



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANTONIO MARCOS SARAIVA

**“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA
NUCLEOTIDASE SurE DE *Xylella fastidiosa*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Antonio Marcos Saraiva
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Anete Pereira de Souza

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sa71c	<p>Saraiva, Antonio Marcos Caracterização funcional e estrutural da nucleotidase SurE de <i>Xylella fastidiosa</i> / Antonio Marcos Saraiva. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadora: Anete Pereira de Souza. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Xylella fastidiosa</i>. 2. Nucleotidase. 3. Nucleosídeos - Metabolismo. 4. Cinética de enzimas. 5. Regulação alostérica. I. Souza, Anete Pereira de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Functional and structural characterization of nucleotidase SurE from *Xylella fastidiosa*.

Palavras-chave em inglês: *Xylella fastidiosa*; Nucleotidase; Nucleosídeos - Metabolism; Enzyme kinetics; Allosteric regulation.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Anete Pereira de Souza, Pietro Ciancaglini, Marco Aurélio Takita, Jörg Kobarg, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa.

Data da defesa: 21/09/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 21 de setembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

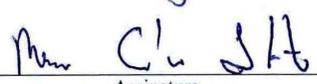
Profa. Dra . Anete Pereira de Souza (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dr. Pietro Ciancaglini


Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Takita


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg


Assinatura

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa


Assinatura

Profa. Dr .Julio Cezar Franco de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Ljubica Tasic

Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

**“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis”
(Bertold Brecht)**

OFEREÇO

Aos meus pais **Elcimar e Conceição**
que sempre investiram na minha educaço,
o maior legado que me trasmitiram e
a razõ pela qual eu alcancei mais esta etapa.

Agradecimentos

Talvez esta seja a parte mais importante da tese. Por todo este longo trabalho, o qual durou mais de cinco anos e, pelos resultados obtidos, compartilho e agradeço o apoio de todas estas pessoas:

Agradeço a Deus primeiramente por ter me dado força nos momentos mais difíceis desta jornada;

Aos meus pais e irmãos, pela valiosa educação e pelo apoio familiar durante toda a minha vida;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza pela excelente orientação, pelos conhecimentos transmitidos e pelo meu amadurecimento científico desde os meus tempos de Iniciação Científica;

À FAPESP (Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado (processo 04/02540-3) e pelo financiamento do trabalho através do projeto SMoIBNet (processo 01/07533-7)

Aos meus amigos e colegas do LAGM do CBMEG-Unicamp: Marcelo Szymanski, Adriano, Susy, Alexandre, Cleide. Débora, Lu Kauer, Zé Sérgio, Camília, Nani, Karen, Roberta, Sérgio e tantos outros que passaram e os recém-chegados Clelton, Lilian e Eliane pelos conhecimentos compartilhados, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos divertidos dentro e fora do laboratório;

Em especial, à Dilaine Schneider, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis do doutorado. Obrigado pelo carinho e pela força;

Aos amigos do Barracão da Genética: Prianda, Fernanda, Thiago, Tati, Adna, Melissa, Letícia, Lu Rossini, Laura, Karine, Danilo e muitos outros que me ajudaram nesta etapa;

Aos meus amigos de Campinas e Santos: Patricia, Celina, Rafael, Andréia, Cintia e muitos outros;

Aos técnicos Juverlande e Zildinha e às secretárias do CBMEG Tânia e Sandra que sempre foram solícitos, gentis e cujo apoio técnico foi de fundamental importância para o andamento deste trabalho

Ao Prof. Dr. Ricardo Aparício (IQ-Unicamp) por todo o seu conhecimento e colaboração na área de SAXS e cristalografia de proteínas, o qual foi de suma importância para a aquisição de resultados e para o andamento da tese

Aos alunos do professor Ricardo: Marcelo Reis, pelo seu inestimável apoio na área de SAXS e na elaboração do artigo e ao Marcelo Leite, pela grande ajuda na obtenção e coleta de dados da proteína;

Ao Prof. Dr. Nilson Zanchin por ter possibilitado a utilização de toda a infra-estrutura e os equipamentos do CEBIME e do LEC do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS);

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama e a sua aluna Luciana que me ajudaram a conhecer melhor o mundo das fosfatases;

A Prof^a. Dr^a. Dagmar Machado e Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud (IB-Unicamp) por terem permitido a utilização de seus laboratórios, e ao seus alunos Luis Peroni (Dagmar) Jacy e Carol (Liana) pelo apoio nos experimentos de cinética enzimática;

Aos membros da minha pré-banca: Prof. Dr. Jörg Kobarg (LNLS) e Prof^a. Dr^a. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP) pelo tempo despendido e pela contribuição e sugestões a este trabalho;

Aos membros da banca: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini (FFCLRP - USP/Ribeirão Preto), Prof. Marco Aurélio Takita (IAC-Cordeirópolis), Prof. Dr. Jörg Kobarg (LNLS), Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa (LNLS), Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira (UNIFESP-Diadema), Prof^a. Dr^a. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP) e Prof. Dr. Michel Georges Albert Vicentz (IB-UNICAMP) pela atenção, pelo trabalho e dedicação para ler esta tese e por gentilmente terem aceito o convite para participarem da minha banca;

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o progresso deste trabalho.

MUITO OBRIGADO

Sumário

Lista de Tabelas	X
Lista de Figuras	XI
Prefácio	XIII
Resumo	XV
Abstract	XVII
1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	04
2.1. <i>Xylella fastidiosa</i>	04
2.2. Genômica de <i>Xylella</i>	06
2.3. Mecanismos de patogenicidade	07
2.4. As <i>orfs</i> e suas proteínas correlatas estudadas	14
2.4.1. <i>orf XfvirJ</i>	14
2.4.2. <i>orf XfdsbC</i>	16
2.4.3. <i>orf XftolB</i>	17
2.4.4. <i>orf XffnrE</i>	18
2.4.5. <i>orf XfhtpX</i>	18
2.5. A <i>orf XF0703</i> de <i>Xylella fastidiosa</i> (<i>XfsurE</i>)	19
2.6. Função das SurEs	22
2.7. Nucleotidases e catabolismo de nucleosídeos	24
2.8. Nucleotidases e a síntese de DNA	26
2.9. Nucleotidases e atividade <i>house-cleaning</i>	28
2.10. Estrutura tridimensional e estado oligomérico de SurEs	29

2.11. Cinética enzimática	34
3. Objetivos	39
3.1. Objetivos gerais	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. Manuscrito	40
5. Resultados Complementares	54
5.1. Proteína XfSurE	55
5.1.1. Expressão e purificação	55
5.1.2. Dicroísmo Circular	56
5.1.3. Obtenção de cristais	59
5.1.4. Coleta de dados	62
5.2. Proteína XfVirJ	64
5.2.1. Expressão e purificação	64
5.2.2. Clivagem	66
5.3. Proteína XfFnrE	67
5.3.1. Expressão e purificação	67
6. Discussão	70
7. Conclusões	76
8. Perspectivas	77
9. Referências Bibliográficas	79
10. Anexos	94
10.1. Artigo I: “A new member of the aldo-keto reductase family from the plant pathogen <i>Xylella fastidiosa</i> ”	94
10.2. Declaração de Bioética	103

Lista de Tabelas

Tabela I: Breve descrição das orfs estudadas neste trabalho incluindo a anotação no genoma de *Xylella* (9a5c), a predição da proteína correlata, o tamanho gênico e o peso molecular da proteína e provável função **14**

Tabela II. Dados de deconvolução de dados de dicroísmo circular obtidos pelo *software* CDSSTR da proteína XfSurE em três diferentes pHs **57**

Tabela III. Dados de deconvolução de dados de dicroísmo circular obtidos pelo *software* CDSSTR da proteína XfSurE com a adição do cofator (manganês) e inibidor (fosfato inorgânico) **58**

Tabela IV. Redução de dados obtidos a partir da coleta do cristal de XfSurE **63**

Lista de Figuras

Figura 1. A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> e os sintomas da CVC	06
Figura 2. Mecanismos de patogenicidade de <i>Xylella fastidiosa</i> .	12
Figura 3. Esquematização do mapa genômico de <i>Xylella fastidiosa</i> linhagem 9a5c.	21
Figura 4. Modelos e estruturas tridimensionais de diferentes SurEs	30
Figura 5. Modelos de curvas de cinética enzimática e gráfico de Hill	37
Figura 6. Gel de agarose 1%. Produto de amplificação por PCR da <i>orf</i> XF0703 a ser clonada no pET28a e pET29a, respectivamente	55
Figura 7. Gel de SDS 12%. Expressão e purificação de XfSurE	56
Figura 8. Espectros de dicroísmo circular de XfSurE em três diferentes pHs	57
Figura 9. Espectros de dicroísmo circular de XfSurE com a adição do cofator (manganês) e inibidor (fosfato inorgânico)	58
Figura 10. Cristais de XfSurE obtidos em diferentes condições	60
Figura 11. Cristais obtidos após o refinamento das condições iniciais	61
Figura 12. Coleta de difração por raios X do cristal de XfSurE	63
Figura 13. Gel de SDS-PAGE 12%. Expressão da proteína XfVirJ em <i>E. coli</i> em diferentes vetores de expressão e com diferentes tempo de indução	65
Figura 14. Gel SDS-PAGE 12%. Cromatografia de Afinidade ao níquel para proteína XfVirJ clonada no vetor pSV282	65
Figura 15. SDS-PAGE 12%. Teste de expressão para a proteína XfFrnE	67
Figura 16. SDS-PAGE 12%. Processo de <i>refolding</i> para XfFrnE	69

Figura 17. Esquematização de algumas vias metabólicas e de alguns substratos sobre os quais XfSurE pode atuar

75

Prefácio

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho serão apresentados na forma de um artigo científico e de um capítulo de resultados complementares. No artigo intitulado “Functional and Small angle X-ray Scattering Studies of a New Stationary Phase Survival Protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa*: Evidence of Allosteric Behaviour”, encontra-se a parte principal do trabalho desenvolvido durante esta tese e descreve a caracterização enzimática e estrutural a baixa resolução da nucleotidase SurE do fitopatógeno *Xylella fastidiosa*. Tal manuscrito foi submetido e aprovado pela revista FEBS Journal.

Como resultados complementares, são apresentados os resultados de clonagem, expressão, purificação e dicroísmo circular além dos testes de cristalização e coleta de dados de raios X da proteína XfSurE. Adicionalmente, são descritos os ensaios de expressão e purificação de uma proteína relacionada à virulência (XfVirJ) e de uma poliketide sintase (XfFnrE). Ambas as proteínas também estão relacionadas à patogenicidade de *Xylella fastidiosa*, razão pela qual foram estudadas neste presente trabalho.

Em anexo, encontra-se um artigo, no qual participei como co-autor, desenvolvido pelo grupo de pesquisa onde realizei esta tese. Este artigo, publicado em 2006 e intitulado “A new member of aldo-keto reductase family from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*” (Archives of Biochemistry and Biophysics

453; 143-150), descreve a expressão, purificação, caracterização enzimática e por espalhamento de luz a baixo ângulo de uma aldo-ceto redutase de *Xylella*.

Ao final deste trabalho, apresenta-se a discussão e as conclusões baseadas nos resultados obtidos no estudo da proteína SurE. Incluiu-se também uma breve descrição das perspectivas de pesquisa das três proteínas que foram estudadas durante o Doutorado.

Resumo

A linhagem 9a5c da bactéria *Xylella fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado, o qual gerou diversas informações sobre seu metabolismo e patogenicidade. Das *orfs* codificadas por esta bactéria, destaca-se; no presente trabalho, a *XF0703*, cuja proteína correlata (com 28,3 kDa) possui similaridade com proteínas SurE de várias outras bactérias. Proteínas SurEs são nucleotidases que desfosforilam diversos nucleosídeos monofosforilados para seus respectivos nucleosídeos. Tal função é de fundamental importância para manter o *pool* balanceado dos quatro (deoxi)ribonucleosídeos para síntese de DNA e RNA, respectivamente. Este trabalho descreve a clonagem da *orf XF0703* no vetor pET29a, a expressão da proteína recombinante (XfSurE) em *Escherichia coli* BL21(DE3) e a purificação da mesma por cromatografia de afinidade ao níquel. A análise da estrutura secundária foi feita por dicroísmo circular e realizou-se a determinação do estado oligomérico por cromatografia de gel filtração e espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS), os quais revelaram que a proteína é um tetrâmero. Dados de caracterização funcional indicam que a proteína possui maior atividade em pH neutro na presença do íon manganês como cofator, com uma maior afinidade pelo substrato 3'-AMP ($K_{0,5}=0,16$ mM). Além disso, ensaios cinéticos mostram que a proteína possui um comportamento alostérico com alta cooperatividade positiva (coeficiente de Hill em torno de 2,6) com todos os quatro substratos naturais testados (3'-AMP, 5'-dAMP, 5'-AMP e 5'-GMP). Experimentos com a técnica de

SAXS permitiram calcular o raio de giro ($32,7 \pm 0.2 \text{ \AA}$), distância máxima intramolecular (100 \AA) e a simetria do envelope da molécula (222). A estrutura de diversas SurEs homólogas já cristalizadas foram superpostas ao envelope obtido, sendo que StSurE (SurE de *Salmonella* com maior identidade de aminoácidos) mostrou ter o melhor ajuste. No entanto, notou-se que havia espaços vazios no envelope de XfSurE e tais espaços podiam ser preenchidos a partir do afastamento das alças responsáveis pela tetramerização e pela rotação dos dímeros. Estes movimentos (translação e rotação) podem explicar o comportamento alostérico da proteína, facilitando a entrada de substrato ao sítio catalítico da molécula.

Abstract

The 9a5c strain from bacterium *Xylella fastidiosa* was the first phytopathogen to have its genome completely sequenced, which revealed a lot of information about its metabolism and its pathogenicity. From a variety of *orfs* encoded by this bacterium, we highlight, in this work, the XF0703, which correlated protein (with 28.3 kDa) has similarity with SurE proteins from several other bacteria. The SurE proteins are nucleotidases that dephosphorylate various monophosphorylated nucleosides to their respective nucleosides. This function is critical for maintaining the balanced pool of four (deoxy) ribonucleosides for DNA and RNA synthesis.

In this work, we describes the cloning of the XF0703 *orf* into the vector pET29a, the recombinant protein overexpression (XfSurE) in *Escherichia coli* BL21(DE3) and the protein purification by nickel affinity chromatography. The secondary structure analysis was done by circular dichroism, while oligomeric state determination was achieved by gel filtration chromatography and small-angle X-ray light scattering (SAXS), which showed that the protein is a tetramer. Functional characterization data indicate that the protein has a highest activity at neutral pH in the presence of manganese as a cofactor, with a highest affinity for the 3'-AMP substrate ($K_{0.5} = 0,16$ mM). Furthermore, kinetic tests showed that the protein has a allosteric behavior with a high positive cooperativity (Hill coefficient around 2.6) for all natural substrates screened (3'-AMP, 5'-dAMP, 5'-AMP and 5'-GMP). Experiments with SAXS technique have allowed to calculate the radius of gyration (32.7 ± 0.2 Å), maximum intramolecular distance (100 Å) and molecule symmetry

(222). The structures of other homologue SurE proteins were superimposed to the obtained envelope and StSurE structure from *Salmonella* (with the highest amino acid identity) showed the best fit. However, it was noted that there were empty spaces on the XfSurE envelope and such spaces could be filled with the translation of the loops responsible for tetramerization and the rotation of the dimers. These movements (rotation and translation) can explain the allosteric behavior, facilitating the entry of substrate to the catalytic site of the molecule.

1. Introdução

Embora seja cultivada em mais de 100 países, a cultura de laranja apresenta uma distribuição pouco uniforme: o Brasil é o maior produtor global, sendo responsável por mais de 1/3 da produção mundial. Mais de 85% da produção nacional se concentra no estado de São Paulo cuja área plantada se estende a 700 mil hectares e a produção chega a 350 milhões de caixas ou 14,28 toneladas de fruto (safra 2007/2008). Os lucros advindos da exportação de suco de laranja chegam a 2,35 bilhões de dólares, sendo que São Paulo é responsável por 90% das exportações. No que se refere à pauta de exportação brasileira de produtos agrícolas e derivados, o mercado de suco de laranja só perde em lucratividade para o setor sucroalcooleiro e carne bovina (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo).

No entanto, apesar da grande importância econômica derivada da citricultura brasileira, as divisas geradas pela mesma poderiam ser bem maiores. Isso não é possível, pois ocorre uma baixa produtividade em nossos pomares devido a vários fatores, principalmente pragas e doenças, que acometem grande parte das árvores causando danos irreversíveis. Dentre estas pragas, uma das mais devastadoras é a Clorose Variegada de Citros (CVC), conhecida popularmente como “amarelinho” (Lee *et al*, 1991; Laranjeira, 1997).

A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, um fitopatógeno que coloniza o xilema da planta. Todavia, a CVC não é a única doença causada por esta bactéria, sendo esta também responsável pela doença de Pierce em videiras e outras moléstias em pessegueiros, amendoeiras e em outras espécies vegetais

(Purcel & Hopkins, 1996). O impacto econômico causado por esta doença é enorme, pois uma planta infectada pela bactéria perde a clorofila, ocorre o amarelamento e o aparecimento de manchas das folhas. Tais sintomas levam à uma produção precoce de frutos pequenos e duros, imprestáveis para o consumo, os quais perdem seu valor comercial.

Desde a publicação da seqüência do genoma completo de *Haemophilus influenzae* em 1987, houve um grande avanço na área de genômica bacteriana com centenas de organismos já seqüenciados, sendo muito deles patógenos humanos. No entanto, patógenos vegetais causam perdas de cerca de 20% na produção mundial de alimentos, devido às doenças causadas. Eles são, portanto, agentes indiretos da miséria humana (Dow & Daniels, 2000). Doenças de bactérias fitopatógenas são mais severas nos trópicos, onde seus efeitos podem ser localmente impactantes. A necessidade de descobrir novas estratégias baseadas no entendimento da patogenicidade impulsionou projetos de sequenciamento de genomas como o da *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c (Simpson *et al.*, 2000)

Os dados gerados por tais estudos impulsionaram a entrada da era pós-genômica ou genômica funcional e, a partir deste momento, começaram trabalhos envolvendo a análise do transcriptoma (série de transcritos produzidos por um organismo), do proteoma (conjunto completo de proteínas codificadas por um organismo em uma determinada situação) e, enfim, a integração de todas as vias metabólicas de um organismo, o metaboloma. Tudo isso aliado ao conhecimento de genômica estrutural (análise da estrutura do genoma: mapeamento de genes,

arquitetura dos cromossomos, seqüência de bases, organização dos genes nos cromossomos, além da determinação estrutural de proteínas), efetuando-se a caracterização molecular completa do organismo (Griffits *et al.*, 2000).

Assim, as informações geradas pelo seqüenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c (projeto ONSA/2000, Simpson *et al.*, 2000) servem como base para abordagens da genômica funcional, almejando-se principalmente ao estudo das proteínas relacionadas à patogenicidade da bactéria. Para tal, é necessário estudo de expressão gênica e aspectos funcionais destas proteínas, compreendendo etapas de expressão e purificação protéica e, posteriormente, a resolução estrutural destas por métodos de cristalografia de raios X ou espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN). A partir da elucidação da estrutura protéica, espera-se encontrar métodos mais diretos e eficazes de combate à CVC. Desta maneira, os resultados aqui obtidos, acrescentarão conhecimentos básicos ao estudo da patogenicidade da bactéria.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Xylella fastidiosa*

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma doença de importância agrônômica, cujo agente causal é a bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987; Hartung *et al.*, 1994), uma bactéria gram-negativa parasita do xilema da planta. Em 1987, a espécie *X. fastidiosa* foi classificada taxonomicamente e seu nome proposto por Wells *et al.* (1987), sendo posicionada em um gênero à parte dos demais grupos bacterianos. Esta bactéria possui o formato de bacilos filamentosos gram-negativos (tamanho aproximado: 0,25-0,35µm x 0,9-3,5µm), os quais exibem rugosidades na superfície da parede bacteriana (Chagas *et al.*, 1992), não apresentando flagelos, apenas fímbrias filamentosas. Esta bactéria requer, também, a preparação de meios ricos específicos para fins de cultura laboratorial (Chang e Walker, 1988), cresce sob temperatura ótima de 26-28°C e pH ótimo entre 6,5 e 6,9 (Wells *et al.*, 1997). A *Xylella* é considerada um organismo de manutenção difícil em cultura no laboratório, devido as suas exigências nutricionais e ao seu crescimento excessivamente lento (Dow e Daniels, 2000).

A *X. fastidiosa* é transmitida por mudas contaminadas e por vetores homópteros adultos, que se alimentam da seiva do xilema. Dezesete espécies de “cigarrinhas” (Fundecitros, 2002) são capazes de transmitir a CVC: elas se alimentam de árvores contaminadas, adquirem a bactéria e, ao se alimentarem de árvores saudáveis, transmitem a doença. Atualmente, a *Xylella* encontra-se disseminada em todas as regiões de citricultura do país (Roberto *et al.*, 1996). Os primeiros pontos de disseminação da CVC no Brasil foram observados em 1987,

no interior do estado de São Paulo. A doença se apresentava como uma anormalidade em pomares de laranjas doces, os quais exibiam nas folhas os sintomas de clorose e redução do tamanho, drástica redução no tamanho dos frutos, bem como sintomas de deficiência de zinco e fitotoxicidade por cobre e boro. Em poucos meses a planta deixava de produzir frutos apropriados à comercialização (Tubelis, 1992). Outros sintomas observados são: necrose e abscisão foliar em folhas mais velhas (Sherald, 1993), frutos com alto conteúdo de açúcar, pequenos, duros e cujo amadurecimento é precoce (Lee *et al.*, 1993). O espalhamento da doença por toda a planta é relativamente rápido, ocasionando o declínio do crescimento e da produtividade com o passar dos anos (Lee *et al.*, 1991). A bactéria e alguns sintomas característicos são mostrados na Figura 1.

A *X. fastidiosa*, além de causar doença em citros, também ataca diversos hospedeiros como: alfafa e videira (Goheen *et al.*, 1973), pêssegueiros (Hopkins *et al.*, 1973; Nyland *et al.*, 1973), amendoeiras (Mircetich *et al.*, 1976); ameixeiras (Hopkins, 1989), pereiras (Leu e Su, 1993) e plantas de café (Paradela Filho *et al.*, 1997). Casos de ataques por *Xylella* nestas culturas foram verificados em áreas tropicais e subtropicais por toda a América (Hopkins, 1989) e alguns países da Ásia (Leu e Su, 1993). As linhagens de *Xylella* que atacam diferentes espécies de plantas também têm sido analisadas quanto à diversidade genética existentes entre elas (Lacava *et al.*, 2001). Verificou-se que a linhagem 9a5c de *Xylella* (a primeira a ter seu genoma sequenciado) possui uma alta patogenicidade, ou seja, é capaz de produzir os sintomas da CVC quando introduzidas em laranjeiras, mesmo sob condições de laboratório (Li *et al.*, 1999).

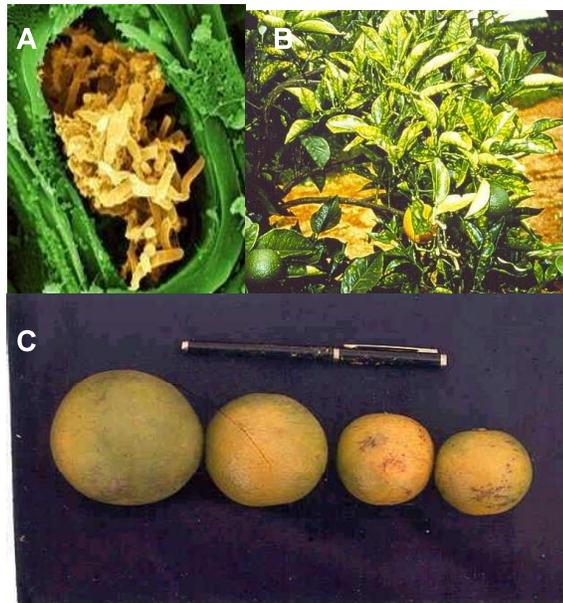


Figura 1. A bactéria *Xylella fastidiosa* e os sintomas da CVC. **(A)** A bactéria *Xylella fastidiosa* dentro do vaso xilemático (retirado de www.genomenetwork.org/), **(B)** Planta de *Citrus* com sintomas de CVC (www.ars.usda.gov) e **(C)** Comparação do tamanho do fruto de uma laranja saudável (à esquerda) a frutos acometidos pela doença (à direita) (Fonte: www.ufv.br).

2.2. Genômica

A genômica estuda a caracterização molecular sistemática de genomas inteiros, através de seu seqüenciamento completo. A partir do conhecimento do mapa físico (Frohme *et al.*, 2000) e da seqüência de bases do genoma de *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) tornou-se possível, a investigação das proteínas expressas utilizando ferramentas moleculares. A bactéria *X. fastidiosa* linhagem 9a5c foi o primeiro fitopatógeno a ser seqüenciado no mundo e seu genoma compreende um cromossomo circular de 2,7 Mb e dois plasmídeos de 51 kb e 1

kb (Simpson *et al.*, 2000). Cerca de 7% do seu genoma são derivados de fagos, sugerindo-se transferência horizontal durante o processo evolutivo (Wixon, 2000; de Mello Varani *et al.*, 2008). Posteriormente, outras três linhagens de *Xylella* também foram seqüenciadas: Ann-1 (de oleandro, um tipo de arbusto), Dixon (amendoeira) e Temecula-1, responsável pela doença de Pierce em videiras na Califórnia (Bhattacharyya *et al.*, 2002).

Os dados de seqüenciamento impulsionaram os estudos nesses microrganismos, permitindo a formulação de diversas vias metabólicas virtuais bem como uma visão geral dos processos bioquímicos que ocorrem na bactéria (Simpson *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000). Foram realizados estudos de perfil de expressão gênica por meio de microarranjos sob diferentes condições (de Souza *et al.*, 2004; Pashalidis *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008) além da caracterização funcional e estrutural de diversas proteínas (Catani *et al.*, 2004; Muniz *et al.*, 2004; Rosselli *et al.*, 2006; Rinaldi *et al.*, 2009) e análise de linhagens mutantes (Gaurivard *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007).

2.3. Mecanismos de patogenicidade

Sabe-se que, ao contrário de outros fitopatógenos, a *Xylella* é xilema-dependente, vivendo exclusivamente no interior destes vasos, formado principalmente por células lignificadas mortas da planta (Hopkins, 1989; Alves *et al.*, 2004; Fritchi *et al.*, 2007). A transmissão da doença se dá unicamente através de insetos hospedeiros, aos quais a bactéria está extremamente adaptada. Uma

vez inoculada na planta, a bactéria começa a se reproduzir dentro dos vasos xilemáticos, e os sintomas da doença aparecem depois de algumas semanas na variedade que ataca videiras (Costa *et al.*, 2004) ou depois de alguns meses em *Citrus sp* - linhagem 9a5c)

Os sintomas da doença são conseqüências da oclusão dos vasos xilemáticos, que ocasiona um estresse hídrico na planta (McElroni *et al.*, 2001). O processo de colonização do xilema se dá inicialmente pela adesão às partes internas destes vasos, seguida do processo de auto-agregação bacteriana e, por conseqüência, o desenvolvimento de um biofilme. Posteriormente, ocorre a migração e o fluxo de bactérias por entre os vasos xilemáticos via interconexões membranosas denominadas *pits* (Tyree *et al.*, 2002). A bactéria necessita, provavelmente, de um arsenal enzimático extracelular para atravessar estas membranas, sendo este composto principalmente por poligalacturonases, xilanases e celulases, capazes de degradar tais membranas (Simpson *et al.*, 2000; Van Sluys *et al.*, 2003; Stevenson *et al.*, 2004). A poligalacturonase PglA parece ter um papel crítico neste processo, pois na linhagem Temecula-1 mutante para este gene apresentam um fenótipo menos agressivo e o grau de colonização da bactéria é bem menor (Roper *et al.*, 2007b). Na linhagem 9a5c de *Citrus sp*, a sequência deste gene apresenta um *frameshift*, sendo que se especula que esta seja uma provável razão da menor virulência desta linhagem comparada àquela que ataca uvas (Van Sluys *et al.*, 2003).

A severidade dos sintomas está diretamente relacionada ao grau de colonização dos vasos e não ao número de vasos infectados em si. Observou-se

que, em épocas em que há alta requisição de água pela planta, como no verão, os sintomas são mais proeminentes (Elrone *et al.*, 2001). Esta oclusão não é unicamente causada pelo acúmulo de biofilme bacteriano ou de células de *Xylella* mortas, mas também pela produção de tiloses e gel de polissacarídeos produzidos no processo de resposta pela planta, os quais também bloqueiam o xilema após a infecção (Fritschi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2008a).

No que se refere ao inseto transmissor, a *Xylella* parece ser a única entre os patógenos de plantas capaz de se multiplicar dentro do vetor (Hill *et al.*, 1995) e ser transmitida sem a necessidade de um período de latência (Purcell *et al.*, 1979). Portanto, a transmissão da bactéria pelo vetor se dá em três passos: (1) aquisição do patógeno a partir de uma planta infectada, (2) adesão da bactéria na cutícula do inseto seguido de colonização da superfície e (3) inoculação da bactéria pelo vetor em uma nova planta (Purcell *et al.*, 1979). Verifica-se que, conforme mencionado, uma vez adquirida a bactéria, o vetor pode transmiti-la imediatamente para outra planta sem a necessidade de colonização no interior do aparelho sugador do inseto (Purcell *et al.*, 1979).

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) está envolvida na virulência e na formação de biofilme de diversos fitopatógenos (Denny, 1995). Em *Xanthomonas*, estes polissacarídeos são chamados de goma xantana, os quais são transcritos por um cluster de 12 genes (*gumB a gumM*) (da Silva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). *Xylella* apresenta o mesmo cluster, porém não possui os genes *gumI*, *gumJ* e *gumL*, os quais são responsáveis por adicionar resíduos manosil na goma xantana (Simpson *et al.*, 2000; Van Sluys *et al.*, 2003). Nota-se que os EPS

estão mais relacionados à maturação do biofilme em *Xylella* do que à adesão inicial da bactéria na planta (Souza *et al.*, 2006; Chaterjee *et al.*, 2008a). Outro fator interessante é o baixo nível de produção destes EPS em *Xylella*, o qual pode estar relacionado ao seu crescimento fastidioso em meios de cultura (Roper *et al.*, 2007a).

Apesar de não ser uma bactéria flagelada, a *Xylella* apresenta dois tipos de *pili* localizados em lados opostos de sua célula. O *pili* tipo IV é está relacionada à mobilidade e migração enquanto que o *pili* tipo I é responsável pela adesão e formação de biofilme bacteriano. Portanto, tais estruturas estão envolvidas em mecanismos opostos (Chaterjee *et al.*, 2008a). Sabe-se que, a mobilidade *twitching*, coordenada pelo *pili* tipo IV, é controlada por uma via de quimiosensores transcritos pelos genes *pilG* e *chpC* (Burr *et al.*, 2007).

