



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPLEXO DE PROTEÍNAS
HIPOTÉTICAS - XACb0032/XACb0033 DA BACTÉRIA
Xanthomonas axonopodis pv. *citri***

THAIS PEREIRA LOPES

Orientadora: Profa. Dra. Ljubica Tasić

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

L881c Lopes, Thais Pereira.
 Caracterização estrutural do complexo de proteínas
 hipotéticas – XACb0032/XACb0033 da bactéria
 Xanthomonas axonopodis pv *citri* / Thais Pereira Lopes. -
 Campinas, SP: [s.n], 2007.

 Orientadora: Ljubica Tasic.

 Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
 Instituto de Química.

 1. Purificação. 2. Caracterização estrutural. 3. Sistema
 secretório tipo IV. 4. *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.
 I. Tasic, Ljubica. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Structural characterization of hypothetical proteins complex -
XACb0032/XACb0033 from *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Palavras-chaves em inglês: Purification, Structural characterization, Type Four
Secretion System, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

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. Anete Pereira de Souza (IB-UNICAMP)

Data de defesa: 16/08/2007

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, pela oportunidade do aprendizado da vida!

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe Nancy, a minha tia Maria, minha Vó Mafalda e também minha tia Janet.

Agradeço à Profa. Dra. Ljubica Tasić, mais conhecida como Buba, pela orientação recebida.

À minha companheira de laboratório, Paula e aos colegas do LNLS, em especial, a Veruska e o Júlio César (SAXS).

Aos meus amigos, Zé, Muniz, Fer, Dudu, Almir e da Panela 99!

Aos professores com os quais tive trabalhos em colaboração, a Profa. Dra. Anita Marsaioli, a Profa. Dra. Iris Torriani, a Dra. Beatriz Guimarães, e em especial o Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos, pela utilização do laboratório LEC do LNLS.

Aos membros que compõem esta banca, o Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos, mais uma vez, e a Profa. Dra. Anete Pereira de Souza e ao membro suplente, Prof. Dr. Ricardo Aparício.

Ao IQ da UNICAMP, em especial, ao laboratório I-250.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Ao LNLS pela utilização da Linha de Luz Síncrotron, SAXS 2.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado!

Muito Obrigada a todos!!!

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Thais Pereira Lopes
Data de nascimento: 13 de novembro de 1978
Naturalidade: São Paulo- SP
e-mail: thaispl@gmail.com

Formação Acadêmica

- 2005 a 2007 Mestrado em Química Orgânica
Universidade Estadual de Campinas
- 1999 a 2004 Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas – noturno
Universidade Estadual de Campinas
Premiação: Diploma de Honra ao Mérito concedido pelo
Conselho Regional de Química – IV Região
- 1994 a 1998 Curso Técnico em Química
Escola Técnica Walter Belian

Trabalhos apresentados em congressos

- 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? 2nd IBEROAMERICAN NMR MEETING, Tarragona, Espanha, **2007**.
- 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**.
- 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^a SBBq e 10th IUBMB, Salvador, BA, Brasil, **2007**.
- 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, 11th NMR Users Meeting/Workshop NMR in South America, Angra dos Reis, RJ, Brasil, **2007**.
- 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 chaperone (XACb0033) and its co-expressed and co-purified target protein

- (XACb0032) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, 17^a RAU, painel, Resumos de trabalhos científicos, 66, Campinas, SP, Brasil, **2007**.
- 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 chaperones, IX Jornada de Ressonância Magnética Nuclear, painel e *apresentação oral*, Recife, PE, Brasil, **2006**.

Atuação Profissional

HEMOCENTRO - UNICAMP

Biologista

Atividades desenvolvidas:

Responsável pela organização do laboratório e pelo desenvolvimento de projetos e procedimentos de rotina na área de controle de qualidade de bolsas de sangue com a utilização de técnicas de biologia molecular, extração de DNA e RNA humano, viral.

Técnica responsável pela operação do microscópio confocal.

Período: Set/2004 aos dias atuais

HEMOCENTRO - UNICAMP

Estágio Nível Superior

Atividades desenvolvidas:

Desenvolvimento de projetos na área de controle de qualidade de bolsas de sangue com a utilização de técnicas de biologia molecular, extração de DNA e RNA humano, viral e bacteriano.

Período: Fev/2001 a Mai/2004

DOW CORNING DO BRASIL

Estágio Nível Superior

Atividades desenvolvidas:

Pesquisa e desenvolvimento de métodos de Siliconização de papel e análise através de Fluorescência de Raio-X.

Período: Mar/2000 a Jan/2001

Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda.

Técnica Química

Atividades desenvolvidas:

Análise de eficácia/segurança de produtos cosméticos.

Período: Mai/99 a Mar/2000

IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Divisão de Metalurgia - Laboratório Químico

Estágio Nível Técnico

Atividades desenvolvidas:

Análise de metais via Espectrofotometria de Absorção Atômica

Análise por Gravimetria

Período: Nov/97 a Dez/98

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPLEXO DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS - XACb0032/XACb0033 DA BACTÉRIA

Xanthomonas axonopodis pv. *Citri*

Autora: Thais Pereira Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Ljubica Tasic

Palavras-chave: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), sistema secretório tipo IV (TTFS), co-expressão, purificação, caracterização estrutural

A bactéria gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é responsável pelo cancro cítrico, uma doença de grande importância econômica em todo o mundo. Seus mecanismos de virulência ainda são pouco conhecidos, mas acredita-se que o processo de translocação das proteínas de virulência para a célula da planta hospedeira seja realizado por meio dos sistemas de secreção, principalmente do tipo III e hipoteticamente do tipo IV, onde se destaca o papel das chaperones secretórias. O alvo do nosso estudo é uma proteína hipotética, a XACb0032, que em ensaios de duplo híbrido, apresentou interação com a também hipotética XACb0033 anteriormente indicada como possível chaperone do sistema secretório tipo IV (TTFS). Ambas as proteínas hipotéticas são codificadas pelo *locus virB* do plasmídeo pXAC64. Os estudos estruturais apresentados iniciaram-se com a clonagem em pET23a, seguidos de testes de expressão desta proteína utilizando cepas de *Escherichia coli*, BL21(DE3)pLysS e RP *códon plus*. A expressão da XACb0032 foi bem sucedida utilizando a cepa RP *códon plus*. Os problemas encontrados para purificar a insolúvel XACb0032 foram resolvidos utilizando a sua co-expressão com a XACb0033. Após dois passos de purificação, obtivemos o complexo das proteínas (XACb0032/XACb0033) puro e em quantidades satisfatórias para análises espectroscópicas. O complexo destas proteínas foi analisado por dicromismo circular (CD), emissão de fluorescência (estática e dinâmica), ressonância magnética nuclear (RMN) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Todos os dados obtidos indicaram que o complexo purificado exibe a estrutura enovelada e que após a adição de adenosina difosfato (ADP) ocorre uma mudança evidente na sua forma e no seu tamanho, indicando uma possível quebra do complexo XACb0032/XACb0033 após a liberação de ADP na célula. Portanto, podemos supor que o sistema de secreção do tipo IV deve funcionar da seguinte maneira: 1. Ligação da chaperone XACb0033 à XACb0032 mantendo-a em uma conformação semi-desenovelada; 2. Ligação do complexo ao ATP; 3. Reconhecimento do sistema ATP + complexo pelo TTFS, logo a ATPase cliva o ATP; 4. Formação do ADP e sua presença promove a dissociação da XACb0032 do complexo; 5. Possível secreção da proteína alvo, ou seja, a XACb0032 poderia passar através do canal de secreção até atingir a célula eucariótica.

ABSTRACT

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF HYPOTETICAL PROTEINS COMPLEX - XACb0032/XACb0033 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Author: Thais Pereira Lopes
Supervisor: Prof. Dr. Ljubica Tasic

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), type four secretion system (TFSS), co-expression, purification, structural characterization

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) is the causative agent of citrus canker, a disease of significant economic importance worldwide. The molecular bases of the virulence mechanism are still unknown, but it is believed that transfer of bacterial virulence proteins directly into the host cell cytoplasm is mediated by protein secretion systems, mainly type III and hypothetically type IV. The target of our study was XACb0032. This protein, in two hybrid system, interacted with XACb0033, a protein previously annotated as a possible cytoplasmatic chaperone of type four secretion system (TFSS). Both proteins are hypothetical and encoded by *virB locus* on pXAC64 plasmid. Structural studies were initiated by pET23a cloning; followed by expression tests with *Escherichia coli* strains BL21(DE3)*pLysS* and RP. The XACb0032 RP-expression was successful, however, the protein was insoluble. This problem was solved with its co-expression with XACb0033. After two purification steps, the pure protein complex has been analysed by following spectroscopic methods: circular dichroism (CD), fluorescence emission (static and dynamic), nuclear magnetic resonance (NMR) and small angle X-ray scattering (SAXS). Our results indicate that the complex shows a folded structure and that after ADP addition, a drastic change occurred in the complex size and shape, that might indicate complex breaking upon ADP production in cell. Based on these observations, we can provide the following model for TFSS pathway concerning these proteins: 1. The chaperone (XACb0033) binds to the XACb0032 to keep it in a semiunfolding conformation; 2. This complex binds with ATP; 3. ATP bound to complex docks onto the TFSS apparatus and ATPase hydrolysis ATP; 4. ADP is formed and its presence provides that XACb0032 protein dissociates from complex; 5. The XACb0032 could be able to pass through the needle into the eukaryotic cell.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Índice de Figuras.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> - <i>Xac</i> e cancro cítrico	1
1.2. Sistemas de secreção em bactérias gram-negativas.....	2
1.2.1. Sistema de secreção do tipo III (TTSS).....	4
1.2.2. Chaperones de secreção (CS).....	5
1.2.3. Sistema de secreção do tipo IV (TFSS).....	8
1.3. Genoma da <i>Xac</i> e o complexo das proteínas em estudo.....	10
1.4. Análises espectroscópicas.....	14
1.4.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	14
1.4.2. Emissão de fluorescência: estática e tempo de vida.....	15
1.4.3. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	16
1.4.4. Espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS).....	18
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Expressão das proteínas.....	20
3.1.1. Sistema de expressão pET.....	20
3.1.2. Linhagens de <i>E. coli</i>	21
3.1.3. Meio de cultura LB (Luria – Bertani).....	22
3.1.4. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE, 15 %).....	22
3.1.5. Transformação	23
3.1.5.1. XACb0032.....	23
3.1.5.2. Complexo de proteínas XACb0032/XACb0033.....	24
3.1.6. Indução	24
3.2. Purificação	25
3.2.1. Lise bacteriana	25
3.2.2. Lise do corpo de inclusão (XACb0032).....	26

3.2.3. Purificação do complexo de proteínas	26
3.2.3.1. Cromatografia de troca aniônica (DEAE).....	27
3.2.3.2. Cromatografia de exclusão molecular por gel filtração	27
3.2.4. Complexo puro	28
4. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	29
4.1. Determinação da concentração	29
4.2. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	29
4.3. Emissão de fluorescência estática	30
4.4. Tempo de vida de fluorescência	31
4.5. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	31
4.6. Espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS).....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. XACb0032.....	33
5.1.1. Expressão da proteína	33
5.2. Complexo XACb0032/XACb0033.....	34
5.2.1. Co-expressão das proteínas.....	34
5.2.2. Purificação do complexo de proteínas.....	36
5.2.2.1. Cromatografia de troca aniônica (DEAE).....	36
5.2.2.2. Cromatografia por exclusão molecular	37
5.3. Determinação da concentração do complexo.....	38
5.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	39
5.5. Emissão de fluorescência: estática e tempo de vida.....	41
5.6. Ressonância magnética nuclear (RMN – STD).....	43
5.7. Espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS).....	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
7. PASSOS EM ANDAMENTO.....	50
8. CONCLUSÕES.....	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
10. ANEXO	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CD	Dicroísmo circular, do inglês, <i>circular dichroism</i>
CS	Chaperones de secreção
Da	Dalton (1Da = $1,661 \cdot 10^{-24}$ g)
DEAE	dietilaminoetil celulose
D _{máx}	Dimensão máxima
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-ditiotreitol
IPTG	<i>iso</i> -propil- β -D-tiogalactopiranosídeo
GSP	Caminho de secreção geral, do inglês, <i>general secretory pathway</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Mpf	Formação do par conjugado, do inglês, <i>mating pair formation</i>
NOE	Efeito <i>Overhauser</i> nuclear, do inglês, <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
ORFs	Fases abertas de leitura, do inglês, <i>Open Reading Frames</i>
pI	Ponto isoelétrico
PIB	Produto interno bruto
Rg	Raio de giro
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo, do inglês, <i>small angle X-ray scattering</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
STD	Técnica de RMN de transferência de spin, do inglês, <i>Saturation Transfer Difference</i>
TEMED	N,N', N, N'- tetrametiletilenodiamina
TFSS	Sistema de secreção do tipo IV, do inglês, <i>Type Four Secretion System</i>
TTSS	Sistema de secreção do tipo III, do inglês, <i>Type Three Secretion System</i>
T-DNA	DNA de transferência, do inglês, <i>Transferred DNA</i>
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1. Predição da estrutura secundária do complexo.....	40
Tabela 5.2. Espectros de emissão de fluorescência estática e tempo de vida de fluorescência para a XACb0033 sozinha e para o complexo.....	42
Tabela 5.3. Mapa do epítipo, mostrando a interação dos ligantes ATP e ADP com o complexo.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Sistemas secretórios bacterianos.....	3
Figura 1.2. Modelo do TTSS assistido por chaperone em <i>Salmonella</i>	7
Figura 1.3. Esquema representativo do TFSS	9
Figura 1.4. Representação do plasmídeo pXAC64 da <i>Xac</i>	12
Figura 1.5. Seqüências dos nucleotídeos e aminoácidos das duas proteínas, XACb0032 e XACb0033.....	12
Figura 1.6. Espectros de CD característicos para proteínas.....	15
Figura 5.1. Gel SDS- PAGE (15 %) (a) Expressão da XACb0032 (b) Lise da XACb0032.....	33
Figura 5.2. Gel SDS- PAGE (15%) (a) Co-expressão das proteínas XACb0032/XACb0033. (b) Lise do complexo.....	34
Figura 5.3. Purificação do complexo XACb0032/XACb0033 por cromatografia de troca iônica.....	36
Figura 5.4. Purificação do complexo XACb0032/XACb0033 por cromatografia de exclusão molecular.....	37
Figura 5.5. Curva analítica construída utilizando BSA como padrão.....	38
Figura 5.6. Espectro de CD do complexo XACb0032/XACb0033.....	39
Figura 5.7. (a) Espectros de CD em 20°C antes e após aquecimento e (b) Espectros de CD dependentes de temperatura (20-95°C).....	40

Figura 5.8. (a) Espectros de fluorescência estática e (b) Tempos de vida de fluorescência do complexo XACb0032/XACb003341

Figura 5.9. Espectros de RMN do complexo XACb0032/XACb0033 com ATP (1:100) em região 4,0 a 9,0 ppm.....44

Figura 5.10. (a) Curva de espalhamento e (b) função $p(r)$ do complexo formado pelas proteínas XACb0032 e XACb0033.....46

Figura 5.11. Modelo “*bead model*” do complexo das proteínas XACb0032 e XACb0033 apresentado em três diferentes vistas.....47

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) e Cancro Cítrico

A *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é uma bactéria gram-negativa que parasita plantas cítricas. Suas características são respiração aeróbica, crescimento lento, formato de cocobacilo e locomoção flagelar, o que é importante para a sua adesão à célula hospedeira. A *Xac* também apresenta sistemas de secreção que permitem com 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 foi introduzida no Brasil em 1957 e atinge todas as variedades e espécies de citros. A planta atingida pelo cancro cítrico apresenta lesões salientes, o que não ocorre na maioria das outras doenças, sendo que os primeiros sintomas aparecem nas folhas e posteriormente nos frutos e ramos, e nestes em menor quantidade. 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 usadas pelo homem. Apresenta alto índice de contágio, uma vez que o patógeno penetra na planta através dos estômatos, lenticelas e também através de lesões causadas por insetos ou pelo homem. É uma bactéria altamente resistente, pois consegue sobreviver em diversos ambientes por vários meses ou até por anos e a única forma de eliminá-la é a erradicação das plantas contaminadas (Brunings e Gabriel, 2003).

