig. 9, B and C). The fact that the E83A mutant does not bind CsA and shows chemical shift perturbations in Gly-79 and in three catalytic residues neighboring the catalytic loop (Fig. 6) supports our model. High crystallographic B factors for the divergent loop in wild-type CsCyp, together with conformational exchange-broadened residues Gly-77, Asn-78, Gly-79, and Thr-80 of the catalytic loop, evident in NMR spectra of CsCyp E83A, also corroborate our loop-displacement model. Thus, the model not only explains why the E83A and E83S mutants have reduced PPIase activity that cannot be further inhibited by CsA but also offers an elegant explanation for the redox control of protein activity. In *Schistosoma mansoni* Cyp, disulfide bond formation, which renders the enzyme inactive, was similarly suggested to cause changes in cavity areas. However, the molecular mechanism governing such allosteric regulation was not demonstrated (Gourlay et al., 2007). In any case, it does not involve a divergent loop or an FF→LU transition. Thus, to our knowledge, this is the first report of this type of enzyme regulation among Cyps.

The Citrus CTD as a Target of CsCyp

Finally, we show that CsCyp binds with greater affinity to the YSPSAP sequence relative to the more abundant heptad repeats YSPTSP and YSPSSP found in the citrus CTD. The K_d value for the YSPSAP binding to CsCyp is comparable to that of the FGPDLF peptide binding to human CypA (Piotukh et al., 2005). Despite the facts that our molecular docking simulations offer a good explanation for such selective binding (Fig. 8) and that CypA preferentially binds Gly-Pro sequences (Howard et al., 2003; Piotukh et al., 2005), it is important to note that peptides with a Gly at position -1 bind Cyps with such great affinity that they actually function as inhibitors, as is the case for FGPDLF (Howard et al., 2003; Piotukh et al., 2005). Given the peculiar conformation Gly assumes at the -1 position, it has been suggested that suboptimal binding sequences may in fact be better substrates for isomerization (Howard et al., 2003). Thus, we cannot rule out the possibility that the YSPTSP and YSPSSP sequences are indeed also substrates of CsCyp.

MATERIALS AND METHODS

Protein Purification

The citrus (*Citrus sinensis*) CsCyp gene (ACX37092.1) was cloned into the *NdeI*/*NotI* sites of pET28a. The 6xHis-CsCyp was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells and purified by metal affinity chromatography. Cells were grown at 30°C in Luria-Bertani medium containing kanamycin (50 mg mL⁻¹) to an optical density at 600 nm of 0.6, followed by induction with 0.4 mM isopropylthio- β -D-galactopyranoside (IPTG) for 3 h. After centrifugation, cells were suspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM imidazole, and 20% glycerol, incubated on ice with lysozyme (1 mg mL⁻¹) for 30 min, and sonicated.

Clarified supernatants were incubated with cobalt resin for 2 h at room temperature. The beads were washed with 10 column volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 20% glycerol, and the retained proteins were eluted with buffer containing 200 mM imidazole. The 6xHis tag was cleaved with thrombin at 25°C for 16 h. Protein was further purified on a Superdex 75 10/300 column equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 2% glycerol. Purified CsCyp (11 mg mL⁻¹) was stored at 4°C in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM NaCl, and 0.4% glycerol. The CsTdx protein was expressed and purified as described previously (Domingues et al., 2010).

Crystallization

Despite numerous attempts to crystallize CsCyp in the absence of a ligand, or in complex with CTD peptides, only the CsCyp:CsA complex produced diffractable crystals. In addition, no crystals of oxidized CsCyp were obtained, since a protocol to fully oxidize the protein has not yet been established. Crystallization of the CsCyp:CsA complex (1:2 molar ratio) was performed using the sitting-drop vapor-diffusion method at 18°C. The drop contained 1 μ L of the CsCyp:CsA complex plus 1 μ L of the reservoir solution containing 100 mM Bis-Tris propane, pH 7.0, and 1.2 M sodium citrate. Crystals were refined using the seeding technique using the same crystallization conditions. Well-formed crystals grew within 1 d and were used for x-ray data collection.

X-Ray Data Collection, Structure Determination, and Refinement

Protein crystals were flash cooled in a stream of gaseous nitrogen at 100 K. The x-ray diffraction data were collected in the MX2 beamline ($\lambda = 1.445$ Å) of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory using a MAR CCD detector (MARRResearch GmbH), with a crystal-to-detector distance of 110 mm and 1° oscillations. Data images were processed with MOSFLM (Leslie, 1992), scaled, and merged with SCALA (Evans, 2006). The structure of the CsCyp:CsA complex was determined by molecular replacement with Phaser, using the structure of the *Caenorhabditis elegans* Cyp3 in complex with CsA (Protein Data Bank no. 1DYW) as a model. The structure was refined using Phenix and fit to generate electron density maps using Coot. All data were refined to give satisfactory final R_{factor} and R_{free} factors and geometric parameters. Information on data collection is summarized in Table II. The structure of CsCyp in complex with CsA has been deposited in the Protein Data Bank (no. 4JIM).

Mass Spectrometric Analysis

Purified CsCyp separated on polyacrylamide gels under nonreducing conditions was digested with trypsin, dried under vacuum, and reconstituted in 100 μ L of 0.1% formic acid. The peptide mixture was analyzed on an LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry by an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem) through a Proxeon nanoelectrospray ion source, as described previously (Aragão et al., 2012). Peak lists (magellan storage file) were generated from the raw data files using Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) and the Sequest search engine and searched against the National Center for Biotechnology Information database using carbamidomethylation (+57.021 D) as a fixed modification, oxidation of Met (+15.995 D) as a variable modification, one trypsin missed cleavage, with a tolerance of 10 ppm for precursor and 0.02 D for fragment ions. Peak lists were filtered using Xcorr cutoffs (+1 > 1.8, +2 > 2.5, and +3 > 3.5).

For cross-link analysis, the raw data files generated by Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific) were converted to a peak list format (mgf) using Proteome Discoverer version 1.3. The Mascot generic file files were analyzed using the MassMatrix software (Xu and Freitas, 2007) to search automatically against the CsCyp sequence. The parameters for disulfide bond analysis were carbamidomethylation (+57.021 D) as a fixed modification, oxidation of Met (+15.995 D) as a variable modification, cross-linkage search with Cys-Cys, four trypsin missed cleavages, and a tolerance of 10 ppm for precursor and 0.02 D for fragment ions. Search results yielding high confidence (mass-matrix peptide score > 70) and potential cross-linked peptides were manually validated for b and y ion series containing α - and β -chains.

X-Ray Fluorescence Analysis

All measurements were performed at the XRF beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, as described previously (Balan et al., 2006). A

white beam 0.1 mm high $\times$ 5 mm wide was used to excite the CsCyp samples under total reflection conditions. Samples were prepared as follows: 5 μ L of the protein solution at 8 mg mL⁻¹ was dropped onto a Perspex support and dried using an infrared lamp for 15 min. Samples were measured for 300 s, and the collected x-ray fluorescence spectra were evaluated using the PyMCA program (Solé et al., 2007).

Site-Directed Mutagenesis

The Cys residues Cys-40 and Cys-168 were each replaced by Ser (C40S, C168S, and C40S/C168S), whereas Glu-83 was replaced by Ala, Ser, or Gln (E83A, E83S, and E83Q), by site-directed mutagenesis using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The proteins, subcloned into pET28a, were expressed as 6xHis tag fusions and purified as described above.

PPIase Assay

The PPIase assay was performed as described previously (Domingues et al., 2012). Purified proteins were incubated in 50 mM HEPES, pH 8.0, and 100 mM NaCl and stabilized at 10°C for 5 min. CuSO₄ and CsA were added to the reaction mix to final concentrations of 15 and 30 nM, respectively. The reaction was initiated by the addition of 1 mg of α -chymotrypsin followed by the peptide substrate *N*-succinyl-AAPP-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 100 μ M. The PPIase reaction was monitored at 390 nm for a period of 5 min. Data were fitted to a first-order rate equation ($A_{390} = A_1 + A_0 e^{-kt}$, with k as rate constant) and rate constants (k_{obs}) derived as described by Motohashi et al. (2003). The k_{cat}/K_m values were calculated according to the equation $k_{cat}/K_m = (k_{obs} - k_0)/[PPI]$, where k_0 is the first-order rate constant for spontaneous cis-trans-isomerization (Motohashi et al., 2003).

GST Pull-Down Assays

GST-CsTdx, subcloned into the *SalI*/*NotI* sites of pCEX-4T, was expressed in BL21 (DE3) cells upon induction with 0.4 mM IPTG for 2 h at 30°C (Domingues et al., 2010). Cells were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM dithiothreitol (DTT) and lysozyme (1 mg mL⁻¹). After sonication and centrifugation, soluble fractions of GST-CsTdx were immobilized on glutathione resin, and unbound proteins were removed with three PBS washes. Purified wild-type CsCyp, or CsCyp mutants (approximately 30 μ g), were incubated with the resin containing GST or GST-CsTdx for 2 h at 4°C. The beads were washed four times with PBS, and bound proteins were resolved on 13% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto nylon membranes, probed with anti-CsCyp (1:3,000) or anti-GST (1:3,000) serum, and developed with the ImmunoCruz kit (Santa Cruz Biotechnology).

NMR Sample and Peptide Preparation

Uniformly ¹⁵N- and ¹³C,¹⁵N-labeled protein was prepared for NMR analysis by growing the CsCyp cell culture at 30°C in M9 minimal medium containing ¹⁵NH₄Cl and/or [¹³C]Glc (Cambridge Isotopes) to an optical density at 600 nm of 0.6, followed by induction with 0.4 mM IPTG for 3 h. CsCyp was purified as described above. The protein (approximately 1 mM) was solubilized in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, containing 50 mM NaCl and 5% Deuterium oxide, and incubated with synthesized ligand hexapeptides derived from the heptad repeats of the citrus CTD (EY725107): peptide 1 (YSPSP), peptide 2 (YSPSP), and peptide 3 (YSPSAP). A fourth peptide (FCPDLF) was used as a control, since it binds human CypA (Piotukh et al., 2005).