Os dados do genoma de diversas linhagens de *Xylella* revelaram um grande número de genes que codificam adesinas e hemaglutininas (Simpson *et al.*, 2000). Adesinas estão relacionadas à adesão célula-célula durante a formação de biofilme. As adesinas fimbriais parecem contribuir para agregação celular (de Souza *et al.*, 2004) enquanto que adesinas não fimbriais estão envolvidas na adesão inicial da célula em superfícies (Feil *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2002). Nocautes realizados nos genes que codificam hemaglutininas (*hfxA* e *hfxB*) resultaram em um fenótipo mais virulento, em consequência, de uma hiper-mobilidade da bactéria (Guilhabert & Kirkpatrick, 2005). Esta maior virulência foi resultante de um maior número de vasos colonizados pela bactéria, o que aumentou a severidade dos sintomas. Portanto, sugere-se que estas

hemaglutininas são responsáveis por uma maior adesão célula-célula e também pelo aumento da adesão da bactéria a superfícies, inibindo assim, sua eficiência de colonização (Chaterjee *et al.*, 2008a).

A comunicação célula-célula se dá através de pequenas moléculas sinalizadoras, as quais atuam de forma a permitir uma ação coordenada da comunidade bacteriana durante a formação de biofilme, dado a um determinado estímulo. A molécula mais importante para esta comunicação é o fator de sinalização difusível (DSF) sintetizado pelo gene *rpfF* em *Xylella* e *Xanthomonas* (Barber *et al.*, 1997; Chaterjee & Sonti, 2002; Fouhy *et al.*, 2007). Acredita-se que em *Xylella* o DSF é um derivado do ácido 12-metil tetradecanóico (Simonato *et al.*, 2007) enquanto que em *Xanthomonas*, a molécula é estruturalmente diferente, parecendo ser derivada do ácido cis-11-metil-2-dodecanóico (Wang *et al.*, 2004). Embora comum em muitos fitopatógenos, o DSF apresenta um perfil diferente na regulação da virulência em diferentes taxas. Em *Xanthomonas campestris*, está relacionado à produção de EPS e enzimas extracelulares (Torres *et al.*, 2007; Barber *et al.*, 1997) enquanto que em *Xanthomonas oryzae* está envolvido no suprimento de ferro (Chaterjee *et al.*, 2002).

Em *Xylella*, o DSF regula positivamente genes fimbriais e não fimbriais relacionados à agregação célula-célula e adesão a substratos (Reddy *et al.*, 2007; Roper *et al.*, 2007a; Shi *et al.*, 2007). Tal observação é consistente com os resultados obtidos com as linhagens mutantes para o fator de sinalização difusível DSF (*gene rpfF*) e que, portanto, o acúmulo de DSF parece modular positivamente a formação de biofilme (Chaterjee *et al.*, 2008b) (Figura 2).

Outro sinalizador intracelular bem conhecido é o c-di-GMP, um segundo mensageiro (D'Argenio & Miller, 2004, Dow *et al.*, 2006), cujo ciclo de síntese e degradação é modulado por proteínas que possuem os domínios contendo os aminoácidos GGDEF (síntese), EAL e HD-GYP (degradação).

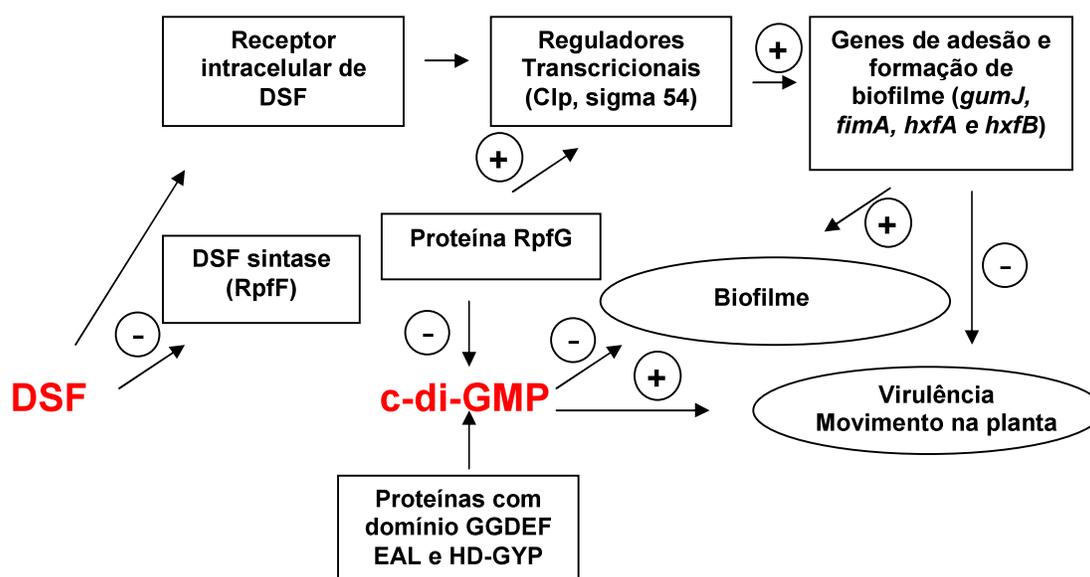


Figura 2. Via de sinalização mediada pelo fator de sinalização difusível (DSF) e c-di-GMP em *Xylella* (Chatterjee *et al.*, 2008a). Ao entrar na célula, este fator é reconhecido por receptores intracelulares, os quais ativam fatores transcricionais que, por sua vez, regulam positivamente a expressão de genes relacionados adesão e formação de biofilme. A síntese de DSF é auto-regulada negativamente pela inibição da DSF sintase de acordo com nível de DSF. Já o c-di-GMP está envolvido em vias de virulência e é degradado por proteínas com domínio GGDEF, como RpfG, a qual também está envolvida na ativação de fatores transcricionais como Clp.

A proteína RpfG de *X. campestris* possui o domínio HD-GYP responsável pela degradação de c-di-GMP (Slater *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2006). Paralelamente, analisando o genoma da linhagem Temecula, observou-se que, a

proteína PD0279 possui o domínio GGDEF, responsável pela síntese de c-di-GMP e que tal proteína é altamente regulada por DSF. Portanto, as vias de regulação de DSF podem envolver a modulação de c-di-GMP, as quais podem estar relacionadas em várias vias de virulência e metabolismo da bactéria - Figura 2. (Chatterjee *et al.*, 2008b). Em *Xanthomonas*, é bem conhecido que c-di-GMP regula a expressão de vários genes relacionados à formação de biofilme (em *Xylella*, c-di-GMP parece inibir tais genes), assim como foram identificadas várias proteínas com os domínios GGDEF, EAL e HD-GYP (Ryan *et al.*, 2007) Outro aspecto interessante é que a degradação desta molécula gera duas moléculas de 5'-GMP, as quais podem servir de substrato para a proteína XfSurE, a enzima mais bem caracterizada neste presente estudo.

No que tange à fitopatogenicidade da bactéria, outras proteínas deste estudo podem estar diretamente relacionada a este processo (Tabela I). Por exemplo, a XfVirJ pode estar relacionada no processo de secreção de macromoléculas efetoras (secreção do tipo IV); a XfToIB, no processo de manutenção da integridade da membrana externa e na translocação de colicinas, as quais são agentes citotóxicos. A proteína XfFnrE (esta possui um domínio DsbA) e XfDsbC podem estar relacionadas à formação e isomerização, respectivamente, de pontes dissulfetos em proteínas que serão exportadas pela célula. Por fim, XfHtpX é uma protease relacionada à degradação de proteínas não enoveladas.

2.4 As orfs estudadas e suas proteínas correlatas

No presente estudo, foram pesquisadas 6 *orfs* relacionadas ao metabolismo e virulência de *Xylella fastidiosa*, cujas algumas características são ilustradas na Tabela I:

Tabela I: Breve descrição das orfs estudadas neste trabalho incluindo a anotação no genoma de *Xylella* (9a6c), a predição da proteína correlata, o tamanho gênico e o peso molecular da proteína e provável função.

<i>orf</i>	Proteína	Tamanho	Função
XF0617	VirJ	903 bp 31,3 KDa	Virulência, relacionada a secreção tipo IV
XF0703	SurE	789 bp 28,3 KDa	Nucleotidase
XF1177	DsbC	789 bp 28,5 KDa	Tiol disulfeto isomerase
XF1625	ToIB	1320 bp 47,6 KDa	Precursor de ToIB (transporte)
XF1856	FnrE	672 bp 25 KDa	Policetídeo sintase (família DsbA oxidoreductase)
XF2287	HtpX	870 bp 31,1 KDa	Protease

A seguir, faz-se uma breve descrição sobre estas proteínas e os estudos envolvendo proteínas similares em outros organismos. É importante ressaltar que, a XfSurE, por ser a proteína mais bem caracterizada neste estudo, possuirá tópicos específicos para a mesma, os quais discutem a função, estrutura e outros assuntos relacionados às proteínas SurEs já caracterizadas.

2.4.1. *orf* XfvirJ

A *orf* XF0617 codifica uma proteína de 28,6 kDa e possui relativa similaridade (41%) com o gene *acvB* de virulência de *Agrobacterium tumefaciens* (Kalogeraki & Winans, 1995). O gene *acvB* expressa uma proteína periplasmática

(Kang *et al.*, 1994) relacionada com a mediação da transferência do T-DNA para planta hospedeira, sendo também participante da formação do tumor na planta (Wirawan & Kojima, 1996). Esta proteína está relacionada à secreção do tipo IV e apresenta um gene homólogo no DNA plasmidial desta bactéria denominado *virJ* (Kalogeraki & Winans, 1995).

Existem evidências que em diferentes linhagens de *Agrobacterium* existe apenas um gene *acvB* ou *virJ* funcional. Tais genes são de importância fundamental para a patogenicidade da bactéria, uma vez que, linhagens mutantes para ambos os genes se tornam avirulentas (Pan *et al.*, 1995). Apesar da diferente localização, codificam proteínas com a mesma função e apresentam homologia, principalmente na região carboxi da proteína a qual, é praticamente idêntica. Também ambas apresentam um perfil hidropático, o que sugere que as proteínas codificadas por estes genes sejam exportadas para o espaço periplasmático e que elas tenham uma seqüência sinal que as direcionem para tal compartimento (Kalogeraki & Winans, 1995).

São proteínas relacionadas à secreção de tipo IV (transferência de macromoléculas como o DNA) onde também participam uma série de outras moléculas que podem levar, por exemplo, à rápida disseminação de genes resistentes a antibióticos e a outros tratamentos. (Christie, 2001).

Em relação à *orf* em estudo, foi realizado um trabalho envolvendo análise por *microarranjos* de *Xylella fastidiosa* (Nunes *et al.*, 2003) comparando-se a transcrição de genes da bactéria em dois diferentes meios de cultura. Foi verificado que a *orf* XF0617 estava presente em uma grande quantidade de

transcritos quando a bactéria era cultivada em meio Perinwinkle Wilt (PW - meio contendo fitona peptona, *tripticase peptona*, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , sulfato de magnésio, *hemin chloride*, fenol vermelho) mostrando que tal *orf* era induzida neste meio e que o gene correspondente a ela era transcrito na bactéria.

2.4.2. *orf XfdsbC*

A família protéica Dsb catalisa a formação de pontes dissulfeto de proteínas bacterianas que para serem secretadas sofrem dois processos: um oxidativo e outro redutivo (isomerização). O processo oxidativo leva à formação de pontes dissulfeto de proteínas recém translocadas para o periplasma, enquanto no processo de isomerização (redutivo), onde se inclui a DsbG, há o rearranjo das pontes dissulfeto que foram formadas incorretamente (Collet *et al*, 2002; Kadokura *et al*, 2003). Sabe-se que a DsbC e DsbG têm a mesma função em *Escherichia coli*, mas não se conhece o motivo. No entanto, há indícios de que a proteína DsbG é menos expressa e apresenta uma maior especificidade pelo substrato.

Foi obtida a estrutura de dois cristais da proteína DsbG com a resolução de 1.7 e 2.0-Å que representam, respectivamente, a forma reduzida e oxidada da proteína. A forma oxidada é menos estável que a reduzida, o que contribui para a atividade isomerase, já que para tal é requerido os dois sítios ativos de cisteína reduzido em um ambiente periplasmático oxidativo. A estrutura da DsbG também revela uma superfície de ligação que é carregada, a qual é consistente com a interação com proteínas globulares que também possuem superfície carregada. Isto sugere que a DsbG pode agir “posteriormente” e preferencialmente no

rearranjo de pontes dissulfeto de proteínas já parcialmente ou totalmente enoveladas (Heras *et al.* 2004).

Em levedura foi caracterizada uma proteína similar denominada PDI, cuja estrutura da superfície é semelhante à DsbC e DsbG com o arranjo de domínios de tioredoxina. Como a estrutura da DsbG, o formato da proteína PDI lembra uma letra “V” com os sítios ativos próximos à extremidade e no interior do vértice encontram-se aminoácidos hidrofóbicos que ajudam na interação de proteínas parcialmente enoveladas (Tian *et al.*, 2006).

2.4.3. *orf XftolB*

A *orf XF1625* é similar à seqüência do gene *tolB* de *E. coli*. Os produtos dos genes do sistema Tol-Pal são necessários para manter a integridade da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Eles também estão envolvidos na patogenicidade de *E. coli*, *Vibrio cholerae* e *Salmonella enterica*. Em *Erwinia chrysanthemi*, uma bactéria enteropatogênica, mutantes para o gene *tolB*, além de outros genes do sistema Tol-Pal, não eram viáveis a não ser que fossem adicionado açúcares ou osmoprotetores no meio para manter a viabilidade. Também foram prejudicados a morfologia e o processo de divisão das células além da diminuição da patogenicidade (Dubuisson *et al.*, 2005).

Em *E. coli*, a proteína TolB também interage com a *colicina* E9 no periplasma. A exportação de *colicinas* é um processo pouco estudado, mas estudos recentes sugerem que há uma região de ligação entre a *colicina* E9 com a TolB, tal região é denominada *TolB Box*, a qual é formada por um pentapeptídeo. Ensaio com mutagenese *in vitro* e ressonância magnética desta

região indicam que ela é muito maior (cerca de treze aminoácidos) e que a substituição de 3 aminoácidos pode causar a diminuição da afinidade da colicina pela proteína TolB (Hands *et al.*, 2005).

2.4.4. *orf XffnrE*

A *orf XF1856* possui 771 pb, codifica uma proteína com 256 aminoácidos e 28,6 kDa. Apresenta similaridade de 34% com a proteína FrnE (uma ditiol-dissulfeto isomerase envolvida na síntese de policetídeos.) de *Deinococcus radiodurans*. Policetídeos são produtos aromáticos polifuncionais naturais como antibióticos (Dreier & Khosla, 2000). Estes compostos possuem grande importância, pois são responsáveis pela produção de substâncias que participam da defesa e da detoxificação de microrganismos. Muitos destes compostos têm interesse farmacêutico, como a frenolicina, um agente antimalarial (Bibb *et al.*, 1994).

2.4.5. *orf XfhtpX*

A *orf XF2287* possui similaridade com a proteína HtpX, cuja função em conjunto com a proteína FstH é essencial para manter a viabilidade celular em *E. coli*, pois são proteases que degradam proteínas anormais de membranas. Ensaios de expressão e purificação de HtpX de *E. coli* mostraram que a proteína apresenta atividade proteolítica contra proteínas solúveis e de membrana (SecY). Na presença de zinco como cofator, a proteína também sofre processo de auto-clivagem e possui atividade de endoprotease em um processo independente de energia (Sakoh *et al.*, 2005). Em outro estudo, foram encontrados fatores

multicópias que aliviam o defeito de crescimento de um mutante para estas duas proteínas, um deles foi denominado *qmcA*, que codifica um proteína de ligação à membrana com homologia à prohibitina formando um oligômero que se liga a FstH. A proteína QmcA possui atividade proteolítica na sua região C-terminal que se encontra exposta na região citoplasmática (Chiba *et al.*, 2006).

2.5. A *orf XF0703* de *Xylella fastidiosa* – gene *XfsurE*

Das 1876 *orfs* encontradas no genoma de *Xylella fastidiosa* 9a5c, 220 foram classificadas como tendo apenas uma função geral. Dentre estas, a *orf XF0703* possui similaridade com o gene *surE* de diversas bactérias. Em *Xylella*, este gene possui 789 bp e a proteína codificada tem 263 aminoácidos, possuindo a massa molecular de 28,3 kDa com um pI teórico de 5,23.

O gene *surE* foi primeiramente descoberto em *E. coli* estando, localizado *upstream* ao gene *pcm*, o qual codifica a proteína L-isoaspartil (D-aspartil) O-metiltransferase (PCM) (Li *et al.*, 1994). Os genes *surE* e *pcm* formam um operon bicistrônico em *E. coli* e em *Xylella*, embora o gene *pcm* também possa ser transcrito a partir do seu próprio promotor (Li *et al.*, 1997). Os genes *pcm* e *surE* são altamente transcritos na fase estacionária ou sob condições de alta densidade celular onde há o declínio do crescimento bacteriano.

Em células velhas, ocorrem danos espontâneos nos resíduos laterais de aminoácidos de proteínas. Nessa situação, resíduos de aspartato e asparagina são deaminados e isomerizados em resíduos de L-isoaspartil. A proteína PCM

atua na via de sinalização da conversão de resíduos de L-isoaspartil em resíduos normais de L-aspartil (Li *et al.*, 1997).

Em estudos envolvendo duplo-mutantes de *E. coli* para os genes *surE* e *pcm* foi observado um notável acúmulo de resíduos de isoaspartil durante a fase estacionária em relação à linhagem selvagem ou simples-mutante para *surE*. No entanto, um fato intrigante é que em linhagens mutantes para o gene *pcm*, o gene *surE* parece suprimir o efeito do fenótipo de acúmulo de isoaspartil (Visick *et al.*, 1998). Também foi visto que em linhagens de *E. coli* adaptadas para sobreviver por 2000 gerações a altas temperaturas, o operon *surE-pcm* é duplicado (Riehle *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que as proteínas SurE e PCM trabalham juntas ou em paralelo para controlar os efeitos dos danos do isoaspartil. Tal processo é requerido para a viabilidade celular sob condições de estresse (Iwasaki & Miki, 2007).

Observa-se também que em *E. coli*, o gene *surE* está interligado com mais dois genes: *rpoS* e o gene *nlpD*. O gene *rpoS* transcreve a subunidade σ da RNA-polimerase de fase estacionária, a qual controla genes que são expressos sob condições de estresse (Hengge-Aronis, 1993). O gene *nlpD* codifica uma lipoproteína de membrana externa que está associada a virulência e pode atuar na formação e na manutenção da parede celular. Mutações no gene *nlpD* levaram a diminuição da sobrevivência das células na fase estacionária (Ichikawa, 1994).

Em *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c, os genes *pcm* e *nlpD* estão próximos ao gene *surE*, conforme mostrado na Figura 3 (www.xylella.Incc.br). No entanto, nenhum tipo de RNA polimerase fator sigma foi encontrada próxima à região onde

estão os genes *nlpD* e *pcm*. A organização destes genes (Figura 3) se repete para outras linhagens de *Xylella* e *Xanthomonas*.

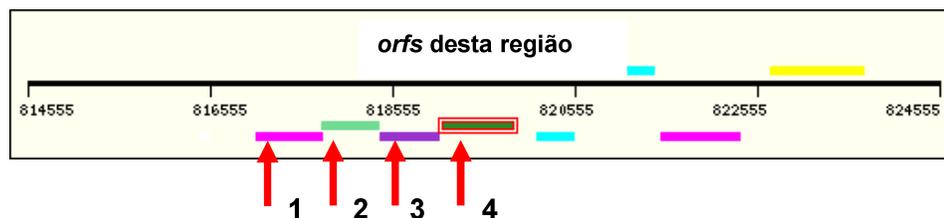


Figura 3. Mapa genômico de *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c mostrando a região onde estão os genes *nlpD*, *pcm* e *surE*. As setas com números indicam: 1 – gene *nlpD*, 2 – gene hipotético conservado, 3 – gene *pcm* e 4 – gene *surE*.

O gene *surE* e seus homólogos são amplamente distribuídos entre eubactérias (exceto Gram-positivas e micobactérias), arqueobactérias e eucariotos. A análise filogenética do gene revela que alguns organismos possuem mais que um gene *surE*. A arqueobactéria *Pyrobaculum aerophilum* possui um par de genes parálogos denominados de *surE α* e *surE β* (derivados provavelmente de duplicação gênica). Em *Saccharomyces cerevisiae*, uma proteína de 700 aminoácidos possui um N-terminal homólogo ao de SurE e o C-terminal homólogo à uma tubulina-tirosina ligase (Mura *et al.*, 2003).

A organização genômica dos genes *surE* não é conservada nos diferentes organismos onde aparece. Em arqueobactérias não foram encontrados genes homólogos ao *pcm*, *nlpD* e *rpoS*, próximos ao gene *surE* (Mura *et al.*, 2003).

2.6. Função

Embora a sua relação intrínseca com a fase estacionária em *E. coli*, ainda não se sabe exatamente em qual processo a proteína SurE atua durante esta fase. Os primeiros ensaios bioquímicos com esta proteína foram feitos em *Thermotoga maritima* e *Pyrobaculum aerophilum* com base na identidade da seqüência da proteína SurE com uma fosfatase ácida da levedura *Yarrowia lipolytica*. Sendo assim, as proteínas SurEs foram primariamente classificadas como uma fosfatase ácida (Zhang *et al.*, 2001), com preferência para nucleosídeos purínicos (Mura *et al.*, 2003). Estes trabalhos revelam que a SurE é uma fosfatase metal dependente e que possui uma organização tetramérica pela junção de dois dímeros.

Estudos aprofundados de caracterização bioquímica com SurE de *E. coli* (EcSurE) feitos por Proudfoot *et al.* (2004) mostraram que EcSurE é capaz de desfosforilar vários ribo e desoxiribonucleotídeos 5'-monofosfatados e ribonucleosídeos 3-monofosfatos. Tais resultados indicaram que a classificação desta proteína como fosfatase ácida não é correta, sendo ela então reclassificada como uma nova classe de nucleotidase a partir dos resultados de Proudfoot *et al.* (2004).

Nucleotidases ou nucleosídeo monofosfato fosfohidrolases (3.1.3.5 ou 3.1.3.6) são fosfatases que especificamente desfosforilam nucleosídeos monofosfatados em nucleosídeos e fosfato inorgânico (Proudfoot *et al.*, 2004). Tal função contribui, entre outras coisas, para a manutenção do balanço correto dos *pools* de nucleotídeos na célula (Hunsucker *et al.*, 2005).

EcSurE tem maior atividade em pH neutro e em presença de manganês, seguido por cobalto, níquel e magnésio. Ela tem capacidade de hidrolisar tanto purinas como pirimidinas, 5' ou 3' nucleosídeos monofosfatados e ribo- ou desoxiribonucleotídeos. Além disso, EcSurE possui maior afinidade por 3'-AMP, seguido por 5'-GMP, 5'-dGMP, 5'-AMP e 3'-CMP (Proudfoot et al, 2004). Os valores de K_m obtidos para estes substratos (0,10 – 0,37 mM) comparam-se a uma faixa típica de 5'-nucleotídeos com “elevado- K_m ” de mamíferos (Spychala et al., 1988).

EcSurE também hidrolisa substratos polifosfatados, indicando atividade de exopolifosfatase. Neste caso, a enzima tem mais afinidade por magnésio, sugerindo um mecanismo catalítico diferente. A enzima apresenta uma curva de saturação sigmoide, a qual reflete uma cooperatividade positiva para a ligação ao polifosfato (Proudfoot et al., 2004).

A função de nucleotídeos procarióticos é pouco entendida, sendo que elas possuem baixa homologia com nucleotídeos eucarióticos. Em *E. coli*, as hidrolases Nudix, as quais produzem desoxinucleotídeos monofosfatados a partir dos seus correspondentes trifosfatados têm sido bioquimicamente caracterizadas. Acredita-se que elas estejam envolvidas na regulação dos *pools* de nucleotídeos (O'Handley et al., 1995 e 2001). Há também duas nucleosídeos quinases que fosforilam timidina, uridina e citidina (Okazaki et al., 1964), sendo que EcSurE pode catalisar a reação reversa.

A especificidade por 3'-monofosfatados pode indicar que EcSurE está envolvida na regulação de 3'-mononucleotídeos originados da degradação de

RNAs por RNases intracelulares. Já a atividade para 5'-monofosfatos, mostra que esta enzima está envolvida na regulação de todos NMPs e dNMPs de *E. coli*. Portanto, trata-se de uma enzima multifuncional com atividade de 5'-nucleotidase, 3'-nucleotidase e exopolifosfatase que pode contribuir significativamente para a sobrevivência de *E. coli* durante a fase estacionária (Proudfoot *et al.*, 2004).

Atualmente, também se cogita que proteínas SurEs sejam enzimas *house-cleaning*, atuando na desfosforilação de nucleosídeos modificados (não-canônicos) e que, portanto, são potencialmente mutagênicos à célula (Gonçalves *et al.*, 2008). Tal suposição se vale da premissa da baixa afinidade de SurEs por substratos canônicos comparada a maioria das nucleotidases já estudadas e que, outras enzimas, previamente caracterizadas e classificadas como nucleotidases em testes com substratos canônicos, apresentavam maior afinidade nucleosídeos quando testadas contra nucleosídeos não-canônicos (Galperin *et al.*, 2006).

2.7. Nucleotidases e catabolismo de nucleosídeos

Para entender melhor os complexos processos em que as nucleotidases estão envolvidas, serão descritos as vias e o funcionamento das nucleotidases eucarióticas, estas muito mais bem estudadas. Em mamíferos, nucleotidases intracelulares catalisam o passo final da cadeia de desfosforilação de nucleotídeos, antes que os mesmos sejam exportados para fora da célula.

Já as nucleotidases extracelulares participam da regulação dos nucleotídeos extracelulares. Nucleosídeos produzidos no espaço extracelular podem ser "importados" e, conseqüentemente, reutilizados através de

transportadores da membrana plasmática. Este ciclo é chamado de recuperação (*salvage*) de nucleosídeos.

Nucleotídeos celulares são derivados ou por processos de recuperação ou através de sua biossíntese. Para ambos os processos, se faz necessário a desfosforilação de nucleosídeos fosfatados existentes. Em consequência, as nucleotidases estão estrategicamente posicionadas entre estas vias metabólicas e, são estritamente reguladas, determinando o destino de nucleotídeos intracelulares e extracelulares. Por exemplo, a desfosforilação de nucleosídeos monofosfatados extracelulares por nucleotidases ali presentes, levará ao aumento da “importação” dos mesmos através de vias de recuperação de nucleosídeos (Hunsucker *et al.*, 2005).

Embora a biossíntese de nucleotídeos seja um processo energeticamente custoso e a recuperação de nucleosídeos extracelulares seja mais benéfica à célula, diferentes tecidos e organismos têm respostas diversas sob diferentes condições. Os parasitos *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* dependem de purinas e pirimidinas exógenas como fonte de seus nucleotídeos e, portanto, necessitam exclusivamente de ciclos de recuperação. Tal característica tem sido utilizada para o desenvolvimento de drogas que bloqueiem a reutilização de purinas (el Kouni *et al.*, 2003). Em mamíferos, a deficiência de biossíntese de nucleotídeos na medula óssea, eritrócitos e epitélio intestinal cria uma dependência dos ciclos de recuperação para o suprimento de nucleotídeos (Savaiano & Clifford, 1981). Por outro lado, a alta taxa de biossíntese de purinas no fígado gera um excesso de

purinas para exportação e para a recuperação em outros tecidos (Murray *et al.*, 1971).

Sob condições de estresse ou ineficiência no suprimento de energia (privação de oxigênio e nutrientes, por exemplo), ocorre o aumento do catabolismo de nucleotídeos no sentido de se preservar uma alta taxa de nucleosídeos trifosfatados em relação ao de nucleosídeos monofosfatados. Como as nucleotidasas catabolisam nucleosídeos monofosfatados, as mesmas são responsáveis pelo aumento desta taxa (de trifosfatados) e, portanto, são importantes componentes para a homeostase celular (Atkison *et al.*, 1976).

2.8. Nucleotidasas e a síntese de DNA

A manutenção dos *pools* balanceados de desoxinucleotídeos (dNTPs) é necessária para que ocorra uma síntese precisa de DNA. O aumento da taxa de um único tipo de dNTP em relação aos outros pode acarretar a redução da fidelidade da replicação do DNA e também resultar no surgimento de mutações e aberrações cromossômicas (Kunz *et al.*, 1994).

Um exemplo das conseqüências que este desbalanço de dNTPs causa é a ADA (deficiência da adenosina deaminase), uma deficiência congênita na produção da enzima adenosina deaminase que converte adenosina em inosina e desoxiadenosina em desoxinosina, gerando uma severa imunodeficiência (Giblett *et al.*, 1972). Com o aumento de dATP no interior de eritrócitos e linfócitos, ocorre a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), a hemoaglutinação de

linfócitos e a inibição da biossíntese de nucleotídeos nestas células (Tattersall *et al.*, 1975).

Por outro lado, estudos envolvendo o nocaute do gene para 5'-AMP nucleotidase de *E. coli*, mostraram que o acúmulo de ATP no interior da célula conferiu à bactéria maior tolerância a ambientes mais frios (Shain & Morrison, 2007). De fato, o acúmulo de ATP é uma estratégia utilizada por organismos psicrófilos à medida que a temperatura do ambiente diminui. Isto tem sido interpretado como um mecanismo compensatório, pois a motilidade, *colisão* celular e a energia livre de Gibbs da hidrólise de ATP são reduzidas e, para contornar tal problema, há um contrabalanço no sentido de aumentar o nível de ATP na célula. (Napolitano *et al.*, 2005).

Adicionalmente, como a síntese de DNA nuclear ocorre somente na fase S, enquanto que a síntese de DNA mitocondrial ocorre durante todo o ciclo celular, é esperado que os *pools* dos desoxinucleotídeos de cada um destes compartimentos sejam regulados separadamente. Embora as etapas de biossíntese e recuperação formem os mesmos desoxinucleotídeos, há evidências que apontam que os desoxinucleotídeos oriundos de cada ciclo tenham um propósito diferente dentro da célula (Hunsucker *et al.*, 2005).

2.9. Nucleotidasas e atividade *house-cleaning*

No metabolismo celular são constantemente gerados subprodutos que são dispensáveis e até mesmo perigosos para a célula, principalmente durante alguma fase de estresse. Estas substâncias são excretadas ou hidrolisadas para

metabólitos comuns por diversas enzimas *house-cleaning*. Muito destes compostos são nucleosídeos trifosfatados não canônicos os quais podem ser erroneamente incorporados durante a síntese de DNA (Galperin *et al.*, 2006).

Os nucleotídeos precursores que compõem o DNA e RNA são susceptíveis a diversos danos causados por ataques químicos provenientes de diversas moléculas, principalmente por espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas moléculas quando reagem com as bases de DNA formam compostos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos, que modificam a estrutura do DNA gerando um mau pareamento entre as bases. Entre estes compostos, o mais comum é a 7,8-dihidro-8-oxoguanina ou 8-OH-Gua. Portanto, o entendimento do processo de formação destas lesões oxidativas nos nucleotídeos contituem a base para a compreensão deste distúrbio da informação genética (Kamiya *et al.*, 2003). Neste contexto, as nucleotidases *house-cleaning* estão envolvidas no processo reverso, sanitizando a célula contra estes compostos virtualmente perigosos, pois interceptam e hidrolisam nucleotídeos não canônicos, prevenindo o dano no DNA e suplementando o trabalho do sistema de reparo de DNA (Galperin *et al.*, 2006).

A nucleotidase *house-cleaning* mais bem estudada é a MutT de *E. coli* que apresenta uma alta seletividade para 8-oxo-dGTP além de 2-oxo-dATP e 8-oxo-dATP (Maki & Sekuguishi, 1992). Outra nucleosídeo fosfatase, a YjjG protege a célula contra derivados pirimidínicos não canônicos como 5-fluor-2-deoxiuridina (5-Fduridina), 5-fluoruridina, ácido 5-fluororótico (5-FOA), 5-fluoruracil e 5-aza-2-deoxiicitidina, além de prevenir a incorporação de nucleotídeos mutagênicos como 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) e possuir maior atividade fosfatase para 5-fluor-2-

deoxiuridina monofosfato em relação à canônica timidina monofosfato (dTMP) (Titz *et al.*, 2006).

Para ser classificada como nucleotidase *house-cleaning*, uma enzima tem que ter maior afinidade (menor valor de K_m) para nucleosídeos não-canônicos se comparada à atividade observada contra o respectivo nucleosídeo comum.

A descoberta de novas nucleotidasas *house-cleaning* ajuda no melhor entendimento do processo de detoxificação da célula. No entanto, muitas destas enzimas permanecem ocultas nos genomas microbianos, pois estão anotadas como *orfs* conservadas hipoteticamente em muitos deles (Galperin *et al.*, 2006).

2.10. Estrutura tridimensional e estado oligomérico de SurEs

A estrutura tridimensional de proteínas SurE de cinco organismos diferentes foram descritas recentemente, a saber: *Thermotoga maritima* (TmSurE) (Lee *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001); *Pyrobaculum aerophilum* (PaSurE) (Mura *et al.*, 2003), *Thermus thermophilus* (TtSurE) (Iwasaki & Miki, 2007), *Aquifex aeolicus* (AaSurE) (apenas a estrutura depositada em PDB – Protein Data Bank) e *Salmonella typhimurium* (StSurE) (Pappachan *et al.*, 2008).

O monômero das proteínas SurEs já resolvidas consiste em um domínio globular *Rossmann-fold-like* e um β -*haipin* que media a tetramerização (Figura 4, A e C). O enovelamento tipo Rossmann é composto por três camadas $\alpha/\beta/\alpha$ formando um “sanduíche”.

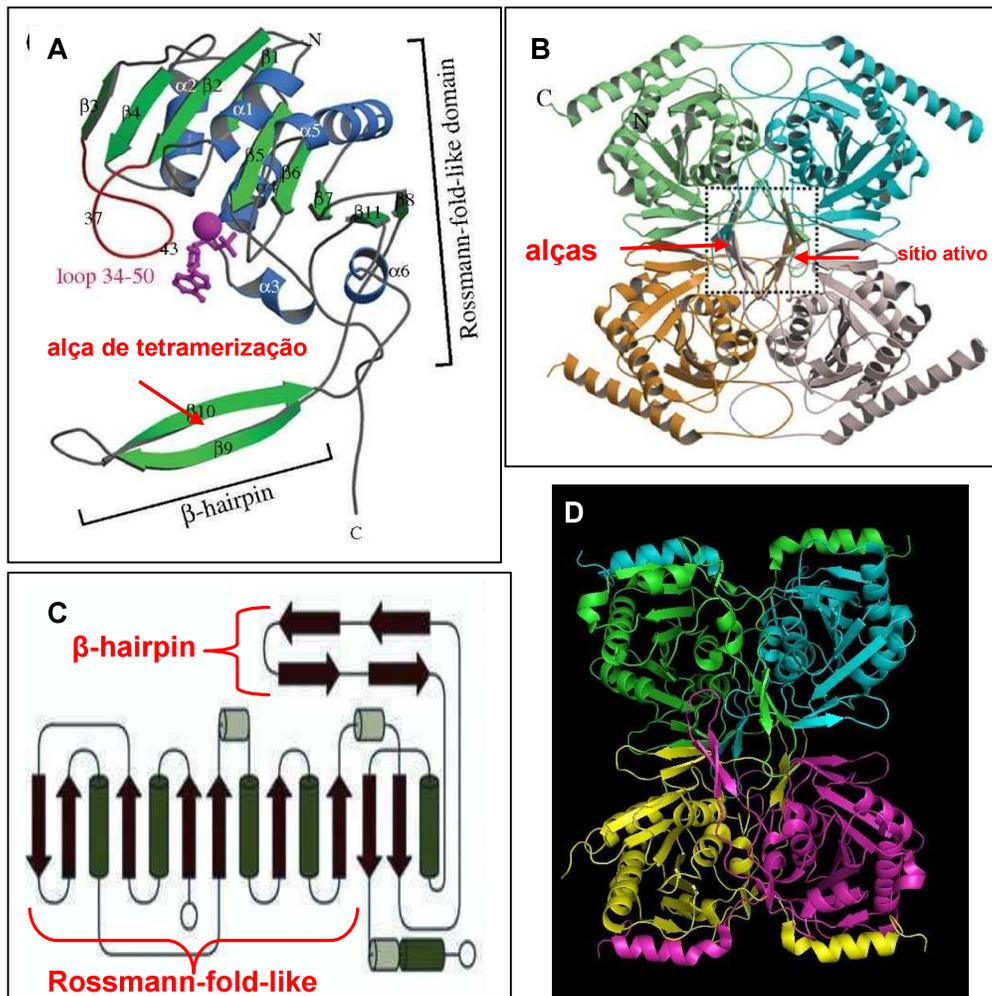


Figura 4. Modelos e estruturas tridimensionais de diferentes SurEs. **(A)** Modelo de um monômero de TtSurE, indicando o enovelamento global de uma SurE: N-terminal com o domínio *Rossmann-fold-like* e o C-terminal com uma β -hairpin formando uma alça responsável pela tetramerização. **(B)** Modelo do tetrâmero TmSurE. Ambas as figuras foram adaptadas de Iwasaki e Milki, 2007. **(C)** Modelo esquemático da disposição de hélices-alfas (cilindros) e fitas-betas (setas) de StSurE (Pappachan *et al.*, 2008) **(D)** Estrutura do tetrâmero de StSurE (PDB 2V4N)

Em TmSurE (Figura 4B), a estrutura é caracterizada por predominância de folhas betas (9 fitas betas paralelas na seguinte ordem: 3-4-2-1-5-6-7-11-8). As folhas betas 1 a 7 compreendem o domínio N-terminal, enquanto que as fitas 8 e 11 fazem parte do domínio C-terminal. Além do mais, 4 hélices-alfas (1-2-4-5) e 2 duas 3_{10} hélices (3 e 6) completam o “sanduíche” da região N-terminal (Zhang *et al.*, 2001).

Já em TtSurE, onde se obteve cristais na presença de substrato (3'-AMP), os protômeros podem ser sobrepostos, exceto na região 34 a 50, a qual correspondem à região do *loop* do sítio ativo (Figura 4A). Tal sobreposição não pode ser feita pois o *loop* se encontra na conformação aberta nos protômeros A e C e na conformação fechada nos protômeros B e D, sendo que o AMP não pode se ligar em conformações fechadas. Isso mostra que a mudança da conformação do *loop* 34-50 dos protômeros B e D, de fechada para aberta, é crítico para a ligação do AMP (Iwasaki & Miki, 2007).

Outro fato interessante é assimetria encontrada no cristal de TtSurE com substrato. Os protômeros A e C estão mais próximos entre si do que os protômeros B e D, tornando a molécula assimétrica. Através de ensaios funcionais, foi detectada uma leve cooperatividade positiva (em torno de 1,2) com os substratos naturais e os autores atribuíram que tal cooperatividade é devido a essa assimetria intrínseca. Adicionalmente, o glutamato da posição 37 do protômero A interage com o manganês presente no sítio ativo do protômero C e vice-versa. Tal aminoácido é fundamental para a ligação do metal divalente e

quando se fez uma mutação sítio dirigida para este resíduo de glutamato para alanina, a enzima perdia sua atividade.

O metal se liga aos oxigênios dos aspartatos 8 e 9, ao fosfato do AMP, à uma molécula de água e é coordenado pelo glutamato 37 (Iwasaki & Miki, 2007). Acredita-se que o mecanismo de catálise ocorra por um ataque nucleofílico da água na ligação de fosfato do substrato, formando uma fosfoenzima intermediária.

Em outubro de 2008, foi depositada a primeira estrutura de SurE de um organismo mesófilo, a StSurE de *Salmonella typhimurium* (Figura 4, C e D) (Pappachan *et al.*, 2008). Adicionalmente, já foram obtidos cristais de CjSurE de *Campylobacter jejuni* (Gonçalves *et al.*, 2008), porém sua estrutura não foi ainda resolvida.

Nos estudos envolvendo StSurE (Pappachan *et al.*, 2008), procurou-se buscar quais os prováveis dados estruturais que fossem diferentes das outras proteínas SurEs que já foram descritas e suas possíveis implicações para a adaptação em um ambiente mesófilo. Nesse sentido, a estrutura de StSurE mostrou-se bastante similar com estruturas já analisadas: StSurE apresenta um domínio *Rossmann fold-like* na região N-terminal e domínio *swapping* na região C-terminal onde também se localiza uma β -hairpin responsável pela tetramerização (Figura 4C).

Dois cristais foram obtidos, sendo que um continha um monômero na unidade assimétrica e o outro possuía um tetrâmero. A proteína é composta por seis hélices-alfas, três hélices-3₁₀ e treze fitas betas (Figura 4C). Foi notado

também que o resíduo aspartato 230 (D230) parece ser crucial para a interação entre dímeros (domínio *swapping*).

Estudos de desnaturação por uréia utilizando dicroísmo circular, mostraram que a proteína começava a perder a sua estrutura com 2 M de uréia e apresentava a estrutura totalmente desenovelada a partir de 4 M. Quando analisada a região de comprimento de onda de 222 nm, correspondente à hélice-alfa, observou-se que este tipo de estrutura sofria um maior grau de desnaturação em relação às fitas betas. Este fenômeno se deve, provavelmente, a uma maior exposição das hélices-alfas localizadas na parte externa da proteína.

Ensaio envolvendo desnaturação térmica indicaram que a proteína perde a estrutura a 45°C, sendo que tal fato também foi confirmado por calorimetria diferencial. Estes resultados, de certa forma, já eram esperados e diferem dos dados de outras proteínas SurEs de organismos extremófilos, cujo ápice da performance enzimática ocorre em temperaturas acima de 80°C.

O estado oligomérico de proteínas SurEs em solução sempre foi muito controverso. Diferentes técnicas foram empregadas para resolver esta questão e o estado oligomérico parece depender do microrganismo estudado. Ainda que já se saiba que a SurE necessita estar em um arranjo tetramérico para se tornar ativa, dímeros são as formas mais frequentemente relatadas na literatura.

Em dois estudos independentes de cromatografia de gel filtração da proteína TmSurE, observou-se que ela existe em solução como dímero (Lee *et al.*, 2001) ou como tetrâmero (Zhang *et al.*, 2001). Já as proteínas PaSurE, StSurE e CjSurE, também estudadas por gel filtração, foram citadas unicamente como

dímeros. Em TtSurE, usando ultracentrifugação, mostrou-se existir em um equilíbrio entre dímeros e tetrâmeros. E, por fim, EcSurE de *E. coli* apresentou-se como tetrâmero (Proudfoot *et al.*, 2004).

2.11. Cinética enzimática

Seres vivos dependem de sua atividade metabólica para a sua sobrevivência. Milhares de reações químicas ocorrem ao mesmo tempo e são processadas rapidamente dentro de uma célula viva. Todas estas transformações são processadas por enzimas, proteínas especializadas em catalisar tais reações metabólicas, embora algumas moléculas de RNA são também capazes de realizar tais reações e, portanto, são conhecidas como riboenzimas. Enzimas dispõem de um enorme poder catalítico, acelerando reações na ordem de 10^{16} , as quais são muito mais eficientes do que qualquer catalisador sintético.

Enzimas também apresentam uma alta seletividade tanto no que se refere às moléculas com as quais ela interage quanto à reação que a mesma catalisa. Substrato é o termo tradicionalmente utilizado para a molécula sobre a qual a enzima atua, sendo que a mesma apresenta geralmente uma grande especificidade para o mesmo. A interação entre enzima e substrato se dá pelo reconhecimento molecular baseado em uma complementaridade estrutural.

Muitas enzimas dependem de componentes não protéicos para complementar sua atividade tais como íons metálicos ou moléculas orgânicas, os quais são chamados de cofatores. Usualmente, cofatores estão ativamente envolvidos na reação enzimática servindo como carreadores de grupos funcionais

na conversão de substrato em produto. No caso de íons metálicos, estes atuam como catalisadores eletrofilicos, estabilizando o aumento da densidade de elétrons ou a carga negativa que se desenvolve durante a reação. Outra provável função é prover um poderoso nucleófilo em pH neutro. A coordenação do íon metálico pode aumentar a acidez do nucleófilo com o próton ionizável. Adicionalmente, no que se refere à classificação, o complexo proteína-cofator o qual é cataliticamente ativo é chamado de holoenzima enquanto que na ausência do cofator, a proteína é chamada de apoenzima.

Cinética é o ramo da ciência que estuda a taxa de uma reação química. No contexto da enzimologia, é possível determinar a velocidade máxima de reação sua afinidade de ligação a substratos e inibidores. Junto com estudos de estrutura e química de proteína, a análise da resposta de taxa enzimática frente ao rendimento pode agregar conhecimentos do mecanismo de ação catalítica da enzima.

Michaelis e Menten propuseram uma teoria geral de ação enzimática consistente com a cinética enzimática observada. Esta teoria se baseia no fato que a enzima (E) e o seu substrato (S) associam reversivelmente na forma de um complexo enzima-substrato (ES). Em gráficos de cinética enzimática que segue este modelo, cujos parâmetros são a concentração do substrato (eixo x) versus velocidade da reação (eixo y), a curva obtida é de uma hipérbole retangular (figura 5A). Outro quesito relevante para este tipo de gráfico é a K_m (constante de Michaelis) que equivale à concentração de substrato correspondente a metade da velocidade máxima da reação.

O modelo de Michaelis-Menten revolucionou a o desenvolvimento da química de enzimas devido a sua simplicidade e ampla aplicabilidade. No entanto, as propriedades cinéticas de muitas enzimas não podem ser explicadas por este modelo. Um importante grupo consiste de enzimas alostéricas as quais frequentemente apresentam curvas sigmóides em gráficos de cinética ao invés de curvas hiperbólicas preditas na equação de Michaelis-Menten. Em enzimas alostéricas, a ligação do substrato ao sitio ativo da enzima pode afetar a propriedade de ligação de outro sitio ativo na mesma molécula de enzima. Isto possivelmente resulta da interação entre suas subunidades, tornando a ligação do substrato cooperativa, fazendo com que curva de cinética se torne sigmóide (Figura 5A). Um parâmetro para medir esta cooperatividade é chamado de coeficiente de Hill (h , o qual também pode ser chamado de n), o qual é obtido através do valor do coeficiente angular da reta obtida no gráfico de Hill. Tal gráfico é confeccionado a partir do log de $(Y/1-Y)$ onde Y é o número moléculas ligadas ao substrato versus concentração de substrato (Figura 5B) (Garret & Grisham, 1995).

O valor de n aumenta de acordo com o grau de cooperatividade da enzima sendo seu valor máximo é igual ao número de sítios ativos presentes na enzima. Se uma proteína é tetramérica, por exemplo, o valor h é no máximo 4. A cooperatividade de uma enzima pode ser positiva, quando h seja maior do que 1, neste caso, a ligação do substrato em um sitio auxilia a ligação de outra molécula de substrato em outro sitio. Há situações em que a cooperatividade é negativa,

quando n é menor que 1, ocorrendo o fenômeno oposto, a ligação do substrato ao sítio da enzima, dificulta a ligação do substrato em outro sítio ativo.

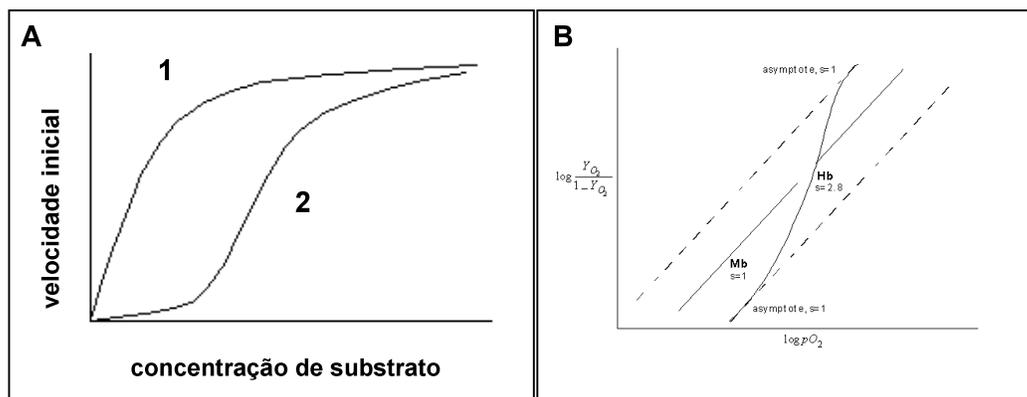


Figura 5. (A) Representação de curva de cinética enzimática (velocidade x concentração de substrato), a curva 1 representa um hipérbole, seguindo o padrão de Michaelis-Menten, já a curva 2 representa uma sigmóide, próximo ao encontrado em enzimas alostéricas. **(B)** Gráfico de Hill de cooperatividade para mioglobina ($h=1$) e para hemoglobina ($h=2,8$)

Existem dois modelos que tentam explicar o mecanismo de cooperatividade e as interações alostéricas das proteínas: seqüencial (KNF) ou associativo (MWC). Apesar de abordagens diferentes, eles se baseiam na hipótese de que estas proteínas se encontram em dois estados estruturais; tenso (T) com menor afinidade ao substrato e relaxado (R) com maior afinidade ao substrato .

No modelo seqüencial (KNF), proposto por Daniel Koshland Jr, há três premissas: (1) as diferentes subunidades de uma enzima podem estar em dois diferentes estados (T ou R), (2) a ligação de um substrato a uma subunidade muda a conformação desta, mas não a de sua vizinha, ou seja, a transição de T para R é induzida pela ligação do substrato em uma determinada subunidade; (3)

A mudança conformacional produzida pela ligação de substrato em uma subunidade pode aumentar ou diminuir a afinidade de ligação de outra subunidade dentro da mesma molécula. Uma subunidade T com uma vizinha R tem maior afinidade para um substrato do que uma subunidade T com vizinha T devido às diferenças existentes entre as interfaces entre TR e TT.

Já o modelo associativo (MWC), proposto em 1965 por Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeaux, se baseia no fato de que a simetria da molécula é conservada durante as transições alostéricas. O modelo MWC também se baseia três premissas: (1) A proteína se interconverte entre as duas conformações, R e T. Portanto, todas as subunidades da molécula devem estar na forma T ou R. Híbridos TR não existem neste modelo, (2) substratos se ligam com baixa afinidade na forma T e com alta afinidade na forma R e (3) A ligação do substrato aumenta a possibilidade de todas as subunidades da molécula estarem na forma R. A transição alostérica é dita associativa pois todas as subunidades de uma vez mudam em harmonia de T para R ou vice-versa (Stryer , 1995)

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais:

Contribuir para o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa*, além de fornecer subsídios ao estudo da estrutura tridimensional de proteínas desta bactéria relacionadas ao metabolismo e à patogenicidade. (XfSurE, XfVirJ, XfDsbC, XfTolB, XfFnrE e XfHtpX)

3.2. Objetivos Específicos:

- Efetuar a clonagem do gene *surE*, *virJ*, *dsbC*, *tolB*, *fnrE* e *htpX* de *X. fastidiosa*, expressão e a purificação de sua proteína correlata em *Escherichia coli*;
- Caracterização enzimática e estrutural de XfSurE.

“Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa* – evidence of allosteric behaviour”

Autores: Antonio M. Saraiva, Marcelo A. Reis, Susely F. Tada, Luciana K. Rosselli-Murai, Dilaine R. S. Schneider, Alexandre C. Pelloso, Marcelo A. S. Toledo, Carlos Giles, Ricardo Aparicio, Anete P. de Souza

Publicado na revista **FEBS Journal**: volume 276 (22) (Novembro 2009)
(p 6751-6762)



Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa* – evidence of allosteric behaviour

Antonio M. Saraiva¹, Marcelo A. Reis^{2,3}, Susely F. Tada¹, Luciana K. Rosselli-Murai¹, Dilaine R. S. Schneider¹, Alexandre C. Peloso¹, Marcelo A. S. Toledo¹, Carlos Giles³, Ricardo Aparicio² and Anete P. de Souza¹

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Brazil

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

³ Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

Keywords

allosteric behaviour; small-angle X-ray scattering; stationary phase survival protein E (SurE); SurE oligomeric state; *Xylella fastidiosa*

Correspondence

A. P. de Souza, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas São Paulo, Brazil
Fax: +55 19 3521 1089
Tel: +55 19 3521 1132
E-mail: anete@unicamp.br

(Received 5 June 2009, revised 11 August 2009, accepted 18 September 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07390.x

The genome data of bacterium *Xylella fastidiosa* strain 9a5c has identified several *orfs* related to its phytopathogenic adaptation and survival. Among these genes, the *surE* codifies a survival protein E (XfSurE) whose function is not so well understood, but functional assays in *Escherichia coli* revealed nucleotidase and exopolyphosphate activity. In the present study, we report the XfSurE protein overexpression in *E. coli* and its purification. The overall secondary structure was analyzed by CD. Small-angle X-ray scattering and gel filtration techniques demonstrated that the oligomeric state of the protein in solution is a tetramer. In addition, functional kinetics experiments were carried out with several monophosphate nucleoside substrates and revealed a highly positive cooperativity. An allosteric mechanism involving torsion movements in solution is proposed to explain the cooperative behaviour of XfSurE. This is the first characterization of a SurE enzyme from a phytopathogen organism and, to our knowledge, the first solution structure of a SurE protein to be described.

Structured digital abstract

- [MINT-7262492](#): *XfSurE* (uniprotkb:[Q9PF20](#)) and *XfSurE* (uniprotkb:[Q9PF20](#)) bind ([M1:0407](#)) by *x ray scattering* ([M1:0826](#))
- [MINT-7262504](#): *XfSurE* (uniprotkb:[Q9PF20](#)) and *XfSurE* (uniprotkb:[Q9PF20](#)) bind ([M1:0407](#)) by *molecular sieving* ([M1:0071](#))

Introduction

Phytopathogens attacking economically important crops are a major concern around the world. It is generally believed that, worldwide, up to 20% of potential crop yields are lost. Bacterial plant diseases are most severe in the tropical regions, where their effects can be disastrous [1]. Throughout the Americas, the bacterium *Xylella fastidiosa* infects a wide range of hosts, including grape, almond, peach and citrus [2,3]. In Brazil, the

strain 9a5c is the causal agent of citrus variegated chlorosis [4,5], which is a disease that attacks sweet orange trees and causes financial losses of up to US\$ 280–320 million per year (<http://www.fundecitrus.com.br>).

In the *Xylella* genome, there are 220 genes whose functions have been predicted on the basis of comparative sequence analysis, although they were not classified into a particular metabolic pathway ([### Abbreviations](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

ASU, asymmetric unit; PDB, Protein Data Bank; pNPP, *p*-nitrophenyl phosphate; SAXS, small-angle X-ray scattering; SurE, stationary phase survival protein E.

xylella.lnce.br [6]. Among them, *orf XF0703* encodes a stationary phase survival protein E (SurE). The *surE* gene is widely spread among archaea, eubacteria and eukaryote species and, apparently, is well conserved [7]. *orf XF0703* has 789 bp and its correlated protein (XfSurE) has 263 amino acids (28.3 kDa) and a theoretical pI of 5.23. The N-terminal primary structure has strong similarity with other previously studied SurEs (Fig. 1).

The *surE* gene was first identified in *Escherichia coli* and belongs to an operon related to the stationary phase survival protein cluster coded by *surE-pcm-nlpD-rpoS* genes [8]. In *Xylella*, this operon has a different genome architecture (*surE-pcm-dedA-nplD*), where the *rpoS* gene, an alternative RNA polymerase sigma factor that is expressed during the stationary phase, is not found [9]. As in *E. coli*, the *Xylella surE* gene has a four nucleotide overlap with *pcm* and the two constitute a bicistronic operon. These genes are highly expressed during the stationary phase in *E. coli*. The PCM protein is involved in rescuing cells from damage caused by isoaspartyl residues that are formed during

stress by the conversion of asparagines and aspartate residues [10]. Assays with double mutant *pcm/surE* strains show isoaspartyl residue accumulation but, interestingly, in the *pcm* single mutant strain, the *surE* gene appears to suppress this phenotype [11]. These results corroborate the hypothesis that SurE and PCM proteins act in a coordinated manner to maintain cell viability during stress [11,12].

Despite previous studies, the function of the SurE protein is not completely known, nor is its catalytic mechanism. Recently, this protein was reclassified as a nucleotidase (nucleoside 5'-monophosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.5) because of broad specificity to 5'(3') nucleosides in addition to exopolyphosphatase activity [13]. Thus, SurE protein may be involved in pathway regulation of DNA and RNA synthesis [14] or, in another hypothesis, it comprises a housekeeping enzyme implicated in noncanonical nucleoside catabolism [15,16]. Five crystallographic structures of SurE have so far been characterized, obtained from *Thermotoga maritima* (TmSurE) [17,18], *Pyrobaculum aerophilum* (PaSurE) [7], *Thermus thermophilus* (TtSurE) [19],

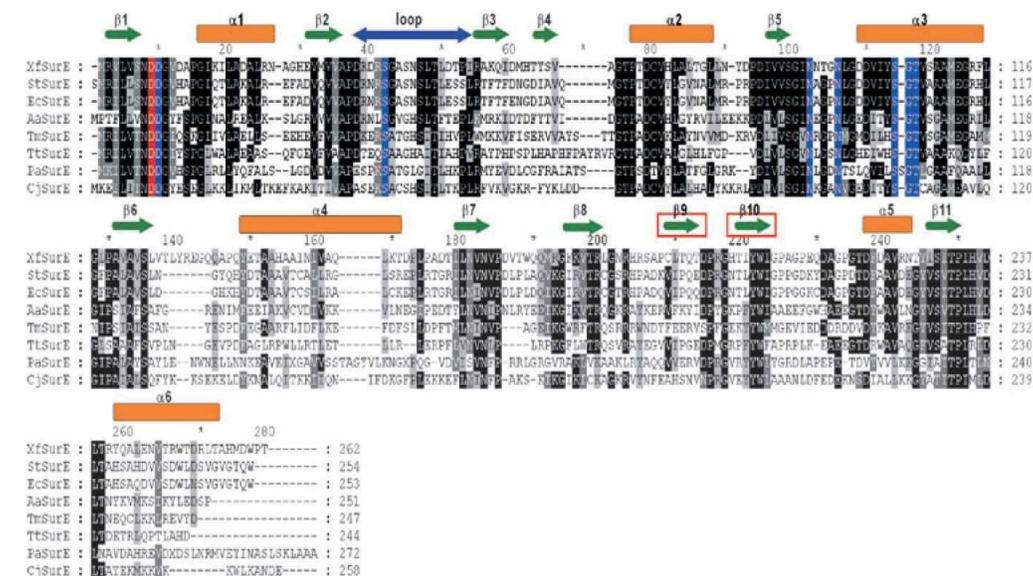


Fig. 1. Multiple sequence alignment of SurEs using CLUSTALW2 [49] and GENEDOC [50], with identities given in parentheses. XfSurE, *X. fastidiosa*; StSurE, *S. typhimurium* (54%); EcSurE, *E. coli* (54%); AaSurE, *A. aeolicus* (42%); TmSurE, *T. maritima* (37%); TtSurE, *T. thermophilus* (36%); PaSurE, *P. aerophilum* (30%) and CjSurE, *C. jejuni* (33%). Letters shaded in black indicate residues that are identical in at least four of the SurEs. Conserved substitutions are shaded in grey. Amino acids implicated in metal coordination and catalysis are highlighted in blue and Asp8 is shaded in red. Secondary structure elements (orange sticks for α -helix and green arrows for β -sheet) predicted from XfSurE sequence with PSIPRED [51] are also indicated. The blue double-arrow designates the regions corresponding to the functional loop, and two β -sheets involved in tetramerization are enclosed in red rectangles [19].

Aquifex aeolicus (AaSurE) (not described in the literature) and, recently, *Salmonella typhimurium* (StSurE) [20]. The protein from *Campylobacter jejuni* (CjSurE) is under investigation [16].

In the present study, to provide a better understanding of SurE protein function, and as part of our efforts aiming to characterize possible pathogen-related proteins from *X. fastidiosa* [21–24], we report the overexpression, purification and characterization of a new SurE protein. This is the first characterization of a SurE enzyme from a phytopathogenic organism. In addition, modelling approaches based on small-angle X-ray scattering (SAXS) data were used to obtain information on of the overall shape of this protein, permitting the identification of structural features similar to those of the SurE family of proteins. These studies, associated with kinetics parameters, indicate that XfSurE has different features from the previously described SurE proteins. Therefore, this present study not only contributes to a better understanding of the SurE family of proteins, but also adds new information on the metabolism and phytopathogenicity of *X. fastidiosa*.

Results and Discussion

Cloning, expression and purification

The *X. fastidiosa* genome has provided important information on bacterial metabolism and pathogenesis [6]. In this context, several *orfs* were identified whose functional and cellular roles are so far not well understood. To better comprehend the bacterial metabolism as well to contribute to the current knowledge about the SurE protein family, we have studied the *X. fastidiosa* SurE protein. Despite early functional and biophysical studies of SurE proteins, important questions remain unanswered and the establishment of efficient expression and purification procedures for the production of XfSurE protein was first required in order to obtain sufficient protein for functional and biophysical experiments.

The *orf* XF0703 was successfully cloned into the pET29a expression vector. In *E. coli* overexpression assays, the best results were obtained by harvesting cells 20 h post-induction, using lactose 5.6 mM as the inductor agent. Approximately 20 mg of soluble XfSurE protein was obtained per litre of culture, despite the fact that part of the protein was expressed in insoluble form. The purification of the recombinant XfSurE was performed by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel, resulting in a large quantity of purified XfSurE obtained in elution frac-

tions over a imidazol concentration range of 250–500 mM. A single band with approximately 30 kDa (XfSurE plus His-Tag C-terminus) was obtained by SDS-PAGE.

CD

To investigate the secondary structural integrity of recombinant XfSurE, CD spectra were obtained at pH 7.0. Analysis of the data using CDSSTR indicated that XfSurE is mainly composed of α -helices (31%) and β -sheets (20%). These results are in agreement with the predicted secondary contents obtained with PSIPRED (29% α -helices and 20% β -sheets) and also are compatible with the data from the crystal structures of SurEs described in the literature that are composed of Rossmann-like domains with a swapping domain [18], thus indicating that the purified recombinant protein was folded and stable at room temperature.

Size exclusion chromatography

The oligomeric state of SurE proteins in solution is currently not well understood. In *T. maritima*, TmSurE was found as dimers [17] or both dimers and tetramers [18]. PaSuE, CjSurE and StSurE exist as dimers [7,16,20] and TtSurE was described as existing in equilibrium between dimers and tetramers [19]. Size exclusion assays with EcSurE indicated a tetrameric organization [13].

Studies using gel filtration and SAXS analysis point to a tetrameric form of XfSurE in solution. Gel filtration revealed that XfSurE appears during column elution as a single peak between the aldolase (158 kDa) and conalbumin (75 kDa) peaks (Fig. 2). According to a calibration curve, this XfSurE peak corresponds to a calculated molecular mass of 117 ± 1 kDa, therefore being equivalent to the expected mass of a tetramer.

Enzymatic assays

Initial enzymatic assays involving XfSurE were performed using the artificial substrate *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) to determine the best pH and cofactor, as well the kinetic parameters. As shown in Fig. 3A, the enzyme has highest activity at pH 7.0. The optimal pH is the same as those of EcSurE and StSurE [13,20], suggesting that, in mesophilic organisms, the enzyme acts at neutral pH, in contrast to thermophilic bacteria where the activity changes depending on the organism.

Various divalent metals were tested to determine the best cofactor with pNPP (Fig. 3B). The enzyme exhib-

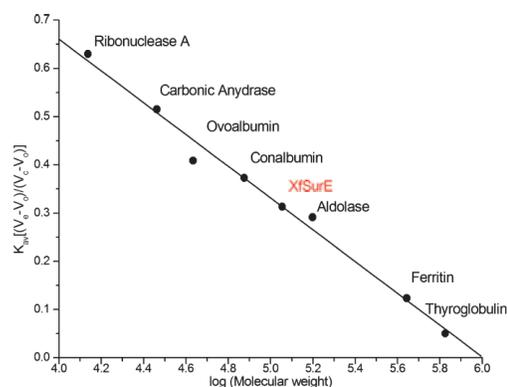


Fig. 2. Calibration curve for XfSurE in buffer B using the molecular mass calibration kits LMW and HMW (GE Healthcare). The estimate of molecular mass for XfSurE is highlighted in red.

ited the highest affinity with Mn^{2+} , followed by $Co^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$. From all characterized SurEs, only EcSurE [13] has a preference for manganese, whereas, in the other SurEs, the preference is for magnesium. Kinetic assays with pNPP (Fig. 3C) showed that, with this substrate, the enzyme has a classical Michaelis–Menten behaviour, with $K_m = 3.2$ mM. This value is higher than that found for EcSurE ($K_m = 2.49$) and TtSurE ($K_m = 2.9$), but below that of StSurE ($K_m = 4.8$). These results demonstrate that the enzyme has low affinity for this substrate.

Several phosphorylated substrates were screened. The results obtained indicate that XfSurE has activity only against monophosphate nucleosides (Fig. 3A). The enzyme has higher activity with purine nucleosides ($3'$ -AMP $>$ $5'$ -dGMP $>$ $5'$ -dAMP $>$ $5'$ -AMP), but did not exhibit a clear preference between ribo- or deoxyribonucleotide and $3'$ or $5'$ monophosphate nucleosides. This is consistent with the classification of SurE as a member of $5'(3')$ nucleotidase. family [13].

Functional experiments with four natural substrates showed that the best divalent metal was Mn^{2+} for all of them. Moreover, the ions Mg^{2+} and Co^{2+} were demonstrated to be alternative metal options for $3'$ -AMP, $5'$ -dAMP and $5'$ -AMP substrates, and Co^{2+} and Mg^{2+} for $5'$ -dGMP (Table 1).

Interestingly, kinetic experiments with natural substrates revealed new catalytic properties of XfSurE. It was clearly demonstrated that, in the presence of natural substrates, XfSurE exhibits an allosteric behaviour with a sigmoidal fit for $3'$ -AMP (Fig. 3C) and other substrates (Table 1). The kinetic values obtained dem-

onstrated that XfSurE possesses the highest affinity for $3'$ -AMP ($K_{0.5} = 0.16$), followed by $3'$ -dAMP, $5'$ -dGMP and $5'$ -AMP. These results are similar to the K_m range of EcSurE (0.10–0.37 mM) [13]. Allosteric behaviour was found for EcSurE only in the presence of polyphosphate substrates, where the enzyme had an exopolyphosphate activity with a Hill coefficient of 1.86. In XfSurE, where allosteric behaviour was found for nucleotidase activity, the positive cooperative behaviour was higher, with a Hill coefficient of 2.6 for the $3'$ -AMP substrate. Other nucleotidases with allosteric properties have been characterized, such as the secreted $5'$ -nucleotidase from *Trichinella spiralis* (Hill coefficient of 1.56 for AMP) [25] cytosolic nucleotidase from chicken [26] and human cytosolic $5'$ -nucleotidase II [27–29]. These findings indicate that XfSurE possibly is a regulatory enzyme and that it is modulated most likely by purine nucleoside byproducts originating from an intricate bacterial metabolism.

Similar to EcSurE, the XfSurE enzyme is inactive towards $5'$ -ATP. To investigate a possible inhibition of XfSurE activity by $5'$ -ATP, an inhibition curve was obtained in the presence of $3'$ -AMP (Fig. 3G). The enzyme is inhibited in a dose-dependent manner, similarly to EcSurE [13]. XfSurE lost 50% of this activity in the presence of 0.86 mM $5'$ -ATP ($K_i = 0.43$ mM).

Structure analysis

SurE structures

Figure 1 shows a sequence alignment of XfSurE with the seven most identical homologues. The crystallographic structures of five homologous proteins have been previously reported both in apo and holo forms. Apo structures from *P. aerophilum* [PaSurE; Protein Data Bank (PDB) entry 1L5X] [7] and *A. aeolicus* (AaSurE; PDB entry 2PHJ) (not described in the literature) as well as a holo form with magnesium ions of *T. maritima* (TmSurE; PDB entry 1J9J) [17,18] have been determined in a crystal form containing a dimer in the crystal asymmetric unit (ASU). *T. thermophilus* SurE structures were determined in different crystal forms, in particular, the apo structures TtSurE1 (PDB entry 2E69; space group $P3_121$, with a tetramer in the ASU) and TtSurE3 (PDB entry 2E6G; space group $P2_12_12_1$, with three tetramers in the ASU) and the complex TtSurE–MnAMP with Mn^{2+} and AMP (PDB entry 2E6C; space group $P3_121$, with one tetramer in the ASU). Sulfate and phosphate ions from the crystallization buffer were observed in both apo structures [19]. Recently, the crystallographic structure of SurE from *S. typhimurium* in the presence of magnesium ions was determined in two different crystal

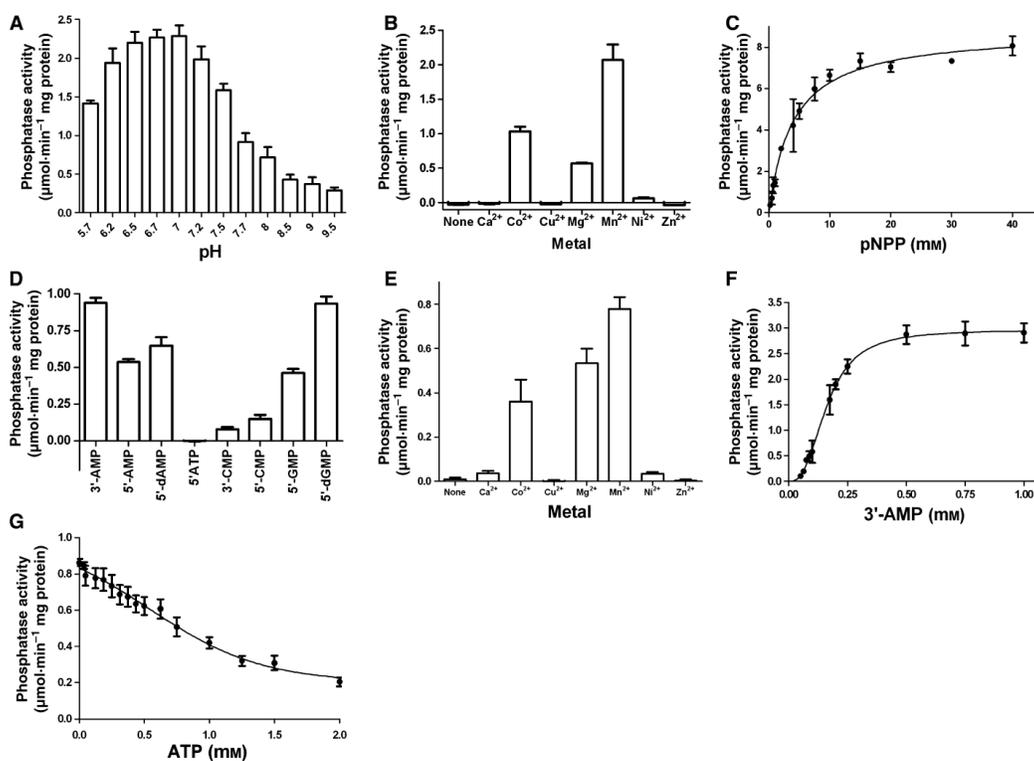


Fig. 3. Functional assays involving XfSurE enzyme. (A–C) Hydrolysis of the artificial substrate pNPP. (A) pH dependence of XfSurE in different buffers: MES-Na (pH 5.5–6.7), HEPES-Na (pH 7.0–8.0) and Tris-HCl (pH 8.2–9.5). (B) Divalent metal preference in buffer HEPES-Na (pH 7.0). Each metal was added at a 0.1 mM concentration, except Mg (added at 1 mM). (C) Kinetics curve of pNPP (0.1–40 mM). The reaction mixture contained 50 mM HEPES-Na buffer, 0.1 mM of Mn^{2+} and 4 mM of pNPP substrate. (D–F) Phosphatase activity with natural substrates. (D) Nucleotidase activity in different phosphorylated nucleosides (at 1 mM). (E) Metal predilection of XfSurE in the presence of 3'-AMP (ion concentrations are the same as those utilized in the pNPP assays). (F) Kinetics curve of 3'-AMP (0.01–1 mM). (G) XfSurE inhibition by ATP (0–2 mM) in the presence of 2.5 mM 3'-AMP.

Table 1. Kinetic parameters and metal predilection for several substrates of XfSurE.

Substrate	$K_{0.5}$ (mM)	V_{max} ($(\mu\text{M}) \cdot (\text{min} \cdot \text{mg}^{-1})^{-1}$)	Hill coefficient	Metals
pNPP	3.2 ± 0.4	8.8 ± 0.2	1.18 ± 0.09	$Mn^{2+} > Co^{2+}$
3'-AMP	0.16 ± 0.01	2.96 ± 0.03	2.67 ± 0.09	$Mn^{2+} > Mg^{2+}$
5'-dAMP	0.41 ± 0.03	0.859 ± 0.001	2.9 ± 0.1	$Mn^{2+} > Mg^{2+}$
5'-AMP	0.79 ± 0.05	0.55 ± 0.02	2.6 ± 0.2	$Mn^{2+} > Mg^{2+}$
5'-dGMP	0.50 ± 0.07	2.26 ± 0.08	2.6 ± 0.3	$Mn^{2+} > Co^{2+}$

forms [20], which will be referred to as StSurE1 (PDB entry 2V4O, whose crystals contain a tetramer in the ASU) and StSurE2 (PDB entry 2V4N, where the ASU contains a monomer). In addition, a report on the crystallization of SurE from *C. jejuni* (CjSurE) in two crystal forms containing either a dimer or a tetramer in the ASU is available [16].

It is important to note that the crystal ASU does not necessarily reflect the protein structure in solution. Indeed, different oligomers with the same number of subunits can be generated by the application of crystallographic symmetry operations on the molecules contained in the ASU, and several cases have been reported where solution studies were essential to

provide information on the macromolecular assembly in solution [30]. In the case of XfSurE homologues, although various crystal forms were reported, containing a monomer, a dimer, a tetramer or a combination of tetramers in the ASU, additional experimental data other than crystallographic data are necessary to determine which macromolecular contacts mediate multimerization and thus the shape of the probable biologically relevant oligomer. To our knowledge, this is the first solution structure of a SurE protein to be described.

SAXS experiments

SAXS measurements taken at various concentrations showed that the oligomeric state of XfSurE does not depend on the protein concentration. Thus, we report only the data for the sample with a protein concentration of $12.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, whose experimental curve is shown in Fig. 4A. The linear behaviour in the Guinier region (Fig. 4A, inset) indicates a monodisperse system, corresponding to a scattering particle with a radius of gyration of $32.7 \pm 0.2 \text{ \AA}$. The distance distribution function $P(r)$ obtained from the experimental data (Fig. 4B) corresponds to a globular molecule with a maximum intramolecular distance $D_{\text{max}} = 100 \text{ \AA}$. Furthermore, the Kratky plot (Fig. 4B, inset), with a well-defined maximum, indicates that the protein is in a folded native conformation.

In addition to the gel filtration technique, an estimate of the molecular mass of XfSurE in solution was obtained by the method described in the Experimental procedures, using lysozyme ($M_{\text{st}} = 14.4 \text{ kDa}$) at a concentration of $c_{\text{st}} = 27.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ as standard. Values for $I(0)$ obtained by Guinier analysis for the sample and the standard were $I(0) = 1.9564 \times 10^{-3}$ and $I_{\text{st}}(0) = 5.8127 \times 10^{-4}$ (arbitrary units on the same scale), respectively, leading to 108 kDa as an estimate for the molecular mass of the protein in solution. This value is in agreement (within the error inherent to the method) with that predicted from the amino acid sequence for four monomers of XfSurE (i.e. 118 kDa). Thus, we assume that XfSurE is a tetramer in solution.

Ab initio shape restoration and structural comparisons

Theoretical scattering curves for different tetramers obtained from the available crystallographic structures of XfSurE homologues were computed by CRY SOL [31] and the values of the parameter χ are provided in Table 2. The best fit was obtained with the homologue StSurE1. The fit to the experimental curve and the dis-

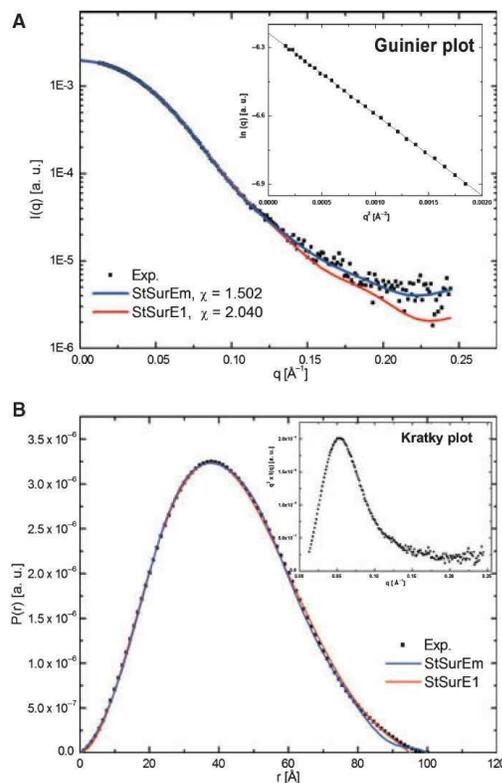


Fig. 4. SAXS experiments. (A) Experimental small-angle X-ray scattering curve of XfSurE and the linear behaviour observed in the Guinier plot (inset). The fit to the experimental data calculated with CRY SOL [31] for the models StSurE1 and StSurEm is also shown. (B) Distance distribution function derived from the experimental curve using GNOM [42] and the Kratky plot obtained from the experimental data (inset). $P(r)$ functions for the models StSurE1 and StSurEm calculated using CRY SOL [31] and GNOM [42] are also shown.

tance distribution function are presented in Fig. 4A,B. In both cases, good agreement is observed.

In addition to this preliminary analysis, which included calculation of global parameters and analysis of crystallographic structures of homologous proteins, a low resolution envelope for XfSurE was derived from the scattering curve. The best results during the DAMMIF [32] runs were obtained imposing the point-group symmetry P222 ($\chi = 1.65$), followed by P2 ($\chi = 1.89$), P1 ($\chi = 2.89$) and P4 ($\chi = 10.77$). The final average envelope is shown in Fig. 5, superposed onto the model StSurE1.

Taken together, the results of the present study unequivocally indicate that the overall shape of

Table 2. Structural parameters for SurE tetramers. The tetramers of TmSurE, PaSurE and AaSurE were generated by the application of crystallographic symmetry operators. Further details are provided in the text.

Model	R_g (Å)	χ	Area (Å ²)			Dihedrals (°)	d_{AC} Å	d_{BD} Å
			A-B	C-D	AB-CD			
StSurEm	32.40	1.502	2185	2403	2057	23.8	26.7	26.1
StSurE1	32.66	2.040	3781	3731	1257	15.2	26.1	25.8
TmSurE	32.40	2.197	3665	3556	1048	8.9	22.5	22.5
PaSurE	31.68	5.609	2999	2994	2231	-1.9	21.1	21.3
AaSurE	31.10	6.439	3621	3620	1434	-32.6	22.8	22.5
TtSurE-MnAMP	30.71	10.355	3272	2980	1815	-16.3	17.9	22.5
TtSurE1	30.62	10.490	3314	3032	1460	-15.3	18.7	22.4
TtSurE3	29.97	14.473	2913	2730	2147	-24.8	16.9	16.6

XfSurE in solution is very similar to that of StSurE1, the tetramer contained in the ASU of the crystallographic structure of SurE from *S. typhimurium*.

Rigid-body modelling

As shown in Fig. 4A,B, the crystallographic model StSurE1 fits the scattering curve and the distance distribution function in both anisometry and D_{max} quite well. Differences observed at higher angles in the scattering profile and small differences in the $P(r)$ function may be explained by the superposition of the StSurE1

structure onto the XfSurE low resolution envelope. As shown in Fig. 5 (center), there are lateral empty portions that suggest differences in the β -hairpin (Fig. 1) responsible for tetramerization in these proteins. To improve the fit to the experimental solution scattering curve, we searched for a more suitable model, starting from the original StSurE1 structure and adopting an approach where protomers A, B, C and D were treated as rigid bodies subject to two independent movements with respect to Fig. 5 (left): a translation of protomers A and D along the z -axis and a rotation of the dimer formed by protomers C and D around the y -axis.

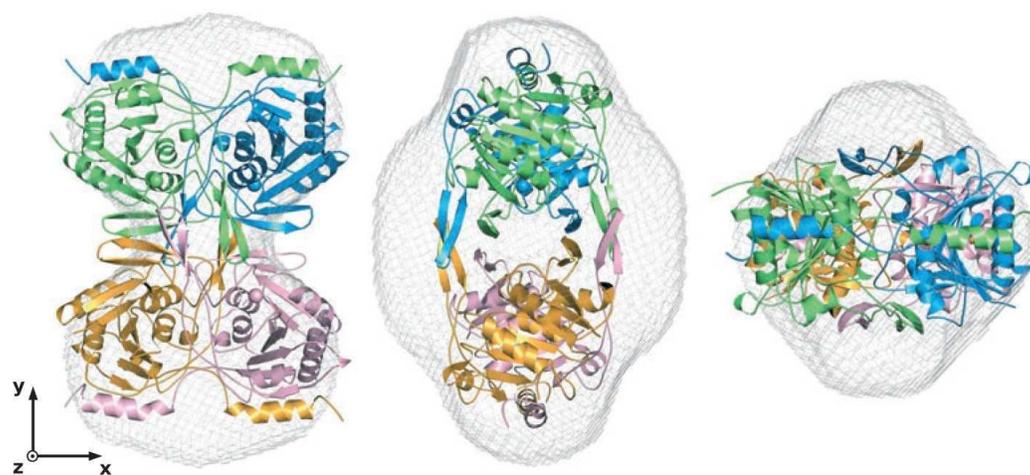


Fig. 5. Cartoon representation of the crystallographic structure of SurE from *S. typhimurium* (StSurE1) superposed onto the XfSurE envelope reconstructed from the experimental solution scattering curve. The center and right views are rotated clockwise by 90° around the x - and y -axes, respectively. Protomers A, B, C and D are shown in green, blue, orange and pink in this sequence, with the corresponding Asp8 C_s represented as a sphere. With respect to the left panel and the coordinated system of the page, the rigid-body modelling procedure described in the text involved translations (with respect to the original position) of protomers A and D along the z -axis and rotations of protomers C and D around the y -axis. The drawing was prepared using PYMOL (<http://www.pymol.org>).

Structural changes introduced during the process were visually inspected by superposing the modified models onto the experimentally-derived envelope.

A characteristic of the StSurE1 tetramer is the distance of the C_{α} carbons of Asp8 in the monomers A/C (d_{AC}) and B/D (d_{BD}), which are responsible for the symmetry properties observed in some of the reported crystallographic structures [19]. This distance is also correlated with the dihedral angle between the plane formed by Asp8 C_{α} in protomers ABD and the plane formed by the corresponding atoms in protomers BCD (Fig. S1), as well as with the interface area between the dimers AB and CD. These parameters have proved to be convenient for structural comparison, and the calculated values for various SurE structures are shown in Table 2.

Translational movement in steps of 1 Å and rotations in the range -90° to $+90^{\circ}$ in steps of 10° were carried out and the χ parameter was computed against the experimental data with CRYSOLOG [31], resulting in the plot shown in Fig. S2. The distances d_{AC} and d_{BD} remained essentially constant throughout the process, thus preserving structural symmetry. As shown in Fig. S2, the value of χ for a translation of approximately 7.5 Å is a minimum for several rotation angles, indicating that, in principle, more than one configuration is possible in solution. Of note, there is a central local minimum (translation and rotation of 7.5 Å and $+25^{\circ}$, respectively), which will be referred to as StSurEm, for which $\chi = 1.502$, and this is lower than that calculated for the initial model StSurE1 ($\chi = 2.040$). StSurEm has a dihedral angle (23.8°) higher than that of StSurE1 (15.2°) (Table 2) and a higher interaction surface area between dimers AB and CD (2057 \AA^2 versus 1257 \AA^2 in the case of StSurE1). The fit to the experimental curve and the $P(r)$ function corresponding to the StSurEm model are shown in Fig. 4A,B.

It is important to note that the active site of each protomer as well as other important residues for catalysis (amino acid residues 32–51 in Fig. 1) are located in the core of the tetramer, a region directly affected by changes in the interface area AB/CD. Conceivably, the possible structural configurations mentioned above may be related to a freedom of movement of the apo enzyme in solution, which would itself constitute a mechanism by which XfSurE may regulate the entry of substrate into the active sites of the tetramer. This hypothesis is in agreement with (and could provide an explanation for) the results obtained by the enzymatic assays, where the Hill coefficients unequivocally indicate the highly positive cooperative behaviour of XfSurE. Proteins of dihedral groups provide rich struc-

tural variations to build allosteric control [33], as observed in fructose-1,6-bisphosphatase tetramer [34] where, in the context of the two-state Monod–Wyman–Changeux model [35], the T state was associated with a dimer turned 17° from its position in the R state, with both coexisting in equilibrium.

Iwasaki and Miki [19] recently proposed for TtSurE that an observed cooperative behaviour was correlated with the structural asymmetry inherent in the apo enzyme, as a result of differences in the distances d_{AC} and d_{BD} (TtSurE1; Table 2). The correlation with a cooperative behaviour was inferred based on the fact that the structure of a holo enzyme (TtSurE–MnAMP) also exhibited the same asymmetry. Thus, it could not be attributed to the presence of the ligand. However, as shown in Table 2, in another apo structure (TtSurE3) determined by Iwasaki and Miki [19], no asymmetry is observed. Both TtSurE1 and TtSurE3 have an ion near the active site region. The asymmetric apo structure TtSurE1 belongs to a crystal form containing a tetramer in the ASU, whereas the ASU of the apo structure TtSurE3 contains three tetramers, with all of them being symmetric. Thus, from a different point of view, the observed asymmetry cannot be considered as an intrinsic property of the apo enzyme.

In the case of XfSurE, the data suggest that the unequivocal positive cooperative behaviour observed is not related to a permanent structural asymmetry. The results obtained in the present study provide insight into a possible allosteric behaviour of the enzyme that could account for the observed cooperativity. Because XfSurE may exhibit a twisting movement in solution, as discussed above, a simple model for an allosteric mechanism would include two configurations, R and T, similar to the Monod–Wyman–Changeux model [35]. Thus, changes in the dihedral angle and accompanying changes in the contact area between dimers AB/CD would control the access of the substrate to the active sites of the tetramer.

Experimental procedures

Cloning, expression and purification

The *surE* gene from *X. fastidiosa* orf XF0703 was amplified by PCR using purified genomic DNA as template. The PCR was carried out using specific primers with restriction enzyme sites *Nde*I and *Xho*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for cloning in pET29a vector (Novagen, Madison, WI, USA): forward primer 5'-ATAAA CATATGCGCGTTCTTGTGTCAGTAA-3' and reverse primer 5'-AAACTCGAGTGTGGCCAGTCCATGTG-3' (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil). The PCR

amplification product was cloned into pET29a and transformed into *E. coli* DH5- α as the cloning host. Sequencing of cloned vectors revealed *orf* XF0703 plus an expected additional eight carboxy terminus amino acid residues, including six histidines (LEHHHHH).

The plasmid containing the *surE* insert from *X. fastidiosa* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells, inoculated overnight at 37 °C and 300 r.p.m. into 3 mL of TB medium containing 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of kanamycin antibiotic and transferred to 2 L of TB at the same antibiotic concentration. The cells were grown until D_{560} of 0.6–0.8 was reached, when XfSurE protein overexpression was induced by the addition of 5.6 mM of lactose followed by cultivation for 20 h at 37 °C and 300 r.p.m. The culture was then centrifuged at 3000 *g* for 15 min at 4 °C and pelleted cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 300 mM NaCl) plus 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ lysozyme and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). The cell suspension was let stand for 30 min at 4 °C followed by sonication. Clarification was performed twice by centrifugation at 27 000 *g* for 40 min at 4 °C. The XfSurE protein purification was performed in a single chromatography step using a Ni-NTA column (Qiagen, Hilden, Germany) equilibrated with buffer A. The purified XfSurE protein was eluted with five column volumes of buffer A containing 250 mM imidazole and the degree of purity was estimated by SDS-PAGE. Subsequently, the purified XfSurE was dialyzed in buffer B (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol). All chemical reagents used were of the highest commercially available grade.

CD

CD spectra of the purified XfSurE protein were measured using a Jasco J-810 Spectropolarimeter dichrograph (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The far-UV CD spectra were generated at 24 °C using XfSurE protein at 6.5 μM in 5 mM Tris-H₂SO₄ buffer at pH 7.0. The assays were carried out using a 1 mm pathlength quartz cuvette, and 20 accumulations within the range 260–190 nm at a rate of 50 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ at 20 °C were recorded for the sample and averaged. Deconvolution and statistical analysis of the CD spectra were performed using the DICHROWEB server [36–38].

Size exclusion chromatography

To assess the oligomeric state of purified XfSurE, gel filtration chromatography was performed using a Superdex 200 HR10/30 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) prepacked column. After equilibration of the column with buffer B (48 mL), the sample was loaded at a flow rate of 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The Superdex column was calibrated using HMW and LMW calibration kits (GE Healthcare) as standard molecular weight markers.

Enzymatic assays

Assays with artificial substrate pNPP involving pH, cofactors and kinetics were performed at room temperature and the data were obtained spectrophotometrically at 410 nm. The phosphatase activity of SurE protein was screened against different phosphorylated substrates (amino acids, sugars, lipids and nucleosides). Kinetic experiments with four substrates (3'-AMP, 5'-AMP, 5'-dAMP and 5'-dGMP) were carried out aiming to understand the behaviour of XfSurE in the presence of these substrates. The phosphatase activity with natural substrates was measured at 620 nm by the release of free phosphate using the malachite green method [39]. The experiments were performed in 50 mM Hepes-Na buffer (pH 7.0) with 0.1 mM of Mn^{2+} . All the reactions were performed in quadruplicate and repeated three times using 2.5 μg (pNPP assays) and 1.5 μg (natural substrates assays) of fresh purified protein. Kinetic parameters were obtained using GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All substrates were purchased from Sigma Chemical.

SAXS data analysis and modelling

The samples of XfSurE were prepared with concentrations in the range 2.0–12.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in buffer B (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol). SAXS data were collected at the D02A-SAXS2 beamline of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas SP, Brazil) using a 2D position-sensitive MarCCD detector (Marresearch, Hamburg, Germany). The sample-to-detector distance was 1306.85 mm, and the X-ray wavelength was 1.488 Å. A momentum transfer interval $0.01 < q < 0.24$ (Å^{-1}) was covered, where $q = [(4\pi)/(\lambda)]\sin \theta$ and 2θ is the scattering angle. The scattering patterns were measured with a 3 min exposure time at 20 °C. For each concentration, five successive frames were recorded. Data reduction using FIT2D [40] included radial integration of the images collected and normalization to the intensity of the transmitted beam to build an average scattering curve. No radiation damage was observed. The average scattering curves underwent conventional Guinier approximation analysis to obtain R_g , the radius of gyration of the molecule and $I(0)$, the scattering intensity at zero angle, assuming Guinier's law $I(q) = I(0)\exp(-q^2(R_g^2)/3)$ for very small angles ($q < 1.3/R_g$) [41]. More accurate estimates for R_g and $I(0)$ were obtained by the indirect Fourier transform method as implemented in GNOM [42], which also calculates the distance distribution function $P(r)$, allowing assessment of the maximum intramolecular distance (D_{max}) and molecule anisometry. Examination of the Kratky plot [$q^2 I(q) \times q$], where the native state of a compact globular protein, has a characteristic profile, was employed as a tool to characterize the conformational state of the protein in solution [43,44]. An estimate for the molecular mass of the protein was obtained using a known

protein collected in the same experimental conditions as a standard for calibration and the equation $[Mc/I(0)]_{\text{protein}} = [Mc/I(0)]_{\text{standard}}$, where, for each species, M is the molecular mass, c is the concentration and $I(0)$ is the scattering intensity at the origin. This method is capable of providing molecular mass estimates with an error of approximately 10% [45]. The number of subunits (n) and thus the oligomeric state in solution was obtained from the known molecular mass of the protein monomer (P) and the relation $n = M/P$.

Ab initio dummy bead models were calculated from the experimental curves using DAMMIF, a faster version of DAMMIN [32]. Different point-group symmetries (P1, P2, P4 and P222) were imposed. The final low resolution 3D envelope representing the protein was generated by averaging twenty independent DAMMIF runs, with the software DAMAVER and DAMFILT [46] in the automatic mode. With the objective of clearer visualization, the average model was represented by a surface calculated using the software NCSMASK [47].

In parallel to the *ab initio* methods used to construct a low resolution envelope from the experimental curve, rigid-body modelling based on the homologous protein StSurE1 was carried out in an independent fashion. Translation and rotation movements of the protein subunits were performed using PYMOL (<http://www.pymol.org>). The discrepancy (χ) between the experimental data and the theoretical scattering curve computed for each possible model was assessed with the software CRY SOL [31]. Conventionally, the parameter χ provided by CRY SOL is used as a measurement of the goodness of fit to the experimental data. Structural alignments were carried out with SUPCOMB [48]. Calculation of interaction surface areas between subunits in oligomers was performed using the software AREAIMOL available in the CCP4 package [47]. First, the accessible surface area for each individual subunit (S_i , S_j) and the surface of the complex ($S_{i,j}$) were calculated. The interaction surface area was then obtained as half of the buried surface area, defined as: $S_i + S_j - S_{i,j}$.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Process 01/07533-7 and 05/03234-6). A. M. Saraiva, S. F. Tada, L. K. Rosselli-Murai, A. C. Pelloso and M. A. S. Toledo were supported by fellowships from FAPESP. M. A. Reis and D. R. S. Schneider received PhD fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We gratefully acknowledge Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) for beamline time, Professor Nilson Zanchin for providing CD espectral polarimeter facilities, and Professor Dagmar Stach-Machado and Luis A. Peroni (IB/Unicamp) for technical expertise on the

kinetics experiments. We are deeply indebted to Professor Carol Collins (IQ/Unicamp) for carefully reading the manuscript and assisting with language revision.

References

- Dow JM & Daniels MJ (2000) *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* **17**, 263–271.
- Lambais MR, Goldman MH, Camargo LE & Goldman GH (2000) A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* **3**, 459–462.
- Purcell AH & Hopkins DL (1996) Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 131–151.
- Pooler MR & Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr Microbiol* **31**, 377–381.
- Lee RF, Derrick KS, Beretta MJG, Chagas CM & Rosetti V (1991) Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Ind* **000**, 12–15.
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LM, Araya JE, Baia GS, Baptista CS *et al.* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature* **406**, 151–159.
- Mura C, Katz JE, Clarke SG & Eisenberg D (2003) Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurEalpha): an acid phosphatase with purine nucleotide specificity. *J Mol Biol* **326**, 1559–1575.
- Li C, Ichikawa JK, Ravetto JJ, Kuo HC, Fu JC & Clarke S (1994) A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* **176**, 6015–6022.
- da Silva Neto JF, Koide T, Gomes SL & Marques MV (2007) The single extracytoplasmic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. *J Bacteriol* **189**, 551–560.
- Li C, Wu PY & Hsieh M (1997) Growth-phase-dependent transcriptional regulation of the *pcm* and *surE* genes required for stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**, 3513–3520.
- Visick JE, Ichikawa JK & Clarke S (1998) Mutations in the *Escherichia coli surE* gene increase isoaspartyl accumulation in a strain lacking the *pcm* repair methyltransferase but suppress stress-survival phenotypes. *FEMS Microbiol Lett* **167**, 19–25.
- Riehle MM, Bennett AF & Long AD (2001) Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 525–530.

- 13 Proudfoot M, Kuznetsova E, Brown G, Rao NN, Kitagawa M, Mori H, Savchenko A & Yakunin AF (2004) General enzymatic screens identify three new nucleotidases in *Escherichia coli*. Biochemical characterization of SurE, Yfbr, and YjgG. *J Biol Chem* **279**, 54687–54694.
- 14 Reichard P (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**, 349–374.
- 15 Galperin MY, Moroz OV, Wilson KS & Murzin AG (2006) House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol* **59**, 5–19.
- 16 Gonçalves AMD, Rêgo AT, Thomaz M, Enguita FJ & Carrondo MA (2008) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of two crystal forms of stationary-phase survival E protein from *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**, 213–216.
- 17 Lee JY, Kwak JE, Moon J, Eom SH, Liong EC, Pedelacq JD, Berendzen J & Suh SW (2001) Crystal structure and functional analysis of the SurE protein identify a novel phosphatase family. *Nat Struct Biol* **8**, 789–794.
- 18 Zhang RG, Skarina T, Katz JE, Beasley S, Khachatryan A, Vyas S, Arrowsmith CH, Clarke S, Edwards A & Joachimiak A (2001) Structure of *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: a novel acid phosphatase. *Structure* **9**, 1095–1106.
- 19 Iwasaki W & Miki K (2007) Crystal structure of the stationary phase survival protein SurE with metal ion and AMP. *J Mol Biol* **371**, 123–136.
- 20 Pappachan A, Savithri HS & Murthy MRN (2008) Structural and functional studies on a mesophilic stationary phase survival protein (SurE) from *Salmonella typhimurium*. *FEBS J* **275**, 5855–5864.
- 21 Azzoni AR, Tada SF, Rosselli LK, Paula DP, Catani CF, Sabino AA, Barbosa JA, Guimarães BG, Eberlin MN, Medrano FJ *et al.* (2004) Expression and purification of a small heat shock protein from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* **33**, 297–303.
- 22 Catani CF, Azzoni AR, Paula DP, Tada SF, Rosselli LK, de Souza AP & Yano T (2004) Cloning, expression, and purification of the virulence-associated protein D from *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* **37**, 320–326.
- 23 Paula DP, Azzoni AR, Siqueira SF, Catani CF, Rosselli LK & de Souza AP (2003) Expression and purification of a putative H-NS nucleoid-associated protein from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* **32**, 61–67.
- 24 Rosselli LK, Oliveira CL, Azzoni AR, Tada SF, Catani CF, Saraiva AM, Soares JS, Medrano FJ, Torriani IL & Souza AP (2006) A new member of the aldo-keto reductase family from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Arch Biochem Biophys* **453**, 143–150.
- 25 Gounaris K, Selkirk ME & Sadeghi SJ (2004) A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol* **136**, 257–264.
- 26 Itoh R, Usami C, Nishino T & Tsushima K (1978) Kinetic properties of cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver. *Biochim Biophys Acta* **526**, 154–162.
- 27 Bretonnet AS, Jordheim LP, Dumontet C & Lancelin JM (2005) Regulation and activity of cytosolic 5'-nucleotidase II. A bifunctional allosteric enzyme of the haloacid dehalogenase superfamily involved in cellular metabolism. *FEBS Lett* **579**, 3363–3368.
- 28 Spychala J, Madrid-Marina V & Fox IH (1988) High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. *J Biol Chem* **263**, 18759–18765.
- 29 Walldén K, Stenmark P, Nyman T, Flodin S, Gräslund S, Loppnau P, Bianchi V & Nordlund P (2007) Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. *J Biol Chem* **282**, 17828–17836.
- 30 Putnam CD, Hammel M, Hura GL & Tainer JA (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* **40**, 191–285.
- 31 Svergun D, Barberato C & Koch MHJ (1995) CRY-SOL – a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* **28**, 768–773.
- 32 Svergun D (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* **76**, 2879–2886.
- 33 Goodsell DS & Olson AJ (2000) Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 105–153.
- 34 Liang JY, Zhang Y, Huang S & Lipscomb WN (1993) Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2132–2136.
- 35 Monod J, Wyman J & Changeux JP (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**, 88–118.
- 36 Whitmore L & Wallace BA (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668–W673.
- 37 Whitmore L, Janes RW & Wallace BA (2006) Protein Circular Dichroism Data Bank (PCDDDB): data bank and website design. *Chirality* **18**, 426–429.
- 38 Whitmore L & Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400.
- 39 Geladopoulos TP, Sotiroidis TG & Evangelopoulos AE (1991) A malachite green colorimetric assay for

- protein phosphatase activity. *Anal Biochem* **192**, 112–116.
- 40 Hammersley AP, Svensson SO, Hanfland M, Fitch AN & Häusermann D (1996) Two-dimensional detector software: from real detector to idealised image or two-theta scan. *High Press Res* **14**, 235–248.
- 41 Glatter O & Kratky O (1982) *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press Inc. (London) Ltd., London.
- 42 Svergun D (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* **25**, 495–503.
- 43 Semisotnov GV, Kihara H, Kotova NV, Kimura K, Amemiya Y, Wakabayashi K, Serdyuk IN, Timchenko AA, Chiba K, Nikaido K et al. (1996) Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* **262**, 559–574.
- 44 Doniach S (2001) Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering. *Chem Rev* **101**, 1763–1778.
- 45 Mylonas E & Svergun DI (2007) Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. *J Appl Crystallogr* **40**, s245–s249.
- 46 Volkov VV & Svergun D (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* **36**, 860–864.
- 47 CCP4 (2002) High-throughput structure determination. Proceedings of the 2002 CCP4 (Collaborative Computational Project in Macromolecular Crystallography) Study Weekend, January, 2002, York, United Kingdom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1897–1970.
- 48 Kozin MB & Svergun D (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Crystallogr* **34**, 33–41.
- 49 Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R et al. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **21**, 2947–2948.
- 50 Nicholas HB, Nicholas KB Jr & Deerfield DW (1997) Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW NEWS* **4**, 14.
- 51 McGuffin LJ, Bryson K & Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405.

Supporting information

The following supplementary material is available:

Fig. S1. Stereoview defining the dihedral angle.

Fig. S2. The parameter χ as a function of the translation and rotation movements.

This supplementary material can be found in the online version of this article.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

SUPPORTING INFORMATION

Functional and Small-Angle X-ray Scattering Studies of a New Stationary Phase Survival Protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa*: Evidence of Allosteric Behaviour.

*Saraiva, Antonio*¹; *Reis, Marcelo*^{2,3}; *Ferreira, Susely*¹; *Rosselli, Luciana*¹; *Schneider, Dilaine*¹; *Peloso, Alexandre*¹; *Toledo, Marcelo*¹; *Giles, Carlos*³; *Aparicio, Ricardo*²; *de Souza, Anete*¹

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil

²Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil

³Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil

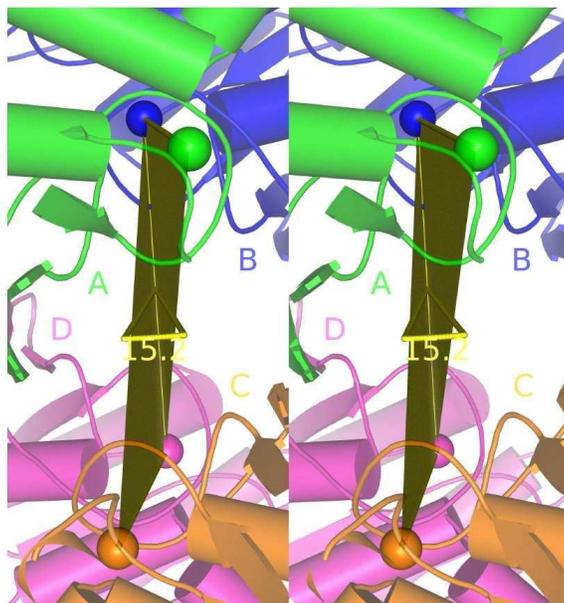


Fig. S1: Stereoview defining the dihedral angle between the plane formed by Asp8 C_{α} in protomers ABD and the plane formed by Asp8 C_{α} in protomers BCD (StSurE1). The α -carbons are shown as spheres and the protomers in different colours. Figures were generated with PyMOL (<http://www.pymol.org>) under Linux.

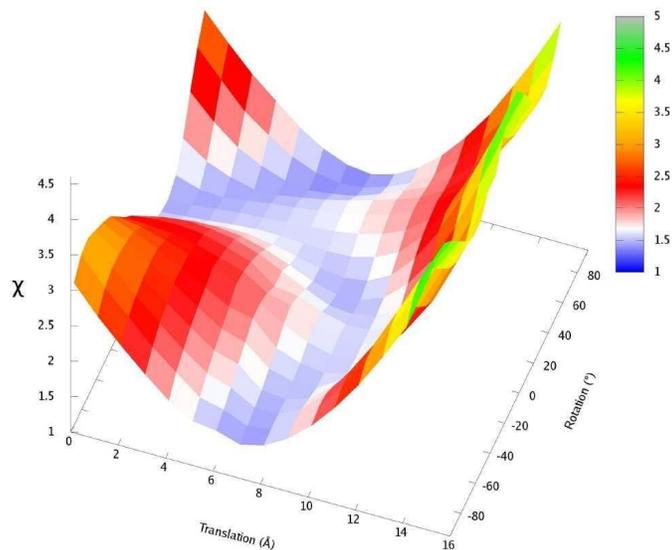


Fig. S2: The parameter χ as a function of the translation and rotation movements involved in the rigid-body modelling described in the text. For each configuration, the discrepancy χ of the theoretical scattering curve from the experimental data was computed with CRY SOL (see *Experimental Procedures*). The central local minimum with coordinates 7.5 Å and +25° was referred to as StSurEm in the text.

5. Resultados Complementares

5.1. Proteína XfSurE

5.1.1. Clonagem, expressão e purificação

Conforme descrito no manuscrito, a *orf XF0703* foi clonada em pET29a, expressa em *E. coli* BL21(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. A figura 6 mostra o produto da amplificação (cerca de 800 bp) da respectiva *orf* a ser clonada em pET28a e pET29a.

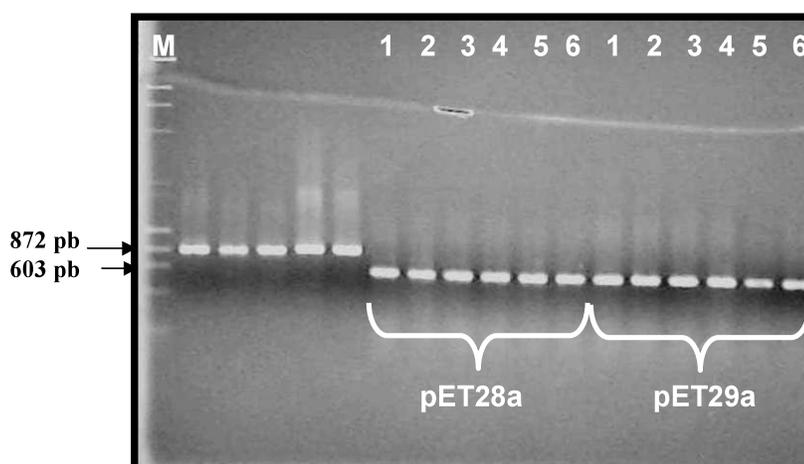


Figura 6. Gel de agarose 1%. Produto de amplificação por PCR da *orf XF0703* a ser clonada no pET28a e pET29a, respectivamente. Legenda: M = Marcador λ HindIII/ ϕ XHaeIII, 1-6 = temperatura de anelamento utilizada (gradiente), sendo 1 - 48°C; 2 - 50,2°C; 3 - 52,1°C; 4 - 55,5°C; 5 - 58,7°C e 6 - 60,5°C.

Como o processo de clonagem e sequenciamento do inserto foi obtido de uma forma mais rápida em pET29a, decidiu-se prosseguir os experimentos envolvendo este vetor. Posteriormente, averigou-se que o rendimento da purificação da proteína recombinante derivada deste vetor foi muito bom e, portanto, não se continuou os trabalhos com o pET28a.

No que se refere à expressão e à purificação da proteína XfSurE, a Figura 7 sumariza as melhores condições encontradas já descritas no manuscrito. Obteve-se a proteína solúvel expressa no tempo de indução de 20 horas (T_{20}), sendo que a mesma eluiu relativamente pura nas frações de 250 (I_{250}) e 500 mM (I_{500}) de imidazol.

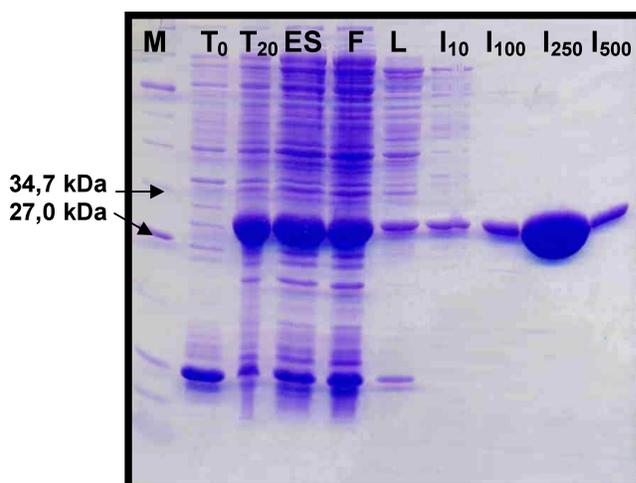


Figura 7. Gel de SDS 12%. Expressão e purificação de XfSurE. Legenda: M = Marcador de peso molecular para proteínas (New England Biolabs). T_0 = tempo de indução de 0 horas (sem indução), T_{20} = tempo de indução de 20 horas, ES = extrato solúvel bacteriano, F = *flow through*, L = lavagem da resina com tampão de extração e I_n = tampão de extração com imidazol (10, 100, 250 e 500 mM) para purificação da proteína.

5.1.2. Dicroísmo Circular

Complementando os resultados de dicroísmo circular apresentados no manuscrito, outros ensaios foram realizados com a proteína XfSurE em três diferentes pHs e com adição de cofator e inibidor. Os resultados estão representados nas Figuras 8 e 9 e nas tabelas II e III.

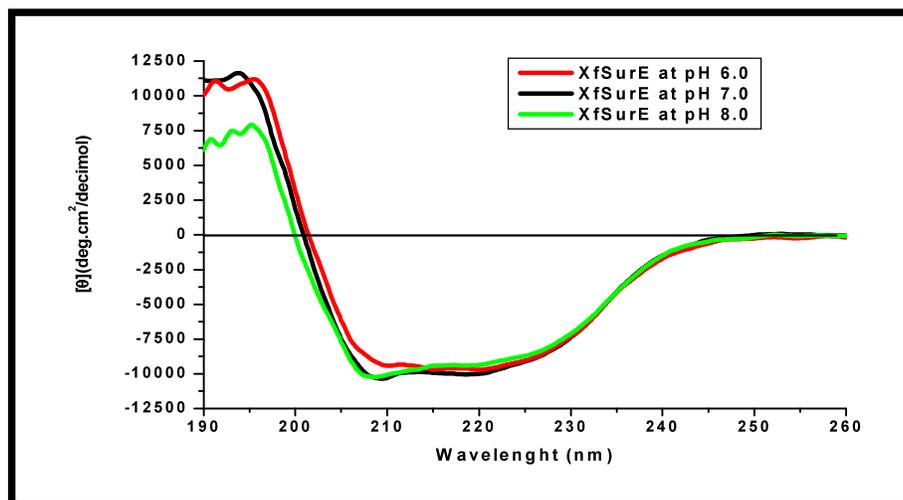


Figura 8. Espectros de dicroísmo circular de XfSurE em três diferentes pHs

Tabela II. Dados de deconvolução de dados de dicroísmo circular obtidos pelo *software* CDSSTR da proteína XfSurE em três diferentes pHs

Condição	Hélice- α (%)	Folhas- β (%)	Outros (%)
PSI-PRED	29	20	51
pH 6,0	31	21	48
pH 7,0	31	20	49
pH 8,0	33	15	52

Avaliando-se o perfil de estrutura secundária da proteína em diferentes pHs, nota-se que não há uma grande variação entre os pHs 6,0 e 7,0. No entanto, em pH alcalino, verifica-se que há uma certa perda de estrutura (principalmente em folhas-betas). Tais dados condizem com resultados obtidos nos ensaios de atividade mostrados no manuscrito, onde XfSurE apresenta maior atividade em pH neutro ou levemente ácido e perde mais de 50% de sua atividade em pH alcalino

(8,0), provavelmente devido a essa leve desnaturação que a proteína sofre neste ambiente.

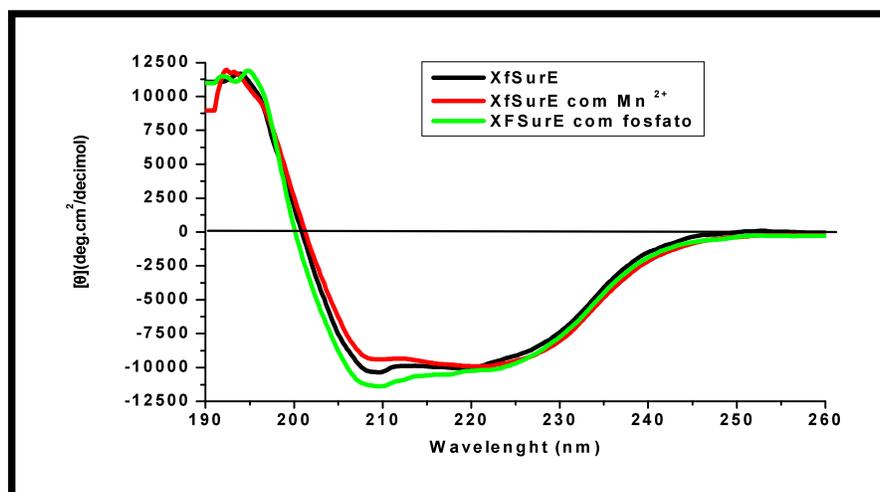


Figura 9. Espectros de dicroísmo circular de XfSurE em pH 7,0 com a adição do cofator (manganês) e inibidor (fosfato inorgânico)

Tabela III. Dados de deconvolução de dados de dicroísmo circular obtidos pelo *software* CDSSTR da proteína XfSurE com a adição do cofator (manganês) e inibidor (fosfato inorgânico)

Condição	Hélice-alfa (%)	Folhas-β (%)	Outros (%)
PSI-PRED	29	20	51
XfSurE	31	20	49
XfSurE + Mn ²⁺	33	18	49
XfSurE + PO ₄ ³⁻	34	15	51

Em relação à adição do cofator, observou-se uma pequena diferença com a presença do cofator natural (o manganês) onde a proteína apresenta um maior enovelamento em hélice-alfa e perda em folha-beta. Já na presença do inibidor, o

fosfato, o qual é o produto da reação a qual a enzima catalisa, nota-se uma perda da estrutura em folha-beta e um acréscimo em estrutura em hélice-alfa. Estes dados também condizem com os ensaios de inibição com este íon, onde a proteína é parcialmente inibida na presença do mesmo (dados não mostrados).

5.1.3. Obtenção de cristais

Após a obtenção da proteína XfSurE recombinante derivada do pET29a, a mesma foi concentrada até obter uma solução de 5,5 e 11 mg/mL (contendo o íon manganês a 1 mM como cofator, sendo que na concentração de 5,5 mg/mL também foi acrescentado o substrato 3'-AMP a 10 mM) em tampão Tris-HCl 15 mM pH 8,0, NaCl 25 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM.

Screening inicial: Os experimentos foram realizados no laboratório robotizado de Cristalização de Proteínas do LNLS/CeBiME. Em cada condição, 3 gotas de cristalização foram originadas pela adição de 1 µL de solução protéica a 5,5 mg/mL (com e sem substrato) ou a 11 mg/mL (sem substrato) mais 1 µL de tampão referente a cada condição. Testaram-se 6 kits de cristalização a saber: Kit 1: Crystal Screen e Crystal Screen 2 (96 condições) – Hampton Research, Kit 2: Wizard I e II (96 condições) – Emerald BioSystems, Kit 3: PACT (96 condições) – Nextal/Qiagen, Kit 4: JCSG+ (96 condições) – Nextal/Qiagen, Kit 5: SaltRx (96 condições) – Hampton Research e Kit 6: Precipitant Synergy (64 condições) – Emerald BioSystems.

Após uma semana, cada condição foi visualizada utilizando uma lupa com luz polarizada para verificação da presença de cristais. A princípio, os maiores

Resultados Complementares

cristais foram obtidos nas condições, a saber: (A) formato de magnésio 200 mM pH 5,9 e 20% PEG 3350. (B) bis-tris-propano 100 mM pH 7,5; 20% PEG 3350 e NaI 200 mM. (C) tampão bis-tris-propano 100 mM pH 7,5; 20% PEG 3350 e NaNO_3 200 mM (Figura 10).

Foi possível constatar um reagente “padrão” de cristalização, o precipitante PEG 3350. No entanto, na condição A apareceram cristais em adição de sal e em pH ácido enquanto que as condições B e C são praticamente idênticas, pois se variou apenas o sal. É importante salientar que, para as três condições, apareceram cristais nas duas concentrações de proteínas utilizadas

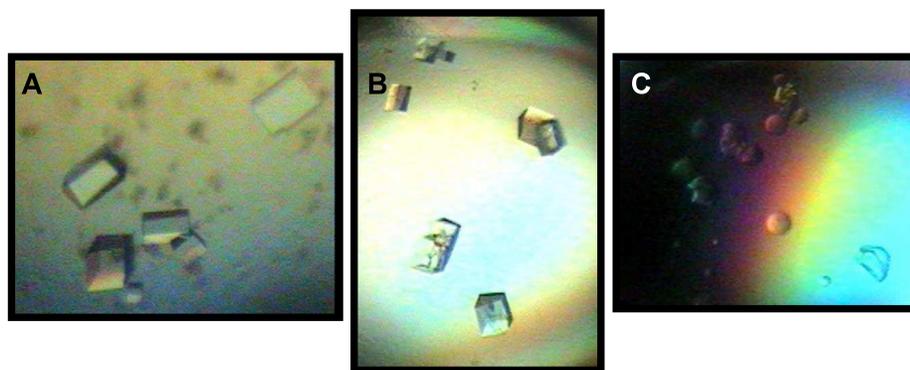


Figura 10. Cristais de XfSurE obtidos em diferentes condições. (A) formato de magnésio 200 mM pH 5,9 e 20% PEG 3350. (B) bis-tris-propano 100 mM pH 7,5; 20% PEG 3350 e NaI 200 mM. (C) tampão bis-tris-propano 100 mM pH 7,5; 20% PEG 3350 e NaNO_3 200 mM.

Observa-se que, por exemplo, na condição B, os cristais aparecem germinados (tamanho de 150 μm) enquanto que na condição C, os cristais são menores (50 μm) e não tem uma forma definida. Portanto, partiu-se para a etapa de refinamento onde, para todas as condições, fez-se uma varredura fina de

Resultados Complementares

concentração de PEG (de 15 % a 30 %). Em relação à condição A, fez uma screening variando a concentração de formato (50 a 400 mM) e o pH (4,5 a 6,5) e, adicionou-se sal (iodeto de sódio) para verificar se havia a formação de cristais.

Para as condições B e C, o procedimento foi semelhante: uma varredura fina na concentração e pH do tampão bis-tris-propano (50 a 200 mM e pH entre 6,5 a 9,5) e mudança na força iônica do sal (0 a 280 mM de iodeto de sódio ou nitrato de sódio). Com estes procedimentos, notou-se uma considerável melhora na quantidade e na qualidade dos cristais nas condições A e B, sendo que alguns deles obtidos nestas condições são mostrados na Figura 11.

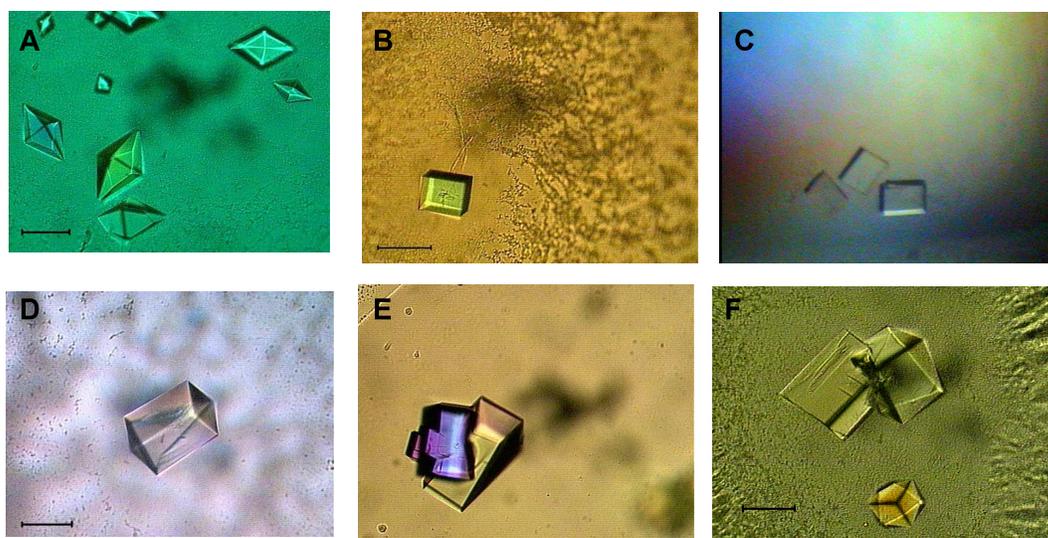


Figura 11. Cristais obtidos após o refinamento das condições iniciais. Os cristais da figura A são derivados da condição A e os cristais da figuras B, C, D, E e F são derivados da condição B. A figura C é na presença do substrato 3'-AMP. A escala à esquerda indica o tamanho de 100 μm .

5.1.4. Coleta de dados

Após o refinamento das condições de cristalização, foram obtidos vários cristais de boa qualidade, os quais tinham tamanho suficiente para serem utilizados na linha de difração por raios X; exceção feita à condição C (possui nitrato de sódio como sal) onde os cristais eram mal formados e pequenos. Adicionalmente, um problema encontrado nesta etapa foi encontrar um crioprotetor ideal, visto que, uma vez submersos no tampão de cristalização contendo um determinado crioprotetor, a maioria dos cristais “trincavam” e, conseqüentemente, o resultado da coleta de dados não era bom.

Após o teste com diversos crioprotetores e diversas concentrações dos mesmos, observou-se que o glicerol, apesar de não ser o crioprotetor ideal, gerava menos danos à estrutura do cristal. Os cristais obtidos na condição A (na presença do sal de formato) não difratavam muito bem, porém um bom conjunto de dados foi obtido de um cristal proveniente de uma condição derivada de B, a saber: tampão bis-tris-propano pH 7,5 100 mM, 20% PEG 3350 e NaI 140 mM na presença de glicerol 15% como crioprotetor.

Nesta coleta obteve-se uma boa difração do cristal sendo que a redução dos dados se encontra na tabela IV, onde podemos destacar o grupo de espaço encontrado (C2), os parâmetros da célula unitária ($a = 172.36 \text{ \AA}$, $b = 84.18 \text{ \AA}$, $c = 87.24 \text{ \AA}$ e $\alpha=90,0^\circ$, $\beta=96,59^\circ$ e $\gamma=90,0^\circ$) e a resolução (57 a 1,93 \AA). Adicionalmente, a imagem da coleta de difração do cristal por raios X na linha MX-2 do LNLS encontra-se na Figura 12.

