

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

Instituto de Física Gleb Wataghin – IFGW

&

LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON – LNLS

TESE DE DOUTORADO

**Estudos estruturais e funcionais das
oxidoredutases de pontes dissulfeto da
família DsbA de *Xylella fastidiosa***

Fábio Cupri Rinaldi

Banca examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beatriz Gomes Guimarães

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

Prof. Dr. Igor Polikarpov

Prof^a. Dr^a. Iris Concepción Linares de Torriani

Prof. Dr. Eduardo Granado Monteiro da Silva

LNLS

IB/USP

IFSC/USP

IFGW/UNICAMP

IFGW/UNICAMP

Este exemplar corresponde
à redação final da tese de
doutorado defendida pelo
aluno Fábio Cupri Rinaldi
e aprovada pela comissão
julgadora.

15/05/08

Beatriz Gomes Guimarães

Campinas – SP

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

R47e

Rinaldi, Fabio Cupri

Estudos estruturais e funcionais das oxidoredutases de pontes dissulfeto da família DsbA de *Xylella fastidiosa* / Fabio Cupri Rinaldi. -- Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores: Beatriz Gomes Guimarães e José Antonio Brum.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Oxidoredutases de pontes dissulfeto. 2. Cristalografia de proteínas. 3. Fluorescência 4. *Xylella fastidiosa*.
I. Guimarães, Beatriz Gomes. II. Brum, José Antonio.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". IV. Título.

- **Título em inglês:** Structural and functional studies of the disulfide oxidoreductases DsbA from *Xylella fastidiosa*
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 1. Disulfide bond oxidoreductases
 2. Protein crystallography
 3. Fluorescence
 4. *Xylella fastidiosa*
- **Área de concentração:** Física da Matéria Condensada
- **Titulação:** Doutor em Ciências
- **Banca examinadora:**

Prof^a Beatriz Gomes Guimarães
Prof. Luis Eduardo Soares Netto
Prof. Igor Polikarpov
Prof^a Iris Concepción Linares Torriani
Prof. Eduardo Granado Monteiro da Silva
- **Data da defesa:** 26.03.2008
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **FABIO CUPRI RINALDI – RA 981090** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 26 / 03 / 2008.

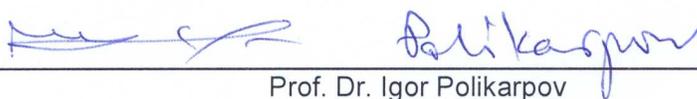
COMISSÃO JULGADORA:



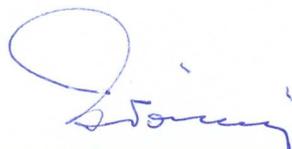
Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães (Orientadora do Candidato)
LNLS



Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto
IB/USP



Prof. Dr. Igor Polikarpov
IFSC/USP



Profa. Dra. Iris Concepción Linares de Torriani
DFMC/IFGW/UNICAMP



Prof. Dr. Eduardo Granado Monteiro da Silva
DEQ/IFGW/UNICAMP

Dedicatória

Dedico o resultado final de minha tese de doutorado à minha mãe, aos meus pais e aos meus irmãos, grandes responsáveis pela minha formação, sem palavras para descrever o quanto os amo.

A Verinha, amor da minha vida, a quem devo grande parte dos resultados alcançados. À compreensão pelas madrugadas em que passei coletando, por saber ouvir e confortar e pelas grandes idéias que muitas vezes me deu.

Aos meus “filhotes”: Ziggy Marley, Leca, canGICA, Marwin, Biga e Bohr, por conseguirem me fazer rir e confortar nos momentos difíceis.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora Dra. Beatriz Guimarães pela sua imensa contribuição em meu desenvolvimento profissional, pela liberdade e confiança depositada em mim, pelas discussões enriquecedoras, por saber exigir nas horas certas, pelas correções primorosas e por ter tornado este trabalho possível.

Aos amigos Mario e Marcão pelas contribuições diretas no trabalho, pelas discussões sobre a carreira e, principalmente, por me ajudarem em meu amadurecimento científico. Além de terem tornado o dia-dia mais divertido.

Às amigas, Anita, Amanda e Kelly, pelo apoio na parte de biologia molecular e pelas conversas descontraídas.

À Frances Lílian, aluna de iniciação, que contribuiu muito no tempo em que estive trabalhando comigo.

À Andréia pela amizade e contribuição na preparação das proteínas mutadas.

Ao Dr. Fábio Gozzo e ao Amadeu pela colaboração e dedicação com os ensaios na espectrometria de massas.

A todos os colegas do grupo de cristalografia do LNLS por compartilharem o espaço físico de trabalho e estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

Ao LNLS pelo grande apoio científico e financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos dos cursos dos quais participei (André, Ney, Alessandro, Caqui e outros).

Ao pessoal da secretaria do LNLS por estarem sempre de bom humor e dispostos a ajudar.

Ao pessoal da secretaria da pós pela infundável paciência durante todos esses anos e pela ajuda nos momentos em que efetivamente precisei.

Gostaria de agradecer também a IUCr pelas contribuições financeiras em congressos e cursos internacionais.

Ao Dr. Robert Sweet e a Dra. Annie Heroux pelo apoio no curso Rapidata 2006.

Ao Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW), aos amigos da turma da graduação e da pós-graduação e aos grandes professores que tive.

À Fapesp pelo auxílio financeiro essencial para a execução deste projeto. Sem a qual esse trabalho não seria possível.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente ou que simplesmente fizeram parte de alguma forma de todos esses anos de esforço.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP projeto 03/12875-0.

Índice

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
I - Introdução	1
I.1 - Formação de pontes dissulfeto no processo de enovelamento das proteínas.....	1
I.2 - Oxidoredutases de pontes dissulfeto.....	5
I.3 - Oxidoredutases de pontes dissulfeto da família DsbA	11
I.4 - Proteínas da família DsbA em <i>Xylella fastidiosa</i>	15
II - Objetivos	19
III - Materiais e Métodos	20
III. 1. Desenho e preparação dos oligonucleotídeos.....	20
III. 2. Amplificação dos genes.....	20
III. 3. Clonagem e subclonagem dos genes.....	22
III. 4. Mutagênese sítio dirigida	24
III. 5. Expressão das proteínas recombinantes em larga escala	25
III. 6. Marcação com selenometionina.....	26
III. 7. Purificação.....	27
III. 8. Dicroísmo circular.....	29
III. 9. Determinação do potencial de oxidação-redução	30

III. 10. Ensaio de oxidação de um peptídeo sintético	34
III. 11. Cristalização.....	35
III. 12. Obtenção de cristais derivados de átomos pesados	37
III. 13. Coleta e processamento dos dados de difração	41
III. 14. Resolução da estrutura da proteína XfDsbA.....	43
III. 14. 1. Substituição Molecular.....	43
III. 14. 2. Substituição Isomorfa.....	45
III. 14. 3. Difração Anômala.....	45
III. 15. Refinamento da estrutura cristalográfica	47
III. 16. Análise da estrutura cristalográfica.....	48
III. 17. Modelagem por homologia da proteína XfDsbA2	48
IV - Resultados e Discussão	51
IV. 1. Amplificação e clonagem dos genes	51
IV. 2. Expressão e purificação.....	52
IV. 3. Cristalização	54
IV. 4. Coleta e processamento dos dados de difração de raios X	58
IV. 4. 1. Coleta de dados de cristais nativos	58
IV. 4. 2. Coleta de dados de cristais derivados de átomos pesados	59
IV. 4. 3. Coleta de dados de cristais marcados com selenometionina	64
IV. 5. Tentativas iniciais de resolução da estrutura da XfDsbA	67
IV. 5. 1. Substituição Molecular	67
IV. 5. 2. Substituição Isomorfa	70
IV. 6. Resolução da estrutura cristalográfica da XfDsbA	71
IV. 7. Refinamento da estrutura da XfDsbA.....	72
IV. 8. Análise da estrutura da XfDsbA.....	74
IV. 8. 1. Estrutura Global	74
IV. 8. 2. Sítio Ativo da XfDsbA.....	81
IV. 9. XfDsbA2 - A segunda oxidoreductase de ponte dissulfeto de <i>X. fastidiosa</i>	90
IV. 10. Propriedades redox das proteínas XfDsbA e XfDsbA2.....	96
IV. 10. 1. Determinação do potencial redox das proteínas XfDsbA e XfDsbA2.....	96

IV. 10. 2. Ensaio de oxidação de um peptídeo sintético.....	101
V - Conclusões e Perspectivas.....	107
Referências.....	111

Lista de Figuras

Figura 1: Tipos de interações observadas entre resíduos de aminoácidos em proteínas	2
Figura 2: Figura esquemática das vias oxidativa e isomerativa de procariotos em condições aeróbicas	8
Figura 3: Ciclo catalítico da DsbA	12
Figura 4: Estrutura global da proteína DsbA de <i>E. coli</i>	13
Figura 5: Sintomas de contaminação pela bactéria <i>X. fastidiosa</i> nas folhas e frutos	16
Figura 6: Alinhamento seqüencial da região do sítio ativo de membros da família DsbA	18
Figura 7: Experimento de “cross-linking”	41
Figura 8: Gel de agarose com concentração de 1%. Produto da digestão dos vetores de expressão pET28a(+) contendo os genes de interesse	52
Figura 9: SDS-PAGE 12,5%. Purificação das proteínas XfDsbA e XfDsbA2	53
Figura 10: Cristais da XfDsbA	56
Figura 11: Cristais da XfDsbA marcada com SeMet	57
Figura 12: Foto do loop contendo o cristal montado na linha X26C no NSLS.....	65
Figura 13: Curvas de f' e f'' obtidas a partir dos dados de fluorescência do cristal da XfDsbA	65
Figura 14: Comparação global das estruturas da XfDsbA, EcDsbA e VcDsbA	76
Figura 15: Alinhamento seqüencial de oxidoredutases da família DsbA	80
Figura 16: Sobreposição estrutural dos resíduos do sítio ativo dos três monômeros da XfDsbA.....	82
Figura 17: Imagem estéreo da sobreposição estrutural dos resíduos do sítio ativo da XfDsbA, EcDsbA e VcDsbA	85
Figura 18: Imagem estéreo do sítio ativo do monômero C da XfDsbA mostrando o peptídeo de 8 resíduos modelado	87
Figura 19: Sobreposição da estrutura da XfDsbA com o complexo EcDsbA-DsbB	89
Figura 20: Espectro de Dicroísmo Circular das proteínas XfDsbA e XfDsbA2.....	92
Figura 21: Sobreposição da estrutura cristalográfica da XfDsbA com o modelo da XfDsbA2	93

Figura 22: Superfícies eletrostáticas das proteínas XfDsbA e XfDsbA2	95
Figura 23: Valores máximos de intensidade de fluorescência para as proteínas XfDsbA e XfDsbA2 em diferentes estados redox e pHs	96
Figura 24: Medidas das constantes de equilíbrio para a proteína XfDsbA em pH 6,0, 7,0 e 8,0	98
Figura 25: Medidas das constantes de equilíbrio para a proteína XfDsbA2 em pH 6,0, 7,0 e 8,0	99
Figura 26: Catálise de oxidação de um peptídeo sintético pelas enzimas XfDsbA e XfDsbA2	101
Figura 27: Medidas das constantes de equilíbrio para os mutantes XfDsbA _{T157V} e XfDsbA2 _{T203V}	105

Lista de Tabelas

Tabela 1: Construções produzidas para os genes que codificam as proteínas <i>XfDsbA</i> e <i>XfDsbA2</i>	22
Tabela 2: Parâmetros de rede e estatística dos dados de difração do cristal nativo da <i>XfDsbA</i>	59
Tabela 3: Condições de “quick-cryo-soaking” e resolução do conjunto de dados correspondente	61
Tabela 4: Condições de “quick-cryo-soaking” dos testes feitos para cristais tratados com glutaraldeído	62
Tabela 5: Condições de “soaking” lento para diversos compostos	63
Tabela 6: Parâmetros de rede e estatística dos dados de difração do cristal da <i>XfDsbA</i> marcada com SeMet	66
Tabela 7: Proteínas utilizadas como modelos para aplicação do método de modelos mistos e respectivas identidades seqüenciais com a proteína <i>XfDsbA</i>	69
Tabela 8: Estatísticas do refinamento da estrutura da <i>XfDsbA</i>	74
Tabela 9: Desvio quadrático médio (r.m.s.d) entre as posições dos $C\alpha$ da <i>XfDsbA</i> e homólogas	76
Tabela 10: Ligações de hidrogênio envolvendo resíduos do sítio catalítico da <i>XfDsbA</i>	83
Tabela 11: Constante de equilíbrio e potencial redox das proteínas <i>XfDsbA</i> e <i>XfDsbA2</i> para o sistema DsbA/glutathiona	100
Tabela 12: Constante de equilíbrio e potencial redox das proteínas mutantes <i>XfDsbA</i> _{T157V} e <i>XfDsbA2</i> _{T203V} para o sistema DsbA/glutathiona	105

Resumo

As oxidoredutases de pontes dissulfeto da família DsbA são responsáveis pela catálise da formação de pontes dissulfeto em proteínas secretadas para o periplasma, participando do processo de enovelamento de fatores de virulência de diversos organismos. É a proteína com maior potencial de oxidação atualmente caracterizada e tal propriedade é associada às interações eletrostáticas envolvendo resíduos de seu sítio ativo, que apresenta um arranjo Cys-Pro-His-Cys altamente conservado. A bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* possui dois genes adjacentes que codificam duas oxidoredutases pertencentes à família das DsbAs (*XfDsbA* e *XfDsbA2*). Embora a *XfDsbA* conserve o arranjo CPHC, a *XfDsbA2* possui a substituição do resíduo histidina, descrito como essencial à atividade da enzima, por alanina (CPAC). Visando a caracterização estrutural e funcional destas proteínas, a estrutura cristalográfica da *XfDsbA* foi determinada a 1,9 Å de resolução e um modelo por homologia da *XfDsbA2* foi construído. Além disso os potenciais de oxidação das enzimas foram determinados por medidas de fluorescência. A estrutura da *XfDsbA* revelou a presença de um peptídeo ligado próximo a região do sítio ativo em um dos monômeros mostrando, pela primeira vez em uma estrutura a alta resolução, o provável modo de interação da DsbA com um substrato. Os ensaios funcionais revelaram que as DsbAs de *X. fastidiosa* apresentam potenciais redox similares e ligeiramente superiores ao da homóloga de *Escherichia coli*. Embora trabalhos sobre a importância do arranjo CPHC têm associado o alto potencial redox das DsbAs à presença do resíduo histidina no sítio ativo, os resultados obtidos para a *XfDsbA2* mostraram que a substituição do resíduo de histidina por alanina não afeta seu potencial redox. A análise das interações envolvendo resíduos do sítio ativo mostrou diferenças importantes entre *XfDsbA*, *XfDsbA2* e suas homólogas de *E. coli* e *Vibrio cholerae*. Ensaios funcionais com mutantes foram realizados em busca da identificação dos resíduos que possam compensar a ausência da histidina em *XfDsbA2*. Os resultados obtidos fornecem novas informações sobre o mecanismo molecular dessa família de enzimas.

Abstract

Disulfide oxidoreductase DsbA catalyzes disulfide-bond formation in proteins secreted to the periplasm and has been related to the folding process of virulence factors in many organisms. It is the most oxidizing of the thioredoxin-like proteins and DsbA redox power is understood in terms of the electrostatic interactions involving the active site motif CPHC. The plant pathogen *Xylella fastidiosa* has two chromosomal genes encoding two oxidoreductases belonging to the DsbA family and, in one of them, the canonical motif CPHC is replaced by CPAC. Aiming at the structural and functional characterization of *X. fastidiosa* DsbAs, the crystal structure of *Xf*DsbA was solved at 1.9 Å resolution and the *Xf*DsbA2 homology model was calculated. We also determined the redox potential of both enzymes by means of fluorescence experiments. The crystal structure of the *Xf*DsbA revealed an electron density corresponding to an 8-mer peptide interacting with the hydrophobic groove on the surface of the monomer C next to the active site. This modeled peptide shows at first time in a high-resolution crystal structure the probable mode of interaction between DsbA and a substrate. Furthermore, the results presented in this work surprisingly show that, despite the absence of the active site histidine in *Xf*DsbA2, both proteins have similar redox potentials. In addition, the structure of *Xf*DsbA revealed critical differences in the interactions involving the active site residues. Biochemical assays with *Xf*DsbA mutants were performed in order to investigate the residues which may be responsible for compensate for the lack of the conserved histidine in *Xf*DsbA2. The results presented contribute to the understanding of DsbA molecular mechanism.

I – Introdução

I.1 - Formação de pontes dissulfeto no processo de enovelamento das proteínas

O processo de enovelamento de uma proteína consiste na formação de uma estrutura tridimensional estável através de um complexo conjunto de interações entre os resíduos de aminoácidos, de forma a adquirir um estado conformacional energeticamente favorável (Pace *et al.*, 1996). Embora o estado desenovelado da proteína seja energeticamente mais favorável para a entropia conformacional dos resíduos de aminoácidos, a liberação de moléculas de solvente durante o enovelamento e as forças que estabilizam seu estado enovelado, tais como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e pontes dissulfeto, compensam essa perda entrópica (Figura 1). As propriedades dos resíduos de aminoácidos variam de acordo com o tamanho da cadeia lateral, sua carga líquida, grau de hidrofobicidade e polaridade, de tal maneira que a disposição seqüencial dos resíduos em uma proteína e o ambiente químico em que ela se encontra (pH, força iônica, solvente) determinam seu estado enovelado. Portanto, a seqüência de aminoácidos de uma proteína, por si, carrega as informações necessárias para que esta alcance o estado enovelado e os estados intermediários para adquirí-lo (Anfinsen, 1973).

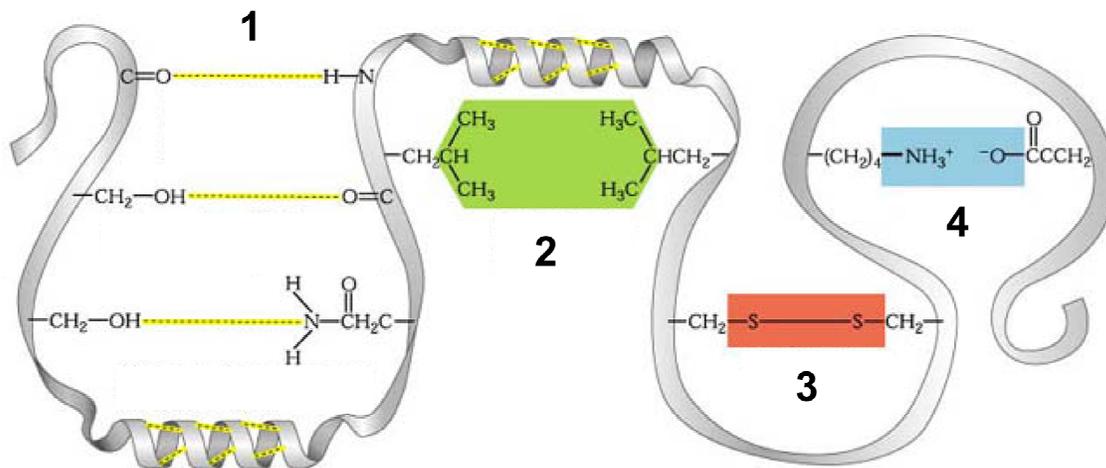


Figura 1: Tipos de interações observadas entre resíduos de aminoácidos em proteínas. 1) Ligações de hidrogênio; 2) Interação hidrofóbica; 3) Ponte dissulfeto; 4) Interação eletrostática. Adaptado de Alberts e colaboradores (Alberts *et al.*, 2003).

O processo de enovelamento inicia-se com a síntese da cadeia polipeptídica e termina com o chamado estado nativo da proteína. Embora o estado enovelado das proteínas possa ser conhecido através de técnicas como Ressonância Magnética Nuclear e Cristalografia de Raios X, o conjunto de fatores que governa o processo de enovelamento ainda não foram completamente compreendidos. Levinthal e colaboradores propuseram que o enovelamento de uma proteína *in vivo* não ocorre de maneira aleatória, mas segue um caminho bem definido (Levinthal, 1968). Dentre os mecanismos que governam o processo de enovelamento, têm sido sugeridos o colapso hidrofóbico dos resíduos apolares formando estruturas organizadas (Dill *et al.*, 1995) e a formação de elementos de

estrutura secundária seguido da interação entre esses arranjos para formar a estrutura terciária (Ptitsyn, 1973; Ptitsyn, 1995; Kim & Baldwin, 1990; Wetlaufer, 1973a, 1990; Wetlaufer *et al.*, 1973b). O processo de enovelamento ganha em complexidade quando as proteínas estudadas possuem resíduos de cisteínas que formam pontes dissulfeto. A presença de pontes dissulfeto é importante na manutenção do estado enovelado de muitas proteínas secretadas para o exterior do citoplasma. Em contraste, proteínas encontradas no citoplasma formam pontes dissulfeto apenas como parte de seu ciclo catalítico e não como uma forma de estabilização do estado enovelado (Hiniker & Bardwell, 2003).

Em 1961, Anfinsen e colaboradores mostraram que a formação de pontes dissulfeto em proteínas pode ocorrer espontaneamente *in vitro*. Utilizando como modelo a proteína ribonuclease A (Rnase A) que contém quatro pontes dissulfeto, os autores foram os primeiros a observar que apenas a informação contida na seqüência de aminoácidos da proteína é suficiente para seu enovelamento (Anfinsen *et al.*, 1961). Entretanto, Anfinsen e colaboradores observaram que embora a Rnase A pudesse se enovelar espontaneamente, a formação eficiente de pontes dissulfeto *in vitro* levava horas ou mesmo dias, enquanto a formação dessas pontes *in vivo* deveria ocorrer em um processo muito mais rápido, em segundos ou minutos após a síntese das proteínas. Além disso, a formação espontânea de pontes dissulfeto *in vitro* produziu proteínas que em sua maioria não apresentava atividade, sugerindo que pontes dissulfeto incorretas haviam sido formadas impedindo que a proteína alcançasse seu estado energeticamente mais favorável (Anfinsen *et al.*, 1961; Hiniker & Bardwell, 2003).

Tais observações sugeriram que as células possuem mecanismos de catálise da formação de pontes dissulfeto. A proteína PDI (do inglês “protein disulfide isomerase”) foi a primeira proteína descrita associada com a atividade de catálise de pontes dissulfeto em proteínas secretadas (Freedman, 1989; 1991). Recentemente, um grande número de outras proteínas tem sido identificado como enzimas que auxiliam o correto enovelamento de proteínas que possuem ponte dissulfeto. Um exemplo é a enzima DsbA, identificada por Bardwell e colaboradores em 1991 (Bardwell *et al.*, 1991). Os autores mostraram que linhagens de *Escherichia coli* com deleção do gene *dsbA* apresentavam deficiência na formação de pontes dissulfeto em proteínas secretadas (Bardwell *et al.*, 1991).

Durante as últimas décadas, estudos visando um melhor entendimento do processo de enovelamento de proteínas mostraram que cada célula possui uma maquinaria responsável exclusivamente por garantir que as cadeias polipeptídicas nascentes possam alcançar o estado nativo (Bardwell *et al.*, 1991). Essa maquinaria é formada basicamente por duas vias. Uma via é composta por proteínas que promovem a catálise do enovelamento, responsável por garantir um enovelamento rápido e eficiente, através da formação e isomerização de pontes dissulfeto em proteínas secretadas. A outra via é formada pelas chamadas chaperonas, proteínas que auxiliam outras proteínas a alcançarem o enovelamento correto. As chaperonas agem durante ou após o enovelamento, utilizando a energia de hidrólise do ATP para desenovelar proteínas mal formadas e permitir que elas assumam a configuração tridimensional correta. Estão também

associadas à prevenção da formação de agregados protéicos (Beissinger & Buchner, 1998; Ellis & Hartl, 1999).

As proteínas pertencentes à via de catálise podem ser receptores de elétrons agindo diretamente na formação das pontes dissulfeto das proteínas-alvo ou doadores de elétrons agindo na redução dessas pontes (Bardwell *et al.*, 1991). As proteínas dessa via são caracterizadas por possuírem um sítio ativo composto por dois resíduos de cisteína que vão do estado oxidado para o estado reduzido quando se dá a formação da ponte dissulfeto da proteína-alvo. As proteínas responsáveis pela formação ou redução de pontes dissulfeto em outras proteínas são denominadas de oxidoreduases de pontes dissulfeto e são caracterizadas por possuírem um sítio ativo composto por dois resíduos centrais em um arranjo do tipo Cys-X-X-Cys (Hatahet & Ruddock, 2007).

I.2 - Oxidoreduases de pontes dissulfeto

Em eucariotos e procariotos, a formação, redução e isomerização de pontes dissulfeto são processos catalizados por membros da superfamília das tioredoxinas (Kadokura *et al.*, 2003).

Embora pontes dissulfeto sejam essenciais para a estabilização da forma enovelada de muitas proteínas, elas são raramente encontradas em proteínas citoplasmáticas de organismos procarióticos e eucarióticos. Normalmente pontes dissulfeto são encontradas em proteínas direcionadas para compartimentos fora do citoplasma da célula. Em eucariotos, a maioria das proteínas contendo pontes dissulfeto são secretadas para o retículo endoplasmático, onde a formação da

ponte ocorre. Em procariotos, essas proteínas são secretadas e suas pontes dissulfeto formadas no compartimento periplasmático, localizado entre a membrana citoplasmática e a membrana externa. Existem razões para que a formação de pontes dissulfeto não ocorra no citoplasma. Enzimas citoplasmáticas, tais como a ribonuclease redutase e a metionina sulfoxido redutase, apresentam-se com suas pontes dissulfeto reduzidas em suas formas ativas (Rietsch & Beckwith, 1998). A presença de vias de oxidação de cisteínas para formação de pontes dissulfeto no citoplasma poderia causar a inativação dessas enzimas. Outra razão é a necessidade de uma conformação parcialmente desenovelada para que proteínas extra-citoplasmáticas sejam translocadas através da membrana (Randall & Hardy, 1995). A formação de pontes dissulfeto no citoplasma poderia dificultar a secreção de proteínas essenciais para as células. Além disso, existem inúmeras enzimas que possuem pontes dissulfeto que, quando ativas, podem ser nocivas para a célula, de forma que, para prevenir a atividade prematura dessas enzimas, a formação de tais pontes ocorre fora do citoplasma (Hiniker & Bardwell, 2003). Para garantir que a formação de pontes dissulfeto ocorra apenas em compartimentos especiais das células, organismos eucarióticos e procarióticos possuem fatores que impedem a formação dessas pontes no citoplasma. Um importante fator é o ambiente extremamente redutor do citoplasma, que pode ser exemplificado pela razão glutatona reduzida/oxidada de cerca de 200:1 em procariotos (Aslund *et al.*, 1999). No meio citoplasmático a presença dos sistemas tioredoxina/tioredoxina redutase, glutaredoxina/glutaredoxina redutase e glutatona/glutatona redutase auxiliam na manutenção dos resíduos de cisteína em seu estado reduzido (Prinz *et al.*, 1997).

Além disso, as enzimas que promovem a oxidação de cisteínas são quase ausentes no citoplasma, mas encontradas em abundância no periplasma e no retículo endoplasmático.

Em eucariotos as funções de oxidase e isomerase são exercidas por proteínas denominadas de “Protein Disulfide Isomerase” (PDI). Em procariotos, proteínas das vias oxidativa e isomerativa são identificadas pela sigla Dsb (“**Disulfide bond**”) e possuem a seqüência de resíduos CXXC no sítio ativo. As proteínas Dsb controlam a formação e o rearranjo de pontes dissulfeto durante o processo de enovelamento de proteínas secretadas em bactérias. A via oxidativa, formada pelas proteínas DsbA e DsbB, catalisa a formação de pontes dissulfeto, enquanto a via isomerativa, composta pelas proteínas DsbC, DsbD e DsbG, corrige pontes dissulfeto formadas entre pares de cisteínas incorretos (Hiniker & Bardwell, 2003) (Figura 2).