NMR Spectroscopy

All NMR experiments were performed at 25°C using a Varian Inova 600-MHz spectrometer equipped with a triple-resonance HCN cryogenic probe, operating at a ¹H frequency of 599.987 MHz, at the Brazilian Biosciences National Laboratory or with a four-channel Varian Unity Inova 900-MHz spectrometer operating at a ¹H frequency of 899.794 MHz, equipped with a 5-mm triple-resonance HCN and Z-axis pulsed-field gradient cryogenic probe, at The Henry Wellcome Building for Biomolecular NMR Spectroscopy of the University of Birmingham. For sequential assignments, 3D HN(CA)CO, HNCO, HNCACB, and CBCACONH classic triple-resonance experiments (Sattler et al., 1999) were acquired using a ¹³C,¹⁵N-labeled sample. Titration

experiments were performed by measuring a series of two-dimensional ¹H-¹⁵N HSQC spectra, acquired with 2,048 complex data points in the acquisition domain and 256 increments in the time domain, on uniformly ¹⁵N-labeled sample at different equivalent ratios of ligand to protein. All spectra were processed using NMRPipe and NMRView software (Johnson and Blevins, 1994; Delaglio et al., 1995). Prior to Fourier transformation, the time domain data were zero filled in all dimensions. When necessary, a fifth-order polynomial baseline correction was applied after transformation and phasing. The K_d values for the CsCyp ligands were determined using the titration analysis module of the NMRView program.

To investigate the possibility of zinc binding to CsCyp, ¹H-¹⁵N SOFAST HMQC spectra were acquired at 900 MHz on ¹⁵N-labeled samples of (1) 1 mM CsCyp in the presence of (2) 14 mM DTT and 10 mM EDTA, (3) 10 mM ZnCl₂, (4) 10 mM ZnCl₂ followed by the addition of 10 mM EDTA (same sample as used in sample 3), and on (5) 1.4 mM ¹⁵N-labeled Cyp C40S/C168S. The standard pulse sequence, sofastNhmqc, from the Biopack sequence library was employed. A large spectral width in the ¹⁵N dimension (16,400 Hz) with the offset at 192 ppm, a J_{NH} coupling constant of 22.7 Hz, and an Ernst excitation angle of 120° were used to enable optimal detection of the two-bond J -coupling constant between the amide proton and nitrogen nuclei in the H_i imidazole region of the spectrum (approximately 160–260 ppm). To compensate for the relatively large number of scans per free induction decay required to generate sufficient signal to noise (350, 864, and 1,200 scans for samples 2, 3, and 4, respectively), a recycle delay of 400 ms and an acquisition time of 40 ms were used to reduce the experimental time. Thirty-two complex data points were acquired in the ¹⁵N dimension. Spectra were processed using NMRPipe and analyzed using CcpNmr Analysis (Vranken et al., 2005). Prior to Fourier transformation, a cosine bell window function for apodization was applied in both dimensions as well as linear prediction in the indirect dimension.

Isothermal Titration Calorimetry

Isothermal titration calorimetry experiments were performed on a VP-ITK Microcal calorimeter at 25°C, according to Davis et al. (2010). Purified CsCyp was extensively dialyzed against 50 mM HEPES, pH 8.0, and 200 mM NaCl. Titrations consisted of 5- μ L injections of dialyzed CsCyp into the sample cell containing the ligand CsA at 5 μ M final concentration. The recorded data were analyzed using Origin 7 software (MicroCal). Binding constants were obtained from the average of three independent experiments.

Molecular Docking Simulations

Molecular docking studies between CsCyp and peptides YSPSAP and YSPSP were carried out with the program Rosetta FlexPepDock (London et al., 2011). The peptides were roughly docked into the active site of CsCyp based on the binding mode of HIV-1 CA protein CypA (Howard et al., 2003) and then submitted to the high-resolution peptide-protein docking protocol, in which peptide backbone and rigid body orientation are optimized by the “Monte Carlo with minimization” approach. The complex was refined in 20 independent FlexPepDock simulations and ranked based on a Rosetta general full-atom energy score.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Fragment ion spectra of reduced and cross-linked peptides.

Supplemental Figure S2. Interaction of CsCyp with CsA assessed by isothermal calorimetry, showing the raw injection heats and integrated data fit to a single-site binding model.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the NMR facility at the HWB-NMR (University of Birmingham) for providing access to the Wellcome Trust-funded 900-MHz spectrometer. Special thanks also to Doug Ward (University of Birmingham) for help with initial mass spectrometry data collection and interpretation and to Romêni

Ramos Domingues and Bianca Alves Pauletti for the mass spectrometry experiments performed at the Brazilian Biosciences National Laboratory.

Received March 22, 2013; accepted May 23, 2013; published May 24, 2013.

LITERATURE CITED

- Aragão AZB, Nogueira MLC, Granato DC, Simabuco FM, Honorato RV, Hoffman Z, Yokoo S, Laurindo FR, Squina FM, Zeri AC, et al (2012) Identification of novel interaction between ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) and thioredoxin-1. *J Biol Chem* 287: 43071–43082
- Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Wu X, Hanes SD, Heitman J (2000) Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J* 19: 3739–3749
- Balan A, Santacruz CP, Moutran A, Ferreira RC, Medrano FJ, Pérez CA, Ramos CH, Ferreira LC (2006) The molybdate-binding protein (ModA) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Protein Expr Purif* 50: 215–222
- Bannikova O, Zywicki M, Marquez Y, Skrahina T, Kalyna M, Barta A (2013) Identification of RNA targets for the nuclear multidomain cyclophilin atCyp59 and their effect on PPIase activity. *Nucleic Acids Res* 41: 1783–1796
- Buratowski S (2009) Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36: 541–546
- Coaker G, Falick A, Staskawicz B (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308: 548–550
- Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ Jr, Paramanathan R, Bernstein G, MacKenzie F, Tempel W, Ouyang H, Lee WH, et al (2010) Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 8: e1000439
- Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6: 277–293
- Domingues MN, de Campos BM, de Oliveira ML, de Mello UQ, Benedetti CE (2012) TAL effectors target the C-terminal domain of RNA polymerase II (CTD) by inhibiting the prolyl-isomerase activity of a CTD-associated cyclophilin. *PLoS ONE* 7: e41553
- Domingues MN, De Souza TA, Cernadas RA, de Oliveira ML, Docena C, Farah CS, Benedetti CE (2010) The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Mol Plant Pathol* 11: 663–675
- Dominguez-Solis JR, He Z, Lima A, Ting J, Buchanan BB, Luan S (2008) A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16386–16391
- Dornan J, Page AP, Taylor P, Wu S, Winter AD, Husi H, Walkinshaw MD (1999) Biochemical and structural characterization of a divergent loop cyclophilin from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 274: 34877–34883
- Evans PR (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 72–82
- Fischer G, Schmid FX (1990) The mechanism of protein folding: implications of *in vitro* refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* 29: 2205–2212
- Gourlay LJ, Angelucci F, Baiocco P, Boumis G, Brunori M, Bellelli A, Miele AE (2007) The three-dimensional structure of two redox states of cyclophilin A from *Schistosoma mansoni*: evidence for redox regulation of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J Biol Chem* 282: 24851–24857
- Gullerova M, Barta A, Lorkovic ZJ (2006) AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* 12: 631–643
- Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 15: 795–815
- Howard BR, Vajdos FE, Li S, Sundquist WL, Hill CP (2003) Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nat Struct Biol* 10: 475–481
- Iki T, Yoshikawa M, Meshi T, Ishikawa M (2012) Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J* 31: 267–278
- Johnson BA, Blevins RA (1994) NMR View: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR* 4: 603–614
- Ke H, Mayrose D, Belshaw PJ, Alberg DG, Schreiber SL, Chang ZY, Etzkorn FA, Ho S, Walsh CT (1994) Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,4-dimethylthreonine cyclosporin A. *Structure* 2: 33–44
- Laxa M, König J, Dietz KJ, Kandlbinder A (2007) Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and redox-related functions. *Biochem J* 401: 287–297
- Leslie AG (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data Joint CCP4 + ESRF-EAMCB. *News Protein Crystallogr* 26: 27–33
- London N, Raveh B, Cohen E, Fathi G, Schueler-Furman O (2011) Rosetta FlexPepDock Web server: high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 39: W249–W253
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73: 1067–1078
- Ma X, Song L, Yang Y, Liu D (2013) A gain-of-function mutation in the ROC1 gene alters plant architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol* 197: 751–762
- Ma Z, Atencio D, Barnes C, DeFiglio H, Hanes SD (2012) Multiple roles for the Ess1 prolyl isomerase in the RNA polymerase II transcription cycle. *Mol Cell Biol* 32: 3594–3607
- Motohashi K, Koyama F, Nakanishi Y, Ueoka-Nakanishi H, Hisabori T (2003) Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin: thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J Biol Chem* 278: 31848–31852
- Nagy PD, Wang RY, Pogany J, Hafren A, Makinen K (2011) Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* 411: 374–382
- Pelton JG, Torchia DA, Meadow ND, Roseman S (1993) Tautomeric states of the active-site histidines of phosphorylated and unphosphorylated IIIGlc, a signal-transducing protein from *Escherichia coli*, using two-dimensional heteronuclear NMR techniques. *Protein Sci* 2: 543–558
- Peterson MR, Hall DR, Berriman M, Nunes JA, Leonard GA, Fairlamb AH, Hunter WN (2000) The three-dimensional structure of a Plasmodium falciparum cyclophilin in complex with the potent anti-malarial cyclosporin A. *J Mol Biol* 298: 123–133
- Pfütz G, Kallen J, Schirmer T, Jansonius JN, Zurini MG, Walkinshaw MD (1993) X-ray structure of a dimeric cyclophilin-cyclosporin crystal complex. *Nature* 361: 91–94
- Piotukh K, Gu W, Kofler M, Labudde D, Helms V, Freund C (2005) Cyclophilin A binds to linear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins. *J Biol Chem* 280: 23668–23674
- Rupp B (2009) Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology, Ed 1. Garland Science, New York, NY.
- Sattler M, Schleucher J, Griesinger C (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog NMR Magn Reson Spectrosc* 34: 93–158
- Sekhon SS, Kaur H, Dutta T, Singh K, Kumari S, Kang S, Park SG, Park BC, Jeong DG, Pareek A, et al (2013) Structural and biochemical characterization of the cytosolic wheat cyclophilin TaCypA-1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69: 555–563
- Solé VA, Papillon E, Cotte M, Walter P, Susini J (2007) A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive x-ray fluorescence spectra. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 62: 63–68
- Taylor P, Dornan J, Carrello A, Minchin RF, Ratajczak T, Walkinshaw MD (2001) Two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains. *Structure* 9: 431–438
- Taylor P, Page AP, Kontopidis G, Husi H, Walkinshaw MD (1998) The x-ray structure of a divergent cyclophilin from the nematode parasite *Brugia malayi*. *FEBS Lett* 425: 361–366
- Trupkin SA, Mora-García S, Casal JJ (2012) The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant J* 71: 712–723
- Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59: 687–696
- Wang P, Heitman J (2005) The cyclophilins. *Genome Biol* 6: 226
- Wu X, Wilcox CB, Devasahayam G, Hackett RL, Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Heitman J, Hanes SD (2000) The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J* 19: 3727–3738
- Xu H, Freitas MA (2007) A mass accuracy sensitive probability based scoring algorithm for database searching of tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 8: 133