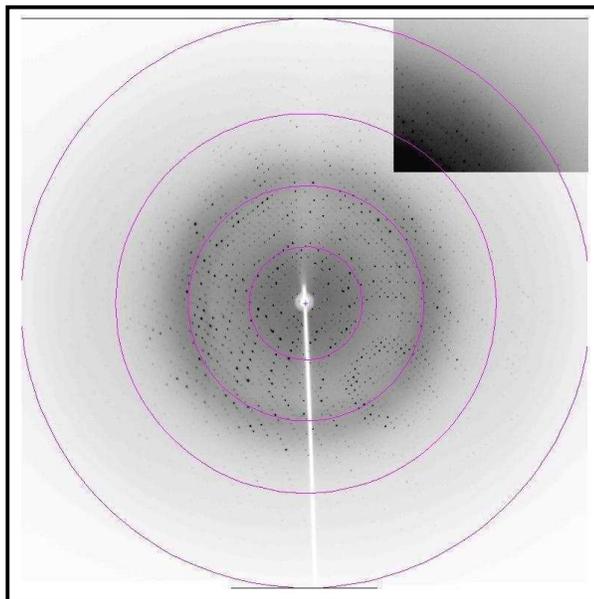


Figura 12. Coleta de difração por raios X do cristal de XfSurE. Acima à direita, uma sobreposição da região de alta resolução.

Tabela IV. Redução de dados obtidos a partir da coleta do cristal de XfSurE. Os valores em parênteses indicam os dados da camada de mais alta resolução

Grupo de espaço	C2
Parâmetros da célula unitária (Å, °)	a=172.36 b=84.18 c=87.24 α= 90,0 β=96,59 γ =90,0
Resolução (Å)	57-1.93
Resolução na última camada (Å)	2.03-1.93
Número de imagens	330
Reflexões observadas	412918 (52628)
Reflexões únicas	92203 (12675)
Multiplicidade	4.5 (4.2)
Completeza (%)	98.9 (93.3)
R_{merge}	6.0 (45.2)
Média $\ I/I\ $	17.3 (2.5)
Wilson plot B-Factor (Å ²)	30.9

Após a análise e compilação dos dados e imagens obtidos, iniciou-se a etapa de modelamento da estrutura tridimensional de XfSurE nativa, ou seja, sem a presença do cofator e do substrato. Foi feita uma substituição molecular utilizando o programa Balbes, onde se obteve um bom acordo com a estrutura de AaSurE de *Aquifex aeolicus*. Atualmente, a determinação da estrutura se encontra na fase de refinamento e espera-se que, com dados coletados, seja possível terminar a determinação de estrutura tridimensional de XfSurE.

5.2. Proteína XfVirJ

5.2.1. Expressão e purificação

A proteína XfVirJ foi expressa nos vetores de expressão pET28a(TEV) (acrescenta uma cauda de polihistidina no N-terminal), pETSUMOpro (apresenta uma proteína de fusão SUMO (27 kDa) que aumenta a solubilidade) e pSV282 (possui uma *maltose binding protein* (44 kDa) que também aumenta a solubilidade). Os resultados obtidos são indicados na Figura 13 (A e B).

Como se pode observar na Figura 13, houve a expressão da proteína na fração solúvel. Todavia, houve apenas a expressão da proteína na fração solúvel no vetor pSV282, cuja proteína recombinante possui 75 kDa. Houve uma considerável expressão nos outros vetores, mas na fração insolúvel (30 kDa para pET28a e 57 kDa para pETSUMO). Observou-se que o melhor tempo de indução para todos os vetores foi de 4 horas.

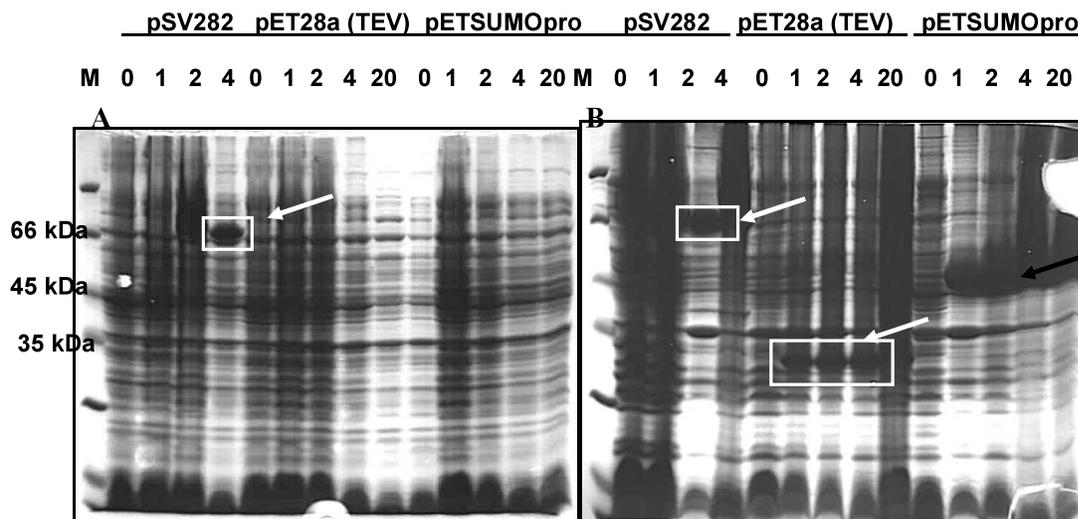


Figura 13. Gel de SDS-PAGE 12%. Expressão da proteína XfVirJ em *E. coli* em diferentes vetores de expressão e com diferentes tempos de indução. **(A)** Fração solúvel e **(B)** fração insolúvel. A legenda acima indica o vetor e o tempo de indução utilizado. A seta e o retângulo branco indica a proteína recombinante produzida em cada vetor.

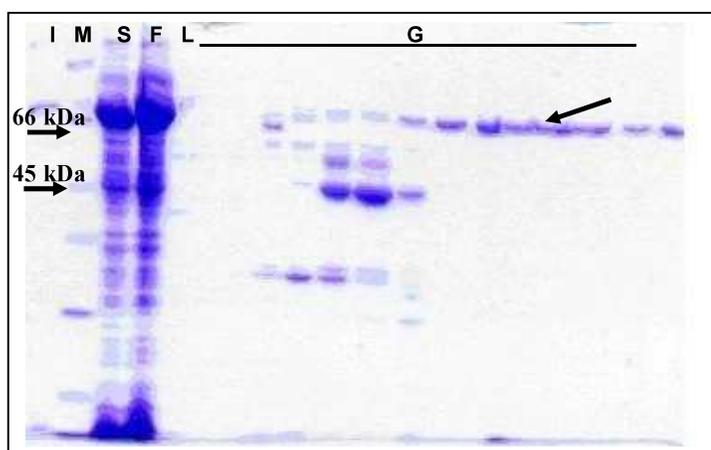


Figura 14: Gel SDS-PAGE 12%. Cromatografia de Afinidade ao níquel para proteína XfVirJ clonada no vetor pSV282. Legenda: I = fração insolúvel da amostra, M = marcador PMW (Fermentas), S = fração solúvel da amostra, F = *flow through*, L = lavagem com tampão com 1 M de NaCl, G = eluição com tampão com gradiente crescente de imidazol. A seta indica a proteína purificada.

A proteína foi produzida em larga escala em *E.coli* BL21(DE3) (2 litros de cultura) e purificada no sistema FPLC. Como se observa na Figura 14, uma considerável quantidade de proteína purificada (75 kDa) foi obtida, indicando que a cromatografia de afinidade ao níquel foi eficiente.

5.2.2. Clivagem

Com a obtenção da proteína purificada, partiu-se para os ensaios de clivagem da proteína recombinante. Apesar da grande quantidade de proteína obtida durante a purificação, a etapa de clivagem revelou-se como um grande gargalo para a obtenção da proteína sem a MBP (maltose binding protein), a proteína fusionada quando se utiliza este vetor. Nos primeiros testes de clivagem, onde se avaliou a quantidade de protease, temperatura e tempo, não se obteve sucesso.

Também foram realizados ensaios com a proteína desnaturada por temperatura, para verificar se a fusão com a *maltose binding protein* não estaria encobrindo o sítio de clivagem para a protease TEV. Tais testes também resultaram na não clivagem da proteína de interesse.

Outras condições podem ser analisadas para que se consiga, mesmo que parcialmente, a clivagem da proteína recombinante. Provavelmente, devido ao grande tamanho da proteína de fusão, o sítio de clivagem esteja sendo encoberto e mesmo com a desnaturação por temperatura, o sítio permaneça não sendo exposto. Tal limitação pode ser ultrapassada utilizando-se outros agentes desnaturantes. No entanto, é preferível trabalhar com a proteína em condições

nativas e, para tanto, é necessário encontrar uma maneira de clivar a proteína de fusão em condições nativas.

5.3. Proteína XfFnE

5.3.1. Expressão e purificação

A partir da confirmação da presença do inserto de interesse no vetor pSV282, células da linhagem de expressão de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas. Foi realizado um teste de expressão da proteína de interesse utilizando-se 100 mL de meio de cultura e 10 mL do mesmo tampão de extração. A expressão da proteína de interesse foi induzida por 4 horas, visto que tal período mostrou-se suficiente para a obtenção de quantidade satisfatória da proteína de interesse (Figura 15A).

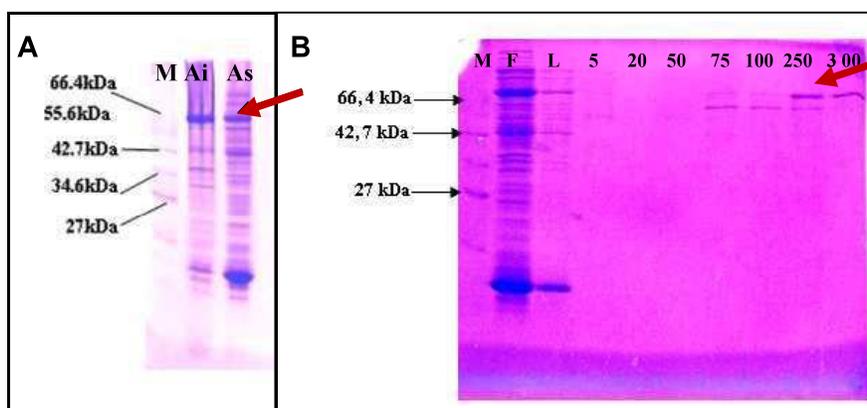


Figura 15. SDS-PAGE 12%. Expressão e purificação de XfFnE. **(A):** Teste de expressão para a proteína XfFnE. O tempo de indução da proteína foi de 4 horas. A proteína de interesse (69,26 kDa) está indicada pela seta vermelha. Legenda. M: marcador Broad Range (New England BioLabs), Ai = amostra insolúvel, As: = amostra solúvel. **(B):** SDS-PAGE 12%. Cromatografia de afinidade ao níquel para purificação da proteína XfFnE. Legenda. M = marcador PMW (Fermentas). F = *flow through*; L = lavagem; 5, 20, 50, 70, 100, 200 e 300 = eluição com a respectiva concentração de imidazol em mM.

A proteína de interesse foi expressa e obtida em ambas as frações: solúvel e insolúvel (Fig. 15A). Subseqüentemente, a fração solúvel do processo de extração foi submetida ao processo cromatográfico de afinidade em resina de níquel em colunas de gravidade (Figura 15B).

O processo de purificação não apresentou bons resultados para a proteína XfFnrE, pois grande parte da proteína de interesse foi eliminada no *flowthrough* indicando uma baixa afinidade desta pela resina carregada com Ni⁺². Em decorrência desta baixa afinidade, pequena quantidade da proteína de interesse foi obtida nas frações de eluição com um grau de pureza satisfatório. Tais frações correspondem às alíquotas de 250 e 300 mM de imidazol (Figura 12B).

A proteína de interesse foi obtida na fração solúvel e capturada por cromatografia de afinidade por níquel e amilose. Contudo a remoção da proteína de fusão (MBP - Maltose Binding Protein) utilizando-se a protease TEV (Tobacco Etch Virus) apresentou baixo rendimento dificultando a obtenção da proteína de interesse purificada.

Tendo-se em vista o sucesso que tem sido obtido com a metodologia de *refolding* com outras proteínas, esta técnica foi aplicada, na tentativa de solubilizar a proteína XfFnrE apenas com a S-tag, oriunda do pET29a. Seguindo-se a mesma metodologia, não foi possível obter a proteína XfFnrE na fração solúvel. Contudo, a adição de 10 mM de DTT ao extrato protéico presente na fração insolúvel, e a incubação deste por 2 horas antes do processo de desnaturação por uréia permitiu a solubilização da proteína de interesse (Figura 16).

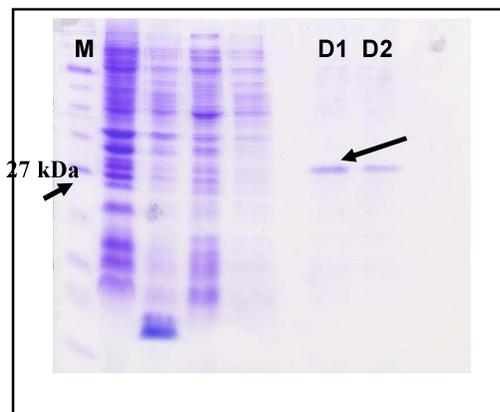


Figura 16. SDS-PAGE 12%. Processo de refolding para o produto protéico da *orf Xf1586*. M: Marcador Broad Range (New England Biolabs). D1 = primeira diálise, D2 = segunda diálise. XfFnE em pET29:

Como pode ser observado no SDS-PAGE apresentado a proteína XfFnE foi solubilizada pelo método de *refolding* utilizando-se desnaturação por uréia e reenovelamento por dois passos de diálise contra o tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl). Atualmente, novos experimentos envolvendo a técnica de dicroísmo circular estão sendo realizados de modo a averiguar se a proteína, após o processo de *refolding*, se encontra enovelada.

6. Discussão

Os dados gerados pelo seqüenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa* forneceram vários subsídios para o entendimento do seu metabolismo e patogenicidade. No presente trabalho, os maiores esforços foram concentrados na caracterização da nucleotidase SurE deste microrganismo.

O gene *surE* de *Xylella*, correspondente à *orf XF0703*, foi clonado em vários vetores de expressão. No entanto, os melhores resultados de expressão e de purificação da proteína recombinante foram obtidos no vetor pET29a, o qual adiciona 8 resíduos de aminoácidos (incluindo uma His-Tag) na região C-terminal da proteína.

A proteína XfSurE expressa neste vetor, apresentou-se altamente solúvel e foi obtida com alto grau de pureza por cromatografia de afinidade ao níquel. Tal facilidade permitiu que os ensaios cinéticos fossem realizados no mesmo dia da purificação da proteína, não afetando, portanto, a atividade da mesma, uma vez que fora constatado que XfSurE perdia parcialmente sua atividade quando armazenada em geladeira ou freezer.

Uma característica desvendada de XfSurE foi o seu estado oligomérico, sempre controverso em diversos organismos. Foi determinado, através de duas diferentes técnicas (SAXS e cromatografia de gel filtração), que XfSurE é um tetrâmero. Com base nas informações estruturais de outras SurEs, este tetrâmero é formado pela junção de dois dímeros (AB e CD) que se ligam entre si (AD e BC) através de folhas-betas laterais responsáveis pela tetramerização.

Os ensaios de cinética com o substrato artificial pNPP revelaram que XfSurE apresenta características similares a SurEs de organismos mesófilos (EcSurE e StSurE). As três proteínas SurEs possuem maior atividade em pH neutro, porém XfSurE e EcSurE apresentam maior afinidade ao metal manganês enquanto que StSurE tem o magnésio como melhor cofator. As SurEs de organismos extremófilos possuem características bem distintas seja por sua predileção por ambientes ácidos (TmSurE e PaSurE) ou alcalinos (TtSurE) seja por preferência de metal: magnésio (TmSurE e TtSurE) ou cobalto (PaSurE).

Sobre o comportamento cinético na presença deste substrato (pNPP), XfSurE apresentou um comportamento não-cooperativo ($h \approx 1$) e o valor de K_m de 3,12, próximos aos valores encontrados em EcSurE e StSurE.

No que se refere aos substratos naturais, vários compostos fosforilados foram testados (açúcares - glicose 6-fosfato, lipídeos - glicerol-fosfato, aminoácidos - serina e tirosina fosfatada, nucleosídeos - vide manuscrito), sendo que só houve atividade fosfatase para os nucleosídeos monofosforilados. Dentre eles, XfSurE apresentou maior afinidade para $3'\text{-AMP} > 5'\text{-GMP} > 5'\text{-dAMP} > 5'\text{-AMP}$. Não se observou uma clara predileção para deoxi ou ribonucleotídeos ou para a posição do fosfato (3' ou 5'), mas notou-se uma maior atividade para nucleosídeos purínicos em vista da menor atividade observada para citidinas monofosforiladas. Portanto, XfSurE é uma 5'(3')nucleotidase com atividade para uma ampla gama de substratos.

No contexto cinético, XfSurE apresentou um comportamento alostérico para os quatros substratos testados (3'-AMP, 5'-GMP, 5'-dAMP, 5'-AMP). O

coeficiente de Hill obtido para todos os substratos foi em torno de 2,6 (exceto para dGMP onde $h = 2,9$). Isso demonstra uma clara cooperatividade positiva, antes só observada em EcSurE para substratos polifosfatados ($h = 1,8$).

Sob o ponto de vista estrutural, a caracterização por SAXS permitiu a construção de envelopes à baixa resolução onde foram impostas várias simetrias. A melhor simetria obtida foi a 222 onde o valor de parâmetro χ foi de 1,65. A sobreposição do modelo 222 com a estrutura das SurEs já cristalizadas apresentou um bom ajuste (*fit*) indicando que, o envelope obtido independentemente destas estruturas, tem formato similar aos das proteínas já caracterizadas. Em relação aos valores de χ , StSurE apresentou o valor mais baixo ($\chi=2,04$), portanto é a estrutura que mais se aproxima dos dados experimentais obtidos.

Apesar desta boa sobreposição, observamos a existência de alguns espaços vazios que foram encontrados na lateral do envelope. Para preencher estes espaços, decidimos afastar os protômeros diagonais A e D de StSurE (que formam entre si a alça de tetramerização). Entretanto, isto também poderia implicar na perda da simetria 222, portanto, decidimos também rotacionar os dímeros AB para que a simetria se mantivesse. A Figura S1 do material suplementar do artigo mostra quais são as distâncias de afastamento e os graus de rotação permitidos, sem que se comprometa a estrutura da molécula. Valores de rotação muito altos foram descartados em vista de que tal fato exigiria uma alta flexibilidade destas alças. Uma estrutura intermediária, denominada StSurEm (afastamento de AD 7,5 Å e grau de rotação AB de 25°) apresentou uma melhor

correlação com o envelope obtido e, conseqüentemente, um menor valor de $\chi = 1,504$.

Outro parâmetro a ser considerado com estas modificações é a área de contato entre os dímeros AB e CD. Estas torções provocam uma maior área de contato entre os mesmos, diminuindo a área de acesso ao solvente. Uma suposição é que este fato pode dificultar o acesso do substrato ao sítio ativo.

Tais movimentos de afastamento e de rotação podem explicar o comportamento alostérico da proteína, onde a mesma em solução poderia estar em dois estados: T (tenso) ou R (relaxado) conforme descrito no modelo MWC e que, portanto, a ligação do substrato poderia induzir a conformação de um estado para outro.

A seguir, é apresentado na Figura 17, um modelo com algumas rotas metabólicas onde XfSurE pode agir. Sob o ponto de vista funcional, XfSurE pode atuar em diversas vias no metabolismo de *Xylella*. A regulação de fosforilação/desfosforilação de nucleosídeos compreende uma ampla gama de nucleosídeos quinases e nucleotidasas, respectivamente. Tais reações são de fundamental importância para que se mantenha o *pool* balanceado de cada desoxi/ribonucleosídeo para síntese de DNA e RNA. No genoma de *Xylella*, várias *orfs* foram classificadas como tendo estas funções, entre elas a XfSurE.

Como 5'-nucleotidase, XfSurE pode atuar na via de desfosforilação de diversos desoxi e ribonucleosídeos purínicos 5'-monofosforilados gerados a partir da degradação de DNA e RNA por DNAses e RNAses, respectivamente. Já como 3'-nucleotidase, ela pode agir sobre o 3'-nucleosídeos liberados a partir da

degradação de RNA por tipos específicos de RNAses (RNase F ou RNase T1). Os ribonucleosídeos 3'-monofosfatados, uma vez desfosforilados, podem ser novamente fosforilados na posição 5' por nucleosídeos quinases e assim, serem utilizados para a síntese de RNA e DNA. Além disso, embora com menor afinidade, XfSurE também pode agir na desfosforilação de citosinas monofosfatadas geradas nos processos mencionados acima.

Como EcSurE, a nucleotidase XfSurE é inibida por nucleosídeos trifosfatados (5'-ATP), isso pode refletir que em situações nas quais a célula possui uma ampla fonte de energia, esta enzima não esteja ativa. Porém, no contexto contrário, onde a quantidade de ATP na célula é baixa, XfSurE pode atuar na desfosforilação de AMPs para que estes sejam posteriormente convertidos em ATP. É importante ressaltar, que a própria hidrólise do ATP, cuja reação é utilizada em diversos processos enzimáticos, tem como subproduto, o adenilato (5'-AMP), o qual também é substrato para a enzima. Outra situação em que esta enzima pode atuar, é na desfosforilação do guanilato (5'-GMP), gerado a partir da degradação do mensageiro secundário 5'-di-GMP, molécula presente no metabolismo de *Xylella*. Outra rota de atuação é sobre guanilatos e adenilatos produzidos a partir da conversão de 5'-IMP em etapas de síntese e recuperação de nucleosídeos.

Por fim, outra via de atuação de XfSurE é na desfosforilação de nucleosídeos não-canônicos. Ensaio preliminares (dados não mostrados) mostram que XfSurE é bastante ativa contra 8'-bromoadenosina e 8'-bromoguanosina monofosfatadas. É necessário, no entanto, a realização de

experimentos de cinética enzimática para os respectivos substratos. Tais substratos são frequentemente produzidos em situações de estresse da bactéria, onde há uma intensa produção de metabólitos indesejáveis à célula e podem se tornar mais uma classe de substratos de XfSurE.

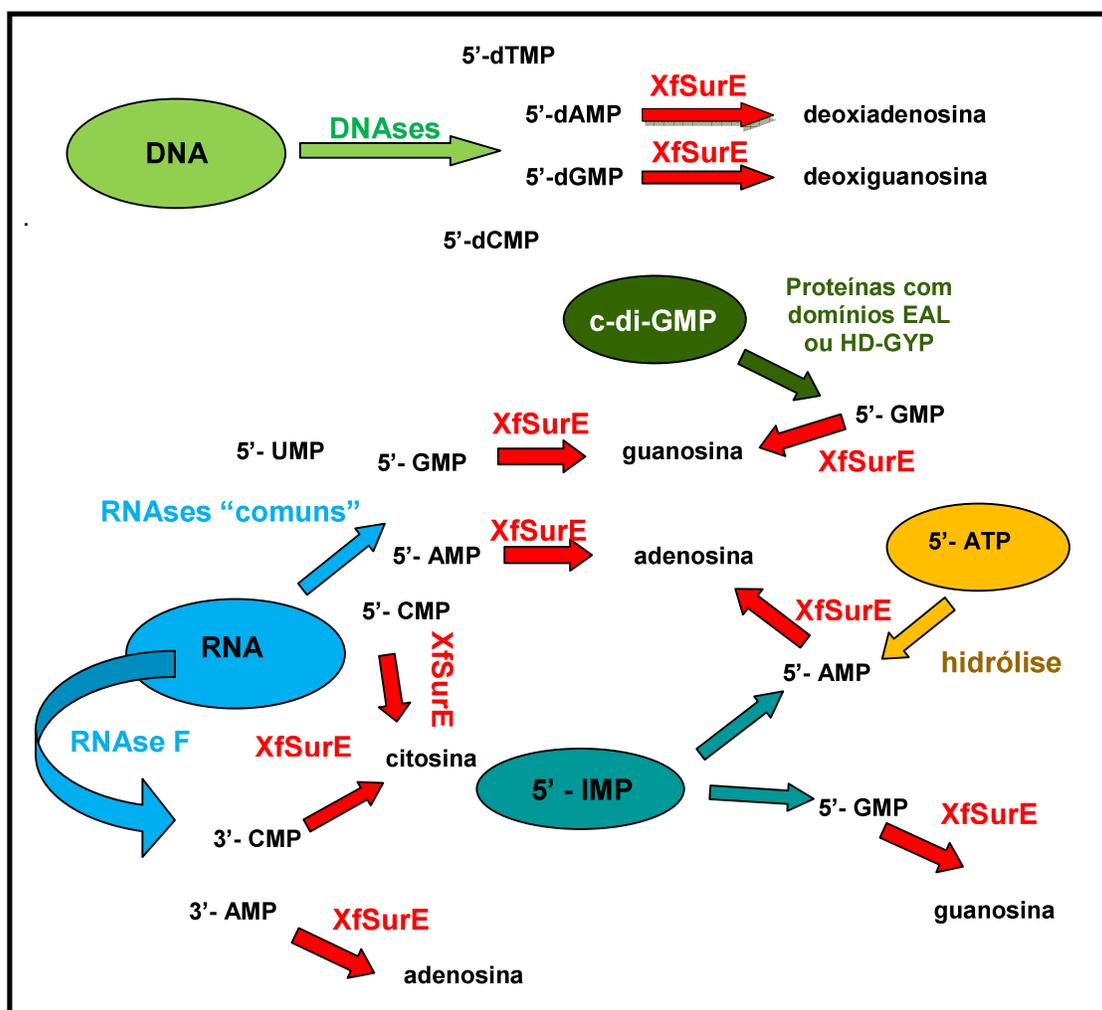


Figura 17. Esquemática de algumas vias metabólicas e de alguns substratos sobre os quais XfSurE pode atuar.

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível a obtenção das seguintes conclusões a partir da proteína XfSurE super expressa em *E. coli*.

(1) É produzida na forma solúvel e purificada com um alto grau de pureza;

(2) É uma proteína relativamente estável e enovelada;

(3) Encontra-se na forma tetramérica em solução;

(4) Possui atividade de 5'(3') nucleotidase, confirmando a sua predição no genoma de *Xylella*. Também é proteína multifuncional, atuando sobre diversos nucleosídeos monofosforilados, especialmente, o 3'-AMP

(5) XfSurE apresenta características alostéricas com substratos naturais. O coeficiente de Hill encontrado foi em torno de 2,6 indicando uma alta cooperatividade positiva.

(6) A utilização da técnica de SAXS permitiu a aquisição de diversas informações estruturais como raio de giro e a distância máxima intramolecular. O modelo de envelope indicou maior *fit* com a estrutura de StSurE de *Salmonella*. No entanto, espaços vazios neste envelope podem indicar que a proteína realiza certos movimentos como afastamento das alças de tetramerização e a rotação de um dos dímeros. Tais movimentos podem estar diretamente relacionados ao comportamento alostérico da proteína.

(7) Esta é a primeira de caracterização enzimática e estrutural de uma SurE de um organismo fitopatógeno e a primeira SurE a ter um modelo a baixa resolução definido, o que permitiu vincular as propriedades enzimáticas com a estrutura a baixa resolução resolvida por espalhamento de luz a baixo ângulo

8. Perspectivas

8.1. Para todas as proteínas

- Ensaio de detecção da proteína por anticorpos específicos em ensaios *in vitro* de *Xylella* em meio de cultura e de expressão gênica através de PCR Real Time em condições *in vitro* e *in vivo* (bactéria inoculada na planta).

8.2. Proteína XfSurE

- Término da resolução da estrutura tridimensional;
- Obtenção de cristais na presença de substrato (3'-AMP, 5'-AMP) e do inibidor (5'-ATP);
- Experimento de SAXS envolvendo cofatores e substratos,
- Ensaio de atividade com substratos não-canônicos (5'-XMP, 5'-TMP...);
- Utilização da técnica de fluorescência ou calorimetria para observar mudança no sítio ativo na presença de substrato;

8.3. Proteína XfVirJ

- Clonagem da *orf XfVirJ* no vetor pSV278 (adiciona cauda de MBP porém possui sítio de clivagem para trombina);
- Expressão, purificação e clivagem da proteína recombinante;
- Ensaio de dicroísmo circular e SAXS

8.4. Proteína XfFnrE

- Ensaio de dicroísmo circular para avaliar a estrutura secundária da proteína após o processo de *refolding*;
- Teste de atividade de policetídeo sintase a partir dos extratos de proteína em *E. coli* com diversos substratos.

9. Referências Bibliográficas

- Alves, E., Marucci, C. R., Lopes, J. R. S. & Leite, B. (2004). Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology* 152(5): 291-297.
- Atkinson, D. E. (1976). Adaptations of enzymes for regulation of catalytic function. *Biochem Soc Symp* 41: 205-223.
- Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. & Daniels, M. J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* 24(3): 555-566.
- Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Reznik, G., Feil, H., Feil, W. S., Anderson, I., Bernal, A., D'Souza, M., Ivanova, N., Kapatral, V., Larsen, N., Los, T., Lykidis, A., Selkov, E., Walunas, T. L., Purcell, A., Edwards, R. A., Hawkins, T., Haselkorn, R., Overbeek, R., Kyrpides, N. C. & Predki, P. F. (2002). Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Research* 12(10): 1556-1563.
- Bibb, M. J., Sherman, D. H., Omura, S. & Hopwood, D. A. (1994). Cloning, sequencing and deduced functions of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide antibiotic frenolicin. *Gene* 142(1): 31-39.
- Bretonnet, A. S., Jordheim, L. P., Dumontet, C. & Lancelin, J. M. (2005). Regulation and activity of cytosolic 5'-nucleotidase II - A bifunctional allosteric enzyme of the Haloacid Dehalogenase superfamily involved in cellular metabolism. *Febs Letters* 579(16): 3363-3368.
- Burr, T. J., Hoch, H. C., Cursino, L., Li, Y. (2007). The role that different pili classes in *Xylella fastidiosa* play in colonization of grapevines and Pierce's disease pathogenesis: Chemosensory cluster controlling twitching motility. In *Pierce's Disease Research Symp. Proc.*:123-26. San Diego: Calif. Dep. Food Agric.

- Catani, C. F., Azzoni, A. R., Paula, D. P., Tada, S. F. S., Rosselli, L. K., de Souza, A. P. & Yano, T. (2004). Cloning, expression, and purification of the virulence-associated protein D from *Xylella fastidiosa*. *Protein Expression and Purification* 37(2): 320-326.
- Chagas, C. M., Rossetti, V. & Beretta, M. J. G. (1992). Electron-Microscopy Studies of a Xylem-Limited Bacterium in Sweet Orange Affected with Citrus Variegated Chlorosis Disease in Brazil. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 134(4): 306-312.
- Chang, C. J. & Walker, J. T. (1988). Bacterial leaf scorch of northern red oak - isolation, cultivation and pathogenicity of a xylem-limited bacterium. *Plant Disease* 72(8): 730-733.
- Chatterjee, S. & Sonti, R. V. (2002). rpfF mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(5): 463-471.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P. & Lindow, S. (2008). Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* 46: 243-271.
- Chatterjee, S., Wistrom, C. & Lindow, S. E. (2008). A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7): 2670-2675.
- Chiba, S., Ito, K. & Akiyama, Y. (2006). The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. *Molecular Microbiology* 60(2): 448-457.
- Christie, P. J. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology* 40(2): 294-305.
- Collet, J. F., Riemer, J., Bader, M. W. & Bardwell, J. C. A. (2002). Reconstitution of a disulfide isomerization system. *Journal of Biological Chemistry* 277(30): 26886-26892.
- Costa, H. S., Raetz, E., Pinckard, T. R., Gispert, C., Hernandez-Martinez, R.,

- Dumenyo, C. K. & Cooksey, D. A. (2004). Plant hosts of *Xylella fastidiosa* in and near southern California vineyards. *Plant Disease* 88(11): 1255-1261.
- da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M. C., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E. A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Clapina, L. P., Cicarelli, R. M. B., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J. S., Ferreira, R. C. C., Ferro, M. I. T., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F. M., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T. M., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A. D., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A. F., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I. D., dos Santos, M. T., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C. & Kitajima, J. P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417(6887): 459-463.
- D'Argenio, D. A. & Miller, S. I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology-Sgm* 150: 2497-2502.
- de Mello Varani, A., Souza, R.C., Nakaya, H.I., de Lima, W. C., Paula de Almeida, L., Kitajima, E. W., Chen, J., Civerolo, E., Vasconcelos, A. T., Van Sluys, M.A. (2008). Origins of the *Xylella fastidiosa* prophage-like regions and their impact in genome differentiation. *PLoS One*. 3(12):e4059.
- de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta, H. D., Caldana, C., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. & Machado, M. A. (2004). Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *Fems Microbiology Letters* 237(2): 341-353.
- Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 173-197.
- Dow, J. M. & Daniels, M. J. (2000). *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to
-

- plants. *Yeast* 17(4): 263-271.
- Dow, J. M., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & Ryan, R. P. (2006). The HD-GYP domain, cyclic Di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(12): 1378-1384.
- Dreier, J. & Khosla, C. (2000). Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the beta-ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer. *Biochemistry* 39(8): 2088-2095.
- Dubuisson, J. F., Vianney, A., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. & Lazzaroni, J. C. (2005). Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology-Sgm* 151: 3337-3347.
- el Kouni, M. H. (2003). Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology & Therapeutics* 99(3): 283-309.
- Feil, H., Feil, W. S. & Lindow, S. E. (2007). Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology* 97(3): 318-324.
- Fouhy, Y., Scanlon, K., Schouest, K., Spillane, C., Crossman, L., Avison, M. B., Ryan, R. P. & Dow, J. M. (2007). Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology* 189(13): 4964-4968.
- Fritschi, F. B., Lin, H. & Walker, M. A. (2007). *Xylella fastidiosa* population dynamics in grapevine genotypes differing in susceptibility to Pierce's disease. *American Journal of Enology and Viticulture* 58(3): 326-332.
- Frohme, M., Camargo, A. A., Heber, S., Czink, C., Simpson, A. J. D., Hoheisel, J. D. & de Souza, A. P. (2000). Mapping analysis of the *Xylella fastidiosa* genome. *Nucleic Acids Research* 28(16): 3100-3104.
- Galperin, M. Y., Moroz, O. V., Wilson, K. S. & Murzin, A. G. (2006). House cleaning, a part of good housekeeping. *Molecular Microbiology* 59(1): 5-19.
- Garret, R. H. & Grisham, C. M. (1995) 1st edition. Biochemistry. Saunders College Publishing. USA. pp. 352-423
- Gaurivaud, P., Souza, L. C. A., Virgilio, A. C. D., Mariano, A. G., Palma, R. R. &

Referências Bibliográficas

- Monteiro, P. B. (2002). Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9): 4658-4665.
- Giblett, E. R., Anderson, J. E., Cohen, F., Pollara, B. & Meuwisse, H. J. (1972). Adenosin-deaminase deficiency in 2 patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 2(7786): 1067-& .
- Goheen, A. C., Nyland, G. & Lowe, S. K. (1973). Association of a *Rickettsia*-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of disease in grapevines. *Phytopathology* 63(3): 341-345.
- Gonçalves, A. M. D., Rego, A. T., Thomaz, M., Enguita, F. J. & Carrondo, M. A. (2008). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of two crystal forms of stationary-phase survival E protein from *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 64: 213-216.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. (2000). Genomics. *In: An introduction to genetic analysis*. 7th edition. W. H. Freeman, New York, 860 p.
- Guilhbert, M. R. & Kirkpatrick, B. C. (2005). Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(8): 856-868.
- Hands, S. L., Holland, L. E., Vankemmelbeke, M., Fraser, L., Macdonald, C. J., Moore, G. R., James, R. & Penfold, C. N. (2005). Interactions of TolB with the translocation domain of colicin E9 require an extended TolB box. *Journal of Bacteriology* 187(19): 6733-6741.
- Hartung, J. S., Beretta, J., Brlansky, R. H., Spisso, J. & Lee, R. F. (1994). Citrus Variegated Chlorosis bacterium - axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84(6): 591-597.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and stress - the role of RpoS in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell* 72(2): 165-168.

- Heras, B., Edeling, M. A., Schirra, H. J., Raina, S. & Martin, J. L. (2004). Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(24): 8876-8881.
- Hill, B. L. & Purcell, A. H. (1995). Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85(2): 209-212.
- Hopkins, D. L. (1989). *Xylella fastidiosa* - xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27: 271-290.
- Hopkins, D. L., Mollenha.Hh & French, W. J. (1973). Occurrence of a *Rickettsia*-like bacterium in xylem of peach trees with Phony Ddisease. *Phytopathology* 63(11): 1422-1423.
- Hunsucker, S. A., Mitchell, B. S. & Sychala, J. (2005). The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* 107(1): 1-30.
- Ichikawa, J. K., Li, C., Fu, J. & Clarke, S. (1994). A gene at 59 Minutes on the *Escherichia coli* chromosome encodes a lipoprotein with unusual amino-acid repeat sequences. *Journal of Bacteriology* 176(6): 1630-1638.
- Iwasaki, W. & Miki, K. (2007). Crystal structure of the stationary phase survival protein SurE with metal ion and AMP. *Journal of Molecular Biology* 371(1): 123-136.
- Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual Review Biochemistry* 72,111-135.
- Kalogeraki, V. S. & Winans, S. C. (1995). The octopine-type Ti plasmid Ptia6 of *Agrobacterium tumefaciens* contains a gene homologous to the chromosomal virulence gene *acvB*. *Journal of Bacteriology* 177(4): 892-897.
- Kamiya, H. (2003). Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides. *Nucleic Acids Research* 31(2): 517-531.
- Kang, H. W., Wirawan, I. G. P. & Kojima, M. (1994). Cellular-localization and functional-analysis of the protein encoded by the chromosomal virulence
-

- Gene (*acvB*) of *agrobacterium tumefaciens*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 58(11): 2024-2032.
- Knofel, T. & Strater, N. (2001). Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. *Journal of Molecular Biology* 309(1): 239-254.
- Kunz, B. A., Kohalmi, S. E., Kunkel, T. A., Mathews, C. K., McIntosh, E. M. & Reidy, J. A. (1994). Deoxyribonucleoside triphosphate levels - a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology* 318(1): 1-64.
- Lacava, P. T., Araujo, W. L., Maccheroni, W. & Azevedo, J. L. (2001). RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology* 33(4): 302-306.
- Lambais, M. R., Goldman, M. H. S., Camargo, L. E. A. & Goldman, G. H. (2000). A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology* 3(5): 459-462.
- Laranjeira, F. F. (1997). Ten years of citrus variegated chlorosis: What do we know? *Laranja*. 18: 123-141.
- Lazzaroni, J. C., Dubuisson, J. F. & Vianney, A. (2002). The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* 84(5-6): 391-397.
- Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., Park, I. C., Yoon, U. H., Hahn, J. H., Koo, B. S., Lee, G. B., Kim, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Kim, J. H., Jung, C., Koh, N. H., Seo, J. S. & Go, S. J. (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* 33(2): 577-586.
- Lee, J. Y., Kwak, J. E., Moon, J., Eom, S. H., Liang, E. C., Pedelacq, J. D., Berendzen, J. & Suh, S. W. (2001). Crystal structure and functional analysis of the SurE protein identify a novel phosphatase family. *Nature Structural Biology* 8(9): 789-794.

- Lee, R. F. , Beretta, M. J. G. *et al.* (1993). Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the casual agent. *Summa Phytopathologica*. 19(2):123-125.
- Lee, R. F., Derrick, K. S., Beretta, M. J. G., Chagas, C. M., Rosetti, V. (1991). Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry*. Oct:12-15
- Leu, L. S. & Su, C. C. (1993). Isolation, Cultivation, and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease* 77(6): 642-646.
- Li, C., Ichikawa, J. K., Ravetto, J. J., Kuo, H. C., Fu, J. C. & Clarke, S. (1994). A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *Journal of Bacteriology* 176(19): 6015-6022.
- Li, C., Wu, P. Y. & Hsieh, M. (1997). Growth-phase-dependent transcriptional regulation of the *pcm* and *surE* genes required for stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Microbiology-Uk* 143: 3513-3520.
- Li, W. B., Zreik, L., Fernandes, N. G., Miranda, V. S., Teixeira, D. C., Ayres, A. J., Garnier, M. & Bove, J. M. (1999). A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Current Microbiology* 39(2): 106-108.
- Li, Y. X., Hao, G. X., Galvani, C. D., Meng, Y. Z., De la Fuente, L., Hoch, H. C. & Burr, T. J. (2007). Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology-Sgm* 153: 719-726.
- Maki, H. & Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355(6357): 273-275.
- McElrone, A. J., Sberald, J. L. & Forseth, I. N. (2001). Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease* 85(11): 1160-1164.
- Morrison, B. A. & Shain, D. H. (2008). An AMP nucleosidase gene knockout in *Escherichia coli* elevates intracellular ATP levels and increases cold tolerance. *Biology Letters* 4(1): 53-56.

Referências Bibliográficas

- Muniz, J. R. C., Alves, C. A., de Pieri, C., Beltramini, L. M., Selistre-De-Araujo, H. S., Vettore, A. L., da Silva, F. R., Arruda, P., Garratt, R. C., Oliva, G. & Souza, D. H. F. (2004). Overexpression, purification, biochemical characterization, and molecular modeling of recombinant GDP-mannosyltransferase (GumH) from *Xylella fastidiosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315(2): 485-492.
- Mura, C., Katz, J. E., Clarke, S. G. & Eisenberg, D. (2003). Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurE alpha): An acid phosphatase with purine nucleotide specificity (vol 326, pg 1559, 2003). *Journal of Molecular Biology* 328(2): 517-517.
- Murray, A. W. (1971). Biological significance of purine salvage. *Annual Review of Biochemistry* 40: 811-& .
- Napolitano, M. J. & Shain, D. H. (2004). Four kingdoms on glacier ice: convergent energetic processes boost energy levels as temperatures fall. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: S273-S276.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E. (2004). Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(6): 1737-1742.
- Nunes, L. R., Rosato, Y. B., Muto, N. H., Yanai, G. M., da Silva, V. S., Leite, D. B., Goncalves, E. R., de Souza, A. A., Coletta, H. D., Machado, M. A., Lopes, S. A. & Oliveira, R. C. C. (2003). Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. *Genome Research* 13(4): 570-578.
- Nyland, G., Goheen, A. C., Lowe, S. K. & Kirkpatr.Hc (1973). Ultrastructure of a *Rickettsia*-like organism from a peach tree affected with phony disease. *Phytopathology* 63(10): 1217-1217.
- O'Handley, S., Scholes, C. P. & Cunningham, R. P. (1995). Endonuclease III interactions with DNA substrates .1. Binding and footprinting studies with oligonucleotides containing a reduced apyrimidinic Site. *Biochemistry* 34(8):

- 2528-2536.
- O'Handley, S. F., Dunn, C. A. & Bessman, M. J. (2001). Orf135 from *Escherichia coli* is a nudix hydrolase specific for CTP, dCTP, and 5-methyl-dCTP. *Journal of Biological Chemistry* 276(8): 5421-5426.
- Okazaki, R. & Kornberg, A. (1964). Deoxythymidine kinase of *Escherichia coli* .I. Purification + Some properties of enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 239(1): 269-& .
- Pan, S. Q., Jin, S. G., Boulton, M. I., Hawes, M., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1995). An *Agrobacterium* virulence factor encoded by a Ti plasmid gene or a chromosomal gene is required for T-DNA transfer into plants. *Molecular Microbiology* 17(2): 259-269.
- Pappachan, A., Savithri, H. S. & Murthy, M. R. N. (2008). Structural and functional studies on a mesophilic stationary phase survival protein (Sur E) from *Salmonella typhimurium*. *Febs Journal* 275(23): 5855-5864.
- Paradela Filho, O., Sugimori, M. H., Ribeiro, I. J. A., Garcia Júnior, A., Beretta, M. J. G., Harakawa, R., Machado, M. A., Laranjeira, F. F., Rodrigues Neto, J., Beriam, L. O. S. (1997). Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. *Summa Phytopathologica*. 23:46-49.
- Pashalidis, S., Moreira, L. M., Zaini, P. A., Campanharo, J. C., Alves, L. M. C., Ciapina, L. P., Vencio, R. Z. N., Lemos, E. G. M., Da Silva, A. M. & da Silva, A. C. R. (2005). Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 9(1): 77-90.
- Proudfoot, M., Kuznetsova, E., Brown, G., Rao, N. N., Kitagawa, M., Mori, H., Savchenko, A. & Yakunin, A. F. (2004). General enzymatic screens identify three new nucleotidases in *Escherichia coli* - Biochemical characterization of SurE, YfbR, and YjjG. *Journal of Biological Chemistry* 279(52): 54687-54694.
- Purcell, A. H. & Hopkins, D. L. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34: 131-151.
- Purcell, A. H., Finlay, A. H. & Mclean, D. L. (1979). Pierces disease bacterium -
-

- Mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science* 206(4420): 839-841.
- Reddy, J. D., Reddy, S. L., Hopkins, D. L. & Gabriel, D. W. (2007). ToIC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(4): 403-410.
- Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual Review of Biochemistry* 57: 349-374.
- Riehle, M. M., Bennett, A. F. & Long, A. D. (2001). Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(2): 525-530.
- Rinaldi, F. C., Meza, A. N. & Guimaraes, B. G. (2009). Structural and biochemical characterization of *Xylella fastidiosa* DsbA family members: new insights into the enzyme-substrate interaction. *Biochemistry* 48(15): 3508-3518.
- Rinaldo-Matthis, A., Rampazzo, C., Reichard, P., Bianchi, V. & Nordlund, P. (2002). Crystal structure of a human mitochondrial deoxyribonucleotidase. *Nature Structural Biology* 9(10): 779-787.
- Roberto, S. R., Coutinho, A., Delima, J. E. O., Miranda, V. S. & Carlos, E. F. (1996) Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Ocrogonia terminalis* e *Oncometopia facielis* em citros. *Fitopatologia Brasileira*. 21:517-518.
- Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. A. & Kirkpatrick, B. C. (2007). Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22): 7252-7258.
- Roper, M. C., Greve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M. & Kirkpatrick, B. C. (2007). *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(4): 411-419.
- Rosselli, L. K., Oliveira, C. L. P., Azzoni, A. R., Tada, S. F. S., Catani, C. F., Saraiva, A. M., Soares, J. S. M., Medrano, F. J., Torriani, I. L. & Souza, A. P. (2006). A new member of the aldo-keto reductase family from the plant

- pathogen *Xylella fastidiosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 453(2): 143-150.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P. & Dow, J. M. (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(17): 6712-6717.
- Sakoh, M., Ito, K. & Akiyama, Y. (2005). Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 280(39): 33305-33310.
- Savaiano, D. A. & Clifford, A. J. (1981). Adenine, the precursor of nucleic-acids in intestinal cells unable to synthesize purines denovo. *Journal of Nutrition* 111(10): 1816-1822.
- Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. <http://www.agricultura.sp.gov.br/> . Acessado em 09/2009.
- Sherald, J. L. (1993). Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in american elm and failure of reciprocal transmission between strains from elm and sycamore. *Plant Disease* 77(2): 190-193.
- Shi, X. Y., Dumenyo, C. K., Hernandez-Martinez, R., Azad, H. & Cooksey, D. A. (2007). Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: Genes and phenotypes controlled by *algU*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(21): 6748-6756.
- Simionato, A. V. C., da Silva, D. S., Lambais, M. R. & Carrilho, E. (2007). Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. *Journal of Mass Spectrometry* 42(4): 490-496.
- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bove, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H.,

- Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., Franca, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., de Oliveira, M. C., de Oliveira, R. C., Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., Rosa, A. J. D., de Rosa, V. E., de Sa, R. G., Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., da Silva, A. C. R., da Silva, A. M., da Silva, F. R., Silva, W. A., da Silveira, J. F., Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., de Souza, A. A., de Souza, A. P., Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tsuhako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovskij-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., Setubal, J. C. & Org, X. f. C. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406(6792): 151-157.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* 38(5): 986-1003.
- Souza, L. C. A., Wulff, N. A., Gaurivaud, P., Mariano, A. G., Virgilio, A. C. D., Azevedo, J. L. & Monteiro, P. B. (2006). Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC *gumB* and *gumF* genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. *Fems Microbiology Letters* 257(2): 236-242.
- Spychala, J., Madridmarina, V. & Fox, I. H. (1988). High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta - Properties and allosteric regulation by
-

- IMP and ATP. *Journal of Biological Chemistry* 263(35): 18759-18765.
- Stevenson, J. F., Matthews, M. A. & Rost, T. L. (2004). Grapevine susceptibility to Pierce's disease I: Relevance of hydraulic architecture. *American Journal of Enology and Viticulture* 55(3): 228-237.
- Stryer, L. (2005). Biochemistry. 4th edition. W. H. Freeman and Company. New York. pp 147-206.
- Tattersall, M. H. N., Ganeshaguru, K. & Hoffbrand, A. V. (1975). Effect of External Deoxyribonucleosides on Deoxyribonucleoside Triphosphate Concentrations in Human Lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* 24(16): 1495-1498.
- Tian, G., Xiang, S., Noiva, R., Lennarz, W. J. & Schindelin, H. (2006). The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites (vol 124, pg 61, 2006). *Cell* 124(5): 1085-1088.
- Titz, B., Hauser, R., Engelbrecher, A. & Uetz, P. (2007). The *Escherichia coli* protein YjjG is a house-cleaning nucleotidase in vivo. *Fems Microbiology Letters* 270(1): 49-57.
- Torres, P. S., Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M. & Vojnov, A. A. (2007). Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environmental Microbiology* 9(8): 2101-2109.
- Tubelis, A. (1992). Difusão da clorose em pomares de São Paulo e Minas Gerais. *Informativo Coopercitrus* 72:24-30.
- Tyree, M. T & Zimmermann, M. H. (2002). Xylem Structure and the Ascent of Sap. New York: Springer-Verlag
- Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan, L. R., Camargo, L. E. A., da Silva, A. C. R., Moon, D. H., Takita, M. A., Lemos, E. G. M., Machado, M. A., Ferro, M. I. T., da Silva, F. R., Goldman, M. H. S., Goldman, G. H., Lemos, M. V. F., El-Dorry, H., Tsai, S. M., Carrer, H., Carraro, D. M., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Siqueira, W. J., Coutinho, L. L., Kimura, E. T., Ferro, E. S., Harakava, R., Kuramae, E. E.,

Referências Bibliográficas

- Marino, C. L., Giglioti, E., Abreu, I. L., Alves, L. M. C., do Amaral, A. M., Baia, G. S., Blanco, S. R., Brito, M. S., Cannavan, F. S., Celestino, A. V., da Cunha, A. F., Fenille, R. C., Ferro, J. A., Formighieri, E. F., Kishi, L. T., Leoni, S. G., Oliveira, A. R., Rosa, V. E., Sasaki, F. T., Sena, J. A. D., de Souza, A. A., Truffi, D., Tsukumo, F., Yanai, G. M., Zaros, L. G., Civerolo, E. L., Simpson, A. J. G., Almeida, N. F., Setubal, J. C. & Kitajima, J. P. (2003). Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology* 185(3): 1018-1026.
- Visick, J. E., Ichikawa, J. K. & Clarke, S. (1998). Mutations in the *Escherichia coli* *surE* gene increase isoaspartyl accumulation in a strain lacking the *pcm* repair methyltransferase but suppress stress-survival phenotypes. *Fems Microbiology Letters* 167(1): 19-25.
- Wang, L. H., He, Y. W., Gao, Y. F., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C. Z., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X. & Zhang, L. H. (2004). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology* 51(3): 903-912.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelcopaul, L. & Brenner, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* Gen-Nov, Sp-Nov - Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas spp.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(2): 136-143.
- Wirawan, I. G. P. & Kojima, M. (1996). A chromosomal virulence gene (*acvB*) product of *Agrobacterium tumefaciens* that binds to a T-strand to mediate its transfer to host plant cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60(1): 44-49.
- Worku, Y. & Newby, A. C. (1982). Nucleoside exchange catalyzed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Biochemical Journal* 205(3): 503-510.
- Zhang, R. G., Skarina, T., Katz, J. E., Beasley, S., Khachatryan, A., Vyas, S., Arrowsmith, C. H., Clarke, S., Edwards, A., Joachimiak, A. & Savchenko, A. (2001). Structure of *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: A novel acid phosphatase. *Structure* 9(11): 1095-1106.
-

10. Anexos

10.1 – Artigo I:

“A new member of the aldo-keto reductase family from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*”

Autores: Luciana K. Rosselli , Cristiano L.P. Oliveira , Adriano R. Azzoni , Susely F.S. Tada Cleide F. Catani , Antonio M. Saraiva , José Sérgio M. Soares , Francisco J. Medrano , Iris L. Torriani , Anete P. Souza

**Publicado na revista Archives of Biochemistry and Biophysics 453 (2006)
143–150**



A new member of the aldo–keto reductase family from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*

Luciana K. Rosselli^a, Cristiano L.P. Oliveira^{b,c}, Adriano R. Azzoni^a, Susely F.S. Tada^a,
Cleide F. Catani^d, Antonio M. Saraiva^a, José Sérgio M. Soares^a, Francisco J. Medrano^c,
Iris L. Torriani^{b,c}, Anete P. Souza^{a,*}

^a Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6010, 13083-875 Campinas, SP, Brazil

^b Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^c Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, C.P. 6192, Campinas, SP, Brazil

^d Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6010, Campinas, SP, Brazil

Received 18 April 2006, and in revised form 7 July 2006

Available online 31 July 2006

Abstract

The *Xylella fastidiosa* genome program generated a large number of gene sequences that belong to pathogenicity, virulence and adaptation categories from this important plant pathogen. One of these genes (XF1729) encodes a protein similar to a superfamily of aldo–keto reductase together with a number of structurally and functionally related NADPH-dependent oxidoreductases. In this work, the similar sequence XF1729 from *X. fastidiosa* was cloned onto the pET32Xa/LIC vector in order to overexpress a recombinant His-tag fusion protein in *Escherichia coli* BL21(DE3). The expressed protein in the soluble fraction was purified by immobilized metal affinity chromatography (agarose–IDA–Ni resin). Secondary structure contents were verified by circular dichroism spectroscopy. Small angle X-ray scattering (SAXS) measurements furnish general structural parameters and provide a strong indication that the protein has a monomeric form in solution. Also, ab initio calculations show that the protein has some similarities with a previously crystallized aldo–keto reductase protein. The recombinant XF1729 purified to homogeneity catalyzed the reduction of DL-glyceraldehyde (K_{cat} 2.26 s⁻¹, K_m 8.20 ± 0.98 mM) and 2-nitrobenzaldehyde (K_{cat} 11.74 s⁻¹, K_m 0.14 ± 0.04 mM) in the presence of NADPH. The amino acid sequence deduced from XF1729 showed the highest identity (40% or higher) with several functional unknown proteins. Among the identified AKRs, we found approximately 29% of identity with YakC (AKR13), 30 and 28% with AKR11A and AKR11B, respectively. The results establish XF1729 as the new member of AKR family, AKR13B1. Finally, the first characterization by gel filtration chromatography assays indicates that the protein has an elongated shape, which generates an apparent higher molecular weight. The study of this protein is an effort to fight *X. fastidiosa*, which causes tremendous losses in many economically important plants.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Aldo–keto reductase; *Xylella fastidiosa*; XF1729 protein; XF1729 gene

The bacteria *Xylella fastidiosa* [1] is the causal agent of a number of economically important crop diseases, including Citrus Variegated Chlorosis (CVC)¹, affecting mainly sweet oranges [2]. Although its complete genome is already

sequenced [3], *X. fastidiosa* is very poorly characterized by biochemical approaches at a protein level. Since *X. fastidiosa* 9a5c strain (associated with CVC) is the first plant pathogen to be fully sequenced, a large benefit for the whole field of disease research in plants can be expected. An

* Corresponding author. Fax: +55 19 37881089.

E-mail address: anete@unicamp.br (A.P. Souza).

¹ Abbreviations used: CVC, Citrus Variegated Chlorosis; AKR, aldo–keto reductase; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic

acid; PCR, polymerase chain reaction; SDS-PAGE, SDS–polyacrylamide gel electrophoresis; MALDI-TOF, matrix-assisted laser-desorption time-of-flight; CD, circular dichroism; PEG, polyethylene glycol.

initial step towards characterizing the function of several proteins has been taken by functional and structural genomic projects.

In order to gather information about the proteins involved in the mechanisms of the bacterium pathogenicity, we chose the XF1729 ORF (gi 9106797) for the characterization studies. This target ORF is located, together with other different and putative dehydrogenases/keto-reductases [4], in a large citrus specific genomic island (named GI₂) that seems to be important in the environmental adaptation and pathogenicity of this bacterium [5,6]. The bacteria require protection against the production of reactive oxygen species (ROS) by the plant in response to injuries. To prevent damage from ROS, *X. fastidiosa* contain six genes involved with oxide reduction [7].

The XF1729 ORF codifies a protein of 291 amino acids, with a predicted molecular weight of 31.4 kDa, theoretical *pI* of 4.99 that probably belongs to the toxin production and detoxification category. Its putative function could be assigned via similarity to characterized sequences in the databases. The comparative amino acids alignment shows that the target protein is similar to putative oxidoreductases found in several species and revealed that the protein has a common domain with aldo-keto reductase (AKR) superfamily proteins. However, this ORF product was first described in the genome annotation as being a phenylacetaldehyde dehydrogenase due its similarity with the PadA enzyme from *Escherichia coli*. This enzyme belongs to another protein family (aldehyde dehydrogenase superfamily) that efficiently oxidizes only phenylacetaldehyde-like aromatic aldehydes and is a homodimer that uses NADP+ as a coenzyme [8,9].

The AKRs are a growing superfamily of oxidoreductases that are found across biological kingdoms and phyla. Found in prokaryotes and eukaryotes including yeast,

plant, amphibia and mammals. Although several dimers and tetramers have been characterized, members of the superfamily are typically monomeric (α/β)₈-barrel proteins, approximately 35 kDa in mass, which use NAD(P)(H) to catalyze the reduction of aldehydes and ketones, monosaccharides, ketosteroids and prostaglandins and other specific substrates [10,11]. Currently, the superfamily contain more than 120 proteins that are distributed throughout 14 families (AKR1–AKR14) on the basis of sequence identity: The criteria follow that members within a family have less than 40% amino acid sequence identity with other families and that members within a subfamily have greater than 60% sequence identity [11].

Comparing the XF1729 protein with its similar sequences, we found the highest identity (~65%) with a putative oxidoreductase from *Deinococcus radiodurans* [12] and approximately 29% of identity with YakC from *Schizosaccharomyces pombe* that is the founding member of 13th AKR family [13]. However, family 13 of the aldo-keto reductases currently consists of one poorly characterized protein and several unknown function proteins were found to belong to this family. Apart from this, we found two solved structure proteins – the vegetative protein 147 (PDB entry 1PYF) and the general stress protein 69 (PDB entry 1PZ1) – from *Bacillus subtilis* that show an approximate identity of 30 and 28% with the XF1729 target protein, respectively. Both proteins are members of the AKR11 family [14,15] and the alignment of these sequences is shown in Fig. 1.

Here, we report the cloning and overexpression the recombinant protein in *E. coli*. The purified XF1729 protein exhibited a typical aldo-keto reductase activity, being able to reduce DL-glyceraldehyde and 2-nitrobenzaldehyde in the presence of NADPH. Its primary structure and activity assay showed that the enzyme is a new member of the

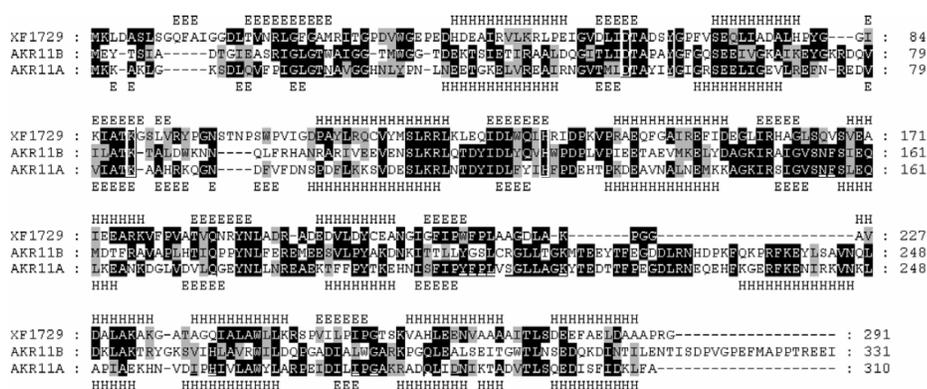


Fig. 1. Comparison of amino acid sequences of the XF1729 protein from *X. fastidiosa* (XF1729, gi 15838330) with the vegetative protein 147 (AKR11A, gi 47168571) and the general stress protein 69 (AKR11B, gi 47168574) from *Bacillus subtilis*. The multiple sequence alignment was carried out using the CLUSTALW and GENEDOC programs. Letters shaded in black indicate amino acids that are identical in at least two aligned sequences. Letters shaded in gray indicate similar amino acids. Vertical rectangles indicate the residues belonging to the catalytic tetrad present in all the sequences. Underlined letters show the residues involved in NADPH cofactor binding. Secondary structure elements (E = β -sheet, H = α -helix) are indicated above the predict structure deduced from the XF1729 sequence (by PSIPRED program) and below the AKR11A crystallographic structure (PDB entry 1PYF) obtained from its sequence.

AKR 13 family, classified as AKR13B1.² Although, in the genome annotation, the protein is described as belonging to the aldehyde dehydrogenase superfamily, its function has not been assigned (data not shown). In addition, modeling approaches based on SAXS data give the indication of the general shape of this protein, permitting the identification of similar structural features with proteins of the AKR11 family. It also aims at adding new information on proteins that may be related to the *X. fastidiosa* pathogenesis, necessary for new approaches towards the combat of CVC.

Materials and methods

Materials

The oligonucleotide primers were synthesized at Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brazil). The pET32-Xa/LIC vector and the BL21(DE3) strain were obtained from Novagen (Madison, WI). The Chelating Sepharose Fast Flow (agarose-IDA-Ni) resin affinity resin was obtained from Qiagen (Hilden, Germany). The Coomassie blue reagent for total soluble protein determination was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). The molecular-mass marker (LMW) and the Tricorn 10/100 (10 × 100 mm) chromatography column were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The protease inhibitor phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), lysozyme, and the enzyme trypsin were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). All other chemical reagents used were of the highest commercially grade available.

Expression vector construction

The target ORF (XF1729) amplification for cloning into pET32Xa/LIC was done in two steps by polymerase chain reaction (PCR): the initial amplification of target ORF from *X. fastidiosa* 9a5c strain was carried out using the purified genomic DNA as the template and the 5'-GCGGTCGGCAGCGTGTGCG-3' (sense) and 5'-GCGGGCCTTTGTCGTTTTTCCTG-3' (antisense) primers. The amplification protocol consisted of a 3 min denaturation at 94°C followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and 30 s and final extension at 72°C for 2 min. This first PCR product was used, as a template, for the specific amplification with a pair of PCR primers, 5'-GGTATTGAGGGTTCGCATGAACTTGAT-3' (sense) and 5'-AGAGGAGAGTTAGAGCCTCAACCGC GTGG-3' (antisense), specifically designed to be cloned into pET32Xa/LIC. The primers were designed to generate products with vector cohesive overhangs (in bold). In this second amplification, we used the same amplification pro-

tol, except for the annealing temperature that was 55°C. The amplified DNA fragments were analyzed on 1% agarose gel. The blunt-ended PCR products were purified, treated and cloned in the linearized pET32Xa/LIC vector according to the vector manufacturer's protocol [16]. The pET32Xa/LIC vector is designed for the expression of the recombinant protein fused to the 109 amino acid thioredoxin (11.7 kDa), a six amino acid His-tag and 15 amino acid S-tag sequences upstream to the cloning site. The fusion tags together have a molecular mass of 17.6 kDa, a theoretical pI of 5.95, and they can be removed from the recombinant target protein by protease cleavage using the factor Xa [16].

The recombinant plasmids were used to transform competent *E. coli* DH5 α cells, using a slightly different method to the standard polyethylene glycol (PEG) method [17]. The standard method describes a heat shock step when cells are kept at 42°C for 30 s. The high temperature step was substituted by letting the cells stand at room temperature for 10 min. Cells were cultured overnight at 37°C in Luria-Bertani broth (LB) plates containing 50 μ g/mL ampicillin. The colonies were individually stored at -70°C in a permanent 2YT + HMFMB broth [18] and checked by PCR. The ORF XF1729 insert of pET 32Xa/LIC plasmid was sequenced to verify the correct nucleotide sequence.

Protein expression and purification

The *E. coli* strain BL21(DE3) cells were transformed with recombinant plasmid and cultured in 3.0 mL LB broth added to 50 μ g/mL ampicillin, grown overnight at 37°C and 300 rpm. This pre-innoculum was then transferred to 5.0 L of LB broth containing ampicillin at the same concentration and grown to OD₆₀₀ of 0.8. At this point, the cells were induced with an addition of 5.6 mM lactose, at 37°C, for 4 h and with shaking at 300 rpm. The cell pellets were resuspended in adsorption buffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing PMSF and lysozyme to concentrations of 1.0 mM and 1.0 mg/mL, respectively. Then the suspension was sonicated, clarified by centrifugation at 27,500g and the clear supernatant was used for protein purification.

The two steps of chromatography purification were carried out in the Tricorn 10/100 column (Amersham Biosciences, USA), packed with 8 mL agarose-IDA-Ni resin, using an AKTA-FPLC System. In the first step, the column was equilibrated with an adsorption buffer, containing 1 M NaCl, and the clarified sample was applied to the column. The resin was washed with this buffer, containing 5 mM imidazole, and subsequently the heterolog protein was eluted using a gradient (1–100%) of adsorption buffer, containing 300 mM NaCl and 300 mM imidazole. The sample containing the recombinant XF1729 was incubated with trypsin (1%, w/w – 0.1 μ g per 10 μ g recombinant protein) at 25°C for 20 min to separate the fusion tags of the protein. The protease was inactivated by PMSF at 1 mM and the sample was dialyzed against the adsorption buffer to

² Dr.T.M. Penning, a founding member of the nomenclature system for the AKR superfamily, personal communication.

prepare for the next purification step. The final step of purification was performed equilibrating the column with the adsorption buffer, containing 1 M NaCl. The column was loaded with the sample (containing XF1729 and the cleaved fusion protein) and the flowthrough proteins (XF1729) were collected. Bound proteins were eluted using a gradient (1–100%) of adsorption buffer, containing 300 mM NaCl and 300 mM imidazole.

Molecular weight and protein concentration determination

The purity and molecular weight were estimated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was performed using a 4% stacking gel and a 12% separation gel according to Laemmli [19]. The use of gel filtration chromatography for the determination of the molecular mass, shape and oligomeric structure of the purified protein was performed using a pre-packed Superdex 75 HR10/30 column from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The preparation of a calibration curve was carried out using the Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit, also from Pharmacia Biotech. The column was equilibrated with 50 mM Tris–HCl, pH 7.5, containing 300 mM NaCl. The protein sample at a concentration of about 2 mg/mL was injected using a 100 μ L sample loop. The protein elution volume needed for molecular mass determination was obtained from the UV chromatogram recorded by the AKTA–FPLC system used.

The total soluble protein concentration was assayed according to the method presented by Bradford (1976), using bovine albumin serum as the protein standard [20]. More accurate estimations for purified XF 1729 were made based on absorbance at 280 nm, using a calculated extinction coefficient of 1.190 $\text{g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$, based on the method described by Pace and Schmidt [21].

Identity confirmation of the XF1729 protein

In order to verify the correct amino acid sequence of the XF1729 protein, mass spectrometry and N-terminal sequencing were carried. The purified protein XF1729 mass spectrometric analysis was carried out using matrix-assisted laser-desorption time-of-flight (MALDI-TOF) MALDI-LR mass spectrometer (Micromass, USA). The trypsin-digested protein and intact protein were analyzed in the spectrometer using reflecting and linear modes, respectively, according to the equipment manufacturer's instructions. The matrixes used for trypsin-digested (peptides) and intact protein samples were CHCA and sinapinic acid, respectively. The masses of monoisotopic peaks with relative intensity higher than 5% of the most intense peak in the spectrum were used for comparison to a theoretical digestion of the protein by trypsin. This was carried out using the MS-Digest program (<http://prospector.ucsf.edu>). The N-terminal sequencing was done with the purified protein loaded in a 12% SDS–polyacrylamide gel, electroblotted onto a PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA) using

the transfer buffer (0.29% glycine; 0.58% Tris–HCl; 0.037% SDS; 20% methanol) and stained with Ponceau corant. A portion of the stained 31 kDa protein was excised and loaded onto a Protein Sequencer PPSQ-23A (Shimadzu, Japan) according to the equipment manufacturer's protocols.

Circular dichroism (CD) spectroscopy

In order to estimate the protein's secondary structure, the CD spectra of the fully purified protein, free of highly scattering particles, was studied. Far-UV CD spectra were generated using a 1 mm pathlength cuvette containing 200 μ L XF1729 protein sample at 0.1 mg/mL in 5 mM Tris–HCl buffer pH 7.5 at 20 °C. The assays were carried out in a Jasco 810 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The spectrum was presented as an average of four scans recorded from 190 to 250 nm, at a rate of 20 nm/min.

Enzyme assay

The enzymatic activity was measured spectrophotometrically in a thermostated Hewlett–Packard 8453 spectrophotometer at 25 °C. Aldo–keto reductase activity was determined by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm using a molar extinction coefficient of 6220 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ and DL-glyceraldehyde as the substrate. The assay conditions were as follows: 50 mM K_2HPO_4 , 10 mM KCl and 0.5 mM EDTA at pH 7.0. The concentration of NADPH was kept constant at 250 μ M in all experiments and the concentration of purified XF1729 was 0.48 μ M. Twenty measurements were obtained in a substrate concentration range of 0.5–80 mM for DL-glyceraldehyde and 0.02–1 mM for 2-nitrobenzaldehyde. The values for K_m and K_{cat} were determined by a non-linear curve fitting of the data to the Michaelis–Menten equation with the program Origin (Microcal).

Small angle X-ray scattering

Small angle X-ray scattering experiments were performed at the SAXS beamline of the Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) in Campinas, Brazil. The wavelength used in the experiments was 1.488 Å, and the experimental setup included a temperature-controlled (15 °C) capillary tube sample holder [22] and a linear position sensitive detector. Solutions of purified XF1729 protein at a concentration of 2.39 mg/mL were used in the experiments. The buffer solution used was 10 mM Tris–HCl, pH 7.5. A 10 mg/mL albumin protein solution (67 kDa), measured in the same experimental conditions, was used as a secondary standard for molecular weight determination. Two samples to detector distances were used (933 and 336 mm), which gives a measured q range ($q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta)$, λ = wavelength and 2θ = scattering angle) equal to $0.0112 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2226 \text{ \AA}^{-1}$. The data treatment of the scattering intensity was carried out using

the software package TRAT1D [23], performing the usual correction for detector homogeneity, incident beam intensity, sample absorption, blank subtraction, intensity averaging and the experimental error values. Data analysis and model calculations were performed using the GNOM [24], GASBOR [25], DAMAVER [26] and CRY SOL [27] computer programs.

Results and discussion

Strategy for XF1729 cloning and expression

The pET32Xa/LIC-XF1729 construction was successfully transformed into the BL21(DE3) strain. Therefore, the overexpression level of the recombinant protein was tested under various conditions. The induction of the protein expression was most efficient when induced for 4 h at 37 °C with a lactose concentration of 5.6 mM. Approximately 6 mg of soluble protein was obtained from 1 L of the induced bacterial culture. However, SDS-PAGE analysis indicated that the recombinant XF1729 protein was partly expressed in the soluble fraction and partly as inclusion bodies.

Protein purification and molecular weight determination of XF1729

A high amount of relatively pure recombinant protein containing the His-tag was recovered from the lysed extract in the first purification step using immobilized metal affinity chromatography (Fig. 2, lanes 2–4). The elution fractions contained the recombinant protein and a few impurities which could be completely eliminated in the last purification step. Approximately 3 mg of purified fusion recombinant protein per liter of initial bacterial broth were recovered at this step.

Subsequently, in the first purification, the cleavage of the N-terminal fusion tags from the target protein was performed by trypsin proteolysis due to the poor efficiency of the factor Xa. The fusion tags were successfully removed from XF1729 by trypsin cleavage. Analysis on SDS-PAGE of the proteolysis products are shown in Fig. 2 (lane 5) as two bands: the XF1729 (31 kDa) and the fusion tags (17.6 kDa). The N-terminal sequence of the cleaved protein was found to be: MKLDASLSGQFAIGG confirming its correct identity and the cleaved site of trypsin. The N-terminal sequencing was very important because it showed that trypsin protease completely removed the fusion tag proteins.

The second chromatographic step was performed to separate the fragment containing the tags and the target protein. In this case, the purified XF1729 was collected in the flowthrough fractions (Fig. 2, lane 6). The contaminant protein was also separated from the target protein during this step (Fig. 2, lane 7). The result indicated that the separation was achieved, since the flowthrough fractions were virtually free from proteins containing His-tag. These fusion tags were bounded in the column (Fig. 2, lane 7). The final amount of purified recombinant XF1729 obtained was approximately 1.6 mg/L of initial bacterial broth. Finally, the molecular mass of the purified protein determined by mass spectrometry was 31,023 Da, which is close to the theoretical value calculated from the primary amino-acid sequence (31,442 Da).

Sequence and secondary structure comparisons

The alignment of the XF1729 primary sequence with two structure solved proteins from *B. subtilis*, AKR11A and AKR11B, revealed many interesting features (Fig. 1). First, the three analyzed sequences have a similar molecular mass of about 35 kDa. Second, the active site architecture

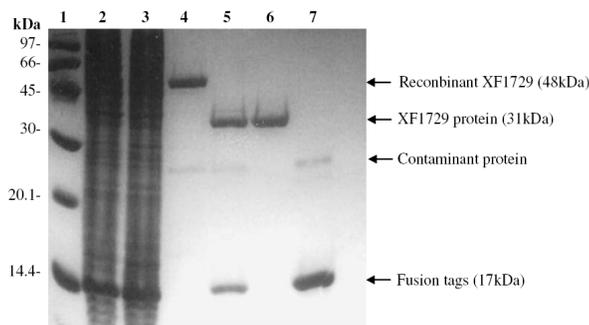


Fig. 2. SDS-PAGE of the fractions collected during the purification steps of the recombinant XF1729. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, extract from bacterial lysis loaded onto the affinity chromatography column; lane 3, flow-through extract; lane 4, fraction collected during the elution step at imidazole concentration of approximately 100 mM, containing the recombinant protein (XF1729 + fusion tags); and lane 5, proteins resulted from limited trypsin digestion step for the XF1729 separation from fusion tags. This fraction was loaded onto the affinity chromatography column to promote final purification of the XF1729; lane 6, flowthrough fraction of the final purification step containing the XF1729 protein; lane 7, proteins eluted at 200 mM imidazole concentration containing the fusion tags and contaminant protein. Separation gel of 12% acrylamide concentration.

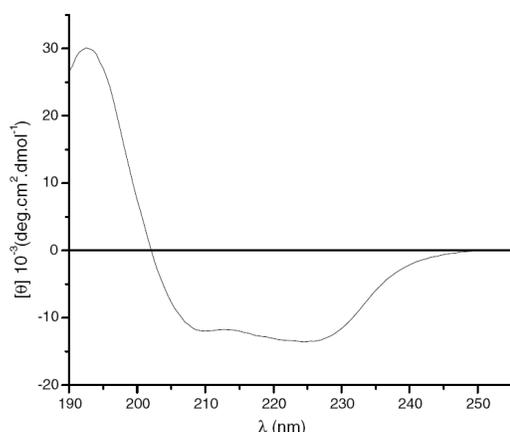


Fig. 3. Circular dichroism spectrum of the purified recombinant XF1729. The spectrum was recorded at 20 °C and a protein concentration of 0.1 mg/mL in 5 mM Tris buffer, pH 7.0. Data were collected using an average of 4 scans per replicate.

of the AKRs making up the catalytic tetrad Asp-53, Tyr-58, Lys-84 and His-125 (numbered according to the AKR11A) is observed also in the XF1729 protein. Moreover, the distributions of essential amino acid residues involved in cofactor binding are quite similar among the compared proteins. Third, the secondary structures predict contents are very close to both the AKR11A and AKR11B, being that the structural motif core (α/β) barrel is a notable characteristic among members of AKR family.

In order to investigate the structural integrity and secondary structure contents of the purified XF1729, the protein was analyzed by CD spectroscopy. The CD spectrum result is shown in Fig. 3 and indicates that the recombinant XF1729 contains a substantial amount of secondary structure. The protein presented a predominant signal of α -helices, with a positive band around 192 nm and negative ones at 209 and 222 nm. This result is in agreement with secondary structure prediction from the PSIPRED program (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) that estimated 41.2% of α -helices and 19.6% β -strands for the XF1729 protein.

Kinetic results

The kinetic results show that the XF1729 has aldo-keto reductase activity and can use NADPH as a cosubstrate. The NADPH-dependent reductase activity of XF1729 has been confirmed with DL-glyceraldehyde and 2-nitrobenzal-

Table 1
Kinetic parameters of XF1729 protein

Substrate	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})
DL-Glyceraldehyde	8.20 ± 0.98	2.56
2-Nitrobenzaldehyde	0.15 ± 0.004	11.74
NADPH	0.012 ± 0.002	2.08

dehyde substrate (Table 1). However, the catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) for 2-nitrobenzaldehyde substrate was more than 250-fold higher than that for DL-glyceraldehyde substrate. Some AKRs have been shown to use NADH, however, no activity was observed in XF1729 when assayed with this potential cosubstrate. Furthermore, XF1729 is unable to oxidize glucose with NADP as a cosubstrate.

Thus, comparing the activity with other AKRs by kinetics parameters, we verified that the XF1729 protein (classified as AKR13B1) is able to reduce the standard AKR substrate DL-glyceraldehyde like both the AKR11A and AKR11B enzymes. However, the YakC, a founding member of a 13th AKR family, showed no measurable activity with this substrate, but in contrast, the same enzyme exhibited an excellent activity with 2-nitrobenzaldehyde as did XF1729.

SAXS results

The experimental scattering intensity as a function of the modulus of the momentum transfer vector q is shown in Fig. 4A. The theoretical fit was done using the GNOM soft-

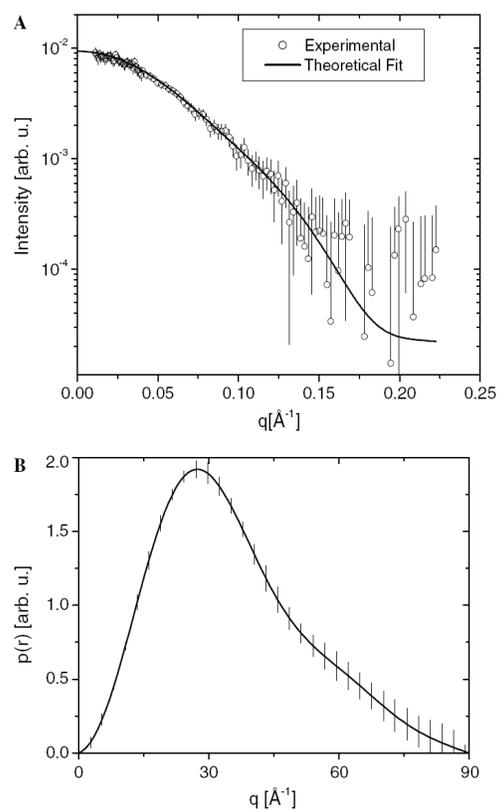


Fig. 4. (A) Experimental scattering intensity and theoretical fit (B) Pair distance distribution function $p(r)$ calculated from the scattering intensity.

ware [24]. This program also calculates the inverse Fourier transform of the scattering intensity giving the pair distance distribution function $p(r)$ shown in Fig. 4B. From the comparison of the extrapolated zero angle scattering intensity value, given by the theoretical fit for the XF1729 protein and albumin scattering intensity, we obtained a value of (34 ± 2) kDa for the XF1729 protein molecular weight. This value is in very good agreement with the expected molecular weight (31.4 kDa) indicating that the protein is in monomeric form in solution. Also, from the theoretical fit, we obtained (27.5 ± 0.8) and $\sim 90 \text{ \AA}$ values for the particle radius of gyration and particle maximum dimension, respectively. The $p(r)$ function gives the indication that the protein possesses quite an elongated prolate shape.

We performed ab initio calculations to obtain more information about the protein shape. The modeling strategy used was based on chain like models. Starting from a spherical arrangement of a dummy backbone with the same number of protein residues, the GASBOR program uses simulated annealing optimization to search for the residues conformation that best fits the experimental data. From the low information nature of the SAXS technique, it is not possible to retrieve a unique solution from this modeling procedure. Due to this, we performed an average of the ab initio models in order to retrieve the most probable configuration, using the DAMAVER program [26]. In this procedure, the ab initio models are compared with each other by the SUPCOMB alignment program [28] and the models that have higher similarity are averaged. The most probable configuration is space-filled with a close packing of spheres. From a set of 10 independent models, we retrieved a most probable solution, shown in Fig. 5A, from the averaging process with spherical subunits radii of 2.25 Å. As previously indicated by the $p(r)$ function, the protein has an anisotropic shape, but from the model we can see that it has a transversal diameter of $\sim 30 \text{ \AA}$ with a well-defined heavier domain in its conformation. One of the fits is shown in Fig. 5B (solid line). In all cases, the ab initio calculations show a very good fit with $\chi < 0.5$ (data not shown).

In order to compare the XF1729 protein with its similar sequences, we choose the AKR11A crystallized protein with the highest alignment score ($\sim 30\%$ sequence identity – PDB entry 1PYF) and compared it with our results. Using the atomic coordinates from a PDB file, the CRY-SOL program [27] was used to fit the experimental SAXS data, varying the protein excluded volume and hydration shell electronic contrast. The resulting fit of the XF1729 scattering data by the 1PYF crystallographic structure is shown in Fig. 5B (dashed line). The differences between the scattering intensity calculated for the crystallographic structure and that of the experimental data are the origin of some differences in the three-dimensional structure of the XF1729 protein and AKR11A. Fits using proteins with lower identity scores give similar (or worse) results (data not shown). The structural differences can be better seen in Fig. 5C where the resulting ab initio model (transparent spheres) was superposed with the 1PYF crystallo-

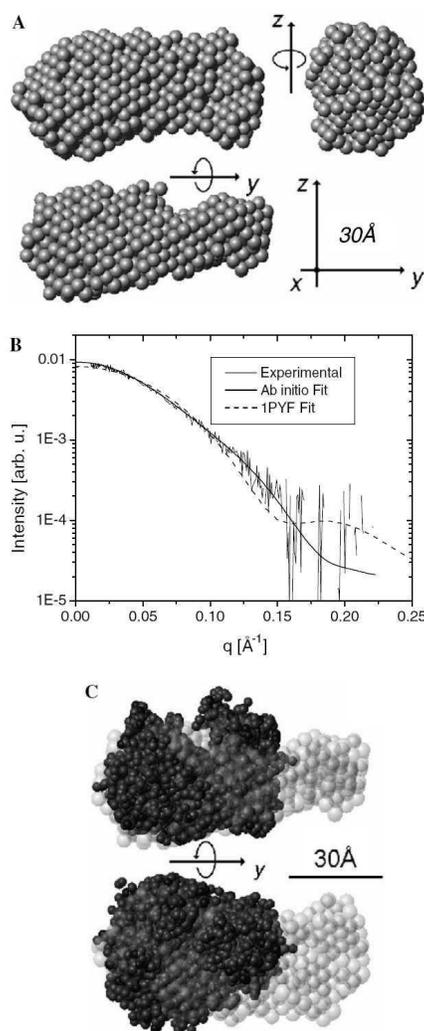


Fig. 5. (A) Most probable model for XF1729 protein given by a spatial average of 10 independent ab initio model calculations. (B) Fit by one model (solid line) and by the crystallographic structure 1PYF (dashed line). (C) Superposition of the crystallographic structure from 1PYF (solid spheres) and the SAXS model for XF1729 (transparent spheres).

graphic structure (solid spheres). It is interesting to note that the above mentioned heavier domain of the ab initio model is very similar to part of the crystallographic structure, differing in the final portion where the XF1729 ab initio model presents a longitudinal arrangement contrasting with the more globular arrangement of the crystallographic structure. This test may not be conclusive, but it is quite interesting to note that the proteins have a high shape similarity even for a low ($\sim 30\%$) sequence identity.

Oligomerization analysis

It is known that AKRs are typically monomeric proteins of about 35 kDa, but dimeric and tetrameric members do occur. In view of this fact, we investigated the oligomeric structure of the XF1729 protein. The molecular weight determined by gel filtration chromatography was 62 kDa, corresponding to double the molecular weight found in mass spectroscopy assays (~31 kDa), data not shown. Although the results seem to indicate that the protein forms oligomers in the observed conditions (50 mM Tris-HCl, pH 7.5), it is well known that elongated proteins give higher molecular weight values in these kinds of experiments. In this way, we have another indication that the XF1729 protein has a prolate shape, in agreement with the SAXS results.

Finally, our results showed that the protein is quite stable at room temperature and remained folded throughout the purification process, being suitable for crystallization studies aiming at three dimensional structure determinations. Also, from the scattering results and model calculations, we have the indication that the general protein shape is in some aspects similar to the proteins from AKR 11 family.

Conclusion

This is the first report of a putative aldo-keto reductase from the *X. fastidiosa* plant pathogen. In this work, the target protein was cloned, expressed in the soluble form and the expressed protein established its methods of purification. The protein was purified in two steps by immobilized metal affinity chromatography (agarose-IDA-Ni resin). Subsequently, its purity and identity were verified by SDS-PAGE, N-terminal sequencing and mass spectrometry. Its correct folding was verified by circular dichroism spectroscopy analysis that indicated a secondary structure composed mainly of α -helices, despite some short β -strands also seeming to be present.

Small angle X-ray scattering measurements furnish the general structural parameters for this protein (radius of gyration, maximum dimension and molecular weight) leading to the conclusion that the protein is a monomer in the solution. This indicates that the solution state of the XF1729 protein is different from the PadA similar enzyme from *E. coli*, which forms dimers under similar conditions. In addition, the initial characterization by gel filtration chromatography assays showed that the protein has an elongated shape, in agreement with the SAXS results. Moreover, the kinetics results show that the enzyme has an aldo-keto reductase activity allowing it to be classified as the AKR13B1. Several unknown function proteins were found to belong to this family, therefore the natural substrate of these enzymes, including XF1729, should be elucidated.

Acknowledgments

The authors thank Dr. H.S.S. de Araújo from Universidade Federal de São Carlos for the N-terminal sequence

analysis; Dr. M.N. Eberlin from Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) for the MALDI-TOF mass spectrometry; R.C. Sassonia M.Sc., and Dr. M.G. Oliveira for the use of the spectrophotometer and the Structural Molecular Biology Center (CEBIME) researchers from the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS) for technical expertise. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 01/07533-7). L.K.R., C.L.P.O., A.R.A., S.F.S.T., C.F.C. and A.M.S. were recipients of fellowships from FAPESP and J.S.M.S. was recipient of fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A.P.S. is recipient of a research fellowship from CNPq.

References

- [1] J.M. Wells, B.C. Raju, H. Hung, W.G. Weisburg, L. Mandelco-Paul, D.J. Brenner, *Int. J. Syst. Bact. Apr.* (1987) 136–143.
- [2] R.F. Lee, K.S. Derrick, M.J.G. Beretta, C.M. Chagas, V. Rosetti, *Citros Ind. Oct.* (1991) 12–15.
- [3] A.J.G. Simpson, F.C. Reinach, P. Arruda, et al., *Nature* 406 (2000) 151–157.
- [4] L.R. Nunes, Y.B. Rosato, N.H. Muto, G.M. Yanai, V.S. Silva, D.B. Leite, E.R. Gonçalves, A.A. Souza, H.D. Coletta-Filho, M.A. Machado, S.A. Lopes, R.C. Oliveira, *Genome Res.* 13 (2003) 570–578.
- [5] A. Bhattacharyya, S. Stülwagen, G. Reznik, et al., *Genome Res.* 12 (2002) 1556–1563.
- [6] R.C. Oliveira, G.M. Yanai, N.H. Muto, D.B. Leite, A.A. de Souza, H.D. Coletta Filho, M.A. Machado, L.R. Nunes, *FEMS Microbiol. Lett.* 216 (2002) 15–21.
- [7] L.M. Moreira, R.F. de Souza, N.F. Almeida Jr., J.C. Setubal, J.C.F. Oliveira, L.R. Furlan, J.A. Ferro, A.C.R. da Silva, *Annu. Rev. Phytopathol.* 42 (2004) 163–184.
- [8] A. Ferrández, M.A. Prieto, J.L. García, E. Diaz, *FEBS Lett.* 406 (1997) 23–27.
- [9] S.P. Hanlon, T.K. Hill, M.A. Flavell, J.M. Stringfellow, R.A. Cooper, *Microbiology* 143 (1997) 513–518.
- [10] J.M. Jez, T.M. Penning, *Chem.-Biol. Interact.* 130–132 (2001) 499–525.
- [11] D. Hyndman, D.R. Bauman, V.V. Heredia, T.M. Penning, *Chem.-Biol. Interact.* 143–144 (2003) 621–631.
- [12] O. White, J.A. Eisen, J.F. Heidelberg, et al., *Science* 286 (1999) 1571–1577.
- [13] T. Morita, T. Huruta, M. Ashiuchi, T. Yagi, *J. Biochem.* 132 (2002) 635–641.
- [14] A. Ehrensberger, D.K. Wilson, *Acta Crystallogr. D* 59 (2003) 375–377.
- [15] A. Ehrensberger, D.K. Wilson, *J. Mol. Biol.* 337 (2004) 661–673.
- [16] Xa/LIC Vector Kits Manual, ninth ed., Novagen, USA, 2000, 56 pp (www.novagen.com).
- [17] B.T. Kurien, R.H. Scofield, *BioTechniques* 18 (6) (1995) 1023–1026.
- [18] A.R. Azzoni, S.F.S. Tada, L.K. Rosselli, D.P. Paula, C.F. Catani, A.A. Sabino, J.A.R.G. Barbosa, B.G. Guimarães, M.N. Eberlin, F.J. Medrano, A.P. Souza, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 297–303.
- [19] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [20] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [21] C.N. Pace, F.X. Schmidt, in: T.E. Creighton (Ed.), *Protein Structure, A Practical Approach*, IRL Press, New York, 1997, pp. 253–259.
- [22] L.P. Cavalcanti, I.L. Torriani, T.S. Plivelic, C.L.P. Oliveira, Kellermann, R. Neuschwander, *Rev. Sci. Instr.* 75 (2004) 4541–4546.
- [23] C.L.P. Oliveira, TRATID – Computer Program for SAXS Data Treatment. LNLS Technical Manual MT 01/2003.
- [24] V. Semenyuk, D.I. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 537–540.
- [25] D.I. Svergun, M.V. Petoukhov, M.H.J. Koch, *Biophys. J.* 80 (2001) 2946–2953.
- [26] V.V. Volkov, D.I. Svergun, *J. Appl. Cryst.* m36 (2003) 860–864.
- [27] D.I. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch, *J. Appl. Cryst.* 28 (1995) 768–773.
- [28] M.B. Kozin, D.I. Svergun, *J. Appl. Cryst.* 34 (2001) 33–41.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **Caracterização Funcional e Estrutural da Nucleotidase SurE de *Xylella fastidiosa***

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

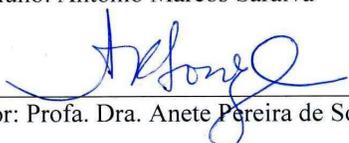
(X) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº15/2003), intitulado Determinação de estruturas tridimensionais de proteínas relacionadas à patogenicidade de *Xylella fastidiosa*;

() tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____


Aluno: Antonio Marcos Saraiva


Orientador: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido



Nome: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Função: Presidente do CIBIO/CBMEG