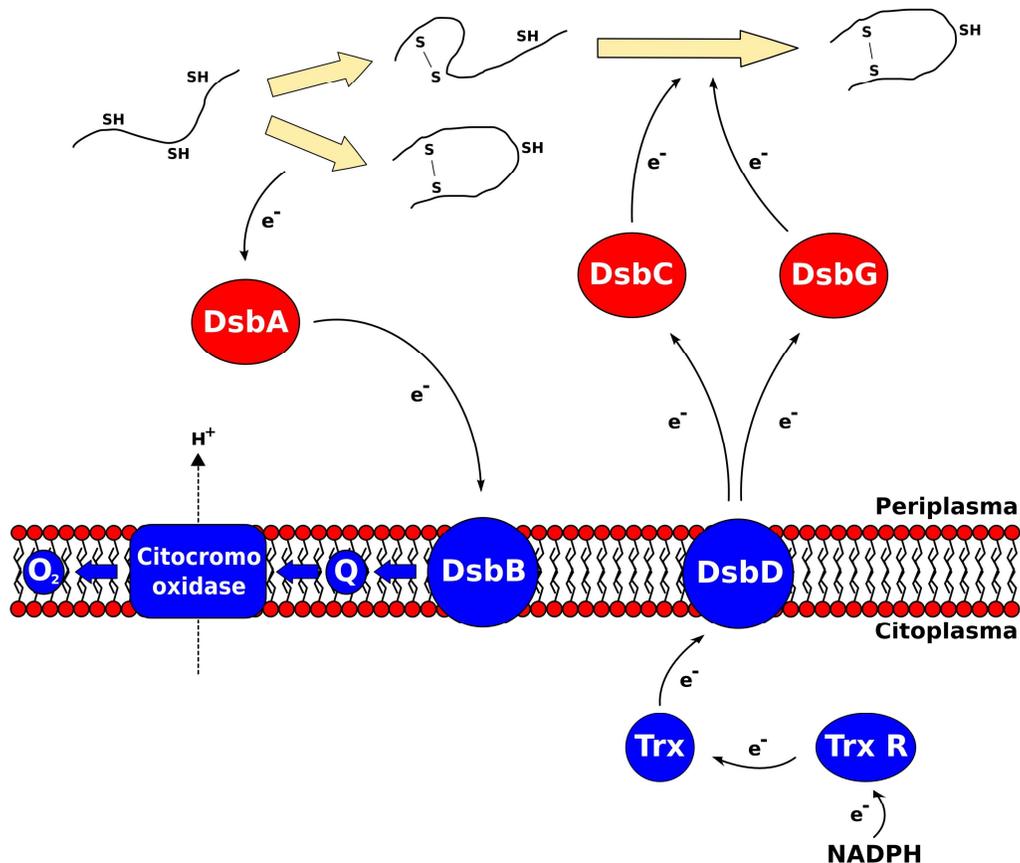


Figura 2: Figura esquemática das vias oxidativa (DsbA-DsbB) e isomerativa (DsbC-DsbD-DsbG) em bactérias gram-negativas em condições aeróbicas. As setas mostram o fluxo de elétrons durante a formação ou redução das pontes dissulfeto. As setas azuis mostram o fluxo de elétrons na via de transposto de elétrons. Adaptado de Kadokura e colaboradores (Kadokura *et al.*, 2003).

Os numerosos fenótipos associados à deleção dos genes *dsbA* e *dsbB* em linhagens de *E. coli* refletem a variedade de proteínas que necessitam de pontes dissulfeto para realizar apropriadamente suas funções. Entre elas estão proteínas necessárias para motilidade flagelar de bactérias e resistência a antibióticos (Missiakas *et al.*, 1993; Tomb, 1992). Outros exemplos são fatores de virulência, tais como as enterotoxinas I e II de *E. coli*, que possuem diversas pontes dissulfeto

e tornam-se inativos em linhagens contendo a deleção do gene *dsbA* (Watarai *et al.*, 1995; Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994). Ensaios com proteínas que contêm pontes dissulfeto como a fosfatase alcalina (PhoA), proteína de membrana externa OmpA e a β -lactamase, mostraram que tais pontes não são formadas em linhagens mutantes de *E. coli* deficientes em *dsbA* e as proteínas ficam sujeitas ao ataque de proteases (Bardwell *et al.*, 1991).

Todos esses dados sugeriram que a enzima DsbA fosse responsável pela oxidação de cisteínas para formação de pontes dissulfeto em proteínas secretadas para o periplasma. Entretanto, após a formação da ponte dissulfeto do substrato, as cisteínas presentes no sítio ativo da DsbA precisam ser novamente oxidadas para que a enzima volte à sua forma ativa. A oxidação da DsbA é catalisada pela proteína transmembrânica DsbB, que por sua vez torna-se reduzida. Foi mostrado que a deleção do gene *dsbB* em *E. coli* causa a acumulação da DsbA na forma reduzida com efeito semelhante aos resultados obtidos com a deleção do gene *dsbA* (Dailey *et al.*, 1993; Bardwell *et al.*, 1993; Missiakas *et al.*, 1995). O processo de oxidação da DsbB, por sua vez, pode ocorrer em condições aeróbicas ou anaeróbicas (Kobayshi *et al.* 1997; Bader & Bardwell, 2002). Em condições aeróbicas, DsbB transfere os dois elétrons vindos do processo de oxidação da DsbA para a ubiquinona oxidada. A forma reduzida da ubiquinona transfere então os elétrons para as proteínas citocromo oxidases que, por fim, os transfere para moléculas de oxigênio (Kadokura *et al.*, 2003) (Figura 2). Em condições anaeróbicas, a transferência de elétrons ocorre da DsbB para a menaquinona e desta para aceptores de elétrons (Kadokura *et al.*, 2003). A DsbB insere-se na membrana citoplasmática da bactéria através de quatro hélices transmembrânicas

e apresenta seus N- e C- terminais voltados para o citoplasma. Essa configuração permite a exposição para o periplasma de duas regiões, possuindo, cada uma delas, um par de cisteínas: Cys40 e Cys41 no primeiro domínio periplasmático e Cys104 e Cys130 no segundo (Kadokura *et al.*, 2003). Embora o primeiro par de cisteínas forme um arranjo do tipo CXXC a proteína DsbB não possui nenhum domínio com enovelamento do tipo tioredoxina como pode ser observado na estrutura cristalográfica do complexo entre DsbA e DsbB (Inaba *et al.*, 2006).

No caso de uma proteína apresentar múltiplas pontes dissulfeto em sua forma nativa, o sistema DsbA-DsbB nem sempre as forma corretamente (Bader *et al.*, 2000). Em um experimento de enovelamento *in vitro* utilizando a proteína Rnase A, Bader e colaboradores demonstraram que, embora a DsbA pudesse catalizar a formação de pontes dissulfeto, a Rnase A reenovelada era cataliticamente inativa, sugerindo que as pontes dissulfeto formadas não estavam corretas (Bader *et al.*, 2000). Quando esse mesmo experimento foi realizado na presença de um oxidante (Glutathione), a Rnase A adquiria sua forma ativa. Portanto, o que promove a correta formação de pontes dissulfeto *in vivo*?

A via isomerativa, formada pelas proteínas DsbC, DsbD e DsbG é responsável pelo rearranjo de pontes dissulfeto não nativas, através da formação das pontes dissulfeto entre pares de cisteínas corretos, impedindo assim que as proteínas sejam degradadas pela célula (Shevchik *et al.*, 1994; Missiakas *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1997). A proteína DsbC é homodimérica e cada monômero possui um domínio com enovelamento tipo tioredoxina apresentando a seqüência característica CXXC e um domínio responsável pela dimerização (Shevchik *et al.*, 1994). Acredita-se que a DsbC forme uma ponte dissulfeto com o substrato até

que diferentes combinações entre pares de cisteínas sejam testados e a ponte mais estável seja formada (Bader & Bardwell, 2001). A proteína DsbG possui atividade de isomerase semelhante a DsbC, mas interage com substratos específicos (Andersen *et al.*, 1997). De modo similar ao que ocorre na via oxidativa, a via isomerativa também possui uma proteína de membrana (DsbD), responsável por reativar as proteínas periplasmáticas DsbC e DsbG, agindo como doadora de elétrons para tais proteínas. Os elétrons são transferidos via NADPH passando pela tioredoxina (Trx) via tioredoxina redutase (Trx R), ou seja, a DsbD mantém as proteínas DsbC e G reduzidas às custas da oxidação do NADPH no citoplasma (Kadokura *et al.*, 2003) (Figura 2).

I.3 – Oxidoredutases de pontes dissulfeto da família DsbA

A DsbA foi identificada inicialmente em *Escherichia coli* como sendo uma proteína de 21 kDa presente no periplasma da bactéria (Bardwell *et al.*, 1991). Seu sítio catalítico apresenta um arranjo Cys-Pro-His-Cys, altamente conservado nos membros da família (Bardwell *et al.*, 1991). Estudos mostraram que a DsbA não apresenta especificidade por nenhuma proteína, estando qualquer proteína periplasmática, que apresente pares de cisteínas, sujeita à ação desta (Kadokura *et al.*, 2003). Além disso, a DsbA normalmente age sobre cada cisteína aleatoriamente, de forma que é possível que pontes dissulfeto sejam formadas entre pares de cisteínas incorretos.

O mecanismo de ação da DsbA tem sido extensivamente estudado e várias propriedades funcionais e estruturais dessa enzima foram determinadas. De uma

maneira geral, as pontes dissulfeto localizam-se no interior da proteína em ambiente hidrofóbico. Entretanto, a cisteína N-terminal das DsbAs está localizada na superfície da proteína sendo esta a primeira a interagir com a cisteína do substrato. Portanto, a reação entre a DsbA oxidada e o seu substrato acontece em dois passos e envolve um intermediário covalente entre as duas proteínas (Figura 3). Após a oxidação da proteína alvo, a DsbA fica no estado reduzido e é reoxidada pela proteína DsbB. Através de processo semelhante ao que ocorre entre a DsbA e seu substrato a reoxidação da DsbA passa por um estado intermediário covalente entre DsbA e DsbB (Bader *et al.*, 1999).

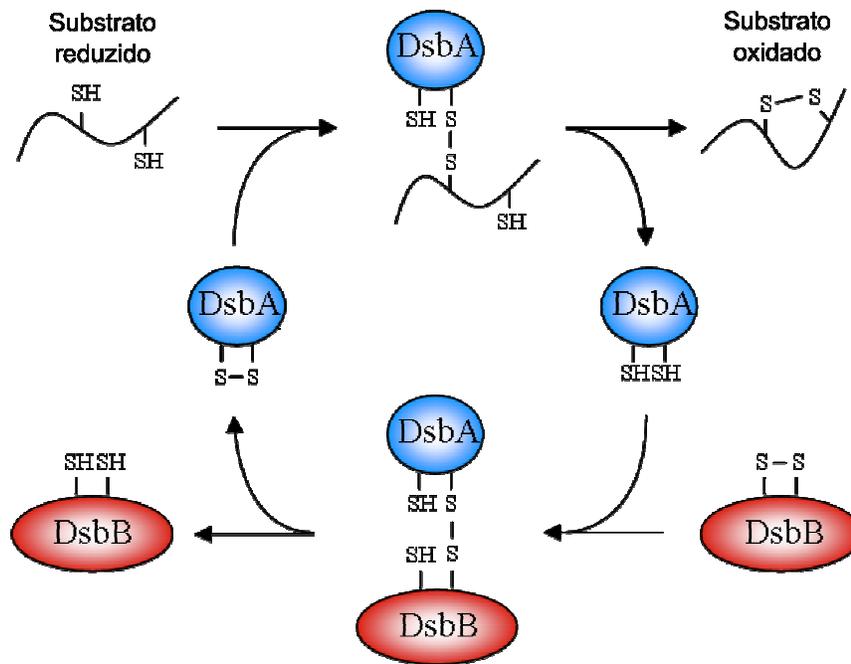


Figura 3: Ciclo catalítico da DsbA.

As estruturas cristalográficas de dois membros da família das DsbAs foram relacionadas, a DsbA de *E. coli* que vamos designar como *EcDsbA* (Martin *et al.*,

1993) e sua homóloga de *V. cholerae*, que vamos designar como *VcDsbA* (Hu *et al.*, 1997). A DsbA é formada por 2 domínios, um deles apresentando um enovelamento tipo tioredoxina (domínio A) e o segundo, composto exclusivamente por hélices α (domínio B), formado pela inserção de aproximadamente 65 resíduos após a fita β_3 do domínio tioredoxina (Figura 4).

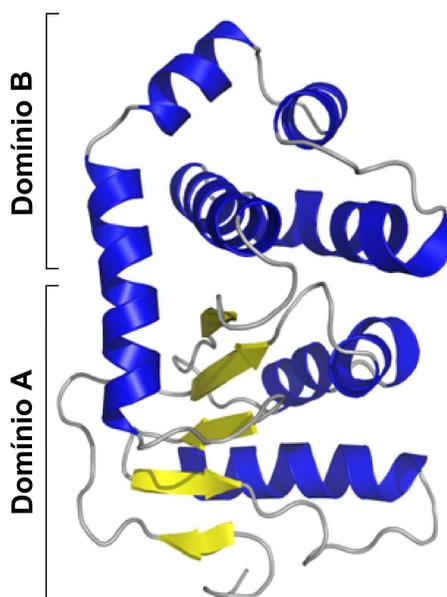


Figura 4: Estrutura global da proteína DsbA de *E. coli*.

A natureza altamente oxidante da DsbA foi comprovada através de ensaios funcionais com glutatona para a determinação da constante de equilíbrio (K_{eq}) da reação $DsbA_{oxi} + 2GSH \leftrightarrow DsbA_{red} + GSSG$. A partir da constante de equilíbrio e do potencial redox do par GSSG/GSH (glutatona oxidada/reduzida), o potencial redox da DsbA de *E. coli* foi calculado em -89 mV, fazendo desta a proteína mais oxidante já estudada (Wunderlich & Glockshuber, 1993). A baixa constante de equilíbrio observada mostra que a ponte dissulfeto da DsbA é altamente instável e

reativa. A instabilidade da forma oxidada da DsbA é o que direciona a reação de oxidação entre a DsbA e a proteína substrato. A alta reatividade do sítio ativo da DsbA é atribuído à cisteína N-terminal do arranjo CPHC, que apresenta um pKa notavelmente baixo (aproximadamente 3), enquanto o pKa normalmente encontrado para resíduos de cisteínas em proteínas é de aproximadamente 9 (Guddat *et al.*, 1997a). Tal valor de pKa faz com que, em pH fisiológico, a cisteína N-terminal esteja desprotonada e requeira que algum resíduo da vizinhança estabilize seu anion tiolato. A análise da estrutura cristalográfica da *EcDsbA* levou à formulação da hipótese de que a estabilização do íon tiolato é promovida por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas no sítio ativo envolvendo, principalmente, o resíduo de histidina encontrado no arranjo CPHC, estando tal resíduo estruturalmente próximo da cisteína N-terminal (Guddat *et al.*, 1997a). Além disso, a análise da estrutura cristalográfica mostrou que a cisteína N-terminal está localizada no início da hélice α_1 , de forma que o tiolato da cisteína é também estabilizado pela carga parcial positiva do dipolo da hélice. Comprovando a importância da histidina do arranjo CPHC para a atividade da *EcDsbA*, Guddat e colaboradores mostraram que mutações nesse resíduo levam a uma dramática diminuição (1000 x) no poder de oxidação da enzima (Guddat *et al.*, 1997a). A partir das estruturas cristalográficas dos mutantes de *EcDsbA* H32Y, H32L e H32S foi observado que essa diminuição no poder de oxidação dos mutantes não pode ser atribuída a mudanças conformacionais causadas pela substituição do resíduo de histidina, mas sim pela ausência das interações eletrostáticas das quais este resíduo participa na enzima selvagem (Guddat *et al.*, 1997a).

A importância dos resíduos centrais do arranjo CXXC fica clara numa comparação entre a DsbA e a tioredoxina. A tioredoxina possui um potencial redox de -270 mV, o que a caracteriza como uma proteína com função redutora de pontes dissulfeto. Da mesma forma que na DsbA, os resíduos centrais no arranjo CXXC da tioredoxina (CGPC) são de extrema importância para sua atividade redutora. A mutação de tais resíduos para aqueles da DsbA (CPHC) causou um aumento significativo no potencial redox, mudando seu caráter de redutora para oxidante (Jonda *et al.*, 1999). Esses dados confirmam a importância do arranjo do sítio ativo para a atividade redox dessa família de proteínas.

Além dos resíduos centrais da seqüência CXXC outros resíduos pertencentes à vizinhança do sítio ativo também têm sido envolvidos na estabilidade da cisteína N-terminal através de interações eletrostáticas (Gane *et al.*, 1995).

I.4 - Proteínas da família DsbA em *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa fitopatogênica que causa prejuízos importantes para a produção de frutas cítricas, café e uva. A doença chamada Clorose Variegada de Citros (CVC), causada pela *X. fastidiosa*, provoca o aparecimento de lesões nas folhas, assim como o endurecimento, diminuição e aspecto envelhecido no fruto.



Figura 5: Sintomas de contaminação pela bactéria *X. fastidiosa* nas folhas e frutos. Fonte: Fundecitrus.

O mecanismo de patogenicidade da *X. fastidiosa* ainda não foi completamente compreendido. Sabe-se que a bactéria afeta o desenvolvimento das plantas causando um desbalanceamento do fornecimento de água para as partes aéreas, assim como pela produção de fitotoxinas. A falta de água é causada pela oclusão do xilema da planta devido ao alojamento e multiplicação da bactéria (Simpson *et al.*, 2000). A infecção de pomares pela *X. fastidiosa* no estado de São Paulo e em partes de Minas Gerais é preocupante, pois um levantamento feito em 2005 mostrou que 43% das plantas estavam contaminadas e os prejuízos financeiros chegaram à ordem de 200 milhões de dólares (Fundecitrus, 2005). Não existe método curativo para a doença, sendo o controle químico dos vetores e a inspeção rotineira dos pomares as formas atuais de controle da CVC, podendo chegar, em casos mais graves, à erradicação das árvores contaminadas.

A análise do genoma da *X. fastidiosa* mostrou a presença de dois genes, anotados sob os códigos XF1436 e XF1437 (*Xylella fastidiosa* Genome Project) que codificam duas proteínas da família das DsbAs, tais proteínas serão a partir

de agora, designadas *XfDsbA* e *XfDsbA2* respectivamente. A *XfDsbA* é constituída por 194 aminoácidos, enquanto sua homóloga *XfDsbA2* possui 260 aminoácidos. O alinhamento das seqüências de aminoácidos dessas duas proteínas mostrou 41% de identidade. Apesar da região do sítio ativo ser bastante conservada, existe uma diferença intrigante nos arranjos CXXC, onde estão localizadas as cisteínas formadoras de ponte dissulfeto. A *XfDsbA* apresenta a seqüência CPHC, característica dos membros da família, enquanto em *XfDsbA2* observa-se a substituição do resíduo de histidina por uma alanina. Como dito anteriormente, tal resíduo de histidina tem sido descrito como essencial para o mecanismo catalítico das DsbAs (Guddat *et al.*, 1997a). Além disso, a presença de mais de uma proteína pertencente à família das DsbAs em um mesmo organismo não é comum, tendo sido identificadas poucas espécies que possuem duas proteínas homólogas à DsbA contendo a seqüência CXXC. Na maioria desses organismos uma das proteínas contém o sítio ativo conservado CPHC e a segunda proteína contém a mesma substituição do resíduo de histidina por alanina (CPAC) observada em *X. fastidiosa* (Figura 6). A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis*, causadora do cancro cítrico, também possui dois genes que codificam proteínas pertencentes a família das DsbAs, sendo que uma delas possui a mesma substituição do resíduo de histidina por uma alanina na seqüência CXXC (Figura 6). Recentemente, ensaios de complementação com as duas proteínas da família das DsbAs encontradas na bactéria adaptada ao frio *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*PhDsbA* e *PhDsbA2*) mostraram que ambas as proteínas foram capazes de restaurar a motilidade celular de linhagens de *E. coli* que apresentavam deleção do gene *dsbA*, indicando que ambas as proteínas

devem possuir atividade de oxidoreductase de pontes dissulfeto (Madonna *et al.*, 2006).

<i>EcDsbA</i> :	APQVLEFFSFFCPHCYQFE
<i>VcDsbA</i> :	SPVVSEFFSFYCPHCNTFE
<i>XfDsbA</i> :	KIEVVEIFGYTCPHCAHFD
<i>XacDsbA</i> :	KVEVTEVFGYTCPHCAHFE
<i>PhDsbA</i> :	TPQVTEYFSFYCPHCFKFE
<i>XfDsbA2</i> :	KIEVVEVFGYVCPACFQFQ
<i>XacDsbA2</i> :	KIEVAEVFGYVCPACNAFQ
<i>PhDsbA2</i> :	KPEVKEFFSFYCPACNNME

Figura 6: Alinhamento seqüencial da região do sítio ativo de membros da família DsbA. *Ec* - *Escherichia coli*, *Vc* - *Vibrio cholerae*, *Xf* - *Xylella fastidiosa*, *Xac* - *Xanthomonas axonopodis* e *Ph* - *Pseudoalteromonas haloplanktis*.

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas DsbA de *X. fastidiosa* com suas homólogas com estrutura tridimensional resolvida mostrou que a proteína *XfDsbA* apresenta 21% de identidade com a proteína *EcDsbA* e 23% com a proteína *VcDsbA*. Por outro lado, *XfDsbA2* possui 24% de identidade com *EcDsbA* e 23% com a *VcDsbA*. A caracterização de duas proteínas de um mesmo organismo pertencentes à família das DsbAs, uma delas apresentando uma substituição do resíduo His do sítio ativo traz importantes contribuições para uma melhor descrição do mecanismo catalítico desta família de proteínas.

II - Objetivos

O trabalho aqui apresentado teve como objetivo a caracterização estrutural e funcional das oxidoreduases de pontes dissulfeto (DsbA) da bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa*. A determinação da estrutura tridimensional dessas proteínas, aliada à determinação de seus potenciais redox, pretende contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de ação das DsbAs, enzimas essenciais no processo de enovelamento de diversas proteínas secretadas. No caso particular das DsbAs de *X. fastidiosa*, a existência de duas enzimas dessa família em um mesmo organismo e a substituição do resíduo de histidina do sítio ativo da proteína *XfDsbA2* levantam questões interessantes a respeito do papel de tais enzimas na célula e seus mecanismos moleculares.

Para atingir o objetivo proposto foi necessário o aprendizado das técnicas que envolveram a produção recombinante e a obtenção da estrutura cristalográfica da proteína *XfDsbA*, bem como de técnicas bioquímicas e espectroscópicas visando a determinação das propriedades redox das proteínas e de seus mutantes. O aprendizado dessas técnicas também fez parte dos objetivos desse trabalho de doutorado.

III - Materiais e Métodos

III. 1. Desenho e preparação dos oligonucleotídeos

A partir da seqüência dos genes anotados sob os códigos XF1436 e XF1437, disponíveis nos banco de dados “*Xylella fastidiosa* Genome Project”, (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>), os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados acrescentando-se sítios para as enzimas de restrição NdeI (CATATG) na extremidade 3’(forward) e XhoI (CTCGAG) na extremidade 5’(reverse) (Tabela 2). As DsbAs são proteínas periplasmáticas e apresentam em seu N-terminal um peptídeo sinal, que foram excluídos das construções. Essas seqüências foram preditas através do programa SignalP de predição de peptídeo sinal em proteínas (Nielsen *et al.*, 1997). Os oligonucleotídeos foram adquiridos comercialmente junto à Invitrogen Brasil Custom Primers Life Technologies com seus respectivos certificados de análises. Os oligonucleotídeos foram diluídos em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e quantificados através de leitura da absorção a 260 nm. Os oligonucleotídeos foram utilizados na concentração de 100 µM.

III. 2. Amplificação dos genes

A técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) (Mullis, 1990) foi utilizada para a clonagem dos genes que codificam as proteínas de interesse. As reações foram feitas utilizando como molde o DNA genômico da bactéria *X. fastidiosa* em um aparelho termociclador GeneAmp/ PCR System 9700/Applied

Biosystems. A reação de PCR foi feita em um volume final de 100 µl contendo 5 µl de DNA genômico de *X. fastidiosa*, 1µl de oligonucleotídeos direto (forward) e reverso (reverse) específicos para cada gene a 100 µM, 2,5 µl de dNTP mix a 10 mM, 10 µl do tampão Taq DNA Polimerase 10 X (100mM Tris-Hcl pH 8.8, 500mM KCl, 0,8% Nonidet P40), 2,5 µl de MgCl₂ 50 mM e 2,5 u da enzima Taq DNA Polimerase (5 u/µl) completando o volume restante com água milli-Q. A reação de PCR foi realizada iniciando-se com desnaturação a 95 °C por 1 minuto seguida por anelamento durante 1 minuto à temperatura de 56 °C, ajustada considerando-se a T_m (“melting temperature”) dos oligonucleotídeos utilizados, e por uma extensão final a 72 °C por 1 minuto. Foram feitos então 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão e após o término dos ciclos a reação foi completada com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para cada construção desenhada (Tabela 1) foram feitas três reações com quantidades distintas (1%, 2% e 5%) do agente DMSO (Dimethyl sulfoxide). O DMSO ajuda a aumentar a produção, eficiência e especificidade das ampliações por PCR. Os produtos de amplificação foram purificados com o “kit” *QIAquick Gel Extration Kit* (QIAGEN).

Tabela 1: Construções produzidas para os genes que codificam as proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2*.

Gene	Oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R)	Número de pares de bases	Proteína	Peso Molecular (kDa)
XF1436	XF1436R (5'-CTCGAGTCACCGGC CATGTGAGGCAG-3')	582	<i>XfDsbA</i>	23,1
	XF1436F (5'-CATATGAATCACCTT CCGGTTGTTGG-3')			
XF1437	XF1437R (5'-CTCGAGCTACTTACC AAGCGACTTACGC-3')	726	<i>XfDsbA2</i>	28,2
	XF1437F (5'-CATATGCAAGCTAAG GATGGTAGTGCGG-3')			

III. 3. Clonagem e subclonagem dos genes

Os produtos das reações de PCR foram ligados no vetor de clonagem pGEM (Promega) utilizando-se o Kit pGEM-T- Easy/Vector System I/Promega: tampão T4 Ligase 2x Rapid Ligation, pGEM-T-easy (50 ng/ μ l), T4 DNA Ligase (100u). Tal vetor possui 3015 pb, α -complementação e o gene que confere resistência à ampicilina. Para facilitar a ligação de produtos de PCR o vetor pGEM possui a base timina nas extremidades 3'. Bactérias competentes das linhagens de *E. coli* DH5 α e *E. coli* JM109 foram transformadas com o vetor pGEM contendo o gene de interesse. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (1 % tripton, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl, 1,5 % Agar) contendo

100 µg/mL de ampicilina e 20 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo ultrapure/USB). As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite e colônias de coloração branca foram selecionadas e inoculadas em 2mL de meio LB líquido (1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl) contendo ampicilina 100µg/mL. As culturas cresceram durante a noite a 200rpm e 37°C. Os plasmídeos contendo o gene de interesse foram extraídos das células e digeridos com as enzimas de restrição NdeI (1 u/µl) e XhoI (1 u/µl) no tampão R+ 10X (100mM Tris-HCl pH 8.5, 10mM MgCl₂, 100mM KCl e 0.1mg/ml soro de albumina bovina) por um período de 2 horas a 37°C. O tamanho dos insertos foi confirmado por gel de eletroforese em agarose 1%. A verificação da seqüência dos genes clonados foi feita utilizando o seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem). As seqüências obtidas foram submetidas à análise utilizando o programa Chromas (Technelysium Pty. Ltd, Helensvale, Queensland, Australia) e comparadas às seqüências dos genes depositadas nos bancos de dados de *X. fastidiosa*.