9. ANEXO III – ARTIGO PUBLICADO EM MARÇO DE 2011 NA REVISTA JBC (JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY), NO QUAL PARTICIPO COMO QUARTA AUTORA.

Realizei os experimentos contidos nas figuras 02 e 04.

Plant Pathogenic Bacteria Utilize Biofilm Growth-associated Repressor (BigR), a Novel Winged-helix Redox Switch, to Control Hydrogen Sulfide Detoxification under Hypoxia^{*[S]}

Received for publication, February 23, 2011, and in revised form, March 24, 2011. Published, JBC Papers in Press, June 1, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.234039

Beatriz G. Guimarães^{1,2}, Rosicler L. Barbosa¹, Adriana S. Soprano, Bruna M. Campos, Tiago A. de Souza, Celisa C. C. Tonoli, Adriana F. P. Leme, Mario T. Murakami, and Celso E. Benedetti³

From the Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo CP6192, Brazil

Winged-helix transcriptional factors play important roles in the control of gene expression in many organisms. In the plant pathogens *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*, the winged-helix protein BigR, a member of the ArsR/SmtB family of metal sensors, regulates transcription of the bigR operon involved in bacterial biofilm growth. Previous studies showed that BigR represses transcription of its own operon through the occupation of the RNA polymerase-binding site; however, the signals that modulate its activity and the biological function of its operon are still poorly understood. Here we show that although BigR is a homodimer similar to metal sensors, it functions as a novel redox switch that derepresses transcription upon oxidation. Crystal structures of reduced and oxidized BigR reveal that formation of a disulfide bridge involving two critical cysteines induces conformational changes in the dimer that remarkably alter the topography of the winged-helix DNA-binding interface, precluding DNA binding. This structural mechanism of DNA association-dissociation is novel among winged-helix factors. Moreover, we demonstrate that the bigR operon is required for hydrogen sulfide detoxification through the action of a sulfur dioxygenase (Blh) and sulfite exporter. As hydrogen sulfide strongly inhibits cytochrome *c* oxidase, it must be eliminated to allow aerobic growth under low oxygen tension, an environmental condition found in bacterial biofilms, xylem vessels, and root tissues. Accordingly, we show that the bigR operon is critical to sustain bacterial growth under hypoxia. These results suggest that BigR integrates the transcriptional regulation of a sulfur oxidation pathway to an oxidative signal through a thiol-based redox switch.

Winged-helix proteins belong to a larger ensemble of helix-turn-helix (HTH)⁴ factors employed by living organisms to

sense and respond to diverse environmental cues (1). For example, in bacterial cells, winged-helix transcriptional factors function as metal sensors, which control metal tolerance (2).

In the plant pathogens *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*, the winged-helix repressor protein BigR (biofilm growth-associated repressor) controls the expression of the bigR operon through the recognition of the -10 region in the operator site, thus blocking transcription of the operon genes (3). bigR operons are evolutionarily conserved in some plant-associated bacteria and human opportunistic pathogens and encode BigR itself, membrane transporters, and Blh, a DUF442- β -lactamase domain protein related to the mitochondrial sulfur dioxygenase ETHE1 involved in sulfide detoxification in mammals (3, 4). Previous studies have shown that the bigR operon is actively transcribed in *Xylella* and *Agrobacterium* biofilms and that mutants lacking BigR can attach more tightly to glass and root surfaces than normal bacteria. Although these results strongly indicated that the bigR operon plays an important role in bacterial biofilm formation or cell adhesion, the biological function of the operon genes and the signals that modulate the repressor activity of BigR remained elusive (3).

Due to sequence similarities to bacterial metal sensors, BigR was designated a member of the ArsR/SmtB protein family. Nevertheless, the sequence homology to metalloregulatory repressors is restricted to the HTH DNA-binding domain, and BigR does not preserve the metal-binding sites usually found in the metal sensors (5). Moreover, the DNA binding activity of BigR, activation of the operon, and growth of the *Agrobacterium* bigR[−] and blh[−] mutants were not influenced by metal ions (3). These findings led us and others to propose that BigR and a related group of uncharacterized ArsR-like proteins (supplemental Fig. S1) comprise a new subfamily of winged-helix repressors (3, 6, 7).

In this new subfamily of winged-helix repressors, a conserved methionine (Met-18) and two invariant cysteines (Cys-42 and Cys-108) are predicted to be close in the structure, suggesting a structural or functional role in protein activity or regulation (3). Interestingly, the conserved cysteines, which are not present in the metal sensors, are found in the recently characterized SoxR regulator (supplemental Fig. S1) involved in sulfur oxidation (8). Thus, the similarities shared by BigR and Blh with SoxR and ETHE1, respectively, suggested a role of the bigR operon in sulfur metabolism.

^{*} This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

The atomic coordinates and structure factors (codes 3PQK and 3PQL) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

^[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S6 and a supplemental movie.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin BP 48 91192, France.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-19-3512-1111; Fax: 55-19-3512-1006; E-mail: celso.benedetti@lnbio.org.br.

⁴ The abbreviations used are: HTH, helix-turn-helix; BigR, biofilm growth-associated repressor; Blh, β -lactamase-like hydrolase; ArsR, arsenic resistance repressor.

Here we show how the conserved cysteines affect the DNA binding activity of BigR through a structural mechanism of DNA association/dissociation that is novel among the winged-helix repressors. In addition, we provide evidence suggesting that Blh is structurally related and functions as a glutathione-dependent sulfur dioxygenase similar to mouse ETHE1 and that its activity is coupled to a sulfite exporter. In summary, our results unveil the biological role of the bigR operon in hydrogen sulfide detoxification under oxygen-limiting conditions. These features may help bacterial cells to form thicker biofilms and to colonize plant tissues with low oxygen tension.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Purification and Crystallization—*Xylella* BigR was initially purified by ion exchange and hydrophobic interaction chromatographies and crystallized as described previously (9). In an alternative purification protocol, protein extracts were loaded into a Q Sepharose fast flow in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 0.5 mM DTT. After elution, BigR was dialyzed in the same buffer, loaded into a Hi-Trap heparin HP column, and eluted with a linear NaCl gradient. The protein was further purified on a Superdex G75-16/60 column, and crystals were obtained by mixing 1 μ l of protein solution (6.5 mg/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT) with 1 μ l of reservoir buffer (100 mM imidazole, pH 8.0, 10% PEG 8000).

X-ray Data Collection and Processing—X-ray diffraction data from native and Se-Met-labeled crystals were collected at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, and although data processing indicated that the crystals belonged to space group P321 (9), structure refinement could only be performed without imposing any crystal symmetry. Thus, diffraction data collected from Se-Met-labeled crystals at the wavelength corresponding to the maximum of f'' was reprocessed in the triclinic space group using the XDS package (10). This data set was chosen due to its higher completeness in space group P1 in comparison with the native data set. Statistics from this data set were labeled as oxidized BigR (see Table 1).

The crystals produced by the alternative purification protocol were cryoprotected with 30% (v/v) PEG 400 added to the mother liquor prior to flash-cooling in a 100 K nitrogen stream. The crystals belonged to space group P1 and diffracted up to 2.5-Å resolution. The diffraction data corresponding to reduced BigR were processed with the XDS package, and the statistics are shown in Table 1.

