

# Instituto de Química Departamento de Química Orgânica

# DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

# **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA XACb0033 DA BACTÉRIA** *Xanthomonas axonopodis* **pv.** *citri*

Aluna: Paula Fernanda Lacarini Borin (RA: 011739) Orientadora: Profa. Dra. Ljubica Tasic

Campinas, 2010

# FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

B644c	Borin, Paula Fernanda Lacarini. Caracterização estrutural da proteína hipotética XACb0033 da bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> / Paula Fernanda Lacarini Borin Campinas, SP: [s.n], 2010.
	Orientadora: Ljubica Tasic.
Dissertação - Universidade Estadual de O Instituto de Química. 1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri (Xa</i> 2. Sistema secretório do tipo IV. 3. Clonagem 4. Caracterização estrutural. I. Tasic, Ljubica. II. Universidade Estadual de Campinas. Instit Química. III. Título.	Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	<ol> <li>Xanthomonas axonopodis pv. citri (Xac).</li> <li>Sistema secretório do tipo IV. 3. Clonagem.</li> <li>Caracterização estrutural. I. Tasic, Ljubica.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</li> </ol>

**Título em inglês:** Structural characterization of an hypothetical protein XACb0033 from *Xanthomonas axonopis* pv. *citri* (bacterium)

**Palavras-chaves em inglês:** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), Type four secretion system (T4SS), Cloning, Structural characterization

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Ljubica Tasic (orientadora), Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Giselle Zenker Justos (UNIFESP)

Data de defesa: 13/01/2010

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente e especialmente minha mãe Eufrazia, que sempre me apoiou e me ajudou muito!

Agradeço a minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Ljubica Tasic (Buba) pelos ensinamentos, atenção, pela disponibilidade, prestatividade e pelas risadas que demos juntas!

Ao Prof. Dr. Carlos Ramos, que além de ceder seu laboratório no LNLS para realização dos experimentos, me ensinou e me ajudou desde o inicio da minha iniciação científica em 2001 e me fez gostar ainda mais da Bioquímica!

A minha amiga de laboratório Thais, pela ajuda e companhia que sempre fez!

Aos alunos e funcionários do LNLS, em especial, a Veruska que me ajudou desde o início da minha iniciação científica até redigir esta dissertação!

Aos professores com quais tive trabalho em colaboração, a Profa. Dra. Iris Torriani, Profa. Dra. Anita Marsaioli, a Profa. Dra. Beatriz Guimarães.

Aos amigos Ricardo Marinho, Alexandre, Fábio, Adriana Martins, Adriana Ramos, Ana Paula, Carla e Monteiro!

Ao meu marido André!

Aos membros que compõem esta banca!

Ao IQ-UNICAMP especialmente pela minha formação acadêmica!

*Ao LNLS pela utilização de toda infra-estrutura, desde laboratórios, linhas de luz e biblioteca!* 

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado!!!Muito Obrigada!!!

# Curriculum vitae

## Paula Fernanda Lacarini Borin

Brasileira, casada, 27 anos Rua José de Oliveira Campos, 80 Apto 504 Vila Francischini – Valinhos – SP E-mail: paulaflb@yahoo.com.br

# FORMAÇÃO

- Graduada Bacharel em Química Tecnológica, UNICAMP, conclusão em 2005.
- Técnica em Bioquímica, ETECAP, conclusão em 1999

## ARTIGOS PÚBLICADOS E APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

## **Artigos Publicados**

- Khater, L.; Alegria, M.C.; Borin, P. F. L.; Santos, T.M.; Docena, C.; Tasic, L.; Farah, C. S.; Ramos, C. H. I.; Identification of the flagellar chaperona FlgN in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri* by its interaction with hook-associated FlgK. *Archives of Microbiology* 2007, 188(3), 243-250.
- 2. Tasic, L.; **Borin, P. F. L.**; Khater, L.; Ramos, C. H. I.; Cloning and characterization of three hypothetical secretion chaperona proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri, Protein expression and Purification* **2007**, *53*, 363-369.

## Participação em Reuniões Cienfíficas (Nacionais e Internacionais)

- Marsaioli, A.; Lopes, T.; Borin, P.; Figueiredo, I.; Ramos, C.; Fujiwara, F.; Silva, J. C.; Torriani, I.; Tasic, L.; TYPE IV PROTEIN SECRETION PATHWAY: DOES *Xac* USE IT? 2<sup>nd</sup> IBEROAMERICAN NMR MEETING, Tarragona, Espanha, 2007. (painel)
- Marsaioli, A.; Lopes, T.; Borin, P.; Figueiredo, I.; Ramos, C.; Fujiwara, F.; Silva, J. C.; Torriani, I.; Tasic, L.; TYPE IV PROTEIN SECRETION PATHWAY: DOES *Xac* USE IT? EUROMAR, Magnetic Resonance Conference, Tarragona, Espanha, 2007. (painel)
- Lopes, T. P.; Borin, P. F. L.; Ramos, C. H. I.; Silva, J. C.; Torriani, I. C. L.; Tasic, L.; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Type IV Secretion System Proteins Interaction, 36<sup>a</sup> SBBq e 10<sup>th</sup> IUBMB, Salvador, BA, Brasil, 2007. (painel)

- Lopes, T. P.; Borin, P. F. L.; Ramos, C. H. I.; Figueiredo, I. M.; Marsaioli, A. J.; Tasic, L.; STD-NMR in Type IV Secretion System Proteins analyses, 11<sup>th</sup> NMR Users Meeting/Workshop NMR in South America, Angra dos Reis, RJ, Brasil, 2007. (painel)
- Lopes, T. P.; Borin; P. F. L.; Aoki, P. S.; Ramos, C. H. I.; da Silva, J. C.; Torriani, I.; Tasic, L.; Comparative analysis of possible type IV secretion system chaperona (XACb0033) and its co-expressed and co-purified target protein (XACb0032) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, 17<sup>a</sup> RAU, Resumos de trabalhos científicos, 66, Campinas, SP, Brasil, **2007**. (painel)
- Figueiredo, I. M.; Borin; P. F. L.; Lopes, T. P.; Ramos, C. H. I.; Marsaioli, A. J.; Tasic, L.; A RMN como ferramenta primordial nas interações supramoleculares de chaperonas, IX Jornada de Ressonância Magnética Nuclear, Recife, PE, Brasil, 2006. (painel e *apresentação oral*)

# **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL**

### • Desde 2006 – Petrobras - Replan

Cargo: Técnica de Operações Jr

Principais atividades: Controle e acompanhamento do processo de produção de Nafta e GLP do setor de Craqueamento Catalítico Fluído.

### • 2004-2006 – UNICAMP

Cargo: Técnica de Laboratório

Principais atividades: Preparação das aulas experimentais do laboratório de gradução de Química Orgânica.

## • 2004 – EMS Sigma Pharma

Cargo: Estagiária

Estágio da graduação na Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de novos medicamentos.

### • 2001-2004 – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Iniciação Científica no Laboratório de Biofísica Molecular, atuando com clonagem e análise estrutural de proteínas.

## 2001-2001 – Livet Produtos Veterinários

Cargo: Técnica de Laboratório

Pricipais atividades: Montagem do laboratório e análises de patógenos por técnicas de biologia molecular.

### • 2000-2001 – Intituto Butantan

Cargo: Estagiária

Estágio do ensino técnico no centro de Biotecnologia, trabalhando com Vacinas de DNA recombinantes

#### Resumo

# CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA XACb0033 DA BACTÉRIA Xanthomonas axonopodis pv. citri

**Palavras chave**: Xanthomonas axonopodis pv. citri (Xac), Proteína XACb0033, Sistema secretório do tipo IV (T4SS), Clonagem, Expressão, Caracterização Estrutural, Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

A Xanthomonas axonopodis pv. citri (Xac) é uma bactéria Gram-negativa que parasita plantas cítricas e é responsável pela doença conhecida como cancro cítrico, que apresenta grande importância econômica em todo mundo. Acredita-se que a infecção da célula hospedeira ocorre com atuação dos sistemas de secreção, onde fatores macromoleculares de virulência, normalmente proteínas ou complexos de ácidos nucléicos com proteínas, são excretados para o citosol da célula no caso dos sistemas do tipo III e IV, onde irão interferir no processo celular do hospedeiro. O alvo do estudo é a proteína hipotética XACb0033, codificada pelo locus virB do plasmídio pXac64. Ela foi identificada como possível chaperona secretória do sistema de secreção tipo IV, por apresentar diversas características destas proteínas, como baixo peso molecular, pl ácido e propensão a formação de dímeros, entre outras. A XACb0033 foi clonada no vetor de expressão pET23a(+) e expressa na bactéria Escherichia coli utilizando técnicas de biologia molecular de clonagem e expressão. Os resultados da expressão foram satisfatórios, obtendo-se a proteína em quantidade suficiente para sua purificação seguida pela caracterização estrutural. A XACb0033 foi analisada por Espectrometria de Massas (MALDI-Tof MS), Dicroísmo Circular (CD), fluorescência de emissão estática e dinâmica, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN de <sup>1</sup>H) e Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Todos os dados indicam que a XACb0033 apresenta estrutura enovelada, não interage com os nucleotídeos (ATP e ADP) e tende em agir em forma dimerica seguindo o modelo de uma chaperona secretória, e, por fim, a estrutura do seu envelope molecular foi obtida.

### Abstract

# STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF AN HYPOTHETICAL PROTEIN XACb0033 FROM Xanthomonas axonopis pv. citri (BACTERIUM)

*Key words*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri (Xac)*, XACb0033 protein, Type four secretion system (T4SS), Cloning, Expression, Structural Characterization, Small angle X-ray scattering (SAXS).

Xanthomonas axonopodis pv. citri (Xac) is a Gram-negative bacterium that parasites citric plants all over the world and is responsible for causing the citrus canker with significant economic importance. It is believed that infection of the host cell occurs with activity of Xac's secretion systems, where macromolecular virulence factors, usually proteins or nucleic acid complexes with proteins, are excreted into the cytosol of the host cells as in the case of type III and IV systems. where they will interfere with the key cell processes. The aim of our study was structural characterization of the XACb0033, Xac's hypothetical protein, encoded by the *locus virB* of pXac64 plasmid. This protein was identified as a possible type IV secretion system chaperona because it presents many features of these proteins, such as low molecular weight, acidic pl, and propensity to form dimers, among others. The XACb0033 was cloned at expression vector pET23a (+) and expressed in *Escherichia coli* using molecular biology techniques for cloning and expression. The expression results were satisfactory, obtaining sufficient protein for its purification followed by structural characterization. The XACb0033 was analyzed by Mass Spectrometry (MALDI-Tof MS), Circular Dichroism (CD), static and dynamic Fluorescence, Nuclear Magnetic Resonance (<sup>1</sup>H NMR) and by Small Angle X-ray Scattering (SAXS). All collected data indicated that XACb0033 has folded structure, does not interact with nucleotides (ATP and ADP) and tends to act in dimeric form, following a model of a secretory chaperona, and, at last but not at least, its molecular envelope structure has been obtained.

# Índice

Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xvi

1.	Introdução	1
	1.1. Xanthomonas axonopodis pv. citri - Xac e Cancro Cítrico	1
	1.2. Sistemas de Secreção em bactérias Gram-negativas	3
	1.3. Sistema Secretório Tipo III (T3SS)	4
	1.4. Sistema Secretório Tipo IV (T4SS)	4
	1.5. Chaperonas de Secreção (CS)	7
	1.6. Genoma da Xac e a proteína em estudo XACb0033	9
	1.7. Clonagem	11
	1.8. Expressão de proteínas em sistema bacteriano	12
	1.8.1. Sistema pET de expressão	13
	1.9. Análises espectroscópicas e espectrométricas	14
	1.9.1. Dicroísmo circular (CD)	14
	1.9.2. Fluorescência de emissão	16
	1.9.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	18
	1.9.4. Espalhamento de Raios – X a Baixo Ângulo (SAXS)	20
	1.9.5 Espectrometria de Massas (EM)	24
2.	Objetivos	26
3.	Materiais e Métodos	26
	3.1. Clonagem	26
	3.1.1. Seleção das enzimas de restrição	26
	3.1.2 Amplificação do DNA	27
	3.1.3 Eletroforese de DNA	28
	3.1.4 Purificação de DNA em bandas de gel de agarose	29
	3.1.5 Suclonagem em pUC18	29
	3.1.6. Clonagem em pET23a(+)	30

3.1.7. Sequênciamento de DNA	33
3.1.8. Extração de DNA plasmidial	34
3.2. Expressão de proteínas	35
3.2.1. Metodologia	35
3.2.2 Meio de cultura Luria Broth (LB)	35
3.2.3. Cepas bacterianas utilizadas	35
3.2.4. Células competentes	
3.2.5. Eletroporação	
3.2.6. Expressão e preparação dos extratos proteícos	37
3.2.7. Lise bacteriana	37
3.2.8. Desenovelamento da proteína XACb0033 com uréia	38
3.2.9. Purificação da proteína de interesse (XACb0033)	38
3.2.10. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE, 15 %)	39
3.3. Diálises	40
3.4. Espectrometria de massas	40
3.5. Determinação da concentração da proteína XACb0033	41
3.6. Dicroísmo Circular (CD)	41
3.7. Fluorescência de emissão estática e determinação de tempo de	vida 42
3.8. Ressonância Magnética Nuclear	43
3.9. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	43
4. Resultados e Discussões	45
4.1. Clonagem da ORF 10073.2 (gene que codifica XACb0033)	45
4.1.1. Subclonagem em pUC18	45
4.1.2. Clonagem em pET23a (+)	46
4.1.3. Expressão de proteínas e preparação dos extratos protéicos	; 50
4.1.4. Purificação da XACb0033	52
4.1.5. Determinação da concentração da proteína XACb0033	53
4.1.6 Espectrometria de massas	53
4.1.7. Análise estrutural por dicroísmo circular	
4.1.8. Emissão de fluorescência: estática e dinâmica	
4.1.9 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1	

(RMN de <sup>1</sup> H)	60
4.1.10. Tentativas de Cristalização	61
4.1.11. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	62
5. Considerações Finais	65
6. Conclusões	68
7. Referências Bibliográficas	69

# Lista de Abreviaturas

ADT	Adenosina difosfato	
APS	Persulfato de amônio do inglês amonium persulfate	
АТР	Adenosina trifosfato	
BSA	Albumina de soro bovino do inglês Bovine serum albumine	
CD	Dicroímo circular do inglês Circular Dichroism	
ddNTP	2',3'didesoxiribonucleotídeo 5'-trifosfato	
DDT	Ditiotretiol	
<b>D</b> <sub>máx</sub>	Diâmetro máximo	
DMSO	Dimetilsulfoxido	
DNA	Ácido dexosiribonucléico do inglês DeoxyriboNucleic Acid	
dNTP	2'-Desoxinucleosídeo 5'-trifosfato	
E. coli	Escherichia coli	
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>	
EM	Espectrometria de massas	
FPLC	Cromatografia líquida de performance rápida do inglês Fast Protein Liquid Chromatography	
GST	Glutathiona S-Transferase	
НА	Proteína Hemaglutinina do inglês Hemagglutinin protein	

Hsc	Componentes de choque térmico do inglês Heat Shock Cognate	
Hsp	Proteína de choque térmico do inglês Heat Shock Proteins	
IFGW	Instituto de Física Gleb Wataghin	
IPTG	Isopropil β-tiogalactopiranosideo	
LB	Luria Broth	
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron	
locus	Do latim, "lugar" é o local fixo num cromossomo onde está localizado	
MALDI	Ionização a Laser assistida por Matriz do inglês Matrix Assisted Laser Desorpion/Ionization	
Mb	Mioglobina	
Mpf	Formação do par conjugado do inglês Mating Pair Formation	
mRNA	RNA mensageiro	
NOE	Efeito Overhauser Nuclear do inglês Nuclear Overhauser Effect	
OGM	Organismo geneticamente modificado	
ORF	Fase de leitura aberta do inglês Open Reading Frame	
pb	Pares de bases	
PCR	Reação em cadeia da polimerase do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>	
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonila do inglês phenylmethanesulphonylfluoride	
pv.	Pathovar	

qsp	Quantidade suficiente para	
Rg	Raio de giração	
RMN	Ressonância Magnética Nuclear	
RNA	Ácido ribonucleico do inglês Ribonucleic acid	
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo do inglês <i>Small Angle X-ray Scattering</i>	
SDS	Dodecil sulfato de sódio do inglês Sodium Dodecyl Sulfate	
STD	Transferência de diferença de saturação, do inglês <i>Saturation Transfer Difference</i>	
T3SS	Sistema secretório Tipo 3, do inglês Type 3 secretion System	
T4SS	Sistema secretório Tipo 4 do inglês Type 4 secretion System	
T-DNA	DNA transferido do inglês Transferred DNA	
TEMED	N,N,N´,N´- tetrametiletilenodiamino	
Tof	Tempo de vôo, do inglês Time-of-flight	
Vir	Virulência	
WaterLOGSY	Espectroscopia de observação de ligação da água com gradiente, do inglês Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy	
Хас	Xanthomonas axonopodis pv. citri	
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactosídeo	

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.1.:** Absorbâncias de luz circularmente polarizada (CD) características para as estruturas secundárias de proteínas ( $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ )..15

Tabela 5.1.: Comparação entre chaperonas secretórias com a XACb0033..67

### Lista de Figuras

Figura 1.5.: Seqüência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos da XACb0033......10

*Figura 1.6.:* Espectros de CD: característicos para proteínas com estrutura de α-hélice, folha-β e randômica......15

*Figura 1.9.:* Intensidade de espalhamento e função de distribuição de distâncias para diferentes objetos geométricos (Svergun e Koch, 2003)......22

### Figura 4.5.: Indução com 1mM IPTG da proteína hipotética XACb0033.

Gel SDS-page 15%. Poço 1 – Amostra não induzida, poço 2 – Amostra com 1h de indução, poço 3 Amostra com 16hs de indução......50

xviii

# 1. Introdução

### 1.1. Xanthomonas axonopodis pv. citri - Xac e Cancro Cítrico

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri (Xac)* é uma bactéria Gram-negativa, que parasita plantas cítricas. Possui como características respiração aeróbica, crescimento lento, formato de bacilococus e locomoção flagelar, fato importante para a sua adesão à célula hospedeira. Também, apresenta sistemas de secreção que permitem que fatores macromoleculares de virulência sejam secretados para o meio extracelular (Brunings e Gabriel, 2003). Este fitopatógeno é responsável pelo desenvolvimento do cancro cítrico, uma doença que no Brasil foi introduzida provavelmente por volta de 1954, sendo constatada pela primeira vez no ano de 1957, no município de Presidente Prudente, em material propagativo proveniente do Japão (Bitancourt, 1957).