Por estas razões, o cancro cítrico é considerado uma das mais graves doenças da citricultura brasileira e possui também grande importância econômica, uma vez que o Brasil apresenta o maior parque citrícola do mundo, e a laranja é um produto que atende cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais, trazendo anualmente mais de US\$ 1 bilhão em divisas para o Brasil, que está no centro de uma cadeia produtiva que gera PIB equivalente a US\$ 5 bilhões de dólares. Este setor emprega diretamente cerca

de 400 mil pessoas e é atividade econômica essencial de 322 municípios paulistas e 11 mineiros (<http://www.abecitrus.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, sendo eles plantas ou animais. A infecção começa 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 hospedeira (no caso dos sistemas do tipo III e IV), onde irão interferir no processo celular do hospedeiro, desempenhando assim 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 podem ser classificados em seis tipos diferentes, dependendo da forma como é realizada a translocação dos fatores de virulência para a célula hospedeira.

Dentre os seis tipos de sistemas de secreção, quatro deles utilizam o caminho de secreção geral (GSP - *General Secretory Pathway*), onde o transporte das proteínas através da membrana interna é realizado pelo sistema *sec*-dependente, no qual as proteínas a serem secretadas possuem uma sequência sinal na extremidade amino-terminal que será clivada no periplasma (Economou, 1999; Henderson *e col.*, 2004). Estes quatro sistemas são chamados de *sec*-dependentes (tipo V, chaperone/proteína da membrana externa, tipo II e tipo IV) e são classificados de acordo com a forma em que as proteínas a serem secretadas atravessam a membrana externa (Thanassi e Hultgren, 2000). Os outros caminhos de secreção são *sec*-independentes e são

O sistema do tipo IV pode funcionar como *sec*-dependente e também como *sec*-independente (Burns, 1999) e ele apresenta algumas similaridades com o sistema do tipo III, embora aparentemente eles não sejam relacionados. Estes dois sistemas possuem algumas características em comum, como por exemplo, ambos necessitam de contato físico com a célula hospedeira, requerem que uma chaperone secretória se ligue à proteína a ser secretada e espera-se que a exportação desta seja feita em somente uma etapa, via canal de secreção. Entretanto existe uma diferença fundamental entre eles: o sistema tipo IV pode exportar DNA simples fita e complexo DNA-proteína até a célula e não há nenhuma evidência de que o sistema do tipo III possa fazer o mesmo (Christie e Vogel, 2000).

1.2.1. Sistema de secreção do tipo III (TTSS)

O sistema de secreção do tipo III (TTSS – *Type Three Secretion System*) está relacionado com os componentes do sistema flagelar bacteriano (Plano e *col.*, 2001), sendo que um terço das proteínas que compõem a estrutura do TTSS são homólogas às proteínas constituintes da porção basal do flagelo (Hueck, 1998; Aizawa, 2001). Desta forma é possível que ele seja uma adaptação evolucionária do aparato flagelar, uma vez que na escala evolutiva a mobilidade tenha sido desenvolvida antes da virulência (Bennett e Hughes, 2000). O aparato flagelar confere mobilidade à bactéria, o que é importante para o processo de infecção, entretanto a formação do sistema de secreção permite que proteínas possam ser secretadas (Galán e Collmer, 1999).

O formato cilíndrico do TTSS é conhecido por ser parecido com uma agulha de injeção. Ele é composto por aproximadamente 20 proteínas e é considerado o mais complexo dentre os sistemas de secreção, permitindo a rápida e eficiente translocação das proteínas através do caminho: membrana interna, periplasma, membrana externa e finalmente membrana da célula eucariótica (Feldman e Cornelis, 2003). A formação e ativação do complexo

ocorrem quando a bactéria entra em contato com o hospedeiro (Galán e Collmer, 1999) e então todas estas barreiras são atravessadas de uma só vez pelo estreito canal de aproximadamente 30 Å, do citoplasma bacteriano para o citosol da célula eucariótica. Já dentro da célula eucariótica as proteínas chamadas de efetoras irão interferir nos processos celulares (Galán e Collmer, 1999; Feldman e Cornelis, 2003).

Para que todo esse processo possa ocorrer, as proteínas efetoras devem ser reconhecidas e a sua especificidade assegurada para que o substrato correto seja engajado na maquinaria de secreção. O estreito canal do sistema agulha mostra que para que o substrato seja reconhecido, ele deve estar em uma forma semi-desenovelada antes da secreção e ainda deve haver uma hierarquia na qual os diferentes substratos são selecionados. Para que tais características sejam atendidas, o mecanismo de reconhecimento do substrato envolve vários meios de sinalização, além do auxílio de proteínas acessórias (Smith e Hultgren, 2001; Galán e Wolf-Watz, 2006).

Neste sistema, a maioria das proteínas secretadas possui uma seqüência sinal localizada dentro dos primeiros 20-30 aminoácidos (Sory *e col.*, 1995; Schesser *e col.*, 1996), entretanto, diferentemente dos sistemas *sec*-dependentes, esta seqüência sinal não é clivada durante o processo de secreção (Galán e Wolf-Watz, 2006). No entanto, esta seqüência sinal não assegura a especificidade do substrato, sendo sugerido que as chaperones citosólicas as quais se ligam especificamente ao substrato desempenhem este papel (Wattiau e Cornelis, 1993; Feldman e Cornelis, 2003).

1.2.2. Chaperones de secreção (CS)

As chaperones dos sistemas de secreção, em geral, têm peso molecular menor que 20 kDa, pI geralmente ácido, podem interagir especificamente com uma proteína efetora e uma ou duas proteínas translocadoras, atuam como dímeros e se ligam a região amino-terminal da proteína cognata e possuem

hélice anfipática no C-terminal. Em geral estas são codificadas por genes localizados próximos aos genes que codificam as proteínas as quais elas irão se associar, o que ajuda na sua identificação (Cornelis e Van Gijsegem, 2000).

Esta família de proteínas não partilha similaridades significantes entre suas seqüências primárias, entretanto a estrutura cristalográfica de algumas delas mostra que elas apresentam estrutura terciária bem similar (Stebbins e Galán, 2003). Em geral as chaperones se ligam aos aminoácidos 50-100 da sua proteína cognata. Seu sítio de ligação é, então, logo após da seqüência sinal na extremidade amino-terminal (Schesser *e col.*, 1996; Woestyn *e col.*, 1996).

As estruturas tridimensionais obtidas através da co-cristalização da chaperone com a sua proteína efetora nos fornecem algumas informações sobre a função destas. Elas mostram que estas chaperones mantêm o seu domínio de ligação na proteína cognata em um estado parcialmente desenovelado, o que propicia à proteína efetora uma conformação e tamanho compatíveis com o tamanho do canal de secreção (Stebbins e Galán, 2001; 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) e mais uma função importante diz respeito ao encaminhamento do complexo chaperone/proteína efetora para a maquinaria de secreção, onde este processo é dirigido pela chaperone, pois a remoção do domínio de ligação da chaperone, em alguns dos complexos, previne a secreção da proteína cognata (Lee e Galán, 2004). Portanto, a seqüência sinal existente na proteína a ser secretada deve ser um sinal geral para a secreção e as chaperones devem conferir a especificidade necessária ao processo.

Além de reconhecer o complexo, a maquinaria de secreção tem de desfazê-lo, 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 na maquinaria de secreção, a proteína efetora encontra-se com o seu domínio efetor, que normalmente é localizado na extremidade carboxi-terminal, ainda enovelado (Luo *e col.*, 2001). A limitação no tamanho do canal de secreção exige que este domínio se encontre

desenvolvido para que seja possível a secreção (Galán e Wolf-Watz, 2006). Tem sido demonstrado que as ATPases associadas a maquinaria de secreção atuam de forma a ajudar no recrutamento e no processo de desenvolvimento da proteína a ser secretada, funções condizentes com a sua posição (IM, membrana interna) na estrutura do sistema de secreção. Estudos *in vitro* mostraram que a ATPase se liga tanto à chaperone sozinha, quanto ao complexo e estudos *in vivo* demonstraram que na presença de ATPase ocorre a dissociação do complexo e o desenvolvimento do domínio efetor da proteína efetora (Akeda e Galán, 2005; Muller *e col.*, 2006). Além destes fatores, essa atividade de desenvolvimento pode ser crítica no fornecimento de energia para o processo de secreção (Galán e Wolf-Watz, 2006). Um esquema representativo do modelo da secreção pelo TTSS assistido por chaperone está apresentado na Figura 1.2.

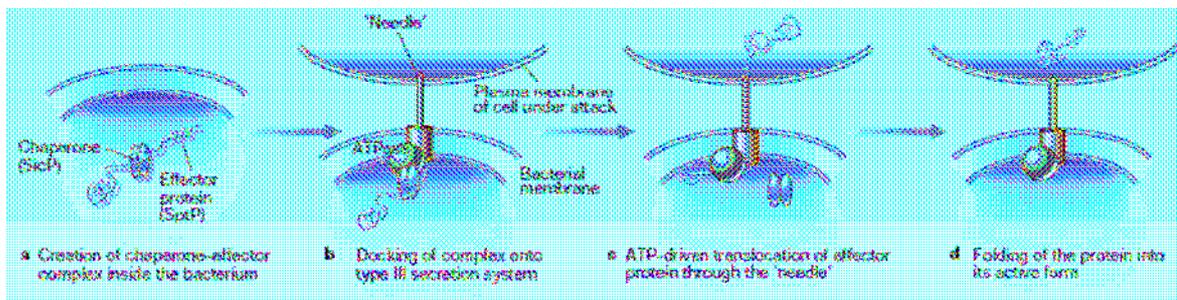


Figura 1.2. Modelo do TTSS assistido por chaperone em *Salmonella*. **a)** Criação do complexo entre a chaperone (SicP, azul) e a proteína de virulência (SptP, cinza) a ser injetada na célula alvo. **b)** O complexo se liga ao aparato do TTSS (vermelho), demonstrado aqui entre as membranas interna e externa da bactéria, com uma "agulha" passando para a membrana plasmática da célula sob ataque. **c)** A proteína efetora passa através da agulha para a célula sob ataque, com a utilização de ATP. **d)** A proteína efetora é enovelada na sua forma ativa dentro da célula sob ataque. Retirado de Smith e Hultgren, 2001.

1.2.3. Sistema de secreção do tipo IV (TFSS)

O sistema de secreção do tipo IV (TFSS - *Type Four Secretion System*) aparentemente não está relacionado com o sistema do tipo III e sim relacionado evolutivamente com os componentes da maquinaria de conjugação bacteriana. A transferência por conjugação através do envelope celular das bactérias gram-negativas é mediada por uma estrutura supramolecular denominada de formação do par conjugado (*Mating Pair Formation* – Mpf). Este complexo é formado por um canal responsável por estabelecer o contato entre as células e há a formação de um canal de conjugação por onde ocorre a translocação do DNA a ser transferido (Cascales e Christie, 2003). Os aspectos clínicos deste tipo de transferência são extremamente problemáticos, pois o DNA de uma bactéria é incorporado por outra, levando a rápida disseminação de genes resistentes a antibióticos e outros fatores de virulência entre as populações bacterianas (Burns, 1999; Christie, 2001).

O protótipo do TFSS é o sistema VirB/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), enquanto que o VirB1, se deletado, atenua a virulência e conseqüentemente a transferência de DNA (Berger e Christie, 1994) e mais um gene que codifica o VirD4 que é o receptor do substrato (Christie, 1997). VirB1 a VirB11 constituem as subunidades do Mpf e estas sozinhas formam a estrutura do canal. Quando juntas com VirD4, formam o canal de secreção transenvelope (Christie e col., 2005). A arquitetura molecular do TFSS está representada na Figura 1.3. e uma descrição detalhada do sistema foi realizada por Christie e colaboradores, 2005.

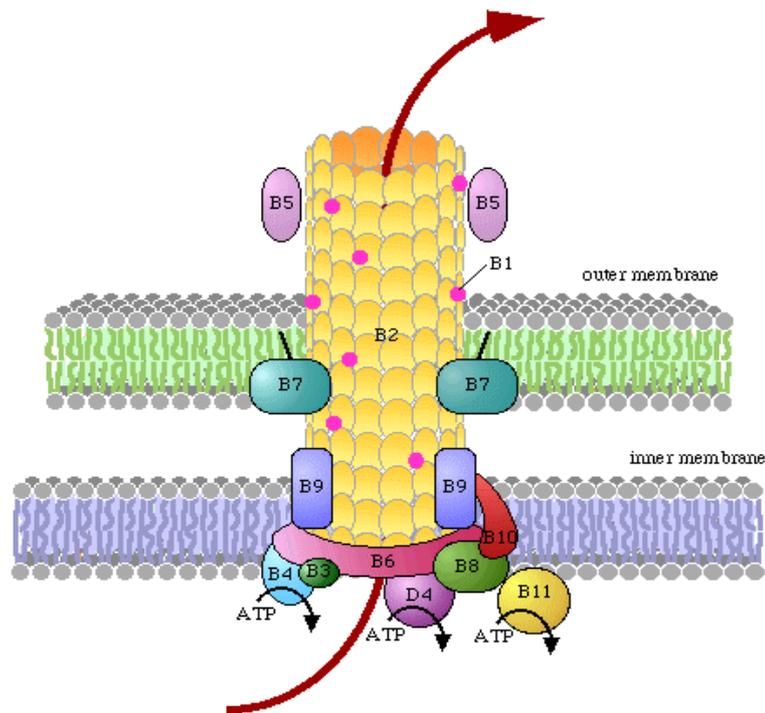


Figura 1.3. Esquema representativo do TFSS, onde: inner membrane - membrana interna; outer membrane – membrana externa e proteínas B1-B11 e D4 fazem parte do TFSS, conforme (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map03080.html>).