Structure Solution and Refinement—The structure of the oxidized form of BigR was solved by multiwavelength anomalous diffraction method from Se-Met-labeled crystals. Initial phase calculation in the space group P3₁21 and density modification using autoSHARP (11) resulted in interpretable electron density maps. Nevertheless, although alternating cycles of model building using COOT (12) and refinement with REFMAC5 (13) allowed the modeling of 96 out of the 102 residues expected in the asymmetric unit (a single monomer), $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ values remained at 0.230/0.263, and the addition of water molecules caused the R_{free} to rise. Refinement was done against both native and derivative data processed in the space group P3₁21, and the same problem was encountered. At this point, lower symmetry space groups were applied, and structure refinement

could only be accomplished in P1. Diffraction data collected from the Se-Met-labeled crystal at the wavelength corresponding to the maximum of f'' were reprocessed in P1, and the structure refinement was performed with BUSTER 2.9.1 (14). Non-crystallographic symmetry was applied in all steps of the refinement using the local structure similarity restraints method implemented in the program BUSTER. The local structure similarity restraints method involves local distances between pairs of atoms instead of domain separation as in conventional superposition-based non-crystallographic symmetry treatments. The "autoncs" method in BUSTER automatically detects and applies the local structure similarity restraints. Alternating cycles of refinement and model building using COOT (12) allowed the modeling of 603 out of the 612 expected residues for the six monomers in the asymmetric unit. One hundred and thirty-three solvent atoms were added during the last refinement cycles, and the R -factor/ R_{free} values converged to 0.209/0.242. The stereochemistry of the model was analyzed with MolProbity (15), and no outliers were observed in the MolProbity Ramachandran plot, which showed 94.3% of the residues in the most favored region. Additional refinement details are summarized in Table 1.

The structure of reduced BigR was solved by molecular replacement with the program PHASER (16) using the atomic coordinates of an *E. coli* repressor YgaV (PDB code 3CUO) (17) as the search model. BigR shares 29% identity and 55% similarity at the amino acid level with YgaV. Two copies of the polyaniline dimer used as model were placed in the asymmetric unit. Extensive attempts to use the oxidized form of BigR as a model for molecular replacement were unsuccessful, possibly due to the structure flexibility. Model refinement was performed by alternating cycles of BUSTER with visual inspection of the electron density maps and manual rebuilding with COOT. Non-crystallographic symmetry was applied in all steps of the refinement. A total of 385 residues were modeled out of the 408 expected for the four monomers in the asymmetric unit. The stereochemistry of the model was analyzed with MolProbity, and no outliers were observed in the Ramachandran plot with 99.2% of the residues in the most favored region. Additional refinement details are summarized in Table 1. Electrostatic potentials were calculated using the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (18) through the PDB2PQR Server (19). The three-dimensional coordinates of oxidized and reduced BigR have been deposited in the Protein Data Bank (accession codes 3PQK and 3PQJ, respectively).

Molecular Modeling and Docking—The crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* ETHE1 protein, 2GCU (20), and *Escherichia coli* rhodanese YnjE, 3IPP (21), were used as templates for restraint-based modeling of the Blh ETHE1-like and DUF442 domains, respectively, using MODELLER (22). Ten models were generated based on the alignment obtained by the prediction method pGenTHREADER from the PSIPRED server (23–25). Models were evaluated with the discrete optimized protein energy potential, and those with the lower global scores were selected for explicit solvent molecular dynamics simulation using GROMACS (26) to check their stability and consistency. The overall and local quality analyses of the final models were assessed by VERIFY3D (27), PROSA (28), and VADAR

BigR, a Novel Redox Switch

(29). Three-dimensional structures were displayed, analyzed, and compared using the program COOT (12).

GSH were modeled into the putative active site of the ETHE1-like domain of Blh using the Molegro Virtual Docker (30). Typical docking runs consisted of a single ligand with the ETHE1-like domain with no solvent molecules. The iron metal in the binding site was considered in the docking runs, taking into account steric (van der Waals) and electrostatic interactions. The docking procedure was randomized with a minimum of 10 runs and 5000 iterations per ligand. The best 10 poses (ligand orientation) generated were recalculated and reranked by analyzing the energy scores, binding affinities, and ligand-residue (H-bond) interactions. Video images were produced using the UCSF Chimera package from the Resource for Bio-computing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (31).

Protein Oxidization and Disulfide Bond Formation—*E. coli* cells expressing the His₆-BigR protein were lysed in the presence of 30 mM oxidized glutathione (GSSG). The lysates were incubated for 30 min on ice, and the protein was purified by affinity chromatography (3). BigR samples were analyzed by mass spectrometry and gel-shift assays.

Molecular Mass Determination by Mass Spectrometry—Purified BigR with reduced and oxidized thiols were treated with 50 mM iodoacetamide and analyzed by a Q-ToF Ultima API spectrometer (Waters Corp.), operated in MS continuum mode. Data acquisition was from m/z 100–3,000 at a scan rate of 1 s and an interscan delay of 0.1 s. The spectra were accumulated over about 300 scans, and the multiple charged data produced on the m/z scale were converted to the mass scale using the maximum entropy-based software (32) supplied with the MassLynx 4.1 software package. The processing parameters were: output mass range was 6,000–20,000 Da at a resolution of 0.1 Da/channel, the simulated isotope pattern model was used with the spectrum blur width parameter set to 0.2 Da, and the minimum intensity ratios between successive peaks were 20% (left and right). The deconvoluted spectrum was smoothed (2×3 channels, Savitzky-Golay smooth), and the mass centroid values were obtained using 80% of the peak top and a minimum peak width at half-height of four channels.

Site-directed Mutagenesis and Gel-shift Assays—The Cys-42 and Cys-108 residues were each replaced by serines by site-directed mutagenesis, generating the C42S (M1) and C108S (M2) mutant proteins. The proteins, subcloned into pET28a, were expressed as His₆ fusions, purified by affinity chromatography, and used in gel-shift assays as described previously (3), except that those treated with GSSG were also incubated with tris(2-carboxyethyl)phosphine prior to analysis.

Fluorometric Assays—GFP fluorescence as a measurement of the transcriptional activity of the operon was performed as described previously (3). Bacterial cells carrying the reporter plasmid (Blh promoter fused to GFP) were transformed with the wild type and mutated BigR proteins. Cells were grown in LB medium to $A_{600\text{ nm}} = 1.0$, and the expression of the repressors was induced by 0.1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside. After growth at 37 °C for 3 h, cells were collected, resuspended in PBS buffer, and lysed with lysozyme (0.2 mg/ml) in the presence of 10 mM GSSG for 2 h on ice. The suspension was

disrupted by sonication, and GFP fluorescence was measured in the supernatant.

Growth of *Agrobacterium* Cells—The wild type *A. tumefaciens* strain C58 and the insertion mutants defective in BigR (*bigR*[−]) and Blh (*blh*[−]) production were grown in YEP medium, pH 7.5, as described previously (3), or in YEP supplemented with 50 mM MES buffer, pH 5.8. For growth in gradient plates, 3 μ l of a bacterium suspension ($A_{600\text{ nm}} = 0.05$) were spotted on each plate containing ammonium sulfide (0–1 mM), thiosulfate (0–25 mM), or GSSG (0–5 mM), and the cells were grown at 30 °C for 2–4 days.

Sulfite production by the bacterial cells was measured semi-quantitatively using the sulfite test strips (Merckoquant, Merck), by visual comparison of the reaction zone of the test strip with the color scale provided by the manufacturer. Bacterial cells were grown at 30 °C for 16 h in buffered YEP, pH 5.8, supplemented with 0.5 mM ammonium sulfide. Cells were removed by centrifugation, and the amount of sulfite was measured in the supernatant.

A. tumefaciens wild type and insertion mutants were grown inside glass vials with screw-capped gas-tight seals. Three μ l of the bacterial suspensions were streaked on the surface of the MES-buffered medium. The vials were closed tight and purged with 100% nitrogen at a flow rate of 25 ml/min using inlet and outlet needles. Bacterial cells were grown at 30 °C for different time periods under atmospheric oxygen or after a purge with 0.75 or 1.5 liters of nitrogen.

RESULTS

BigR Shows a Typical Winged-helix Fold but Two Redox States—To gain insights into the structure-function relationship of BigR and to elucidate the structural/regulatory role of the conserved cysteines in this type of winged-helix repressor, the crystal structure of BigR was solved. We observed that BigR purified by two independent procedures produced two types of protein crystals (Table 1). Surprisingly, the three-dimensional structures derived from these crystals revealed that although BigR adopts a typical winged-helix fold of homodimeric repressors of the ArsR family, the protein was found in two redox states. The structure of oxidized BigR revealed an intrachain disulfide bond between the conserved Cys-42 and Cys-108 residues that links helix 2 to helix 5 (Fig. 1, A and B). This observation strongly suggested that the invariant cysteines could indeed play a critical role in the structure and function of the repressor.

The Cys-42–Cys-108 Disulfide Bridge Induces Conformational Changes in BigR—When the structures of oxidized and reduced BigR were compared with each other, significant changes in the tertiary and quaternary structures of the repressor were observed. The main conformational changes between the two redox-state monomers occur in the N terminus of helix 1, β -hairpin wing, and C terminus of helix 5 (Fig. 1A). The loop preceding helix 4 also adopts a slightly different conformation. Most notably, however, in reduced BigR, the β -hairpin wing approaches helix 4 more closely, whereas in oxidized BigR, the disulfide bond induces a large displacement of helix 5 and introduces a small 3_{10} helix comprising residues Cys-108–Glu-111 (Fig. 1A). In addition, the BigR quaternary structures show a

TABLE 1
Data collection and refinement statistics

	Oxidized BigR	Reduced BigR
Data statistics ^a		
Space group	P1	P1
Unit cell	$a = 34.36 \text{ \AA}; b = 34.37 \text{ \AA};$ $c = 141.31 \text{ \AA} \alpha = \beta =$ $90.01^\circ; \gamma = 120.01^\circ$	$a = 40.59 \text{ \AA}; b = 47.84 \text{ \AA}; c = 54.70 \text{ \AA} \alpha = 90.03^\circ \beta = 89.96^\circ;$ $\gamma = 105.34^\circ$
Wavelength (Å)	0.9795	1.433
Resolution range (Å)	29.01–2.10 (2.22–2.10)	39.10–2.50 (2.63–2.50)
No. of unique reflections	30801	13185
Multiplicity	2.2	3.9
Completeness (%)	94.0 (92.4)	93.8 (83.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.3 (2.8)	13.2 (4.0)
R_{meas} (%)	6.7 (45.8)	9.7 (43.7)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	18.59–2.10	20.86–2.50
No. of reflections	30782	13169
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.209/0.242	0.194/0.249
r.m.s.d. ^b bond length (Å)	0.010	0.010
r.m.s.d. ^b bond angle (°)	1.03	1.17
Mean B -value protein (all atoms) (Å ²)	37.3	43.30
Mean B -value solvent (Å ²)	41.3	44.86
Protein atoms	4603	2923
Solvent atoms	133	129
Residues in Ramachandran plot regions (%)		
Most favored	94.25	99.18
Allowed	5.75	0.82
Outliers	0	0

^a Numbers in parentheses are for the highest resolution shell.^b r.m.s.d., root mean square deviation.

remarkable reorientation of the HTH domain and β -hairpin wing of one monomer relative to the other upon the disulfide bond formation (Fig. 1C). The dimer of reduced BigR is much more compact. For instance, the distance between the C- α atoms of Gln-67 (helix 4) from opposite monomers goes from 34.8 Å in the oxidized structure to 31.2 Å in reduced BigR (Fig. 1C).