Após a confirmação da seqüência dos genes e a purificação dos insertos, foi realizada a ligação em vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen). Tal vetor possui 5369 pb e contém um gene que confere resistência ao antibiótico canamicina. Para os vetores de expressão pET28a(+) contendo os genes de interesse, o processo de transformação foi feito pelo método de choque térmico (Mandel & Higa, 1970) utilizando células competentes das linhagens *E. coli* BL21(SI), C41(DE3) e C43(DE3). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina e deixadas a 37 °C durante a noite.

III. 4. Mutagênese sítio dirigida

Os oligonucleotídeos contendo as substituições necessárias para produção dos mutantes *XfDsbA_{T157V}* e *XfDsbA2_{T203V}* foram desenhados utilizando o programa “QuikChange® Primer Design Program”, (STRATAGENE).

A reação de PCR foi feita em um volume final de 50 µl contendo 2 µl (para *XfDsbA_{T157V}*) e 3 µl (para *XfDsbA2_{T203V}*) dos vetores de expressão pET28a(+) contendo os genes que codificam as proteínas selvagens, 2,5 µl de oligonucleotídeos direto (forward) e reverso (reverse) específicos para cada gene a 12,5 pmol, 7,5 µl de dNTP mix a 2 mM, 10 µl do tampão de reação 10 X (200 mM Tris-Hcl pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA), 1,0 µl de MgSO₄ a 20 mM e 1,0 µl da enzima *PfuTurbo* DNA polimerase (2,5 u/µl) completando o volume restante com água milli-Q. A reação de amplificação foi realizada iniciando-se com desnaturação a 95 °C por 1 minuto seguida por 18 ciclos de desnaturação (95 °C por 30 seg), anelamento (55 °C por 1 min) e extensão (68 °C por 8 min) e após o término dos ciclos a reação foi mantida a 4 °C. Após a reação de amplificação as amostras foram incubadas com 0,5 µl de endonuclease *Dpn* I (20 u/µl) durante 1 hora a 37 °C. A endonuclease *Dpn* I é específica para DNA metilado e é utilizada para digerir o DNA utilizado como “template” que possui o gene que codifica a proteína selvagem. Os vetores contendo os genes mutados foram transformados em bactérias competentes das linhagens de *E. coli* DH5α que foram plaqueadas em meio LB sólido (1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl, 1,5 % Agar) contendo 50 µg/ml de canamicina. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite e colônias foram

selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido (1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl) contendo 50µg/ml de canamicina e deixadas sob agitação a 200 rpm e 37 °C durante a noite. Os plasmídeos contendo o gene de interesse foram extraídos das células e a verificação da seqüência foi feita através de sequenciamento. As seqüências obtidas foram submetidas à análise utilizando o programa Chromas (Technelysium Pty. Ltd, Helensvale, Queensland, Australia) e as mutações foram verificadas.

Após a confirmação da mutação nos genes de interesse os plasmídeos foram purificados e transformados em células competentes da linhagem *E. coli* C43(DE3). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina e deixadas a 37 °C durante a noite.

III. 5. Expressão das proteínas recombinantes em larga escala

As células das linhagens de *E. coli* C41(DE3) ou C43(DE3) transformadas pelo vetor pET28a(+) contendo os genes de interesse, mantidas a -80°C, foram plaqueadas em meio LB sólido na presença de canamicina (50 µg/mL) e deixadas durante a noite a 37°C. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de LB líquido com 50 µg/mL de kanamicina. O pré – inóculo foi incubado durante a noite a 37 °C sob agitação. Cada pré – inóculo foi vertido em 500 ml de meio de cultura LB adicionado de canamicina (50 µg/mL) e deixado sob agitação a 37 °C até que a densidade óptica do meio de cultura estivesse entre 0,6 – 0,8 (DO_{600nm}). A indução foi feita com 0,4 mM de IPTG. Alcançou-se um maior rendimento incubando a

cultura a 37°C sob agitação por um período de 5 horas após indução. As células foram então sedimentadas por centrifugação (3000 x g, 30 min) e o “pellet” ressuspendido em 20 mL de tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio, 0.5 M de NaCl e 5 mM de Imidazol, pH 7,4) para cada 0,5 L de cultura de células. As amostras foram mantidas em banho de gelo e a lise celular foi realizada em 10 ciclos de 30 segundos de sonicação e 30 segundos de intervalo com amplitude de 40 % (sonicador Sonics Vibra-Cell). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g por 30 minutos a 4 °C para separação das frações solúvel e insolúvel do lisado. Adicionou-se sulfato de estreptomicina 2 % (p/v) ao sobrenadante e a amostra foi deixada a 4°C sob agitação lenta por 45 minutos para precipitação do DNA. Realizou-se nova centrifugação (20000 x g, 30 min) e recuperou-se o sobrenadante para a purificação.

A expressão das proteínas mutantes *XfDsbA_{T157V}* e *XfDsbA_{T203V}* segue o mesmo protocolo das proteínas selvagens.

III. 6. Marcação com selenometionina

Células da linhagem *E. coli* C43 (DE3) transformadas com o vetor contendo o gene de interesse foram retiradas do estoque a -80°C e estriadas em meio de cultura LB sólido. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de LB líquido adicionado de 50 µg/mL de canamicina. Os pré-inóculos foram deixados durante a noite a 37 °C sob agitação. 2 mL do pré-inoculo foram centrifugados e as células foram ressuspendidas em 1mL de meio mínimo M9 contendo 6,8 g/L de Na₂HPO₄ pH 7,3; 3 g/L de KH₂PO₄; 0,5 g/L de NaCl; 2 mM de MgSO₄; 1% glicose; 100µM

CaCl₂; 30 μM tiamina; 18,7 mM NH₄Cl, adicionado de alguns compostos metálicos (50 μM FeCl₃; 10 μM MnCl₂; 10 μM ZnCl₂; 2 μM CoCl₂). Este volume foi vertido em 500 mL do mesmo meio adicionado de 50 μg/mL de canamicina e a cultura foi deixada sob agitação a 37 °C até atingir a densidade óptica de 0.6 (DO_{600nm}), em tempo médio de 10 à 12 horas. Antes da indução, adicionou-se ao meio 100 mg/L dos aminoácidos lisina, fenilalanina e treonina; 50 mg/L dos aminoácidos isoleucina e valina e 60 mg/L de selenometionina. A expressão da proteína foi induzida com a adição de 0,4 mM de IPTG. Alcançou-se um maior rendimento incubando a cultura a 37°C sob agitação por um período de 6 horas após indução. A lise celular e precipitação do DNA foram feitos como descrito na sessão anterior. A fração solúvel da amostra foi levada à purificação. Devido à alta sensibilidade da SeMet à oxidação, todas as soluções utilizadas foram degaseificadas previamente aos experimentos de cristalização, com o intuito de homogeneizar as amostras contendo a proteína marcada com SeMet na forma não oxidada.

III. 7. Purificação

As proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* foram purificadas por cromatografia em 3 etapas. Ao final de cada etapa de purificação alíquotas das frações purificadas eluídas das colunas foram analisadas por SDS-PAGE, em géis de 12,5 % de poliacrilamida. As amostras foram diluídas na proporção 1:1 com tampão de amostra, aquecidas a 100°C por 10 min e aplicadas nos géis. Após a purificação, a proteína eluída foi dialisada contra tampão 10 mM Tris-HCl e 20 mM NaCl pH 7.5 adicionado de 5 mM de DTT.

a) Cromatografia por afinidade

A purificação foi feita utilizando-se a coluna de Hi-trap Chelating de 5 ml (Amersham-Biosciences) montada em um sistema FPLC (Pharmacia). A coluna foi inicialmente carregada com 100 mM NiSO₄. A amostra foi aplicada na coluna a um fluxo de 1.5 mL/min, prosseguindo-se com a lavagem da coluna com 30 mL do tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio, 0.5 M de NaCl e 5 mM de Imidazol, pH 7,4). A proteína de interesse foi eluída por um gradiente de 0 a 0.8 M de Imidazol em um volume de 60 mL.

b) Cromatografia por troca iônica

Essa etapa cromatográfica foi utilizada em conjunto com a cromatografia por afinidade com o intuito de se obter amostras de alta pureza (>95%) para os ensaios de cristalização. A purificação foi feita utilizando-se a coluna, Hitrap SP HP de 5 mL (Amersham Biosciences) em um sistema FPLC (Pharmacia). As frações eluídas da cromatografia de afinidade contendo a proteína de interesse foram reunidas e dialisadas contra o tampão de ligação (Tampão A: 10 mM citrato de sódio pH 5,5, 20 mM NaCl). A coluna foi equilibrada com 20 mL de tampão de ligação e a amostra aplicada na coluna a um fluxo de 1.5 mL/min, prosseguindo-se com a lavagem da coluna com 30 mL do tampão de ligação. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi feita utilizando-se um gradiente de 0 – 1M de NaCl em um volume de 40 mL.

c) Cromatografia por filtração em gel

Essa etapa cromatográfica foi utilizada em conjunto com a cromatografia por afinidade previamente à realização dos ensaios funcionais. As frações eluídas da cromatografia de afinidade contendo a proteína de interesse foram reunidas e concentradas por diálise inversa utilizando PEG 20000 até um volume final de 2 mL. A coluna utilizada (Superdex 75 16/60) foi equilibrada em tampão 20mM fosfato de sódio pH 7,0, 200mM NaCl. A amostra foi aplicada na coluna e submetida a um fluxo de 1 mL/min.

A proteína *XfDsbA* marcada com SeMet foi purificada seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. A incorporação dos átomos de Se foi verificada por espectrometria de massas utilizando um espectrômetro Q-Tof Ultima API (Micromass, Manchester, UK) pela técnica de “electrospray” no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Os dados foram processados pelo programa MassLynx (v. 4.0). Os experimentos foram realizados com auxílio do Dr. Fábio Gozzo do LNLS.

A purificação dos mutantes *XfDsbA*_{T157V} e *XfDsbA*_{T203V} seguiu o mesmo protocolo das proteínas selvagens.

III. 8. Dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular foi medido em um espectropolarímetro Jasco-810 com um sistema do tipo Peltier PFD 425S para controle de temperatura. O experimento foi realizado a 20°C usando uma largura de banda de

1 nm e um caminho ótico de 1 mm. As amostras de proteínas foram utilizadas na concentração de 0.1 mg/mL em 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl. Os espectros foram adquiridos entre 190 a 250 nm. Subtraiu-se dos espectros das proteínas o espectro do tampão utilizado (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl).

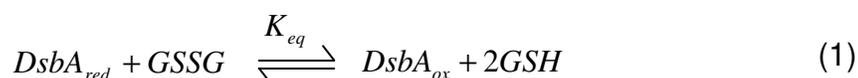
III. 9. Determinação do potencial de oxidoredução

Experimentos realizados por Wunderlich e colaboradores (Wunderlich & Glockshuber, 1993) utilizando a proteína *EcDsbA* mostraram que, devido ao “quenching” da fluorescência de um de seus triptofanos pela ponte dissulfeto, existe uma diferença significativa entre as intensidades máximas de fluorescência emitida pelas formas oxidada e reduzida da enzima. Essa característica intrínseca da *EcDsbA* foi explorada na realização dos ensaios funcionais para a determinação do seu potencial redox na presença do par GSSG/GSH (Wunderlich & Glockshuber, 1993).

As proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* apresentam comportamento semelhante ao da *EcDsbA* no que diz respeito à emissão de fluorescência nos estados oxidado e reduzido, permitindo que ensaios funcionais para a determinação do potencial redox das enzimas fossem realizados com base no trabalho de Wunderlich e colaboradores. Para isso, diferentes amostras das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* foram dialisadas contra os seguintes tampões: 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₃ pH 6.0; 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₃ pH 7.0; 100 mM Tris-HCl pH 8.0, contendo 1mM de EDTA. Os tampões foram deareados sob um fluxo de nitrogênio durante 3 minutos para remoção das moléculas de oxigênio presentes na solução.

Essa etapa é de extrema importância para o sucesso dos ensaios, pois a proteína é muito susceptível à oxidação pelo oxigênio ambiente. A concentração de cada alíquota foi medida através da absorção em 280 nm considerando-se coeficientes de extinção molar de 21740 M⁻¹ cm⁻¹ para a X/DsbA e de 24300 M⁻¹ cm⁻¹ para a X/DsbA2. A verificação do estado redox da proteína após a diálise foi realizada através da comparação com o espectro de fluorescência da proteína tratada com agente oxidante (25 µM Diamida) e agente redutor (10 mM TCEP). Para estudar o equilíbrio redox das proteínas na presença de glutathione, o máximo de intensidade de fluorescência (comprimento de onda 333 nm) foi medido. Para realizar o experimento de titulação com glutathione, a proteína no estado oxidado (0,5 µM) foi incubada a 30°C na presença de 0,1 mM de GSSG (glutathione oxidada) e em diferentes concentrações de GSH (glutathione reduzida; 0-2,4 mM). O tempo de incubação necessário para a reação alcançar o equilíbrio é dependente do pH e foi otimizado medindo-se o máximo de intensidade de fluorescência em intervalos de tempo definidos, até que não mais se observasse alteração. Após o equilíbrio da reação ter sido alcançado, a intensidade máxima de fluorescência emitida foi medida durante 10 segundos em intervalos de 1 segundo. A média da intensidade dos dez pontos obtidos foi calculada. Para cada pH, três medidas independentes foram feitas para cálculo do desvio padrão.

Quando equilibrada com glutathione, a reação de oxido-redução da DsbA pode ser expressa pela seguinte equação:



onde a expressão para a constante de equilíbrio da reação é dada por:

$$K_{eq} = \frac{[DsbA_{ox}][GSH]^2}{[DsbA_{red}][GSSG]} \quad (2)$$

Se A é a quantidade de DsbA no estado oxidado presente após equilíbrio da reação, a proporção de DsbA no estado reduzido (R) pode ser expressa pela seguinte equação:

$$R = 1 - A = \frac{DsbA_{red}}{DsbA_{red} + DsbA_{ox}} \quad (3)$$

Através das medidas de emissão de fluorescência das amostras para diferentes concentrações de GSH podemos obter R a partir da equação abaixo:

$$R = \frac{(F - F_{ox})}{(F_{red} - F_{ox})} \quad (4)$$

onde F_{ox} é a intensidade de fluorescência máxima (valor fixo) para a enzima completamente oxidada na amostra, F_{red} é a intensidade de fluorescência máxima (valor fixo) para a enzima completamente reduzida na amostra e F é a intensidade de fluorescência máxima (valor variável) para a amostra contendo uma mistura de enzima oxidada e reduzida.

Combinando as equações 2 e 3 pode-se encontrar uma expressão que relaciona as grandezas R e K_{eq} .

$$R = \frac{[GSH]^2/[GSSG]}{K_{eq} + [GSH]^2/[GSSG]} \quad (5)$$

Essa equação é equivalente à equação de Michaelis-Menten. A partir do gráfico de $([GSH]^2/[GSSG])/R$ em função de $[GSH]^2/[GSSG]$ a constante de equilíbrio K_{eq} pode ser obtida pela intersecção da curva com o eixo horizontal.

As concentrações de GSH e GSSG no equilíbrio foram calculadas através das equações abaixo:

$$[GSH] = [GSH_0] - 2R[DsbA_0] \quad (6)$$

$$[GSSG] = [GSSG_0] + R[DsbA_0] \quad (7)$$

onde $[GSH_0]$ e $[GSSG_0]$ são as concentrações iniciais de GSH e GSSG respectivamente e $[DsbA_0]$ é a concentração inicial da enzima.

O potencial redox das proteínas $XfDsbA$ (E_0^{DsbA}) e $XfDsbA2$ (E_0^{DsbA2}) a 30°C de temperatura foram calculados através da equação de Nernst utilizando o potencial redox da glutatona ($E_0^{GSH/GSSG}$ à 30°C) (Wunderlich & Glockshuber, 1993).

$$E_0^{DsbA} = E_0^{GSH/GSSG} - (RT / nF) \ln K_{eq} \quad (8)$$

onde R é a constante dos gases ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura (303 K), F é a constante de Faraday ($9,649 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$) e n é o número de elétrons (dois) transferidos na reação.

O equipamento utilizado para as medidas de fluorescência foi um Fluorômetro K2 (ISS, Champaign, Illinois U.S.A.). As amostras foram excitadas no

comprimento de onda 280 nm e a intensidade de fluorescência no máximo de emissão foi medida. Utilizou-se o programa ORIGIN 6.1 (OriginLab Corp., Northampton, MA, U.S.A.) para a produção dos gráficos e cálculo das regressões lineares.

III. 10. Ensaio de oxidação de um peptídeo sintético

A atividade redox das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* foi medida utilizando um peptídeo sintético de dez resíduos de aminoácidos (NRCSQGSCWN) com o N- e C-terminais acetilado e amidado, respectivamente. O peptídeo foi desenhado de acordo com descrição de Ruddock e colaboradores (Ruddock et al., 1995), contendo dois resíduos de cisteína separados por uma região flexível, longa o suficiente para permitir a formação de uma ponte dissulfeto. As misturas de reação continham 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.02 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM GSSG, e 2 mM GSH na presença de 20 μ M de peptídeo e 1 μ M de enzima. Alíquotas de 100 μ L foram removidas após determinados tempos de reação, que foi interrompida com a adição de HCl em uma concentração final de 0,3 M. As amostras foram diluídas dez vezes e analisadas por cromatografia líquida (nanoAcquity, Waters, Milford) acoplada a um espectrômetro de massas do tipo Q-ToF Ultima API (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram dessalinizadas utilizando uma coluna C18 (Waters Symmetry). As formas oxidada e reduzida do peptídeo foram separadas através de eluição com 0,1 % de ácido fórmico (solução A) e 0,1 % de ácido fórmico, 100 % de acetonitrila (solução B) utilizando uma coluna capilar UPLC BEH 130 C18 a um fluxo de 1 mL/min. Os peptídeos foram eluídos em um

gradiente de 10 % a 20 % da solução B durante 20 min e a coluna lavada com 40 % de B por 3 min e reequilibrada com 10% de B por 3 min. A análise quantitativa das formas oxidada e reduzida do peptídeo foi feita utilizando-se o programa Protein Lynx 2.2 (Waters). A velocidade inicial de oxidação do peptídeo foi determinada pela taxa inicial de formação do peptídeo oxidado.

III. 11. Cristalização

Devido à natureza empírica do processo de cristalização, a obtenção de monocristais para estudos estruturais através da difração de raios-X passa pelo teste de diversas soluções com diferentes tampões, agentes precipitantes e sais (Bergfors, 1999). Para isso foram desenvolvidos “kits” comerciais que constituem-se em conjuntos limitados de soluções considerando a combinação de diferentes pH e agentes precipitantes. Existem ainda outras variáveis que podem ser exploradas no processo de cristalização de uma proteína, como concentração da proteína, presença de aditivos e temperatura.

Os “kits” utilizados para os testes iniciais de cristalização das proteínas XfDsbA e XfDsbA2 estão listados abaixo.

- Crystal Screen (Hampton Research) – 50 soluções
- Crystal Screen 2 (Hampton Research) – 50 soluções
- JBScreen 1 a 10 (Jena Bioscience) – 240 soluções
- Wizard I (Emerald BioSystems) – 48 soluções
- Wizard II (Emerald BioSystems) – 48 soluções

Para os ensaios de cristalização, as proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* foram dialisadas contra 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 20 mM de NaCl e 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 50 mM de NaCl, respectivamente. As amostras foram concentradas até cerca de 11 mg/mL e tratadas com o agente redutor DTT para homogeneização, na forma reduzida, das pontes dissulfeto das proteínas. Os ensaios de cristalização foram feitos utilizando o método de difusão de vapor à temperatura de 20 °C, colocando-se 600 µL da solução de cristalização no reservatório e misturados na lamínula 2 µL da solução de proteína e 2 µL da solução reservatório.

A observação de material cristalino em alguma das condições, mesmo que de tamanho e morfologia inadequados, é ponto de partida para que monocristais apropriados aos experimentos de difração sejam obtidos, através do refinamento das condições iniciais de cristalização. Algumas condições promissoras foram obtidas a partir dos “kits” de cristalização e o refinamento consistiu na variação da concentração do agente precipitante, do sal, da proteína e o pH do tampão. Os cristais foram posteriormente otimizados com o teste de aditivos. As gotas foram preparadas com a adição de 4,5 µL da solução de proteína misturada com volume igual da solução do reservatório e 1 µL das soluções dos “kits” de aditivos (Hampton Research).

III. 12. Obtenção de cristais derivados de átomos pesados

Os dois métodos básicos para a obtenção de cristais derivados de átomos pesados, co-cristalização e “soaking”, foram utilizados neste trabalho e são descritos brevemente a seguir.

Cocristalização: a solução contendo o átomo pesado escolhido é adicionada à gota de cristalização em uma determinada proporção. O objetivo é que os átomos pesados incorporem-se a regiões específicas da proteína durante o processo de cristalização.

“Soaking”: consiste em mergulhar o cristal da proteína em uma solução contendo uma determinada concentração de átomo pesado. O objetivo é que tais átomos difundam-se pelos canais de solvente incorporando-se à rede cristalina. Inicialmente os experimentos são realizados alterando-se a concentração dos sais de átomos pesados e o tempo de “soaking”. Para cada cristal de proteína necessita-se otimizar estes parâmetros. Uma outra maneira de se utilizar o método de “soaking” é através da técnica chamada “quick-cryo-soaking” onde átomo pesado é adicionado na própria solução crioprotetora onde o cristal é mergulhado. A diferença para o método de “soaking” tradicional é que os períodos de tempo em que os cristais são deixados na solução crioprotetora com átomo pesado são menores, e as concentrações utilizadas são maiores (Nagem *et al.*, 2001).

Inúmeros experimentos foram realizados na tentativa de obtenção de cristais derivados de átomos pesados. Em particular, para os experimentos de “soaking” lento foram utilizados os seguintes compostos:

- Cloreto de Metil Mercúrio (MeHgCl)
- Ácido paraCloroMercuriBenzenoSulfônico (pCMBS)
- Acetato de Mercúrio II ($\text{Hg}(\text{OAc})_2$)
- Ácido Mersalil
- TetraCloro Platinato de Potássio (K_2PtCl_4)
- Ácido TetraCloro Aurico (HAuCl_4)
- Nitrato de Prata (AgNO_3)
- Acetato de Samário III ($\text{Sm}(\text{OAc})_3$)
- Acetato de Lutécio III ($\text{Lu}(\text{OAc})_3$)

Muitos dos compostos de átomos pesados que foram testados não são solúveis em tampão citrato de sódio, presente na condição de cristalização. Assim, a estratégia adotada foi transferir os cristais para gotas contendo uma solução em que o citrato de sódio foi substituído por acetato de sódio na mesma concentração e pH, lavá-los nessas gotas e transferí-los para as gotas que possuíam soluções com átomos pesados, também em presença de acetato em lugar do citrato.

Para os experimentos de “quick–cryo–soaking” foram utilizados os seguintes compostos:

- Iodeto de sódio (NaI)
- Cloreto de Césio (CsCl)
- Cloreto de Samário III (SmCl₃)
- Cloreto de Európio III (EuCl₃)
- Cloreto de Gadolínio III (GdCl₃)
- Cloreto de Mercúrio II (HgCl₂)
- Iodeto de Potássio (KI)
- Cloreto de Platina (PtCl)
- Acetato de Uranila (UO₂(OAc)₂)
- Cloreto de Tálcio (TlCl₃)

As concentrações de átomo pesado tipicamente usadas nos experimentos de “quick–cryo–soaking” foram de 50 mM à 500 mM durante 30 s à 60 min.

Além dos métodos clássicos de co-cristalização e “soaking”, o chamado método do iodo molecular, foi utilizado neste trabalho. O método, recentemente descrito, (Miyatake *et al.*, 2006), consiste em posicionar uma gota de uma solução contendo I₂ (Iodo Molecular) ao lado da gota de cristalização que possua cristais. O iodo molecular, devido à sua grande volatilidade, estará presente em forma gasosa no ambiente fechado do poço, e pode incorporar-se à gota de cristalização e difundir-se pelos cristais. O iodo liga-se preferencialmente a cadeias laterais de tirosinas, que podem tornar-se mono- ou di-iodinizada (Miyatake *et al.*, 2006).

Finalmente, o composto Gd-HPDO3A (Girard *et al.*, 2002), cedido pela companhia Bracco Imaging s.p.a. (Milano, Italy) foi utilizado, tanto nos experimentos de “quick-cryo-soaking” quanto nos experimentos de co-cristalização. Tal composto possui a vantagem de ter uma carga líquida neutra, minimizando as alterações dos contatos cristalinos da rede.

Um problema observado freqüentemente nos experimentos para incorporação de átomos pesados é que os cristais submetidos ao processo de “soaking” podem ser danificados micro ou macroscopicamente. O processo de “soaking” causa, muitas vezes, a completa destruição do cristal. Um método chamado “cross-linking” (Quiocho & Richards, 1964; Lusty, 1999), foi utilizado na tentativa de fortalecer os contatos da rede cristalina e por conseqüência o cristal. O método de “cross-linking” foi desenvolvido inicialmente para enrijecer o cristal contra o estresse mecânico proveniente do resfriamento no momento da coleta de dados. Entretanto, é atualmente usado em outras situações como, por exemplo, a transferência dos cristais para soluções com diferentes pHs em relação à solução original ou, como acontece nesse trabalho, na preparação de cristais derivados de átomos pesados. A reação de “cross-linking” ocorre entre as moléculas da proteína e o reagente glutaraldeído na interface dos contatos cristalinos. Através de difusão de vapor as moléculas de glutaraldeído penetram na gota contendo os cristais e difundem-se por seus canais de solvente ligando-se às amins da cadeia lateral dos resíduos de lisina.

Os experimentos de “cross-linking” foram feitos em uma placa de cristalização do tipo gota sentada, depositando-se uma alíquota de 5 µl de glutaraldeído 25% (v/v) na ponte e uma gota de 2µl da solução precipitante

contendo um ou mais cristais sobre uma lamínula. A lamínula sela o poço e mantém a gota pendurada com os cristais sujeitos à ação do glutaraldeído (Figura 7). Os experimentos foram feitos à temperatura de 18 °C com 500 µl da solução precipitante no poço.

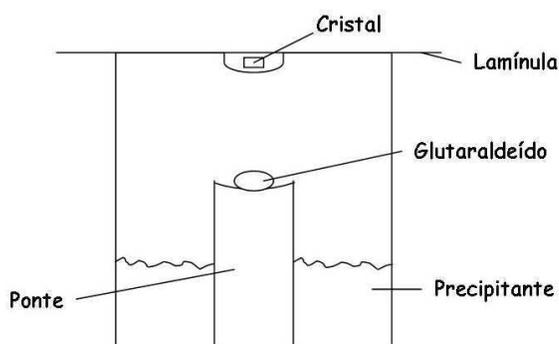


Figura 7: Experimento de “cross-linking”. Poço de cristalização do tipo gota sentada contendo glutaraldeído na ponte e a gota com solução precipitante e cristais sob a lamínula.

Após 40 min a lamínula contendo os cristais foi transferida para um novo reservatório sem a presença do glutaraldeído. O excesso de reagente foi removido lavando-se a gota três vezes com 5-10 µl de solução precipitante e os cristais foram então usados nos experimentos de “quick-cryo-soaking” com soluções contendo átomos pesados (Lusty, 1999).

III. 13. Coleta e processamento dos dados de difração

Os dados de difração de raios X dos cristais da proteína XfDsbA (conjunto nativo) foram coletados na linha de cristalografia de proteínas D03B–MX1 do

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, SP, Brasil). O comprimento de onda foi ajustado para 1,43 Å e um detector MarCCD 165 foi utilizado para registro dos dados de difração. Os cristais foram mantidos a 100 K durante a coleta de dados utilizando-se um soprador de nitrogênio gasoso. Antes do resfriamento, os cristais foram submersos em uma solução crioprotetora contendo a solução mãe adicionada de 20% de glicerol.