Este sistema de conjugação bacteriana, além de exportar T-DNA, exporta proteínas associadas ao DNA simples fita não ligadas covalentemente (Christie, 2001) e também somente proteínas, como no caso da proteína CagA de *Helicobacter pylori* (Stein e col., 2000) e a toxina pertussis de *Bordetella pertussis* (Winans e col., 1996). Em geral, a translocação do substrato é realizada em uma só etapa, não havendo a necessidade de um intermediário periplasmático, entretanto há uma exceção. Em *Bordetella pertussis* a toxina Ptl é exportada para o periplasma pelo caminho *sec*-dependente (Burns, 2003), ilustrando a versatilidade deste sistema.

Acredita-se que o transporte do substrato para a célula hospedeira necessite de energia para a biogênese do processo ou para o processo de transporte propriamente dito através da hidrólise de ATP. 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).

Em *Agrobacterium tumefaciens*, no caso da transferência de proteínas independentemente de DNA, uma chaperone (VirE1) deve estar envolvida mediando a transferência da proteína VirE2 (Deng e col., 1999), pois a VirE1 possui 7,5 kDa, é uma proteína ácida que interage diretamente com o domínio interno da VirE2 e evidências *in vivo* mostram que VirE1 estabiliza VirE2 e, também, previne que a VirE2 sofra agregação *in vitro* (Sundberg e Ream, 1999; Zhou e Christie, 1999). Reunindo as características citadas acima e as propriedades físicas de VirE1, pode-se perceber que ela se parece com as chaperones requeridas pelo sistema de secreção tipo III (Cheng e Schneewind, 2000). Desta forma, por analogia ao TTSS, a exportação de proteína independente de DNA via TFSS deve ser realizado primeiramente com a formação do complexo entre a proteína cognata e a sua chaperone (Christie e Vogel, 2000).

1.3. Genoma da *Xac* e o complexo das proteínas em estudo

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 genes que codificam sistemas secretórios dos tipos II, III e IV. O sistema do tipo II apresenta dois genes diferentes, um geral ao gênero *Xanthomonas* (*xps* - *Xanthomonas* protein secretion), e outro específico para *Xac*, (*xcs* - *Xanthomonas citri* protein secretion). Já o TTSS está localizado no cromossomo e é codificado por um grupo de 27 genes (da Silva e col., 2002).

Existem em seu genoma dois *loci*, ambos originalmente chamados de *virB*, que codificam distintos e independentes sistemas de secreção tipo IV, 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). Um cluster similar ao *locus virB* também foi encontrado no genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Os *loci virB* da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* apresentam fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* - ORFs) que codificam proteínas não caracterizadas anteriormente, sendo algumas somente encontradas no gênero *Xanthomonas* (da Silva e col., 2002).

Foram realizados ensaios de duplo-híbrido para estudar interações entre proteínas do TFSS 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 VirB de *Xac* como isca e a biblioteca genômica de *Xac* como presa, sendo encontradas várias interações entre os componentes do TFSS e proteínas hipotéticas codificadas pelos dois *loci virB*. Uma destas interações foi atribuída às proteínas XACb0032 e XACb0033 (Alegria e col., 2005). Os genes das proteínas hipotéticas XACb0032 e XACb0033 encontram-se entre os genes *trwC* e *virB1* do plasmídeo pXAC64 da *Xac* (Alegria e col., 2005) e a representação da localização destas proteínas no plasmídeo pXAC64 encontra-se na Figura 1.4.

A XACb0032 tem 108 aminoácidos na sua seqüência e possui ortólogos codificados nos genomas de *Azotobacter vinelandi*, *Chlorobium tepidum*, *Sinorhizobium meliloti*, *B. melitensis*, *Rickettsia conorii*, *Nitrosomonas europaea*, *Rhodospirillum rubrum* e *X. fastidiosa* (Alegria e col., 2005). A XACb0033, sua proteína parceira anteriormente descrita como possível chaperone do sistema secretório tipo IV, tem 72 aminoácidos (Kather e col., 2005) e possui ortólogos encontrados em *Nitrosomonas europaea*, *Rhodospirillum* e *X. fastidiosa*.

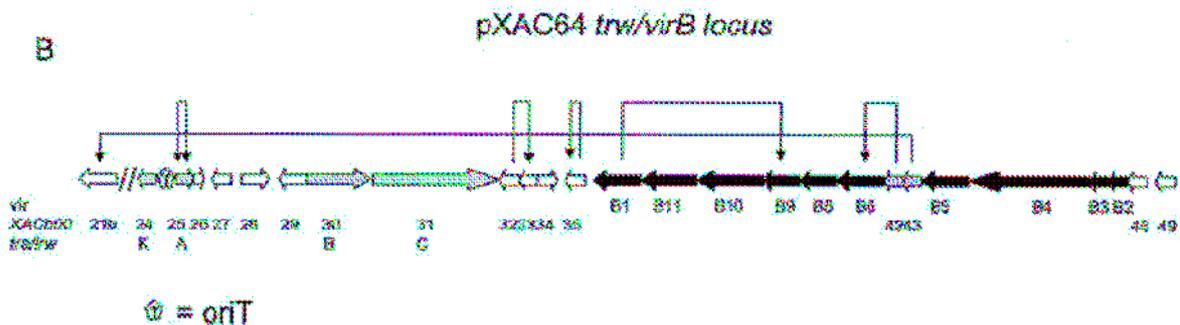


Figura 1.4. Representação do plasmídeo pXAC64 da *Xac*. Genes que codificam proteínas com funções desconhecidas estão indicados em branco, como é o caso da XACb0032 e XACb0033. As setas indicam interações observadas em ensaios de duplo-híbrido (isca → presa). Retirado de Alegria e colaboradores, 2005.

O domínio mínimo requerido na interação da XACb0032 corresponde aos resíduos 18 a 72 da XACb0033 (Alegria e col., 2005). As seqüências dos nucleotídeos e aminoácidos correspondentes às duas proteínas estão apresentadas na Figura 1.5.

XACb0032

(a)

ATGCGGGGTGACTTTGTGACCATCGCCATGCAAGGCGACTTCGGAAAACCAAGGC
CCGCTCTGGTGATCCAGGCCGACCAGTTTGACGCACACACCACCGTGACGGTGCT
GCCGGTGACAAGCACGCTCGTTGCTGCGCCGCTGCTGCGTATTACCGTTCATCCA
AGTACCGACAATGGTTTGCAGAAGCCGTCTCAGGTGATGGTGGACAAGGCCATGA
CCGTGAAGCGTGACAAGGTAGGTTCGAGCCTTTGGGCGCGTAGACGCTGATGCGTT
GGTGGAAATTGAGCGCTGCCTGGCCGTGTTCTTGGGCATCGCTAAGTGA

(b)

MRGDFVTIAMQDFGKPRPALVIQADQFDAQHTTVTVLPVSTLVAAPLLRITVHPSTDN
GLQKPSQVMVDKAMTVKRDKVGRAFGRVDADALVEIERCLAVFLGIAK

XACb0033

(c)

ATGGCACACGTCAATTCACGAGTTCAAAGCACCGCGACGCCCTGCGCATGGCAG
GGCTGCGTCCGGTGCAAATTTGGGTGCCGGACACACGGCGGCCTGACTTCGCCGA
GGAATGCCGCCGTCAAGTGTGCTTGTGCTGCACAAGCGGACATGGCGGATACCGAC
ATGCAGCGCTTCATGGATGAGGCGCTAGCAGACATGGATGGCTGGACGGAATGA

(d)

MAHVNSRVQKHRDALRMAGLRPVQIWPDRRPFDAEECRRQCRLAAQADMADTDM
QRFMDEALADMDGWTE

Figura 1.5. Seqüências dos nucleotídeos e aminoácidos das duas proteínas. (a) Seqüência dos nucleotídeos da XACb0032; (b) Seqüência dos aminoácidos da XACb0032; (c) Seqüência dos nucleotídeos da XACb0033; (d) Seqüência dos aminoácidos da XACb0033 (<http://watson.fapesp.br/Xantho/Main.htm>).

O entendimento das estruturas tridimensionais das proteínas envolvidas no mecanismo de translocação (proteínas efetoras e chaperones) é essencial para que o mecanismo de virulência da *Xac* seja esclarecido, uma vez que proteínas de virulência com estrutura tridimensional 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).

Entender a estrutura de uma proteína é muito importante para que se possa decifrar a sua função. Estas moléculas exibem uma enorme variedade de funções biológicas e são o instrumento molecular através do qual a informação genética é expressa. Elas são polímeros formados pelos aminoácidos e não exibem estruturas uniformes, porém examinando-se a forma em como estes aminoácidos estão dispostos, podem-se entender as propriedades físicas e químicas e como consequência, seus mecanismos de ação nos seres vivos (Voet e col., 2000). As proteínas apresentam níveis de organização na sua estrutura, sendo: a estrutura primária, que consiste na seqüência dos aminoácidos, e que no caso das nossas proteínas foi obtida através da análise do genoma da *Xac* por bioinformática e está representada na Tabela 1.1. A estrutura secundária representa o arranjo espacial dos átomos de um esqueleto polipeptídico sem levar em consideração a conformação de suas cadeias laterais e inclui padrões regulares de enovelamento, como as α -hélices, folhas β e também estruturas que não possuem padrão (randômica), em que a estrutura secundária de uma proteína é estudada com o auxílio da técnica de dicroísmo circular. A estrutura terciária descreve o enovelamento dos elementos estruturais secundários e especifica as posições de cada átomo da proteína, incluindo as cadeias laterais e a estrutura quaternária, na qual as subunidades protéicas associam-se com uma geometria específica e de modo não-covalente apresentando um arranjo espacial específico. Os estudos destas estruturas são realizados utilizando as técnicas de fluorescência, onde o triptofano é utilizado como sonda, técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), onde é possível obter o envelope protéico e pelas técnicas de ressonância magnética

nuclear (RMN) ou cristalografia de raios-X que são as únicas utilizadas em análises de estrutura no nível atômico (Voet e col., 2000).

1.4. Análises espectroscópicas

Existem várias técnicas que permitem a análise espectroscópica de proteínas em solução, entre elas foram utilizadas neste trabalho dicroísmo circular (CD), emissão de fluorescência (estática e dinâmica), ressonância magnética nuclear (RMN-SDT) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Estas técnicas serão comentadas a seguir.

1.4.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD), na região do UV-distante (180 a 240 nm), é uma técnica utilizada em análises da estrutura secundária de proteínas em solução devido à quiralidade destas moléculas. 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 a responsável por esta diferença na absorção. Os átomos da ligação peptídica podem interagir com os átomos de outras ligações peptídicas originando a estrutura secundária da proteína, assumindo arranjos helicoidais em determinados trechos de sua seqüência de aminoácidos. Estas formas regulares dos arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada resultando na obtenção dos espectros de CD como função de elipticidade (graus) versus comprimento de onda (Kelly e Price, 1997; Rodger, 1997). Cada tipo de estrutura secundária: predominantemente α -hélice; predominantemente folha β ; $\alpha+\beta$ (regiões α e β separadas); α/β (região α e β misturadas); randômica (predominantemente desordenada) apresenta um tipo de espectro de CD (Levitt e Chothia, 1976; Rodger, 1997) (Figura 1.6.). Através desta técnica pode-se dizer se estão ocorrendo mudanças na conformação da

proteína e, em caso positivo, correlacioná-las com as características do meio circundante. Podemos 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.

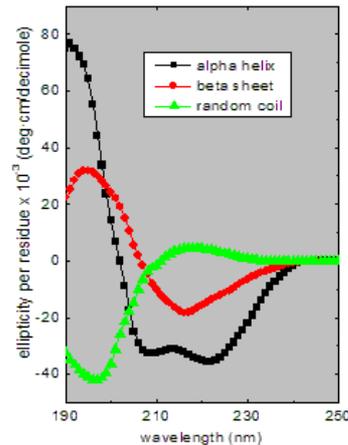


Figura 1.6. Espectros de CD característicos para proteínas com estruturas de: α -hélice (preto); predominantemente folha β (vermelho); e randômica (verde).

1.4.2. Emissão de fluorescência: estática e tempo de vida

O fenômeno de fluorescência consiste na absorção de energia pelos elétrons de um fluoróforo (molécula fluorescente), passando do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1). Para que esta molécula volte o estado fundamental esta energia deve ser perdida. No caso da fluorescência, essa energia é emitida em forma de luz, mas esta não é a única forma, havendo também perdas de energia na forma de calor, processos químicos e vibracionais. Por este motivo, a energia emitida em forma de luz é menor do que a energia absorvida, como pode ser verificado através dos espectros de excitação e emissão, onde o comprimento de onda da luz absorvida é menor do que o comprimento de onda no espectro da luz emitida (Lakowicz, 1983).

Tipicamente as moléculas fluorescentes possuem elétrons deslocalizados em ligações duplas conjugadas (moléculas aromáticas). Assim, a espectroscopia de fluorescência de emissão é utilizada nos estudos conformacionais das proteínas, utilizando como sondas aos resíduos aromáticos: tirosina, fenilalanina e triptofano. Este último (Trp, W) é considerado o mais importante e utilizado nesta técnica, pois não é abundante, facilitando a interpretação dos espectros, possui alto rendimento quântico e pode ser excitado sem a interferência dos outros dois aminoácidos, tirosina e fenilalanina. Ele também apresenta uma absorção por volta de 280 nm e uma emissão por volta de 340 nm, sendo que a sobreposição das bandas de emissão e de absorção é pequena, refletindo a mudança de geometria que ocorre com a molécula quando o grupo indol do triptofano é excitado eletronicamente. Este grupo é altamente sensível ao ambiente local, apresentando diferentes características de emissão de fluorescência dependendo do grau de exposição ao meio hidrofílico ou hidrofóbico. Assim, o resíduo de triptofano encontra-se mais exposto ao solvente, ele possui máximo de emissão em torno de 350-355 nm, pois necessita despende uma maior quantidade de energia para reorganizar as moléculas de água que estão a sua volta e quando está no estado nativo (resíduo não exposto) em torno de 335 nm, pois não é necessário haver gasto de energia na reorganização das moléculas de água (Lakowicz, 1983). Por estas características, a técnica permite o estudo de mudanças conformacionais em proteínas e o estudo das interações entre proteínas com outras moléculas (Lakowicz, 1983).

1.4.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é sem dúvida uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas aplicada aos estudos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. A RMN de hidrogênio-1 (^1H RMN) vem sendo o mais aplicado não só na química e na física, mas também na

medicina, biologia e agricultura. Novos conceitos em RMN são continuamente descobertos e acompanhados pelo avanço tecnológico dos espectrômetros (Grant e Harris, 1996).

Vários processos biológicos podem ser inibidos ou promovidos pelas interações entre as proteínas e as moléculas pequenas. Por exemplo, as chaperones secretórias do tipo III ou IV, alvo deste estudo, reconhecem as proteínas a serem transportadas e se ligam a elas, deixando-as em uma conformação parcialmente desenovelada. Aparentemente, a atividade ATPásica de uma das proteínas do sistema de secreção (ATPase) é necessária para que o complexo de chaperone-proteína alvo se dissocie e para que a proteína alvo fique na conformação compatível com o tamanho do canal de secreção para que esta possa ser transportada (Bennett e Hughes, 2000). Sendo assim, o processo de infecção provocado pela *Xac* deve ser controlado pelas interações chaperone/proteína efetora/ATP.

A RMN demonstrou que é possível detectar e quantificar estas interações com alta sensibilidade sem o conhecimento prévio da função da macromolécula (Hajduk *e col.*, 1997). Algumas metodologias monitoram as mudanças nos deslocamentos químicos das macromoléculas e são de difícil realização na ausência de proteínas marcadas isotopicamente. Isso faz com que o estudo das propriedades dos ligantes seja mais apreciado, pois fornece espectros de RMN simplificados e de melhor resolução em comparação com os espectros das macromoléculas. Existem muitos métodos baseados na detecção dos ligantes, entre eles, os baseados na transferência de efeito Overhauser nuclear (NOE), que são experimentos que detectam o ligante com constante de dissociação (K_d) na faixa de 10^{-3} - 10^{-8} M e fornecem seu epítipo, como por exemplo STD (*Saturation Transfer Difference*) (Mayer e Meyer, 2001), WaterLOGSY (*Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy*) (Dalvit *e col.*, 2001) e NOE pumping (Shapiro e Chen, 2000) além do experimento DOSY-NOESY (*Diffusion-Ordered NOESY*) que fornece também o epítipo da proteína (Gozansky e Gorenskin, 1996).

O experimento de STD é sem dúvida, o mais popular dos experimentos de transferência de NOE, provavelmente, por ser o mais sensível, rápido, além de fornecer o epítipo da ligação do ligante e as constantes de dissociação dos complexos. Este método está baseado na transferência de magnetização da proteína para os ligantes através da saturação seletiva de um sinal da proteína. Os hidrogênios do ligante que estiverem próximos à proteína serão saturados através da difusão de spin fornecendo sinais do espectro de STD (Mayer e Meyer, 2001). A única desvantagem deste experimento é que ao analisar misturas de proteínas com peptídeos a irradiação da proteína pode atingir também o peptídeo fornecendo resultados falsos.

1.4.4. Espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (ângulos menores que 3-5°) tem sido bastante utilizada nos últimos anos no estudo de proteínas em solução. O espalhamento de raios-X a baixo ângulo é um processo de espalhamento elástico que ocorre quando o feixe de raios-X atravessa a amostra e interage 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. E estes, por consequência, permitem a construção de modelos do envelope molecular, onde podem ser obtidas informações sobre as estruturas terciárias e quaternárias da macromolécula sem detalhes do nível atômico (Glatter, 1982; Svergun, 1999).

A técnica de SAXS fornece informações estruturais sobre as inhomogeneidades da partícula com dimensões características de dez a algumas centenas de ângstrons (Å). As inhomogeneidades ou flutuações na densidade eletrônica são tidas como centros espalhadores e supondo que os centros espalhadores estão no vácuo, a amplitude do espalhamento é proporcional ao número de moles 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 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 exigindo 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 maior em relação aos raios-X obtidos de forma convencional propiciando um melhor padrão de espalhamento em condições experimentais adequadas, tornando possível registrar esses casos de contraste fraco com maior eficiência (Zhang e col., 1994).

O tratamento matemático dos dados de SAXS consiste primeiramente em uma análise prévia, em que é construída a curva de espalhamento $I(q)$ versus q , onde q é o vetor de espalhamento, $q = (4\pi/\lambda)\text{sen}\theta$, sendo λ o comprimento de onda utilizado e 2θ o ângulo de espalhamento. A linearização desta curva (aproximação de *Guinier*) traz informações sobre a monodispersividade do sistema e sobre o raio de giro (R_g) que é um parâmetro dimensional. Se o sistema é monodisperso é feita a transformada de *Fourier* da curva de espalhamento gerando outro gráfico que contém as mesmas informações, no entanto ele possui um formato mais intuitivo. Isto é feito pelo programa GNOM (Svergun, 1991) e o gráfico obtido é o $P(r)$ versus r , onde $P(r)$ é a distribuição dos pares de distância de elétrons. Este gráfico fornece informações mais analíticas sobre os parâmetros dimensionais R_g e dimensão máxima ($D_{\text{máx}}$) (Glatter, 1982). A área desta curva é proporcional a intensidade de espalhamento quando $q = 0$, ou seja, a $I(0)$ e a intensidade de espalhamento $I(0)$ é um dado importante, pois através deste valor é possível obter informações aproximadas sobre a massa da macromolécula através de uma relação em que $I(0)$ é proporcional a concentração da macromolécula vezes a sua massa. Para que este cálculo aproximado da massa possa ser realizado, utiliza-se um padrão

de massa externo, no caso das proteínas, albumina de soro bovino (BSA) ou lisozima (Svergun e Koch, 2003).

Na construção dos modelos *ab initio* são utilizados os programas computacionais idealizados por Glatter e o modelo final deve ajustar-se as curvas de espalhamento. Ele contém informação sobre as regiões de maior densidade eletrônica na molécula de proteína, sendo possível a construção do seu envelope molecular. Existem alguns programas, entre eles o DAMMIN que faz a modelagem *bead model* (Svergun, 1999).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi caracterizar estruturalmente o complexo de proteínas hipotéticas XACb0032/XACb0033, onde a XACb0033 foi anotada como possível chaperone do TFSS. A determinação da interação entre estas proteínas poderá indicar os mecanismos de virulência envolvendo sistema secretório tipo IV da *Xac*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Expressão das proteínas

As ORFs referentes às proteínas XACb0032 e XACb0033 foram anteriormente (no projeto de pós doutoramento de Ljubica Tasic e na tese de doutorado de Letícia Khater) clonadas no vetor de expressão pET23a (Novagen) e transformadas em cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) pLysS, conforme descrito em Tasic e colaboradores, 2006 e 2004.

3.1.1. Sistema de expressão pET

O vetor de expressão utilizado foi o pET23a que é controlado pelo sistema T7 (Studier e col., 1990). A expressão do DNA alvo é realizada somente na

presença da RNA polimerase do vírus T7. Então foi utilizada a cepa de bactéria *E. coli* BL21(DE3) (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 promotor lacUV5 do operon *lac*, que está reprimido na presença da D-glicose e na ausência do seu indutor natural, lactose.

O produto do gene *lac I* é um repressor que, quando ligado ao operador O, impede a expressão da T7 RNA polimerase impossibilitando a transcrição do DNA alvo. Entretanto, na presença de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), que é utilizado como indutor por ser análogo ao indutor natural, o repressor se desliga do operador O, pois o indutor se liga a ele e muda a sua conformação, permitindo a expressão da T7 RNA polimerase, o que por consequência, possibilita a transcrição do DNA alvo. A T7 RNA polimerase passa a ser produzida 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 *et al.*, 1990).

3.1.2. Linhagens de *E. coli*

A linhagem de *E. coli* utilizada para manutenção e multiplicação de vetores plasmidiais foi a DH5 α . A cepa de bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene) foi utilizada para expressar as proteínas de interesse. Esta cepa possui baixos níveis de produção de proteases, que poderiam degradar as proteínas alvo e apresenta expressão aumentada de lisozima que inibe a T7 RNA polimerase, regulando a expressão da proteína de interesse. Esta linhagem pode ser utilizada quando a proteína alvo se apresenta tóxica para a bactéria. A cepa de bactérias *E. coli* BL21(DE3) Códon Plus RP (Stratagene), além das características descritas acima, exceto a expressão aumentada de lisozima,

possui também suplementação de RNA transportadores para códons raros de arginina (R) e prolina (P), pois estes são pouco freqüentes nas bactérias o que pode reduzir ou parar a tradução.

3.1.3. Meio de cultura LB (Luria – Bertani)

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 µg/mL, de modo a selecionar as colônias que continham o DNA alvo.

3.1.4. 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 (tris-HCl 1,5 M, pH 8,8); 2,3 mL de água (MilliQ); e 100 µl de solução de SDS (10%). Os catalisadores da polimerização foram o persulfato de amônio (100 µL, 10 %, APS) e o N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamino (4 µL TEMED). O gel de empacotamento (3 mL) foi composto por 2,10 mL de água (MilliQ); 0,50 mL da solução de acrilamida e bis-acrilamida (30 %); 0,38 mL de tampão de gel (tris-HCl 1,5 M, pH 6,8); 30 µl de SDS (10 %); 30 µL de APS (10 %) e 3 µL de TEMED.

A composição do tampão de amostra para eletroforese foi de tris-HCl (50 mM, pH 6,8); ditionotretiol (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: primeiramente foi aplicada a voltagem de 80 V por aproximadamente 15 minutos e, em seguida, uma voltagem de 200 V por aproximadamente 40 minutos. No caso do acompanhamento da expressão e a lise, foram aplicados 3,0 µL de amostra enquanto que 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* a 50°C e descorado em ácido acético/etanol/água (3/2/3, v/v/v) durante 40 minutos, à temperatura ambiente.

3.1.5. Transformação

Utilizou-se no procedimento de transformação por eletroporação aplicando as instruções do fabricante, eletroporador *MicroPulser™ Eletroporation Apparatus (Bio-Rad)*. Para cada 500 µL de células competentes (Sambrook e Russell, 2001) foi adicionado 1 µL de DNA referente a proteína ou de cada proteína em questão na co-expressão. 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 (10 mL do meio SOB + MgCl₂ (50 µL, 2M) + glicose (200 µL, 1M) e incubou-se a 37°C a 200 rpm por 1 hora. Após este período, a mistura foi plaqueada (200 µL) em meio LB contendo os antibióticos ampicilina (50 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL).

3.1.5.1. XACb0032

Foi realizada a transformação do DNA plasmidial correspondente à proteína XACb0032 em células competentes da linhagem *BL21(DE3) Códon Plus RP* de *E. coli*, conforme descrito no item 3.1.5.

3.1.5.2. Complexo de proteínas XACb0032/XACb0033

Os DNAs plasmidiais referentes às proteínas XACb0032 e XACb0033 foram co-transformados em células competentes da linhagem BL21(DE3)plysS de *E. coli*, conforme descrito no ítem 3.1.5. Neste caso foram utilizados 1 µL de DNA referente à proteína XACb0032 e 1 µL de DNA referente à proteína XACb0033.

3.1.6. Indução

Os procedimentos da indução realizados tanto para a XACb0032 como para o complexo estão descritos em seguir. Foi preparado o pré-inóculo, onde uma colônia, produto da transformação, foi escolhida ao acaso e inoculada em meio LB líquido contendo antibióticos (50 µg/mL, ampicilina, cloranfenicol) a 37°C, 200 rpm por 16 horas. Após este período, adicionou-se 5,0 mL do pré-inóculo a 0,5 L de meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos e o crescimento das bactérias foi conduzido a 37°C, 200 rpm. A expressão da XACb0032 e a co-expressão das XACb0032/XACb0033 foram induzidas por IPTG (1 mM) quando a absorbância em 600 nm encontrava-se entre 0,6 - 0,8 unidades de absorbância. Amostras induzidas foram deixadas a 37°C, 200 rpm por 16 horas. No caso da co-expressão, primeiramente este procedimento foi realizado em pequena escala (mini-indução – 50 mL de meio LB) para que fosse possível verificar as melhores condições para se obter uma melhor eficiência na indução e no caso do complexo, selecionar as colônias que continham os dois insertos. Posteriormente, foi realizado um aumento na escala de indução.

Após a indução, as culturas de células foram centrifugadas a 14000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e as células armazenadas a – 80°C para posterior lise e purificação. A análise da indução foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).

A análise da indução foi feita retirando-se alíquotas de 1,5 mL de cultura antes da adição do IPTG (amostra não induzida) e após 1 h, 2 h, 3 h, e 16 h da indução (amostras induzidas). Estas amostras foram submetidas à centrifugação de 14000 x g por 2 minutos, e o precipitado foi suspenso em 30 µL de água e 30 µL de tampão de amostra. O DNA das amostras foi quebrado mecanicamente utilizando-se sonicador (*Sonifier 450- Branson*) e em seguida, as amostras foram mantidas a 100°C durante 5 minutos e centrifugadas a 14000 x g durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

Utilizou-se eletroforese de proteínas em géis de SDS-PAGE (15 %) na análise qualitativa das amostras. Estas (3 µL) foram aplicadas no gel de empacotamento e as proteínas separadas no gel de resolução.

A análise dos géis foi feita comparando-se as bandas das amostras coletadas antes da adição do IPTG (amostras não induzidas) com as bandas das amostras coletadas após a adição do IPTG (amostra induzida). Para identificar o tamanho da banda correspondente à proteína induzida, utilizou-se marcador de massa molecular de proteínas como padrão o *Low Range* (Sigma-Aldrich).

3.2. Purificação

3.2.1. Lise bacteriana

Os procedimentos de lise bacteriana das células obtidas por indução da XACb0032 e, também, por co-expressão das proteínas XACb0032/XACb0033 estão descritos em seguir. As células bacterianas foram suspensas em tampão de lise contendo tris-HCl (50 mM, pH 8,0), cloreto de sódio (NaCl, 50 mM) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 10 mM) aplicando 15 mL desta solução por 1 L de cultura. As células, então, foram lisadas por sonicação no sonicador *Sonifier 450 (Branson)* e logo centrifugadas a 14000 x g, por 30 minutos, a 4°C. A análise do resultado da lise foi feito por gel SDS-PAGE (15 %). Verificou-se que após a lise das células bacterianas referentes à expressão da XACb0032, esta

não se encontrava no sobrenadante e sim no corpo de inclusão. Já na lise das células bacterianas referentes à co-expressão, a presença do complexo se dá no sobrenadante.

3.2.2. Lise do corpo de inclusão (XACb0032)

O corpo de inclusão contendo a proteína XACb0032 foi suspenso em tampão de lise e foi realizada a adição lenta de solução de uréia 10 M até a concentração final de 8 M. O solubilizado, depois de centrifugado, foi diluído lentamente sob agitação branda com tampão. Após diluição, a solução de 4 M de uréia foi dialisada a 4°C contra 4 L do mesmo tampão já utilizado, durante aproximadamente 16 h. Após diálise, a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 30 min, a 4°C, para a remoção de precipitado (Ribeiro *et al.*, 2003). Os tampões utilizados na tentativa de solubilização foram: tampão fosfato (100 mM, pH 8,0) e tampão acetato (100 mM, pH 3,0). O resultado foi visualizado por gel SDS-PAGE (15 %).

3.2.3. Purificação do complexo de proteínas

A purificação do complexo de proteínas XACb0032/XACb0033 foi feita em duas etapas, utilizando as técnicas cromatográficas de troca iônica (DEAE) e exclusão molecular por gel filtração. Primeiramente, o sobrenadante das amostras, após a centrifugação, foi filtrado com seringa estéril (filtro de 0,22 µm). 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, a condutância e a pressão.

3.2.3.1. Cromatografia de troca aniônica (DEAE)

O ponto isoelétrico teórico do complexo de proteínas foi estimado pelo programa ProtParam Toll (ca.expasy.org/tools/protparam.html) e este valor foi de 6,26. Portanto foi utilizada a coluna dietilaminoetil celulose - DEAE (DEAE-celulose, $\text{CELULOSE-O-CH}_2\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2^+$) (GE) utilizando tampão fosfato (100 mM, pH 8,0) e gradiente de cloreto de sódio (0-100 %, 1 M). A coluna cromatográfica utilizada contenha 45 mL de DEAE e foram aplicados 5,0 mL de amostra. O fluxo foi mantido a 1,0 mL/min e foram coletadas aproximadamente 20 frações com volume de 3,0 mL cada, sendo que o complexo de proteínas foi encontrado nas frações eluídas com 40 e 50 % de NaCl (1 M). As frações correspondentes aos picos no cromatograma foram analisadas através de eletroforese (SDS-PAGE) para verificar quais frações apresentavam maior grau de pureza.

3.2.3.2. Cromatografia de exclusão molecular por gel filtração

As frações mais puras foram então dialisadas contra um volume de 4 L de tampão fosfato (100 mM, pH 8,0) e NaCl (100 mM) a 4°C por 16 horas. A amostra foi concentrada utilizando o sistema *Amicon Ultra 10.000 MWC* segundo as especificações do fabricante (4°C, centrifugação a 9000 x g por 15 minutos) e novamente purificada utilizando a cromatografia de exclusão molecular, coluna Superdex 200 - GE de 320 mL. Foram aplicados 5,0 mL da amostra, o fluxo de tampão (tampão fosfato - 100 mM, pH 8,0 e NaCl - 100 mM) foi mantido a 2,5 mL/min e seu volume utilizado foi correspondente a 1,5 vezes o volume da coluna. Foram coletadas aproximadamente 10 frações com volume de 1,0 mL cada e as frações que apresentaram pico no cromatograma foram analisadas através de eletroforese (SDS-PAGE).

3.2.4. Complexo puro

Após a obtenção do complexo puro, as frações foram dialisadas contra o tampão mais favorável, tampão fosfato (100 mM, pH 8,0) ou tris-HCl (5 mM, pH 8,0) a ser utilizado nas análises espectroscópicas realizadas e então concentradas utilizando o sistema *Amicon Ultra 10.000 MWCo* segundo as especificações do fabricante.

Estes procedimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos, pois o Instituto de Química ainda não possui o certificado de biossegurança necessário para tais fins.

4. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

Uma vez obtido o complexo de proteínas puro, partiu-se para a análise espectroscópica do mesmo.

4.1. Determinação da concentração

A concentração do complexo 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 $\mu\text{g/mL}$. Adicionou-se 800 μL do reagente de Bradford (100 mg de *Coomassie brilliant blue G-250*, 50 mL de etanol 95 % (v/v), 100 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85 % (v/v) em 1 L de água), e completou-se o volume para o total de 900 μL utilizando NaCl (1 M). Após a reação (5 min), a absorbância a 595 nm foi determinada em duplicata. As amostras do complexo puro foram submetidas ao mesmo procedimento, e dependendo do caso, diluídas para que fosse possível a interpolação dos dados na curva analítica.

4.2. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Na aquisição dos espectros, utilizou-se o espectropolarímetro J-720 (Jasco), cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm e a concentração do complexo foi em torno de 5,0 μM em tampão tris-HCl (5 mM, pH= 8,0). Os espectros de CD foram coletados em temperatura de 20°C, mantida por meio de um controlador de temperatura Peltier Type Control System PFD4255. Os espectros foram obtidos no intervalo do ultravioleta distante entre 200 a 260 nm, obtendo-se 4 coletas cumulativas com velocidade de 20 nm/min e tempo de resposta do detector de 2 segundos.

O ensaio de desenovelamento térmico foi monitorado na região de 200 a 260 nm e as condições foram as mesmas utilizadas na aquisição do espectro de

CD mencionadas acima, entretanto programou-se a temperatura para variar de 20 a 95 °C a uma taxa de 60°C/h.

Os programas utilizados para registro e o tratamento dos dados foram Spectra manager[®] (JASCO) e Origin[®] versão 6.0 (Microcal).

Os valores obtidos na leitura em mgraus (θ) foram convertidos para elipticidade molar médio ($[\theta]_{mrw}$) de acordo com a equação: $[\theta]_{mrw} = (\theta * MM)/(c * L * n)$ sendo, θ - 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 α -hélice foi feito segundo a equação descrita por Chen e colaboradores (1974) e também pelos programas DICROPROT (Deléage e col., 1993), onde foi verificado o conteúdo de α -hélice e K2D (Andrade e col., 1993), onde pode-se calcular também o conteúdo de folha- β e estrutura randômica.

4.3. Emissão de fluorescência estática

O fluorímetro utilizado nos experimentos foi o Aminco Bowman[®] Series 2 (Slm-Aminco). Os espectros de fluorescência estática foram obtidos a temperatura ambiente em comprimento de onda de excitação 295 nm, fendas de excitação e emissão de 8 mm e varredura entre 300 a 400 nm. Utilizou-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm e a concentração do complexo de 2 a 4 μ M. O tampão utilizado nas amostras e conseqüentemente na subtração do branco foi o tris-HCl (5 mM, pH 8,0). Os programas utilizados no registro dos dados foram o SLMAB2 (Slm-Aminco) e Origin[®] versão 6.0 (Microcal[™]).

4.4. Tempo de vida de fluorescência

As medidas do tempo de vida de fluorescência foram feitas no intervalo de 4 a 200 Hz, utilizando-se um fluorímetro de modulação de fase com correlação cruzada e multi-frequência (ISS K2). A excitação foi feita a 295 nm e a emissão foi observada de um filtro óptico de 310 nm (Edmond Industrial Optics). Utilizou-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm e a concentração do complexo de 2 a 4 μM . O tampão utilizado nas amostras e conseqüentemente na subtração do branco foi o tris-HCl (5 mM, pH 8,0). Utilizou-se Ficoll 400 como padrão cujo tempo de vida é de 0 ns.

4.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN de hidrogênio (RMN de ^1H) e de transferência de saturação, *Saturation Transfer Difference* (STD-NMR), foram utilizados para o monitoramento do ligante e para tal utilizou-se o espectrômetro de RMN de 500 MHz (Varian, INOVA 500 MHz) equipado com uma sonda tripla de detecção inversa (tri_res, $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$) e de 5 mm. Utilizou-se o programa da Varian na aquisição e no processamento dos dados e Xmaneger 2.0 (nmrsun) (http://www.download.com/3000-2155_4-10521296.html). As amostras do complexo foram preparadas em água deuterada (D_2O , Sigma Aldrich) para concentração final de 10 μM . Os ligantes ATP e ADP foram adicionados em concentrações de 1 mM, para que houvesse um excesso de ligante de 100 vezes. A supressão do sinal da água residual (HDO) foi feita através de um pulso de WATERGATE (Piotto e col., 1992). Nos experimentos de STD-NMR utilizou-se a irradiação em -0,15 ppm e, fora de ressonância, em 30 ppm, onde nenhum sinal do complexo está presente. O tempo de saturação foi de 2 s. O espectro foi referenciado com sinal da água em 4,78 ppm.

4.6. Espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS)

Os experimentos foram realizados em julho de 2006 e 18 de janeiro de 2007 na linha SAXS2 do LNLS (D11A-SAXS1 # 5030/06 e D02A-SAXS2 # 5685/06, respectivamente). O comprimento de onda utilizado foi de $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ e distância amostra-detector foi de 1,1 m ($D = 1101 \text{ mm}$). A preparação das amostras foi realizada da seguinte forma: depois de obtido o complexo de proteínas puro, o mesmo foi dialisado contra tampão fosfato (100 mM, pH 8), pois verificou-se que neste tampão o padrão de espalhamento obtido foi melhor em relação ao outro tampão testado (tampão tris-HCl, 5 mM, pH 8). A concentração do mesmo foi determinada, conforme descrito no Item 4.1. e esta foi de 5,99 mg/mL. Esse complexo foi estudado sozinho, com a adição de ATP e com a adição de ADP. Os ligantes ATP e ADP foram adicionados em igual concentração a do complexo (mol/mol). O controle negativo do experimento (branco) também foi feito diluindo-se o ligante ATP e ADP no mesmo tampão utilizado para as amostras e em igual concentração. Utilizou-se como padrão externo a lisozima, que foi diluída no mesmo tampão, mas na concentração de 1 mg/mL.

O módulo do vetor espalhamento (q) foi calculado de acordo com a relação $q = (4\pi/\lambda)\text{sen}\theta$, sendo λ o comprimento de onda utilizado e 2θ o ângulo de espalhamento. A monodispersividade do sistema foi confirmada pelos gráficos de *Guinier* (Glatter, 1982) e a massa molecular foi calculada utilizando o padrão de lisozima. Os dados foram analisados pelo programa computacional GNOM (Svergun, 1991) e a construção do modelo *ab initio* foi realizado pelo programa DAMMIN (Svergun, 1999).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. XACb0032

5.1.1. Expressão da proteína

A proteína XACb0032 apresentou problemas na expressão em cepas BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS. Realizou-se então, a transformação do pET23a - XACb0032 na cepa BL21(DE3) RP códon plus, solucionando assim este problema de expressão. A melhor condição para indução foi observada a 37°C após 2 horas, pois após este tempo a proteína começa a degradar, conforme pode ser visto na Figura 5.1.a (3h e 16h). Entretanto, após a lise celular e desenovelamento/reenovelamento com uréia, esta proteína mostrou-se insolúvel em diversas condições (diferentes tampões e pH), não sendo possível purificá-la (Figura 5.1.b).

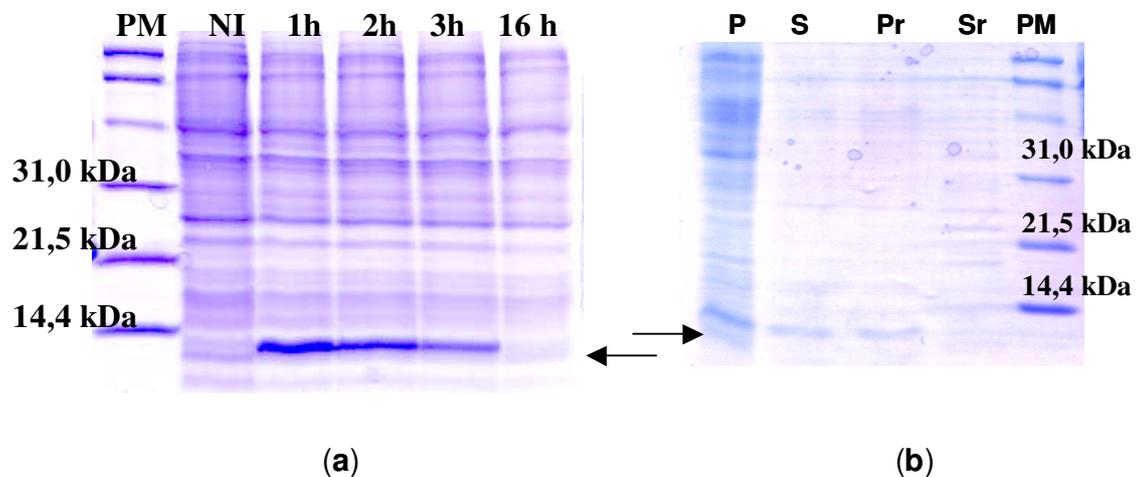


Figura 5.1. Gel SDS- PAGE (15 %): (a) Expressão da XACb0032 em cepa BL21(DE3) RP códon plus. PM - padrão de peso molecular de proteínas. NI - amostra não induzida; amostras 1h, 2h, 3h e 16h após a adição de IPTG (1 mM). (b) Lise da XACb0032, onde: P - pellet, S - sobrenadante, Pr - pellet e Sr - sobrenadante após desenovelamento/reenovelamento com uréia.

5.2. Complexo XACb0032/XACb0033

5.2.1. Co-expressão das proteínas

A co-expressão das proteínas foi feita em cepas de *E.coli* BL21(DE3) *pLysS* e a melhor condição encontrada para a indução foi observada a 37°C após 18 horas (Figura 5.2.a). As proteínas foram isoladas das células das bactérias através da lise celular e foi possível observar, através de eletroforese em gel de acrilamida, que o complexo das proteínas, XACb0032 e XACb0033, diferentemente da proteína XACb0032 sozinha, encontrava-se no sobrenadante e, portanto solúvel e com massa de aproximadamente 28 kDa (Figura 5.2.b). Primeiramente as colônias que continham os dois insertos foram selecionadas de acordo com o tamanho da banda de indução apresentada no gel e então essas colônias foram utilizadas para a expressão em maior escala.

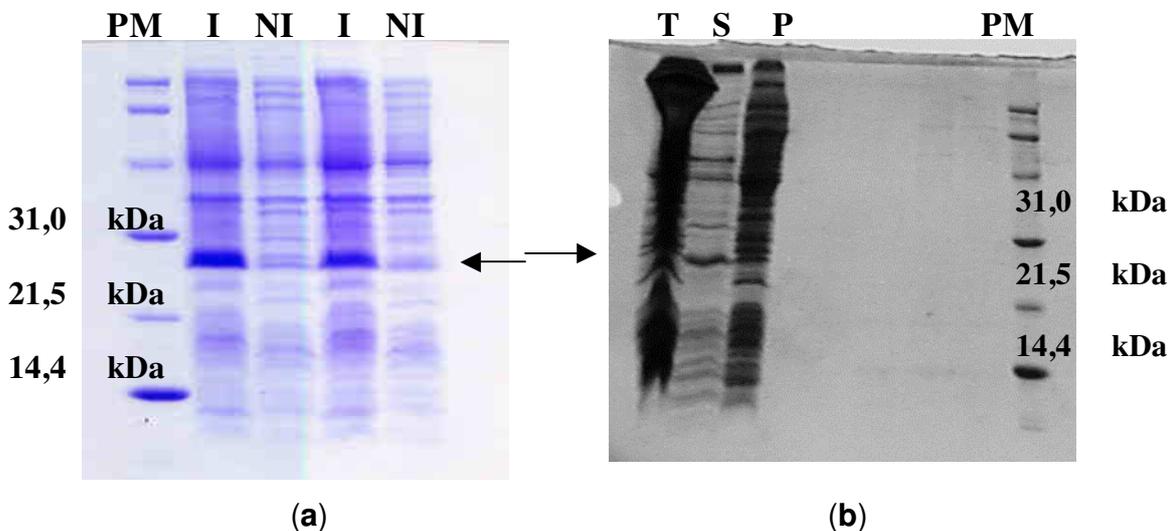


Figura 5. 2. Gel SDS - PAGE (15%): (a) Co-expressão das proteínas XACb0032/XACb0033, sendo: NI - amostra não induzida; I amostra induzida, após adição de IPTG (1 mM); PM - padrão de peso molecular de proteínas. (b) Lise do complexo, onde: T: lise total; P - pellet; S – sobrenadante; PM - padrão de peso molecular de proteínas.

O método de co-expressão de proteínas, normalmente é utilizado nos casos em que as proteínas parceiras envolvidas são insolúveis quando são expressas separadamente, pois provavelmente a parte hidrofóbica fica exposta ao solvente, mas quando interagem e formam um complexo este é solúvel (Romier *et al.*, 2006). Estudos mostram que a co-transformação da proteína alvo com a sua chaperone aumenta a quantidade de proteína alvo solúvel (de Marco e de Marco, 2004; Romier *et al.*, 2006). O procedimento de co-expressão da XACb0032 com a sua chaperone XACb0033 foi utilizado na tentativa de solubilizar a proteína XACb0032, já que esta não se apresentou solúvel nem mesmo após o procedimento de desnovelamento/enovelamento com uréia. Este foi realizado com os dois vetores de expressão iguais pET23a, que contém o mesmo gene de resistência ao antibiótico ampicilina, portanto a única maneira de identificar qual a colônia de *E.coli* que continha os dois insertos foi através da mini-indução e posterior visualização do tamanho da banda no gel SDS- PAGE.

O gel SDS- PAGE possui como característica ser redutor, entretanto, neste caso foi observado somente uma banda no gel, o que leva a hipótese de que as proteínas do complexo podem estar ligadas por ligações dissulfeto, pois a atmosfera oxidante faz com que as ligações dissulfeto (S-S) que foram reduzidas formando o grupo tiol (-SH) pelas condições redutoras do gel (DTT) voltem a se formar. O tamanho da banda encontrada foi por volta de 28 kDa, o que condiz com a massa teórica calculada (28346,56 Da) com a razão molar de 2:1, XAC0033 e XAC0032 respectivamente, pois sabe-se que as chaperones atuam como dímeros (Feldman e Cornelis, 2003) e através da estrutura cristalográfica do complexo entre a chaperone (SicP) e a proteína efetora (SptP) de *Salmonella*, que a razão molar para um complexo chaperone-proteína alvo é de 4:2, originada pela combinação de dois complexos 2:1 de SicP- SptP (Stebbins e Galán, 2001).

5.2.2. Purificação do complexo de proteínas

5.2.2.1. Cromatografia de troca aniônica (DEAE)

Na primeira etapa da purificação, as frações que apresentaram maior grau de pureza foram eluídas entre 40 e 50 % de NaCl e estas podem ser visualizadas através do gel SDS- PAGE (15%) (Figura 5.3).

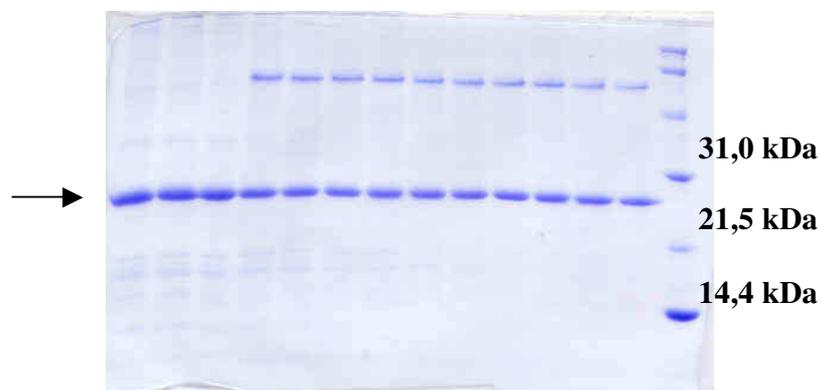


Figura 5.3. Purificação do complexo XACb0032/XACb0033 por cromatografia de troca iônica visto por gel de eletroforese (SDS-PAGE, 15%), as frações mais puras foram eluídas entre 40 e 50 % de NaCl; PM - padrão de proteínas.

A cromatografia de troca aniônica foi escolhida devido ao cálculo do ponto isoelétrico teórico (pI) do complexo de proteínas estimado em 6,26. Entretanto, como pode ser observado no gel SDS-PAGE, algumas frações ainda apresentaram impurezas e em algumas delas estas impurezas apresentavam maior massa molecular (aproximadamente o dobro) em relação à massa molecular do complexo protéico, por esta razão, partiu-se para a cromatografia por exclusão molecular.

5.2.2.2. Cromatografia por exclusão molecular

As frações mais puras foram então concentradas e novamente foi realizado um processo cromatográfico para que fosse possível obter o complexo de proteínas totalmente puro. As frações puras obtidas como resultado da purificação, podem ser observadas no gel SDS-PAGE (15%) (Figura 5.4).

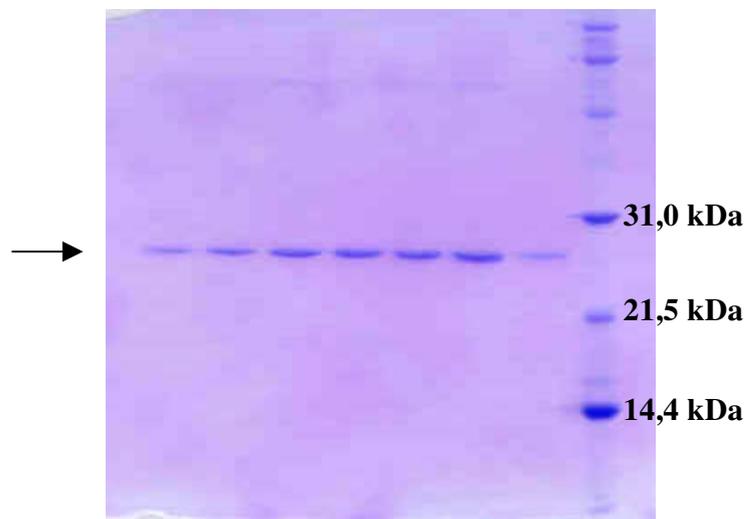


Figura 5.4. Purificação do complexo XACb0032/XACb0033 por cromatografia de exclusão molecular vista por gel de eletroforese (SDS-PAGE, 15%); PM - padrão de proteínas.

A cromatografia por exclusão molecular permitiu que as impurezas fossem totalmente removidas, obtendo-se assim o complexo de proteínas puro. Baseando-se nos resultados obtidos pode-se dizer que a proteína XACb0032 não pode ser purificada sozinha devido a sua insolubilidade, entretanto a sua expressão em conjunto com a sua possível chaperone XACb0033 resultou na co-purificação bem sucedida.

5.3. Determinação da concentração do complexo XACb0032/XACb0033

A determinação da concentração do complexo foi realizada pelo método de Bradford e a seguir tem-se a curva analítica construída utilizando BSA como padrão (Figura 5.5).

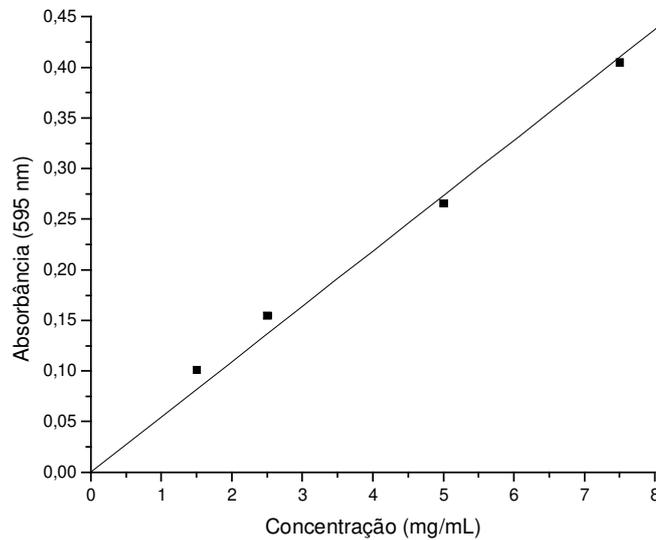


Figura 5.5. Curva analítica construída utilizando BSA como padrão.

A interpolação dos dados foi realizada, utilizando-se a regressão linear. O complexo puro foi quantificado após a sua concentração e antes dos testes espectroscópicos e em alguns casos utilizou-se mais de um lote do complexo (1 lote do complexo = lise de 0,5 L de indução) para alcançar a quantidade de proteína desejada para a técnica espectroscópica a ser utilizada. O rendimento obtido em média para cada lote do complexo purificado foi de aproximadamente 2,5 mg/mL, ou seja, 2,5 g/L.

5.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Na Figura 5.7 está apresentado o espectro de CD do complexo das proteínas XACb0032/XACb0033 a 20°C. Baseando-se nos dados de CD, pode-se observar que existem mínimos globais próximos a 208 e 222 nm, entretanto o formato da curva não é o formato característico de uma proteína com alta porcentagem de α -hélice (compare Figuras 1.6. página 15 e 5.6. a seguir). Como o complexo das proteínas apresenta um conjugado das duas proteínas, espera-se que a sua porção proveniente das chaperones (XACb0033) esteja enovelada, enquanto que a XACb0032 apresenta sua estrutura semi-enovelada.

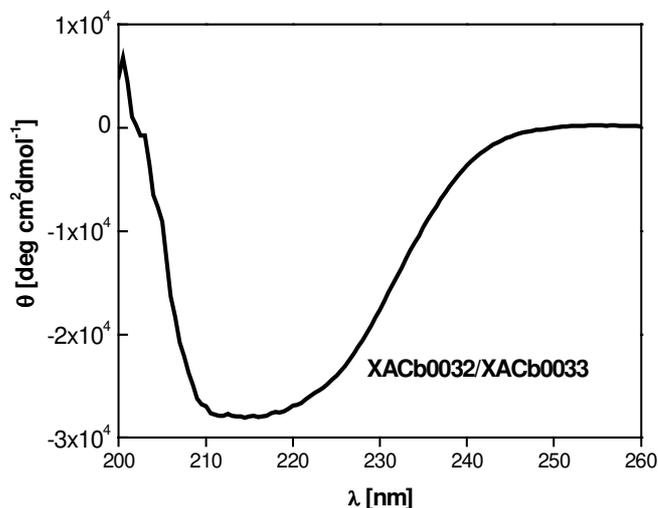


Figura 5.6. Espectro de CD do complexo XACb0032/XACb0033 obtido sob condições experimentais conforme Item 4.2.

O cálculo da porcentagem de α -hélice foi realizado pelo programa DICROPROT (Deléage e col., 1993) e pode-se calcular também o conteúdo de folha- β e estrutura randômica através da equação descrita por Chen* e colaboradores (1974) e também pelo programa K2D** (Andrade e col., 1993). Os resultados encontram-se na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Predição da estrutura secundária do complexo

	Chen*	K2D**
α - hélice	26%	32%
folha β	11%	13%
randômica	46%	44%

Na Figura 5.7. estão apresentados os espectros de CD em função da temperatura que foi variada dentro do intervalo de 20 a 95°C. O complexo de proteínas XACb0032 e XACb0033 mostrou-se estável termicamente conforme mostram os dados.

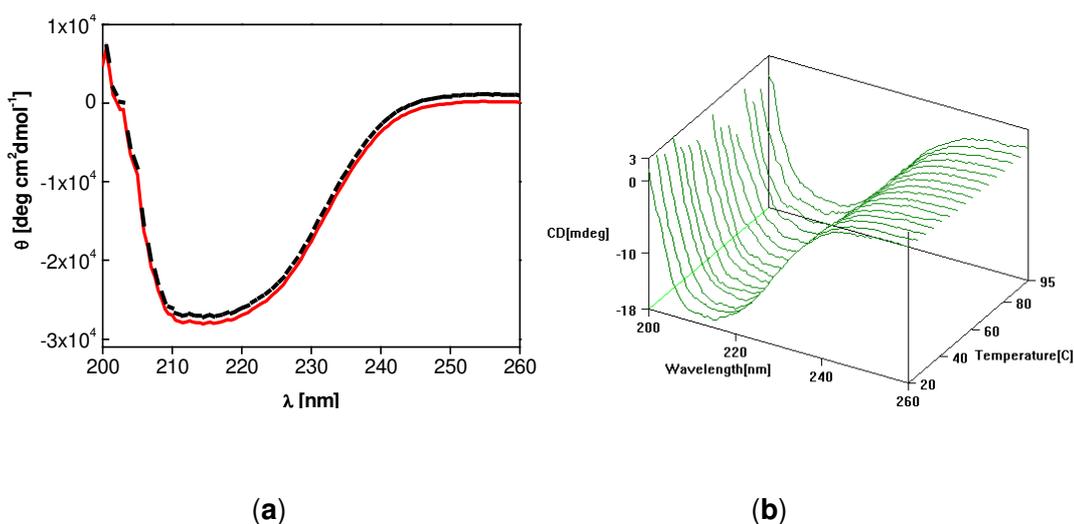


Figura 5.7. Espectros de CD do complexo XACb0032/XACb0033: **(a)** Espectros de CD em 20°C antes (linha cheia) e após aquecimento (linha pontilhada). **(b)** Espectros de CD dependentes de temperatura (20-95°C). As condições experimentais foram: 5 μ M da proteína, tampão tris-HCl (5 mM, pH 8,0), cubeta de 10 mm, 4 repetições (*scans*) e a velocidade de 20 nm/min.

Segundo os experimentos de CD realizados, o complexo apresentou uma estrutura secundária enovelada com aproximadamente 30% de α -hélice.

Estrutura esta, que durante o processo de desenovelamento/enovelamento térmico no intervalo de 20 -95 °C, mostrou-se estável.

5.5. Emissão de fluorescência: estática e tempo de vida

Os resultados de fluorescência estática e tempo de vida estão apresentados na Figura 5.8. O espectro de emissão de fluorescência do complexo, como pode ser visto, apresenta máximo de emissão em 336 nm. Já o espectro do tempo de vida mostra que existem dois tempos de vida diferentes, um em 1,5 ns e outro em 4,2 ns.

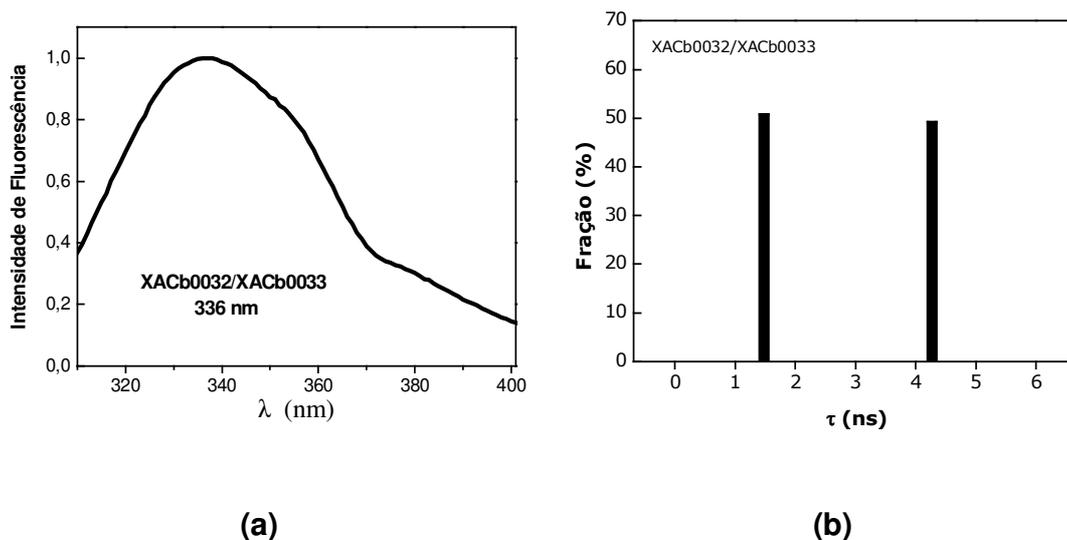


Figura 5.8. (a) Espectros de emissão de fluorescência estática e (b) Tempos de vida de fluorescência do complexo XACb0032/XACb0033 com $\lambda=295$ nm e X^2 de 1,2.

A Tabela 5.2. mostra os resultados obtidos pelos espectros de emissão de fluorescência estática e tempo de vida de fluorescência para a XACb0033 sozinha (Tasic e col., 2007) e para o complexo.

Tabela 5.2. Espectros de emissão de fluorescência estática e tempo de vida de fluorescência para a XACb0033 sozinha (Tasic *et al.*, 2007) e para o complexo

	Máximo de Emissão	Tempo de Vida de Fluorescência	
Complexo	$\lambda=336$ nm	4,276 ns	1,477 ns
XACb0033	$\lambda=345$ nm	4,868 ns	1,167 ns
Variação	$\Delta = 9$ nm	0,592 ns	0,310 ns

A proteína XACb0033 apresenta dois triptofanos, um na posição 26 e outro na posição 70, enquanto que o triptofano não está presente na proteína XACb0032. Assim, o complexo de proteínas deve possuir quatro resíduos de triptofano provenientes da proteína XACb0033, pois o complexo, conforme foi visto pelos dados de SAXS (Item 5.7, a seguir), em alta concentração, aproximadamente 6,0 mg/mL, apresenta relação molar de 4:2, sendo XACb0033 e XACb0032 respectivamente, e em concentrações baixas, deve apresentar uma relação molar de 2:1. Sendo assim, o máximo de emissão do complexo é atribuído aos triptofanos 26 e 70 da XACb0033. Observa-se que o máximo de emissão do complexo é em 336 nm, levando a acreditar que os resíduos de triptofano estão envolvidos em interações supramoleculares. Já o máximo de emissão para a XACb0033 é em 345 nm (Tasic *et al.*, 2007), o que permite dizer que pelo menos um dos seus triptofanos poderia estar interagindo com o solvente, o que provavelmente, se deve ao W70, pois ele se encontra no final da seqüência C-terminal, uma região usualmente sem estrutura terciária evidente (Tasic *et al.*, 2007). A observada migração do máximo de emissão de 345 nm para 336 nm, portanto, deve indicar o provável envolvimento dos triptofanos em interações intra-moleculares entre as proteínas XACb0033 e XACb0032.

O complexo de proteínas apresentou componentes de tempo de vida longo e curto similares aos observados para a proteína XACb0033 (Tasic *et al.*, 2007), conforme mostra o espectro de tempo de vida, onde existem dois tempos

de relaxação, indicando que os triptofanos estão em ambientes diferentes, apresentando mecanismos de relaxação diferentes. Porém, não foi possível atribuir os tempos de vida a um triptofano em específico (Tasic *et al.*, 2007). Os tempos de vida dos mesmos triptofanos no complexo foram mudados de 1,167 ns para 1,477 ns e de 4,868 ns para 4,276 ns, indicando, mais uma vez, que houve uma mudança na vizinhança dos triptofanos 26 e 70. Estes dados também confirmam a interação existente entre as duas proteínas.

5.6. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Este trabalho foi executado em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli, onde o complexo XACb0032/XACb0033 e as suas interações com adenosina trifosfato e adenosina difosfato (ATP e ADP) foram monitoradas aplicando-se a técnica de RMN STD. Para investigar este sistema foi feita a atribuição de todos os sinais do ATP e ADP em 99,9 % de D₂O. A solução do complexo foi preparada em D₂O (99 %) em concentração de 10 μM enquanto que as concentrações de ATP e ADP foram de 1 mM. Otimizados os parâmetros experimentais, foram conduzidos três experimentos de ¹H de RMN, um saturando o sinal da água (PRESAT) o qual forneceu o espectro de hidrogênio-1 da mistura (Figura 5.9.a), outro de STD-controle (Figura 5.9.b) e o STD (Figura 5.9.c), neste último à proteína foi irradiada em -0,15 ppm durante 2 s. A comparação dos espectros de STD, ilustrados nas Figuras 5.9. b e c, mostrou que apenas os hidrogênios **H-2** (8,28 ppm) da adenosina e **H-1'** (6,15 ppm) da ribose (ATP e ADP) interagem diretamente com a proteína.

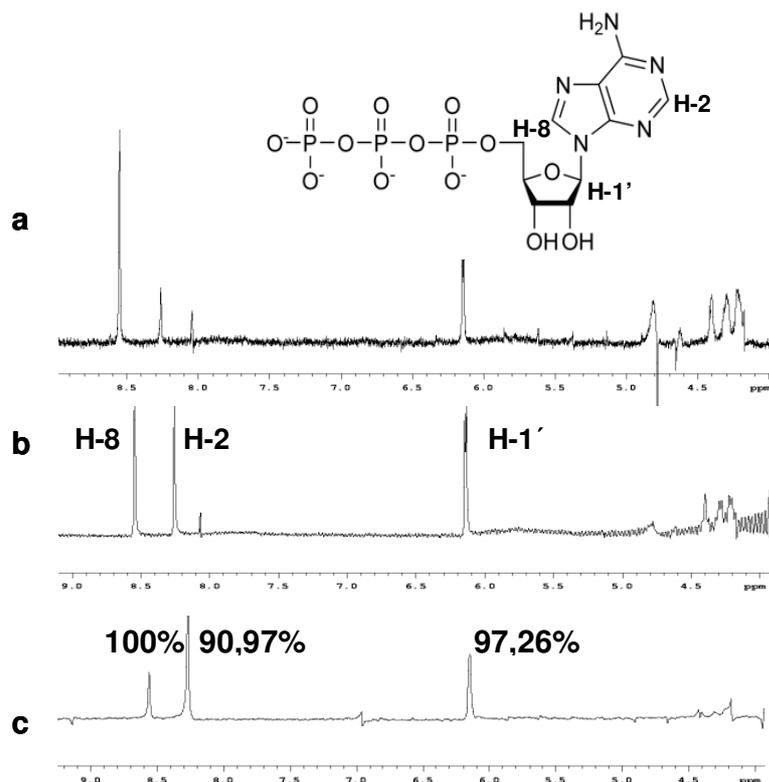


Figura 5.9. Espectros de RMN do complexo XACb0032/XACb0033 com ATP (1:100) em região 4,0 a 9,0 ppm: **a)** RMN de ^1H (499,99 MHz, 99,9 % D_2O), **b)** STD-control (nenhum hidrogênio do complexo irradiado) e **c)** STD com $\text{nt}=512$. Os números em negrito representam o mapa do epítipo.

Os valores do fator STD para os experimentos realizados com as misturas: complexo/ATP e complexo/ADP; estão apresentados na Tabela 5.3. Os valores obtidos indicam que o complexo interagiu com o ADP numa proporção menor do que com o ATP e, também, sua interação foi menos seletiva devido à ausência do sinal do H-8.

A partir dos resultados obtidos por STD foi possível propor um modelo da interação entre o complexo XACb0032/XACb0033 e ATP e ADP. Observou-se que a interação se dá principalmente através do **H-2** da adenosina e do **H-1'** da ribose, além de uma participação forte do **H-8** no caso de interação do complexo com o ATP, já os **H-2'**, **H-3'** e **H-4'** não apresentaram sinais nesses experimentos (STD).

Tabela 5.3. Fator STD para os hidrogênios **H-8**, **H-2** e **H-1'** obtido em interações do complexo XACb0032/XACb0033 com ATP e ADP

	Complexo+ATP	Complexo+ADP
H-8	100,00 %	–
H-2	90,97 %	95,99 %
H-1'	97,26 %	100,00 %

Os mesmos experimentos de STD foram conduzidos com a XACb0033 e não foram observadas interações com ATP ou ADP na temperatura de 25°C. Portanto, podemos dizer que a possível chaperone, XACb0033, nas condições em que foi realizado o experimento, não apresenta sítio de ligação com os ATP e ADP (Tasic *et al.*, 2007).

5.7. Espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS)

Nos dias 11 e 12 de julho de 2006 foram coletados dados de espalhamento no LNLS, linha de SAXS-2. Os experimentos foram realizados com o complexo de proteínas sozinho e na presença de β -mercaptoetanol. Os dados preliminares foram analisados em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Íris Torriani, porém não foram satisfatórios, sendo necessário que estes experimentos fossem repetidos em 18 de janeiro de 2007, sendo também realizados experimentos com adição de ATP e ADP ao complexo. Os parâmetros experimentais foram apresentados no Item 4.6. Os resultados obtidos na presença de β -mercaptoetanol ainda estão sendo analisados.

As curvas de espalhamento $I(q)$ versus q e a função $p(r)$ do complexo formado pelas proteínas XACb0032 e XACb0033 estão mostradas nas Figuras 5.10. (a) e (b), respectivamente, superpostas com as curvas obtidas após a adição de ADP. As curvas obtidas com a adição de ATP não mostraram diferenças com as obtidas para o complexo sozinho, isto deve ter ocorrido provavelmente devido a baixa resolução da técnica. A massa molecular esperada para esse complexo é de 28,38 kDa (2:1; mol/mol,

XACb0033/XACb0032). A partir dos dados de SAXS foi obtida uma massa de 54,9 kDa para o complexo, ou seja, aproximadamente o dobro da esperada (4:2 - XACb0033/XACb0032). Porém, com a adição de ADP, a curva de intensidade apresenta comportamento que indica polidispersidade e o cálculo de massa molecular com os dados desta experiência (eliminando os pontos da intensidade que correspondem a espécies maiores) possui como resultado um valor de 19,8 kDa.

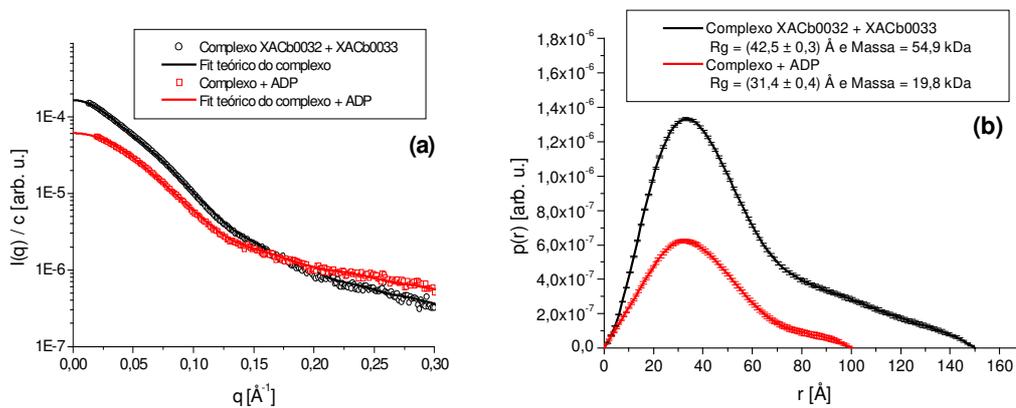


Figura 5.10. (a) Curva de espalhamento e (b) função $p(r)$ do complexo formado pelas proteínas XACb0032 e XACb0033. Os pontos iniciais da curva em vermelho foram eliminados para fazer as análises.

Os parâmetros dimensionais obtidos para o complexo sem ADP foram: raio de giro $R_g = 42,5 \pm 0,3 \text{\AA}$ e dimensão máxima $D_{\max} = 150 \text{\AA}$ e com ADP foram: raio de giro $R_g = 31,4 \pm 0,4 \text{\AA}$. O raio de giro caracteriza o tamanho da partícula, e o espalhamento $I(0)$ é relacionado à sua massa molecular. Na prática, a massa molecular normalmente é estimada por comparação com uma amostra referência (Svergun e Koch, 2003), neste caso a lisozima. Entretanto a lisozima possui forma globular e o complexo de proteínas não, o que permite dizer que o cálculo da massa molecular pelos dados de SAXS é somente uma aproximação. A inspeção visual da curva $p(r) \times r$ permite dizer que o complexo de proteínas possui um formato alongado, pois estas curvas apresentam a função de distribuição das distâncias característico desta forma geométrica (Svergun e Koch, 2003).

Analisando estes resultados, e comparando os dados obtidos do complexo com e sem ADP, podemos dizer que na presença de ADP ocorre diminuição na massa molecular e no raio de giro, indicando uma possível quebra do complexo.

A partir das curvas de espalhamento do complexo foi realizado um cálculo *ab initio* com o intuito de obter um modelo para esse complexo. Primeiramente foi obtido um modelo do tipo “*bead model*”. O modelo está apresentado na Figura 5.11. Para os resultados do complexo com a adição de ADP não é possível obter um modelo, pois em solução teremos pelo menos dois espalhadores com formas diferentes que seriam as proteínas XACb0032 e XACb0033 formando um sistema polidisperso.

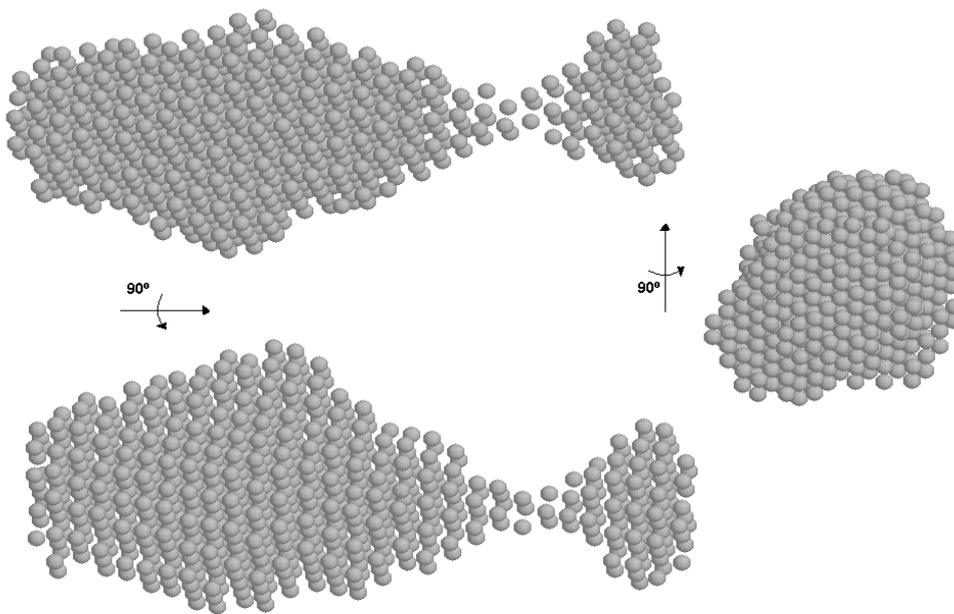


Figura 5.11. Modelo “*bead model*” do complexo das proteínas XACb0032 e XACb0033 apresentado em três diferentes vistas.

Como pode ser visto no modelo “*bead model*” do complexo, este apresenta a forma alongada, conforme era indicado na curva de função de distribuição das distâncias.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão da proteína XACb0032 em cepa de *E. coli* BL21(DE3) RP códon plus foi obtida com sucesso, entretanto esta se apresentou insolúvel, mesmo mediante o uso do método de desenovelamento/enovelamento com uréia. Então a forma encontrada para fazer com que fosse possível o estudo desta proteína foi a sua co-expressão com sua proteína parceira, a XACb0033, anteriormente anotada como possível chaperone do sistema de secreção do tipo IV. A co-expressão das duas proteínas foi executada em cepa de *E. coli* BL21(DE3)*pLysS*, sendo que, no gel SDS-PAGE, que é desnaturante, a co-expressão foi observada em uma única banda com o tamanho de aproximadamente 28 kDa, o que condiz com a massa teórica calculada (28346,56 Da) com a razão molar de 2:1 para XACb0033 e XACb0032, respectivamente. Este resultado era esperado já que as chaperones atuam como dímeros (Feldman e Cornelis, 2003) e que através da estrutura cristalográfica do complexo entre a chaperone (SicP) e a proteína efetora (SptP) da *Salmonella* foi observada a razão molar de 4:2, respectivamente, originada pela combinação de dois complexos de 2:1 das SicP-SptP (Stebbins e Galán, 2001).

A purificação do complexo, após a utilização de duas etapas sendo elas cromatografia de troca iônica e logo após a de exclusão molecular, também foi bem sucedida e o complexo puro foi obtido para a sua caracterização estrutural. Antes de cada técnica utilizada, a concentração do complexo foi medida de forma a que ela fosse de acordo com a necessidade de cada técnica.

Os espectros de dicroísmo circular apresentaram algumas características sobre o complexo, como o seu conteúdo de α -hélice, que foi de 30 % e a sua estabilidade térmica, de 20 a 95 °C, onde ele mostrou ser termicamente estável. Os ensaios de fluorescência indicaram que as proteínas apresentam interações intramoleculares, já que a XACb0032 não possui triptofanos e a XACb0033 apresenta dois, nas posições 26 e 70, e ocorreu a migração do máximo de emissão de 345 nm (Tasic e col., 2007) para 336 nm, levando a acreditar que os

resíduos de triptofano não estão expostos ao solvente. As medidas de tempos de vida, onde foram encontrados dois tempos, indicam que os dois triptofanos estão em ambientes diferentes, apresentando mecanismos de relaxação diferentes, entretanto não é possível identificá-los.

Os resultados de RMN mostraram que ATP e ADP se ligam ao complexo das proteínas, podendo ser feito o mapa de epítipo dos ligantes. Essa ligação suporta a hipótese de que o complexo de proteínas se liga ao ATP, é reconhecido pelo TTFS, onde a ATPase cliva o ATP formando ADP e este por sua vez é reconhecido pelo complexo que se decompõe para que a proteína alvo possa ser secretada.

O experimento de SAXS permitiu verificar que o complexo de proteínas possui uma razão molar de 4:2, pois foi obtida uma massa de 54,9 kDa para o complexo, ou seja, aproximadamente o dobro da esperada 28 kDa. Já a massa do complexo com ADP apresenta um valor de 19,8 kDa. Os parâmetros dimensionais obtidos para o complexo sem ADP foram: raio de giro $R_g = 42,5 \pm 0,3 \text{ \AA}$ e dimensão máxima de $D_{\max} = 150 \text{ \AA}$ e com ADP foram raio de giro $R_g = 31,4 \pm 0,4 \text{ \AA}$. Podemos dizer, então, que na presença de ADP ocorre diminuição na massa molecular e no raio de giro, indicando uma possível quebra do complexo. A partir das curvas de espalhamento do complexo foi obtido um modelo do tipo “*bead model*”, este apresenta forma alongada.

7. PASSOS EM ANDAMENTO

Os ensaios de cristalografia foram realizados utilizando-se diferentes concentrações do complexo: 10 mg/mL, 15 mg/mL e 18 mg/mL em tampão tris-HCl (5 mM, pH 8) e foi utilizado o laboratório Robolab do LNLS. Os ensaios iniciais apresentaram a formação de cristais, entretanto estes cristais eram de sais e não de complexo protéico. Porém foi diagnosticado um problema no armazenamento dos kits, onde as soluções de cada poço, devido a um problema na vedação, foram misturadas. Devido a isso, os ensaios iniciais deverão ser repetidos. A espectrometria de massas também foi utilizada para verificar a massa molecular da XACb0033 (Tasic *et al.*, 2007) e os dados mostraram que a proteína foi expressa sem a primeira metionina e com tendência para formar dímeros e tetrâmeros. Estudos futuros serão realizados para que possa ser confirmada a razão molecular entre as proteínas no complexo e, também, para identificar a posição da provável ligação dissulfeto entre elas.

8. CONCLUSÕES

O complexo das proteínas XACb0032/XACb0033 foi analisado por dicroísmo circular (CD), fluorescência (estática e dinâmica), ressonância magnética nuclear (RMN, STD) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Todos os dados obtidos indicaram que o complexo purificado exibe a estrutura enovelada e que após a adição de adenosina difosfato (ADP) ocorre uma mudança evidente na sua forma e seu tamanho, indicando uma possível quebra do complexo XACb0032/XACb0033 após a liberação de ADP na célula. Portanto, podemos supor que o sistema de secreção do tipo IV deve funcionar da seguinte maneira: 1. Ligação da chaperone XACb0033 à XACb0032 mantendo-a em uma conformação semi-desenovelada; 2. Ligação do complexo ao ATP; 3. Reconhecimento do sistema ATP + complexo pelo TTFS, logo a ATPase cliva o ATP; 4. Formação do ADP e sua presença promove a dissociação da XACb0032 do complexo; 5. Possível secreção da proteína alvo, ou seja, a XACB0032 poderia passar através do canal de secreção até atingir a célula eucariótica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, A. J., Greenfield 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., Docena C., *e col.* New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. J Bacteriol, v.186, n.18, Sep, p.6186-97. 2004.

Alegria, M. C., Souza D. P., *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.

Andrade, M.A.; Chacon P., *e col.* Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. Protein Eng, v.6, p. 383-90. 1993.

Bennett, J. C. e Hughes C. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. 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.

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 translocation. Trends Microbiol, v.10, n.4, Apr, p.186-92. 2002.

Cascales, E. e Christie P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. Nat Rev Microbiol, v.1, n.2, Nov, p.137-49. 2003.

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.13, n.16, Jul 30, p.3350-9. 1974.

Cheng, L. W. e Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM, and YopN into the cytosol of eukaryotic cells. J Bacteriol, 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., Ferro J. A., 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.

de Marco, A. e De Marco V. Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. J Biotechnol, v.109, n.1-2, Apr 8, p.45-52. 2004.

Dalvit C., Fogliatto G., e col. WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability. J. Biomol. NMR, v.21, n.4, Dec. p.349-59. 2001

Deléage G., Geourjon, C. DICROPROT V 2.3: DICROism of PROTeins. Comp. Appl. Biosc., v.9, p. 197. 1993.

Deng, W., Chen L., e col. VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. Mol Microbiol, v.31, n.6, Mar, p.1795-807. 1999.

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

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

Hadjuk, P. J., Olejniczak, E. T., e col. One-Dimensional Relaxation- and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. J. Am. Chem. Soc., v.119, p.12257-12261. 1997.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia F., e col. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol Mol Biol Rev, v.68, n.4, Dec, p.692-744. 2004.

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.

Galán, J. E. e Collmer A. 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. Small Angle X-Ray Scattering. London: Academic Press. 1982.

Grant, D. M. e Harris, R. K. Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance Vol. 1. Historical Perspectives, New York: Wiley. 1996.

Gozansky, E. K. e Gorenstein D. G. DOSY-NOESY: diffusion-ordered NOESY. J Magn Reson B, v.111, n.1, Apr, p.94-6. 1996.

<http://watson.fapesp.br/Xantho/Main.htm>.

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

http://www.download.dom/3000-2155_4-10521296.html.

<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map03080.html>.

Kather, L., Santos T.M., *e col.* *In silico* identification of potential 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 circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. Biochim Biophys Acta, v.1338, n.2, Apr 4, p.161-85. 1997.

Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Kluwer Academy / Plenum Publisher. 1983.

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

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

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

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, n.25, Jun 27, p.6108-17. 2001.

Muller, S. A., Pozidis C., *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.

Piotto, M., Saudek V., *e col.* Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. J Biomol NMR, v.2, n.6, Nov, p.661-5. 1992.

Plano, G. V., Day J. B., *e col.* Type III export: new uses for an old pathway. Mol Microbiol, v.40, n.2, Apr, p.284-93. 2001.

Ribeiro, E. A., Jr., Regis W. C., *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.

Romier, C., Ben Jelloul M., *e col.* Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.62, n.Pt 10, Oct, p.1232-42. 2006.

Sambrook J. e Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition – vol.1). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Shapiro M.J. e Chen A. NOE Pumping. A High-Throughput Method To Determine Compounds with Binding Affinity to Macromolecules by NMR. J. Am. Chem. Soc. v.122,p. 414-5, 2000.

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

Smith, C. L. e Hultgren S. J. Bacteria thread the needle. Nature, v.414, n.6859, Nov 1, p.29, 31. 2001.

Sory, M. P., Boland A., *e col.* Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.26, Dec 19, p.11998-2002. 1995.

Stebbins, C. E. e Galán 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 Galán J. E. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. Nature, v.414, n.6859, Nov 1, p.77-81. 2001.

Stein, M., Rappuoli R., *e col.* Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.3, Feb 1, p.1263-8. 2000.

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

Sundberg, C. D. e Ream W. The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. J Bacteriol, v.181, n.21, Nov, p.6850-5. 1999.

Svergun, D. I. Mathematical methods in small-angle scattering data analysis, J. Appl. Crystallogr. v.24, p.485-92. 1991.

Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. Biophys J, v.76, n.6, Jun, p.2879-86. 1999.

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

Tasic, L. Borin, P. F., e col. Interactions of hypothetical type IV secretion system proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Rio de Janeiro: 2nd IWSB 2004 Program and Abstracts, 2004.

Tasic, L. Borin, P. F., e col. Interactions of hypothetical type IV secretion system proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecularde - SBBq Caxambu: Programa e Resumos da XXXIII Reunião Anual, 2004.

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

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

Voet, D. V., Voet J. G. e Pratt C. W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre. Artmed. 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.

Winans, S. C., Burns D. L., e col. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. Trends Microbiol, v.4, n.2, Feb, p.64-8. 1996.

Woestyn, S., Sory M. P., e col. The cytosolic SycE and SycH chaperones 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., Savvides S. N., 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., *et al.* Theory of the structure factor of lipid bilayers. Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics, v.50, n.6, Dec, p.5047-5060. 1994.

Zhou, X. R. e Christie P. J. Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single-stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction. J Bacteriol, v.181, n.14, Jul, p.4342-52. 1999.

ANEXO I

O procedimento utilizado na clonagem do fragmento correspondente à proteína XACb0032, realizado durante o projeto de pós-doutoramento de Ljubica Tasic, está descrito a seguir.

1- PCR da XACb0032 (11005.1) de 324 pb

- 45 µL PCR supermix
- 0,5 µL DNA *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*)
- 2 µL MgCl₂ (50 mM)
- 0,25 µL Taq polimerase (5 u/µL)
- 2,75 µL DMSO (5 %)
- 1 µL primer forward (25 pmol/µL) LEXC11005F
- 1 µL primer reverse (25 pmol/µL) LEXC11005R
- + 1 gota de óleo mineral

Condições do PCR:

- 95°C – 5 min
- 35 ciclos de:
 - 95°C – 1 min
 - 60°C – 1 min 30s
 - 72°C – 3 min
 - 72°C – 10 min
- 4°C – ∞

2- pUC18/*Sma*I/*CIP*

A - digestão do pUC18 com *Sma*I

- 5 µL pUC18
- 1 µL *Sma*I (5 u/µL)
- 1 µL *y+*
- 3 µL H₂O

Incubar 1 h a 30°C

Gel de agarose 0,8 % TBE

B - digestão do pUC18/*Sma*I com *CIP*

- 50 µL pUC18/*Sma*I (170 ng)
- 6 µL *NEB3*
- 0,5 µL H₂O
- 1 µL *CIP* (fosfatase alcalina)

Incubar 1 h a 37°C

Desativar a enzima: 30 min 65°C

Adicionar 5 μ L EDTA (0,1 M)
Precipitar o DNA utilizando acetato de sódio e etanol
Resuspende em 20 μ L de H₂O
Gel de agarose 0,8 % TBE

Transformar o DNA em *E. coli* DH5 α

3- Ligação com vetor pUC18/*Sma*I/*CIP*

(a concentração do vetor preparado e do DNA obtido por PCR tem que ser igual)

Preparação do fragmento de PCR

- 10 μ L do produto de PCR purificado
- 4 μ L Blunting/Kinassing Buffer 5x
- 0,2 μ L Klenow (5 u/ μ L)
- 0,5 μ L T4 P.K. (10 u/ μ L)
- até 20 μ L H₂O

Incubar 1 h a 37°C

Desativar enzimas 15 min 75°C

Ligação do DNA de interesse (PCR) com o vetor pUC18/*Sma*I/*CIP*

- 20 μ L do DNA de interesse preparado
- 1 μ L da T4 DNA ligase (1 u/ μ L)
- 1 μ L do vetor pUC18/*Sma*I/*CIP*

Incubar 16 h a 16°C

Transformar vetor com inserto em DH5 α por PEG ou eletroporação (LB+amp)

Seleção de colônias – brancas (X-gal)

Mini prep - DNA (isolar)

4- pUC18-ORF digestão com *Sa*II e *Nde*I

- 3 μ L pUC18-ORF
- 2 μ L *Sa*I/ Buffer 10x
- 2 μ L BSA 10x
- 1 μ L *Nde*I (1 u/mL)
- 2 μ L *Sa*II (1 u/mL)
- 5 μ L H₂O

20 μ L volume final

Incubar 2 h a 37°C

Gel de agarose 0,8 % TBE

5- Digestão do pET23a-Mb (wt) com *Nde*I e *Sa*II

- 8 µL pET23a-Mb (wt)
- 2 µL *SalI* Buffer 10x
- 2 µL BSA 10x
- 1 µL *NdeI* (1 u/mL)
- 2 µL *SalI* (1 u/mL)
- 5 µL H₂O

20 µL volume final

Incubar 2 h a 37°C

Gel de agarose 0,8 % TBE

6- Ligação do produto ao vetor pET23a/*NdeI*/*SalI*

- 7 µL ORF
- 2 µL pET23a/*NdeI*/*SalI*
- 4 µL Ligase buffer 5x
- 1 µL ligase (1 u/mL)
- 6 µL H₂O

20 µL volume final

Incubar 16 h a 16°C

7- Transformação do pET23a-OFRs em *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* por eletroporação (conforme item 3.1.5., pg. 17)

8- Extração do DNA e sequenciamento

Enzimas de restrição utilizadas:

- *NdeI* (BioLabs)
(*Neisseria denitrificans*)

Sítio de reconhecimento:

5'...CA TATG...3'
3'...GTAT AC...5'

- *SalI* (Q-Biogene)
(*Streptomyces albus*)

Sítio de reconhecimento:

5'...G TCGAC...3'
3'...CAGCT G...5'

Mapa do vetor pET23a (Novagen)