Oxidized BigR Does Not Bind to DNA, Allowing Transcription of Its Operon—The fact that BigR was found in two redox states strongly suggested that the Cys-42–Cys-108 disulfide bridge observed in the crystal structure was the basis of a DNA association/dissociation mechanism and transcriptional regulation of the operon. To test this hypothesis, BigR was expressed in the presence and absence of molar excess of GSSG to promote intrachain disulfide bond formation. Mass spectrometry analysis of the purified proteins revealed molecular mass peaks consistent with a mixture of reduced (S–H) and oxidized (S–S) forms of BigR on both GSSG-treated and untreated samples (supplemental Fig. S2), indicating that the GSSG treatment was effective to promote the intrachain disulfide bond formation.

Gel-shift assays showed that BigR from the GSSG-treated sample does not bind to its target DNA, except when in the presence of the reducing agent tris(2-carboxyethyl)phosphine (Fig. 2A). These results indicated that in the oxidized form, BigR loses its affinity to DNA. To confirm this, the Cys-42 and Cys-108 were each replaced by serines, and the DNA binding properties of the mutated proteins were evaluated. As expected, both the C42S and the C108S mutants shifted the target DNA, similar to the wild type BigR in its reduced form (Fig. 2B). In addition, the mutated proteins strongly repressed the transcription of a GFP reporter gene under the control of the BigR target promoter, similar to the wild type BigR (Fig. 2C). Because the mutated proteins cannot form an intrachain disulfide bond, the results confirm that BigR binds to DNA in its reduced form.

To show, however, that BigR releases transcription upon Cys-42–Cys-108 bond formation, the wild type and mutated proteins were expressed in *E. coli* carrying the operon reporter plasmid, and the expression of the reporter gene was quantified in response to the GSSG treatment. The results clearly show a significant increase in GFP fluorescence only in the GSSG-treated cell extracts expressing the wild type BigR, thus confirming that in the S–S form, BigR dissociates from DNA, allowing transcription of the operon (Fig. 2D).

The Structural Basis of the Molecular Switch and Redox-regulated DNA Binding—The crystal structures of oxidized and reduced BigR provide the structural basis of the redox-regulated DNA binding. In the oxidized dimer, the side chains of a number of basic residues from both monomers are exposed and arranged in a slightly less compact and continuous basic patch when compared with the reduced dimer (Fig. 3, A and B). These residues are from the HTH domain and β -hairpin wing and are predicted to bind DNA (33). Thus, in the more open conformation of oxidized BigR (Fig. 1C), the side chains of these basic residues are thought to retract from DNA. In addition, a closer look at the Cys-42 and Cys-108 environments reveals the molecular basis of the redox switch. In reduced BigR, the N terminus of helix 1 sits in between helices 2 and 5 of the opposite monomer (Fig. 3, C and D). Accordingly, the C terminus of helix 5 retracts, and the side chains of Cys-42 and Cys-108 are no longer in position to interact. Furthermore, in reduced BigR, the side chain of the conserved Met-18, which is stabilized by a hydrophobic interaction with Tyr-104 from the opposite monomer, occupies almost the exact position of the disulfide bond in the oxidized structure (Fig. 3D). The Cys-42 sulfur acts as a proton donor in a hydrogen bond with the carbonyl oxygen of Leu-38, whereas the Cys-108 sulfur forms a hydrogen bond with the main-chain amide of Met-13 from the oppo-

BigR, a Novel Redox Switch

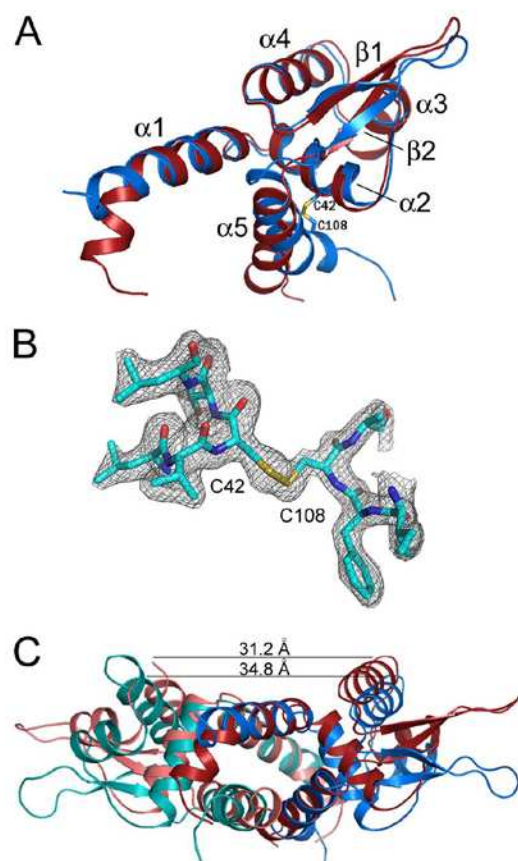


FIGURE 1. Structure and conformational changes of oxidized and reduced BigR. *A*, structural comparison of the oxidized (blue) and reduced (red) monomers. The intrachain disulfide bond is represented as sticks, and the corresponding cysteine residues are labeled. Secondary structure elements are indicated. *B*, $2F_o - F_c$ electron density map contoured at 1.2σ showing the disulfide between Cys-42 and Cys-108 in the oxidized monomer. *C*, superposition of the BigR dimers. Light and dark colors are used to distinguish the homodimer subunits. The figure was produced by superposing the C- α atoms of residues 21–32 (helix 1) from both monomers. The distances between the Gln-67 C- α atoms of helix 4 from opposite subunits are indicated.

site monomer. The Cys-108–Met-13 interaction contributes to the stabilization of the twisted conformation of helix 1 in reduced BigR, whereas in oxidized BigR, Met-18 is largely displaced and interacts with Met-39 from the opposite monomer. Met-39 is partially conserved in this subgroup of winged-helix repressors and is replaced in some repressors by a leucine, which conserves the hydrophobic character in this position (supplemental Fig. S1). In summary, a network of interactions involving sulfur-containing residues appears to regulate the redox-induced conformational changes in BigR. This observation, together with the fact that BigR and Blh are both similar to proteins involved in sulfur oxidation, led us to investigate a possible role of BigR and its operon in sulfur metabolism.

The *bigR* Operon Is Required for Hydrogen Sulfide Detoxification—Despite the low sequence identity observed between the β -lactamase domain of Blh and the sulfur dioxygenase

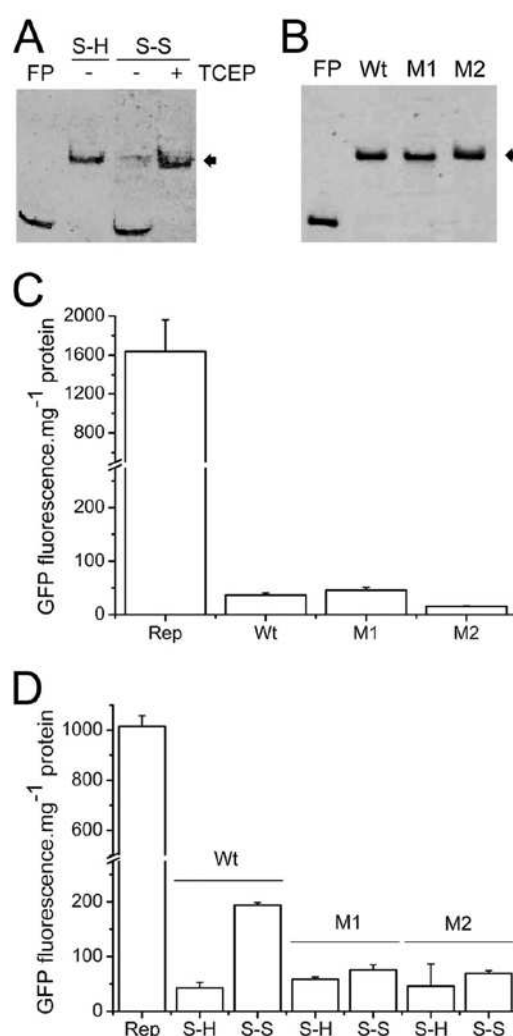


FIGURE 2. Oxidized BigR ceases from binding to DNA and releases transcription. *A*, gel-shift assay showing that oxidized (S–S) BigR does not bind to the target DNA as reduced (S–H) BigR; however, binding is restored upon tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) treatment. Shifted bands are indicated by arrows, and FP is the free probe. *B*, gel-shift assay showing that both the C42S (M1) and the C108S (M2) mutants bind to the target DNA as the wild type (Wt) protein. Shifted bands are indicated by arrows, and FP is the free probe. *C*, GFP fluorescence as a measurement of the transcriptional activity of the *bigR* operon reporter plasmid alone (Rep) or in the presence of the wild type BigR, M1, or M2 proteins. *D*, GFP reporter gene assay of *E. coli* cell extracts expressing the wild type or mutated BigR proteins, in the presence (S–S) or absence (S–H) of GSSG. Error bars indicate S.E.