Os dados de difração de raios X dos cristais da proteína marcada com SeMet foram coletados na linha de luz X26C do “National Synchrotron Light Source” (BNL, Brookhaven, USA) utilizando um detector ADSC Quantum-4. A energia da borda de absorção do átomo de selênio foi determinada através do espectro de emissão de fluorescência do cristal, analisado pelo programa CHOOCH (Evans & Pettifer, 2001). Tal programa calcula os valores das componentes f' e f'' do fator de espalhamento atômico em função da energia, a partir da intensidade de fluorescência medida. A partir dos gráficos de f' e f'' os valores para o valor máximo de f'' (pico) e mínimo de f' (inflexão) foram determinados. Dois conjuntos de dados foram coletados utilizando o programa CBASS: um na energia do máximo de f'' (0.9795 Å) e o segundo na energia do mínimo de f' (0.9802 Å). Foram coletadas 720 imagens com oscilação de 0.5 ° por imagem. O tempo de exposição foi de 15 segundos com o cristal posicionado a uma distância de 160 mm do detector.

Tanto os dados dos cristais nativos quanto os dados dos cristais marcados com SeMet foram processados utilizando-se o programa HKL2000 (Otwinowski, 1997) para as etapas de indexação, integração e escalonamento.

III. 14. Resolução da estrutura da proteína *XfDsbA*

III. 14. 1. Substituição Molecular

O método de substituição molecular é utilizado quando existem, disponíveis em bancos de dados, modelos estruturais de proteínas homólogas. As estruturas cristalográficas de duas homólogas à *XfDsbA*, disponíveis no banco de dados PDB serviram como modelo para tentativas de resolução da estrutura da *XfDsbA* pelo método de substituição molecular, apesar da baixa identidade entre a proteína de interesse e os modelos (21% de identidade com *EcDsbA*, código 1DSB e 23% de identidade com *VcDsbA*, código PDB 1BED).

Embora diversas tentativas tenham sido realizadas utilizando tais modelos como entrada para os programas PHASER (Storoni *et al.*, 2004), MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) e AMORE (Navaza, 1994), a resolução da estrutura cristalográfica da *XfDsbA* por substituição molecular não foi bem sucedida. Métodos mais sofisticados, como o método dos modelos mistos e o método dos modos normais de vibração foram então empregados conforme descrito a seguir.

No método de substituição molecular a etapa de preparação do modelo é muito importante, sobretudo quando a identidade entre o modelo e a estrutura alvo é baixa. Alguns programas foram criados para aumentar a eficácia dessa etapa. Uma dessas ferramentas é a construção de modelos mistos (“Mixed Models”) (Schwarzenbacher *et al.*, 2004). O primeiro passo na identificação de um modelo é definir um alinhamento seqüencial entre a proteína alvo e o modelo. Quanto mais preciso for o alinhamento maior serão as chances de obtenção de uma solução

correta pelo método de substituição molecular. As seqüências foram alinhadas pelo método FFAS (Fold and Function Assignment System) (Rychlewski *et al.*, 2000), e a partir do alinhamento as regiões que apresentavam “gaps” foram cortadas do modelo. Além disso, todas as cadeias laterais não conservadas foram substituídas por resíduos de serina e as cadeias laterais conservadas foram mantidas. O modelo gerado foi utilizado na substituição molecular através do programa PHASER.

Outra ferramenta utilizada na preparação de modelos para a substituição molecular foi a análise dos modos normais (“Normal-Mode Analysis”, NMA) de vibração da proteína (Suhre & Sanejouand, 2004a). Mesmo em casos onde existe alta similaridade seqüencial, mudanças conformacionais estão presentes. Essas mudanças podem ser originadas, por exemplo, pela ligação de um substrato ou mesmo a diferentes condições encontradas na preparação das proteínas. O método NMA é uma ferramenta que tenta prever quais podem ser os graus de liberdade no movimento dos átomos de uma proteína. Esses movimentos comuns são classificados como modos normais de vibração da proteína. O cálculo dos modos normais é baseado na aproximação harmônica da função de energia potencial ao redor do mínimo de energia conformacional. Os modos normais de vibração do modelo a serem utilizados no processo de substituição molecular são calculados e cada uma das configurações geradas pode ser usada como um novo modelo. O programa utilizado na geração dos modos normais de vibração dos modelos empregados nas tentativas de resolução da estrutura da X/DsbA foi o ELNEMO (Suhre & Sanejouand, 2004b).

III. 14. 2. Substituição Isomorfa

Como alternativa ao método de substituição molecular, os métodos MIR, SIRAS e MIRAS foram aplicados, combinando-se os conjuntos de dados nativos e derivados. Após o processamento dos dados, os programas SHELXD (Uson & Sheldrick, 1999), HYSS (Grosse-Kunstleve & Adams, 2003) e BnP (Weeks et al., 2002) foram utilizados para a determinação das posições dos átomos pesados e os programas SHARP (LaFortelle & Bricogne, 1997) e BnP na tentativa de resolução do problema das fases.

III. 14. 3. Difração Anômala

Como alternativa às técnicas de substituição isomorfa aplicou-se o método de difração anômala utilizando o átomo de selênio como espalhador anômalo.

Um conjunto de dados de difração de raios X do cristal da proteína XfDsbA marcada com SeMet foi coletado sintonizando a energia do feixe incidente de modo a maximizar a componente f'' do fator de espalhamento atômico. Como passo inicial na resolução da estrutura, os dados foram utilizados como entrada no programa HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004). Esse programa é uma interface gráfica para os programas SHELXC, SHELXD e SHELXE (Sheldrick & Schneider, 1997). Os dados inicialmente são analisados pelo programa SHELXC, que fornece estatísticas úteis sobre a qualidade dos dados e sinal anômalo presente. A próxima etapa consiste na busca pelas posições atômicas dos átomos pesados através da utilização de métodos diretos (SHELXD). A partir do resultado do programa SHELXD é possível inferir sobre a qualidade das soluções encontradas.

Tal qualidade é descrito através de uma variável denominada “Correlation Coefficient” (CC) (Fujinaga & Read, 1987).

$$CC = \frac{\sum (|F_o|^2 - \overline{|F_o|^2})(|F_c|^2 - \overline{|F_c|^2})}{\sqrt{\sum (|F_o|^2 - \overline{|F_o|^2})^2 \sum (|F_c|^2 - \overline{|F_c|^2})^2}} \quad (9)$$

Valores de CC acima de 30 % (no caso de SAD) e um bom contraste entre a melhor solução e as restantes indicam que a solução encontrada pode estar correta. A escolha do número de sítios a serem procurados e do intervalo de resolução a ser utilizado podem ser críticas para o sucesso na determinação das posições dos espalhadores anômalos. Daí a importância da utilização do programa SHELXC, que fornece uma boa estimativa do limite de resolução para o qual a razão sinal anômalo/ruído (δ) é utilizável. Tal parâmetro é definido por:

$$\delta = \left\langle \frac{|I^+ - I^-|}{(\sigma(I^+)^2 + \sigma(I^-)^2)^{1/2}} \right\rangle \quad (10)$$

onde I^+ e I^- são as intensidades dos pares de Bijvoet e $\sigma(I^+)$ e $\sigma(I^-)$ são os erros nas intensidades das respectivas reflexões (Zwart, 2005).

O programa autoSHARP (Vonrhein *et al.*, 2006) foi utilizado para determinação estrutural automática utilizando como entrada os sítios encontrados pelo programa SHELXD. O autoSHARP refina as posições dos átomos pesados, ocupação dos sítios e, se necessário, os valores f' e f'' em 3 ciclos. O cálculo das fases é então realizado e estima-se o conteúdo de solvente presente no cristal. A

qualidade das fases pode ser medida através de parâmetros como “Phasing Power” e “Merit Figure”, definidos por

$$\text{“Phasing Power”} = Ph = \frac{|F_{H(calc)}|}{\sum \| |F_{PH} \pm F_P| - |F_{PH(calc)}| \|} \quad (11)$$

$$\text{“Merit Figure”} = m = \frac{\int P(\alpha) \exp(i\alpha) d\alpha}{\int P(\alpha) d\alpha} \quad (12)$$

onde α é a fase e $P(\alpha)$ a probabilidade da fase α .

A modificação de densidade eletrônica foi realizada utilizando o programa SOLOMOM (Abrahams & Leslie, 1996). A partir do mapa de densidade eletrônica um modelo inicial foi construído automaticamente utilizando-se o programa ARP/wARP (Perrakis et al., 1999). Durante a construção do modelo os valores de R-factor e R-free foram monitorados.

III. 15. Refinamento da estrutura cristalográfica

O modelo parcial construído pelo programa ARP/wARP foi refinado intercalando-se o ajuste manual da cadeia ao mapa de densidade eletrônica com a utilização de algoritmos computacionais. O programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) foi utilizado na etapa de refinamento através da interface CCP4i (Potterton *et al.*, 2003). Após cada ciclo de refinamento com o programa REFMAC o modelo foi analisado e ajustado manualmente utilizando-se o programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

III. 16. Análise da estrutura cristalográfica

A atribuição dos elementos de estrutura secundária para a proteína XfDsbA foi realizada utilizando-se o programa DSSP (Kabsch & Sander, 2004). A análise de interações dos resíduos do sítio catalítico foi feita com o programa COOT. As sobreposições estruturais com proteínas homólogas foram feitas em duas etapas. Primeiramente as seqüências das proteínas foram alinhadas. Esse alinhamento seqüencial foi feito utilizando-se o programa CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1994). A análise dos alinhamentos possibilitou a identificação de regiões de inserções e “gaps” nas seqüências, e tais regiões foram excluídas do alinhamento estrutural. Os arquivos contendo as posições atômicas das proteínas EcDsbA e VcDsbA foram obtidos no banco de dados “Protein Data Bank”. Tais arquivos foram utilizados como entrada para o programa “LSQKAB” que realiza o cálculo do desvio quadrático médio (RMSD, “Root Mean Square Deviaion”) para todos os átomos C α dos resíduos utilizados na sobreposição (Kabsch, 1976). Além da sobreposição global das estruturas, foi feita também a sobreposição de cada domínio separadamente, bem como da região do sítio ativo. As figuras foram produzidas utilizando-se o programa PyMOL (DeLano, 2002). As superfícies eletrostáticas foram geradas pelo programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991).

III. 17. Modelagem por homologia da proteína XfDsbA2

A estrutura cristalográfica da proteína XfDsbA foi utilizada como molde para o cálculo do modelo da proteína XfDsbA2. O alinhamento seqüencial das duas proteínas foi realizado com o programa CLUSTALW. Para o cálculo do modelo da

proteína XfDsbA2 o programa MODELLER foi utilizado (Šali & Blundell, 1993). O programa utiliza como arquivos de entrada um alinhamento da proteína alvo com a proteína molde e o arquivo de coordenadas da proteína molde e realiza um alinhamento seqüencial baseando-se na estrutura da proteína molde. A vantagem desse tipo de alinhamento é que, com base na localização dos elementos de estrutura secundária da proteína molde, o programa posiciona os “gaps” e inserções preferencialmente em regiões expostas ao solvente e em loops, minimizando eventuais falhas dos alinhamentos seqüenciais convencionais. A partir do alinhamento o programa “transfere” os parâmetros espaciais da proteína molde para a proteína alvo, tais como distâncias atômicas, ângulos diédricos e ligações de hidrogênio. O modelo tridimensional é então calculado respeitando-se as restrições espaciais impostas e a otimização do modelo é realizada através de dinâmica molecular e “simulated annealing”. Vários modelos podem ser gerados a partir de um único molde. Durante o processo de construção do modelo uma função chamada “objective function” é minimizada pelo programa. A “objective function” depende de parâmetros espaciais e de parâmetros energéticos de todos os átomos presentes no modelo. Tal função é analisada para a escolha do modelo final. Outra ferramenta utilizada na validação do modelo foi o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), que faz a análise estereoquímica do modelo indicando se as restrições espaciais (ângulo de ligação, distância de ligação, ângulo diédricos, valores de phi/psi e etc) estão sendo respeitadas. Utilizou-se ainda para a validação do modelo o programa VERIFY3D (Luthy *et al.*, 1992). Tal programa indica regiões mal construídas do modelo através de um teste que analisa a seqüência mais compatível com o ambiente dos resíduos no modelo 3D

e atribui um score para cada resíduo (“Score 3D-1D”). O ambiente dos resíduos é determinado por: i) área do resíduo inacessível ao solvente; ii) fração da cadeia lateral coberta por átomos polares; e iii) estrutura secundária local. Para a qualidade do modelo ser considerada satisfatória é necessário que pelo menos 80 % dos resíduos possuam o “Score 3D-1D” acima de 0,2. O programa PROVE foi utilizado como método de avaliação dos desvios dos volumes atômicos médios para os átomos do modelo. Os desvios são avaliados através do parâmetro “volume Z-scores”. Os limites normais do parâmetro “Z-score” para que uma estrutura seja considerada de boa qualidade estão entre -3 e 3.

IV – Resultados e Discussão

IV. 1. Amplificação e clonagem dos genes

Os genes de interesse foram amplificados utilizando-se a técnica de reação de polimerase em cadeia tendo como molde o DNA genômico de *X. fastidiosa*. Os produtos das reações de PCR foram purificados e os genes foram clonados no vetor pGEM-T-Easy (Promega) para que fosse feita a verificação das seqüências. Os genes foram clonados com sucesso e suas seqüências confirmadas através de seqüenciamento.

Após confirmação das seqüências os genes foram sub-clonados em vetores de expressão. A extração dos insertos do vetor de clonagem foi realizada através de digestão enzimática, seguida da purificação a partir do gel de agarose, ligação nos vetores pET28a(+) e transformação das linhagens DH5 α de *E. coli*. Após extração e purificação dos plasmídeos, estes foram submetidos à digestão pelas enzimas de restrição e os insertos tiveram suas seqüências confirmadas através de seqüenciamento.

Verificou-se que os genes de interesse foram subclonados com êxito no vetor pET28a(+) (Figura 8).

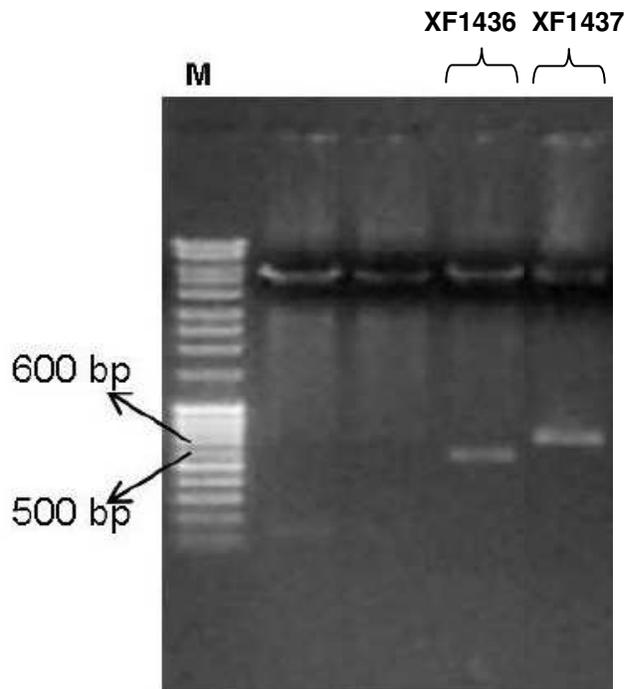


Figura 8: Gel de agarose com concentração de 1%. Produto da digestão dos vetores de expressão pET28a(+) contendo os genes de interesse. Os números mostrados no alto da figura correspondem às construções descritas na tabela 2. Observam-se bandas correspondentemente às massas moleculares esperadas.

IV. 2. Expressão e purificação

Os vetores pET28a(+) contendo os genes que codificam as proteínas de interesse foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) para realização de testes de expressão. Nas diversas condições testadas não houve expressão das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* em níveis detectáveis. Novos testes de expressão utilizando células das linhagens *E. coli* C41(DE3) e C43(DE3), linhagens estas derivadas da BL21 (DE3) e que possuem maior resistência a proteínas tóxicas (Miroux, B. and Walker, J. E., 1996), foram bem

sucedidos. A produção em larga escala das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* sem a sequência do peptídeo sinal foi feita utilizando-se as duas linhagens. Obteve-se alto rendimento das duas proteínas na fração solúvel e, após lise celular, o extrato protéico foi submetido à purificação.

As etapas empregadas para a purificação das duas proteínas foram semelhantes e durante o desenvolvimento do projeto, três etapas de purificação foram empregadas: cromatografia por afinidade, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular.

As proteínas foram inicialmente purificadas por cromatografia de afinidade tendo-se obtido um grau de pureza suficiente para os ensaios de cristalização, apenas com esta etapa (Figura 9). O rendimento obtido na produção das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* foi de aproximadamente 50 mg e 30 mg de proteína pura por litro de cultura, respectivamente.

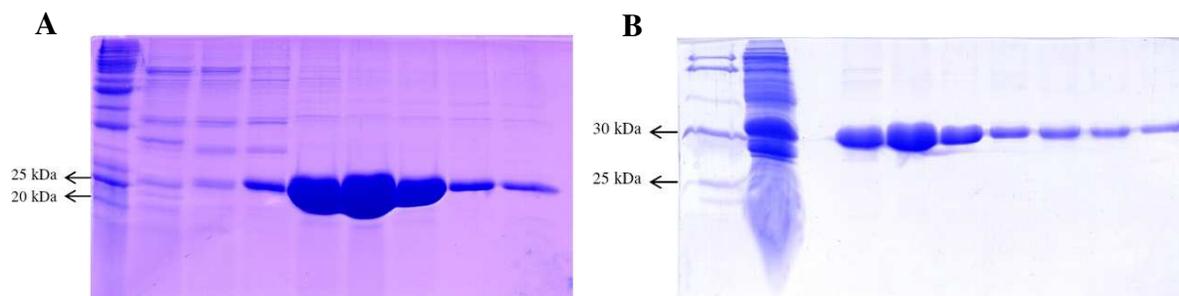


Figura 9: SDS-PAGE 12,5%. Purificação das proteínas (A) *XfDsbA* (23,5 kDa) e (B) *XfDsbA2* (31,0 kDa). Frações eluídas da coluna Hi-trap Chelating. Observa-se uma intensa banda de massa molecular correspondente às proteínas de interesse.

Com o intuito de otimizar o processo de cristalização, uma segunda etapa de purificação foi introduzida. Entretanto, apesar da amostra apresentar um grau

de pureza maior após a cromatografia por troca iônica, nenhuma alteração com relação à qualidade dos cristais foi observada, quando comparados aos cristais obtidos a partir da amostra eluída da coluna de afinidade. Dessa forma essa segunda etapa de purificação não foi utilizada em preparações posteriores.

Nas preparações que visavam à realização de ensaios funcionais as amostras foram submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular após a cromatografia por afinidade. Medidas de fluorescência mostraram que, após a cromatografia por afinidade as amostras apresentavam uma mistura da proteína nos estados oxidado e reduzido. Para os ensaios funcionais era necessário obtermos amostras homogêneas da proteína em sua forma oxidada. As amostras obtidas após a cromatografia de exclusão molecular apresentavam-se homogêneas na forma oxidada e a partir desse momento em todas as preparações feitas para os ensaios de atividade as amostras foram submetidas às duas etapas de purificação.

Para os ensaios de atividade dos mutantes *X/DsbA*_{T157V} e *X/DsbA*_{T203V} seguiu-se os mesmos procedimentos de purificação para as proteínas selvagens, tendo sido obtidos resultados semelhantes.

IV. 3. Cristalização

Cristais da proteína *X/DsbA* em forma de agulhas foram observados nos ensaios iniciais na condição D5 do “kit” JBScreen Classic 3 da Jena Bioscience (30% PEG 4000, 100 mM citrato de sódio pH 5,6 e 100 mM de sulfato de amônia). Tal condição de cristalização foi refinada variando-se o pH, a concentração do

agente precipitante e a concentração da proteína. Cristais de dimensões aproximadas de $100 \times 15 \times 15 \mu\text{m}^3$ foram obtidos no intervalo de 10 a 15 dias (Figura 10A).

Havia sido descrito na literatura que, após a purificação, a DsbA de *E. coli* encontra-se como uma mistura dos estados oxidado e reduzido (Wunderlich & Glockshuber, 1993). Em vista disto, e buscando uma maior homogeneidade da amostra para a cristalização, tratamos a amostra da XfDsbA purificada com 5 mM de DTT por um período de 1 hora. A proteína tratada com DTT foi submetida aos ensaios de cristalização e os cristais cresceram após 10 a 15 dias (Figura 10B). Observamos uma pequena melhoria no tamanho e forma dos cristais. Dessa forma adotamos como padrão submeter a proteína ao tratamento com DTT previamente aos ensaios de cristalização. Uma outra alíquota da proteína foi separada para ensaios com um agente oxidante. O agente oxidante diamida (diazeno dicarbonil) foi adicionado à proteína em uma concentração final de 2 mM. Após incubação por uma hora, foram realizados ensaios de cristalização nas mesmas condições em que já haviam sido obtidos cristais para a proteína sem tratamento. Não houve, entretanto, crescimento dos cristais.

Outra melhoria na qualidade dos cristais foi alcançada com a utilização do “kit” de aditivos da Hampton-Research. Cristais maiores e visualmente de melhor morfologia foram obtidos com a adição de uma solução de hidrocloreto de guanidina com concentração final de 100 mM na gota de cristalização. Os cristais obtidos em presença do aditivo são mostrados na Figura 10C.

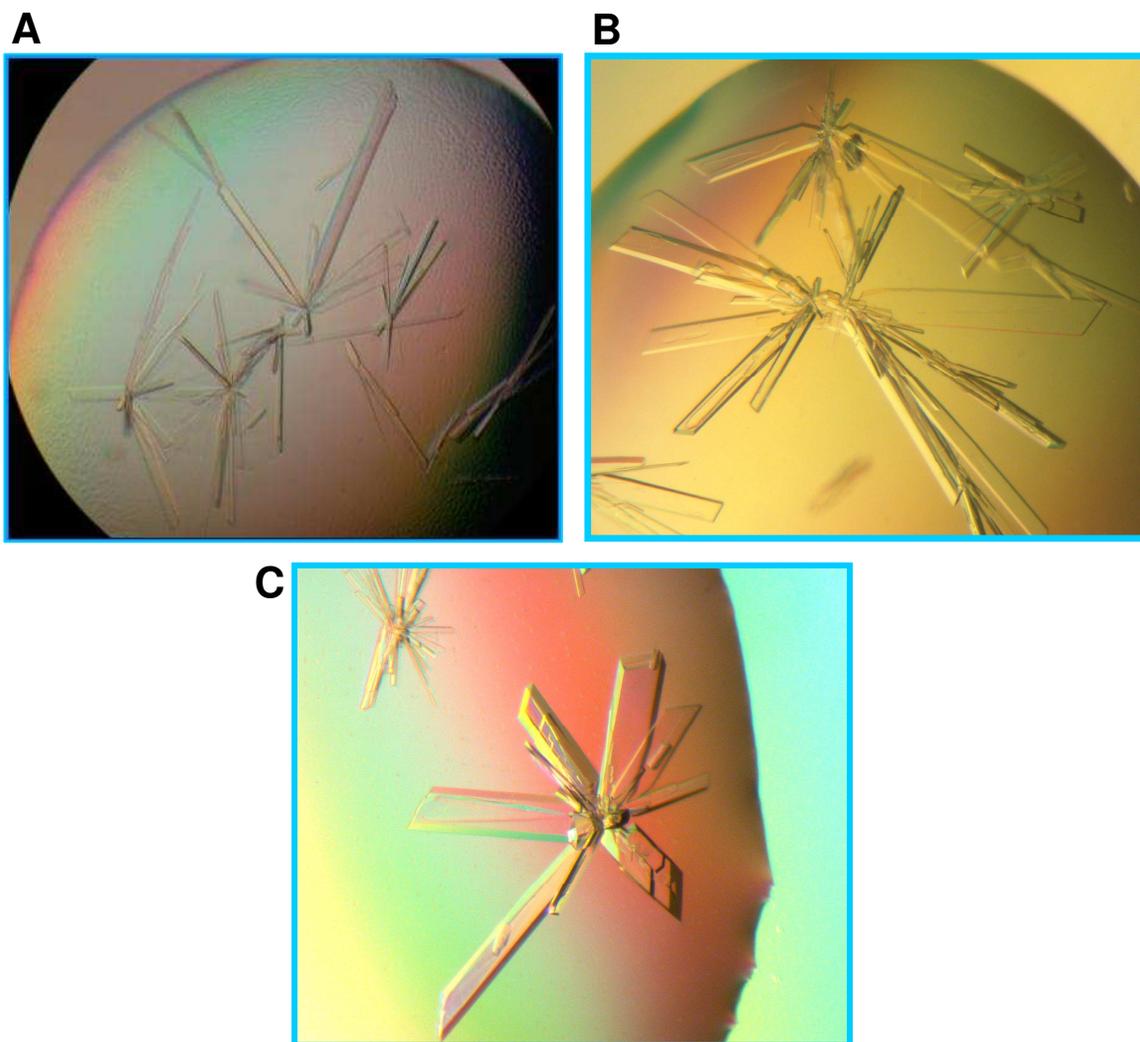


Figura 10: Cristais da *XfDsbA*. A) Cristais obtidos nas condições refinadas do “kit” de cristalização. B) Cristais obtidos após tratamento da proteína com 5 mM do agente redutor DTT durante uma hora antes dos ensaios de cristalização. C) Cristais obtidos com a utilização de 100 mM do aditivo hidrocloreto de guanidina nas gotas de cristalização.

A proteína *XfDsbA* marcada com SeMet foi submetida a ensaios de cristalização que consistiram de um refinamento em torno da condição de cristalização da proteína nativa (30 % PEG 4000, citrato de sódio pH 5,0). A amostra foi tratada com DTT para homogeneização e as gotas de cristalização

foram preparadas com e sem a adição de hidrocloreto de guanidina. Os cristais da *XfDsbA* marcada com SeMet apresentaram-se, sistematicamente, na forma de agulhas finas (Figura 11).

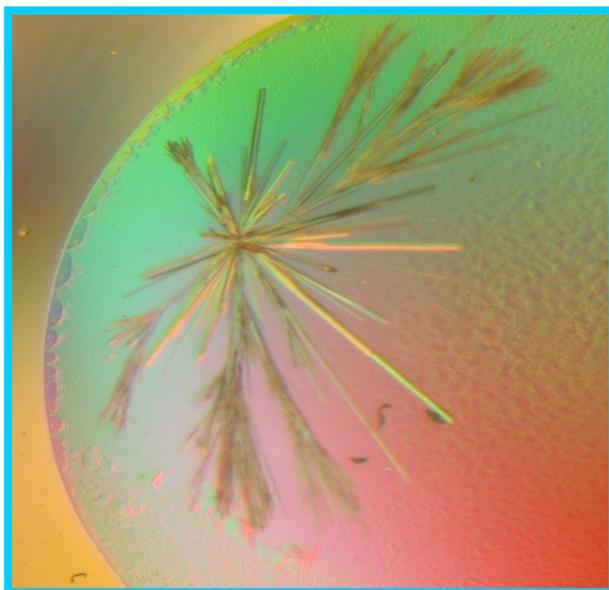


Figura 11: Cristais da *XfDsbA* marcada com SeMet

Para a proteína *XfDsbA2* nenhuma condição de cristalização promissora foi obtida. Um dos motivos do insucesso na obtenção de cristais dessa proteína pode ser a presença de um fragmento de 44 resíduos no N-terminal da *XfDsbA2* para o qual a predição de estrutura secundária indica tratar-se uma região sem enovelamento definido. Esse fragmento, provavelmente flexível, pode ter interferido no processo de cristalização impedindo que os contatos cristalinos se formassem. Uma nova construção do gene que codifica a *XfDsbA2* sem a presença desse fragmento foi preparada e ensaios de cristalização da *XfDsbA2* truncada (*XfDsbA2* $_{\Delta 44}$) estão sendo realizados como continuação desse trabalho.

IV. 4. Coleta e processamento dos dados de difração de raios

X

Diversos conjuntos de dados foram coletados na tentativa de resolução da estrutura cristalográfica da XfDsbA, tanto conjuntos de dados nativos quanto derivados de átomos pesados. Faz-se a seguir um resumo das tentativas e resultados mais importantes.

IV. 4. 1. Coleta de dados de cristais nativos

Três conjuntos completos de dados de difração de cristais nativos da proteína XfDsbA foram coletados, correspondentes às diferentes condições de cristalização cujos resultados são mostrados na figura 10. Para a proteína sem tratamento os cristais difrataram até uma resolução de 2,2 Å, enquanto, os conjuntos de dados dos cristais da proteína tratada com DTT e com aditivo apresentaram padrões de difração de melhor qualidade e foram coletados até a resolução de 1,95 Å e 1,90 Å, respectivamente. Esses três conjuntos de dados foram inicialmente utilizados na tentativa de resolução estrutural pelo método de substituição molecular (Sessão IV. 5. 1). Entretanto, não foi possível resolver a estrutura devido à baixa similaridade seqüencial entre os modelos disponíveis e a XfDsbA (discussão a seguir).

Os parâmetros de rede e as estatísticas do processamento do conjunto de dados do cristal crescido na presença de aditivo são apresentados a seguir (Tabela 2). O conjunto de dados foi coletado na linha de Cristalografia de Proteínas D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Tabela 2: Parâmetros de rede e estatística dos dados de difração do cristal nativo de XfDsbA crescido na presença de 100 mM de hidrocloreto de guanidina. Os valores entre parêntesis correspondem à camada de mais alta resolução

Grupo Espacial	C2
Célula Unitária	a= 200.12 Å, b= 41.72 Å, c= 79.81 Å, β = 95.87°
Resolução(Å)	50.00 - 1.90 (1.97 – 1.90)
Multiplicidade	3.5 (2.9)
Completeza (%)	99.7 (98.3)
R_{symm}(%)	7.4 (47.9)
<I/σ(I)>	14.7 (2.0)

IV. 4. 2. Coleta de dados de cristais derivados de átomos pesados

Os cristais da proteína XfDsbA tratada com DTT foram submetidos ao “soaking” em diferentes soluções contendo átomos pesados. A principal dificuldade em se fazer esses experimentos foi a grande fragilidade dos cristais, que se rompiam com muita facilidade quando em contato com as soluções de átomos pesados. Para superar essa dificuldade testes com várias soluções de átomos pesados foram realizados em distintas concentrações. Além disso, outras alternativas de incorporação foram testadas, tais como o método de iodo

molecular, a realização de “cross-linking” nos cristais da *XfDsbA* e a utilização de um composto com carga líquida neutra que minimiza a interferência nos contatos cristalinos.

Diversos experimentos de “quick-cryo-soaking” resultaram em 17 conjuntos de dados completos coletados. Na busca por compostos apropriados para os experimentos de “soaking” um dos fatores que se levou em conta foram os valores teóricos da componente f'' do fator de espalhamento atômico dos átomos pesados no comprimento de onda da linha MX1 (1,43 Å), com o objetivo de maximizar o sinal anômalo do conjunto de dados. Como os conjuntos de dados desses cristais derivados seriam utilizados para aplicação das técnicas SIRAS e MIRAS, uma estimativa inicial do valor de f'' foi importante na escolha dos compostos.

Na tabela 3 são apresentados as condições de “soaking” dos cristais derivados que tiveram conjuntos de dados coletados.

Tabela 3: Condições de “quick–cryo–soaking” e resolução do conjunto de dados correspondente.

Composto	Concentração (M)	Tempo de Soaking (min)	Resolução do conjunto de dados (Å)
	0,15	5	2,30
CsCl	0,15	15	2,65
	0,15	30	2,10
	0,2	15	2,10
PtCl	0,25	2	2,30
EuCl₃	0,275	15	2,80
SmCl₃	0,125	35	2,80
Gd–HPDO3A	0,1	5	2,30

Os cristais imersos nas soluções de HgCl₂, GdCl₃ e NaI ou não difrataram, o que caracteriza desordem interna, ou romperam-se mesmo a baixas concentrações dos átomos pesados, não sendo possível coletar nenhum conjunto de dados de difração. Além disso, nem todos os cristais nativos da XfDsbA difratam ou apresentam um padrão de difração de qualidade. É difícil, portanto, saber se um cristal não difratou devido à desorganização interna causada pela presença do átomo pesado ou se ele não difrataria mesmo sem a presença do átomo pesado.

Os experimentos de “cross-linking” dos cristais com glutaraldeído permitiu o teste de concentrações das soluções de átomos pesados de até 1 M sem romper o cristal. Na tabela abaixo (Tabela 4) são apresentados testes de soluções de átomos pesados realizados com cristais tratados com glutaraldeído e submetidos

ao “quick-cryo-soaking”. Esses cristais foram submetidos a experimentos de difração.

Tabela 4: Condições de “quick-cryo-soaking” dos testes feitos para cristais tratados com glutaraldeído.

Composto	Concentração (M)	Tempo de Soaking (min)
	0.025	30
Gd-HPDO3A	0.05	30
	0.1	90
	0,15	60
CsCl	1	75
	0.2	15
KI	1	5
Sm(OAc)₃	0.1	60
	0.1	100
UO₂(OAc)₂	0.2	30
HAuCl₄	0.1	115
Lu(OAc)₃	0.14	120
TiCl₃	0.1	140
PbCl	0.1	80

Os cristais submetidos às soluções de CsCl (0,15 M, 60 min), CsCl (1 M, 75 min), Gd-HPDO3A (0,1 M, 90 min) e KI (0,2 M, 2 min) difrataram a 2,20 Å, 2,30 Å, 2,40 Å e 2,60 Å de resolução respectivamente e tiveram conjuntos de dados de difração coletados e processados.

Além da técnica de “quick-cryo-soaking”, a técnica de “soaking” lento foi empregada nas tentativas de incorporação de átomos pesados, utilizando-se uma série de compostos (Tabela 5).

Tabela 5: Condições de “soaking” lento para diversos compostos.

Composto	Concentração	Tempo de Soaking
MeHgCl	Saturado	24 dias
PCMBS	0.5 mM	24 dias
Hg(OAc)₂	0.5 mM	24 dias
Ácido Mersalil	0.5 mM	40 dias
K₂PtCl₄	1 mM	24 dias
HAuCl₄	1 mM	24 dias
AgNO₃	1 mM	37 dias
Sm(OAc)₃	1 mM	40 dias
Lu(OAc)₃	1 mM	40 dias

Os cristais submetidos a soluções de MeHgCl, PCMBS, K₂PtCl₄, ácido mersalil, Sm(OAc)₃, Lu(OAc)₃ e HAuCl₄ não difrataram, não sendo possível coletar nenhum conjunto de dados de difração. Entretanto, dois cristais submetidos às soluções de AgNO₃ e Hg(OAc)₂ difrataram a 2,25 Å e 2,30 Å de resolução respectivamente e conjuntos de dados de difração foram coletados e processados.

Finalmente, vários testes com cristais da *XfDsbA* foram feitos utilizando a técnica de iodo molecular (I_2). Três conjuntos completos de dados de difração foram coletados a 2,30 Å, 2,40 Å e 2,60 Å de resolução e processados.

Todos os conjuntos de dados de difração coletados de cristais derivados de átomos pesados foram utilizados nas tentativas de resolução estrutural da proteína *XfDsbA* pelas técnicas de substituição isomorfa, entretanto, essas tentativas não foram bem sucedidas. As possíveis razões para o insucesso da técnica são discutidas mais detalhadamente na sessão IV. 5. 2. Entretanto, a razão principal foi a dificuldade na incorporação de átomos pesados nos cristais da proteína. Para superar esse problema a proteína *XfDsbA* foi marcada com SeMet para utilização das técnicas de difração anômala.

IV. 4. 3. Coleta de dados de cristais marcados com selenometionina

Os cristais em forma de agulhas da proteína *XfDsbA* marcada com SeMet foram testados na linha de cristalografia de proteínas D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Os cristais, em sua maioria, apresentaram difração de baixa qualidade ou simplesmente não difrataram. Entretanto, uma das agulhas testadas apresentou um padrão de difração de boa qualidade. Tal cristal foi armazenado em nitrogênio líquido e enviado ao “National Synchrotron Light Source – NSLS”, Brookhaven, EUA. A coleta de dados foi realizada durante um curso sobre coleta e processamento de dados (RapiData 2006) realizado neste laboratório. O cristal foi montado na linha X26C (Figura 12) e um experimento de varredura de fluorescência foi realizado para determinação da energia exata da

borda de absorção do átomo selênio incorporado na proteína. Os dados foram processados pelo programa CHOOCH para obtenção das curvas de f' e f'' em função da energia do feixe incidente (Figura 13).



Figura 12: Foto do loop contendo o cristal montado na linha X26C no NSLS.

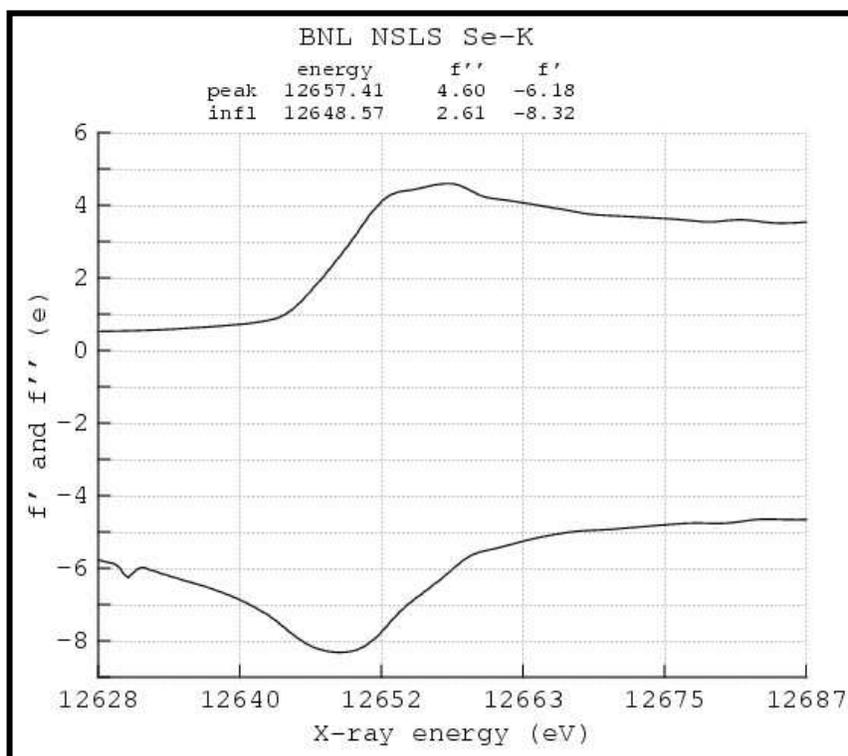


Figura 13: Curvas de f' e f'' obtidas a partir dos dados de fluorescência do cristal da XfDsbA.

O primeiro conjunto de dados foi coletado ajustando o comprimento de onda da radiação incidente para o valor correspondente ao máximo de f'' (0.9795 Å). Um conjunto de dados com o comprimento de onda ajustado na inflexão (0.9802 Å) também foi coletado. Entretanto, foi possível resolver a estrutura pela técnica de SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction) utilizando apenas o conjunto de dados coletado no comprimento de onda do pico de f'' . A tabela 6 mostra as estatísticas do processamento.

Tabela 6: Parâmetros de rede e estatística dos dados de difração do cristal da *XfDsbA* marcada com SeMet.

Grupo Espacial	C2
Célula Unitária	a= 203.16 Å, b= 42.54 Å, c= 81.435 Å, β = 96.15°
Comprimento de onda (Å)	0,9795
Resolução(Å)	1.85 (1.92 – 1.85)
Multiplicidade	6.6 (4.9)
Completeza (%)	91.5 (83.6)
$R_{\text{sym}}(\%)$	7.9 (31.3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	22.6 (8.9)

IV. 5. Tentativas iniciais de resolução da estrutura da XfDsbA

Os métodos de substituição molecular, substituição isomorfa e substituição isomorfa combinada com difração anômala foram inicialmente utilizados na tentativa de resolução da estrutura da XfDsbA.

IV. 5. 1. Substituição Molecular

O método de substituição molecular foi aplicado utilizando os conjuntos de dados nativos coletados e as estruturas tridimensionais da DsbA de *E. coli* (código PDB: 1DSB; 21% de identidade) e de *V. cholerae* (código PDB: 1BED; 23% de identidade). As primeiras tentativas de aplicação do método utilizando diretamente as coordenadas dos modelos falharam e algumas estratégias alternativas foram empregadas.

Nas estruturas de proteínas os “loops” são, normalmente, as regiões mais flexíveis. Dessa forma, mesmo que duas proteínas possuam enovelamentos semelhantes, “loops” expostos ao solvente podem adotar conformações distintas. Assim, um dos procedimentos adotados foi a exclusão, das coordenadas dos modelos, de “loops” superficiais e de “loops” que tivessem fatores de temperatura muito elevados. Outra estratégia adotada foi a substituição de todos os resíduos dos modelos por alaninas.

Uma vez que a estrutura da DsbA é composta por dois domínios, os modelos foram separados em dois, cada um contendo um dos domínios da

proteína. A busca por soluções das funções de rotação e translação foi feita utilizando os dois domínios independentemente.

Além disso, foi empregado o método de modos normais de vibração “NMA”. A estrutura tridimensional da *EcDsbA* (código PDB: 1DSB) foi utilizada como entrada no programa ELNEMO (Suhre & Sanejouand, 2004b). Os modos normais de vibração foram calculados e gerou-se 123 conformações para a molécula. Cada modelo, na forma de um arquivo PDB, difere dos demais por apresentar pequenos deslocamentos em determinadas regiões da estrutura. Cada modo normal serviu como um novo modelo para realização de substituição molecular pelo programa PHASER. Para os resultados com mais alto coeficiente de correlação foram gerados e analisados mapas de densidade eletrônica.

A técnica de modelos mistos (“Mixed Models”) (Schwarzenbacher *et al.*, 2004) baseia-se na construção de um modelo a partir do alinhamento da seqüência da proteína de interesse com seqüências de proteínas homólogas disponíveis no PDB. A seqüência da *XfDsbA* foi alinhada com as seqüências das proteínas *EcDsbA*, *VcDsbA* e de proteínas de baixa similaridade com estruturas resolvidas e depositadas no banco de dados (Tabela 7).

Tabela 7: Proteínas utilizadas como modelos para aplicação do método de modelos mistos e respectivas identidades seqüenciais com a proteína XfDsbA.

Proteína	Organismo	Código PDB	Identidade (%)
DsbA	<i>V. cholerae</i>	1BED	23
DsbA	<i>E. coli</i>	1DSB	21
Glutathiona transferase	<i>Rattus norvegicus</i>	1R4W	8
DsbG	<i>E. coli</i>	1V57	15
Função desconhecida	<i>Enterococcus faecalis</i>	1Z6M	13

O alinhamento foi utilizado como base para a edição do modelo. As regiões de “gap” entre as seqüências foram retiradas do modelo estrutural além de regiões de “loops” com baixa similaridade. Os resíduos não conservados foram substituídos por resíduos de serina. O modelo gerado serviu como entrada do programa PHASER, e os mapas de densidade eletrônica foram calculados e analisados para as soluções de mais alta correlação. Apesar de observamos alguns elementos de estrutura secundária nos mapas de densidade eletrônica a qualidade dos mapas não indicava uma solução satisfatória.

Apesar das diversas estratégias empregadas não foi possível determinar a estrutura da XfDsbA pelo método de substituição molecular. Esse resultado negativo deve-se, provavelmente, a baixa identidade seqüencial entre a XfDsbA e os modelos disponíveis.

Partiu-se então para a utilização das técnicas que requerem a incorporação de átomos pesados nos cristais de proteína (Substituição Isomorfa e Difração Anômala).

IV. 5. 2. Substituição Isomorfa

Os 17 conjuntos de dados de difração de cristais submetidos aos mais diversos tipos de solução contendo átomos pesados foram utilizados nas tentativas de determinação estrutural. A técnica de MIR foi empregada utilizando-se várias combinações entre os conjuntos de dados de difração dos cristais nativos e derivados. Conjuntos de dados de cristais derivados com átomos pesados que possuíssem sinal anômalo significativo no comprimento de onda utilizado na linha MX1 foram utilizados nas tentativas de cálculo das fases através das técnicas SIRAS e MIRAS. Entretanto, nenhuma destas tentativas resultou em um mapa de densidade eletrônica interpretável. Vale ressaltar que, no caso dos métodos de substituição isomorfa, o isomorfismo entre o cristal nativo e os cristais derivados deve ser o melhor possível e que diferenças desejáveis nos parâmetros de cela unitária dos cristais nativos e derivados são da ordem de 1%. Embora alguns cristais derivados apresentassem um sinal isomorfo significativo, a falta de isomorfismo e a baixa ocupação dos sítios podem ter sido os fatores limitantes para a utilização do método.

Para contornar o problema de incorporação encontrado nas técnicas de “soaking” foi utilizada a incorporação de átomos pesados diretamente aos resíduos da proteína durante a etapa de expressão, procedimento que aumenta a ocupação dos sítios de átomos pesados. Além disso, utilizando linhas de luz com comprimento de onda variável é possível maximizar o sinal anômalo desses átomos e determinar a estrutura da proteína utilizando apenas as técnicas de difração anômala, que possuem a vantagem da utilização de apenas um cristal na

coleta de dados, eliminando o problema de isomorfismo encontrado quando da aplicação das técnicas de substituição isomorfa.

IV. 6. Resolução da estrutura cristalográfica da *XfDsbA*

A estrutura da DsbA de *X. fastidiosa* foi resolvida pelo método de difração anômala em um único comprimento de onda (SAD) a partir dos dados de difração do cristal marcado com SeMet.

Inicialmente, a resolução na qual os dados seriam cortados foi determinada analisando-se as estatísticas calculadas pelo programa SHELXC, levando-se em conta o sinal anômalo por faixa de resolução. Os dados foram cortados a 2,6 Å com um sinal anômalo de 2,3. Geralmente utilizam-se valores de sinal anômalo acima de 1,2 na determinação dos sítios de átomos pesados. O cálculo das posições dos átomos de selênio presentes no cristal determinou 6 sítios apresentando um coeficiente de correlação (CC) de 47,6. Os sítios encontrados possuíam alto valor de ocupação e alto contraste no coeficiente de correlação entre o sexto sítio e o sétimo. As coordenadas atômicas e ocupação dos átomos pesados foram refinadas utilizando o programa autoSHARP, também utilizado no cálculo das fases. Após 3 ciclos de refinamento, as fases foram calculadas e os valores finais de “Phasing Power” e de figura de mérito foram de 1,05 (0,28) e 0,34 (0,15) respectivamente, onde os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução (1,90 – 1,85 Å).

As próximas etapas consistiram na determinação do conteúdo de solvente do cristal, o cálculo da mão correta e a modificação de densidade eletrônica. O

conteúdo de solvente inicial estimado pelo autoSHARP foi de 51,4 %. Tal valor foi refinado durante o processo de modificação de densidade eletrônica através da técnica de achatamento de solvente. O valor final estimado foi de 45,0 % com a presença de três moléculas na unidade assimétrica. A construção automática do modelo foi realizada utilizando-se o programa ARP/wARP, a partir do mapa obtido após modificação de densidade eletrônica. 20 ciclos de construção e refinamento resultaram em um modelo contendo 540 resíduos de um total de 600 (para os três monômeros). A construção das cadeias foi monitorada pelos valores R-factor e R-free que ao final da construção atingiram os valores 26,3 e 39,8 respectivamente.

IV. 7. Refinamento da estrutura da XfDsbA

O modelo inicial construído pelo programa ARP/wARP foi o ponto de partida para o refinamento da estrutura. Inicialmente a seqüência correta de resíduos foi assinalada ao modelo e em seguida a posição dos resíduos foi ajustada manualmente para os três monômeros (A, B e C) presentes na unidade assimétrica. O processo de refinamento seguiu com o programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) através da opção de refinamento restrito utilizando peso para a geometria de 0.4, alternando-se ciclos de construção manual utilizando o programa gráfico COOT (Emsley & Cowtan, 2004). O peso dado à geometria foi ajustado tomando como base os desvios quadráticos médios das distâncias e ângulos de ligação. Nos últimos ciclos de refinamento foi utilizado o refinamento “Translation, Libration and Screw” (TLS) (Painter & Merritt, 2006). A determinação dos grupos TLS foi feita através do servidor “TLS Motion Determination”

(<http://skuld.bmsc.washington.edu/~t/smd/>) utilizando o modelo parcialmente refinado como entrada. Nesse ponto, os dados experimentais foram substituídos pelo conjunto de dados do cristal nativo que havia sido coletado anteriormente até 1.90 Å de resolução (Sessão IV. 4. 1 Tabela 2). As cadeias foram novamente examinadas e ajustadas para esse novo mapa de densidade eletrônica. Um total de 516 moléculas de água foram introduzidas no modelo utilizando o programa ARP/wARP. A qualidade dos mapas de densidade eletrônica permitiu a construção dos resíduos 4 a 193 para o monômero A (de um total de 194), 4 a 190 para o monômero B e 3 a 193 para o monômero C. A estatística final do refinamento está apresentada na tabela 8.

Tabela 8: Estatísticas do refinamento.

Refinamento	
Resolução (Å)	20,00 – 1,90
R-factor (%)	18,3
R-free (%)	22,4
Figura de mérito	0,87
Nº de átomos da proteína	4452
Nº de átomos de solvente	516
 (Å ²)	24,9
 solvente (Å ²)	26,9
Geometria (desvio quadrático médio)	
Distância de ligação (Å)	0,011
Ângulo de ligação (°)	1,288
Gráfico de Ramachandran (% de resíduos)	
regiões mais favoráveis	93,4
regiões permitidas	6,6
regiões não permitidas	0,0

IV. 8. Análise da estrutura da XfDsbA

IV. 8. 1. Estrutura Global

A estrutura da proteína XfDsbA possui enovelamento tipo α/β . Como descrito para as estruturas das proteínas homólogas *EcDsbA* e *VcDsbA* (Martin *et*

al., 1993; Hu *et al.*, 1997), a XfDsbA possui dois domínios. Um dos domínios é caracterizado pelo enovelamento tipo tioredoxina (domínio A, resíduos 1 ao 65 e 145 ao 194). O segundo domínio (domínio B, resíduos 66 ao 144) contém exclusivamente hélices α e está inserido seqüencialmente no domínio tipo tioredoxina. O domínio tioredoxina é composto por cinco fitas beta ($\beta 1 - \beta 5$) que formam uma folha beta cercada de um lado por duas hélices α ($\alpha 2$ e $\alpha 7$), paralelas às fitas, e de outro por parte da hélice $\alpha 6$. O domínio B é composto por cinco hélices α , consistindo de três hélices α antiparalelas ($\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) e outras duas hélices α ($\alpha 5$ e parte da $\alpha 6$) (Figura 14). A hélice $\alpha 6$ e o “loop” que conecta a hélice $\alpha 2$ e a fita $\beta 3$ ligam os dois domínios. A sobreposição, dois a dois, dos três monômeros simetricamente independentes resulta em um desvio quadrático médio que varia entre 0,30 – 0,38 Å para todos os átomos C α . O conteúdo da cela unitária do cristal foi analisado utilizando-se o servidor programa EBI-PISA (Krissinel & Henrick, 2007) com o intuito de verificar a possível relevância biológica da associação entre monômeros que constituem o cristal de XfDsbA. Tal análise não apontou a presença de nenhum provável oligômero biológico, tendo em vista as energias livres de associação calculadas e a área média de superfície enterrada pela interação dos monômeros (500 Å²). As análises e comparações com estruturas homólogas foram realizadas com o monômero A.

A estrutura cristalográfica da XfDsbA foi sobreposta às estruturas homólogas disponíveis no “Protein Data Bank”. Os valores dos desvios quadráticos médios entre as posições dos C α são apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Desvio quadrático médio (r.m.s.d) entre as posições dos C α da *XfDsbA* e homólogas: *VcDsbA_Ox* (código PDB 1BED, estado oxidado); *EcDsbA_Ox* (código PDB 1DSB, estado oxidado); *EcDsbA_Red* (código PDB 1A2L, estado reduzido).

<i>r.m.s.d</i> (Å)	<i>VcDsbA_Ox</i>	<i>EcDsbA_Ox</i>	<i>EcDsbA_Red</i>
Global	2,5	3,0	3,0
Domínio A	2,9	3,8	3,8
Domínio B	1,7	1,7	1,6

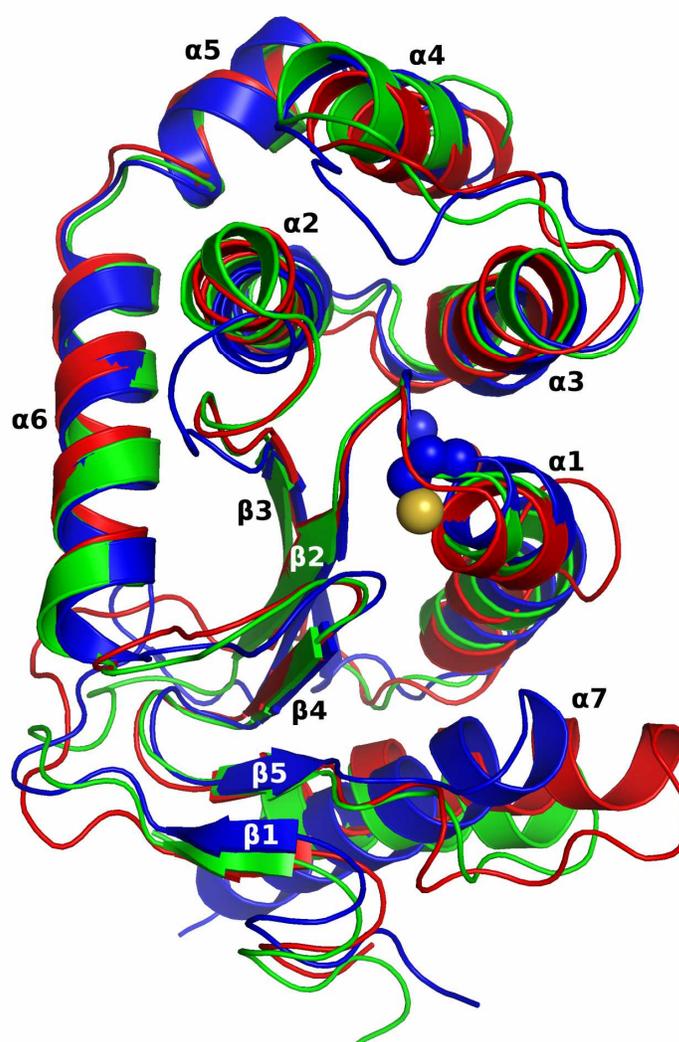


Figura 14: Comparação global das estruturas da *XfDsbA* representada em azul, *EcDsbA* (código PDB 1A2L, estado reduzido) representada em vermelho e *VcDsbA* (código PDB 1BED, estado oxidado) representada em verde. A cisteína catalítica Cys38 da *XfDsbA* está

representada através em esferas e os elementos de estrutura secundária estão identificados.

Como esperado, as estruturas globais são bastante semelhantes, mas diferenças locais podem ser observadas principalmente nas regiões dos loops (Figura 14). Analisando-se os valores de desvio quadrático médio (Tabela 10) observa-se que a forma oxidada da VcDsbA é globalmente a mais semelhante estruturalmente à XfDsbA. Além disso, quando a sobreposição dos domínios é feita separadamente observa-se que o domínio A possui maior variabilidade estrutural entre as DsbAs de diferentes organismos. O “loop” que conecta as fitas $\beta 1$ e $\beta 2$ (domínio A) em XfDsbA possui uma inserção de 5 resíduos em relação ao “loop” correspondente em EcDsbA e VcDsbA. Ao contrário do que se observa em EcDsbA, cuja estrutura apresenta uma “quebra” da hélice $\alpha 1$ causada por uma inserção de três resíduos (Glu38, Val39, Leu40), em XfDsbA e VcDsbA, tal hélice apresenta-se contínua. Uma diferença estrutural importante é observada no “loop” entre a fita $\beta 3$ e a hélice $\alpha 2$ (domínio B). Em XfDsbA este “loop” apresenta 2 resíduos a menos que em EcDsbA e VcDsbA e sua conformação afasta a cadeia principal dos resíduos do “loop” da cisteína N-terminal do sítio ativo. Este “loop” participa da formação de uma proposta região de interação da DsbA com cadeias polipeptídicas (Guddat *et al.*, 1997b). Outra diferença está no “loop” que conecta as hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$ pertencentes ao domínio B, que, em XfDsbA, apresenta uma inserção que induz uma mudança conformacional resultando em sua aproximação do sítio ativo. Finalmente, o loop que conecta a fita $\beta 5$ e a hélice $\alpha 7$ é altamente variável entre os membros da família DsbA. Em comparação com a mesma região

em *EcDsbA*, tal “loop” apresenta uma deleção de 6 resíduos. Além disso, a hélice $\alpha 7$ da *XfDsbA* possui 4 resíduos a mais e uma conformação mais fechada quando comparada a mesma região da *EcDsbA*. Essa conformação da hélice permite que o resíduo Phe173 aproxime-se do resíduo catalítico His40 e participe do sulco supostamente envolvido na interação com cadeias polipeptídicas. A figura 15 mostra um alinhamento das seqüências de vários membros da família DsbA, baseado nas estruturas conhecidas de *XfDsbA*, *EcDsbA* e *VcDsbA*. O alinhamento destaca as regiões de inserção e deleção bem como a conservação de alguns resíduos relevantes (descrição a seguir).

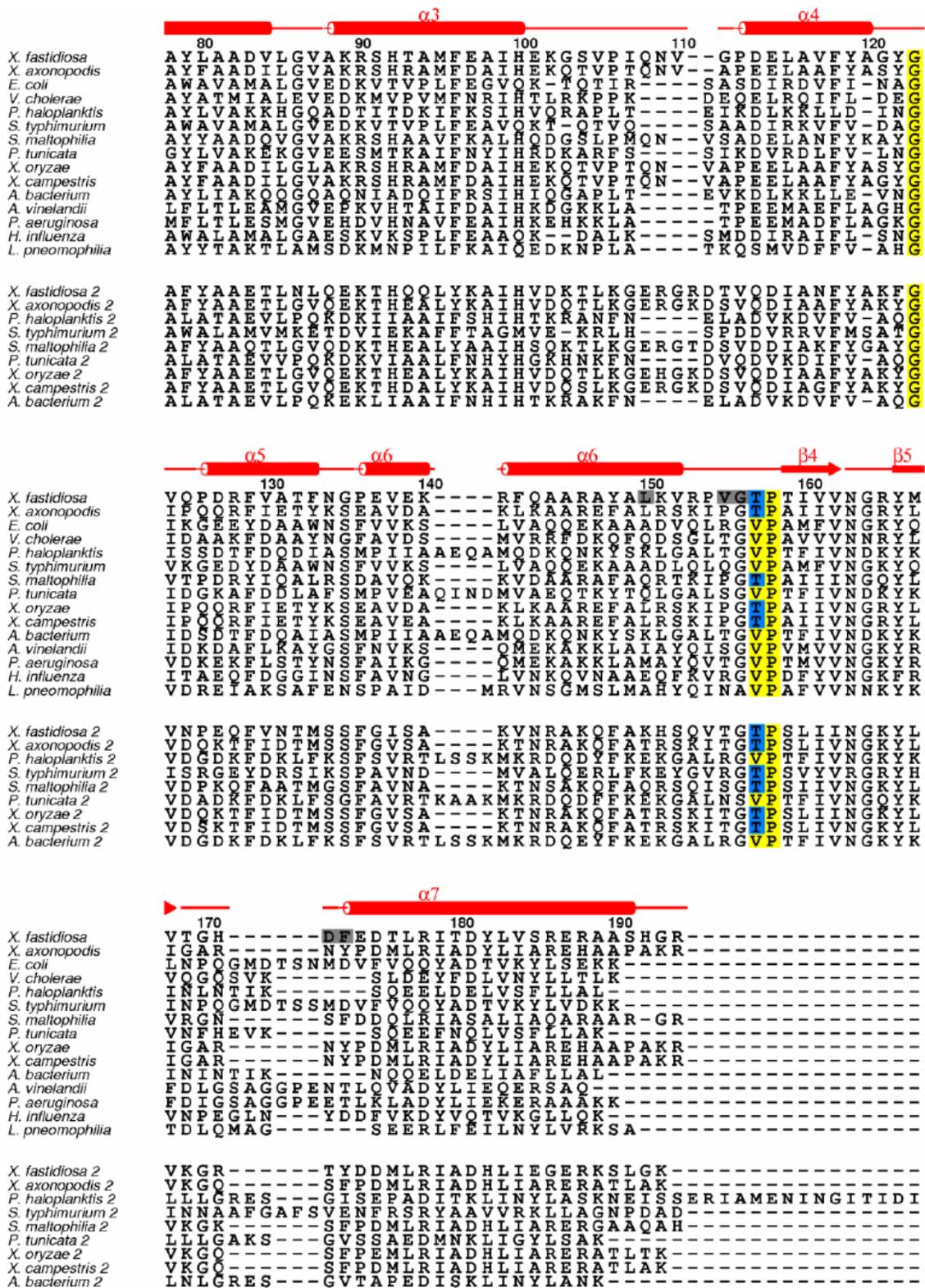


Figura 15: Alinhamento seqüencial de oxidoreduases da família DsbA. O bloco superior corresponde a proteínas da família DsbA que apresentam a seqüência CPHC em seus

sítios ativos. O bloco inferior corresponde a proteínas da família DsbA com sítio ativo CPAC (identificadas com número 2). Os resíduos conservados em todos os organismos e os resíduos conservados da seqüência CXXC estão representados em amarelo, exceto pelos resíduos que substituem o resíduo de histidina na seqüência CPHC que estão em azul. Resíduos envolvidos no sítio de interação com o peptídeo (ver descrição abaixo) estão em cinza. Os triptofanos das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* estão representados em verde. Os elementos de estrutura secundária da *XfDsbA*, atribuídos pelo programa DSSP (Kabsch & Sander, 2004), estão representados acima das seqüências. Todas as seqüências apresentadas no alinhamento tiveram a seqüência sinal, responsável por endereçar a proteína para o periplasma, removida e os números dos resíduos são correspondentes a proteína *XfDsbA*.

IV. 8. 2. Sítio Ativo da *XfDsbA*

A estrutura cristalográfica da *XfDsbA* foi determinada em pH 5.0 a partir de uma amostra de proteína tratada com o agente redutor DTT antes dos ensaios de cristalização. Os três monômeros cristalograficamente independentes apresentam as cisteínas catalíticas no estado reduzido e a conformação dos resíduos do sítio ativo muito similar (Figura 16).

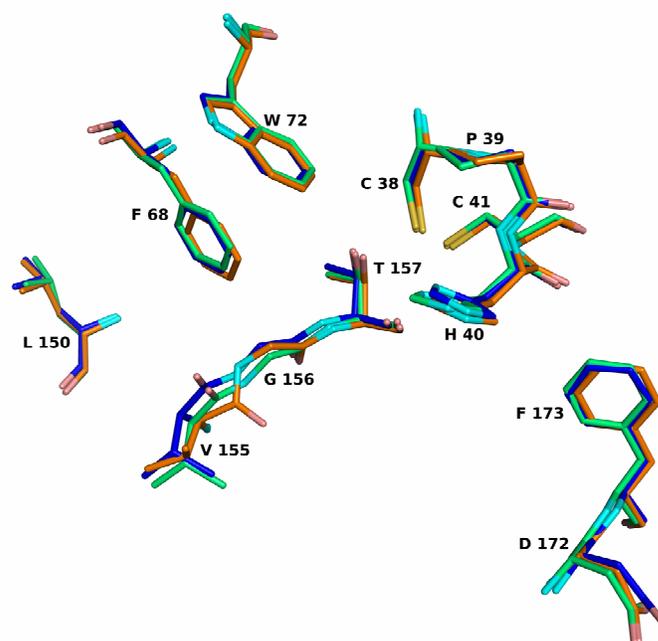


Figura 16: Sobreposição estrutural dos resíduos do sítio ativo dos três monômeros da *XfDsbA*, monômero A (azul), B (laranja) e C (verde).

Em *XfDsbA*, o tiolato da cisteína N-terminal, Cys38 (equivalente ao resíduo Cys30 em *EcDsbA*), é estabilizado por diversas ligações de hidrogênio, conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 10: Ligações de hidrogênio envolvendo resíduos do sítio catalítico.

Interação			Distância (Å)
Cys38	S γ - O γ 1	Thr156	3,1
	S γ - S γ	Cys41	3,6
	O - N	Ala42	3,0
	O - N	Cys41	3,2
	N - O	Gly35	3,0
Pro39	O - N	His43	3,0
	O - ND1	His43	3,1
His40	O - N	His43	3,2
	O - N	Phe44	2,8
Cys41	N - O	Cys38	3,2
	S γ - S γ	Cys38	3,6

A análise dos sítios ativos das proteínas *XfDsbA*, *EcDsbA* e *VcDsbA* revela algumas diferenças estruturais interessantes. As comparações são feitas com a estrutura reduzida da *EcDsbA* e oxidada da *VcDsbA*, desde que a estrutura cristalográfica da *VcDsbA* na forma reduzida ainda não foi determinada.

A distância entre o átomo S γ da Cys38 e o átomo N δ 1 da His40 é de 3.9 Å, 0.3 Å maior do que a distância equivalente em *EcDsbA* (Guddat *et al.*, 1998). A interação eletrostática entre esses dois resíduos foi proposta como sendo crítica para a estabilização da forma reduzida da DsbA. Por outro lado, o tiolato do resíduo Cys38 em *XfDsbA* é estabilizado por uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral da Thr157 (3.1 Å de distância) (Figura 17). Este resíduo substitui estruturalmente uma valina encontrada em *EcDsbA* (Val150) e *VcDsbA* (Val148)

(Figura 17), mais conservada entre as espécies (Figura 15). Em *EcDsbA* a cadeia principal da Val150 interage indiretamente com o tiolato do resíduo Cys30, através de uma molécula de água que poderia ser deslocada pelo substrato no processo de interação com a enzima (Guddat *et al.*, 1998). Além disso, a *XfDsbA* possui um resíduo de histidina (His43) nas proximidades da seqüência CPHC que é substituído por uma glutamina em *EcDsbA* e por uma treonina em *VcDsbA* (Figura 17). Adicionalmente, a cadeia lateral do resíduo His100 está a 3,6 Å de distância do átomo de oxigênio da cadeia principal do resíduo Cys38. Tal resíduo de histidina é conservado em *VcDsbA* (His94) e substituído por um ácido glutâmico em *EcDsbA* (Glu97). De acordo com Gane e colaboradores (Gane *et al.*, 1995) o resíduo parcialmente carregado Glu97 é importante para a atividade redox da *EcDsbA*, participando da estabilização do tiolato da cisteína N-terminal. Além disso, uma mutação do resíduo His94 de *VcDsbA* para leucina aumenta o potencial redox dessa enzima (Blank *et al.*, 2003), confirmando a importância do resíduo presente nessa posição.

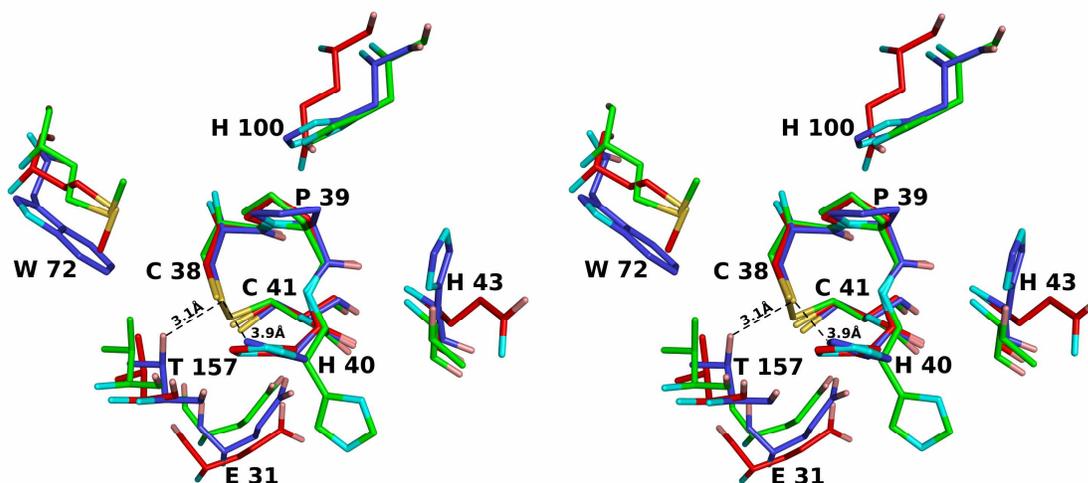


Figura 17: Imagem estéreo da sobreposição estrutural dos resíduos do sítio ativo. Os átomos de carbono da *XfDsbA*, *EcDsbA* e *VcDsbA* estão representados em azul, vermelho e verde, respectivamente. Os nomes dos resíduos e as distâncias correspondem à proteína *XfDsbA*. Interações da cisteína N-terminal (Cys38) com Thr157 e His40 estão representadas.

Nos últimos ciclos de refinamento da *XfDsbA*, durante a modelagem das moléculas de solvente, o mapa de diferença de Fourier mostrou claramente uma densidade eletrônica extra de formato alongado (cerca de 25 Å de comprimento) na superfície do monômero C, próximo ao sítio ativo da enzima. Esta densidade eletrônica foi inicialmente interpretada como sendo uma molécula de polietileno glicol (PEG) proveniente da condição de cristalização. Entretanto, um polímero de etileno glicol não se ajustou bem à densidade eletrônica aumentando ligeiramente os valores Rfactor e Rfree após um novo ciclo de refinamento automático. Além disso, após o refinamento, o aparecimento de picos de densidade eletrônica ao redor da molécula de PEG indicava que o modelo correto deveria possuir ramificações laterais. Nós consideramos, então, a possibilidade de que um

peptídeo proveniente do sistema de expressão tivesse sido co-purificado com a XfDsbA. Reforçando esta hipótese, a região onde tal peptídeo estaria ligado corresponde a um sulco hidrofóbico na superfície da XfDsbA, uma região que tem sido proposta estar envolvida na ligação dos substratos (Guddat *et al.*, 1997b). Um peptídeo de 8 resíduos de aminoácidos foi modelado e refinado com sucesso, com todos os resíduos sendo encontrados dentro das regiões permitidas do gráfico de Ramachandran. Como a seqüência específica do peptídeo não é conhecida e devido à falta de densidade eletrônica para as cadeias laterais os resíduos foram modelados como alaninas (posições 1 a 5 e 8) ou glicinas (posições 6 e 7) (Figura 18). Interessantemente, a densidade eletrônica da cadeia lateral do resíduo na posição 4 do peptídeo está posicionada em direção à cadeia lateral da Cys38, sugerindo uma interação entre os dois resíduos. A hipótese de que o resíduo na posição 4 do peptídeo pudesse ser uma cisteína foi levantada, mas a análise do mapa de densidade eletrônica calculado a partir das diferenças anômalas não revelou um pico de densidade eletrônica naquela posição que pudesse ser atribuído ao átomo de enxôfre da cisteína. A modelagem de um peptídeo ligado próximo ao sítio ativo do monômero C da XfDsbA permitiu um exame mais detalhado de como os substratos interagem com a DsbA. As extremidades do peptídeo são estabilizadas por contatos hidrofóbicos, enquanto a porção central da molécula, formada por três resíduos, interage com a XfDsbA através de ligações de hidrogênio com a cadeia principal dos resíduos Val155 e Thr157 e através de contato hidrofóbico com a His40 da seqüência CPHC. Estas interações poderiam ser responsáveis pela estabilização de uma conformação favorável para

a formação da ponte dissulfeto entre a enzima e seus parceiros durante o ciclo catalítico da DsbA.

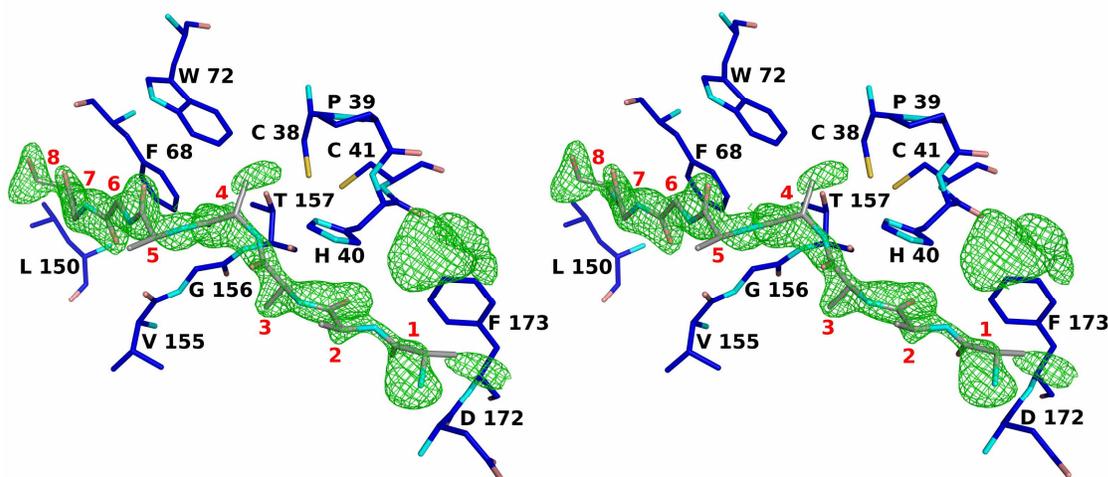


Figura 18: Imagem estéreo do sítio ativo do monômero C da *XfDsbA* mostrando o peptídeo de 8 resíduos modelado. O mapa de Fourier F_o-F_c contornado a 3σ é representado em verde e está sobreposto ao modelo final do peptídeo. A seqüência CPHC e os resíduos envolvidos nas interações com o peptídeo são mostrados, assim como a numeração dos resíduos do peptídeo (vermelho).

Uma outra densidade eletrônica extra foi observada próxima às cadeias laterais dos resíduos Phe173 e His40 (Figura 18). Tentativas de modelar uma molécula proveniente da solução de cristalização ou do crio-protetor não foram bem sucedidas. Imaginamos que essa densidade corresponda, provavelmente, a uma extensão desordenada do peptídeo de oito resíduos modelado na superfície da proteína. Entretanto, não foi possível modelar, sem ambigüidade, uma molécula que representasse satisfatoriamente o mapa de densidade eletrônica.

A estrutura cristalina do complexo DsbA–DsbB de *E. coli* foi recentemente publicada (Inaba *et al.*, 2006). As interações entre essas duas proteínas envolvem o segundo loop periplasmático da *EcDsbB* (Pro100-Phe106), que se acomoda no sulco hidrofóbico da DsbA, logo abaixo da cisteína N-terminal Cys30. O resíduo Cys104 de *EcDsbB* forma uma ponte dissulfeto com a Cys30 da *EcDsbA* durante o ciclo catalítico (Figura 4). A sobreposição da estrutura da *XfDsbA* com o complexo *EcDsbA*- DsbB revela que o peptídeo modelado no monômero C da *XfDsbA* concorda estruturalmente com a posição do loop da *EcDsbB* que interage com a *EcDsbA* (Figura 19). Além disso, um tri-peptídeo da *EcDsbA* (Arg148-Gly149-Val150) forma uma pequena folha beta antiparalela com a região dos resíduos Cys104-Phe106 da proteína *EcDsbB* (Inaba *et al.*, 2006). É interessante observar que o peptídeo ligado ao monômero C da *XfDsbA* interage, de maneira semelhante ao observado no complexo *EcDsbA*-DsbB, com os resíduos Val155-Gly156-Thr157. A Val155 e a Thr157 formam ligações de hidrogênio com a cadeia principal do peptídeo enquanto o resíduo Gly156, altamente conservado nos membros da família (Figura 15), participa da interação com o ligante através de contato hidrofóbico (Figura 18). Além disso, a densidade eletrônica extra observada próxima aos resíduos Phe173 e His40 também sobrepõe-se ao modelo do “loop” da proteína *EcDsbB* e pode realmente corresponder a um fragmento desordenado da cadeia polipeptídica (Figura 19).

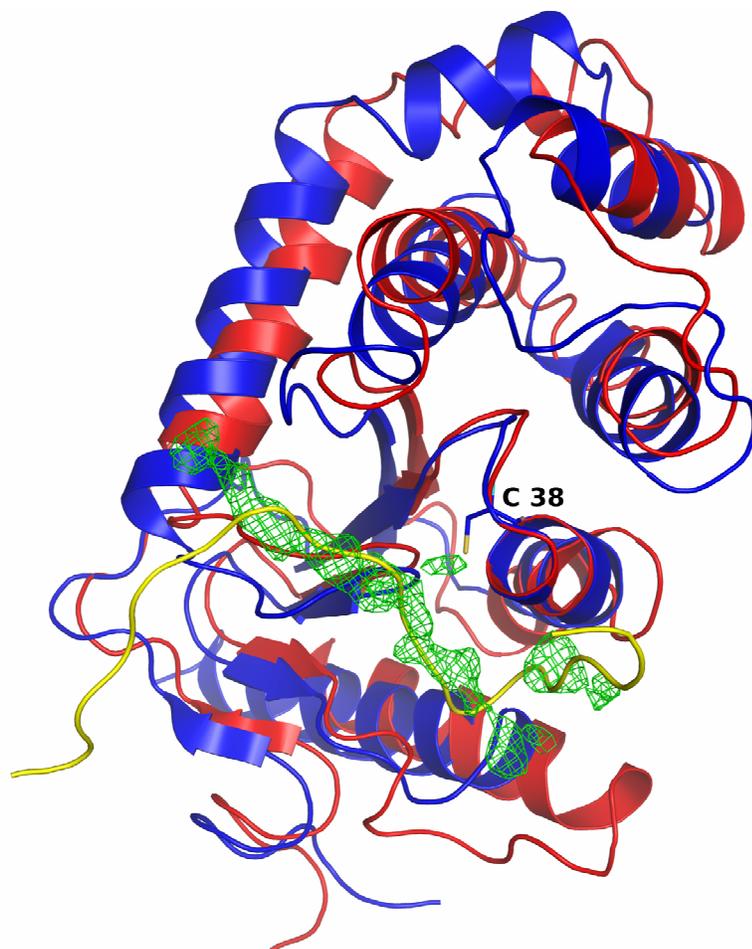


Figura 19: Sobreposição da estrutura da *XfDsbA* com o complexo *EcDsbA*-DsbB. *XfDsbA* e *EcDsbA* são representadas em azul e vermelho, respectivamente, e o “loop” da *EcDsbB* que interage com a *EcDsbA* está representado em amarelo. O mapa Fo-Fc contornando a 3σ (verde) indica a região de interação do peptídeo com a *XfDsbA*, sobrepondo-se ao “loop” de interação com a *EcDsbB* no complexo. O resíduo catalítico Cys38 da *XfDsbA* está indicado na figura.

IV. 9. *XfDsbA2* - A segunda oxidoreductase de ponte dissulfeto de *X. fastidiosa*

A análise do genoma da bactéria *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) revelou a presença de dois genes adjacentes no cromossomo, que codificam duas proteínas da família das DsbAs. *XfDsbA* possui a seqüência CPHC no sítio ativo, bem caracterizada nos organismos *E. coli* e *V. cholerae*, enquanto *XfDsbA2* apresenta uma substituição do resíduo His por Ala nessa seqüência. Recentemente, outros trabalhos têm identificado mais de uma proteína da família DsbA em alguns organismos. Por exemplo, duas proteínas DsbA codificadas por genes adjacentes, uma delas apresentando a seqüência “clássica” (CPHC) e a outra apresentando a seqüência CPAC, foram estudadas na bactéria adaptada a temperaturas baixas *PhTAC125* (Madonna *et al.*, 2006). Além disso, estudos *in vivo* com a bactéria *Salmonella typhimurium* revelaram a presença de duas proteínas da família DsbA, uma delas apresentando o motivo CPHC (*StDsbA*) e a outra a seqüência CPPC (*StDsbA2*) (Bouwman *et al.*, 2003). Medidas da atividade oxidoreductase *in vivo* para as duas proteínas mostraram que a proteína *StDsbA2* é menos eficiente do que a *StDsbA* em introduzir pontes dissulfeto na proteína fosfatase alcalina. Em outro trabalho, Bessete e colaboradores (Bessete *et al.*, 2001) mediram *in vivo* o efeito causado pelos dois resíduos centrais do motivo CXXC no enovelamento de proteínas com múltiplas pontes dissulfeto em *E. coli*. Os autores mostraram que os resíduos centrais do motivo CXXC são extremamente importantes na sua função de catálise da formação de pontes dissulfeto independentemente de seu potencial redox. Ou seja, embora a proteína

mutante com motivo CPSC possui um potencial redox de -173 mV, baixo comparado aos -122 mV da proteína nativa, ela possui uma atividade 4 vezes maior no enovelamento de proteínas com múltiplas pontes dissulfeto. O alto potencial redox da DsbA nativa ocasiona um aumento na formação de pontes dissulfeto entre cisteínas incorretas em proteínas com múltiplas pontes dissulfeto. Uma diminuição no potencial redox da proteína poderia aumentar a eficiência na formação de pontes-dissulfeto corretas, diminuindo consideravelmente o tempo de enovelamento (Bessete *et. al.*, 2001). Estes estudos sugerem que a *StDsbA2* tenha maior especificidade por determinados substratos do que a proteína *StDsbA* (Bouwman *et. al.*, 2003).

Ambas as proteínas de *X. fastidiosa* possuem uma seqüência sinal característica de proteínas secretadas. Entretanto, a proteína *XfDsbA2* apresenta uma extensão de 44 resíduos no N-terminal que não é observada em *XfDsbA*, e que não mostra similaridade significativa com nenhuma outra seqüência em uma busca feita com o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Além disso, a predição de estrutura secundária para este fragmento do N-terminal indica que a região não possui enovelamento definido.

A caracterização da *XfDsbA2* por dicroísmo circular mostrou bandas no espectro em 192 nm, 209 nm e 222 nm indicando um conteúdo de aproximadamente 33 % de hélices α , diferindo dos aproximadamente 39% de hélices α da *XfDsbA* (Figura 20). A diferença entre os espectros de CD para a *XfDsbA2* com relação a *XfDsbA* pode ser explicada pela presença do N-terminal desestruturado em *XfDsbA2*.

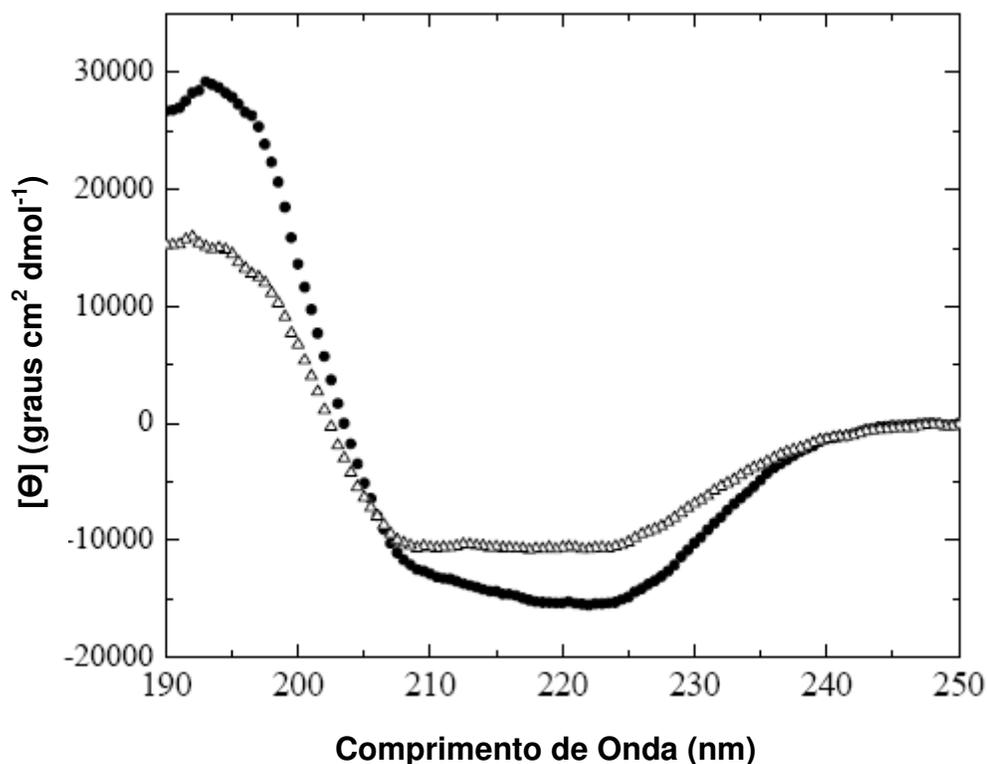


Figura 20: Espectro de Dicroísmo Circular da *XfDsbA* (•) e *XfDsbA2* (Δ). Ambos os espectros indicam proteínas enoveladas com alto conteúdo de hélices α .

Diversas tentativas de cristalizar a proteína *XfDsbA2* não foram bem sucedidas e um modelo por homologia foi construído com o intuito de analisar seu sítio ativo. O modelo da proteína *XfDsbA2* foi calculado com o programa MODELLER utilizando a estrutura cristalina da proteína *XfDsbA* como molde. O modelo final da *XfDsbA2* apresenta boa estereoquímica com todos os resíduos, com exceção de glicinas e prolinas, sendo encontrados nas regiões favoráveis ou permitidas do gráfico de Ramachandran. Análises com o programa Verify3D mostraram que 95.9% dos resíduos apresentaram valores de “profile 3D-1D” acima de 0.2. Como esperado, a estrutura global da *XfDsbA2* é muito similar à da

proteína *XfDsbA*, com um desvio quadrático médio de 0.38 Å para os 193 C α alinhados. A principal diferença na estrutura global é encontrada no “loop” que conecta as hélices α 3 and α 4. A proteína *XfDsbA2* possui uma inserção de dois resíduos que resulta em um “loop” mais longo (Figura 21A). O sítio ativo é globalmente muito similar, mas a substituição de alguns resíduos é observada. O resíduo Ala84 da proteína *XfDsbA2* substitui a His40 da seqüência CPHC da *XfDsbA* e o resíduo Gln87 da *XfDsbA2* substitui o resíduo His43 da *XfDsbA*. Assim como foi observado na estrutura cristalográfica da *XfDsbA*, um resíduo de treonina em *XfDsbA2* (Thr203) também está em posição favorável à interação com a cisteína catalítica N-terminal Cys82 (Figura 21B).

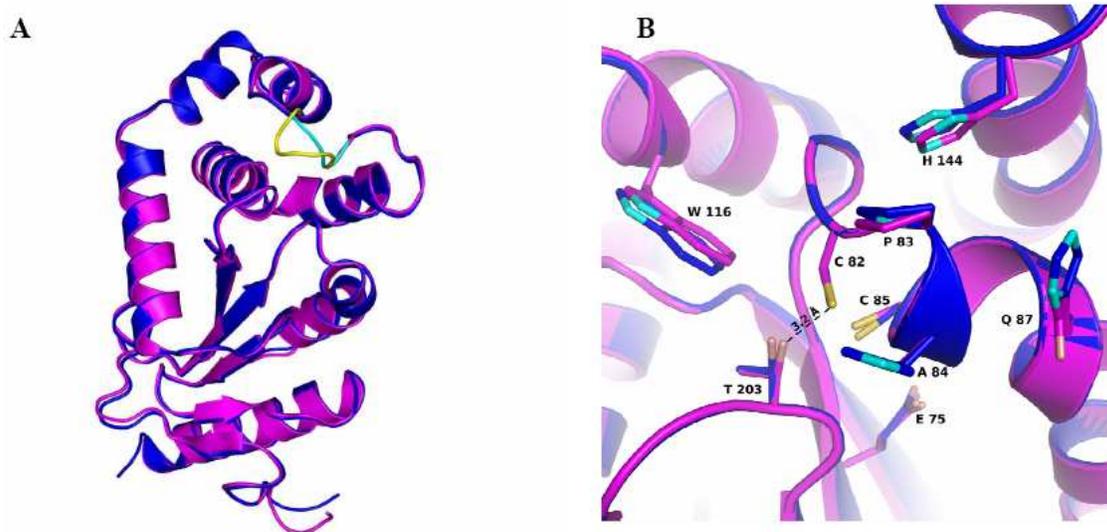


Figura 21: Sobreposição estrutural da *XfDsbA* (azul) com o modelo da *XfDsbA2* (roxo). A principal diferença global entre as duas estruturas é mostrada em A, onde o “loop” que conecta as hélices α 3 and α 4 está representado em azul claro para a *XfDsbA* e amarelo para a *XfDsbA2*. A figura B mostra a conservação do sítio ativo das estruturas, exceto pela substituição dos resíduos His40 em *XfDsbA* por Ala84 em *XfDsbA2* e His43 em *XfDsbA* por Gln87 em *XfDsbA2*. A identificação dos resíduos refere-se à proteína *XfDsbA2*.

A análise das superfícies eletrostáticas de *XfDsbA* e *XfDsbA2* revelou algumas diferenças interessantes entre as duas proteínas. A *XfDsbA* possui basicamente as mesmas características daquelas observadas para a proteína *EcDsbA*. Observa-se em *XfDsbA* a presença de um sulco hidrofóbico (Figura 22) próximo ao sítio ativo da enzima, que é proposto como sendo responsável pela interação DsbA-substrato durante o ciclo catalítico da proteína (Guddat *et al.* 1997b). Análises com o programa Q-SiteFinder (Laurie, A. T. and Jackson R. M. 2005) mostraram que esse sulco hidrofóbico da *XfDsbA* próximo ao sítio ativo possui um volume de 260 Å³. A proteína *XfDsbA2*, por sua vez, possui características diferentes em sua superfície. Comparada a *XfDsbA*, a superfície da proteína *XfDsbA2* possui um caráter mais positivo. A análise feita com o programa Q-SiteFinder não descreve região equivalente ao sulco hidrofóbico da *XfDsbA* como possível região ligadora de peptídeos. As diferenças na superfície da *XfDsbA2* podem estar relacionadas com sua atividade no organismo *X. fastidiosa*, já que trabalhos anteriores (Bessete *et al.* 2001) têm associado a presença de uma segunda proteína da família DsbA à interação com substratos específicos. O bolsão hidrofóbico na região do sítio ativo da proteína *XfDsbA* presente também em *XfDsbA2* não apresenta diferenças relevantes.

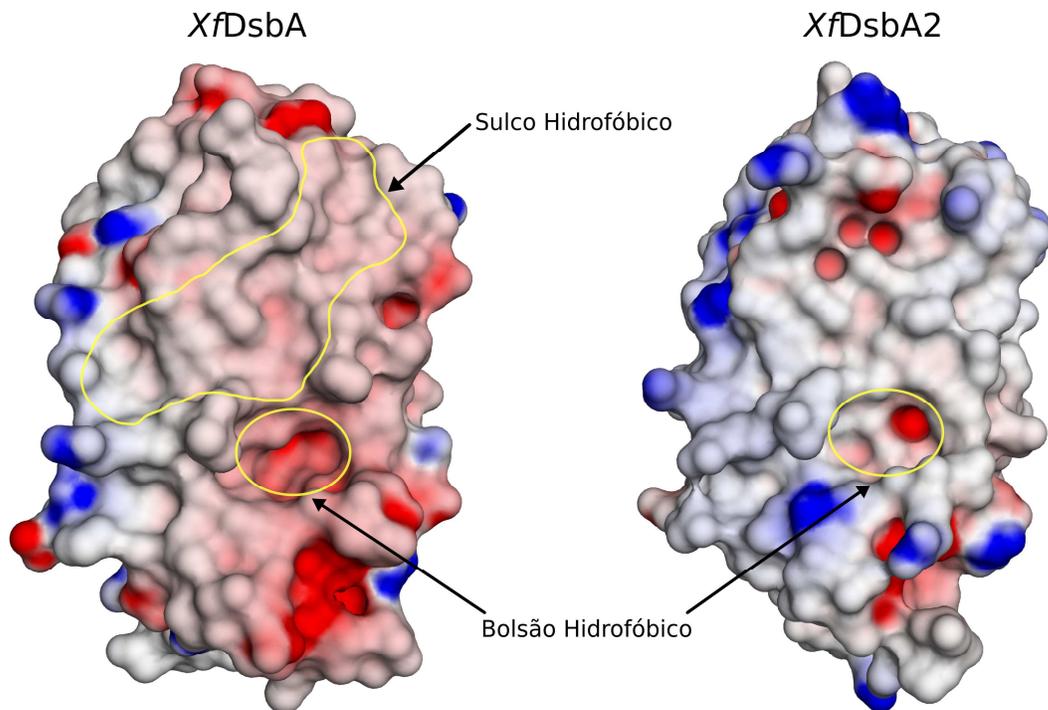


Figura 22: Superfícies eletrostáticas das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2*. As superfícies estão coloridas de acordo com o potencial eletrostático, onde em azul estão regiões positivamente carregadas e em vermelho regiões negativamente carregadas. As regiões descritas como sendo responsáveis pela interação DsbA-substrato estão realçadas.

IV. 10. Propriedades redox das proteínas XfDsbA e XfDsbA2

A atividade redox das proteínas XfDsbA e XfDsbA2 foi estudada a fim de se investigar o efeito da substituição do resíduo de histidina do arranjo CPHC no potencial redox da enzima XfDsbA2.

IV. 10. 1. Determinação do potencial redox das proteínas XfDsbA e XfDsbA2

A intensidade de fluorescência emitida pelas enzimas XfDsbA e XfDsbA2 no estado reduzido é superior à emissão no estado oxidado para todas as faixas de pH, semelhantemente ao observado para a homóloga EcDsbA (Wunderlich & Glockshuber, 1993; Grauschopf *et al.*, 1995) (Figura 23).

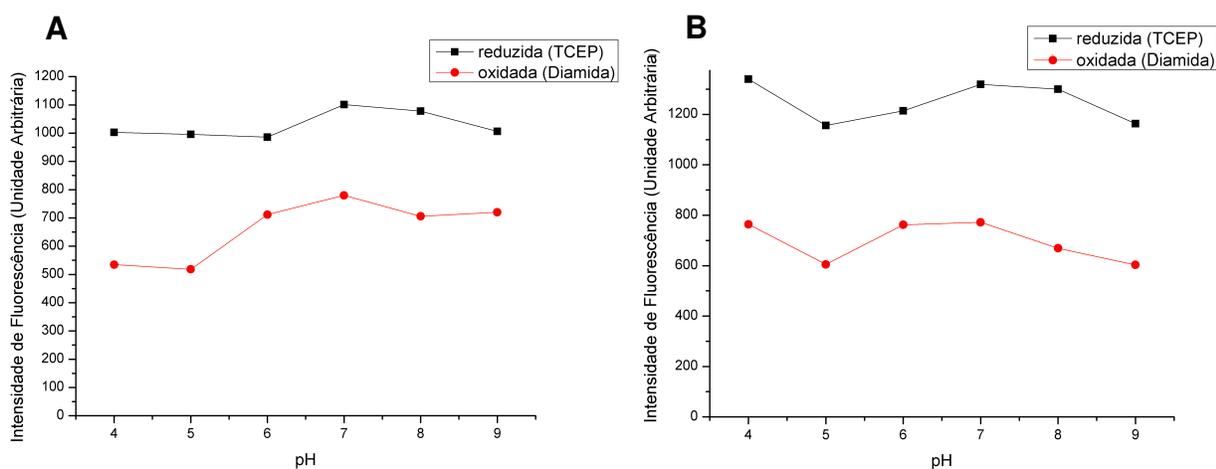


Figura 23: Valores máximos de intensidade de fluorescência para a proteína XfDsbA (A) e XfDsbA2 (B) em diferentes estados redox e pHs. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e a intensidade de fluorescência foi medida em 333 nm.

Apesar do padrão de emissão de fluorescência nos estados reduzido e oxidado ser conservado, existem algumas diferenças estruturais entre *XfDsbA*, *XfDsbA2* e sua homóloga *EcDsbA* (Wunderlich & Glockshuber, 1993). O alinhamento seqüencial e estrutural mostra que os resíduos de triptofanos das DsbAs de *X. fastidiosa* e de *E. coli* não são conservados. Em *XfDsbA*, o Trp72 está a apenas 4 Å de distância da cisteína catalítica (Cys38), sofrendo grande influência do estado redox das cisteínas do sítio ativo. Em *EcDsbA* nenhum dos triptofanos interage diretamente com o sítio ativo (Figura 17). O “quenching” da fluorescência do triptofano que ocorre no caso da *EcDsbA* é descrito como sendo devido a uma transferência de energia entre o Trp126 e as cisteínas via um resíduo intermediário F26 (Hennecke *et al.*, 1997). A análise da estrutura da proteína *XfDsbA* mostra que o Trp72, além de interagir diretamente com o sítio ativo, está mais exposto ao solvente do que os triptofanos da *EcDsbA*. Este fato explica a diferença entre os comprimentos de onda dos máximos de fluorescência medidos para as proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* com relação à *EcDsbA*. Para *XfDsbA* e *XfDsbA2* o máximo está em torno de 333 nm, enquanto para a *EcDsbA* o máximo de emissão é por volta 320 nm, o que indica menor acessibilidade do fluoróforo ao solvente. O segundo triptofano (Trp51) da proteína *XfDsbA* está mais distante do sítio ativo e encontra-se mais enterrado na estrutura.

Com o intuito de verificar a eficiência das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* na catálise de formação de pontes dissulfeto, o potencial redox foi calculado através dos valores da constante de equilíbrio do sistema redox DsbA/glutathione (Wunderlich & Glockshuber, 1993). A quantidade relativa de DsbA no estado reduzido (R) pode ser medida através de fluorescência incubando a proteína com

uma concentração fixa de GSSG (0,1 mM) e diferentes concentrações de GSH (0-2,4 mM). Gráficos de $\{[GSH]^2/[GSSG]\}/R$ em função de $[GSH]^2/[GSSG]$ foram obtidos e a constante de equilíbrio calculada por regressão linear. Os gráficos são apresentados nas figuras 24 e 25 e os resultados obtidos para as constantes de equilíbrio e potenciais redox são mostrados na tabela 11.

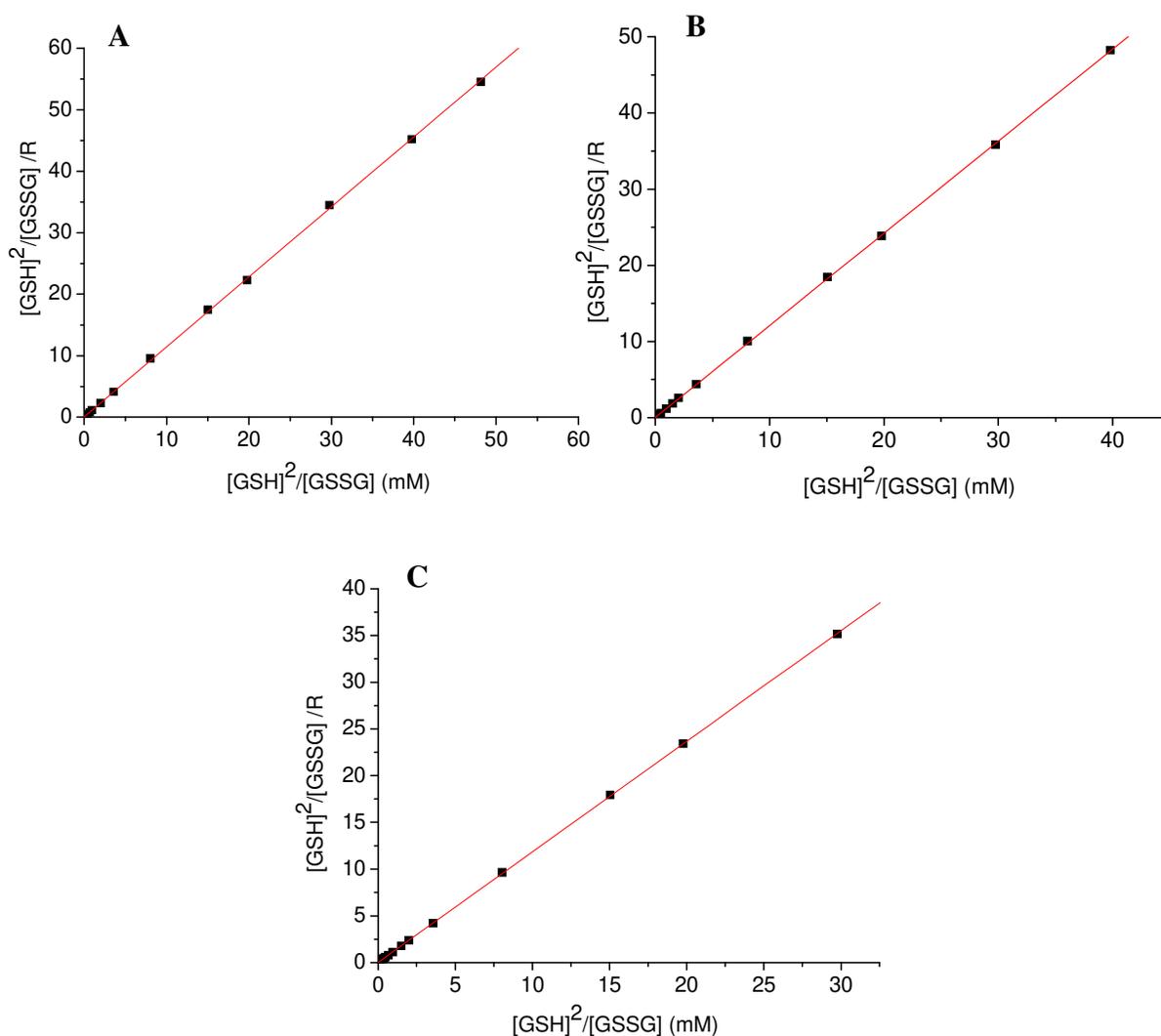


Figura 24: Medidas das constantes de equilíbrio para a proteína *XfDsbA* em pH 6,0; $r=0,9999$ (A); pH 7,0; $r=0,9999$ (B); e pH 8,0; $r=0,9999$ (C); onde r é o coeficiente de correlação obtido na regressão linear.

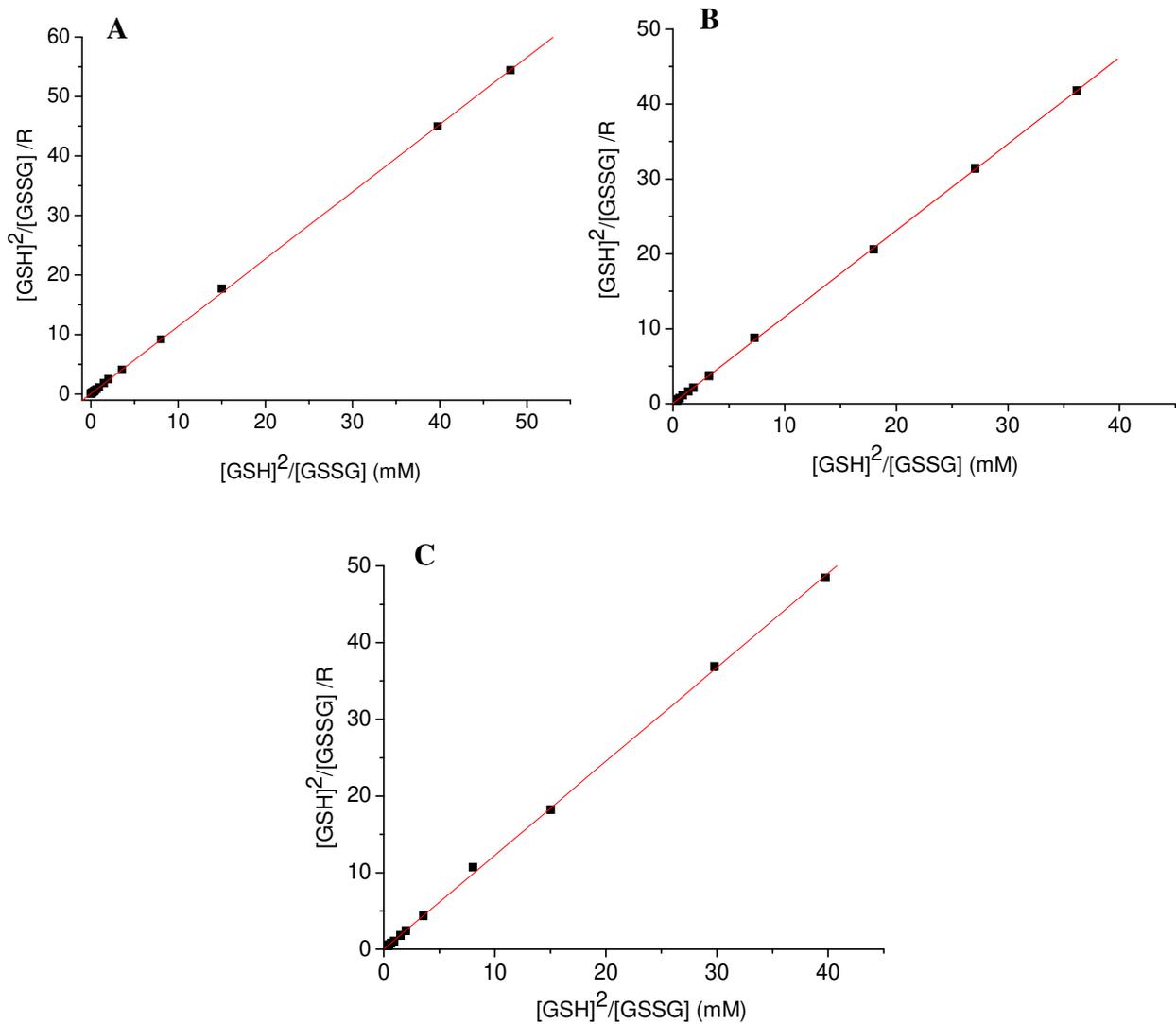


Figura 25: Medidas das constantes de equilíbrio para a proteína X/DsbA2 em pH 6,0; $r=0,9999$ (A); pH 7,0; $r=0,9999$ (B); e pH 8,0; $r=0,9996$ (C); onde r é o coeficiente de correlação obtido na regressão linear.

Tabela 11: Constante de equilíbrio e potencial redox das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* para o sistema DsbA/glutationa em pH 6, 7 e 8, a 30°C. Para comparação, os valores de constante de equilíbrio e potencial redox para a proteína *EcDsbA* (Wunderlich & Glockshuber, 1993) são também apresentados.

		Sítio Ativo	pH		
			6	7	8
K_{eq} (mM)	<i>XfDsbA</i>	CPHC	0,035 ± 0,008	0,022 ± 0,004	0,007 ± 0,001
	<i>XfDsbA2</i>	CPAC	0,063 ± 0,002	0,037 ± 0,013	0,008 ± 0,001
	<i>EcDsbA</i>	CPHC	0,25	0,12	0,04 _{pH 8,5}
E₀ (V)	<i>XfDsbA</i>	CPHC	-0,011 ± 0,002	-0,065 ± 0,003	-0,109 ± 0,006
	<i>XfDsbA2</i>	CPAC	-0,019 ± 0,001	-0,071 ± 0,005	-0,112 ± 0,001
	<i>EcDsbA</i>	CPHC	-0,039	-0,089	-0,165 _{pH 8,5}

Surpreendentemente, a ausência da seqüência CPHC na proteína *XfDsbA2* parece não afetar seu potencial de oxidação, já que ambas as enzimas de *X. fastidiosa* possuem valores similares de E₀ (Tabela 11). Tais resultados mostram ainda que as proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* possuem poder de oxidação superior à proteína *EcDsbA*. Dessa forma as proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* possuem os maiores potenciais de oxidação dentre as DsbAs até o momento estudadas.

IV. 10. 2. Ensaio de oxidação de um peptídeo sintético

Como caracterização complementar da função oxidativa das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2*, estudamos a oxidação de um peptídeo sintético (NRCSQGSCWN). A porcentagem de peptídeo oxidado é determinada em função do tempo e a velocidade inicial de oxidação é calculada (Figura 26). Tal ensaio confirma que ambas as enzimas possuem atividades enzimáticas similares.

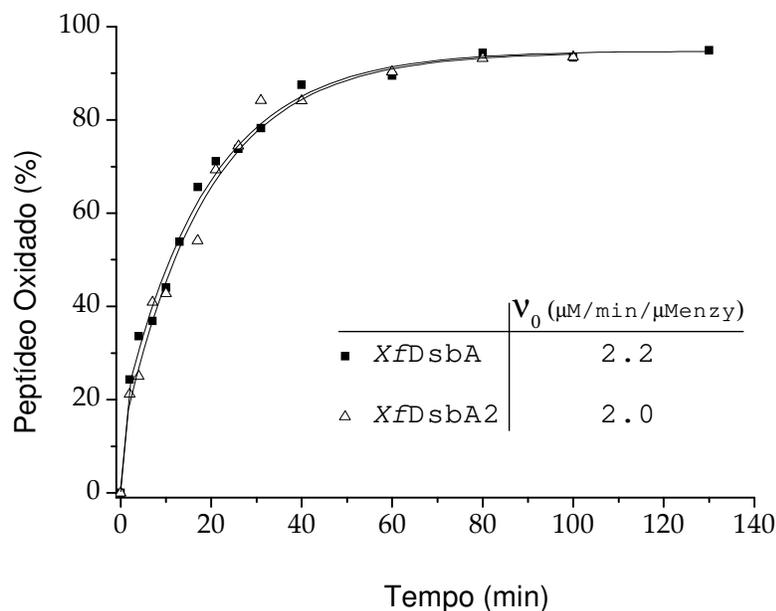


Figura 26: Catálise de oxidação de um peptídeo sintético pelas enzimas *XfDsbA* e *XfDsbA2*.

A caracterização das propriedades redox das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* revelou que a substituição do resíduo de histidina do arranjo CPHC não afeta significativamente o potencial de oxidação da *XfDsbA2*. Em contraste com esse resultado, a mutação do resíduo His32 em *EcDsbA* causa uma dramática

diminuição do potencial redox, fazendo da DsbA um receptor de elétrons menos potente (Grauschopf *et al.*, 1995). Como discutido anteriormente, este resíduo de histidina tem sido proposto como essencial para a estabilização da forma reduzida da DsbA, através de interação eletrostática com o tiolato da cisteína N-terminal Cys30 (Guddat *et al.*, 1997a).

Ambas as proteínas de *X. fastidiosa* apresentam diferenças significativas no sítio ativo se comparadas com as homólogas *EcDsbA* e *VcDsbA* (Martin *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1997). Tanto o sítio ativo da *XfDsbA* quanto da *XfDsbA2* apresentam um resíduo de treonina participando de uma ligação de hidrogênio com a cisteína N-terminal, que pode contribuir para a estabilização do íon tiolato (Figura 17). Esta treonina é substituída por uma valina em *EcDsbA* e *VcDsbA* e também em outras espécies (Figura 15). Embora a proteína *XfDsbA* conserve a seqüência CPHC em seu sítio ativo, em *XfDsbA2* a interação da Cys82 com a Thr203 poderia ser crítica na estabilização da forma reduzida da enzima e conseqüentemente na manutenção de seu potencial redox. O baixo valor de pKa da cisteína N-terminal da *EcDsbA* (3,5) é descrito também como sendo determinante para o alto potencial de oxidação da enzima e os resíduos que compõem a vizinhança do sítio ativo estão diretamente envolvidos nessa propriedade (Ruddock *et al.*, 1995; Gane *et al.*, 1995). A partir da estrutura cristalográfica de *XfDsbA* e do modelo construído para *XfDsbA2*, os valores do pKa da cisteína N-terminal das proteínas foram estimados utilizando-se o programa pro-pKa (Li *et al.*, 2005). Os resultados - pka = -3,1, -2,5 e -4,6 para Cys38 dos monômeros A, B e C de *XfDsbA* respectivamente e pka = 0,71 para Cys82 de *XfDsbA2* - revelaram que em *XfDsbA* o pKa da cisteína N-terminal é

inferior ao observado para a proteína *EcDsbA*, tanto considerando o valor teórico ($pK_a = 0,5$ e $2,7$ para os monômeros A e B respectivamente) quanto o valor experimental ($pK_a = 3,5$) e que em *XfDsbA2* o pK_a da cisteína N-terminal é da mesma ordem daquele calculado para o monômero A da *EcDsbA*, mas inferior ao valor teórico calculado para o monômero B. As diferenças observadas no cálculo teórico de pK_a entre os monômeros A, B e C de *XfDsbA* se dá devido a presença de moléculas de solvente interagindo na região do sítio ativo e ao peptídeo no monômero C. Além disso, para a proteína *EcDsbA*, a diferença do pK_a teórico para os monômeros é explicada pelas diferentes distâncias entre Cys38 S γ e His40 N δ 1 ($3,6 \text{ \AA}$ para o monômero A e $4,5 \text{ \AA}$ para o monômero B). Como a diminuição do valor do pK_a da cisteína N-terminal tem sido relacionada com o aumento do potencial redox de proteínas com motivo CXXC, um menor valor de pK_a para a cisteína N-terminal das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* poder explicar a maior atividade dessas se comparadas à *EcDsbA*.

Além da histidina da seqüência CPHC, o resíduo Glu97 da *EcDsbA* e seu equivalente em *VcDsbA* (His94), têm sido propostos como estando envolvidos na manutenção das propriedades redox de ambas as proteínas (Blank *et al.*, 2003). Acredita-se que a carga positiva líquida da His94 da *VcDsbA* estabiliza o íon tiolato da cisteína N-terminal de maneira semelhante ao proposto para o resíduo His32 do sítio ativo, exceto pelo fato do resíduo His94 estar um pouco mais distante da cisteína (Ruddock *et al.*, 1995; Gane *et al.*, 1995; Blank *et al.*, 2003). O resíduo Gln97 de *EcDsbA*, pertencente ao domínio B, é substituído por uma histidina em *XfDsbA* (His100) e *XfDsbA2* (His144). Em *XfDsbA*, o átomo N ϵ 2 do resíduo His100 está a $3,6 \text{ \AA}$ de distância do oxigênio da cadeia principal da Cys38.

A análise seqüencial de membros da família das DsbAs mostra que a histidina é mais conservada nesta posição (Figura 15). Baseados nas considerações acima, levantamos a hipótese de que, em *XfDsbA2*, dois resíduos estariam envolvidos na manutenção do baixo pKa e estabilização do tiolato da cisteína N-terminal (Cys82), os resíduos Thr203 e His144.

A fim de verificar a influência do resíduo de treonina na atividade das proteínas, os mutantes *XfDsbA*_{T157V} e *XfDsbA2*_{T203V} foram produzidos e suas propriedades redox foram determinadas. Os mutantes foram expressos e purificados seguindo os mesmos protocolos estabelecidos para as proteínas selvagens. A atividade redox dos mutantes foi medida através de ensaios de titulação com o par GSSG/GSH de acordo com os procedimentos experimentais estabelecidos anteriormente. Os gráficos de $\{[GSH]^2/[GSSG]\}/R$ em função de $[GSH]^2/[GSSG]$ foram obtidos e a constante de equilíbrio calculada através de regressão linear. Os gráficos são apresentados na figura 27. Os experimentos foram feitos a 30°C em pH 7,0 e os valores obtidos para as constantes de equilíbrio e potencial redox são mostrados na tabela 12.

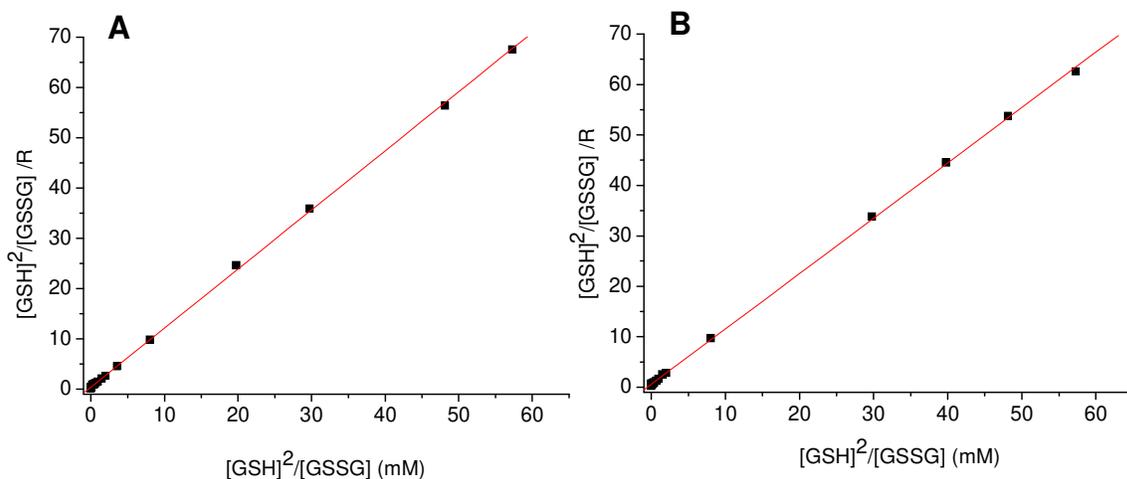


Figura 27: Medidas das constantes de equilíbrio para as proteínas $XfDsbA_{T157V}$ ($r = 0,9999$) (A) e $XfDsbA2_{T203V}$ ($r = 0,9999$) (B). O comprimento de onda com maior valor de intensidade de fluorescência foi de 335 nm.

Tabela 12: Constante de equilíbrio e potencial redox das proteínas mutantes $XfDsbA_{T157V}$ e $XfDsbA2_{T203V}$ para o sistema DsbA/glutathione em pH 7 a 30°C.

	K_{eq} (mM)	E_0 (V)
$XfDsbA_{T157V}$	$0,38 \pm 0,02$	$-0,102 \pm 0,003$
$XfDsbA2_{T203V}$	$0,51 \pm 0,03$	$-0,106 \pm 0,001$

Observa-se uma diminuição do potencial de oxidação das proteínas em relação às enzimas selvagens, sem, entretanto, perda de sua função oxidativa. Comparados à homóloga de *E. coli* os mutantes $XfDsbA_{T157V}$ e $XfDsbA2_{T203V}$ apresentam potencial de oxidação ligeiramente inferior, ao contrário do observado para as enzimas selvagens. Tais resultados indicam que o resíduo de treonina

participa da estabilização do íon tiolato da cisteína, entretanto, não é essencial à atividade catalítica da enzima. Um modelo da proteína *XfDsbA*_{T157V} foi gerado substituindo-se o resíduo Thr157 por um resíduo de valina na estrutura cristalográfica da *XfDsbA* com o intuito de se calcular o pKa teórico do mutante. O valor teórico do pKa da cisteína N-terminal no modelo da proteína mutante (pKa = -1,5, -0,9 e -3,0 para os monômeros A, B e C respectivamente) é ligeiramente superior ao valor teórico encontrado para a proteína nativa, corroborando a hipótese de participação desse resíduo de treonina na estabilização da cisteína N-terminal e sua provável influência no maior poder de oxidação das proteínas de *X. fastidiosa* em relação à homóloga de *E. coli*.

A fim de avaliar o efeito na atividade redox da substituição dos resíduos His100 e His144 das proteínas *XfDsbA* e *XfDsbA2* respectivamente, novos mutantes estão sendo produzidos para posterior determinação de seus potenciais de oxidação. Esperamos com estes experimentos complementar a caracterização funcional destas enzimas.

V - Conclusões e Perspectivas

A determinação da estrutura cristalográfica da DsbA de *X. fastidiosa* e a construção de um modelo por homologia da XfDsbA2 permitiram a análise detalhada das interações presentes no sítio ativo dessas enzimas. Comparações estruturais com outros membros da família revelaram diferenças interessantes na região do sítio ativo. Em XfDsbA a distância entre a cadeia lateral do resíduo de histidina do arranjo CPHC e o tiolato da cisteína N-terminal é ligeiramente superior ao observado em EcDsbA. Além da substituição de tal resíduo de histidina por alanina em XfDsbA2, outras diferenças interessantes estão relacionadas a dois resíduos da vizinhança do sítio ativo Thr157/203 e His100/144 (XfDsbA/XfDsbA2), que não são conservados em EcDsbA. O resíduo de treonina que substitui resíduos de valina em EcDsbA e VcDsbA estabiliza o tiolato da cisteína N-terminal através de uma ligação de hidrogênio. O resíduo de histidina equivalente aos resíduos Glu97 de EcDsbA e His94 de VcDsbA, pode também ter um papel na estabilização da cisteína N-terminal através de interação eletrostática. O refinamento de um peptídeo ligado à região do sítio ativo do monômero C da XfDsbA, revela, pela primeira vez em uma estrutura a alta resolução, o provável modo de interação da DsbA com seus parceiros redox durante o ciclo catalítico.

O estudo das propriedades redox de XfDsbA e XfDsbA2, revelou, surpreendentemente, que a substituição do resíduo de histidina da seqüência CPHC não afeta a função oxidativa da XfDsbA2, e que as proteínas de *X. fastidiosa* apresentam potencial redox consideravelmente superior ao da

homóloga de *E. coli*. É interessante observar que as diferenças encontradas no sítio ativo da enzima XfDsbA2 devem ser as responsáveis pela manutenção do potencial redox, uma vez que em *E. coli* o resíduo de His do arranjo CPHC é essencial à atividade da proteína. A cadeia lateral da Thr203, que forma uma ligação de hidrogênio com a Cys82, poderia ser o resíduo responsável pela estabilização da cisteína e conseqüentemente pela manutenção do alto potencial redox na ausência da histidina. Em busca da confirmação dessa hipótese, os mutantes XfDsbA_{T157V} e XfDsbA2_{T203V} foram produzidos e suas propriedades redox foram determinadas. A mutação dos resíduos de treonina em XfDsbA e XfDsbA2 causaram uma diminuição no potencial redox em relação às enzimas selvagens, entretanto, os mutantes mantiveram suas funções oxidativas. O papel dos resíduos His100/144 (XfDsbA/XfDsbA2) na manutenção do alto poder de oxidação da proteína XfDsbA2 ainda deve ser verificado. Para isso, tal histidina será substituída por glutamina e leucina em ambas as proteínas XfDsbA e XfDsbA2. Os mutantes XfDsbA_{H100Q} e XfDsbA2_{H144Q}; XfDsbA_{H100L} e XfDsbA2_{H144L} estão sendo produzidos e ensaios de atividade serão realizados como continuação deste trabalho.

A presença no cromossomo de dois genes adjacentes que codificam proteínas da família DsbA não é comum dentre os organismos. Entretanto, foi relatado recentemente que a bactéria *P. haloplanktis*, adaptada a baixas temperaturas, também possui dois genes *dsbA* organizados em um único operon (*PhDsbA* e *PhDsbA2*). De modo semelhante ao que observamos em *X. fastidiosa*, a proteína *PhDsbA2* possui uma alanina no arranjo CXXC ao invés da histidina, entretanto, nenhum ensaio funcional foi realizado até o momento. Dessa forma,

nossos resultados mostram, pela primeira vez, a caracterização funcional de duas proteínas da família DsbA de um mesmo organismo, uma delas apresentando a seqüência CPAC. A análise do alinhamento das seqüências mostra que a treonina encontrada em ambas as proteínas de *X. fastidiosa* interagindo com a cisteína N-terminal não é conservada em *P. haloplanktis*. Entretanto, *PhDsbA* conserva o resíduo de histidina que propomos aqui como um dos prováveis responsáveis pelo alto potencial de oxidação da *XfDsbA2* (His100/144 em *XfDsbA/XfDsbA2*).

Concluindo, a análise da estrutura cristalográfica de *XfDsbA* e do modelo de *XfDsbA2* juntamente com ensaios funcionais revelaram que o papel do arranjo canônico CPHC na atividade das DsbAs, bem como de resíduos da vizinhança do sítio ativo pode ser mais complexo do que se supunha. O pKa da cisteína N-terminal das DsbAs é o principal fator que influencia no alto potencial de oxidação dessa família de proteínas, mas não parece ser o único. A Glutaredoxina (Grx), por exemplo, é uma proteína redutora de pontes dissulfeto, mas que apresenta a cisteína N-terminal com baixo valor de pKa (3,5), valor comparável ao da cisteína N-terminal da *EcDsbA*, descrita como sendo uma proteína oxidante. O alinhamento estrutural da região do sítio ativo das proteínas Grx (1KET) e *XfDsbA* mostra a conservação de praticamente todas as interações envolvendo o motivo CXXC (CPYC para Grx), inclusive interações eletrostáticas entre a cisteína N-terminal (Cys22) e o resíduo Lys19, que estabiliza a cisteína N-terminal de forma semelhante ao observado para a *XfDsbA* (Jao *et al.*, 2006), levando-nos a concluir que provavelmente as diferenças de atividade não estejam relacionadas apenas ao valor do pKa, mas sim a fatores ainda não completamente explorados. Vale a pena ressaltar que no caso das DsbAs a inserção do domínio B no domínio

tioredoxina caracteriza-se como uma diferença estrutural marcante em relação a outras proteínas da superfamília tioredoxina. O domínio B deve participar diretamente da interação DsbA-substrato, como pudemos observar através da modelagem de um peptídeo ligado no monômero C da XfDsbA, e pode ter papel crucial no mecanismo catalítico dessa família de proteínas.

Com o objetivo de complementar a caracterização estrutural e funcional das DsbAs de *X. fastidiosa* e, por extensão, desta família de enzimas, novos mutantes estão sendo produzidos para continuação deste trabalho. O mutante XfDsbA2 Δ 44 (deleção do N-terminal desestruturado) foi produzido e ensaios funcionais e de cristalização estão em andamento. A resolução da estrutura cristalográfica desta proteína permitirá uma comparação mais acurada com a homóloga XfDsbA.

Os mutantes XfDsbA_{H100Q}, XfDsbA2_{H144Q}, XfDsbA_{H100L} e XfDsbA2_{H144L} permitirão o estudo da influência deste resíduo de histidina no potencial de oxidação das enzimas e a produção do mutante XfDsbA_{H40A} terá como objetivo investigar se a substituição do resíduo de histidina no arranjo canônico CPHC causa, na proteína de *X. fastidiosa*, efeito semelhante ao observado na homóloga de *E. coli*.

Referências

Abrahams, J. P. and Leslie, A. G. W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Cryst.*, **D52**, 30-42.

Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.

Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. and White, F. H. (1961). The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. *PNAS*, **47**, 1309–1314.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003). *Essential Cell Biology* Garland Science.

Andersen, C. L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D. and Raina, S. (1997). A new *Escherichia coli* gene, dsbG, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol. Microbiol.*, **26**, 121-32

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. and Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status., *PNAS*, **96**, 6161-6165.

Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C. and Bardwell, J. C. A. (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* **98**, 217-227.

Bader, M. W., Xie, T., Yu, C. A., and Bardwell, J. C. A. (2000). Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26082-26088.

Bader, M. W. and Bardwell, J. C. (2001). Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in *Escherichia coli*. *Adv. Protein Chem.*, **59**, 283-301.

Bardwell, J.C.A., McGovern, K., and Beckwith, J. (1991). Identification of a Protein Required for Disulfide Bond Formation In Vivo. *Cell* 67, 6581-6589.

Bardwell, J. C., Lee, J. O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. and Beckwith, J. (1993). A pathway for disulfide bond formation in vivo. *PNAS*, **90(3)**, 1038-1042.

Bergfors T. M. (1999). Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips. International University Line, Biotechnology Series, Second Edition.

Bessette, P. H., Qiu, J., Bardwell, J. C., Swartz, J. R., and Georgiou, G. (2001). Effect of sequences of the active-site dipeptides of DsbA and DsbC on in vivo folding of multidisulfide proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 980-988.

Beissinger, M., and Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *J. Biol Chem.*, **379**, 245–259.

Blank, J., Kupke, T., Lowe, E. Barth, P. Freedman, R. B. and Ruddock, L. W. (2003). The Influence of His94 and Pro149 in Modulating the Activity of *V. cholerae* DsbA. *Antioxidants & Redox Signaling*, **5(4)**, 359-366.

Bouwman, C. W., Kohli, M., Killoran, A., Touchie, G. A., Kadner, R. J. and Martin, N. L. (2003). Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *J. Bacteriol.* **185 (3)**, 991-1000.

Dailey, F. E. and Berg, H. C. (1993). Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *PNAS*, **90(3)**, 1043–1047.

DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>

Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D. and Chan, H. S. (1995). Principles of protein folding -A perspective from simple exact models. *Protein Science*, **4**, 561-602.

Ellis, R. J. and Hartl, F. U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 102-110.

Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.*, **D60**, 2126-2132.

Evans, G. and Pettifer, R. F. (2001). *CHOOCH*: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J. Appl. Cryst.*, **34**, 82-86.

Freedman, R. B. (1989). Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell*, **57**, 1069-1072.

Freedman, R. B. (1991) in *Conformation and Forces in Protein Folding*. (Nall, B. T. and Dill, K. A.). *American Association for the Advancement of Science, Washington, DC*, **206214**

Fujinaga, M. and Read, R. J. (1987). Experiences with a new translation-function program. *J Appl Cryst.*, **20**, 517–521.

Gane, P. J., Freedman, R. B. and Warwicker, J. (1995). A molecular model for the redox potential difference between thioredoxin and DsbA, based on electrostatics calculations. *J. Mol. Biol.*, **249**, 376-387.

Girard, É., Chantalat, L., Vicat, J. and Kahn, R. (2002). Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: results with tetragonal hen egg-white lysozyme. *Acta Cryst.* **D58**, 1-9.

Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. and Bardwell, J. C. A. (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83(6)**, 947-955.

Grosse-Kunstleve, R. W. and Adams, P. D. (2003). Substructure search procedures for macromolecular structures. *Acta Cryst.*, **D59**, 1966-1973.

Guddat, L. W., Bardwell, J. C. A., Glockshuber, R., Wunderlich, M., Zander, T. and Martin, J. L. (1997a). Structural analysis of three His32 mutants of DsbA: Support for an electrostatic role of His32 in DsbA stability. *Protein Science*, **6**, 1893-1900.

Guddat, L. W., Bardwell, J. C. A., Zander, T. and Martin, J. L. (1997b). The uncharged surface features surrounding the active-site of *Escherichia coli* DsbA are conserved and are implicated in peptide binding. *Protein Science*, **6**, 1148 – 1156.

Guddat, L. W., Bardwell, J. C. A. and Martin, J. L. (1998). Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stability. *Structure*, **6**, 757-767.

Hatahet, F. and Ruddock, L. W. (2007). Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS J.*, **274**, 5223–5234.

Hennecke, J., Sillen, A., Huber-Wunderlich, M., Engelborghs, Y. and Glockshuber, R. (1997). Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **36(21)**, 6391-6400.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

Hiniker, A. and Bardwell, J. C. A. (2003). Disulfide Bond Isomerization in Prokaryotes. *Biochemistry*, **42**, 1180-1185.

Hu, S. H., Peek, J. A., Rattigan, E., Taylor, R. K. and Martin, J. L. (1997). Structure of TcpG, the DsbA protein folding catalyst from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.*, **268**, 137-146.

Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. (2006). Crystal Structure of the DsbB-DsbA Complex Reveals a Mechanism of Disulfide Bond Generation. *Cell*, **127**, 789–801.

Jacob-Dubuisson, F., Pinkner, J., Xu, Z., Striker, R., Padmanabhan, A. and Hultgren, S. J. (1994). PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. *PNAS*, **91(24)**, 11552-11556.

Jao, S. C., English Ospina, S. M., Berdis, A. J., Starke, D. W., Post, C. B. and Mieyal, J. J. (2006). Computational and mutational analysis of human glutaredoxin (thioltransferase): probing the molecular basis of the low pKa of cysteine 22 and its role in catalysis. *Biochemistry*. **45(15)**, 4785-4796.

Jonda, S., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R. and Mossner, E. (1999). Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm. *EMBO J.*, **18**, 3271-3281.

Kabsch, W., and Sander, C. (2004). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22(12)**, 2577-2637.

Kabsch, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors LsQKAB. *Acta Cryst.*, **A32**, 922-923.

Kadokura, H., Federico, K. and Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in Prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 111-135.

Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 631-660.

Kobayashi, T., Kishigami, S., Sone, M., Inokuchi, H., Mogi, T., and Ito, K. (1997). Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *PNAS*, **94(22)**, 11857–11862.

Krissinel, E. and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774--797.

LaFortelle, E. and Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.*, **276**, 472-494.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.*, **26**, 283–291.

Laurie, A. T. and Jackson R. M. (2005). Q-SiteFinder: na energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics*, **21**, 1908-1916.

Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.* **65**, 44-45.

Li, H., Robertson, A. D. and Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **61**, 704-721.

Luthy, R., Bowie, J. U. and Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, **356**, 83-5.

Lusty, C. J. (1999). A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **32**, 106-112.

Machado M. A. *Xylella fastidiosa* and the Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a new destructive citrus disease in Brazil.
<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/home/mmachado.html>

Madonna, S., Papa, R., Birolo, L., Autore, F., Doti, N., Marino, G., Quemeneur, E., Sannia, G., Tutino, M. L. and Duilio, A. (2006). The thiol-disulfide oxidoreductase system in the cold-adapted bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: discovery of a novel disulfide oxidoreductase enzyme. *Extremophiles*, **10(1)**, 41-51.

Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol.Biol.* **53**, 159-162.

Martin, J. L., Bardwell, J. C. and Kuriyan, J. (1993). Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature*, **365**, 464-468.

Miroux B & Walker JE. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298

Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1993). Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *PNAS*, **90**, 7084-7088.

Missiakas, D., Schwager, F. and Raina, S. (1995). Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **14**, 3415-3424.

Miyatake, H., Hasegawa, T. and Yamano, A. (2006). New methods to prepare iodinated derivatives by vaporizing iodine labelling (VIL) and hydrogen peroxide VIL (HYPER-VIL). *Acta Cryst.* **D62**, 280-289.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, **262**, 56-65.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.*, **D53**, 240-255.

Nagem, R. A. P., Dauter, Z. and Polikarpov, I. (2001). Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers. *Acta Cryst.* **D57**, 996-1002.

Navaza, J. (1994). *AMoRe*: an automated package for molecular replacement *Acta Cryst.*, **A50**, 157-163.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and Heijne, G. von. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, **10**, 1-6 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Nicholls, A., Sharp, K. A. and Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**, 281-296.

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, *Methods in Enzymology*, **276**, 307-326.

Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M., Gajiwala, K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* **10**, 75-83

Pape, T. and Schneider, T. R. (2004). HKL2MAP: a graphical user interface for phasing with SHELX programs. *J. Appl. Cryst.*, **37**, 843-844.

Perrakis, A., Morris, R. J. and Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 458-463.

Painter, J. and Merritt, E. A. (2006). Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Cryst.*, **D62**, 439-450.

Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. and Dodson, E. J. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta. Cryst.*, **D59**, 1131-1137.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulphide bonds in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15661–15667.

Ptitsyn, O. B. (1973). The stepwise mechanism of protein molecule self-organization. *Dokl Akad Nauk SSSR*, **210**,1213–1215.

Ptitsyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem*, **47**, 83–229.

Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Hacht, A. V. and Bardwell, J. C. A. (2007). The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J Biol Chem.*, **282(39)**, 28823-28833.

Quiocho, F. A. and Richards, F. M. (1964). Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *PNAS*, **52(3)**, 833–839.

Rietsch, A. and Beckwith, J. (1998). The genetics of disulfide bond metabolism. *J. Annu. Rev. Genet.*, **32**, 163-184.

Randall, L. L. and Hardy, S. J. (1995). High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 65-69.

Ruddock, L. W., Hirst, T. R. and Freedman, R. B. (1995). pH-dependence of the dithiol-oxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol: disulphide oxidoreductase) and protein disulphide – isomerase:studies with a novel simple peptide substrate. *Biochem. J.*, **315**, 1001 – 1005.

Rychlewski, L., Jaroszewski, L., Li, W. and Godzik, A. (2000). Comparison of sequence profiles. Strategies for structural predictions using sequence information. *Protein Sci.*, **9**, 232-241.

Šali, A. and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**, 779-815.

Schwarzenbacher, R., Godzik, A., Grzechnik, S. K. and Jaroszewski, L. (2004). The importance of alignment accuracy for molecular replacement. *Acta Cryst.* **D60**, 1229-1236.

Sheldrick, G., and Schneider, T. (1997). SHELXL: High-Resolution Refinement. *Methods Enzymol.*, **277**, 319-343.

Shevchik, V. E., Condemine, G. and Robert-Baudouy, J. (1994). Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO J.*, **13**, 2007-2012.

Simpson, A. J. G. *et al.* (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, **406**, 151-157.

Storoni, L. C., McCoy, A. J. and Read, R. J. (2004). Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Cryst.*, **D60**, 432-438.

Suhre, K. and Sanejouand, Y. H. (2004a). On the potential of normal-mode analysis for solving difficult molecular-replacement problems. *Acta Cryst.* **D60**, 796–799.

Suhre, K. and Sanejouand, Y. H. (2004b). Elnemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Research*, **32**, W610-W614.

Tomb, J. F. (1992). A periplasmic protein disulfide oxidoreductase is required for transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. *PNAS*, **89**, 10252-10256.

Uson, I. and Sheldrick, G. M. (1999). Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **9**, 643-648.

Vagin, A. A. and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025.

Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. and Bricogne, G. (2006). In *Crystallographic Methods*, edited by S. Doublé. Totowa, NJ, USA: Humana Press

Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M. and Sasakawa, C. (1995). Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *PNAS*, **92(11)**, 4927-4931.

Weeks, C. M., Blessing, R. H., Miller, R., Mungee, R., Potter, S. A., Rappleye, J., Smith, G. D., Xu, H. and Furey, W. (2002). Towards automated protein structure determination: BnP, the SnB-PHASES interface. *Z. Kristallogr.*, **217**, 686-693.

Wunderlich, M. and Glockshuber, R. (1993). Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Science*, **2**, 717-726.

Wetlaufer, D. B. (1973a). Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *PNAS*, **70**, 697-701.

Wetlaufer, D. B. and Ristow, S. (1973b). Acquisition of three-dimensional structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **42**, 135-158.

Wetlaufer, D. B. (1990). Nucleation in protein folding-confusion of structure and process. *Trends in Biochemical Sciences*, **15**, 414-415.

Zwart, P. H. (2005). Anomalous signal indicators in protein crystallography. *Acta Cryst.*, **D61**, 1437-1448.