A doenca do cancro cítrico apresenta grande importância na economia brasileira e paulista, uma vez que o cinturão citrícola paulista é composto por mais de 200 milhões de pés de laranja, plantados em 628 mil hectares, responsáveis por 53% da produção mundial de suco e 80% do comércio internacional deste produto. Além disso, é o maior parque citrícola do mundo, empregando atualmente mais de 400 mil pessoas e gerando divisas ao redor de US\$1,5 bilhões anuais. A receita com as exportações brasileiras de suco de laranja superou R\$ 2 bilhões na safra 2006/07. Considerando-se apenas as exportações de suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ), o faturamento da indústria cresceu 70,75% na safra passada, comparação а safra anterior em com (http://www.abecitrus.com.br/informativo/nota receitajul07.html). Apesar do grande potencial produtivo, a citricultura brasileira é alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que são capazes de causar danos irreversíveis na planta e na fruta, o que resulta em queda de produtividade e da qualidade dos frutos. O cancro cítrico é uma doença que causa lesões nos frutos, tornando-os inadeguados para o consumo e comercialização. Todos os tecidos da planta, com

1

exceção da raiz, são susceptíveis a contaminação. Os tecidos mais jovens em crescimento ativo, porém, são alvos mais sensíveis. No inicio, as lesões são pequenas, circulares e de cor amarela, sendo que com o tempo as lesões tornamse maiores, mais salientes e de cor castanha (Figura 1.1).



*Figura 1.1.: Xanthomonas* e o cancro cítrico: (A) Foto por microscopia eletrônica de varredura de um estômato aberto de uma folha apresentando a *X. citri* em seu canal (Graham e col., 2004). Características de lesões na folha (B), fruto (C) e ramo (D), causadas pela infecção com *X. citri* (<u>http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html</u>).

A *Xac* é de fácil disseminação, pois não necessita de um vetor específico de infecção, sendo transmitida através da ação do vento, da chuva e manuseio de ferramentas agrícolas. Apresenta alto índice de contágio, uma vez que o patógeno penetra na planta através dos estômatos e lenticelas, e também através de lesões causadas por insetos ou pelo homem. É muito resistente, conseguindo sobreviver em diversos ambientes por vários meses ou anos, e a única forma de eliminá-la é erradicando as plantas contaminadas (http://www.fundecitrus.com.br/.). Desta forma, estudar o cancro cítrico e o seu agente causador é de extrema importância

para que haja um melhor entendimento da doença e dos mecanismos de virulência do patógeno, contribuindo para a melhoria da citricultura brasileira.

### 1.2. Sistemas de Secreção em bactérias Gram-negativas

Muitas bactérias Gram-negativas patogênicas são capazes de infectar e causar doenças nos seus hospedeiros, de modo que a infecção começa com a atuação dos sistemas de secreção, em que fatores macromoleculares de virulência, normalmente proteínas ou complexos de ácidos nucléicos com proteínas, são excretados para o citosol da célula hospedeira, onde irão interferir no processo celular do hospedeiro. Assim, desempenham um papel fundamental durante a infecção e, também, no desenvolvimento da doença, suprimindo os mecanismos de defesa do hospedeiro (Galán e Collmer, 1999; Cornelis e Van Gijsegem, 2000; Thanassi e Hultgren, 2000). Os sistemas de secreção são compostos por complexos multi-protéicos, e podem ser classificados em seis tipos diferentes, como mostrados na Figura 1.2, dependendo da forma como é realizada a translocação dos fatores de virulência para a célula hospedeira (Economou, 1999; Thanassi e Hultgren, 2000; Buttner e Bonas, 2002; Henderson e col., 2004)



*Figura 1.2.:* Sistemas secretórios bacterianos. Esquema dos tipos de sistemas secretórios utilizados por bactérias Gram-negativas (adaptado de Buttner e Bonas, 2002).

### 1.3. Sistema Secretório Tipo III (T3SS)

O sistema de secreção do tipo III (T3SS, "Type three Secretion System") depende do contato com a célula hospedeira para ser montado. Acredita-se que o sistema que compõe o flagelo da Xac seja ancestral deste sistema de secreção, sendo que um terço das proteínas que compõem a estrutura macromolecular de T3SS são homólogas às proteínas que compõem a porção basal do flagelo (Hueck, 1998; Aizawa, 2001). A Xac possui um conjunto de genes que codifica o T3SS, e outro conjunto de genes, que codifica o flagelo polar, responsável pela locomoção da bactéria, ambos localizados no cromossomo (da Silva e col., 2002). A eficiência da motilidade é importante para a infecção, entretanto, a capacidade de secreção deste sistema derivado do flagelo é de fundamental importância para atacar a célula hospedeira. O T3SS é bem mais eficiente do que os sistemas secretórios tipo I e II (Figura 1.2.) na infecção do hospedeiro, devido à estrutura supramolecular formada pelo conjunto de proteínas que atravessam a membrana bacteriana (composta por três barreiras físicas: membrana interna, periplasma e membrana externa) e a parede da célula vegetal. Desta forma, além de secretar as proteínas de virulência para o meio externo, é capaz de injetá-las diretamente no citosol das células hospedeiras eucarióticas. O Sistema de Secreção do Tipo III desempenha papel fundamental no desenvolvimento de doenças causadas por patógenos de animais como a Yersinia ssp, Shigella flexneri e Salmonela typhimurium, assim como por patógenos de plantas como Pseudomonas syringae, Erwinia ssp e Xanthomonas ssp (Hueck, 1998; Groisman, 2001).

### 1.4. Sistema Secretório Tipo IV (T4SS)

Outra estratégia para garantir o sucesso do patógeno frente ao hospedeiro é o mecanismo de conjugação, no qual o DNA de uma bactéria pode ser incorporado por outra e então transmitido às gerações futuras. Nas abordagens clínicas, a conjugação é excepcionalmente problemática, resultando na rápida disseminação de genes de resistência a antibióticos, e outros fatores de virulência entre populações bacterianas (Burns, 1999; Christie, 2001). O protótipo do T4SS é o sistema *Vir*B/D4 da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, que exporta DNA simples fita, conhecido como T-DNA ("Transferred DNA"), através das membranas bacterianas para dentro da célula da planta, onde o T-DNA se integra ao seu genoma (Zambryski, 1988). O sistema é composto pelo *locus virB*, que consiste em 11 genes (VirB1 a VirB11), dez dos quais são essenciais para a transferência do DNA (VirB2 a VirB11). Já o sistema VirB1 atenua a virulência, e conseqüentemente a transferência de DNA (Berger e Christie, 1994), além de mais um gene que codifica o VirD4, o qual é o receptor do substrato (Christie, 1997). As proteínas VirB1 a VirB11 constituem as subunidades da estrutura supramolecular denominada formação do par conjugado ("Mating Pair Formation" - Mpf), e estas sozinhas formam a estrutura do canal. Quando associadas à proteína VirD4, formam o canal de secreção trans-envelope (Christie, 2001).

O sistema de secreção do tipo IV pode funcionar como sec-dependente e também como sec-independente (Burns, 1999) (T4SS, Figura 1.2), e é uma nanomáguina macromolecular, é utilizado como duto de transporte de proteínas ou complexos proteína/DNA para as células dos hospedeiros, tendo algumas similaridades com o sistema do tipo III, embora aparentemente estes não sejam relacionados (Fronzes e col., 2009; Matxalen e col., 2009). Estes dois sistemas possuem algumas características em comum, tais como, necessidade de contato físico com a célula hospedeira, exigência de que uma chaperone secretória se ligue à proteína a ser entregue (substrato) e espera-se que a exportação do substrato seja feita em somente uma etapa via canal de secreção. Entretanto, existe uma diferença fundamental entre os sistemas: o T4SS é derivado da maquinaria de conjugação de DNA, podendo exportar DNA simples fita e complexo DNA-proteína até a célula, e não há nenhuma evidência de que o T3SS possa fazer o mesmo. As proteínas mais conservadas do T4SS geralmente estão envolvidas com a ligação de ATP para transportar seu substrato para a célula hospedeira (Figura 1.3.), e já foram observados casos que proteínas do T4SS são capazes de hidrolisar ATP in vitro na ausência do seu substrato potencial ou

qualquer outro componente do T4SS (Christie e Vogel, 2000; Arechaga e col., 2008; Fronzes e col., 2009; Matxalen e col., 2009).

Para tal, postula-se que as ATPases VirB4 e VirB11 mediam a formação da maquinaria de secreção ou funcionam através de mudanças conformacionais dirigidas por ATP (Bruns, 2003). Isto é feito baseando-se na estrutura cristalográfica da *H. pylori* HP0525, uma ATPase homóloga de VirB11, onde foi sugerido que a sua estrutura hexamérica funciona como um poro, o qual fecha e abre de acordo com a mudança na conformação propiciada pela ligação ou hidrólise de ATP, respectivamente (Yeo e col., 2000)



*Figura 1.3.:* Sistema secretório do tipo quatro (T4SS). As proteínas B1-B11 constituem o T4SS atravessando as duas membranas e, representado em laranja, parte externa deste sistema. A proteína D4 é uma ATPase e hidrólise de ATP (em azul), libera a energia necessária para secreção do substrato para a célula do hospedeiro (seta vermelha, retirado de Matxalen e col, 2009).

## 1.5. Chaperonas de Secreção (CS)

As chaperonas de sistemas de secreção, em geral, têm peso molecular menor que 20 kDa, pl ácido, interagem especificamente com uma proteína efetora, e uma ou duas proteínas translocadoras; atuam como dímero e se ligam a região amino-terminal da proteína cognata, possuem hélice anfipática no C-terminal e, diferentemente das chaperonas Hsp ("Heat Shock Proteins"), não possuem domínios de ligação de ATP (Wattiau e col., 1996; Bennett e Hughes, 2000; Feldman e Cornelis, 2003). Em geral, para microrganismos, as chaperonas de secreção são codificadas por genes localizados próximos àgueles que codificam as proteínas as quais estas irão se associar, auxiliando na sua identificação (Cornelis e Van Gijsegem, 2000). Esta família de proteínas não partilha similaridades significantes entre suas seguências primárias. Entretanto, a estrutura cristalográfica de algumas delas mostra que estas apresentam estruturas terciárias bem similares (Stebbins e Galán, 2003). Comumente, as chaperonas se ligam aos aminoácidos 50-100 de sua proteína cognata. Desse modo, seu sítio de ligação é logo abaixo da seguência sinal na extremidade amino-terminal (Schesser e col., 1996; Woestyn e col., 1996). As estruturas tridimensionais obtidas através da co-cristalização do chaperone com a sua proteína efetora fornecem informações sobre a função destas. Mostram que estas chaperonas mantêm o seu domínio de ligação na proteína cognata em um estado desenovelado, o que propicia com que a proteína efetora fique em uma conformação e tamanho compatíveis com o tamanho do canal de secreção (Stebbins e Galán, 2003). Outro papel proposto é prevenir a interação prematura da proteína a ser secretada com outras proteínas no citoplasma bacteriano (Woestyn e col., 1996). Outra função importante diz respeito ao encaminhamento do complexo chaperone/proteína efetora para a maquinaria de secreção, onde este processo é dirigido pelo chaperone, uma vez que a remoção do domínio de ligação do chaperone, em alguns dos complexos previne a secreção da proteína cognata (Lee e Galán, 2004). Portanto, a sequência sinal existente na proteína a ser secretada deve ser

um sinal geral para a secreção e as chaperonas devem conferir a especificidade necessária ao processo.

Além de reconhecer o complexo, a maquinaria de secreção tem de desfazêlo, uma vez que a chaperone se mantém no citosol bacteriano após a proteína efetora se engajar no sistema (Galán e Collmer, 1999; Bennett e Hughes, 2000). Ao chegar à maguinaria de secreção, a proteína efetora encontra-se com o seu domínio efetor, que normalmente é localizado na extremidade amino-terminal, ainda enovelada (Luo e col., 2001). A limitação no tamanho do canal de secreção exige que este domínio se encontre desenovelado para que seja possível a secreção (Galán e Wolf-Watz, 2006). Tem sido demonstrado que as ATPases associadas à maguinaria de secreção atuam de forma a ajudar no recrutamento e no processo de desenovelamento da proteína a ser secretada, funções condizentes com a sua posição (membrana interna) na estrutura do sistema de secreção. Estudos in vitro mostraram que a ATPase se liga tanto ao chaperone sozinho, quanto ao complexo e os estudos *in vivo* demonstraram que na presença de ATPase ocorre a dissociação do complexo e o desenovelamento do domínio efetor da proteína a ser secretada (Akeda e Galán, 2005; Muller e col., 2006). Essa atividade de desenovelamento pode ser crítica no fornecimento de energia para o processo de secreção (Galán e Wolf-Watz, 2006).

### 1.6. Genoma da Xac e a proteína em estudo XACb0033

A *Xac* possui um cromossomo e dois plasmídeos, o pXAC33, com 33,7 Kb e o pXAC64, com 64,4 Kb. No seu genoma foram encontrados domínios que codificam sistemas secretórios tipo II, III e IV. O sistema do tipo II apresenta dois domínios diferentes, um geral ao gênero *Xanthomonas* (*xps -Xanthomonas* protein secretion), e outro específico para *Xac*, (*xcs- Xanthomonas citri* protein secretion). Já o T3SS está localizado no cromossomo, e é codificado por um grupo de 27 genes (da Silva e col., 2002). No seu genoma são codificados dois sistemas do tipo T4SS, que são distintos e independentes. Um no cromossomo, cuja função ainda não é conhecida e outro no plasmídeo pXAC64, que codifica a clássica maquinaria de conjugação (da Silva e col., 2002; Alegria e col., 2005).

Foram realizados ensaios de duplo-híbrido para estudar interações entre proteínas do T4SS, a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais a *Xac* utiliza este sistema para interagir e modificar o metabolismo do hospedeiro. Estes ensaios foram realizados utilizando um número de proteínas de *Xac* como isca e a biblioteca genômica de *Xac* como presa, sendo encontradas várias interações entre os componentes do T4SS e proteínas hipotéticas. Uma destas interações foi atribuída às proteínas XACb0032 e XACb0033 (Alegria e col., 2005).

O gene da proteína hipotética XACb0033 encontra-se entre os genes *trwC* e *virB1* do plasmídeo pXAC64 da *Xac*, como mostrado na Figura 1.4. (Alegria e col., 2005). A XACb0033, descrita como possível chaperone do T4SS, tem 72 aminoácidos (Kather e col., 2005) e possui ortologos encontrados em *Nitrosomonas europaea*, *Rhodospirillum* e *X. fastidiosa*. O domínio mínimo requerido na interação da XACb0033 com sua proteína parceira XACb0032 (possível proteína de virulência) corresponde aos resíduos 18 a 72 da sequência de resíduos de aminoácido da XACb0033, representada na Figura 1.5.



*Figura 1.4.:* Representação do plasmídeo pXAC64 da *Xac*: Genes que codificam proteínas com funções desconhecidas estão indicados em branco, como é o caso da XACb0033, as setas escuras representam genes homólogos a genes com função conhecida. As setas indicam interações observadas em ensaio duplo-híbrido (isca → presa, retirado da Alegria e col. 2005).

XACb0033	<b>5'ATG</b> GCACACGTCAATTCACGAGTTCAAAAGCACCGCGAC GCCCTGCGCATGGCAGGGCTGCGTCCGGTGCAAATTTGG GTGCCGGACACACGGCGGCCTGACTTCGCCGAGGAATGC
Sequência dos nucleotídeos	CGCCGTCAGTGTCGTCTTGCTGCACAAGCGGACATGGCG GATACCGACATGCAGCGCTTCATGGATGAGGCGCTAGCA GACATGGATGGCTGGACGGAA <b>TGA</b> 3'
XACb0033 Sequência dos aminoácidos	MAHVNSRVQKHRDALRMAGLRPVQIWVPDTRRPDFAEECR RQCRLAAQADMADTDMQRFMDEALADMDGWTE

Figura 1.5.: Sequência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos da XACb0033.

O entendimento das estruturas tridimensionais das proteínas envolvidas no mecanismo de translocação (proteínas efetoras e chaperonas) é essencial para que o mecanismo de virulência da *Xac* seja esclarecido, uma vez que proteínas de virulência com estrutura 3D específica e compatível com o tamanho do sistema de secreção são introduzidas na célula hospedeira (Galán e Collmer, 1999; Feldman e Cornelis, 2003; Alegria e col., 2004).

### 1.7. Clonagem

Uma variedade de técnicas referentes à tecnologia de DNA recombinante pode ser utilizada na clonagem de DNA, em que a preparação de grande número de moléculas de DNA idênticas é executada. A estratégia de clonagem utilizada é baseada em ampliação de um fragmento de DNA a partir do DNA extraído das células doadoras (Xac), o qual é então ligado a um plasmídeo de DNA, que pode se replicar na célula de um hospedeiro. A ligação do fragmento-plasmídeo gera o DNA recombinante que é inserido em células bacterianas (organismo geneticamente modificado, OGM) para síntese no novo clone (Lodish e col, 2004) O fragmento de DNA a ser ampliado representa um gene ou conjunto de genes que desejam ser clonados, e analogamente ao RNA, o DNA é sintetizado a partir de precursores de desoxinucleosídeos 5'-trifosfato (dNTPs). Também como a síntese de RNA, a síntese de DNA sempre ocorre na direção 5'  $\rightarrow$  3' devido ao crescimento da cadeia resultar da formação da ligação fosfoéster entre o oxigênio 3' da fita que está se formando e o fosfato 5' do dNTP. A RNA polimerase pode achar um sítio de inicialização apropriado nas duplas fitas do DNA a iniciar a síntese do RNA complementar à fita molde de DNA Em contraste, DNA polimerase não consegue iniciar uma síntese de cadeia de novo, para isto reguer uma fita pequena e pré-existente de RNA ou DNA, chamada de iniciador ou primer, para iniciar o crescimento da cadeia. Com o primer emparelhado à fita molde, a DNA polimerase adiciona um desoxinucleotídeo ao grupo hidróxido livre na posição 3' do primer. (Lodish e col, 2004; Voet e Voet, 2006)

Os plasmídeos utilizados em tecnologia de DNA recombinante são moléculas de DNA dupla fita circulares que são separadas do DNA cromossomal da célula. Este DNA extra-cromossomal que ocorre naturalmente em bactérias e leveduras existindo uma relação parasítica com a célula do hospedeiro. Como o DNA cromossomal da célula hospedeira, o plasmídeo é duplicado antes de cada divisão celular. Durante a divisão celular, cópias dos plasmídeos são segregados para cada célula filha, assegurando a propagação do plasmídeo através das próximas gerações da célula do hospedeiro. Os plasmídeos mais utilizados na

tecnologia de DNA recombinante são aqueles que replicam em *E. coli*, apresentando entre 1,2 a 3 kb, e contém três regiões essenciais para clonagem de DNA: uma origem de replicação, um marcador que permite resistência, usualmente gene de resistência a drogas, e uma região onde DNA exógeno pode ser inserido (Lodish e col, 2004).

### 1.8. Expressão de proteínas em sistema bacteriano

A expressão de proteínas em bactéria é um importante método para a produção e estudo de proteínas (Voet e Voet, 2006, Lodish e col, 2004). Se, anteriormente, a quantidade de proteínas obtidas via manuseio da grande quantidade de tecidos processados e purificados representava um obstáculo, hoje esse tipo de desafio foi superado pela boa eficiência de expressão de proteínas em bactérias. As bactérias *E. coli* são comumente utilizadas para produção de proteínas e replicação de DNA plasmidial Devido sua fácil manipulação, rápido crescimento e por poderem carregar plasmídeos, constituem vetores importantes para as técnicas de biologia molecular (Lodish e col, 2004).

Utilizando-se plasmídeos de expressão fusionados a peptídeos, aminoácidos ou pequenas proteínas, como (HA, Hemagglutinin protein), histidinas e glutationa (GST,Glutathione S-Transferase), por exemplo, tem-se maior facilidade para purificação de proteínas através de técnicas cromatográficas. Atualmente, existem vários tipos de plasmídeos disponíveis para transformação de bactérias que sejam competentes para recepção deste material genético, por eletroporação, choque térmico ou quimio-transformação.

A partir da transformação do vetor bacteriano com o plasmídeo onde se encontra o gene de interesse, é preferível que a bactéria produza a proteína em um dado momento de seu crescimento populacional, na fase de crescimento exponencial (log), nesta etapa, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. e a quantidade de produtos finais de metabolismo ainda é pequena, quando a bactéria alcança a fase estacionária, os produtos tóxicos estão

12

tornando-se mais abundantes diminuindo a eficiência da expressão ou produção da própria proteína. Desta forma, é preferível regular a produção da proteína, induzindo as células a expressá-la. Para indução, utiliza-se o composto isopropil β-tiogalactopiranosideo (IPTG), que bloqueia o repressor da RNA polimerase compatível com o promotor do plasmídeo utilizado, permitindo que haja transcrição do gene e sua expressão.

#### 1.8.1. Sistema pET de expressão

O sistema pET de expressão de proteínas heterólogas em E. coli vem sendo amplamente utilizado (Baneyx, 1999). Estes plasmídeos possuem o promotor T7, que é acessado pela T7 RNA polimerase, a qual possui uma alta processividade, possibilitando obter altas concentrações de mRNA do gene que estiver sob seu controle. O produto do gene lac l é um repressor que guando ligado ao operador O impede a expressão da T7 RNA polimerase impossibilitando a transcrição do DNA alvo. Entretanto, na presença de isopropil-β-Dtiogalactopiranosídeo (IPTG), que é utilizado como indutor por ser análogo ao indutor natural, o repressor muda de conformação e se desliga do operador O e permite a expressão da T7 RNA polimerase e então permite a transcrição do DNA alvo. A T7 RNA polimerase passa a ser produzida em quantidade grande e devido a sua maior eficiência, que é cinco vezes maior do que da RNA polimerase da E. *coli*, permite que a expressão do DNA alvo seja realizada em grande quantidade. Também é possível controlar o momento exato em que o DNA alvo será expresso, pois a RNA polimerase da E. coli não o transcreve (Studier, Rosenberg e col., 1990).

O vetor de expressão utilizado foi o pET23a(+) (Novagen), apresenta resistência a ampicilina e é controlado pelo sistema T7 (Studier, Rosenberg *e col.*, 1990). A expressão do DNA alvo (transcrição e tradução) é realizada somente na presença da RNA polimerase do vírus T7. Então foi utilizada a cepa de bactéria *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* (Stratagene), pois esta possui no seu genoma o prófago do bacteriófago T7 e nele a expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do

13

promotor *lacUV5* do *operon lac*, que está reprimido na presença da D-glicose e na ausência do seu indutor natural, lactose.

### 1.9. Análises espectroscópicas e espectrométricas

Existem várias técnicas que permitem a análise espectroscópica de proteínas em solução, sendo que neste trabalho foram utilizadas: Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência de Emissão, Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS). Estas técnicas serão comentadas a seguir.

## 1.9.1. Dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD), conduzida na região do UV (180 a 260 nm), é uma técnica utilizada principalmente em análises de estrutura secundária de proteínas em solução, devido à quiralidade destas moléculas (Kelly e Price, 1997). O sinal de CD representa a absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita após a sua passagem pela amostra sendo, em proteínas, a ligação peptídica [C(O)-NH] responsável por esta diferença na absorção. Os átomos da ligação peptídica podem interagir os de outras ligações peptídicas, originando a estrutura secundária da proteína. Isto permite que a proteína assuma arranjos helicoidais em determinados trechos de sua sequência de aminoácidos (Kelly e Price, 1997; Rodger, 1997). Estas formas regulares dos arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada, resultando na obtenção dos espectros de CD como função da elipticidade (graus) contra o comprimento de onda,  $\lambda$ . (Kelly e Price, 1997; Rodger, 1997), como mostrado na Tabela 1.1. e Figura 1.7.

**Tabela 1.1.:** Absorbâncias de luz circularmente polarizada (CD) características para as estruturas secundárias de proteínas ( $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ )

Transição eletrônica	$\pi \rightarrow \pi^*$	<b>n</b> → π*
α-hélice	191-193/208-210 (nm)	222 (nm)
folha-β	190-200 (nm)	210-225 (nm)

A estrutura secundária de uma proteína pode ser predominantemente  $\alpha$ hélice; predominantemente folha  $\beta$ ;  $\alpha$ + $\beta$  (regiões  $\alpha$  e  $\beta$  separadas);  $\alpha/\beta$  (região  $\alpha$  e  $\beta$  misturadas); randômica (essencialmente desordenada), de modo que cada tipo apresenta um tipo de espectro de CD característico (Levitt e Chothia, 1976; Rodger, 1997). Através desta técnica, pode-se detectar se estão ocorrendo mudanças na conformação da proteína e, em caso positivo, correlacioná-las com as características do meio circundante. Pode-se saber, por exemplo, se mudanças de temperatura, ou de pH, ou a presença de outras moléculas no solvente são capazes de modificar a estrutura da proteína, e se essas modificações estruturais afetam a atividade biológica da macromolécula.



*Figura 1.6.:* Espectros de CD característicos para proteínas com estrutura de  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e randômica (Levitt e Chothia, 1976).

#### 1.9.2. Fluorescência de emissão

A fluorescência é um fenômeno eletrônico que ocorre após absorção de fótons, em que os elétrons da molécula assumem energias correspondentes aos estados quânticos excitados e menos estáveis. A molécula excitada atinge um estado energeticamente mais estável dissipando a energia absorvida por processos de decaimentos radiativos e/ou não-radiativos (Atkins, 2004). Os processos de decaimento não-radiativos envolvem vibrações, rotações e translações da biomolécula ou transferência de energia para as moléculas vizinhas por choques (Atkins, 2004). Os processos radiativos envolvem a emissão de fótons, em que a foto-emissão de estado quântico tripleto para o singleto é chamada de fluorescência, e a que envolve os estados singletos da molécula é chamada de fluorescência (Atkins, 2004). E este processo ocorre com maior probabilidade que a fosforescência.

Tipicamente as moléculas fluorescentes possuem elétrons deslocalizados em ligações duplas conjugadas, *i.e.*, moléculas aromáticas e/ou em moléculas que apresentam conformações mais estáveis do que outras e, aparentemente, são rígidas. Em proteínas, alguns aminoácidos são susceptíveis ao processo de fluorescência: triptofano, tirosina, fenilalanina e cistinas. Porém é possível utilizar sondas fluorescentes ligadas aos determinados aminoácidos, amonoácidos modificados ou compostos que emitem fluorescência quando interagem com a proteína (Lakowicz, 1983). O triptofano é conhecido como resíduo protéico fluorescente e é sensível ao ambiente no qual se encontra, apresentando diferentes características de fluorescência de emissão dependentes do grau de exposição aos meios hidrofílicos e hidrofóbicos. Assim aliado ao seu alto rendimento quântico, quantidade relativamente pequena em proteínas e possibilidade de excitação específica, a técnica de fluorescência de emissão do triptofano se tornou a mais utilizada em biofísica molecular, principalmente em estudos relacionados às mudanças conformacionais de proteínas (Lakowicz, 1983). Quando o resíduo de triptofano se encontra exposto ao solvente, ele gasta uma quantidade maior de energia no estado excitado com a reorganização das

moléculas de água que o envolvem e emite fluorescência em comprimentos de onda menos energéticos, próximos a 355 nm (Lakowicz, 1983). Já quando o resíduo de triptofano se encontra em uma região no interior da proteína, geralmente hidrofóbico e com baixa acessibilidade a água, a emissão de fluorescência ocorrerá em comprimentos de ondas mais energéticos (310 nm a 335 nm) pois não haverá grande perda de energia com a reorganização de moléculas de água (Lakowicz, 1983).

Os principais comprimentos de onda de excitação para o triptofano, tirosina e fenilalanina estão no intervalo entre 260 nm e 295 nm. Porém, é possível separar bem as contribuições nos espectros de emissão entre o triptofano e a tirosina. A contribuição da fenilalanina é muito baixa quando comparada com os do triptofano e a tirosina. Utilizando comprimento de onda ( $\lambda$ ) de excitação próximos a 260 nm é possível excitar principalmente resíduos de tirosina e em 295 nm os resíduos de triptofano serão preferencialmente excitados (Lakowicz, 1983).



*Figura 1.7.:* Diagrama de energia de Jablonski. A absorção de determinada quantidade de energia faz com que um elétron passe do menor estado vibracional do estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado vibracional superior do estado excitado  $S_1$  ou  $S_2$  (setas azuis). Após passar por processos não radiativos (setas pretas), que conduzem o elétron ao menor nível vibracional do primeiro estado excitado, pode ocorrer emissão de fluorescência (seta verde), que é a emissão de um fóton devido ao decaimento do estado  $S_1$  para o estado fundamental  $S_0$ . A relaxação do elétron também pode ocorrer pela emissão de um fóton devido ao decaimento de um estado tripleto ( $T_1$ ) para o estado eletrônico fundamental ( $S_0$ ), processo chamado de fosforescência (seta vermelha).

## 1.9.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os fenômenos físico-químicos desencadeados pelas interacões intermoleculares entre ligantes e receptores macromoleculares são a chave para o entendimento dos processos biológicos. Neste contexto, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tornou-se a priori, uma técnica poderosa no estudo de interações proteína-ligante, sendo capaz de detectar e quantificar as interações com alta sensibilidade, sem o conhecimento prévio da função da proteína (Figueiredo e Marsaioli, 2007). Entretanto, o monitoramento das interações através dos deslocamentos químicos das macromoléculas é difícil de ser analisado sem marcação isotópica. Isso faz com que o estudo das propriedades dos ligantes seja mais apreciado, pois fornece espectros de RMN mais simplificados e resolvidos que os espectros das macromoléculas (Figueiredo e Marsaioli, 2007). Existem muitos métodos espectroscópicos para a observação do epítopo dos ligantes, como métodos baseados na relaxação transversal (72, spin-spin relaxação) e transferência de Efeito Overhauser Nuclear (NOE, "Nuclear Overhauser Effect") (Figueiredo e Marsaioli, 2007, Mayer e Meyer, 2001). Entende-se por epítopo a superfície de contato macromolécula-ligante que pode ser mapeada através dos hidrogênios situados na interface. Os principais experimentos utilizados na obtenção do epítopo do ligante são o STD ("Saturation Transfer Difference"), WaterLOGSY ("Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy") e NOE pumping (Figueiredo e Marsaioli, 2007, Mayer e Meyer, 2001). Já o experimento de DOSY-NOESY ("Diffusion-Ordered" NOE-SpectroscopY) permite a obtenção do epítopo da proteína. Portanto, estas técnicas fornecem informações complementares acerca das interações proteína/ligante.

O NOE é definido como a mudança na área do sinal proveniente de um núcleo causada pela saturação do sinal de um segundo núcleo (Figueiredo e Marsaioli, 2007). Essa alteração resulta da transferência de polarização entre núcleos acoplados dipolarmente via mecanismos de relaxação spin-rede (*T1*).

18
Estes experimentos têm a característica de identificar acoplamentos dipolares que são espectralmente invisíveis nas amostras líquidas, mas fornecem informações relevantes sobre os movimentos moleculares e distâncias intra- e intermoleculares. Já os experimentos de STD consistem na diferença entre dois experimentos, em que no primeiro experimento ("on-resonance"), satura-se o receptor (proteína) via um trem de pulsos seletivos de rádio fregüência (rf). Esses pulsos são aplicados na fregüência de ressonância dos núcleos do receptor e não do ligante (Figueiredo e Marsaioli, 2007). A saturação propaga-se através dos hidrogênios do receptor via rede de interações dipolares intramoleculares entre hidrogênios (H-H); esse processo chamado "difusão de spin" é eficiente devido à grande massa molecular do receptor. A saturação é transferida aos compostos ligados via relaxação cruzada intermolecular para a interface receptor-ligante (Figueiredo e Marsaioli, 2007). As pequenas moléculas dissociam-se do receptor, mas permanecem em um estado "saturado" devido aos seus longos tempos de T1 quando livres. Logo, realiza-se um segundo experimento ("off-resonance") no qual um trem de pulsos de radio fregüências (rf, radio frequences) idêntico ao primeiro é aplicado fora da faixa de ressonância dos núcleos (hidrogênios) dos ligantes e do receptor. A subtração dos experimentos fornece um espectro com os sinais dos ligantes. Nos experimentos "on-resonance" as proteínas são irradiadas em torno de -1,00 ppm, pois normalmente os ligantes não possuem sinais nessa região, enquanto as proteínas sim. Se os ligantes não possuem sinais na região aromática, esta se torna uma região passível de irradiação .Pulsos seletivos são empregados nas irradiações de saturação dos sinais da proteína, pois estes devem ter sua posição de irradiação exatamente selecionada (Figura 1.9). Os experimentos de STD apresentam-se como uma ótima escolha para determinação de epítopos, e das constantes de ligação dos ligantes, informações estas de suma importância no desenvolvimento de novas drogas (Mayer e Meyer, 2001, Figueiredo e col, 2007).



*Figura 1.8.:* Representação esquemática da técnica STD, mostrando um pulso seletivo na proteína, gerando o mapa do epítopo dos ligantes (adaptado do Figueiredo e Marsaioli, 2007).

#### 1.9.4. Espalhamento de Raios – X a Baixo Ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS- "Small Angle X-ray Scattering"; ângulos menores que 3-5°) tem sido muito utilizada nos últimos anos no estudo de proteínas em solução (Svergun, 1996, Svergun e Koch, 2003). SAXS é um processo de espalhamento elástico que ocorre quando feixes de raios-X atravessam a amostra e interagem com os seus elétrons. A radiação reemitida pelos elétrons de cada átomo é espalhada isotropicamente, e estas ondas espalhadas atingem o detector onde são registradas. A partir das curvas de espalhamento obtidas e do tratamento matemático dos dados é, possível obter, com base no formato da curva, parâmetros dimensionais (Svergun e Koch, 2003). Estes, por consequência, permitem a construção de modelos do envelope molecular, em que podem ser obtidas informações sobre as estruturas terciárias e quaternárias da macromolécula, sem detalhes de nível atômico (Glatter e Kratky, 1982; Svergun, 1999, 2007). A técnica de SAXS fornece informações estruturais sobre as inomogeneidades da partícula com dimensões características de dez a algumas centenas de ângstrons (À). As inomogeneidades ou flutuações na densidade eletrônica são assumidas como centros espalhadores, e supondo que os centros espalhadores estão no vácuo, a amplitude do espalhamento é proporcional ao número de mols de elétrons por unidade de volume, ou seja, à densidade eletrônica. Se os centros espalhadores estão imersos em outro meio, como é o caso de partículas em suspensão em um dado solvente, o espalhamento surge do contraste de densidade eletrônica entre a partícula e o solvente (Glatter, 1982). Em proteínas, este contraste pode ser pequeno, resultando em um espalhamento muito fraco. o que exige maior tempo de coleta, ou a utilização de soluções protéicas mais concentradas (o que poderia prejudicar o padrão de espalhamento, uma vez que as proteínas poderiam se agregar) Desta forma, feixes de raios-X produzidos pela radiação síncrotron são empregados, pois o fluxo de fótons do feixe que incide sobre a amostra é muito mais intenso quando comparado aos raios-X obtidos de forma convencional. Isto propicia um melhor padrão de espalhamento em condições experimentais adequadas, tornando possível registrar esses casos de contraste fraco com maior eficiência (Zhang e col., 1994).

Para obtenção de uma curva de SAXS, uma solução de macromoléculas é exposta aos raios-X. A intensidade espalhada I(q) é função da transferência de momento q, obtendo-se a curva  $I(q) \times q$ . Para análise da curva, é conveniente distinguir três regiões de espalhamento. Na região dos ângulos próximos a zero, pode-se determinar o raio de giração Rg, em que Rg é o raio correspondente à distância média quadrática dos elétrons da partícula até seu centro de gravidade, analogamente, o Rg pode ser visto como o raio de inércia da mecânica clássica, na região central; a razão I(0)/Q pode fornecer informação relativa ao volume, e na regiões de mais altos ângulos obtemos a relação superfície/volume da macromolécula (Feigin e Svergun, 1987)

O momento *q* é dado pela equação a seguir, em que  $\theta$  é o ângulo de espalhamento e  $\lambda$  o comprimento de onda do raios-X:

#### $q = 4\pi sen\theta/\lambda$

Uma análise mais completa para determinação da geometria da partícula pode ser feita através do cálculo, a partir dos dados experimentais, da função de distribuição de distância p(r). A p(r) pode ser obtida a partir da transformada

21

inversa da transformada de Fourier de *I* (*q*), a qual possui valor igual a 0 na máxima dimensão da partícula  $D_{máx}$  (Svergun e Koch, 2003). A *p*(*r*) contém a mesma informação da intensidade de espalhamento *I*(*q*), mas a representação da *p*(*r*) no espaço real é mais intuitiva. Além disto, informação sobre a forma da partícula em solução pode ser deduzida visualmente da *p*(*r*). A Figura 1.9. apresenta padrões de espalhamento e *p*(*r*) característicos de objetos geométricos com mesmo valor de  $D_{máx}$ (Svergun e Koch, 2003). Partículas globulares possuem uma *p*(*r*) na forma de uma função gaussiana centro-simétrica com máximo em  $D_{máx}/2$ . Partículas alongadas possuem uma *p*(*r*) com máximo em menores distâncias (linha verde, Figura 1.10). Partículas achatadas mostram um máximo mais alargado, também deslocando o máximo para distâncias menores que  $D_{máx}/2$ . A *p*(*r*) com um máximo deslocado para distâncias maiores que  $D_{máx}/2$  é indicativa de cascas esféricas. Partículas constituídas de subunidades separadas apresentam dois máximos, o primeiro correspondendo às distâncias intrasubunidade e outro a separação entre as subunidades (Svergun e Koch, 2003).



*Figura 1.9.:* Intensidade de espalhamento e função de distribuição de distâncias para diferentes objetos geométricos (Svergun e Koch, 2003).

# 1.9.4.1. Reconstrução ab initio da forma da proteína a partir de dados de SAXS

Um dos objetivos de SAXS aplicado ao estudo de proteínas em solução está em propor um modelo tridimensional a partir de uma curva uni ou bidimensional de espalhamento (Volkova, 2003). No passado, a determinação de objetos espalhadores foi realizada por julgamento de acerto e erro, computando modelos tridimensionais de objetos geométricos como esferas, cilindros, elipses, prismas, etc. e comparando-os com os dados experimentais. O primeiro modelo *ab initio* para determinação de forma foi proposto por Stuhrmann (1970). Neste método, a partícula é representada por uma função de envelope angular, que descreve as partículas em coordenadas esféricas. Contudo, a utilização de função de envelope angular se limita às formas relativamente simples.

Um modelo tridimensional de melhor qualidade, utilizando um modelo de átomo *dummy* (do inglês DAM – *dummy atom model*) pode ser construído *ab initio* utilizando método de Monte Carlo (Hromkovic, 2001). O método foi primeiramente implementado no programa DALAI\_GA (Chacon, 1998, 2000). O volume, por exemplo, de uma esfera de diâmetro igual ao  $D_{máx}$ , que é determinado a partir dos dados experimentais, e é definido e preenchido com empacotamento denso de esferas de raios menores em que as esferas correspondem às densidades eletrônicas intra-partícula. Também, na construção dos modelos *ab initio* são utilizados outros programas computacionais idealizados por Glatter, e o modelo final deve ajustar-se as curvas de espalhamento. Este modelo contém informação sobre as regiões de maior densidade eletrônica na molécula de proteína, sendo possível construir seu envelope molecular. Entre os programas disponíveis, encontra-se o DAMMIN que realiza a modelagem *bead model* (Svergun, 1999).

#### 1.9.5 Espectrometria de Massas (EM)

A espectrometria de massas é aplicada nos estudos das proteínas quanto à determinação de pureza, massa molecular, afinidade em multimerização e a confirmação de sua sequência (Chapman, 2001). A ionização comumente utilizada é a Ionização a Laser assistida por Matriz (MALDI- "Matrix assisted Laser desorpion/ionization") que possibilita a ionização de moléculas biológicas, tais como proteínas e peptídeos (Hoffman e col., 1996), sem fragmentá-las. A ionização das proteínas é acompanhada por um espectrômetro de massas. Por exemplo, uma das montagens experimentais dos equipamentos é MALDI-Tof (Tof-"Time-of-flight"), em que as proteínas ionizadas voam em tempos diferentes em função da diferenças de razão massa/carga (m/z) (Larsen e col., 1996). Durante a ionização assistida pela matriz, a maior parte da energia do laser é absorvida pela matriz utilizada, o que previne a fragmentação e/ou decomposição da amostra. As biomoléculas são então, ionizadas, e assim aceleradas em um campo elétrico dentro de um tubo sob vácuo. Durante o vôo neste tubo, as diferentes moléculas, no caso peptídeos, são separadas de acordo com suas respectivas razões m/z, e assim, atingem o detector em diferentes tempos, fazendo a ferramenta MALDI-Tof muito interessante para os estudos citados (Larsen e col., 1996). As amostras podem ser preparadas de várias maneiras, sendo mais utilizado o método de evaporação de solvente e tendo como a matriz um composto orgânico facilmente ionizável que permite a ionização suave do material biológico. Em espectros de massas de proteínas são observados íons [M+H]<sup>+</sup>, [M+2H]<sup>+</sup> e [2M+H]<sup>+</sup>, com predominância do íon molecular [M+H]<sup>+</sup>, o que permite a obtenção da massa molecular da proteína analisada (Larsen e col., 1996).

A oligomrização das proteínas pode ser estuda também utilizando o método de espectrometria de massas. Para determinar o estado oligomérico da proteína de interesse utiliza a mesma metodologia já descrita acima, porém na preparação das amostras é adicionado um agente redutor capaz de quebrar as ligações de dissulfeto formada pelas cisteínas presente na estrutura da proteína. Os agentes

24

redutores mais utilizados para realizar estes experimentos são 2-mercaptoetanol e DTT(Ditiotretiol).

A reação abaixo representa como o reagente 2-mercaptoetanol quebra as ligações de dissulfeto de uma moléluca de proteína genérica:

 $\mathsf{R_1-CH_2-S-S-CH_2-R_2} \xrightarrow{\mathsf{HS-CH_2-CH_2-OH}} \mathsf{R_1-CH_2-SH} + \mathsf{HS-CH_2-R_2}$ 

# 2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram clonar, expressar, purificar e executar as análises espectroscópicas e espectrométricas que possibilitarão a caracterização estrutural da proteína XACb0033, uma proteína hipotética e proveniente da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

# 3. Materiais e Métodos

A parte experimental consistiu de duas etapas, a primeira etapa foi realizada durante a iniciação científica executada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron sob orientação do Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos e a supervisão da Dra. Ljubica Tasic. O gene da proteína alvo (em estudo) foi clonado no vetor de expressão pET23a(+), a proteína foi expressa na bactéria *Escherichia coli* e o método para purificação da XACb0033 foi padronizado. Posteriormente estão apresentados os dados obtidos durante o período do mestrado. A purificação que havia sido padronizada durante o período de iniciação científica foi modificada, e os dados espectroscópicos e de espectrometria de massas foram obtidos com objetivo em caracterizar estruturalmente a proteína XACb0033.

#### 3.1. Clonagem

Com o objetivo de clonar o gene correspondente a *xacb0033* em pET23a(+) os seguintes passos foram realizados.

#### 3.1.1. Seleção das enzimas de restrição

Os sítios de restrição inseridos nas sequências de iniciadores (*primers*) foram *Nde* I e *Sal* I, como mostrado na seção 3.1.2., pois são sequências

presentes do sítio de multiclonagem do pET23a(+), porém não existem na sequência de DNA do gene a ser clonado. Estas enzimas geram extremidades coesivas como ilustrado na Figura 3.1, sendo que a enzima *Nde* I foi isolada da bactéria *Neisseria denitrificans* e a enzima *Sal* I de *Streptomyces albus* G

5′ C A <sup>v</sup> T A T G 3′	5′ G <sup>•</sup> T C G A C 3′
3′ G T A T_A C 5′	3′ C A G C T_G 5′

*Figura 3.1.:* Clivagem do DNA pelas enzimas de restrição: à esquerda enzima *Nde* I e a direita *Sal* I

# 3.1.2 Amplificação do DNA

Primeiramente através da reação em cadeia da polimerase (PCR), fez-se a amplificação do gene *xacb0033* utilizando DNA da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e óligos de DNA específicos para este gene (iniciadores F "forward" e R "reverse"), conforme apresentado a seguir:

Iniciador Direto 5' GAA TTC CAT ATG GCA CAC GTC AAT TCA CGA G 3' *Nde* I <u>START CODON</u>

# Iniciador Reverso 5' GTC GAC TCA TTC CGT CCA GCC ATC CAT G 3' Sa/I STOP CODON

*Figura 3.2.:* Sequência dos iniciadores utilizados na clonagem da XACb0033 com indicações de sítios de clivagens pelas enzimas de restrição escolhidas (*Nde* I em vermelho e *Sal* I em azul) e indicação de códon de iniciação (Start) e de terminação (Stop).

A reação de PCR e as condições dos ciclos de amplificação estão descritos a seguir:

Reação	Ciclos de amplificações
45μL de PCR super Mix	-
0,5µL de DNA de Xac	1) 95°C – 5 min
2,0µL de MgCl₂ 50mM	2) 95°C – 1min
0,5μL de Taq DNA polimerase 5U/μL	3) 60°C – 1 min 30 seg
2,75µL de DMSO 5%	4) 72°C – 3 min
1,0μL de Primer foward 25pmol/μL	5) 72°C – 10min
1,0μL de Primer reverse 25pmol/μL	<i>6)</i> 4°C - ∞

O produto da PCR foi separado e purificado conforme descrito nas seções 3.1.3 e 3.1.4

#### 3.1.3 Eletroforese de DNA

Os produtos das reações de PCR, as mini-preparações de DNA plasmidial bem como as digestões com enzimas de restrição, foram eletroforeticamente separados em gel de agarose 1% (m/v) preparado em tampão TAE (Tris base 2M, ácido acético glacial 57,1mL/L tampão, EDTA 0,5 M), contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg/mL. À amostra foi adicionado tampão de carregamento (Glicerol 50% (p/v), 10mM EDTA e 0,25% azul de bromofenol (p/v)) utilizou-se cuba horizontal 60V. Após a corrida, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta (Sambrook e col., 1989).

### 3.1.4 Purificação de DNA em bandas de gel de agarose

As purificações dos produtos de PCR e de digestões dos plasmídeos foram feitas utilizando-se o kit GFX (Amersham Biosciences/GE Healthcare) através do seguinte protocolo: as bandas de DNA foram retiradas do gel utilizando-se um bisturi estéril, as fatias foram pesadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Os 10 µL do tampão indicado (*Capture Buffer*) foram adicionados para cada 10 mg das fatias, misturou-se vigorosamente e incubou-se a 60°C até que a agarose estivesse totalmente solubilizada. Depois da solubilização, a mistura foi aplicada em uma pequena coluna (GFX column) por aproximadamente 1 min, ao término do qual a coluna foi centrifugada por 30 s a 10000 g, e a solução que percolou pela coluna foi descartada. A coluna foi então lavada com 500 µL de tampão correspondente (Wash Buffer), centrifugada novamente por 30 s a 10000g e. novamente, a solução que passou através da coluna foi descartada. Posteriormente, 30 µL de água ultrapura, autoclavada e previamente aguecida foram aplicados à coluna para eluição do DNA. Deixou-se aproximadamente 1 min em repouso à temperatura ambiente e centrifugou-se por 1 min a 10000g, recuperando-se o DNA purificado na solução aguosa.

### 3.1.5 Suclonagem em pUC18

A subclonagem em pUC18 foi executada apenas com objetivo de facilitar a clonagem no pET23a(+). O vetor pUC18 é linear e suas extremidades 5' possuem timidinas, as quais viabilizam a ligação de produtos de PCR diretamente, pois a enzima *Taq* polimerase acrescenta uma adenina na extremidade 3' dos produtos de PCR, que pareiam com as timidinas do vetor, possibilitando a ligação. Além disso, este vetor, traz o gene *lac* Z da  $\beta$ -galactosidase, possibilitando a identificação das colônias que apresentam o plasmídeo recombinante de interesse, pois, quando o produto do PCR é ligado ao vetor, o gene da  $\beta$ -galactosidase fica interrompido e a enzima, por isso, fica inativa, gerando colônias brancas. Do contrário, o gene fica contínuo e a enzima funcional, de forma que,

quando expressa, catalisa a reação de hidrólise do X-Gal (5-bromo-4-cloro-3indoil-β-D-galactosídeo), um análogo cromogênico da lactose, formando colônias azuis. Para tal, primeiramente foi feita a reação de Bluting/kinase do produto de PCR e em seguida ligação em pUC18

Reação:	Reação:
10µL do produto de PCR	10μL de produto de PCR após B/K
4,0μL do tampão Bluting/Kinase 5Χ	2,0μL de pUC18 já digerido com Smal/CIP
0,2μL da enzima Klenow 5U/μL	2,0μL de tampão 10X
0,5 $\mu$ L da enzima T4 Kinase 10U/ $\mu$ L	1,0μL de T4 DNA ligase 1U/μL
Água Milli-Q qsp 20μL	Água Milli-Q qsp 20μL
Incubação a 37°C por 30 min	Incubação por 16h a 16°C
Inativação a 75°C por 15min	

Após a ligação, 1  $\mu$ L deste meio reacional foi utilizado para transformar por eletroporação células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Seção 3.2.5). A confirmação do sucesso da clonagem foi avaliada pela reação de digestão do pUC18-XACb0033 e para os clones que liberaram do inserto no tamanho esperado (219 pb) através da reação de digestão (Seção 3.1.6.1.) foi executado o sequênciamento de DNA (vetor + inserto) (Seção 3.1.7). O clone que não apresentou as mutações foi utilizado para clonagem no vetor pET23a(+).

# 3.1.6. Clonagem em pET23a(+)

O gene da XACb0033 digerido do pUC18 foi clonado no vetor de expressão pET23a(+) previamente preparado por digestão em que as mesmas enzimas de restrição foram utilizadas (*Nde* I *e Sal* I).

# 3.1.6.1. Digestão do pUC18-10073 com Nde I e Sal I (preparação do inserto)

O DNA do produto da ligação pUC18-XACb0033 foi digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Sal* I conforme descrito a seguir:

Reação:	
10μL de DNA pUC18-10073	
2,0μL de tampão Sal I 10X	
2,0μL de BSA 10X	
2,0μL de Sal I 1U/μL	
1,0μL de Nde I 1U/μL de 30 em 30 min	
Incubação: 37°C por 2 horas	

O produto da digestão foi separado e purificado conforme descrito nas Seções 3.1.3 e 3.1.4.

# 3.1.6.2. Digestão do pET23a-Mb com Nde I e Sal I (preparação do vetor)

O vetor utilizado para clonagem continha no seu sítio de multiclonagem o gene da proteína Mioglobina (Mb) que foi removido com as enzimas *Nde* I e *Sal* I, possibilitando inserção do gene de interesse.

Reação:	
10μL de DNA pET23a(+)-Mb	
2,0μL de tampão Sal I 10X	
2,0µL de BSA 10X	
2,0μL de Sal I 1U/μL	
1,0µL de Nde I 1U/µL de 30 em 30 min	
Incubação: 37°C por 2 horas	

O produto da digestão foi separado e purificado conforme descrito nas seções 3.1.3 e 3.1.4.

# 3.1.6.3. Ligação do gene da XACb0033 em pET23a(+)

A ligação do vetor pET23a(+) com o gene da proteína de interesse XACb0033 foi feito utilizando condições de reação da ligação conforme descrito a seguir:

Reação:	
4,0μL de DNA 10073 digerido com Nde I e Sal I I	
2,0µL de pET23a(+) já digerido com Nde I e Sal I	
4,0μL de tampão ligase 1U/μL	
Água Milli-Q qsp 20μL	
Incubação: 16 horas a 16°C	

Produto da ligação obtido (1  $\mu$ L) foi utilizado em transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por eletroporação (Seção 3.2.5). O DNA de algumas colônias da transformação, escolhida aleatoriamente, foi utilizado para confirmação do recebimento do inserto, este foi digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Sal* I, conforme reação descrito a seguir.

Reação:	
10μL de DNA pET23a(+)-10073	
2,0µL de tampão Sal I 10X	
2,0μL de BSA 10X	
2,0μL de Sal I 1U/μL	
1,0 $\mu$ L de Nde I 1U/ $\mu$ L de 30 em 30 min	
Incubação: 37°C por 2 horas	

O produto da digestão foi separado e purificado conforme descrito nas Seções 3.1.2 e 3.1.3. e sucesso da clonagem foi confirmado por sequênciamento de DNA do inserto recebido pelo vetor (Seção 3.1.7.)

#### 3.1.7. Sequênciamento de DNA

Para a determinação da sequência correta de nucleotídeos do gene que codifica da proteína alvo do estudo, XACb0033, foi utilizado sequênciamento de DNA pelo método de Sanger (Sanger, 1977). O DNA utilizado para a análise foi um clone positivo para reação de digestão com as enzimas *Nde* I e *Sal* I e este foi extraído conforme seção 3.1.8. Os óligos utilizados na reação de amplificação das cadeias truncadas foram os mesmos utilizados para a PCR conforme ilustrados na Figura 3.2. Foi utilizado seqüenciador de DNA Applied Biosystems.

#### 3.1.8. Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi executada por lise alcalina das células da bactéria, de modo que, no dia anterior à extração, incubou-se uma colônia num tubo contendo 1,5 mL de meio LB e 50  $\mu$ g/mL de ampicilina e 50 $\mu$ g/mL de cloranfenicol a 37°C durante 16 h com a agitação constante de 200 rpm. A suspensão foi transferida para um microtubo, centrifugada a 13200*g* por 5 minutos e descartado o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet bacteriano em 100 $\mu$ L de Solução I (10mM Tris, 1mM EDTA) gelada, utilizando vortex, até o mesmo fosse completamente dissolvido. Adicionou-se 200 $\mu$ L de Solução II (0,2M NaOH, 1% SDS) recentemente preparada e misturaram-se os componentes rapidamente por inversão de cinco vezes. O tubo foi mantido em banho de gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150 $\mu$ L de Solução III (Acetato de sódio 3M, pH 4,9) gelada e homogeneizou-se gentilmente utilizando o vortex, com o tubo na posição invertida, por 10 segundos para dispersar a Solução III através do lisado bacteriano e incubou-se em banho de gelo durante 5 minutos. Centrifugou-se a 13200*g* por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo.

Em seguida, foi adicionado 200  $\mu$ L de fenol e 200  $\mu$ L de clorofórmio e a solução foi homogeneizada usando o vortex, centrifugou-se a 13200*g* por 5 minutos e transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo, sem pipetar o fenol:clorofórmio (fase rosada). O DNA foi precipitado com 800 $\mu$ L de etanol absoluto gelado, centrifugou-se a 13200*g* por 5 minutos e o sobrenadante foi removido por aspiração (bomba de água). Lavou-se o pellet de DNA com 200 $\mu$ L de etanol 70% gelado, removeu-se o sobrenadante e o pellet foi seco ao ar por 10 minutos. Finalizando ressuspendeu-se o DNA em 50 $\mu$ L de TE (Tris 10mM e EDTA 1mM)/RNAse (20 $\mu$ g/mL) e este foi armazenado em geladeira.

#### 3.2. Expressão de proteínas

#### 3.2.1. Metodologia

A expressão da proteína XACb0033 foi feita em sistema pET23a(+) (Novagen) e com transformação de DNA em cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*, conforme descrito em Tasic e col, 2006 e 2004.

#### 3.2.2 Meio de cultura Luria Broth (LB)

O meio de cultura LB foi utilizado no crescimento bacteriano, o meio líquido na expressão protéica e o meio sólido para a manutenção das colônias bacterianas. Ele é composto por triptona 10 g/L, cloreto de sódio (NaCl) 10 g/L e extrato de levedura 5 g/L e a ele foram adicionados os antibióticos, ampicilina e cloranfenicol em concentrações de 50  $\mu$ g/mL, de modo a selecionar as colônias que continham o DNA alvo.

#### 3.2.3. Cepas bacterianas utilizadas

Dentre os vários sistemas de expressão disponíveis para produção de proteínas heterólogas, a bactéria Gram-negativa *E. coli* é um dos mais utilizados e atrativos. Este fato se deve à sua capacidade de crescer rapidamente, com altas concentrações celulares e em substratos baratos, além de sua genética ser bem conhecida e haver disponibilidade de muitos vetores de clonagem e cepas mutantes (Baneyx, 1999).

A linhagem de *E. coli* utilizada para manutenção e multiplicação de vetores plasmidiais foi a DH5 $\alpha$ . Já para a expressão da proteína foi utilizada a cepa de *E.coli* BL21(DE3)*pLysS*, esta cepa apresenta resistência a cloranfenicol e é um plasmídeo que codifica a T7 lisozima. A vantagem de se utilizar esta cepa é que

grande quantidade de mRNA produzido pela T7 RNA polimerase, pode gerar alguns problemas, como a destruição de ribossomos e a morte celular, além disso, a expressão basal da T7 RNA polimerase pode levar à instabilidade da expressão e do plasmídeo. A T7 lisozima, co-expressa na cepa BL21(DE3)*pLysS*, é uma enzima que degrada a T7 RNA polimerase, contornando os problemas citados acima (Baneyx, 1999).

#### 3.2.4. Células competentes

Uma colônia isolada da bactéria *E. coli* da cepa desejada (DH5 $\alpha$  ou BL21(DE3)*pLysS*), foi inoculada em 5 mL de meio líquido LB. Este pré-inóculo foi incubado a 37°C, sob agitação moderada por aproximadamente 16 h. Após este tempo, foram inoculados 5 mL da cultura em 500 mL do meio LB, incubando-se a 37 °C sob agitação até atingir uma absorbância a 600 nm (A<sub>600nm</sub>) de aproximadamente 0,5 ~ 0,6. As células foram colocadas em banho de gelo por 10 a 15 min, transferidas para dois tubos resfriados e centrifugadas por 20 min a 5000*g* a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspendido em 500 mL de água estéril mantida em banho de gelo, e centrifugado novamente. Este procedimento foi repetido 3 vezes, sendo finalmente o sedimento suspendido em 10 mL de uma solução de glicerol 10% (v/v), mantida em banho de gelo, transferido para um tubo menor e centrifugado a 10000*g* por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a scélulas foram, mais uma vez, suspendidas em 1 mL de glicerol 10%, também mantido em banho de gelo, separadas em alíquotas de 500 µL e armazenadas a –80 °C (Dower, 1988).

#### 3.2.5. Eletroporação

Utilizou-se no procedimento de transformação por eletroporação aplicando as instruções do fabricante, eletroporador *MicroPulser TM Eletroporation Apparatus* (Bio-Rad) e células competentes. Para cada 500 µL de células competentes foi adicionado 1  $\mu$ L de DNA referente à proteína. Incubou-se a mistura por 1 minuto em banho de gelo e após transferiu-se para a cubeta de eletroporação previamente resfriada. No eletroporador selecionou-se o programa EC2 e foi dado o pulso. Transferiu-se para um tubo de 1,5 mL contendo 1,0 mL de meio SOC (10mL meio SOB + MgCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ L 2M+ glicose 200 $\mu$ L 1M) e incubou-se a 37° C a 200 rpm por 1 hora. Após este período, a mistura foi plaqueada em meio LB contendo os antibióticos ampicilina (50 mg/mL) e cloranfenicol (50 mg/mL).

#### 3.2.6. Expressão e preparação dos extratos proteícos

Para expressão da proteína heteróloga XACb0033 o clone pET23a-XACb0033 foi inserido em bactéria (*E. coli* cepa BL21(DE3)*pLysS*) pelo método de eletroporação (Seção 3.2.5). A bactéria transformada foi crescida em meio de cultura líquido Luria Broth (LB) contendo ampicilina 50µg/mL e cloranfenicol 50µg/mL, com agitação de 200 rpm e temperatura de 37°C, até que a absorção do meio medida em 600 nm (A<sub>600</sub>) chegasse entre 0,6 a 0,8, em seguida foi adicionado ao meio isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosideo (IPTG) para uma concentração final de 1 mM. Após a adição do IPTG as bactérias foram incubadas nas mesmas condições por mais 16 horas. Em seguida o meio contendo a cultura de bactérias foi centrifugado 5000*g* a 4°C e o pellet foi congelado a -80°C.

#### 3.2.7. Lise bacteriana

O *pellet* de bactéria foi descongelado e suspendido em tampão de lise (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, e EDTA 1 mM, pH 8,0) 10 mL/L de indução, foi adicionado 15µL de DNase 1U/µL, 15µL de PMSF 100 mM,  $30\mu$ L de RNase/Tris-EDTA e 50mg de MgCl<sub>2</sub> e a mistura foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

As células foram lisadas por sonicação no sonicador Sonifier 450 (Branson) até que a solução perdesse sua viscosidade. Em seguida as células foram

centrifugadas a 2000*g* por 30min. A expressão de proteínas foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) (Secção 3.2.10).

#### 3.2.8. Desenovelamento da proteína XACb0033 com uréia

Foi verificado que após a lise bacteriana do pellet (corpo de inclusão) a fração monomérica da proteína XACb0033 encontra-se insolúvel, para solubilização da proteína XACb0033 do corpo de inclusão, o precipitado da lise foi suspendido em 2mL de tampão fosfato 100mM (pH=8,0). Solução de uréia (10 M) foi adicionada lentamente para uma concentração final de 8 M. A solução foi mantida em agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Logo foi diluída duas vezes e dialisada conta 4 L de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH=8,0, contendo NaCl em concentração de 100 mM e EDTA em1 mM) durante 16 horas a 4°C. Em seguida a solução protéica foi retirada da diálise e centrifugada a 18000*g* por 30 min a 4°C (Ribeiro, Regis e col., 2003). O lisado total, precipitado e o sobrenadante da diálise foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) (Seção 3.2.10)

#### 3.2.9. Purificação da proteína de interesse (XACb0033)

O sobrenadante da diálise foi utilizado para obter a proteína XACb0033 pura. O volume do sobrenadante foi reduzido quatro vezes utilizando-se filtro Millipore, com poro de 5000 Da. O método utilizado foi o de exclusão molecular, a coluna utilizada foi a *Superdex* 70 10/30 de 24 mL. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de sódio (100 mM, pH=8,0) e cloreto de sódio (NaCl, 100 mM) com fluxo de 2 mL/min. Utilizou-se o equipamento de cromatografia líquida de performance rápida (FPLC) da Äkta (GE) e todo o processo foi monitorado observando-se a absorbância em 280 nm e a condutância.

Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) (Seção 3.2.10).

#### 3.2.10. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE, 15 %)

Os géis de SDS-PAGE foram aplicados em diversas etapas deste trabalho para acompanhamento tanto da expressão, quanto de duas fases de purificação. O gel de resolução (10 mL) foi composto por 5,0 mL de solução de acrilamida e bis-acrilamida (30 %); 2,5 mL de tampão de gel (1,5 M tris-HCl, pH = 8,8); 2,3 mL de água (Milli-Q); e 100  $\mu$ L de solução de SDS (10%). Os catalisadores da polimerização foram o perssulfato de amônio (100  $\mu$ L, 10 %, APS) e o *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamino (4  $\mu$ L, TEMED). O gel de empacotamento (3 mL) foi composto por 2,1 mL de água (Milli-Q); 0,50 mL da solução de acrilamida e bis-acrilamida (30 %); 0,38 mL de tampão de gel (1,5 M tris-HCl, pH = 6,8); 30  $\mu$ L de SDS (10 %); 30  $\mu$ L de APS (10 %) e 3  $\mu$ L de TEMED.

A composição do tampão de amostra para eletroforese foi de tris-HCI (50 mM, pH 6,8); ditiotretiol (DTT) 100 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%.

O procedimento de eletroforese foi conduzido com a utilização do aparato *Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad)* nas seguintes condições: no gel de empacotamento foi aplicada a voltagem de 80 V por aproximadamente 15 minutos e no gel de resolução uma voltagem de 200 V por aproximadamente 40 minutos. No caso do acompanhamento da expressão, foram aplicados 3,0 µL de amostra e para verificar a eficiência cromatográfica, foram aplicados 7,5 µL de amostra. O gel de SDS foi corado durante 30 minutos com a solução etanol/ácido acético/água (5/1/15, v/v/v) e 0,25 % de *Coomassie Brilliant Blue R* (Bio-Rad) a 50°C e descorado em ácido acético/etanol/água (3/2/3, v/v/v) durante 40 minutos à temperatura ambiente.

#### 3.3. Diálises

Para realizar os experimentos de caracterização estrutural da proteína XACb0033 diferentes soluções tampões foram utilizadas

- Tampão Tris-HCl 5 mM e pH8,0;
- Tampão Fosfato de sódio 20mM e pH8,0; e
- Água Ultra pura (Milli-Q).

Para que fosse trocado o tampão da proteína de acordo com o interesse no experimento, utilizou-se diálise em membrana com poro de 5000 Da contra o tampão a ser utilizado. A diálise foi realizada utilizando 4 litros do tampão de interesse, sob agitação a 4°C.

#### 3.4. Espectrometria de massas

Para as análises de espectrometria de massas, foi utilizada uma solução em água ultra pura (Milli-Q) da proteína com concentração de 0,01 mg/mL e uma solução de concentração 10 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi cinâmico em água:acetonitrila:ácido trifluoracético (1:1:0,1; v/v/v) que foi utilizada como solução matriz. A solução da proteína foi misturada à matriz na proporção de 1:1 v/v (1,5 µL de cada), e em seguida foi aplicada na placa de análise, aguardou-se até que todo o solvente fosse seco (Tasic e col., 2007; Tiroli e col, 2005).

Para os experimentos com  $\beta$ -mercaptoetanol foi incubada 1 $\mu$ M da solução de proteína em água ultra pura com 4  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol por duas horas a temperatura ambiente. Esta mistura foi utilizada como amostra misturando-se à matriz na proporção de 1:1 v/v (1,5  $\mu$ L de cada), a matriz utilizada foi 10 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi cinâmico em água:acetonitrila:ácido trifluoracético (1:1:0,1; v/v/v). E em seguida foi aplicada na placa de análise, aguardou-se até que todo o solvente fosse evaparado.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (LNLS), com um espectrômetro de massas Maldi Q-Tof Premier marca Micromass/ Waters

#### 3.5. Determinação da concentração da proteína XACb0033

A concentração da proteína XACb0033 foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A curva analítica foi feita utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão nas concentrações entre 1,5 e 7,5  $\mu$ g/mL. Adicionou-se 800  $\mu$ L do reagente de Bradford (100mg de Comassie brilliant blue G-250, 50mL de etanol 95% (v/v), 100mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85% (v/v) em 1L de água), e completou-se o volume para o total de 900  $\mu$ L utilizando NaCl (1molxL<sup>-1</sup>).

Após a reação (5 min), a absorbância a 595 nm foi determinada em duplicata. As amostras da XACb0033 pura foram submetidas ao mesmo procedimento, e dependendo do caso, diluídas para que fosse possível a interpolação dos dados na curva analítica.

#### 3.6. Dicroísmo Circular (CD)

Para análise da estrutura secundária da proteína hipotética XACb0033 foi utilizado o dicroísmo circular. As medidas de CD foram feitas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), utilizando um espectropolarimetro Jasco J-810, equipado com controle de temperatura tipo Peltier. Os espectros foram medidos utilizando cubetas de caminho de 10 mm. A amostra da proteína teve sua concentração determinada anteriormente (Seção 3.5). Para obtenção dos espectros de CD foi utilizada proteína de C = 4  $\mu$ M em tampão fosfato (20 mM, pH=8,0) a 20°C. As medidas foram feitas com velocidade de 20 nm/min de 200 a 260nm. Em ensaios de estudos de estabilidade térmica da XACb0033, foram utilizadas três amostras em mesmas condições de aquisição, em 20°C como já explicado, agora sob regime de aquecimento de 1°C/min de 20-65°C e de esfriamento com -1°C/min de 65°C até 20°C no intervalo de  $\lambda$  de 200-260 nm.

Os programas utilizados para registro e o tratamento dos dados foram Spectra manager<sup>®</sup> (JASCO) e Origin<sup>®</sup> versão 6.0 (Microcal). O tampão utilizado como branco foi o tampão fosfato de sódio (20 mM, pH=8,0). Os valores obtidos na leitura em mgraus ( $\theta$ ) foram convertidos para elipticidade molar ([ $\theta$ ]<sub>mrw</sub>) de acordo com a equação: [ $\theta$ ]<sub>mrw</sub> = ( $\theta * MM/(c * L * n)$  sendo,  $\theta$  - elipticidade (mgraus), MM - massa molecular da proteína (g/mol), c - concentração da proteína (mg/ml), L - comprimento do caminho óptico (cm), e n - número de resíduos de aminoácidos da proteína (Adler e col., 1973).

O cálculo da porcentagem de  $\alpha$ -hélice foi feito segundo a equação descrita por Chen e colaboradores (1974) e também pelos programas CDNN (1999) e DICROPROT (Deléage e col., 1993).

# 3.7. Fluorescência de emissão estática e determinação de tempo de vida

As medidas foram feitas no LNLS, fluorímetro utilizado nos experimentos foi o Aminco Bowman<sup>®</sup> Series 2 (Slam-Aminco). Os espectros de fluorescência de emissão foram obtidos a temperatura ambiente aplicando  $\lambda$ =295 nm na excitação da amostra, fendas de excitação e emissão de 8 mm, e aquisição de espectros de emissão em intervalo de 300 a 400 nm. Utilizou-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm e a concentração da proteína foi 4 µM (tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH=8,0).

As medidas do tempo de vida de fluorescência foram executadas no intervalo de 4-200 MHz utilizando-se um fluorímetro de modulação de fase com correlação cruzada e multi-frequência (ISS K2). A excitação foi feita a 295 nm. A emissão foi observada usando-se um filtro óptico de 310 nm (Edmund Industrial Optics). Para registro dos dados foi utilizado o programa de ISS K2. Utilizou se Ficol 400 como padrão com o tempo de vida de 0 ns.

#### 3.8. Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e de STD foram realizados no IQ-UNICAMP, em um espectrômetro INOVA-500 (Varian, 500 MHz) equipado com a sonda de ressonância tripla e detecção inversa de 5 mm em 25°C. Para adquirir e processar os dados de RMN foi utilizado Software padrão da Varian. Em ensaios de STD, a irradiação da proteína em deslocamentos guímicos de 0.15: 0.19 e 0.59 ppm foi aplicada em experimentos separados e como controle a irradiação em 30 ppm, onde nenhum sinal de proteína estava presente. Os espectros foram referenciados utilizando o sinal residual da água (HDO) em 4,7 ppm. As amostras foram preparadas em 600 µL de D<sub>2</sub>O (99,9%, Sigma Aldrich) contendo 10 mM de tampão fosfato de sódio de pH=8.0 (não corrigido para D<sub>2</sub>O). A concentração final da proteína na amostra foi de 10 µM e os ligantes ATP e ADP (ambos de procedência da Sigma Aldrich) foram adicionados em excesso de 100 vezes (1 mM) em duas amostras de proteína independentes. A supressão de água foi realizada utilizado seguência WATERGATE. Como controle positivo nos experimentos de STD utilizou-se a proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsc70, heat shock cognate) e a sua interação com ATP preparada em condições idênticas a indicadas.

#### 3.9. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As experiências foram realizadas no dia 18 de janeiro de 2007 na linha SAXS2 do LNLS, utilizando comprimento de onda do feixe de  $\lambda = 1,488$  Å e a distância amostra-detector de 1101 mm (D). Foram analisadas quatro amostras da proteína XACb0033 em duas concentrações (0,64 e 0,958 mg/mL) e em dois tampões: Tris-HCl (10 mM, pH=8,0) e em fosfato de sódio (20 mM, pH=8,0). Para todas as amostras foram adquiridas 4-8 medidas de SAXS (frames) de 5 min e 10 min cada. Como padrão utilizou-se a lisozima (Sigma-Aldrich, 14,3 kDa) em

concentração de 1 mg/mL e em tampões correspondentes as duas amostras descritas.

# 4. Resultados e Discussões

# 4.1. Clonagem da ORF 10073.2 (gene que codifica XACb0033)

# 4.1.1. Subclonagem em pUC18

A partir do DNA genômico da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi amplificado o gene da ORF anotada como XACb0033 e uma banda de 219 pb foi obtida, conforme esperado pelo banco de dados do genoma da *Xac* (Figura 4.1).



*Figura 4.1.:* Eletroforeograma de análise da amplificação do fragmento de DNA ("Open *Reading Frame*" - ORF) correspondente a proteína hipotética XACb0033 de 8,42 kDa. A esquerda padrão de peso molecular (100 kpb) e circulado em vermelho banda em 219 kpb correspondente ao tamanho esperado da ORF.

Os passos seguintes foram a subclonagem em pUC18, para tal foi utilizado kit Sure Clone (Amershan – GE Life Science) com vetor preparado e a preparação do inserto está descrito na Seção 3.1.5.

A subclonagem foi feita com sucesso, para confirmação do recebimento do inserto de DNA, primeiramente fez-se reações de digestão com as enzimas *Nde* I

e *Sal* I (Seção 3.1.6), escolheu-se um clone positivo, ou seja, que apresentou banda correspondente ao tamanho esperado de 219 pb da XACb0033 do gel de agarose 1% da digestão (Figura 4.2) e este foi levado para sequênciamento dos nucleotídeos (Seção 3.1.7.) no sequênciador de DNA.



*Figura 4.2:* Identificação dos clones positivos. Eletroforeograma dos DNAs de pUC18-XACb0033 digeridos com *Nde* I e *Sal* I. A direita padrão de peso molecular 1 kb plus , e banda circulada em vermelho referente a ORF com 219 kpb.

O resultado obtido foi um clone sem nenhuma mutação em qualquer nucleotídeo e este foi encaminhado para a continuação no processo de clonagem.

### 4.1.2. Clonagem em pET23a (+)

O vetor escolhido e utilizado para clonagem da proteína hipotética da *Xac* XACb0033 foi o pET23a(+), pois possui o promotor T7, que é acessado pela T7 RNA polimerase, gerando altas concentrações de mRNA do gene que estiver sob seu controle e também o operador *lac*. Alguns vetores pET codificam uma cauda de seis histidinas (tag de histidina) fusionada na porção N-terminal da proteína heteróloga que está sendo expressa, a fim de facilitar o processo de purificação

desta proteína, é o caso do pET28a, pET32a, entre outros. O pET23a (+) não apresenta este tag de histidina, o que é interessante para o estudo em questão, pois como o objetivo deste trabalho foi a caracterização estrutural com intenções em estudar e estrutura tridimensional a nível atômico, esta cauda de poli-His poderia nos fornecer uma estrutura com uma conformação forçada.

#### 4.1.2.1 Preparando o vetor

Foi utilizado vetor pET23a ligado ao gene que codifica a proteína mioglobina (pET23a-Mb). O pET23a-Mb foi digerido utilizando as enzimas de restrição que já haviam sido determinadas, *Nde* I e *Sal* I (Seção 3.1.6.2). A reação de digestão foi separada em gel de agarose 1%, (Figura 4.3.). A banda circulada em vermelho é correspondente ao vetor pET23a(+) sem o gene da mioglobina, em 3666 pb, já digerido, pronto para receber novo inserto de DNA.



*Figura 4.3.:* Preparação do plasmídeo pET23a(+). Gel agarose 1%. pET23a(+)-Mioglobina digerido com *Nde* I e *Sal* I, banda em 3666 kpb correspondente ao plasmídeo digerido.

#### 4.1.2.2. Preparando o inserto (ORF XACb0033)

Como descrito na Seção 4.1.1 a suclonagem em pUC18 foi feita com sucesso. O clone que foi sequênciado e confirmado, foi inoculado em meio LB, foi e o DNA plasmidial isolado (Seção 3.1.8.). A partir deste DNA executou-se a reação de digestão com as enzimas *Nde* I e *Sal* I (Seção 3.1.6.2.), obtendo a banda em gel de agarose 1% em 219 pb correspondente ao tamanho do DNA alvo. Em seguida,ligou-se o vetor pET23a(+) e DNA que codifica a proteína do estudo conforme descrito na seção 3.1.6.3.O produto da ligação foi transformado na bactéria *E. coli* por meio de eletroporação (Seção 3.1.5), e esta foi crescida em meio LB por 16 hs a 37°C. Extraiu-se o DNA plasmidial (Seção 3.1.8.) e a fim de confirmar a integração do inserto no plasmídeo alvo, este foi submetido a reação de digestão com as enzimas *Nde* I e *Sal* I. A reação de digestão foi separada em gel de agarose 1%. .Os clones positivos foram sequênciados (Seção 3.1.7) no sequenciador de DNA. Obtivemos um clone sem nenhuma mutação em qualquer nucleotídeo (Figura 4.4), e este foi utilizado para dar sequência nos experimentos de expressão, purificação e análise estrutural.



*Figura 4.4.:* Resultado de sequênciamento de DNA por método de Sanger do Clone pET23a-XACb0033 indicando sequência sem mutações. Na primeira linha sequência da enzima *Nde* I incluindo *START CODON* **ATG**, na última linha *STOP CODON* **TGA** seguindo da sequência da enzima *Sal* I.

Confirmado que a clonagem havia ocorrido com sucesso, deu-se início a expressão da proteína heteróloga XACb0033 em *E. coli*.

#### 4.1.3. Expressão de proteínas e preparação dos extratos protéicos

A proteína alvo XACb0033 é uma proteína hipotética da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* de aproximadamente 8,42 kDa cuja função está sendo estudada, foi anotada como possível chaperone secretória do T4SS. Ela é capaz de ligar-se a sua proteína parceira (XACb0032) utilizando seus resíduos de aminoácidos de 18 – 72 e seu gene está localizado adjacente ao lócus *Vir B* (T4SS) no plasmídeo pXAC64 da *Xac* (Alegria e col, 2004).

Esta proteína hipotética foi clonada com sucesso no vetor de expressão pET23a(+) e toda sua sequência de DNA foi confirmada pelo sequênciamento de nucleotídeos. O DNA recombinante foi inserido em *E. coli* cepa BL21(DE3)*pLysS* pelo método de eletroporação (Seção 3.1.5.). A cepa correta de bactéria foi crescida em meio LB e iniciou-se o processo da avaliação da expressão da XABb0033 por indução adicionando IPTG 1mM. A expressão foi analisada em gel de poliacrilamida e o que se observou foi a produção de duas bandas, uma em aproximadamente 8,4 kDa e a segunda em aproximadamente 12 kDa (Figura 4.5).



*Figura 4.5.:* Indução com 1mM de IPTG da proteína hipotética XACb0033 . Gel SDS-page 15%: Poço 1 – Amostra não induzida, poço 2 – Amostra com 1h de indução, poço 3 - Amostra com 16hs de indução.

A partir do pellet congelado das bactérias induzidas, foi feita a lise bacteriana (Seção 3.2.7.) com a intenção de que a proteína de interesse XACb0033 ficasse solúvel. O ocorrido é que esta proteína estava insolúvel, presente no corpo de inclusão.

Como já se sabe a uréia (H<sub>2</sub>NC(O)NH<sub>2</sub>) é capaz de solubilizar corpos de inclusão, por ser um agente caotrópico capaz que desfazer ligações não covalentes. Ela ser torna interessante na utilização para proteínas, pois apresenta solubilidade em água até 10 M. Utilizou-se uréia na tentativa de solubilizar a XACb0033 do corpo de inclusão, o procedimento foi feito conforme Seção 3.2.8.. O resultado obtido está mostrado na figura 4.6., porém devemos levar em consideração que a concentração de precipitado aplicada no gel do desenovelamento com uréia é dez vezes maior que o sobrenadante. O que pode ser observado é que a fração da proteína XACb0033 referente a banda de aproximadamente 8,4 kDa no gel de poliacrilamida, manteve-se insolúvel, porém a fração da proteína XACb0033 referente a banda de aproximadamente solubilizada.



*Figura 4.6.:* Desenovelamento com uréia. Gel SDS-page 15%. Poços 1 e 2 – Fração solúvel da diálise da proteína em solução 8M uréia, poços 3 e 4 - Fração insolúvel da diálise da proteína em solução 8M uréia (amostra da fração insolúvel 10 vezes mais concentrada que fração solúvel). A direita está apresentado o padrão de peso molecular com designação de peso de proteínas de 20-10 kDa.

Como citado anteriormente, foi visto que o tamanho da segunda banda presente no gel de poliacrilamida estava diferente (~12 kDa) do tamanho esperado (8,42 kDa) e pode-se supor que as condições redutoras utilizadas na eletroforese e no preparo das amostras da XACb0033 foram insuficientes para reduzir as ligações de dissulfeto presentes nesta proteína. Este resultado não é surpreendente visto que a XACb0033 tem dois resíduos de cisteínas (C<sub>39</sub> e C<sub>43</sub>) que podem formar ligação de dissulfeto entre cadeias gerando dímeros, trimeros e/ou tetrâmeros estáveis.

#### 4.1.4. Purificação da XACb0033

A partir do sobrenadante da diálise após desenovelamento com uréia (Seção 3.2.8.) a proteína alvo deste estudo foi purificada utilizando cromatografia de exclusão molecular (Seção 3.2.9.).

Os resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina apresentam a propriedade de absorver luz na região do ultravioleta, sendo que o triptofano apresenta um rendimento quântico superior aos outros citados, esta propriedade é utilizada para acompanhamento do processo de purificação utilizando-se detector UV. A XACb0033 apresenta dois triptofanos, duas tirosinas e duas fenilalaninas em sua estrutura, o que facilita o acompanhamento da purificação utilizando um detector UV em 280nm acoplado ao FPLC. As proteínas maiores eluiram primeiramente e em seguida foram eluindo as proteínas em ordem decrescente de tamanho. As frações que continha a XACb0033 pura estão mostradas na figura 4.7.. O gel de poliacrilamida mostra que a proteína saiu de forma pura, sem nenhum contaminante. As frações puras dos poços 1, 2, 3 e 4 foram agrupadas e concentradas.



*Figura 4.7.:* Purificação da XACb0033. Gel SDS-page 15%. Poços 1, 2, 3 e 4 – Eluatos da coluna de exclusão molecular. O padrão de peso molecular está apresentado à direita.

#### 4.1.5. Determinação da concentração da proteína XACb0033

A determinação da concentração da proteína XACb0033 foi realizada pelo método de Bradford, fez-se uma curva padrão utilizando BSA como padrão. A interpolação dos dados foi realizada utilizando regressão linear. A proteína pura foi quantificada após sua concentração e antes dos testes espectroscópicos. O rendimento médio de proteína purificada foi de 0,48 mg/L de indução ou 0,06 mM /L indução.

Para experimentos como SAXS e as tentativas de cristalização foi necessário purificar pelo menos dois litros de indução para cada experimento

#### 4.1.6 Espectrometria de massas

Para confirmar que a proteína obtida de forma pura era realmente a proteína alvo do estudo, XACb0033, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas (Seção 3.4) com intuito de determinar a sua massa exata. Os resultados

obtidos conforme apresentado na Figura 4.8.,indicam a presença de espécies com a relação massa e carga (m/z) de 8,29 kDa, valor próximo a massa teórica esperada. Os picos de m/z foram atribuídos conforme indicado na Tabela 4.1.



*Figura 4.8.:* Espectro de massas da proteína XACb0033. Presença de três picos com relações m/z em que os mais abundantes referem-se ao monômero (m/z = 8294,17 u.a.), dímero (m/z = 16623,49 u.a.), tetrâmero (m/z = 33181,04 u.a.)

*Tabela 4.1:* Atribuição da oligomerização da XACb0033 em função da relação m/z conforme resultados de MS:

Relação m/z (u.a.)	Oligomerização
8294,17	Monômero
16623,49	Dímero
33181,04	Tetrâmero

Como ilustrado na Figura 4.8., a proteína obtida de forma pura (Figura 4.7.) e em quantidade suficiente para os estudos espectroscópicos foi a XACb0033.
A XACb0033 apresenta duas cisteínas na sua estrutura nas posições 39 e 43, estas podem formar ligação de dissulfeto inter e intra-molecular levando a proteína a formar oligômeros. Para confirmar se os picos atribuídos na Figura 4.8. eram referentes à oligomerização da XACb0033, foi executado um experimento utilizando um agente redutor, o  $\beta$ -mercaptoetanol.

A amostra de XACb0033 foi reduzida adicionando  $\beta$ -mercatoetanol aplicando a concentração molar deste reagente em excesso de quatro vezes (Seção 3.4.). Após esta preparação, a amostra foi submetida a MS e os resultados estão sumarizados na Figura 4.9. Observou se que as ligações de dissulfeto intramoleculares das cisteínas C<sub>39</sub> e C<sub>43</sub> foram reduzidas, obtendo-se o monômero (m/z ~8,2 kDa) em sua maioridade e apenas uma pequena fração da forma tetramérica. Com estes dados foi possível concluir que a proteína hipotética XACb0033 quando pura apresenta-se na forma monomérica e nas formas de aglomerados diméricos e tetraméricos, com possíveis ligações inter e intramoleculares entre as cistinas da proteína. Na presença de um agente redutor como o  $\beta$ -mercatoetanol, as ligações de dissulfeto foram reduzidas.

Confirmado que a proteína expressa e purificada pelos métodos descritos é a proteína XACb0033 iniciou-se sua análise estrutural. A sua estrutura secundária e a estabilidade foram acompanhadas utilizando o Dicroísmo Circular, enquanto que para entendermos como os resíduos do triptofano estavam envolvidos com outras partes da proteína, utilizaram-se as técnicas de Fluorescência de emissão estática e dinâmica (tempo de vida).



*Figura 4.9.:* Representação dos dados obtidos pela MS para proteína XACb0033 em presença de β-mercatoetanol

## 4.1.7. Análise estrutural por dicroísmo circular

Os dados de CD foram analisados por absorção de luz UV em 200 a 260nm (Seção 3.6.). Como ilustrado na Figura 4.10., a proteína hipotética XACb0033 apresentou mínimos globais em 208 e 222 nm, e a curva obtida apresenta um formato padrão característico de uma proteína que possui elementos de estrutura secundária regular e presença de estrutura em  $\alpha$ -hélice.



*Figura 4.10.*: Espectro de CD da proteína XACb0033, em concentração de 4  $\mu$ M em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH=8,0), adquirido a 20°C com a velocidade de 20 nm/min de 200 a 260nm.

O cálculo da porcentagem de  $\alpha$ -hélice foi realizado utilizando diferentes métodos (Chen e col, 1974; CDNN, 1999; Dele´age G., 1993) e os resultados obtidos, expostos na Tabela 4.2., indicam que a proteína XACb0033 possui aproximadamente de 30% de hélice- $\alpha$  na sua estrutura secundária.

Tabela 4.2.: Conteúdo de α-hélice da XACb0033 calculado a partir de dados de CD (20°C)

~ /
30,2
29,3
27,1

Os espectros obtidos com aumento da temperatura (20-65°C) mostraram que ocorrem mudanças estruturais sob aquecimento (Figura 4.11.a.) em que em temperatura superior de 65°C (~70°C) houve agregação e precipitação da proteína. Nos ensaios de estabilidade térmica a proteína aquecida até 65°C, foi resfriada gradativamente até 20°C aplicando o mesmo padrão de agora

resfriamento (-1°C/min). E, em temperatura de 20°C o espectro de CD para a XACb0033 indicou a presença dos elementos estruturais muito próximos os de uma amostra cujo espectro foi adquirido sem aquecimento uma vez que os dois espectros (antes e após aquecimento) foram sobrepostos. Este resultado sugere o mesmo padrão de absorção da proteína que não foi desnaturada, ou seja, a XACb0033 apresentou-se estável termicamente e seu re-enovelamento reversível até 65°C, como mostrado na Figura 4.11.b.



*Figura 4.11.:* Desenovelamento térmico por CD da XACb0033. (a) espectros de CD da XACb0033 com aumento da temperatura, iniciando em 20°C e terminando em 65°C, e (b) espectro de CD a 20°C sem aquecimento (linha cheia vermelha), e espectro a 20°C após aquecimento até 65°C (linha pontilhada). Como visto, não houve a mudança da estrutura secundária após desenovelamento térmico, mostrando que o sistema é reversível.

#### 4.1.8. Emissão de fluorescência: estática e dinâmica

Os resultados obtidos em experimentos de fluorescência de emissão estática e de tempo de vida estão apresentados na Figura 4.12. Como já dito, a XACb0033 apresenta dois triptofanos (W<sub>26</sub> e W<sub>70</sub>), dois resíduos de fenilalanina e dois resíduos de tirosina, podendo fornecer emissão em um espectro. Para que o experimento fosse seletivo apenas para os triptofanos, devido ao seu maior

rendimento quântico, utilizamos uma energia de excitação menor (295 nm), em que excitação dos elétrons dos resíduos de Tyr e Phe não interferiram no experimento.



*Figura 4.12.*: Espectros de emissão de fluorescência da XACb0033. Proteína em 4  $\mu$ M em tampão fosfato (20 mM, pH=8,0). O espectro (**a**) foi obtido com experimentos de emissão estática, com máximo de emissão em 345 nm e excitação em 295 nm, o gráfico em (**b**) representa tempos de vida em que  $\tau_1 = 1,2$  ns e  $\tau_2 = 4,9$  ns

O espectro da fluorescência de emissão da XACb0033, apresentou um máximo de fluorescência em 345 nm. Os resíduos de triptofano (Trp, W) quando expostos a água exibem a fluorescência máxima entre 340 e 350 nm enquanto envolvidos em interações hidrofóbicas emitem ao redor de 330 nm ou menores  $\lambda$ . A XACb0033 com W<sub>26</sub> e W<sub>70</sub> tendo o máximo de emissão de fluorescência em 345 nm, sugere que pelo menos um dois seus W esteja interagindo com o solvente (solução aquosa). Acredita-se que o resíduo W<sub>70</sub> contribua de forma mais significativa na emissão em 345 nm, visto que este resíduo se encontra na região C-terminal da proteína. Para os experimentos de tempo de vida a proteína apresentou componentes de tempo de vida longo e curto,  $\tau_1 = 1,2$  ns e  $\tau_2 = 4,9$  ns, e alguns modelos podem ser associados aos resultados obtidos:

- os triptofanos, W<sub>26</sub> e W<sub>70</sub> estão em ambientes diferentes apresentando mecanismos de relaxação diferentes.
- os tempos de vida medidos estão relacionados ao mesmo triptofano, que apresenta conformações diferentes na proteína, porém não foi possível atribuir a qual triptofano pertence estes dados.

# 4.1.9. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN de <sup>1</sup>H)

Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (IQ-UNICAMP), com objetivo de verificar propriedades de interação da proteína alvo com os nucleotídeos ATP e ADP. Foram adquiridos experimentos de hidrogênio-1 (RMN de <sup>1</sup>H) e de transferência de saturação (STD, "Saturation Transfer Difference"; Seção 3.8). Para a proteína XACb0033 não foi observada a interação com o ATP a 25°C. Entretanto, o espectro de STD para a amostra contendo a XACb0033 e ADP obtido a 5°C, mostrou a presença de dois pequenos sinais em  $\delta$  8,02 referente ao **H-2** e em  $\delta$ 6,10 referente ao **H-1**<sup>'</sup> do ADP (Figura 4.13), indicando que a interação entre estas duas moléculas não é especifica ou é fraca, *i.e.*, de pouca intensidade.



*Figura 4.13.:* Espectros de RMN de <sup>1</sup>H da XACb0033 com ADP (1:100, razão molar, respectivamente) na região de  $\delta$  4,0 a 9,0. Espectro (**a**) STD-controle (nenhum hidrogênio da XACb0033 irradiado) e espectro (**b**) o espectro de STD em que não foi observado nenhuma interação significativa.

#### 4.1.10. Tentativas de Cristalização

Com o objetivo da análise da estrutura terciária da XACb0033 iniciaram-se os experimentos de cristalização desta proteína. A XACb0033 foi dialisada contra água desmineralizada e contra solução Tris-HCI (5mM, pH=8,0) porém a XACb0033 apresentou-se estável somente em concentração máxima de 1 mg/mL. Na tentativa de concentrar ainda mais a amostra da XACb0033 aplicando filtro de 4 kDa (Millipore), observava-se a presença de um precipitado branco no fundo do tubo, e ao medirmos a concentração do sobrenadante verificou-se que era inferior a 1 mg/mL, chegando a conclusão que ocorria agregação protéica em concentrações superiores a 1mg/mL. Então, utilizando a solução de XACb0033 de 1 mg/mL foram executadas diversas tentativas de cristalizar esta proteína, fez-se uma varredura de condições de cristalização utilizando a técnica de gota sentada com Kit Cristal Screen I e II (Hampton Research). Porém o resultado não foi satisfatório, os cristais obtidos eram pequenos e de baixa qualidade.

#### 4.1.11. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A estrutura do envelope topológico sem a resolução em nível atômico, foi obtida utilizando espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). As experiências foram realizadas linha SAXS2 do LNLS (Seção 3.9.). Foram utilizadas duas concentrações da proteína hipotética XACb0033 de 0,64 e 0,958mg/mL. A amostra com maior concentração apresentou um padrão de espalhamento melhor e os dados apresentados são referentes às coletas com esta amostra (0,958 mg/mL). Os resultados de SAXS foram analisados em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Íris Torriani (IFGW-UNICAMP e LNLS). Foi possível obter um modelo topológico da XACb0033, conforme ilustrado na Figura 4.15 (a) e 4.15 (b). As curvas de espalhamento do tipo I(q) vs. q e a função p(r) (Seção 3.9.) da proteína XACb0033 estão ilustradas nas Figuras 4.14 (a) e 4.14(b), respectivamente.



*Figura 4.14.*: Curvas obtidas pelo espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) da XACb0033. (a) Curva de espalhamento e (b) função p(r) da proteína XACb0033.

A partir de dados obtidos podemos deduzir parâmetros referentes a molécula da proteína que foi analisada (Seção 1.6.4.). A partir da  $l(q) \times q$  estimamos o valor do raio de giro da molécula, *i.e.*, o raio de inércia da mecânica clássica, e o resultado obtido para XACb0033 foi de 23 ± 1 Å (Rg), a partir da mesma curva podemos determinar a massa da proteína em solução, e o resultado que obtivemos foi de 9,0 kDa, o que é muito próximo ao teórico e medido pela MS (8,29 kDa). Já a partir da curva p(r) x r pode-se determinar a dimensão máxima da partícula, para a proteína hipotética de aproximadamente 80 Å (D<sub>max</sub>).

Na prática, a massa molecular é estimada por comparação com uma amostra referência (Svergun e Koch, 2003), neste caso, como mencionado na seção experimental, utilizou-se lisozima. Entretanto a lisozima possui uma forma globular e a proteína do estudo, XACb0033, não, o que permite dizer que o cálculo de massa molecular pelos dados de SAXS é somente uma aproximação. Analisando a curva p(r) vs. r podemos dizer que a proteína XACb0033 possui um formato alongado, pois esta curva apresenta uma função de distribuição de distâncias características para esta forma geométrica (Svergun e Koch, 2003), o que foi confirmado com o modelo obtido pelo cálculo *ab initio.* O modelo final otimizado utilizando um modelo *"bead model"* (Seção 1.6.4.1.) está apresentado na Figura 4.15 (a). Como a sua sequência de resíduos de aminoácidos está disponível foi possível, também, obter um modelo do tipo *"dummy residues"* mostrado na Figura 4.15 (b).



*Figura 4.15. Modelos da XACb0033 baseados nos dados de SAXS*: Modelos (a) "*bead model*" e (b) "*dummy residues*" da proteína XACb0033, em que são apresentadas três diferentes vistas para cada modelo.

Como mostrado (Figuras 4.14 a e b e 4.15 a e b) a XACb0033 apresenta uma estrutura topológica em formato alongado, massa molecular de 9 kDa , raio de giro de 23  $\pm$  1 Å e dimensão máxima de 80 Å.

### 5. Considerações Finais

Este trabalho forneceu a estrutura do envelope molecular de uma proteína hipotética da bactéria Xanthomonas axonopodis pv. citri. Para chegar a este resultado a proteína hipotética foi clonada em vetor de expressão pET23a(+), expressa em bactéria E. coli cepa BL21(DE3)pLysS a 37°C e agitação de 200 rpm. Para a indução da bactéria foi utilizado IPTG a 1 mM durante 16 hs. O resultado foi analisado por gel de poliacrilamida (15 %) e observou-se a presença de duas bandas com tamanhos diferentes, uma com 8,4 kDa e outra com 12 kDa, resultado da indução. A banda em 8,4 kDa corresponde ao tamanho teórico esperado de 8,42 kDa, já a banda maior de 12 kDa não condiz com nenhuma massa teórica esperada. Como as chaperonas podem atuar como dímeros (Feldman e Cornelis, 2003) propôs-se que esta banda maior poderia ser a XACb0033 na sua forma dimérica, devido ao possível processo de denaturação incompleta do gel SDS-PAGE. Prosseguiram-se os estudos e a confirmação da proteína heteróloga expressa em *E. coli* foi feita por espectrometria de massas após sua purificação. Realizado o processo de lise bacteriana, observou-se que ambas as bandas referentes à proteína XACb0033 encontravam-se em corpo de inclusão, ou seja, insolúveis. Para tentar solubilizar a proteína hipotética XACb0033, utilizou-se desenovelamento com uréia em concentração final de 8M, seguido de diálise contra tampão fosfato 20mM, pH8 e o ocorrido foi que, dentre as duas bandas expressas, apenas a fração de proteína referente a banda de 12 kDa estava solúvel. Esta foi purificada através do método de exclusão molecular. Para a confirmação da massa desta proteína, utilizou-se espectroscopia de massas (MALDI-TOF MS) e o espectro obtido apresentou três picos, um com relação m/z 8294 u.a., outro com 16623 u.a. e um terceiro com 33181 u.a. A massa experimental se confirmou com o teórico esperado e a XACb0033 em solução poderia estar na suas formas monomérica, dimérica e tetramérica. Confirmada que a proteína pura em solução era a XACb0033, iniciou-se sua caracterização estrutural.

Para a caracterização estrutural, diferentes tampões foram utilizados e a troca de tampão foi feita utilizando-se diálise por membrana com poro de 5000 Da.

Os espectros de Dicroísmo Circular apresentaram algumas características sobre a proteína, como sua estabilidade térmica, de 20 a 65°C, e seu conteúdo de  $\alpha$ -hélice, que foi de 30%. Os ensaios de fluorescência indicaram que a XACb0033 apresenta pelo menos um dos seus triptofanos (ela contém dois na sua estrutura) exposto ao solvente, e as medidas de tempo de vida, indicam que os triptofanos estão em meios diferentes, ou ocorrem conformações diferentes do mesmo triptofano, com mecanismo de relaxação distintos, porem não foi possível identificá-los (Tasic e col., 2007).

Os resultados de RMN mostraram que a proteína alvo deste estudo não consegue se ligar a ATP ou ADP.

Os experimentos de SAXS forneceram o envelope molecular, a estrutura topológica da XACb0033 e os parâmetros dimensionais calculados que foram: massa 9 kDa, o que foi bem próximo ao teórico (8,42 kDa) e aos dados da espectrometria de massas (8,29 kDa), raio de giro (Rg) =  $23 \pm 1$  Å, e diâmetro máximo de 80 Å. A partir das curvas de espalhamento da proteína hipotética de *Xac* XACb0033 foi obtido modelo "*bead model*" e "*dummy residues*" indicando um formato alongado.

Esta proteína foi anotada como hipotética chaperone secretória do sistema tipo IV, onde algumas características das chaperonas secretória foram identificadas neste trabalho.

Chaperonas Secretorias	XACb0033
Atuam como dímeros/oligômeros	Espectrometria de massas
	m/z  = 8294 u.a., 16623 u.a. e  33181 u.a.
Propensão a formar hélice anfipática C- term	$ \begin{array}{c}         V & \stackrel{\text{M}}{\longrightarrow} & R \\         V & 4 \\         H & 11 \\         H & 11 \\         H & 11 \\         1 & 1 & 1 & 5 \\         H & 11 \\         1 & 1 & 1 & 5 \\         R & 7 \\         14 \\         H & 6 \\         H \\         K \\         K \\         H \\         K \\         K \\         S \\         H \\         K \\         S \\         R \\         R \\         R \\         $
pl ácido	pl = 5,8
Tamanho menor que 20 kDa	8,42 kDa
Interação com proteína efetora	Interação com XACb0032, ensaios de duplo híbrido *
Não se ligam a ATP	RMN-STD
	Não é capaz de se ligar a ATP ou ADP
Se ligam na região N-term da proteína efetora	Interação com XACb0032, ensaios de duplo híbrido através dos resíduos de 18-72 da XACb0033*

• Alegria, M. C. E col.; J. Bacteriol. 2005.

## 6. Conclusões

A proteína XACb0033 foi analisada por dicroísmo circular (CD), fluorescência estática e dinâmica, ressonância magnética nuclear (RMN, STD) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Os dados indicaram que a proteína XACb0033 apresenta 8,29 kDa, contém 30% de  $\alpha$ -hélice na sua estrutura secundária, não se liga a ATP ou ADP e possui formato alongado.

Apresenta diversas características de chaperonas secretórias como mostrado na tabela acima, foi denominada secretória Tipo IV por estar entre os genes *trwC* e *virB1* do plasmídeo pXAC64 da *Xac,* próxima aos genes que codificam proteínas de B1 a B11 formadoras do T4SS e sua função poderia assumir um modelo onde: a XACb0033 iria se ligar parcialmente (resíduos de 18-72)a sua proteína efetora XACb0032, deixando parcialmente desenovelada e transportando para a base do sistema secretório, onde a proteína efetora poderá ser excretada conforme mecanismo do canal secretório.

## 7. Referências Bibliográficas

Adler A. J., Greenfied N. J. e col., Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol*, v.27, p.675-735, 1973.

Aizawa, S. I., Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett,* v.202, n.2, Aug 21, p.157-64, 2001.

Akeda, Y. e Galán J. E., Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, v.437, n.7060, Oct 6, p.911-5, 2005.

Alegria, M. C., Souza D. P. e col., New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri. J Bacteriol.* v. 186, n.18, Sep, p.6186-97, 2004

Alegria, M. C., D. P. Souza, e col., Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri. *J Bacteriol*, v.187, n.7, Apr, p.2315-25, 2005.

Arechaga I. e col., ATPase Activity and Oligomeric State of TrwK, the VirB4 Homologue of the Plasmid R388 Type IV Secretion system. *Journal of Bacteriology*, v. 190, p. 5472, 2008.

Baneyx, F., "Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*". *Current Opinion Biotechnology*, v. 10, pp. 411-421, 1999.

Bennett, J. C. e C. Hughes, From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperonas. *Trends Microbiol,* v.8, n.5, May, p.202-4, 2000.

Berger, B. R. e Christie P. J., Genetic complementation analysis of the Agrobacterium tumefaciens virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *J Bacteriol*, v.176, n.12, Jun, p.3646-60, 1994.

Bitancourt, A. A., O cancro cítrico. O Biológico v. 23,:p.101-111, 1957.

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, May 7, p.248-54, 1976.

Brunings, A. M. e Gabriel D. W., *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, v.4, n.3, 2003May1, p.141-157, 2003.

Burns, D. L., Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol,* v.2, n.1, Feb, p.25-9, 1999.

Burns D. L., Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*, v.6, n.1, Feb, p.29-34, 2003.

Buttner, D. e Bonas U., Port of entry the type III secretion translocon. *Trends Microbiol,* v.10, n.4, Apr, p.186-92, 2002.

CDNN 2.1., Circular Dichroism Deconvolution. Neutral Networks, 1999

Chacon P. e col., Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from ray scattering with a genetic algorithm. *Biophysical Journal*, v.74, n6, p.2760-775, 1998.

Chacon P. e col., Reconstruction of protein form with X-ray scattering and genetic algorithm. *Journal Molecular Biology*, v. 299, n. 5, p.1289-1302, 2000.

Chen, Y. H., Yang J. T. e col., Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. Biochemistry, v.182, n.11, Jun, p.3183-90, 2000.

Christie, P. J., Agrobacterium tumefaciens T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol*, v.179, n.10, May, p.3085-94, 1997.

Christie, P. J., Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol*, v.40, n.2, Apr, p.294-305, 2001.

Christie, P. J., Atmakuri K., e col., Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, v.59, p.451-85, 2005.

Christie, P. J. e Vogel J. P., Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*, v.8, n.8, Aug, p.354-60, 2000.

Cornelis, G. R. e Van Gijsegem F., Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol,* v.54, p.735-74, 2000.

da Silva, A. C, e col., Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, v.417, n.6887, May 23, p.459-63, 2002.

Deléage G., Geourjon C., DICROPROT V 2.3: DICROism of PROTeins. Comp Appl. Biosc, v. 9, p.197, 1993. Dower, W. J., Miller, J. F., Ragdale, C. W., "High Efficiency Transformation of *E. coli* by High Voltage Electroporation". *Nucleic Acids Research*, v. 16, p. 6127-6147, 1988.

Economou, A., Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol,* v. 7, n. 8, Aug, p.315-20, 1999.

Feigin L. A. e Svergun D. I., Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering. New York, Plenum Press, 1987.

Feldman, M. F. e G. R. Cornelis, The multitalented type III chaperonas: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett*, v.219, n.2, Feb 28, p.151-8, 2003.

Figueiredo I. M., Marsaioli A. J., Mapeamento Das Interações Proteína-Ligante Através De Técnicas De Rmn De <sup>1</sup>H Utilizando Detecção Do Ligante. *Química Nova*, v.30, n.7, p.1597, 2007.

Fronzes e col., Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. *Science*, v.323, p.266, 2009

Galán, J. E. e A. Collmer., Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, v.284, n.5418, May 21, p.1322-8, 1999.

Galán, J. E. e Wolf-Watz H., Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, v.444, n.7119, Nov 30, p.567-73, 2006.

Glatter O e Kratky O., Small angle x-ray scattering, London, Academic Press, 1982.

Graham, J.H., Gottwald, T.R. e col., *Xanthomonas axonopodis pv. citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molec. Plant Pathol.*, v. 5, p. 1–15, 2004.

Groisman, E.A., Principles of Bacterial Pathogenesis. Academic Press, 2001.

Henderson, I. R. Navarro-Garcia F e col., Type V proteins secretion pathway: the autotranporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 68, n. 4, Dec, p692-744, 2004.

Hromkovic J., Algorithms for hard problems: introduction to combinatorial optimization randomization, approximation and heuristies. London, Spring-Verlag, 2001.

http://www.abecitrus.com.br.

http://www.fundecitrus.com.br

Hueck, C. J., Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.62, n.2, Jun, p.379-433, 1998.

Kather, L., T.M. Santos, e col., *In silico* identification of potencial chaperone genes that belong to type III and Type IV secretion systems in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri. Genetics and Molecular Biology*, v.28, n.2, p.321-327, 2005.

Kelly S. M. e Price N. C., The application of the circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochem Biophys Acta*, v.1338, n.2 Apr 4, p.161-85, 1997.

Larsen, B e col. J. Am. Soc. Mass Spetrom., v.7, p. 287, 1996.

Lakowicz J. R., Principles of fluorescence Spectroscopy, New York. Kluwer Academy/Plenum Plublisher, 1983.

Lee, S. H. e Galan J. E., Salmonella type III secretion-associated chaperonas confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol*, v.51, n.2, Jan, p.483-95, 2004.

Levitt M. e Chothia C., Structural patteners in globular proteins. *Nature*, v.261, n.5561, Jun 17, p.552-8, 1976.

Lodish e col. Molecular Cell Biology, New York, W. H. Freeman and Company, 2004.

Luo, Y., Bertero M. G. e col, Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperonas CesT and SigE. *Nat Struct Biol,* v.8, n.12, Dec p.1031-6, 2001.

Matxalen L. e col., Bacterial type IV secretion systems in human disease, *Molecular Microbiology*, v. 73, n. 2, p.141, 2009.

Mayer M. e Meyer B., Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor . *J Am Chem Soc*, v.123, n25, Jun 27, p.6108-17, 2001.

Muller, S. A., C. Pozidis, e col., Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol*, v.61, n.1, Jul, p.119-25, 2006.

Ribeiro, E. A., Jr., W. C. Regis, e col., Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin. *Protein Expr Purif*, v.28, n.1, Mar, p.202-8. 2003.

Rodger A., Nordén B., *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. New York, Oxford University Press Inc, 1997.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T., *A Laboratory Manual in Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad., 1977

Schesser, K., Frithz Lindsten E. e col., Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains wich mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellulat menbranes. *J. Bacteriol,* v. 178, n. 24, Dec, p.7227-33, 1996.

Stryer, L. *Biochemistry*. New York. W.H. Freeman and Company, 1988.

Stebbins, C. E. e. Galan J. E, Priming virulence factors for delivery into the host. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.4, n.9, Sep, p.738-43, 2003.

Stebbins, C. E. e. Galan J. E., Maintenance of an unfold polypeptides by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, v414, n.6859, Nov 1, p.11998-2002, 1995.

Studier, F. W., A. H. Rosenberg, e col., Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, v.185, p.60-89, 1990.

Svergun D.I., Restoring low resolution structure of biological macromolcules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal*, v.76, n.6, p.2879-2866, 1999.

Svergun D.I., Small-angle scattering studies of macromolecular solutions, *Journal* of *Applied Crystallography*, v. 40, S10, 2007.

Svergun D. I. e Koch M. H. J., Small-angle scaterring studies of biological macromolecules in solution. *Rep Prog. phys*, v.66, Set, p.1735-82, 2003.

Tasic, L., Borin P. e col, Cloning and characterization of three hypothetical secretion chaperonas proteins from Xanthomonas axonopodis pv citri. *Protein Expr Purif*, v.53, n.2, p.363-9, 2007.

Thanassi, D. G. e S. J. Hultgren. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol*, v.12, n.4, Aug, p.420-30. 2000.

Wattiau, P. e Cornelis G. R., *SycE*, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in *Ohe* secretion of *YopE*. *Mol Microbiol*, v.8, n.1, Apr, p.123-31, 1993.

Wattiau, P., Woestyn S. e col., Customized secretion chaperonas in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, v.20, n.2, Apr, p.255-62, 1996.

Woestyn, S., M. P. Sory e col., The cytosolic *SycE* and *SycH* chaperonas of *Yersinia* protect the region of *YopE* and *YopH* involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol*, v.20, n.6, Jun, p.1261-71, 1996.

Yeo, H. J., S. N. Savvides e col., Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol Cell*, v.6, n.6, Dec, p.1461-72, 2000.

Zambryski, P., Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu Rev Genet*, v.22, p.1-30, 1988.

Zhang R., Suter R. M. e col., Theory of the structure factor of lipid bilayers. *Phys Rev E Stat Phys Plasma Fluids Relat Interdiscip Topics*, v.50, n.6, Dec, p.5047-60, 1994.