ETHE1, protein sequence alignments show that the amino acid residues that are involved in metal binding or that have been shown to affect the function of the human ETHE1 protein (20) are conserved in Blh (supplemental Fig. S3). Moreover, molecular modeling not only indicates that Blh is structurally related to ETHE1 but supports previous data showing that these are glutathione-dependent enzymes (34) (supplemental Fig. S3). Thus, to test whether Blh would play a role similar to mammalian ETHE1 in hydrogen sulfide oxidation, we employed the *Agrobacterium blh*[−] and *bigR*[−] mutants. Although the *blh*[−]

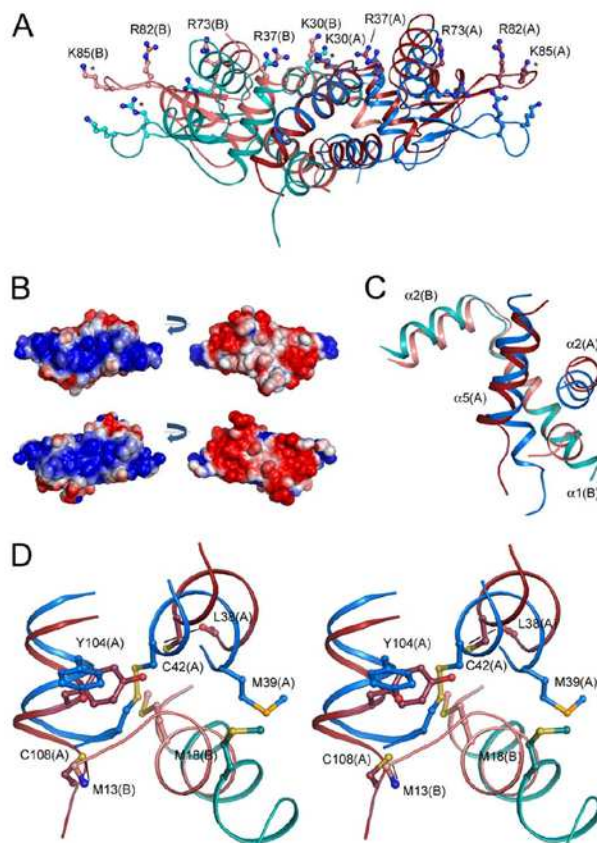


FIGURE 3. The structural basis for the redox-regulated DNA binding in BigR. A, basic residues potentially involved in DNA interaction in oxidized (blue) and reduced BigR (red) are represented in ball-and-sticks format. Dark and light colors are used to distinguish monomers A and B, respectively. Residues marked with an asterisk are replaced by alanines in the refined structure, and their side chains were modeled to produce this image. B, electrostatic surface of reduced (top) and oxidized (bottom) BigR showing differences in the basic DNA-binding region as well as in the negatively charged surface of the opposite face of the dimers. The bonds for potential contour map visualization are ± 2 kT/e. C, comparison of the secondary structure elements in oxidized (blue) and reduced (red) BigR showing the N terminus of helix 1 in between helices 2 and 5 in the reduced structure. Dark and light colors correspond to monomers A and B, respectively. D, stereo view of the Cys-42 and Cys-108 neighborhood depicting a network of sulfur-containing residues.

mutant does not produce Blh, the *bigR*[−] mutant expresses high levels of the operon proteins (3). The *Agrobacterium* wild type and mutant cells were grown in the presence of bismuth (BiGGY agar), an indicator of hydrogen sulfide production. As sulfide combines with bismuth, brown to black pigmented colonies develop. In agreement with the operon regulation, the *bigR*[−] mutant produces fewer pigmented colonies when compared with the wild type bacteria (Fig. 4A), suggesting that when the operon is activated, hydrogen sulfide does not accumulate. By contrast, the *blh*[−] mutant grows much darker colonies in BiGGY agar than the wild type and *bigR*[−] cells, indicating that it accumulates higher levels of hydrogen sulfide.

To further verify whether hydrogen sulfide affects bacterial growth, the *A. tumefaciens* wild type and mutant cells were grown under increased amounts of thiosulfate or ammonium

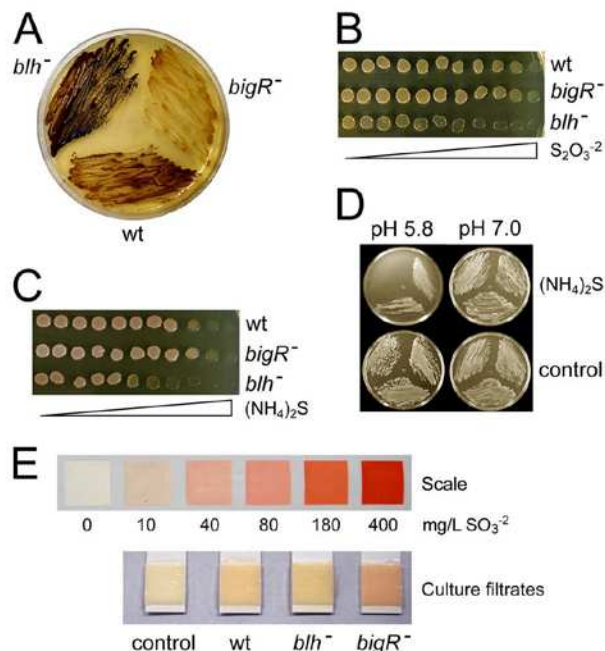


FIGURE 4. The *bigR* operon is required for hydrogen sulfide detoxification. A, growth of *A. tumefaciens* wild type and *bigR*[−] and *blh*[−] insertion mutants in BiGGY agar medium, showing that the *blh*[−] cells accumulate higher levels of hydrogen sulfide relative to wild type (wt) and *bigR*[−] mutant. B and C, growth of the wild type, *bigR*[−], and *blh*[−] cells in thiosulfate (0–25 mM) or ammonium sulfide (0–1 mM) gradient plates, respectively. D, effect of pH on the toxicity of 1 mM ammonium sulfide relative to control (no ammonium sulfide). The growth of the *blh*[−] cells is affected by the acidic pH only. Bacterial cells were plated as indicated in A. E, sulfite levels in the culture supernatants of wild type, *bigR*[−], and *blh*[−] cells estimated by the sulfite test strip, according to the scale. Culture medium without bacterial growth (control) is shown for comparison.

sulfide, which at acidic pH generate hydrogen sulfide. It was found that although *blh*[−] cells are more sensitive to thiosulfate and ammonium sulfide, *bigR*[−] cells are able to tolerate higher amounts of both compounds relative to the wild type bacteria (Fig. 4, B and C), indicating that the *bigR* operon is important for hydrogen sulfide detoxification. The toxic effects of ammonium sulfide and thiosulfate are pH-dependent and were observed at pH $\sim$ 5.8, (Fig. 4D), which is close to the pH where molecular hydrogen sulfide predominates in solution. Because *blh*[−] cells accumulate higher levels of hydrogen sulfide, their growth is inhibited by the low pH (Fig. 4D).

These results indicated that Blh acts as a sulfur dioxygenase similar to mouse ETHE1, which oxidizes hydrogen sulfide to sulfur dioxide (4). Because sulfur dioxide readily interconverts into sulfite and one of the proteins of the *bigR* operon carries a TauE domain found in sulfite exporters (35), we tested whether the bacterial cells would export sulfite. Surprisingly, higher amounts of sulfite were detected in the culture supernatants of the *bigR*[−] relative to wild type and *blh*[−] cells in medium supplemented with ammonium sulfide (Fig. 4E), strongly indicating that when the operon is active, sulfite is exported. Taken together, the results show that the *bigR* operon is important for hydrogen sulfide detoxification through the action of a sulfur dioxygenase that operates in conjunction with a sulfite exporter.

BigR, a Novel Redox Switch

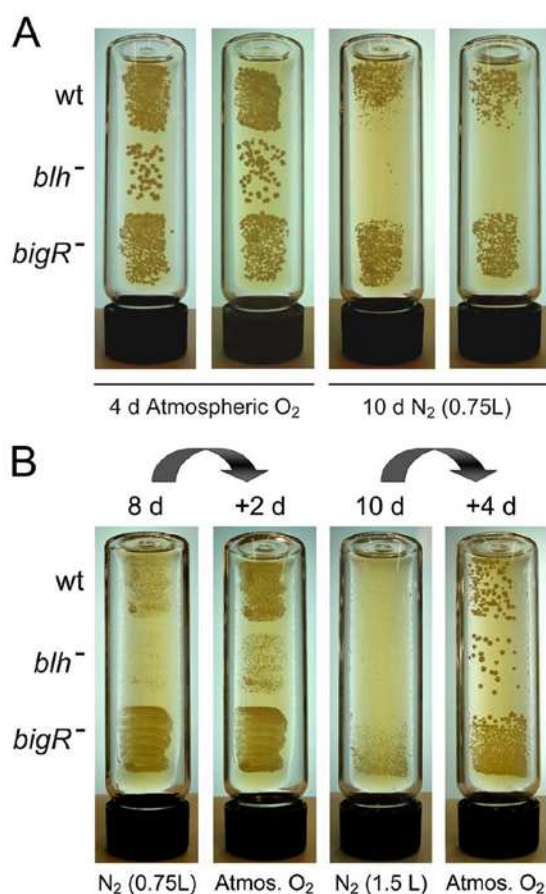


FIGURE 5. The *bigR* operon is critical for growth under oxygen-limiting conditions. A, growth of *A. tumefaciens* wild type and *bigR*⁻ and *blh*⁻ mutants under nitrogen-purged atmospheres (N₂). Bacterial cells were grown for the time periods indicated either under atmospheric oxygen or after a purge of nitrogen. B, after incubation under nitrogen-purged air (0.75 or 1.5 liters of N₂) for the time periods indicated, the flasks were opened, and the cells were further grown for 2–4 days to show that oxygen restored their growth. Atmos. O₂, under atmospheric oxygen.

The *bigR* Operon Is Critical to Sustain Growth under Hypoxia—Hydrogen sulfide is a potent inhibitor of cytochrome *c* oxidase (36). Because *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens* are obligate aerobic organisms (37, 38), we thought that hydrogen sulfide accumulation due to metabolic processes might become a limiting factor for bacterial growth in environments of low oxygen tension, particularly in places where these organisms live. For instance, oxygen levels in vascular tissues and roots can vary considerably, depending on the organism, plant age, tissue type, and cortex architecture, and can be as low as 0.5% (39–43). To test whether the *bigR* operon plays an adaptive role under oxygen-limiting conditions, the *A. tumefaciens* wild type and mutant cells were grown under nitrogen-purged atmospheres. As observed in Fig. 5A, the growth of the *blh*⁻ mutant was impaired in nitrogen-purged air, relative to the wild type and *bigR*⁻ mutant. On the other hand, the *bigR*⁻ mutant grew faster under nitrogen-purged air and recovered faster from lack of oxygen than the wild type and *blh*⁻ mutant after subsequent cultivation in atmospheric oxygen (Fig. 5B). Thus, the results

show that low oxygen tension is a limiting factor for the growth of hydrogen sulfide-producing bacteria and that the *bigR* operon, which detoxifies hydrogen sulfide, allows bacteria to survive in oxygen-limited environments.

DISCUSSION

To successfully colonize the plant vascular tissue and to induce crown galls, which are made of numerous vascular bundles, *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens*, respectively, have to adapt to these particular niches (44, 45). Here we show that the *bigR* operon in these pathogens, previously shown to influence bacterial biofilm formation (3), is required for hydrogen sulfide detoxification to allow bacterial growth under oxygen-limited conditions. Because hydrogen sulfide inhibits respiration, aerobic obligate bacteria such as *Xylella* and *Agrobacterium* must eliminate it to be able to grow under hypoxia, an environmental condition encountered by these pathogens in the interior of plant tissues (39, 41, 43). The data presented here indicate that hydrogen sulfide is oxidized to sulfite by the sulfur dioxygenase Blh and that sulfite, which is also toxic to the cells, is exported. This mechanism of hydrogen sulfide detoxification has not been reported before, and it highlights the adaptive role of the *BigR* operon in the colonization of the plant vascular tissues. In addition, production of hydrogen sulfide in bacterial biofilms may inhibit cell growth if oxygen levels in the biofilm layers are limited. This explains why the *bigR* operon is expressed at higher levels in *Xylella* and *Agrobacterium* biofilms (3). At least in the *Xylella*-citrus interaction, biofilm formation inside xylem vessels is the main cause of disease. Curiously, substantial quantities of sulfur were detected in *Xylella* biofilms inside the xylem vessels, and sulfur-linked structures on the surface of bacterial cells were suggested to promote bacterium adhesion and aggregation (44). Because the *bigR*⁻ mutant appears to be more “sticky,” it is possible that the *bigR* operon may also favor bacterial aggregation by increasing the external sulfur contents through the export of sulfite.

Related *BigR* operons occur in other plant and human opportunistic pathogens, and in a number of cases, the DUF442 domain of Blh is found separate from the ETHE1-like domain, an indication that these domains have independent but coupled enzymatic activities (3). Although Blh seems to function as a sulfur dioxygenase, the precise role of DUF442 is still unknown. DUF442 is structurally related to protein-tyrosine phosphatases (46); however, the C-(X)₅-R motif of the catalytic loop of classical protein-tyrosine phosphatases is replaced by C-(X)₄-R in Blh. Thus, we searched for proteins having the C-(X)₄-R consensus and found that rhodanases (sulfurtransferases) have highly conserved active-site loops with a CRXGX(R/T) motif (47). Surprisingly, the superposition of the Blh DUF442 with the catalytic domain of *E. coli* rhodanase YnJ (21) shows that the two domains have a similar fold and a remarkable conservation of the active-site residues, including the catalytic cysteine (supplemental Fig. S4), suggesting that DUF442 could display a rhodanase-like activity. Considering that rhodanases catalyze the transfer of sulfane sulfurs and have been implicated in cyanide detoxification (48), it is possible that by acting as a rhodanase, DUF442 could provide an extra

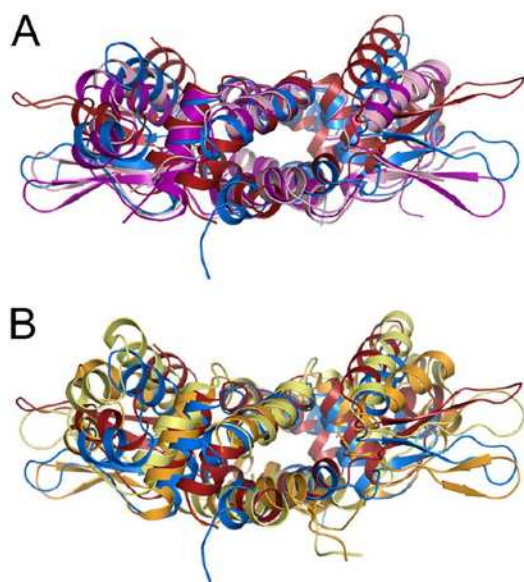


FIGURE 6. Conformational changes of BigR and related metal sensors. A, superposition of the BigR and SmtB dimers showing the conformational changes in the quaternary structures of reduced (red) and oxidized (blue) BigR relative to the structures of SmtB in its apo (purple) and zinc-bound forms (pink). Oxidized BigR adopts a more compact conformation than the apo and zinc SmtBs, as judged by the distances between the C- α atoms of Gln-67 (34.8 Å) and equivalent His-78 in the apo (40.9 Å) and zinc SmtB (37.4 Å). B, superposition of BigR and CzrA dimers showing that oxidized and reduced BigR have quaternary conformations similar to zinc CzrA (orange) and CzrA bound to DNA (yellow), respectively, indicating that the more compact (closed) conformation associated with high DNA binding affinity is conserved between BigR and CzrA. The figures were produced by superposing the C- α atoms of helix 1 of both monomers.

protection against cytochrome *c* oxidase inhibition under low oxygen tension.

In addition to the role played by the bigR operon, the three-dimensional structures of the BigR repressor presented here show that although BigR has a typical winged-helix fold of homodimeric repressors, its DNA binding activity is modulated by the redox status of a cysteine pair. To our knowledge, this is the first report on a winged-helix repressor whose mechanism of DNA association/dissociation is controlled by a redox switch involving a disulfide bond. Thus, we propose that BigR and related proteins be considered as a new subfamily of HTH repressors, named redox switches. In these repressors, a disulfide bridge between helices 2 and 5 induces large conformational changes in the dimer that lead to a retraction of the DNA-binding structures, precluding DNA interaction.

Conformational changes in the quaternary structure of homodimeric wing-helix repressors were reported for the metal sensors SmtB and CzrA (2, 49). A comparison of the quaternary structures of BigR, SmtB, and CzrA shows that BigR in its open conformation (oxidized form) is more compact than both apo and zinc SmtB structures and becomes even more compact when reduced (closed conformation) (Fig. 6A). On the other hand, although the conformations of apo and zinc CzrA are virtually the same (49), the quaternary structures of zinc CzrA and CzrA bound to DNA are similar to the oxidized and

reduced BigR structures, respectively (Fig. 6B). Thus, despite the fold similarities found between BigR and metal sensors, the dimer conformation associated with high DNA binding affinity does not appear to be conserved among these repressors because the closed conformation of SmtB bound to metal has the lower DNA binding affinity (2). Considering that charge distribution in the winged-HTH domain of BigR is not substantially altered between the low and high DNA binding affinity conformations (Fig. 3B), the binding-site topography and relative orientation of the winged-HTH domains become relevant for DNA regulation. In this respect, it is notable that BigR footprints a 22-bp palindrome extending ~ 75 Å (3), a distance that matches more closely the length of the DNA-binding site of reduced BigR than the oxidized BigR, estimated to be ~ 84 Å long. Furthermore, the consensus BigR box has two conserved TATA elements separated by ~ 28 Å (3). Because the heads of helices 4, predicted to contact the major groove of the DNA (33, 49), are ~ 31 Å apart in reduced BigR (Fig. 1C), it is reasonable to suggest that they would recognize the two TATA elements of the BigR box. Interestingly, the distance between the two winged-helix domains of the CzrA dimer in complex with its target DNA is slightly wider than that of reduced BigR (Fig. 6B), which is consistent with the fact that CzrA recognizes a longer 28-bp palindrome (49). Therefore, it appears that BigR and related proteins change the aperture of their winged-HTH domains not only to control their DNA binding affinity but also to match their target DNA sequences.

Redox-sensitive transcriptional factors belonging to other protein families have been described. The prokaryotic OxyR and yeast Yap1, which play roles as hydrogen peroxide sensors, are also modulated by intramolecular disulfide bonds (50, 51). In the case of OxyR, the disulfide bond causes a structural change in the DNA-binding domain of the repressor, affecting DNA regulation (52). Similarly, reversal of disulfide bond formation between distant cysteines is an effective way to induce large conformational changes in the DNA-binding domain of BigR. The transition between the two BigR redox states can be viewed in the animation depicting the molecular movement displayed by the BigR dimer, which resembles a butterfly movement (supplemental Movie S1).

A question that remains unanswered is what oxidizes BigR. Structural comparisons between the reduced and oxidized dimers reveal that although there is a channel leading to the disulfide bridge in oxidized BigR, the unbound cysteines are inaccessibly buried in the structure of the reduced protein (supplemental Fig. S5). This helps to explain why BigR is easily reduced but difficult to oxidize. Although we have some clues of what factors might have contributed to the oxidation of BigR during its purification, how BigR is oxidized *in vivo* is presently unknown. Hydrogen sulfide is unlikely to be the oxidizing agent itself due to its redox potential. Nevertheless, its toxicity also involves the formation of reactive oxygen species as a consequence of the electron transport chain inhibition (53). We believe that hydrogen sulfide-induced reactive oxygen species could play a role in BigR oxidation. Thiol groups of redox-sensitive cysteines have characteristic pK_a values as low as ~ 3.5 . Thus, at pH ~ 5.8 , where toxicity of hydrogen sulfide was observed, the

BigR, a Novel Redox Switch

thiolate anions are highly susceptible to oxidation by reactive oxygen species and can undergo various oxidative modifications including disulfide bonds (54). This idea is consistent with the fact that GSSG oxidized BigR in cell extracts and that *blh*[−] mutants are more sensitive to GSSG than the wild type and *bigR*[−] cells (supplemental Fig. S6). Alternatively, BigR could be a target of a thiol peroxidase similar to Gpx3, a hydroperoxide sensor that promotes the intramolecular disulfide bond that activates Yap1 (51). Proteins similar to Gpx3 exist in most *Xylella* and *Agrobacterium* strains.

In summary, we have described a novel winged-helix repressor that integrates the transcriptional regulation of a sulfur oxidation operon to an oxidative signal through a thiol-based redox switch. Furthermore, because the BigR operon is important for bacterial growth under hypoxia and influences biofilm formation, BigR could become a target to block the operon expression. Small ligands could be identified to either hold helix 1 in between helices 2 and 5 or directly prevent the disulfide bond formation, keeping the repressor bound to its target DNA. This approach might be useful to control biofilm formation in hydrogen sulfide-producing bacteria.

Acknowledgments—We gratefully acknowledge Thais Caroline Dalabona Dombroski and Simone Bau Betim for technical assistance in mass spectrometry and nitrogen gas experiments, respectively, and Jörg Kobarg and José Xavier Neto for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Gajiwala, K. S., and Burley, S. K. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 110–116
- Eicken, C., Pennella, M. A., Chen, X., Koshlap, K. M., VanZile, M. L., Sacchettini, J. C., and Giedroc, D. P. (2003) *J. Mol. Biol.* **333**, 683–695
- Barbosa, R. L., and Benedetti, C. E. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 6185–6194
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M. D., Prella, A., Fagioli, G., Rimoldi, M., and Zeviani, M. (2009) *Nat. Med.* **15**, 200–205
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., and Giedroc, D. P. (2003) *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143
- Campbell, D. R., Chapman, K. E., Waldron, K. J., Tottey, S., Kendall, S., Cavallaro, G., Andreini, C., Hinds, J., Stoker, N. G., Robinson, N. J., and Cavet, J. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 32298–32310
- Liu, T., Chen, X., Ma, Z., Shokes, I., Hemmingsen, L., Scott, R. A., and Giedroc, D. P. (2008) *Biochemistry* **47**, 10564–10575
- Mandal, S., Chatterjee, S., Dam, B., Roy, P., and Das Gupta, S. K. (2007) *Microbiology* **153**, 80–91
- Barbosa, R. L., Rinaldi, F. C., Guimarães, B. G., and Benedetti, C. E. (2007) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 596–598
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800
- Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2006) in *Macromolecular Crystallography Protocols* (Doublié, S., ed) Vol. 2, pp. 215–230, Humana Press, Totowa, NJ
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Smart, O. S., Vonrhein, C., and Womack, T. O. (2009) *BLUSTER*, version 2.9.1. Global Phasing Ltd., Cambridge, UK
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, W375–W383
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
- Gueuné, H., Durand, M. J., Thouand, G., and DuBow, M. S. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1954–1958
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10037–10041
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., and Baker, N. A. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–W667
- McCoy, J. G., Bingman, C. A., Bitto, E., Holdorf, M. M., Makaroff, C. A., and Phillips, G. N., Jr. (2006) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 964–970
- Hänzelmann, P., Dahl, J. U., Kuper, J., Urban, A., Müller-Theissen, U., Leimkühler, S., and Schindelin, H. (2009) *Protein Sci.* **18**, 2480–2491
- Fiser, A., and Sali, A. (2003) *Methods Enzymol.* **374**, 461–491
- Jones, D. T. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202
- Bryson, K., McGuffin, L. J., Marsden, R. L., Ward, J. J., Sodhi, J. S., and Jones, D. T. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, W36–38
- Lobley, A., Sadowski, M. I., and Jones, D. T. (2009) *Bioinformatics* **25**, 1761–1767
- Lindahl, E., Hess, B., and van der Spoel, D. (2001) *J. Mol. Model.* **7**, 306–317
- Eisenberg, D., Lüthy, R., and Bowie, J. U. (1997) *Methods Enzymol.* **277**, 396–404
- Wiederstein, M., and Sippl, M. J. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, W407–W410
- Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D., and Wishart, D. S. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3316–3319
- Thomsen, R., and Christensen, M. H. (2006) *J. Med. Chem.* **49**, 3315–3321
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
- Ferrige, A. G., Seddon, M. J., Green, B. N., Jarvis, S. A., Skilling, I., and Staunton, J. (1992) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, 707–711
- Cook, W. J., Kar, S. R., Taylor, K. B., and Hall, L. M. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 337–346
- Rohwerder, T., and Sand, W. (2003) *Microbiology* **149**, 1699–1710
- Weinitschke, S., Denger, K., Cook, A. M., and Smits, T. H. (2007) *Microbiology* **153**, 3055–3060
- Lloyd, D. (2006) *Trends Microbiol.* **14**, 456–462
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. (1987) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 136–143
- Kanvinde, L., and Sastry, G. R. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2087–2092
- Thomson, C. J., and Greenway, H. (1991) *Plant Physiol.* **96**, 1294–1301
- Eklund, L. (2000) *Trees Structure and Function* **14**, 177–180
- van Dongen, J. T., Schurr, U., Pfister, M., and Geigenberger, P. (2003) *Plant Physiol.* **131**, 1529–1543
- Spicer, R., and Holbrook, N. M. (2007) *J. Exp. Bot.* **58**, 1313–1320
- Armstrong, W., Webb, T., Darwent, M., and Beckett, P. M. (2009) *Ann. Bot.* **103**, 281–293
- Leite, B., Ishida, M. L., Alves, E., Carrer, H., Pascholati, S. F., and Kitajima, E. W. (2002) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, 645–650
- Pavlovkin, J., Okamoto, H., Wächter, R., Läubli, A., and Ullrich, C. I. (2002) *J. Exp. Bot.* **53**, 1143–1154
- Krishna, S. S., Tautz, L., Xu, Q., McMullan, D., Miller, M. D., Abdubek, P., Ambing, E., Astakhova, T., Axelrod, H. L., Carlton, D., Chiu, H. J., Clayton, T., DiDonato, M., Duan, L., Elsiger, M. A., Grzechnik, S. K., Hale, J., Hampton, E., Han, G. W., Haugen, J., Jaroszewski, L., Jin, K. K., Klock, H. E., Knuth, M. W., Koesema, E., Morse, A. T., Mustelin, T., Nigoghossian, E., Oommachen, S., Reyes, R., Rife, C. L., van den Bedem, H., Weekes, D., White, A., Hodgson, K. O., Wooley, J., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A., and Wilson, I. A. (2007) *Proteins* **69**, 415–421
- Cipollone, R., Ascenzi, P., and Visca, P. (2007) *IUBMB Life* **59**, 51–59
- Wilson, K., Mudra, M., Furne, J., and Levitt, M. (2008) *Dig. Dis. Sci.* **53**, 277–283
- Arunkumar, A. I., Campanello, G. C., and Giedroc, D. P. (2009) *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18177–18182
50. Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. E. (2001) *Cell* **105**, 103–113
51. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) *Cell* **111**, 471–481
52. Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., and Ryu, S. E. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1179–1185
53. Eghbal, M. A., Pennefather, P. S., and O'Brien, P. J. (2004) *Toxicology* **203**, 69–76
54. Brandes, N., Schmitt, S., and Jakob, U. (2009) *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 997–1014

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: Adaptação de protocolo de RNAi em *Citrus sinensis*

Pesquisador responsável: Celso Eduardo Benedetti

Experimentador: Bruna Medeira Campos

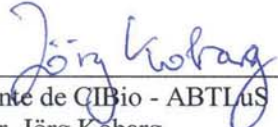
Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☐ -mestrado, ☐ -doutorado,
☒ -doutorado direto, ☐ -pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

O projeto tem como objetivo resolver a estrutura tridimensional da proteína ciclofilina de laranja doce (*Citrus sinensis*) por cristalografia de raios-X. O projeto envolverá a expressão da proteína Cyp de citros em bactéria e subsequente purificação para ensaios de cristalização. Além disso, a proteína recombinante produzida em bactéria será usada em ensaios funcionais e espectroscópicos.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 3.3.2010.

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



Presidente de CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Jörg Kobarg



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



Membro da CIBio - ABTLuS
Prof. Dr. Andrea Balan

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Análise estrutural e funcional das proteínas CsCyp (Ciclofilina) e CsTdx (Tiorredoxina) e Caracterização da interação entre a proteína PthA de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e uma Cisteína Protease de *Citrus sinensis*".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. CEB12, Instituição: LNBio – Laboratório Nacional de Biociências / CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Bruna Medéia de Campos Ramos


Orientador: Celso Eduardo Benedetti

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura