

**Clonagem, expressão e purificação da proteína ligadora  
de alceno sulfonatos do sistema de transporte ABC  
de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.**

**Fabiano Tófoli de Araújo**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação Interunidades em  
Biotecnologia da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

**São Paulo**

**2008**

**Clonagem, expressão e purificação da proteína ligadora  
de alceno sulfonatos do sistema de transporte ABC  
de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.**

**Fabiano Tófoli de Araújo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Área de concentração:** Biologia Molecular e Estrutural de Proteínas

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Balan Fernandes

**São Paulo**

**2008**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Araújo, Fabiano Tófoli de.

Clonagem, expressão e purificação da proteína ligadora de alceno sulfonatos do sistema de transporte ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri / Fabiano Tófoli de Araújo. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Andrea Balan.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular e estrutural de proteínas.

Versão do título para o inglês: Cloning, Expression and Purification of the *Xanthomonas axonopodis* pv citri ABC Transport alkanosulphonate-binding protein.

Descritores: 1. *Xanthomonas* 2. Proteínas de transporte 3. Cromatografia afinidade 4. Fluorimetria 5. Dicroísmo circular 6. Cristalografia I. Balan, Andrea II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB095/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Fabiano Tófoli de Araújo.

Título da Dissertação: Clonagem, expressão e purificação da proteína ligadora de alcano sulfonatos do sistema de transporte ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri .

Orientador(a): Andrea Balan.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

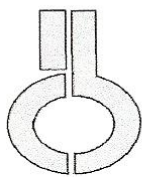
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 154, referente ao projeto intitulado “*Caracterização e análise funcional da proteína XAC3198(SsuA2) do sistema transportes do tipo ABC de Xanthomonas citri*” sob a responsabilidade de Fabiano Tófoli de Araújo, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPESH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 26 de maio de 2006.

Prof. Dr. MARÍLIA C.L. SEELAENDER  
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por seus esforços que permitiram que eu seguisse esta carreira.

Agradeço a oportunidade dada pelos professores: Andrea Balan e Luis Carlos de Souza Ferreira que me orientaram ao longo deste trabalho e serviram como exemplo de excepcionais profissionais.

Aos meus companheiros de grupo (SMOLBNET) Cristiane Santos, Carolina Santacruz, e Eduardo Hiroshi que transformavam o difícil trabalho com biotecnologia em alegria.

A todo pessoal do laboratório: Rita Café, Alexandre Moutran, Roberto Lima, Juliano, Camila Santos, Renata Damásio, Elisa Oshiro, Rafael Ciro, Bruna Maldonado, Natalia Pasternak Taschner, Liliana Massis, Bete Sbrogio, Camila Mathias, Catarina Braga, Hugo Alencar, Juliana Falcão, Wilson Luiz, Marcelo Bibancos, Mariana Diniz, Milene, Otto, Priscila, enfim todos que de alguma forma contribuíram para o trabalho.

Às técnicas do laboratório: Kazui Iguchi, Norma, Camila Calderon e Loren.

Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, principalmente Carlos Inácio Henrique Ramos, João Alexandre Barbosa e Javier Medrano assim como aos técnicos: Andréa, Silvia e Fabio.

Aos meus professores Maria Ester Dal Poz (ensino médio), Reynaldo (universidade) e aos meus orientadores durante minha iniciação científica Lygia da Veiga Pereira e Roberto Rozenberg que me iniciaram na carreira científica.

Também gostaria de agradecer a minha família e amigos que sempre estão ao meu lado nos momentos mais importantes de minha vida.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; estuda-a porque se delicia com ela, e se delicia com ela porque é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la e, se não valesse a pena conhecê-la, não valeria a pena viver.”

Henri Poincaré

## RESUMO

ARAÚJO, T. F. **Clonagem, expressão e purificação da proteína ligadora de alceno sulfonatos do sistema de transporte ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.** 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2008.

Transportadores ABC constituem famílias de proteínas constituídas por componentes de membrana, citoplasma e periplasma (no caso de bactérias). Estas proteínas são responsáveis pelo transporte de substâncias de diferentes tamanhos e características como íons, açúcares e peptídeos. O genoma de *Xanthomonas citri* (*Xac*) possui mais de 20 tipos de transportadores do tipo ABC incluindo o operon *ssuABC*, supostamente associado ao transporte de alceno sulfonatos. Deste operon, escolhemos a proteína periplasmática ligadora de alceno sulfonatos SsuA2, para caracterização e análises espectroscópicas e estruturais. A proteína foi expressa como proteína de fusão associada a uma cauda com 6 histidinas a partir do vetor pET28a na forma solúvel no citoplasma de células de *Escherichia coli*. Anticorpos anti-SsuA2 produzidos em camundongos foram capazes de reconhecer a SsuA2 recombinante (rSsuA2), mas não a proteína em sua forma nativa em extratos de células de *Xac*, sugerindo que a mesma possa ser não funcional ou expressa em quantidades mínimas. A purificação da rSsuA2 foi realizada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado e os ensaios espectroscópicos mostraram que a rSsuA apresenta estrutura secundária característica de proteínas globulares alfa-beta e maior estabilidade em pH neutro (7.0). A temperatura de desenovelamento da proteína foi calculada em torno de 43°C, mas não foi possível fazer o re-novelamento. A fluorescência intrínseca da rSsuA2 em diferentes pHs foi substancialmente alterada em pHs extremos. Os ensaios de espectroscopia indicaram que tanto a proteína com cauda como a proteína sem cauda preservam as mesmas características tendo pouca flexibilidade ao desenovelamento térmico e maior estabilidade em pH neutro, como também evidenciado nos experimentos de cristalização. A proteína cristalizou sempre na presença de sulfato e sulfonatos e os cristais apresentam simetria característica do grupo espacial P21. As análises comparativas das seqüências dos genes *ssuA* e seus adjacentes mostraram que o operon *ssu* (*ssu2* em *Xac*) é altamente conservado e composto de mais quatro genes: *ssuB*, *ssuC*, *ssuD* e *SsuE* e que a *Xac* também apresenta o operon *tau* (*ssu1*) para captação de taurina. Os resultados apresentados neste trabalho são os primeiros passos rumo à caracterização estrutural desta proteína, como também da definição de sua função em *Xac*.

### Palavras-chave:

*Xanthomonas axonopodis* pv. citri; Transportadores ABC; proteína ligadora periplasmática; *ssuA*; alceno sulfonatos; purificação de proteínas; dicroísmo circular; fluorimetria; cristalografia.



## ABSTRACT

ARAÚJO, T. F. **Cloning, Expression and Purification of the *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* ABC Transport alkanosulphonate-binding protein.** 2008. 102 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2008.

ABC transport family is one of the most important in bacteria and eukariotes, usually composed by membrane and cytoplasmic domains, but in bacteria also there is a periplasmic component, responsible for the affinity and specificity of the transport, that includes since small molecules as ions until peptides and sugars. *Xanthomonas citri* (*Xac*) genome revealed more than 20 ABC transporters including the *ssuABC* operon associated to the alkanesulfonate transport. From this operon, the periplasmic-binding protein SsuA2 was chosen for biochemical and structural analysis. The protein expressed in a soluble form in the cytoplasm of the *E. coli* as fusion protein associate a tag with 6 histidines was used for the antibody preparation in mouse, but the presence of SsuA protein in periplasmic extracts of *Xanthomonas* was not evidenced. Spectroscopic analysis revealed the SsuA2 is an alfa/beta protein stable in a large range of neutro pHs but suffered in extreme pHs, results that were corroborated in the crystallization trials. Thermal denaturation showed the T<sub>m</sub> of 43°C. The presence of the his-tag did not affect the behavior of the protein in different experiments. Crystals of SsuA2 protein were obtained always in the presence of sulfate and alkanosulfonates and they present symmetry of spatial group P21. The *ssu* operon is highly conserved in different bacteria (*ssu2* in *Xac*) and in fact, in *Xac* is composed of *ssuB*, *ssuC*, *ssuD* and *SsuE* genes. The operon for taurine assimilation is also present in *Xac* (*ssu1*). The results showed in this work are the first steps to structural characterization of the SsuA2, as well as the definition of your function in *Xac*.

### Key Words:

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; ABC transporters; periplasmic-binding protein; *ssuA*; alkanosulphonate; protein purification; dichroism circular; fluorimetry; crystallography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A. Foto por microscopia eletrônica de varredura de um estômato aberto de uma folha apresentando a <i>X. citri</i> em seu canal. ....	27
Figura 1B. Características de lesões na folha causada pela infecção com <i>X. citri</i> . .	27
Figura 1C. Características de lesões no fruto causadas pela infecção com <i>X. citri</i> . .....	27
Figura 1D. Características de lesões no ramo causadas pela infecção com <i>X. citri</i> . .....	27
Figura 2. Esquema da organização estrutural dos componentes formadores de um transporte do tipo ABC em bactérias gram-negativas. ....	31
Figura 3A. Esquema funcional do transporte do tipo ABC em bactérias gram negativas. ....	33
Figura 3B. Visão superior das ATPases durante o transporte e o processo de dimerização. ....	33
Figura 4A. Estrutura tri-dimensional da proteína ligadora de maltose (MBP) de <i>E. coli</i> , na forma não ligada. ....	34
Figura 4B. Estrutura tri-dimensional da proteína ligadora de maltose (MBP) de <i>E. coli</i> , nas forma ligada. ....	34
Figura 5. Genes pertencentes ao regulon <i>cys</i> de <i>Escherichia coli</i> K12. ....	39
Figura 6A. Representação esquemática das deleções nos genes dos sistemas de transporte SsuABC e TauABC presentes em <i>E. coli</i> . ....	40
Figura 6B. Especificidade do transporte de substrato dos operons <i>ssuABC</i> e <i>tauABC</i> em <i>E. coli</i> . ....	40
Figura 7A. Especificidade do transporte de substrato dos operons <i>ssuABC</i> e <i>tauABC</i> . ....	41

Figura 7B. Reações de catálise de sulfonato e taurina. ....	41
Figura 8. Estrutura 3-dimensional da proteína ligadora de sulfato, Sbp, de <i>S. typhimurium</i> . ....	43
Figura 9. Mapa da região de clonagem do vetor pET28a. ....	47
Figura 10A. Seqüência gênica da proteína SsuA2 (XAC3198) de <i>X. Citri</i> . ....	58
Figura 10B. Seqüência de aminoácidos da proteína SsuA2 (XAC3198) de <i>X. Citri</i> . ....	58
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose evidenciando a amplificação do gene <i>ssuA2</i> de <i>X. citri</i> após a reação da PCR.....	59
Figura 12A. Eletroforese em gel de agarose 0.8% evidenciando a construção do vetor, a partir da ligação do fragmento <i>ssuA2</i> , amplificado por PCR no plasmídeo pET28a, clivado com <i>NdeI</i> e <i>HindIII</i> . ....	60
Figura 12B. Representação esquemática do vetor pET28a/ <i>ssuA2</i> de 6269pb, contendo o gene <i>ssuA2</i> . ....	60
Figura 13. Expressão da proteína SsuA2 recombinante por <i>E. coli</i> BL21 após análise em SDS-PAGE com gel a 12,5%. ....	61
Figura 14A. Cromatograma da purificação por cromatografia de afinidade a níquel de extratos solúveis obtidos após a indução das células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) com IPTG. ....	62
Figura 14B. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% das frações obtidas após a purificação da rSsuA2. ....	62
Figura 15. Proteína rSsuA2 concentrada e dialisada. ....	63
Figura 16A. Seqüência de aminoácidos da proteína rSsuA2 (XAC3198) de <i>X. citri</i> com a região oriunda do vetor pET28a, e sítio de clivagem com Trombina. ....	65

Figura 16B. SDS-PAGE a 12,5% das amostras de rSsuA2 digeridas com enzimas para a clivagem da cauda de histidina. ....	65
Figura 17. Purificação da amostra rSsuA2 após a digestão com trombina analisada em gel SDS-PAGE a 12,5%. ....	66
Figura 18A. Gel SDS-PAGE a 12,5% do extrato celular da <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28a/SsuA2 e da rSsuA2 purificada por cromatografia de afinidade a metal. ....	66
Figura 18B. Western Blot da proteína rSsuA2 realizado com anticorpos anti-rSsuA2. ....	66
Figura 19A. SDS-PAGE dos extratos totais de <i>X. citri</i> e <i>X. campestris</i> . ....	68
Figura 19B. Western Blot dos extratos totais realizado com o anticorpo anti-SsuA2. ....	68
Figura 20. Espectro de Dicroísmo Circular das amostras de rSsuA2 com (linha preta) e sem cauda (linha vermelha) de Histidina. ....	69
Figura 21A. Análise por dicroísmo circular da estabilidade da proteína rSsuA2 com cauda de histidina medida em diferentes pHs. ....	71
Figura 21B. Análise por dicroísmo circular da estabilidade da proteína rSsuA2 sem cauda de histidina medida em diferentes pHs. ....	71
Figura 22A. Desenovelamento térmico pontual da rSsuA2 (15 uM) com HisTag. ....	72
Figura 22B. Desenovelamento térmico pontual da rSsuA2 (15 uM) sem HisTag. ....	72
Figura 23. Espectro de dicroísmo circular de desenovelamento térmico reverso da rSsuA2 (20 uM) com e sem HisTag. ....	73

Figura 24A. Fluorescência intrínseca da proteína rSsuA2 com HisTag em diferentes pHs. ....	74
Figura 24B. Fluorescência intrínseca da proteína rSsuA2 sem HisTag em diferentes pHs. ....	74
Figura 25. Padrão de difração da proteína rSsuA2 com de resolução 1.7 Å. ....	78
Figura 26. Organização gênica do operon <i>ssu2</i> em <i>X. citri</i> 306. ....	80
Figura 27. Organização dos operons <i>ssu</i> em diferentes microrganismos e comparação com <i>X. citri</i> . Todas as proteínas SsuA, exceto a de <i>X. citri</i> estão anotadas como transportadoras de alceno sulfatos. ....	81
Figura 28. Identificação de domínios conservados na seqüência de aminoácidos da proteína SsuA2 de <i>X. citri</i> . ....	83
Figura 29. Alinhamento de diferentes ortólogos da SsuA em comparação com a SsuA2 de <i>X. citri</i> (ClustalW). ....	85
Figura 30. Alinhamento de seqüências dos ortólogos da proteína SsuA2 de <i>X. citri</i> . ....	86 e 87
Figura 31. Árvore filogenética gerada pelo programa TreeView. ....	88
Figura 32. Alinhamento de seqüência da SsuA2 de <i>X. citri</i> com a proteína transportadora de alcanosulfonatos (SsuA) de <i>E. coli</i> cujo transporte já foi caracterizado através de ensaios funcionais. ....	91
Figura 33. Proposta da nova organização dos operons <i>ssu2</i> e <i>ssu1</i> em <i>X. citri</i> . ....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Panorama das diferentes proteínas transportadoras identificadas nos genomas de diversas bactérias. ....	35
Tabela 2 – Proteínas hipotéticas periplasmáticas pertencentes à família dos transportadores ABC, cujos genes foram identificados nos genomas das bactérias de <i>X. citri</i> , <i>X. campestris</i> , <i>X. vesicatoria</i> e <i>X. oryzae</i> .....	37
Tabela 3 – Proteínas periplasmáticas ligadoras de sulfato/nitrato/taurina do sistema de transporte do tipo ABC em <i>E. coli</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. typhimurium</i> .....	38
Tabela 4 – Seqüência dos oligonucleotídeos usados para as reações de PCR.....	46
Tabela 5 – Protocolo da reação de PCR e o programa usado.....	46
Tabela 6 – Análise da produção e recuperação nas diferentes etapas de obtenção da rSsuA2 de <i>X. citri</i> . ....	63
Tabela 7 – Meios e condições de crescimento das linhagens de <i>X. citri</i> e <i>X. campestris</i> . ....	67
Tabela 8 – Previsão da quantidade de estrutura secundária da proteína rSsuA2 em Tris 20 mM pH 7.0, NaCl 50mM a 20°C.....	69
Tabela 9 – Condições dos kits em que houve cristalização da proteína rSsuA2.....	76
Tabela 10 – Condição em que a proteína r SsuA2 cristalizou e resolução da difração por raio-X. ....	77
Tabela 11 – Comparação da seqüência de aminoácidos da SsuA2 com outras proteínas do banco de dados do NCBI.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – ATP-Binding Cassette

Abs – absorvância

Anti-IgG – anticorpo anti-imunoglobulina G

ATP – Adenosina Tri-fosfato

BLAST CD - Basic Local Alignment Search Tool Conserve Domain

BLAST P - Basic Local Alignment Search Tool Protein

BSA – soro albumina bovina

*B. subtilis* – *Bacillus subtilis*

*B. thuringiensis* – *Bacillus thuringiensis*

CD – dicroísmo circular

Da – dalton

DIM – domínio integral de membrana ou Permease

DLN – domínio de ligação de nucleotídeos ou ATPase

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT – ditioneitol

*E. coli* – *Escherichia coli* K-12 W3110

EDTA – ácido etilenediaminotetraacético

ExpPASy – “Expert Protein Analysis System”

FMN – flavina mononucleotídeo

FMNH<sub>2</sub> – Flavina mononucleotídeo reduzida

FPLC – cromatografia líquida de performance rápida

g – gramas

h – horas

HCl – ácido clorídrico

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1- ácido piperazinaetanosulfônico

HisTag ou His6 – cauda de histidina

IgG – imunoglobulina G

IPTG – Isopropyl β-D-thio-galactopyranoside

kb – quilo pares de bases

kDa – quilo dalton

KEGG – “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”

LB – Luria Bertani  
µg – microgramas  
µL – microlitros  
M9 – meio mínimo  
MES – 2-(N-morfolino) ácido etanosulfônico  
mg – miligrama  
min – minuto  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”  
NaCl – cloreto de sódio  
NAD(P)H – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NAS – N-acetil-L-serina  
nm – nanômetros  
ONSA – Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis  
pb – pares de bases  
PBS – tampão salina fosfato  
PBP – proteína ligadora periplasmática  
PEG - Polietileno Glicol  
PEG MME - Polietileno Glicol Etter Monometil  
PCR – Polimerase Chain Reaction – reação de polimerase em cadeia  
pH – potencial hidrogeniônico  
PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil  
PVP – polivinil-pirrolidona  
RNA – ácido ribonucléico  
RPM – rotações por minuto  
rSsuA2 – proteína ligadora SsuA2 recombinante  
*R. solanacearum* – *Ralstonia solanacearum* GMI1000  
Sbp – proteína ligadora de sulfato  
SDS – duodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio  
SMOLBNET - Structural Molecular Biology Network  
Ssu – Sulfonate-Sulfur Utilization



SsuA – proteína ligadora de sulfonato

*S. flexneri* – *Shigella flexneri*

*S. typhimurium* – *Salmonella typhimurium* LT2

T0 – tempo zero

T1 – tempo um

T2 – tempo dois

T3 – tempo três

T4 – tempo quatro

T5 – tempo cinco

*tau* – Taurine-Sulfur Utilization

TauA – proteína ligadora de taurina

Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

Temed – N, N, N, N, - tetrametiletilenodiamina

Tm – temperatura de melting

*X. campestris* – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

*X. citri* – *Xanthomona axonopodis* pv. *citri* 306

*X. oryzae* – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

*X. versicatoria* – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

*Y. pestis* – *Yersinia pestis*

µg – microgramas

µL – microlitros

µM – micromolar

# LISTA DE SÍMBOLOS

## AMINOÁCIDOS

Alanina.....	A
Ácido aspártico ou aspartato.....	D
Ácido glutâmico ou glutamato.....	E
Arginina .....	R
Asparagina.....	N
Fenilalanina.....	F
Cisteína.....	C
Glicina.....	G
Glutamina .....	Q
Histidina .....	H
Isoleucina .....	I
Leucina .....	L
Lisina .....	K
Metionina .....	M
Prolina .....	P
Serina .....	S
Tirosina .....	Y
Treonina .....	T
Triptofano .....	W
Valina .....	V

## BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina .....	A
Citosina .....	C
Guanina .....	G
Timina .....	T

## ELEMENTOS QUÍMICOS

C – carbono  
H – hidrogênio  
N – nitrogênio  
O – oxigênio  
R – radical  
S – enxofre

## **MICROORGANISMOS**

avz – *Azotobacter vinelandii*

aci – *Acinetobacter sp. ADP1*

atu – *Agrobacterium tumefaciens C58*

bsu – *Bacillus subtilis*

btk – *Bacillus thuringiensis*

ecj – *Escherichia coli K-12 W3110*

ppu – *Pseudomonas putida*

rso – *Ralstonia solanacearum GMI1000*

sfl – *Shigella flexneri*

slt – *Salmonella typhimurium LT2*

xcc – *Xanthomonas campestris pv.campestris*

xoo – *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

xcv – *Xanthomonas campestris pv.vesicatoria*

ype – *Yersinia pestis*

# LISTA DE FÓRMULAS

## FÓRMULAS MOLECULARES

$C_2H_7NO_3S$  – taurina

$C_3H_7NO_2S$  – cisteína

$C_6H_{13}NO_4S$  – MES

$C_8H_{18}N_2O_4S$  – HEPES

$NO_3^-$  – nitrato

$NO_2^-$  – nitrito

$R-C-SO_3^-$  – alcano sulfonato

$R-S-SO_3^-$  – tiosulfato

$SO_4^{2-}$  – sulfato

$SO_3^{2-}$  – sulfito

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>1.1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i> e o cancro cítrico.</b> .....	25
<b>1.2 <i>Xanthomonas</i> e Patogênese</b> .....	28
<b>1.3 Sistemas de transporte do tipo ABC</b> .....	30
<b>1.4 A Proteína SsuA2 de <i>Xanthomonas</i></b> .....	36
<b>1.5 Transporte de enxofre</b> .....	38
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>3.1 Linhagens e Vetores</b> .....	45
<b>3.2 Soluções e Tampões</b> .....	45
<b>3.3 Isolamento de DNA genômico de <i>Xac</i></b> .....	45
<b>3.4 Amplificação do gene <i>ssuA2</i></b> .....	45
<b>3.5 Clonagem dos Fragmentos Obtidos na PCR</b> .....	46
<b>3.6 Seqüenciamento do vetor pET28aSsuA2.</b> .....	47
<b>3.7 Transformação de Bactérias por Eletroporação</b> .....	48
<b>3.8 Indução da Expressão dos Genes em Células de <i>E. coli</i> BL21</b> .....	48
<b>3.9 Extração de Proteínas em Condições Nativas</b> .....	50
<b>3.10 Quantificação das proteínas</b> .....	50
<b>3.11 Eletroforese em gel de acrilamida a 12,5%</b> .....	51
<b>3.12 Purificação da proteína de fusão pelo método de cromatografia de afinidade a níquel em coluna pré-empacotada.</b> .....	51
<b>3.13 Concentração e diálise</b> .....	52
<b>3.14 Clivagem da cauda de histidina (HisTag) com Proteases</b> .....	52
<b>3.15 Produção de Anticorpos contra a rSsuA2</b> .....	52
<b>3.16 Western blot</b> .....	53
<b>3.17 Espectroscopia</b> .....	53
<b>3.17.1 Fluorescência intrínseca dos triptofanos</b> .....	54
<b>3.17.2 Dicroísmo Circular</b> .....	54
<b>3.18 Bioinformática: Análises computacionais</b> .....	55
<b>3.19 Cristalização da rSsuA2.</b> .....	56

3.19.1 Adição de átomos pesados aos cristais da rSsuA.....	56
3.20 Processamento dos dados de difração dos cristais da rSsuA2. ....	57
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1 Clonagem do gene <i>ssuA2</i> e obtenção do vetor pET28a/ssuA2 .....	58
4.2 Indução das células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) e expressão da proteína SsuA2 recombinante (rSsuA2). ....	60
4.3 Purificação da proteína rSsuA2 por cromatografia de afinidade a metal imobilizado em coluna pré-empacotada.....	61
4.4 Clivagem da cauda de histidina (6HisTag) .....	64
4.5 Determinação da presença da SsuA2 em extratos protéicos totais de <i>Xanthomonas</i> por Western Blot.....	66
4.6 Análises de Dicroísmo Circular da rSsuA2 .....	68
4.7 Fluorescência.....	73
4.8 Cristalização da proteína rSsuA2, Obtenção de cristais e Dados de Difração.....	75
4.8.1 Cristalização e cristais da rSsuA2.....	75
4.8.2 Processamento dos dados e obtenção de cristais com átomos pesados.....	78
4.9 Bioinformática.....	79
4.9.1 Organização do operon <i>ssu</i> em <i>Xanthomonas citri</i> .....	79
4.9.2 A proteína SsuA2 de <i>Xanthomonas citri</i> .....	82
4.9.3 Análise de Domínios Conservados pelo programa BLAST CD (Basic Local Alignment Search Tool Conserve Domain).....	82
4.9.4 Busca por ortólogos da SsuA2 no banco de dados e homologia de seqüências.....	83
4.10 Modelo da estrutura tri-dimensional.....	88
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>7 PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os transportadores do tipo “ABC” (ATP-Binding Cassete) são sistemas de transporte celular extremamente importantes responsáveis principalmente pela importação e exportação de substâncias através da membrana, como também são associados à outras funções como regulação da transcrição e tradução, reparo de DNA, resistência à drogas, patogenicidade e ativação de respostas imunológicas (DASSA, 2000). Em geral, pelo menos 5% do genoma de bactérias é dedicado à codificação de componentes dessa família (HIGGINS, 2001), porcentagem que se mantém no gênero *Xanthomonas* (cerca de 4%), confirmando a importância destes transportadores nestas bactérias. Diferenças significativas são encontradas nos genomas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac* ou *X. citri*) e *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (*Xcc* ou *X. campestris*) com relação ao número e tipo de transportadores ABC. Sabendo-se que ambas as bactérias apresentam tanto mecanismos de infecção como patogênese diferenciados é interessante pensar que tais proteínas possam estar envolvidas nestes fenômenos.

Devido à sua importância e variedade de funções, este grupo de proteínas tem sido extensivamente estudado tanto do ponto de vista funcional como estrutural, em uma série de organismos. Até pouco tempo, os estudos eram voltados à caracterização dos componentes citoplasmáticos e periplasmáticos, pela facilidade de clonagem e expressão destes, pelo interesse nos mecanismos de interação proteínas ligantes, como também pela dificuldade de se estudar proteínas de membranas. Mais recentemente o foco no estudo dos transportadores ABC está na caracterização dos sistemas completos, incluindo os mecanismos de interação das proteínas periplasmáticas e citoplasmáticas com as respectivas proteínas de membrana (DAWSON *et al.*, 2007).

Apesar do enorme interesse e da importância destas proteínas, a caracterização destes transportadores em *X. citri* ainda é muito insipiente, mesmo no que se refere aos componentes periplasmáticos. Uma busca no genoma de *X. citri* revelou a presença de 18 transportadores do tipo ABC relacionados à captação de diferentes substâncias, incluindo açúcares, peptídeos e íons como molibdato e sulfato. O operon *ssuABC2* o qual codifica para as proteínas SsuA2 (periplasmática ligadora), SsuB2 (integral de membrana) e SsuC2 (ATPase), seria o responsável pela formação do transportador de alceno sulfonatos. Apesar de existirem mais de 100 estruturas resolvidas de proteínas ligadoras periplasmáticas de diversos

organismos (DWYER e HELLINGA, 2004), não existe nenhuma estrutura depositada no banco de dados com a função de captação de alcano sulfonatos. Análises iniciais mostraram que a SsuA2 de *Xac* apresenta alta homologia de seqüência com ortólogos e que estes estão sempre associados a importantes funções no metabolismo microbiano do enxofre. Apesar deste dado, não existem trabalhos com proteínas ortólogas.

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi a expressão e purificação da proteína SsuA2 para análises espectroscópicas baseadas em ensaios de dicroísmo circular e fluorimetria. A caracterização inicial desta proteína é de fundamental importância para a realização dos primeiros ensaios de cristalização visando à resolução de sua estrutura 3-dimensional, como também, de experimentos realizados *in vivo* de captação de sulfatos pela *Xac*.

### **1.1 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e o cancro cítrico**

*X. citri* pertence ao Reino *Bactéria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família: *Xanthomonadaceae* e Gênero: *Xanthomonas*. É uma bactéria aeróbica quimiotrófica estrita que possui o oxigênio (O<sub>2</sub>) comoceptor final de elétrons e utiliza os açúcares encontrados nas plantas, glicose, sacarose, frutose, xilose e galactose como fontes de carbono (TUNG e KUO, 1999; KIM *et al.*, 2004). As colônias são mucóides quando a bactéria é cultivada em meio com glicose devido à secreção de polissacarídeos extracelulares (EPS – principalmente goma xantana). Esse organismo não realiza fotossíntese ou fermentação.

*X. citri* é um fitopatógeno de grande interesse porque é o agente causador do cancro cítrico, doença originada na Ásia, mas que atualmente é endêmica em vários países da América do Sul, como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. A doença causa lesões salientes, corticosas, da cor de palha, em folhas, ramos e, principalmente, nos frutos, tornando-os de pouca utilidade para o comércio e causando graves prejuízos à citricultura.

A dispersão da *Xac* pode ocorrer através de chuvas, tempestades, furacões (Ásia) e pelo homem, através de equipamentos e materiais contaminados (metal, plástico, roupa e madeira processada). A bactéria é sensível à luz solar direta e ao clima seco e frio podendo sobreviver somente alguns dias no solo, algumas

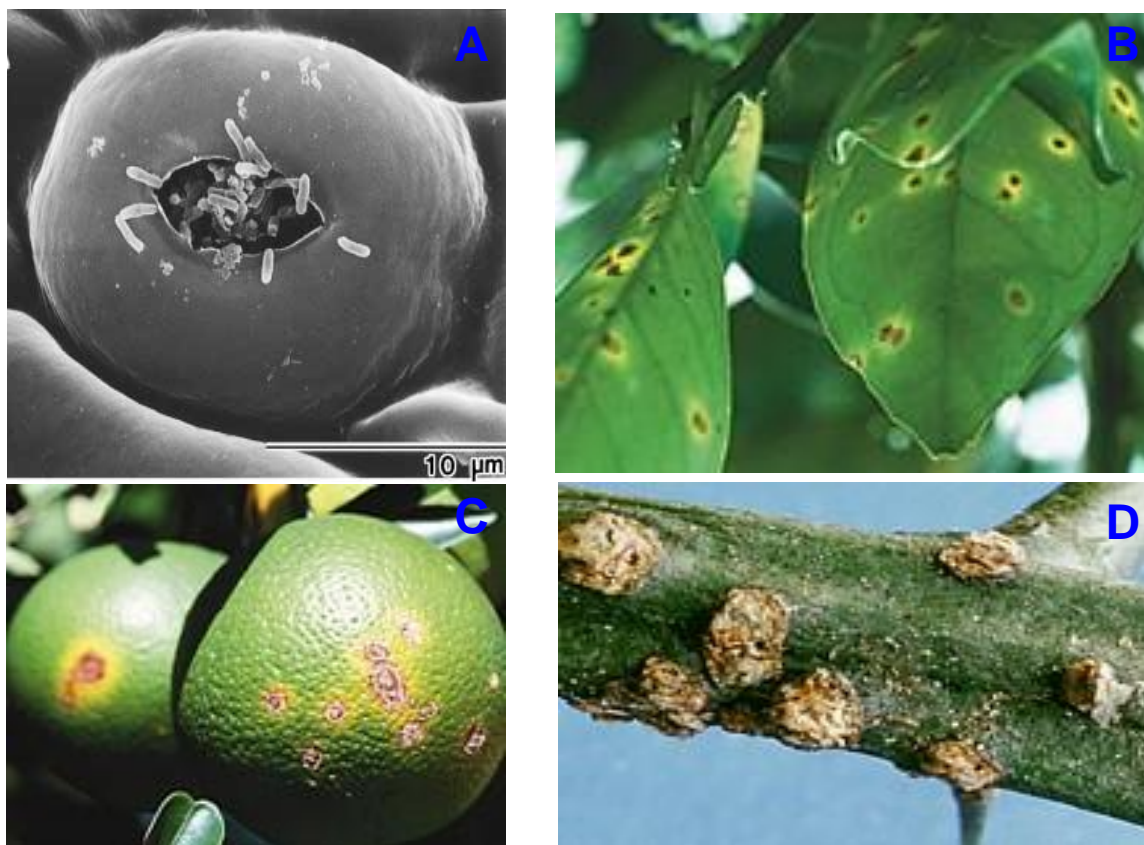


semanas ou meses em restos da planta, cerca de dois meses em frutos infectados caídos no chão (devido à competição com organismos saprófitas) e alguns anos em tecidos secos infectados no solo servindo como fontes de infecção (GOTTWALD *et al.*, 2002; GRAHAM *et al.*, 2004). A infecção da planta, principalmente jovens em fase de crescimento, ocorre através dos estômatos (Figura 1A) ou por lesões nas superfícies de troncos, folhas e frutos, sempre em temperaturas ótimas que variam entre 20 e 30 °C.

Dentro da planta, as células se multiplicam e ocupam os espaços intracelulares enchendo-os de polissacarídeos secretados e água, o que aumenta a permeabilidade da planta e, conseqüentemente, a perda de nutrientes. Algumas espécies de *Xanthomonas* invadem a planta através do tecido vascular onde promovem a necrose das células (CHAN EGOODWIN, 1999). Após o período de crescimento a bactéria pode se dispersar e infectar novas plantas emergindo da abertura estomatal em menos de 5 dias. Os sintomas são lesões que aparecem nas folhas, frutos e galhos (Figuras 1B, 1C e 1D, respectivamente), ocasionando desfolhagem, morte de ramos e queda precoce do fruto (GRAHAM *et al.*, 2004).

Nos pomares de citricultura do Brasil os agricultores identificam o cancro cítrico através de inspeções regulares seguindo um protocolo fornecido pela Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura). A literatura registra cinco formas diferentes de cancro cítrico determinadas a partir das variedades de hospedeiros, severidade e sintomatologia (GRAHAM *et al.*, 2004; SCHAAD *et al.*, 2005).

A forma e o tipo de infecção podem ser identificados a partir do isolamento da bactéria e da sua caracterização. Essas formas são identificadas em laboratórios por meio de métodos moleculares como a análise de homologia DNA-DNA, o seqüenciamento da região do espaço intergênico (ITS) do ribossomo 16S e 23S, a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), sorologia, entre outros (GOTTWALD *et al.*, 2002, LI *et al.*, 2006). Recentemente foram desenvolvidos métodos mais rápidos para a detecção específica de *X. citri* baseados na amplificação dos genes *rfp* e *hrpW* por PCR (COLETTA-FILHO *et al.*, 2005; PARKA *et al.*, 2006).



**Figura 1:** **A)** Foto por microscopia eletrônica de varredura de um estômato aberto de uma folha apresentando a *X. citri* em seu canal (GRAHAM *et al.*, 2004). Características de lesões na folha **(B)**, fruto **(C)** e ramo **(D)**, causadas pela infecção com *X. citri* (<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>).

As perdas econômicas causadas pela contaminação dos citrus com *Xanthomonas* são muito importantes, uma vez que o cinturão citrícola paulista é composto por mais de 200 milhões de pés de laranja plantados em 628 mil hectares e produz 53% da produção mundial de suco e 80% do comércio internacional desse produto. Além disto, é o maior parque citrícola do mundo empregando mais de 400 mil pessoas e gerando divisas ao redor de US\$1,5 bilhões anuais. A receita com as exportações brasileiras de suco de laranja superou R\$2 bilhões na safra 2006/07. Se consideradas apenas as exportações de suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ), o faturamento da indústria cresceu 70,75% na safra passada, em comparação com a safra anterior ([http://www.abecitrus.com.br/informativo/nota\\_receitajul07.html](http://www.abecitrus.com.br/informativo/nota_receitajul07.html)).

Medidas preventivas no controle das pragas causadas por *Xanthomonas* mostraram-se eficientes no bloqueio da disseminação dos fitopatógenos, como o uso de sementes saudáveis, produzidas em culturas inspecionadas, o tratamento das

sementes e a derrubada das árvores em um raio de 30 metros da planta infectada (<http://www.fundecitrus.com.br>). No entanto, tais medidas não evitam infecções ocorridas durante o manuseio humano e ocorrências naturais, sendo necessário o desenvolvimento de outras estratégias de controle das doenças na lavoura e a utilização de cultivares resistentes.

## 1.2 *Xanthomonas* e patogênese

Os genes bacterianos responsáveis pela compatibilidade e incompatibilidade entre planta e bactéria são chamados de genes *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) e genes *avr* (avirulência) que fazem parte de via metabólica de secreção do tipo III, responsável pela liberação de proteínas para as células da planta hospedeira. Alguns genes *hrp* podem ter a função de evitar o reconhecimento da bactéria pelo hospedeiro, alterando a superfície celular bacteriana, ou suprimir a resposta de defesa evitando a formação de papilas pelas células mesófilas da folha. O operon *rpf* (reguladores de fatores de patogenicidade) também é responsável por influenciar a severidade dos sintomas uma vez que além de controlar a expressão de endonucleases, proteases, ligases e polissacarídeos extracelulares, tem a função de sinalizar à bactéria quando o ambiente é favorável ao crescimento. Em hospedeiros não resistentes, proteínas localizadas na superfície das células reconhecem as proteínas Avr secretadas e ocasionam a resposta hipersensitiva (HR) (TUNG e KUO, 1999; CHAN e GOODWIN, 1999; ALEGRIA *et al.*, 2004; ASTUA-MONGE *et al.*, 2005).

Após o seqüenciamento do genoma de quatro espécies de *Xanthomonas*: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ATCC 33913 - XCC e 8004 - XCB), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - XVC (THIEME *et al.*, 2005), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 - XAC (Da SILVA *et al.* 2002) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MAFF311018 - XMO e KACC10331 - XOO) (LEE *et al.*, 2005), foi possível verificar a presença de uma série de genes envolvidos nos mecanismos de infecção e patogenicidade das bactérias.

Com relação à patogenicidade, foram identificados nos genomas de *X. citri* e *X. campestris* o “cluster” *vir*, que codifica proteínas Vir, importantes para a colonização e adesão em bactérias patogênicas; a proteína XadA, relacionada à virulência das bactérias; “clusters” para a síntese de antígeno-O, que podem atuar

como uma barreira para as toxinas da planta; sistemas de secreção do tipo II (cluster *xps*) que estão envolvidos na secreção de enzimas e toxinas; um “cluster” (*hrp* e *hpa*) composto de 26 genes pertencentes ao sistema de secreção do tipo III, crítico para a patogenicidade e iniciação da doença; variedade de fatores hipotéticos de avirulência/genes codificadores de proteínas efetoras, que são fundamentais para o desenvolvimento ou restrição da doença, e finalmente, proteínas ricas em domínios ricos em repetições de leucinas (leucine-rich-repeat, LRR), que podem estar envolvidas em estágios durante a colonização da planta (DA SILVA *et al.*, 2002).

Outros genes e possíveis proteínas específicos de *X. citri* que podem explicar as diferenças nos mecanismos de infecção e tipos de hospedeiros também foram identificados, como a proteína fosfoglicose isomerase (PGI), utilizada para a degradação de frutose e extremamente importante para a patogenicidade, uma vez que na sua ausência a bactéria é incapaz de colonizar o hospedeiro (TUNG e KUO, 1999); os genes *pthA*, *apl1*, *apl2* e *apl3*, pertencentes à família de genes de avirulência (*avr*), responsáveis pela formação do cancro e da resposta de hipersensibilidade (HR) em outros hospedeiros e que são altamente conservados com os genes *avr* de *X. versicatoria* (98%), *X. malvacearum* (97%) e *X. oryzae* (95%) (YANG e GABRIEL, 1995; ALMEIDA *et al.*, 2000); e a proteína VirB, que provavelmente pertence ao sistema de secreção do tipo IV envolvido na conjugação bacteriana entre bactérias gram-negativas (ALEGRIA *et al.*, 2005).

O estudo dos genomas de ambas as bactérias, associado à análise dos diferentes processos de infecção pode revelar uma série de informações importantes sobre a função e características de determinados genes. No cancro cítrico, por exemplo, há maceração tecidual localizada porque a infecção induz uma forte resposta local com a proliferação celular seguida de necrose. Já a podridão negra produzida pela infecção de plantas por *X. campestris*, apresenta massiva degradação tecidual da planta devido à invasão e colonização do tecido. Essas diferenças nos sintomas devem estar correlacionadas aos diferentes genes envolvidos na degradação da parede celular.

A descoberta da função de uma série de genes envolvidos na patogênese dessas bactérias tem servido para o desenvolvimento de estratégias de controle das doenças provocadas por cada uma. Medidas de prevenção e erradicação são adotadas para evitar a contaminação de pomares pela *X. citri*. Algumas estratégias baseiam-se na introdução de genes de resistência ao cancro cítrico em exemplares

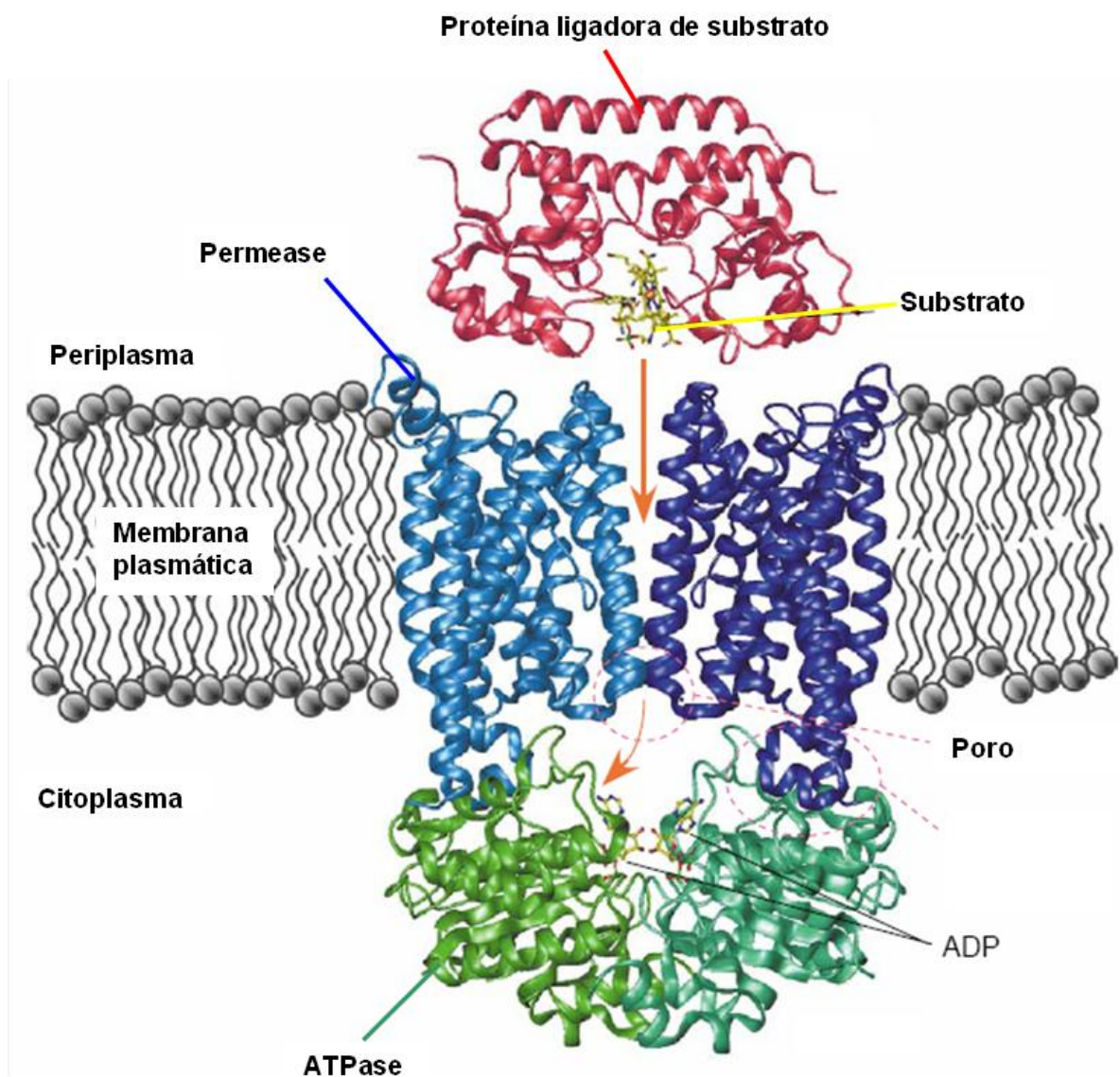
de citrus (GUO e GROSSER, 2004) ou no desenvolvimento de híbridos através de cruzamentos entre espécies de citrus com espécies resistentes ao cancro cítrico (VILORIA *et al.*, 2004).

### **1.3 Sistemas de transporte do tipo ABC**

Os 3 domínios (Arqueas, Bactérias, Eucariotos) possuem os sistemas de transporte do tipo ABC envolvidos na importação e exportação de diversas substâncias e em processos celulares, como também em sua regulação (DASSA e BOUIGE, 2001).

Em bactérias estes sistemas são constituídos por três componentes funcionais e estruturais. Dois componentes apresentam-se associados à membrana citoplasmática enquanto o terceiro, e último, mostra-se solúvel nas bactérias Gram-negativas, ou associado à membrana citoplasmática no lado exterior nas bactérias Gram-positivas (Figura 2).

membrana externa



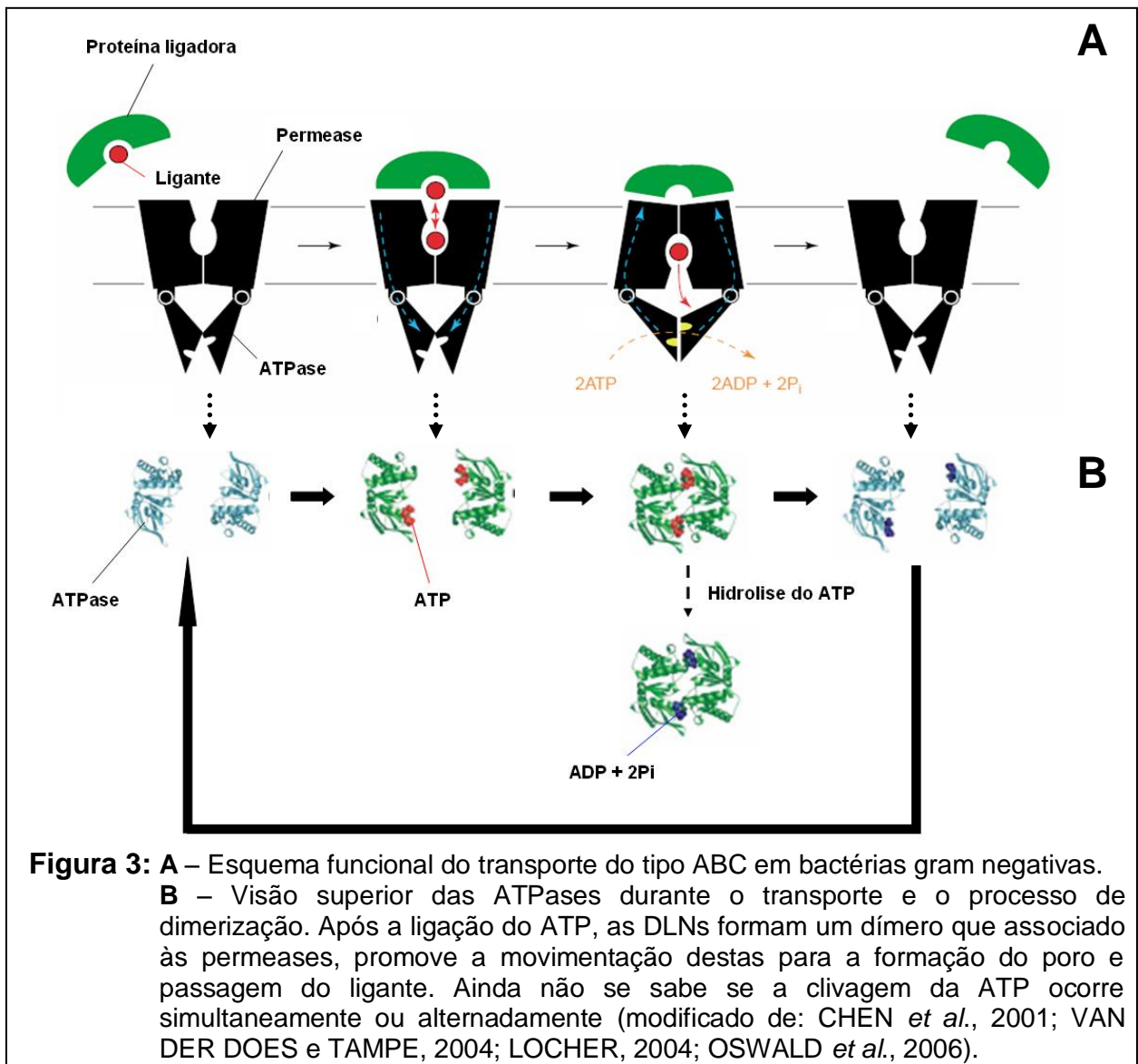
**Figura 2:** Esquema da organização estrutural dos componentes formadores de um transporte do tipo ABC em bactérias gram-negativas (modificado de: LOCHER, 2004; [http://www.genome.jp/dbget-bin/show\\_pathway](http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway)).

Um dos componentes associados à membrana é responsável pela formação do poro pelo qual a substância será transportada. Esse componente é, em geral, formado por duas proteínas hidrofóbicas que atravessam a membrana citoplasmática, formando o domínio integral de membrana (DIM ou Permease). Os DIM são formados por proteínas que apresentam de quatro a oito estruturas em

forma de hélices-alfa (usualmente seis) que se organizam como homodímeros (YOUNG e HOLLAND, 1999).

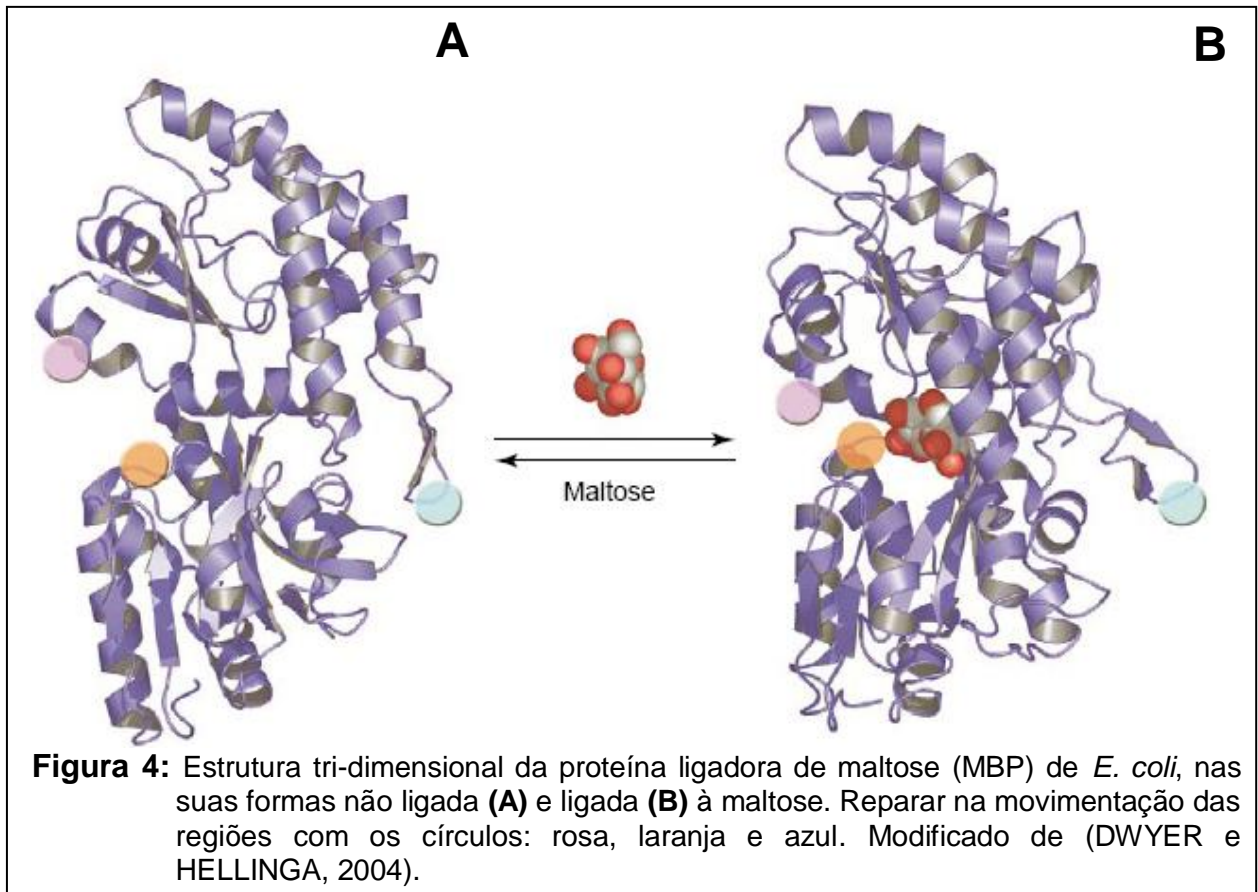
O segundo componente dos sistemas ABC de transporte de bactérias é chamado de domínio de ligação de nucleotídeos (DLN ou ATPase). É representado por proteínas associadas à face interna da membrana citoplasmática com dois domínios geradores de energia, que ligam ATP e o hidrolisam alterando a conformação protéica da(s) DIM permitindo a passagem do substrato. Os DLNs representam os elementos mais característicos e conservados dos sistemas ABC de transporte (Figura 3A e B). Acoplam a hidrólise do ATP com o processo de transporte e possuem várias seqüências conservadas que compartilham de 30 a 40% de identidade com ortólogos (YOUNG e HOLLAND, 1999).

Duas dessas seqüências são denominadas motivos Walker A e Walker B, constituídos pelos aminoácidos GPSGSGKS e VLLLDEP, respectivamente, altamente conservados nas proteínas que hidrolisam ATP e delimitam concavidades na qual a molécula de ATP se acomoda. Existe um outro domínio menor, exclusivo das ATPases de procariotos, onde se encontra uma terceira região formada por 5 aminoácidos (LSGGQ), conhecida como “Motivo C” ou “seqüência assinatura”, também bastante conservada nessas proteínas. Mutações nessas regiões reduzem ou impedem o transporte. O elevado grau de conservação dessas seqüências permite a identificação presuntiva de transportadores ABC em genomas bacterianos (DAVIDSON, 2002; LINTON e HIGGINS, 1998; BRAIBANT *et al.*, 2000; JONES e GEORGE, 1999; DAVIDSON e CHEN, 2004).



O terceiro e último componente, envolvido com a interação ao ligante, é a proteína ligadora periplasmática (PBP), responsável pela especificidade e afinidade do sistema. Em bactérias gram-negativas, esse componente é solúvel e encontra-se livre no periplasma enquanto que em bactérias gram-positivas são encontrados na forma de lipoproteínas ancoradas à face externa da membrana citoplasmática (DASSA, 2000). Em geral as PBPs possuem 2 domínios conectados por uma alça que formam uma fenda onde o substrato é encaixado, portanto podendo adotar duas conformações estruturais. Uma quando ligada ao substrato e outra sem o substrato (DWYER e HELLINGA, 2004) (Figura 4A e B).





Os diversos componentes dos transportadores ABC bacterianos são codificados por múltiplos genes, que codificam polipeptídeos independentes e que se apresentam na forma de operons (YOUNG e HOLLAND, 1999). A importância desses sistemas pode ser avaliada pelo número de genes do transporte tipo ABC identificados nos diversos genomas seqüenciados de bactérias (Tabela 1). A variedade e quantidade de sistemas de transporte refletem a versatilidade que esses microrganismos desenvolveram para se adaptar às mudanças no ambiente e utilizar diferentes nutrientes.

**Tabela 1:** Panorama das diferentes proteínas transportadoras identificadas nos genomas de diversas bactérias (modificado de <http://www.membranetransport.org/index.html>).

	<i>B. subtilis</i> 168	<i>E. carotovora</i> SCRI1043	<i>E. coli</i> K12-MG1655	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	<i>S. flexneri</i> 2a 301	<i>S. typhimurium</i> LT2	<i>X. axonopodis</i> pv. citri 306	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	<i>Y. pestis</i> CO-92
Tamanho do genoma (Mb):	4,2	5,06	4,6	6,3	6,1	6	4,7	4,8	5,17	2,68	4,65
Total de Proteínas Transportadoras:	290	354	351	428	380	317	316	343	199	77	292
<b>1 - Dependentes de ATP</b>	<b>87 (30%)</b>	<b>118 (33%)</b>	<b>72 (21%)</b>	<b>132 (31%)</b>	<b>124 (33%)</b>	<b>124 (39%)</b>	<b>78 (25%)</b>	<b>83 (24%)</b>	<b>50 (25%)</b>	<b>26 (34%)</b>	<b>111 (38%)</b>
<b>1a – Transportadores ABC</b>	<b>82 (94%)</b>	<b>113 (95%)</b>	<b>67 (93%)</b>	<b>124 (94%)</b>	<b>117 (94%)</b>	<b>119 (96%)</b>	<b>73 (93%)</b>	<b>76 (91%)</b>	<b>47 (94%)</b>	<b>25 (96%)</b>	<b>105 (94%)</b>
2 - Proteínas de Canal	5 (2%)	8 (2%)	15 (4%)	18 (4%)	17 (4%)	15 (5%)	14 (4%)	16 (5%)	13 (7%)	6 (8%)	12 (4%)
3 - Sistema Fosfotransferase (PTS)	21 (7%)	28 (8%)	29 (8%)	6 (1%)	5 (1%)	4 (1%)	28 (9%)	29 (8%)	5 (3%)	3 (4%)	20 (7%)
4 - Transporte Secundário	175 (60%)	197 (56%)	231 (66%)	267 (62%)	231 (61%)	170 (54%)	192 (61%)	212 (62%)	127 (64%)	39 (51%)	144 (49%)
5- Não Classificado	2 (1%)	3 (1%)	4 (1%)	5 (1%)	4 (1%)	4 (1%)	4 (1%)	3 (1%)	4 (2%)	3 (4%)	5 (2%)

Cerca de 25% das proteínas transportadoras que a *X. citri* sintetiza são dependentes de ATP, das quais 94% pertence ao sistema de Transporte do tipo ABC (<http://www.membranetransport.org>). A comparação entre os genomas de *X. citri* e *X. campestris* mostrou homologia de 70% (DA SILVA *et al.*, 2002), apesar de ambas apresentarem mecanismos de infecção e patogenicidade diferentes. A busca por genes envolvidos com os sistemas de transporte ABC revela transportadores em comum, como alguns de açúcares e molibdato, mas também, grupos de transportadores presentes somente em uma das espécies, como o transportador de alceno sulfonatos (*ssuABC2*). Dado que estes transportadores são importantes vias de entrada de nutrientes e substâncias para dentro da célula, é plausível imaginar que eles possam desempenhar funções diferenciadas nos mecanismos de infecção apresentados pelas bactérias.

#### 1.4 A proteína SsuA2 de *X. citri*

O gene *XAC3198* (Identificação Gênica: 21243924) identificado no genoma de *X. citri* mas não no de *X. campestris*, codifica uma possível proteína ligadora do sistema de transporte do tipo ABC, denominada SsuA2, cuja função seria a captação de alceno sulfonatos, função atribuída apenas com base em homologia de seqüências de aminoácidos entre os ortólogos. Neste caso, a SsuA2 de *Xac* pertence à Classe 3 do sistema de proteínas ligadoras, (BPD - “Binding Protein Dependent” ou SBD - “Substrate Binding protein-Dependent”), à família de captação de Minerais e Íons Orgânicos (MOI) e, finalmente, ao grupo *ssu* (sulphate-sulphur utilization) responsável pela captação de sulfato segundo a classificação de DASSA e BOUIGE, 2001.

No genoma da *X. citri* também foram identificados os genes *XAC0849* e *XAC0829*, sendo que o primeiro codifica a proteína hipotética transportadora de sulfonato denominada SsuA1, um parólogo da SsuA2, cuja função no metabolismo de *E. coli*, foi caracterizada funcionalmente (EICHHORN *et al.*, 2000). A proteína sintetizada pelo gene *XAC0829* tem homologia de domínio com proteínas hipotéticas com função de captação de sulfato ou taurina.

Em *Xac*, as proteínas codificadas por estes genes tiveram suas funções anotadas como transportadora de sulfato e nitrato (Tabela 2). Além dos genes citados, *X. citri* possui o operon do sistema de transporte ABC para captação de oligopeptídeos (*oppABCD*) e genes que codificam proteases, sugerindo que a bactéria pode apresentar diferentes estratégias para a assimilação de nutrientes (DA SILVA *et al.*, 2002). De fato, Mehta e Rosato (2005) mostraram que transportadores ABC para captação de açúcares e aminoácidos foram ativados durante o processo de infecção da planta.

**Tabela 2:** Proteínas hipotéticas periplasmáticas pertencentes à família dos transportadores ABC, cujos genes foram identificados nos genomas das bactérias de *X. citri*, *X. campestris*, *X. vesicatoria* e *X. oryzae*.

Organismo	Nome do gene	Proteína periplasmática do sistema de transporte do tipo ABC ligadora de	Identificação	Código do gene
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306	<i>ssuA1</i>	Alcano sulfonato	GeneID: 1157269	XAC3198
	<i>ssuA2</i>	Nitrato	GeneID: 1154920	XAC0849
	Sem nome	Sulfonato/nitrato/taurina	GeneID: 1154900	XAC0829
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Sem nome	Sulfonato/nitrato/taurina	GeneID: 999151	XCC0774
	<i>Sbp</i>	Sulfato	GeneID: 1001483	XCC0940
	<i>nasF</i>	Nitrato	GeneID: 998621	XCC2005
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Sem nome	Sulfonato/nitrato/taurina	GeneID: 3731769	XCV0882
	<i>nasS</i>	nitrato	GeneID: 3732654	XCV2091
	<i>cysP</i>	tiosulfato	GeneID: 3729241	XCV1047
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Sem nome	sulfonato/nitrato/taurina	GeneID: 3264763	XOO3768
	<i>Sbp</i>	sulfato	GeneID: 3264392	XOO3690

[http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www\\_bget?ko:K02051](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K02051)

Outros genes que codificam transportadores de nitrato, sulfato, alcano sulfonatos, taurina, também foram identificados nos genomas de *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexneri*; *Pseudomonas putida*; *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, *Acinetobacter sp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Methylobacillus flagellatus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Ralstonia eutropha* indicando alto grau de conservação ([www.genome.jp](http://www.genome.jp), <http://au.expasy.org>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, [www.membranetransport.org](http://www.membranetransport.org)). Somente em *E. coli*, possui estudos funcionais destas proteínas (EICHHORN *et al.*, 2000). As demais, cujas funções não foram estudadas, foram denominadas hipotéticas. A exceção fica por conta da proteína *Sbp* de *S. typhimurium* que já apresenta sua estrutura tri-dimensional resolvida (PFLUGRATH e QUIOCHO, 1985) (Tabela: 3).

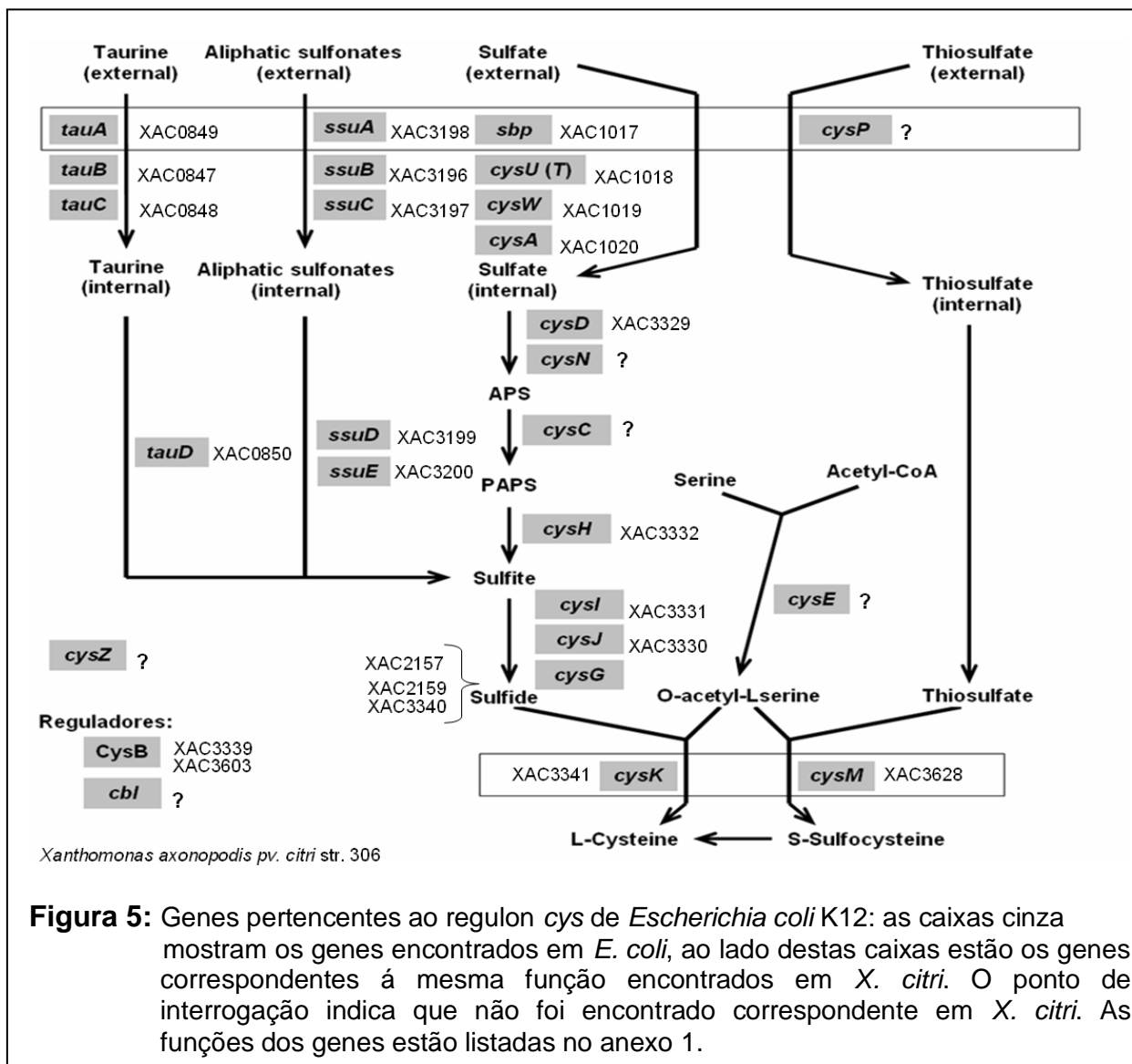
**Tabela 3:** Proteínas periplasmáticas ligadoras de sulfato/nitrato/taurina do sistema de transporte do tipo ABC em *E. coli*, *Y. pestis*, *B. subtilis* e *S. typhimurium* (retirado de [http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www\\_bget?ko:K02051](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K02051)).

Organismo	Nome do gene	Proteína periplasmática do sistema de transporte do tipo ABC ligadora de	Identificação
<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110	<i>ssuA</i>	sulfonato	GI: 89107786
	<i>tauA</i>	taurina	GI: 89107236
	<i>cysP</i>	tiosulfato	GI: 89109239
	<i>Sbp</i>	sulfato	GI: 89110112
<i>Yersinia pestis</i> CO92	<i>ssuA</i>	sulfonato	GeneID: 1176444
	<i>tauA (ssiA)</i>	taurina	GeneID: 1173027
	<i>cysP</i>	tiosulfato	GeneID: 1175837
	Sem nome	sulfato	GeneID: 1175118
	<i>Sbp1</i>	sulfato	GeneID: 1172928
<i>Bacillus subtilis</i> BG10656	<i>ssuA (ygbA, yzeA)</i>	sulfonato	GI: 2633207
	<i>ytlA</i>	sulfonato	GI: 2635543
<i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium LT2	<i>sbp</i>	sulfato	GI: 21243924
	<i>cysP</i>	tiosulfato	ID: 1253966

**OBS:** em alguns casos a proteína não possuía um ID por isso foi colocado o GI.

## 1.5 Transporte de enxofre

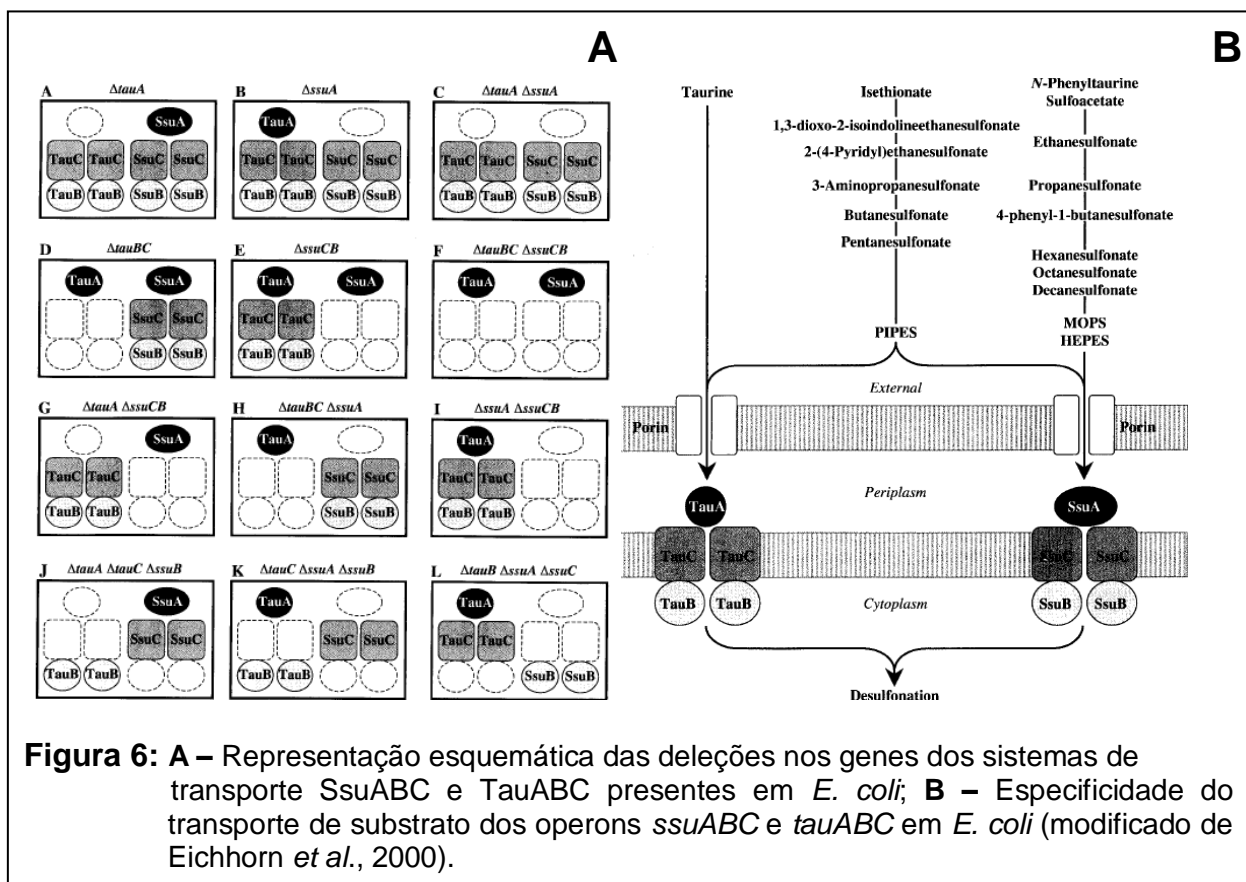
Como citado anteriormente a análise de seqüência de aminoácidos da SsuA2 mostrou alta homologia com proteínas ligadoras periplasmáticas do sistema de transporte ABC e com proteínas que pertencem à família de transportadores de alceno sulfonatos (grupo PRK11553). A assimilação do enxofre em bactérias ocorre por intermédio de diversos sistemas de transporte, inclusive os transportadores ABC. Em *E. coli*, o enxofre pode ser incorporado pelas vias de captação de sulfato tiosulfato, alceno sulfonatos e taurina pertencentes ao regulon *cys* composto por 26 genes (Figura 5) (KERTESZ, 1999; EICHHORN *et al.*, 1999, 2000, 2001 e 2002; STEC *et al.*, 2006). Em *Pseudomonas putida* (KAHNERT *et al.*, 2000) e *Bacillus subtilis* (GUILLOUARD *et al.*, 2002) também foram encontrados e estudados alguns genes do regulon *cys*.



**Figura 5:** Genes pertencentes ao regulon *cys* de *Escherichia coli* K12: as caixas cinza mostram os genes encontrados em *E. coli*, ao lado destas caixas estão os genes correspondentes á mesma função encontrados em *X. citri*. O ponto de interrogação indica que não foi encontrado correspondente em *X. citri*. As funções dos genes estão listadas no anexo 1.

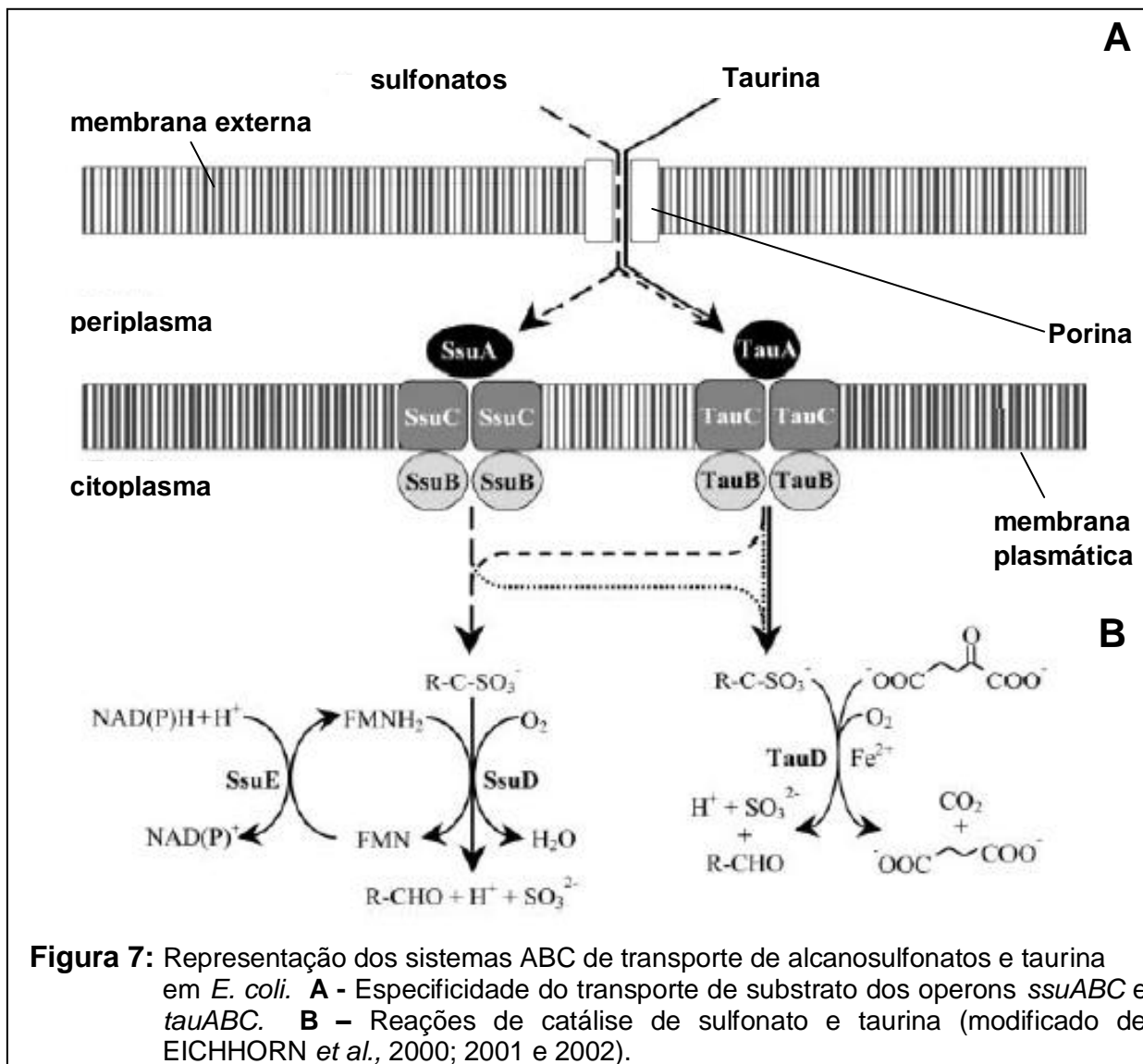
O primeiro sistema ativado para a captação de enxofre ocorre através da proteína periplasmática Sbp que liga sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e o transporta até a proteína de membrana. O segundo sistema a ser ativado, é o de captação de tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) através da proteína ligadora periplasmática CysP. As permeases são as proteínas CysT e CysW e a ATPase a proteína CysA. As proteínas CysD, CysN, CysC, CysH, CysI, CysJ, CysK, CysM e CysG são responsáveis pela incorporação do sulfato. Na limitação de cisteína, sulfato ou tiosulfato, duas outras vias alternativas podem ser ativadas: a via de transporte de alceno sulfonatos ( $\text{R-C-SO}_3^-$ ) através do operon *ssu* (Sulfonate-Sulfur Utilization), seguida pela via de transporte de taurina ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ ) pelo operon *tau* (Taurine-Sulfur Utilization) (STEC *et al.*, 2006).

Estes sistemas foram bem caracterizados funcionalmente por Eichhorn e colaboradores (2000) através de diversas combinações de deleções nos genes dos operons *ssu* e *tau* de *E. coli*. A seleção e análise dos mutantes deixaram claro o metabolismo fisiológico de enxofre assim como seu transporte (Figura 6A). Neste trabalho também foi possível identificar uma variedade de ligantes transportados pelos dois sistemas de transporte (Figura 6B).



O operon *ssuABCDE* de *E. coli* utiliza alceno sulfonatos como fonte de enxofre, que também pode ser adquirido pela célula por uma via alternativa através do operon *tauABCD* transportador de taurina (Figura 7A). Os produtos gênicos TauA e SsuA têm a função de ligantes periplasmáticos, enquanto que as proteínas SsuB/TauB e SsuC/TauC representam proteínas ligadoras de ATP (DLN) e as proteínas formadoras de poros de membrana (DIM), respectivamente. A proteína SsuD é uma monooxigenase que catalisa a conversão de sulfonatos em aldeído e sulfito (desulfonização) utilizando a FMNH<sub>2</sub> (Flavina mononucleotídeo reduzida) como fonte de elétrons, a partir da atuação da SsuE, que reduz a flavina mononucleotídeo (FMN) utilizando o NAD(P)H (nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato) (EICHHORN *et al.*, 2002). Embora esses sistemas sejam parecidos e liberam sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), cada um é responsável pela degradação de seu respectivo ligante (Figura 7B) (VAN DER PLOEG *et al.*, 1999, 1997; EICHHORN *et al.*, 2000, 2001 e 2002).

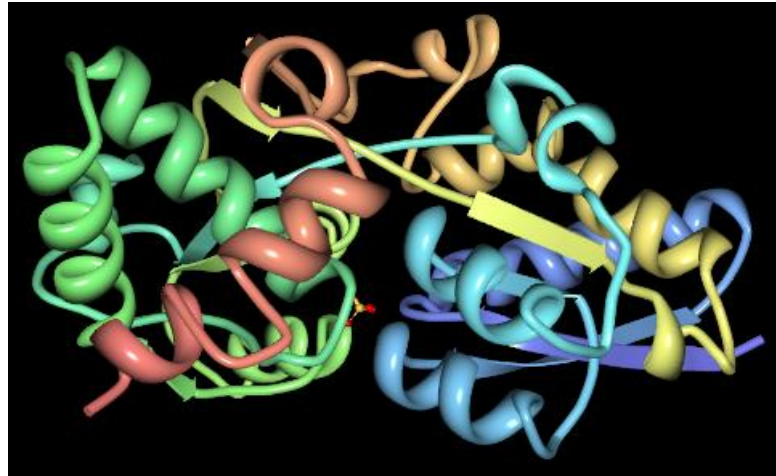


A regulação dos operons *ssu* e *tau* é realizada por duas proteínas do regulon *cys* (*CysB* e *Cbl*), da família de ativadores transcricionais *LysR*, que se ligam à região promotora dos operons. A proteína *CysB* possui dois repressores, cisteína e tiosulfato, que competem com um co-indutor (N-acetil-L-serina - NAS) (EICHHORN *et al.*, 2000). Esta proteína na forma ativa se liga ao sítio de ativação interagindo com a subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase dos promotores *cysJ*, *cysK* e *cysP* (EICHHORN *et al.*, 1999). A proteína *cysB* também se liga à região promotora do



gene *cbl*. Uma vez sintetizada, a Cbl se liga a região promotora *ssu* para sua expressão. Para a expressão do operon *tau*, há a necessidade da ligação tanto da Cbl como da CysB (co-indutor) na região promotora. A ausência da proteína Cbl na célula, faz com que as proteínas TauD, SsuE e SsuD não sejam sintetizadas (VAN DER PLOEG *et al.*, 1999, 1997; KERTESZ, 1999). Uma busca por reguladores destas famílias em *X. citri*, revelou a presença do gene *XAC3339* que codifica a proteína CysB entre outros reguladores da família LysR. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.genome.jp](http://www.genome.jp), <http://au.expasy.org>). Aparentemente, *Xanthomonas* é capaz de transportar sulfatos/sulfonatos para o interior da célula, mas não de transformá-los em sulfito e aldeídos. Por outro lado, pode-se especular que outras vias ou genes estariam envolvidos neste processo. Estes dados revelam a importância da caracterização das proteínas supostamente envolvidas neste processo, bem como o estudo funcional do sistema de captação de sulfatos/sulfonatos de forma geral e específica.

As análises estruturais já foram realizadas para as proteínas Cbl, CysB, SsuD e TauD de *E. coli* (STEC *et al.*, 2006; TYRRELL *et al.*, 1997; EICHHORN *et al.*, 2002; ELKINS *et al.*, 2002, respectivamente), e Sbp de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (PFLUGRATH e QUIOCHO, 1985). Embora a Sbp seja uma proteína periplasmática ligadora de sulfato e a SsuA2 de *Xac* tenha sido descrita como ligadora de alcano sulfonatos, a comparação de seqüências de aminoácidos entre ambas revela apenas 2% de identidade. A Sbp também é regulada pelo regulon *cys* e sua estrutura mostra características semelhantes às proteínas ligadoras periplasmáticas, como a forma elíptica composta por 2 domínios similares globulares conectados por uma alça (dobradiça) flexível formando uma fenda (Figura 8).



**Figura 8:** Estrutura 3-dimensional da proteína ligadora de sulfato, Sbp, de *S. typhimurium*. A resolução da estrutura protéica com o substrato (sulfato) ligado foi obtida por da difração por raios X com uma resolução de 1,7 Å (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1SBP>).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi expressar e purificar a proteína periplasmática SsuA2 do sistema de transporte tipo ABC de *X. citri*, em sua forma ativa e avaliar sua estrutura secundária realizando as seguintes etapas listadas abaixo:

- 3.1. Clonagem do gene *SsuA2*, no vetor de expressão pET28a;
- 3.2. Avaliação da expressão e solubilidade da SsuA2 após a variação nas condições de indução;
- 3.3. Purificação da proteína pelo método de cromatografia de afinidade a metal (níquel);
- 3.4. Produção e teste de anticorpos policlonais mono-específicos em camundongos Balb/c;
- 3.5. Ensaio espectroscópico de Dicroísmo Circular e Fluorimetria para avaliar a estabilidade e características estruturais da rSSuA2;
- 3.6. Caracterização do operon *ssu* por métodos de bioinformática;
- 3.7. Cristalização e obtenção de cristais da rSsuA2;
- 3.8. Processamento dos dados de difração e determinação dos parâmetros de célula unitária.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Linhagens e vetores**

As linhagens utilizadas neste trabalho foram: *E. coli* BL21(DE), *E. coli* XL1Blue, *X. axonopodis* pv. *citri* (306) e *X. campestris* pv. *campestris* (projeto ONSA). O vetor utilizado foi o pET28a (Novagen - San Diego, CA, EUA) para expressão da proteína em *E. coli*.

### **3.2 Soluções e tampões**

As soluções e tampões comumente utilizados nos ensaios de biologia molecular foram preparados segundo Sambrook *et al.* (1989).

### **3.3 Isolamento de DNA genômico de *Xac***

Culturas bacterianas foram crescidas em 3 mL de meio por 18h a 37°C sob agitação e alíquotas de 0,5 mL foram coletadas por centrifugação a 10000 x g por 10 min e ressuspensas em 0,5 mL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP) para extração segundo o protocolo descrito por Llop (1999). A suspensão foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 1 h. Após a centrifugação a 5000 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e adicionado de 300 µL de isopropanol. O material foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por mais 1h para precipitação do DNA total e centrifugado por 10 min a 13000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e após a secagem do DNA, este foi ressuspenso em 100 µL de água.

### **3.4 Amplificação do gene *ssuA2***

O fragmento do gene de interesse foi amplificado a partir do DNA genômico de *X. citri*. As seqüências dos oligonucleotídeos foram desenhadas a partir da respectiva seqüência gênica (GI: 21243924). Para possibilitar a clonagem direcional foram acrescentados aos oligonucleotídeos sítios de enzimas de restrição (Tabela

4). Todas as reações foram preparadas para um volume final de 50 µl com TaqDNA polimerase (Invitrogen Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante, em um termo-ciclador PTC100/MJ. Os protocolos das reações de PCR e os programas seguiram métodos padronizados, sendo que a temperatura de anelamento usada foi de 53,2°C (Tabela 5). Alíquotas de 5 µl do produto final das reações foram usadas para aplicação em gel de agarose (0,7%-0,8%), corado com brometo de etídio após eletroforese.

**Tabela 4:** Seqüência dos oligonucleotídeos usados para as reações de PCR.

PROTEÍNA (CONSTRUÇÃO) OLIGOS	SÍTIO DE RESTRIÇÃO/SEQUÊNCIA	TAMANHO (pb)
<b>SsuA2 (HT+ssuA2)</b> FssuA2Nde28a RssuA2Hind28a	<i>NdeI</i> / 5' gCg <b>CAT ATg</b> gCC gAg CCg gCg CA 3' <i>HindIII</i> / 5' gCg <b>AAg CTT</b> TCA TTT gCT CAC C 3'	903

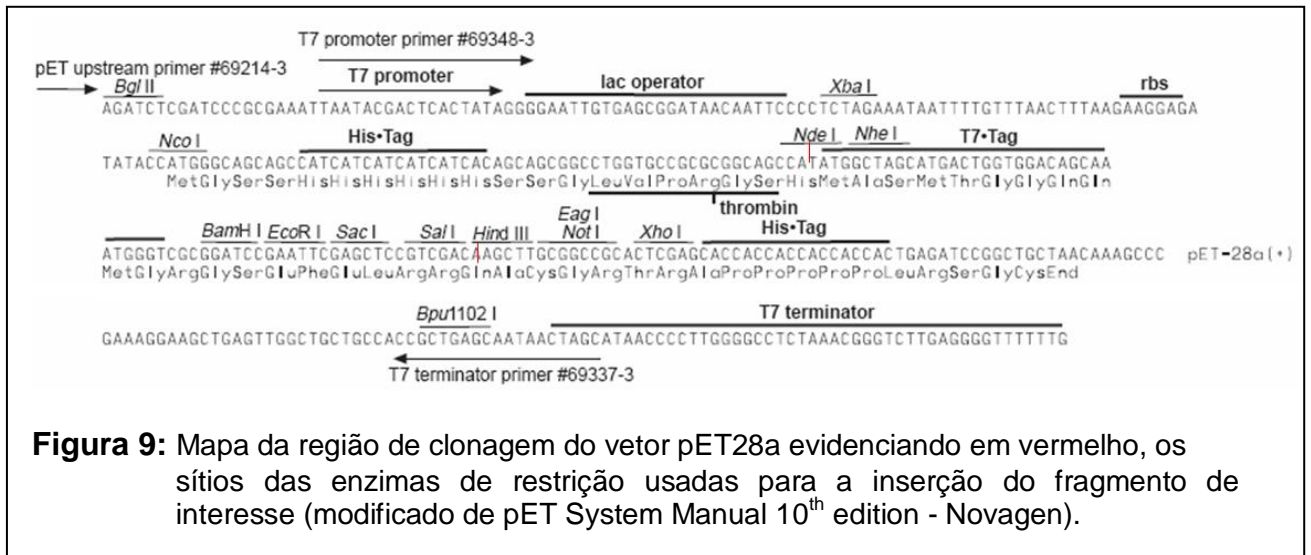
**Tabela 5:** Protocolo da reação de PCR e o programa usado.

<b>DNA (ng)</b>	200
<b>Tampão</b>	1X
<b>DNTPs (uM)</b>	150
<b>Primers (pMoles)</b>	10
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	100
<b>DMSO</b>	0,5X
<b>taq</b>	5U
<b>Água V<sub>final</sub></b>	26ul
<b>T°C</b>	53,2

### 3.5 Clonagem dos fragmentos obtidos na PCR

O gene que codifica a proteína SsuA2 em sua forma madura (sem o peptídeo sinal) foi amplificado por PCR a partir do genoma da *X. citri*, incluindo sítios de enzima de restrição *NdeI* e *HindIII* nas extremidades 5' e 3' para a clonagem direta no vetor de expressão pET28a (Figura: 9). Esse vetor permite a fusão do gene de interesse a 6 histidinas de forma a produzir uma proteína de fusão passível de purificação por cromatografia de afinidade a metal (níquel). O vetor originado, pET28a/SsuA2 foi usado para transformação de linhagens de *E. coli* BL21-DE3 para

análise de expressão e solubilidade em meio LB. Diferentes temperaturas e agitações também foram testadas com o intuito de obtermos maior quantidade de proteína solúvel.



### 3.6 Seqüenciamento do vetor pET28aSsuA2

Para a reação de seqüenciamento, foram utilizados: 5 µl de DNA plasmidiano, 1 µl do iniciador (M13 - 3,2 pmoles), 2 µl de tampão de reação “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” da “Applied Biosystems”, 6 µl de tampão de reação “Save Money” (1ml de Tris 2M; 30µL de MgCl<sub>2</sub> 1M, água Milli-Q q.s.p. 10ml) 1 µL de DMSO e 4 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q esterilizada. O programa de PCR utilizado no seqüenciamento foi: 1 – 96° C por 2 minutos; 2 - 96° C por 1 minuto; 3 - 56° C por 2 minutos; 4 - 72° C por 1 minuto e meio; 5 – Repetir por 30 vezes passos 2 a 4; 6 – 72°C por 8 minutos e meio; 7 – 4° C α. Após o término da reação de extensão os produtos foram precipitados com glicogênio.

As reações de seqüenciamento foram feitas segundo o princípio do método de Sanger *et al.* (1975 e 1977) modificado com a terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos (ddNTPS fluorescentes não radioativos) e reagentes comercializados pela Applied Biosystems (Big Dye™ Terminator Cycle sequencing Ready Reaction), cujos produtos foram analisados em seqüenciador automático (modelo 377) comercializado pela mesma firma. As seqüências obtidas foram alinhadas através de programas específicos.

### 3.7 Transformação de bactérias por eletroporação

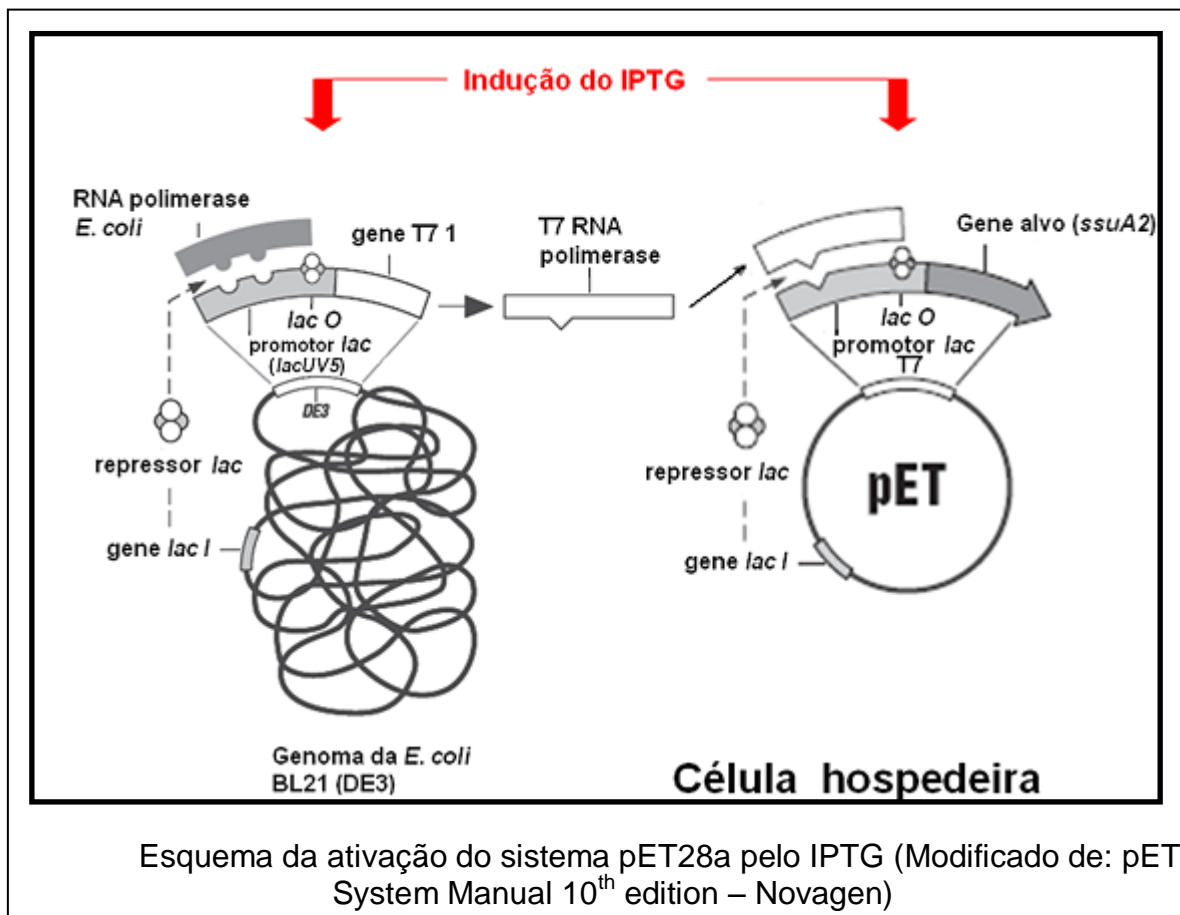
As bactérias usadas como hospedeiras dos plasmídeos foram transformadas por eletroporação. Para estoque e propagação dos vetores, foi usada a linhagem de *E. coli* XL1Blue (Stratagene) e para a expressão da proteína de interesse usamos a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) ([www.invitrogen.com.br](http://www.invitrogen.com.br); pET System Manual 10<sup>th</sup> edition - Novagen).

### 3.8 Indução da expressão do gene *ssuA2* em células de *E. coli* BL21

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi escolhida por apresentar algumas características importantes para o processo de expressão como a deleção de genes que codificam proteases (*ton* e *ompT*) e uma mutação no gene *rne131* (RnaseE) responsável pela degradação de mRNA aumentando a estabilidade de transcrição do mRNA e conseqüentemente a síntese protéica. Além destas deleções esta linhagem apresenta no genoma o gene *lacI* (DE3) e uma cópia do gene cromossomal T7 RNA polimerase (gene T7 1), importantes para a regulação da expressão da proteína de interesse.

O vetor pET28a possui os genes: *ori* (origem de replicação), *Kan* (confere resistência a canamicina e esta orientado contrariamente ao promotor *lac* T7 para evitar o aumento de seu produto gênico), *lacI* (repressor *lac* que Bloqueia o promotor *lac* T7), *lacO* (operador *lac*), promotor *lacT7* e após a clonagem, o gene alvo (*ssuA2*) ([www.invitrogen.com.br](http://www.invitrogen.com.br); pET System Manual 10<sup>th</sup> edition - Novagen).

As células portadoras do vetor de expressão contendo o gene de interesse devem expressá-lo após a adição do indutor IPTG, o qual vai ativar a região operadora (*lacO*) do promotor *lac* (*lac* UV5). Esta ativação promove a síntese de T7 RNA polimerase que ativa o promotor *lac* T7 do vetor, permitindo que o gene alvo seja expresso, conforme mostra o esquema abaixo.



Os transformantes escolhidos após a análise de restrição foram pré-analisados para a expressão da proteína de interesse em inóculos de 5 ml de meio LB acrescido de canamicina, em condições padrões: 37°C e 200 rpm durante 2 horas no shaker modelo 4430 (Innova). Após a confirmação da expressão da rSsuA2 em *E. coli*, diferentes condições foram testadas, com variações na temperatura de incubação, tempo, agitação e aeração (proporção: quantidade de meio/volume do frasco tipo erlenmeyer).

Uma vez determinada a melhor condição para expressão da proteína, ensaios de expressão em grande quantidade foram realizados. Para tal, as células portadoras do plasmídeo de interesse foram pré-inoculadas em 10 ml de LB (+50 µg/ml de canamicina) e crescidas durante uma noite a 37°C. Inóculos na proporção de 1:100 foram feitos em 2 frascos tipo erlenmeyer de 3 litros contendo 1 litro de meio LB+canamicina e as células foram incubadas a 37°C com agitação de 200 rpm até que a D.O. a 600 nm atingisse aproximadamente 0,5-0,6. Ao atingir a D.O. desejada, foi acrescentado o IPTG na concentração final de 0,1 mM, seguindo a indução a 200 rpm e 28°C durante duas horas e meia. Após este período o meio de cultura foi centrifugado a 4°C, 6.000 x g durante 20 minutos para a precipitação das



células que foram estocadas durante 16 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (pET System Manual 10<sup>th</sup> edition – Novagen).

Alíquotas de 1 ml foram retiradas antes ( $T_0$ ) e depois da indução ( $T_2$ ) e, após centrifugação a  $20.000 \times g$  por 5 minutos, os precipitados foram ressuspensos em tampão de amostra. A expressão das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE a 12,5%.

### **3.9 Extração de proteínas em condições nativas**

As células induzidas foram ressuspensas em 40 ml de tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,2, 100 mM de NaCl, 5% de glicerol e 20 mM de imidazol, acrescido de 50  $\mu\text{g/ml}$  de lisozima e uma concentração final de PMSF de 1 mM, para a lise por sonicação de 3 ciclos (4 pulsos de 15 segundos a uma amplitude de 30%) com o aparelho Branson Digital Sonifier 450 (117 V, 450 watts e 60 Khz). Após a sonicação, a amostra foi centrifugada a  $30.000 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 25 minutos, para separação das frações solúveis e insolúveis que foram aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12,5%.

Para a precipitação do DNA, 2% de sulfato de estreptomicina (Merck) foram lentamente adicionados ao extrato em um becker na câmara fria, sob banho frio com leve agitação, durante 40 minutos. Após este passo o extrato foi centrifugado novamente a  $30.000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 25 minutos. Um ml foi retirado após a sonicação e centrifugado a  $20.000 \times g$  e as frações solúveis e insolúveis foram aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12,5%.

### **3.10 Quantificação das proteínas**

As proteínas foram dosadas pelo método de Edelhoch (EDELHOCH, 1967), utilizando-se espectrofotômetro modelo ULTROSPEC 2100 pro (Amersham Biosciences) em absorvância a 280 nm. As amostras foram diluídas 50 vezes em 1/5 do tampão de amostra Tris 20 mM pH 7.0 NaCl 50 mM e 4/5 do tampão 25 mM Fosfato pH 6,5 Guanidina 7,2 M para a exposição dos cromóforos (tirosina, triptofano e cisteína).

Para o cálculo das concentrações foram utilizados os coeficientes de extinção a 280 nm da proteína, obtidos através da análise da seqüência de aminoácidos com

o programa PROTPARAM (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>). O coeficiente de extinção a 280 nm foi calculado em 47440, tanto para a proteína com HisTag, quanto para a sem cauda.

A fórmula utilizada foi: 
$$\frac{\text{D.O. a 280 nm da amostra}}{\text{Coeficiente de extinção a 280 nm}} = [ ] \text{ M}$$

### 3.11 Eletroforese em gel de acrilamida a 12,5%

A eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE a 12,5%) foi feita de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). A coloração foi realizada com azul de Coomassie e a descoloração foi através do fervimento do gel em água no forno de microondas por 3 minutos. Os marcadores de peso molecular utilizados foram: BenchMark™ Protein Leader, BenchMark™ Pré-Stained Protein Leader (Invitrogen) e Unstained Protein Molecular Weight Marker, Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

### 3.12 Purificação da proteína de fusão pelo método de cromatografia de afinidade a níquel em coluna pré-empacotada

Extratos celulares da rSsuA2 na forma solúvel foram submetidos à purificação em resina de afinidade a metal utilizando-se uma coluna HisTrap HP de 1 ml (Amersham Bioscience) com o aparelho AKTA-FPLC (Amersham Bioscience) equipado com monitor UPC-900, bomba P-920, válvula INV-907, misturador M-925 e fracionador FRAC-900-901 (GE) através do programa Unicorn 4.0. Cerca de 45 ml de extrato foram filtrados em filtro Millex 0,22 µm (Millipore) e aplicado no aparelho. A eluição foi realizada com um gradiente crescente de imidazol (20 mM a 500mM).

Os parâmetros foram utilizados conforme o manual do fabricante da coluna HisTrap HP 1ml e os tampões utilizados foram:

**Tampão A:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol

**Tampão B:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2, 500 mM NaCl, 1000 mM Imidazol

Foram empregados 5 volumes de coluna (VC) de tampão (1VC = 1 ml) para equilíbrio, 41 ml de injeção da amostra, 7 VC para lavagem da alça, 1 VC de

fracionamento e eluição gradual até 45% (30VC) do Tampão B, seguida por uma eluição a 100% do Tampão B, 5 VC com a concentração máxima de Imidazol (100% do Tampão B) para limpar a resina e 5 VC do Tampão A para re-equilibrar a coluna.

As frações coletadas foram quantificadas e analisadas em gel SDS-PAGE a 12,5%, para visualização dos resultados.

### **3.13 Concentração e diálise**

As amostras contendo proteínas purificadas foram diluídas na proporção 1:100 em Tampão Tris-Cl 20 MM pH 7,0 e NaCl 50 mM e concentradas em filtros Amicon Ultra, PLGC Ultracel-PL Membrane (Millipore) de 15 ml com a membrana com poro de 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) a 4.000 x g e 4°C (Neste filtro, teoricamente, só passarão proteínas com peso molecular menor que 10.000 Da). Em seguida as amostras concentradas foram centrifugadas a 20.000 x g a 4°C durante 20 minutos, para a retirada da proteína precipitada. As amostras coletadas foram quantificadas e analisadas em SDS-PAGE a 12,5%.

### **3.14 Clivagem da cauda de histidina (HisTag) com trombina**

Para a clivagem da cauda de histidina, a proteína rSsuA2, na concentração de 2mg/ml, foi clivada com 1% de Trombina (3 unidades) acrescida de 0,32 µl CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich). Uma amostra de 50 µL foi coletada a cada intervalo de tempo (T0 = 0 min; T1= 10 min; T2= 30 min; T3= 60 min; T4= 120 min; T5= 240 min; T6= 16 h e acrescida de 4 µL de PMSF para parar a reação. Também foram adicionados 50 µl de Tampão de Amostra para análise em SDS-PAGE a 12,5%. O controle para a verificação de uma possível interferência da trombina nos ensaios espectroscópicos foi feito seguindo o mesmo procedimento sem a proteína rSsuA2

### **3.15 Produção de anticorpos contra a rSsuA2**

Para a obtenção dos anticorpos anti-rSsuA2 foram utilizados 50 µg da proteína rSsuA2, fervida durante 5 minutos, para cada animal para cada dose, usando-se adjuvante completo de Freund (1:1). Foram realizadas 4 inoculações subcutâneas (doses) em 5 camundongos BalbC fêmeas. O intervalo de tempo entre as

doses foi de 1 mês para a 1ª dose e de 1 semana entre cada uma das doses restantes. O soro retirado do plexo oftálmico foi limpo (centrifugado), titulado e usado em ensaios de Elisa para a dosagem da IgG sérica e posteriormente para os ensaios de Western Blot.

### **3.16 Western blot**

O Western blot foi realizado para verificação da presença da proteína SsuA2 em amostras de periplasmas obtidas a partir de culturas de *X. citri* 306 crescidas em diferentes meios de cultivo. As linhagens foram crescidas em meio rico (LB) e meio mínimo (M9) a 200 RPM, 28°C durante 72 horas, na presença e ausência de taurina, sulfato, alciano sulfonatos e nitrato. Também foram realizados testes de crescimento em água de torneira, já que é conhecida a capacidade da *Xanthomonas* se manter estável nesta condição.

Os extratos celulares foram centrifugados, fervidos e aplicados em SDS-PAGE a 12,5%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas em sistema multi-seco em cuba de transferência (Pharmacia LKB Multiphor II), na corrente de 30 mA e tempo de transferência de 2:30 horas. Para bloqueio da membrana de nitrocelulose (Hybond C – Amersham Pharmacia Biotech AB) foi usado 5% de leite desnatado (Molico) em PBS pH 7,4 + 0,05% de tween durante uma noite a 4°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com PBS-Tween 3 vezes para a adição do anticorpo (anti-rSsuA2) na proporção de 1:300 µl. O tempo de incubação foi de 1 hora. O segundo anticorpo, conjugado anti-IgG-peroxidase (camundongo), foi adicionado na diluição de 1:3000 µl, incubado por 1 hora, seguido de 3 lavagens com PBS-Tween. Após este procedimento a membrana de nylon foi revelada em filme Kodak X-Omat K XK-1 13 X 18 cm com o Kit Supersignal (Pierce, Rockford, I, USA).

### **3.17 Espectroscopia**

Após a purificação e concentração da proteína de interesse, amostras de proteína foram usadas para os ensaios estruturais. Os experimentos de espectroscopia foram realizados para analisar a estabilidade da rSsuA2 de *X. citri*

em diferentes pHs e temperaturas além de verificar se a rSsuA2 sem a cauda HisTag conservava as mesmas características da proteína com a cauda.

Todos os experimentos foram realizados 3 vezes sempre com a mesma amostra, tampões, aparelhos, concentrações de proteína e ligante, método de preparo e o mesmo tempo de 20 minutos para estabilização do sistema. Os ensaios foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, sob supervisão do Dr. Carlos Ramos. Foi feita uma média com os dados de 3 experimentos diferentes e os resultados foram plotados no programa ORIGIN (Microcal).

### **3.17.1 Fluorescência intrínseca dos triptofanos**

Para as análises de fluorescência com variação do pH, foram utilizadas 2  $\mu\text{M}$  de proteína purificada. A monitoração da fluorescência foi realizada a 20°C no espectrofluorímetro (AMINCO) Bowman série 2, com o uso do programa AB2. As aberturas de onda de excitação e emissão foram de 1 e 1 nm, respectivamente. A fluorescência da proteína foi medida em um comprimento de 295 nm (triptofano) e as intensidades de emissão foram gravadas entre 310 nm e 430 nm. A cubeta utilizada foi de 1 x 1 cm (Helma).

### **3.17.2 Dicroísmo Circular**

Amostras da proteína purificada na concentração de 10  $\mu\text{M}$  foram submetidas aos ensaios de Dicroísmo Circular em tampões com diferentes pHs. Os espectros de CD foram obtidos com o espectropolarímetro JASCO J-810, calibrado. As amostras foram colocadas em cubetas com caminho óptico de 1,0 mm (Helma). Um total de 20 acumulações foram recolhidas para cada espectro na velocidade de 100 nm/min., resolução de 0,5 nm, resposta de 1 seg. e comprimento de onda 1,0 nm.

Ensaio de desenovelamento e re-enovelamento térmico também foram realizados para avaliação do comportamento da proteína. As concentrações das amostras foram de 15  $\mu\text{M}$  para o desenovelamento térmico pontual e 20  $\mu\text{M}$  para o Desenovelamento Térmico Reverso.

Os espectros de CD foram obtidos com o espectropolarímetro JASCO J-810 equipado com um controlador de temperatura tipo Peltier acoplado a um banho. As

amostras foram colocadas em cubetas com caminho óptico de 1,0 mm (Helma) e os parâmetros utilizados foram: leitura a 222nm, temperatura inicial de 20°C, temperatura final de 95°C, coleta de dados de 0.5°C, velocidade de 100 nm/min., resolução de 0,5 nm, resposta de 4 seg. e comprimento de onda 1,0 nm.

Os resultados obtidos no CD foram corrigidos e ajustados para a contribuição do tampão, e a elipsidade convertida para elipsidade residual molar através da fórmula:

$$[\theta] = \frac{\text{mdeg} \cdot \text{PM}}{\text{L} \cdot \text{NR} \cdot [\ ] \cdot 10}$$

(**[θ]**: elipsidade molar; **PM**: peso molecular em Daltons; **L**: caminho óptico da cubeta; **NR**: numero de aminoácidos; **[ ]**: concentração da proteína em mg/ml).

A predição do conteúdo de estrutura secundária foi realizada com o uso do programa CDNN (DELEAGE, 1993).

### 3.18 Bioinformática: Análises computacionais

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *XAC3198* (SsuA2) de *X. citri* 306 (NCBI gene GI: 21243924) foram obtidas pelo projeto Genoma de *Xanthomonas* (<http://genoma4.iq.usp.br/xanthomonas>).

A busca das seqüências dos ortólogos da SsuA2 foi realizada usando os programas NCBI PROTEIN e NCBI GENE do site do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), KEGG2, do Instituto Central de Bioinformática para investigação em Química da Universidade de Kyoto ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)), Expert Protein Analysis System (<http://au.expasy.org>) e MEMBRANETRANSPORT ([www.membranetransport.org](http://www.membranetransport.org)).

A proteína SsuA2 pertencente ao operon *ssu* em *X. citri* foi comparada, quanto à sua seqüência de aminoácidos a outros ortólogos presentes em outras espécies por meio de alinhamento de seqüências com o uso de programas como BLASTP (MCGINNIS e MADDEN, 2004), CLUSTALX (THOMPSON *et al.*, 1997), CLUSTALW (THOMPSON *et al.*, 1994), GENEDOC (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm>) e TreeView (PAGE, 1996). A

definição de domínios estruturais conservados foi obtida pela Busca de Domínios Conservados – CDD (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2003, 2004, 2005), programa disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>),

Os parâmetros de proteína para SsuA2 de *X. citri* com cauda e sem cauda foram calculados com o programa PROTPARAM disponibilizado no servidor de Biologia Molecular Expasy (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>).

### **3.19 Cristalização da rSsuA2**

Amostras da proteína rSsuA2 na concentração de 6 mg/ml com cauda de histidina, foram usadas para a preparação das placas de cristalização com os kits Hampton Research (Screen I e II, Grid Screen – Sulfato de Amônia), Jena Biosciences (kits 1 ao 10), Wizard 1 e 2 e NEXTAL (kits The Classics I, II, III e IV), segundo as instruções do fabricante. Utilizamos os métodos de gota sentada e gota pendente na relação de 1:1 (2 µl de proteína e 2 µl de precipitante). Foram testadas duas temperaturas de cristalização (4°C e 21°C) e o crescimento dos cristais foi avaliado com lupa Leica MZ12.5. Após o aparecimento dos cristais da rSsuA2 em determinada condição, a mesma foi refinada variando-se o pH e a concentração do precipitante.

#### **3.19.1 Adição de átomos pesados aos cristais da rSsuA**

Cristais da proteína crescidos na melhor condição de difração, foram submetidos ao método de quick-soaking para a incorporação de átomos pesados. Neste método, o cristal é embebido por cerca de no máximo 15 segundos em uma solução idêntica à solução de cristalização com a adição de 0.02 M a 0.5 M de átomos pesados. Os sais de átomos pesados usados foram Iodeto de Sódio (NaI, 0.5 M), Cloreto de Césio (CsCl<sub>3</sub>, 0.5 M), Cloreto de Gadolínio (GdCl<sub>3</sub>, 0.1 M), Cloreto de Prata (AgCl<sub>3</sub>, 0.1 M), Sulfato de Európio (EuSO<sub>4</sub>, 0.1 M), Cloreto de Samário (SmCl<sub>3</sub>, 0.1 M), Cloreto de Platina (PtCl<sub>2</sub>, 0.02 M), Acetato de Samário [Sm(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, 0.02 e 0.05 M], Cloreto de Ouro (AuCl, 0.5 M) e Nitrato de Prata (AgNO<sub>3</sub>, 0.5 M).

### 3.20 Processamento dos dados de difração dos cristais da rSsuA2

Dados cristalográficos foram coletados na linha D03B-MX1 (POLIKARPOV *et al.*, 1998a, 1998b) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil, usando um detector *MARCCD* para gravar os dados com oscilação de  $\Delta\varphi = 1.0^\circ$ . O comprimento de onda do feixe foi  $1.421 \text{ \AA}$ . Para proteção dos cristais contra o congelamento, antes da irradiação, os mesmos foram embebidos em uma solução idêntica à solução do poço acrescida de 15 % de glicerol. Durante o processo de irradiação os cristais foram mantidos em fluxo de nitrogênio a 110K para minimizar os danos da radiação. Os dados de coleta foram processados com o auxílio do Programa Mosflm e o pacote CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

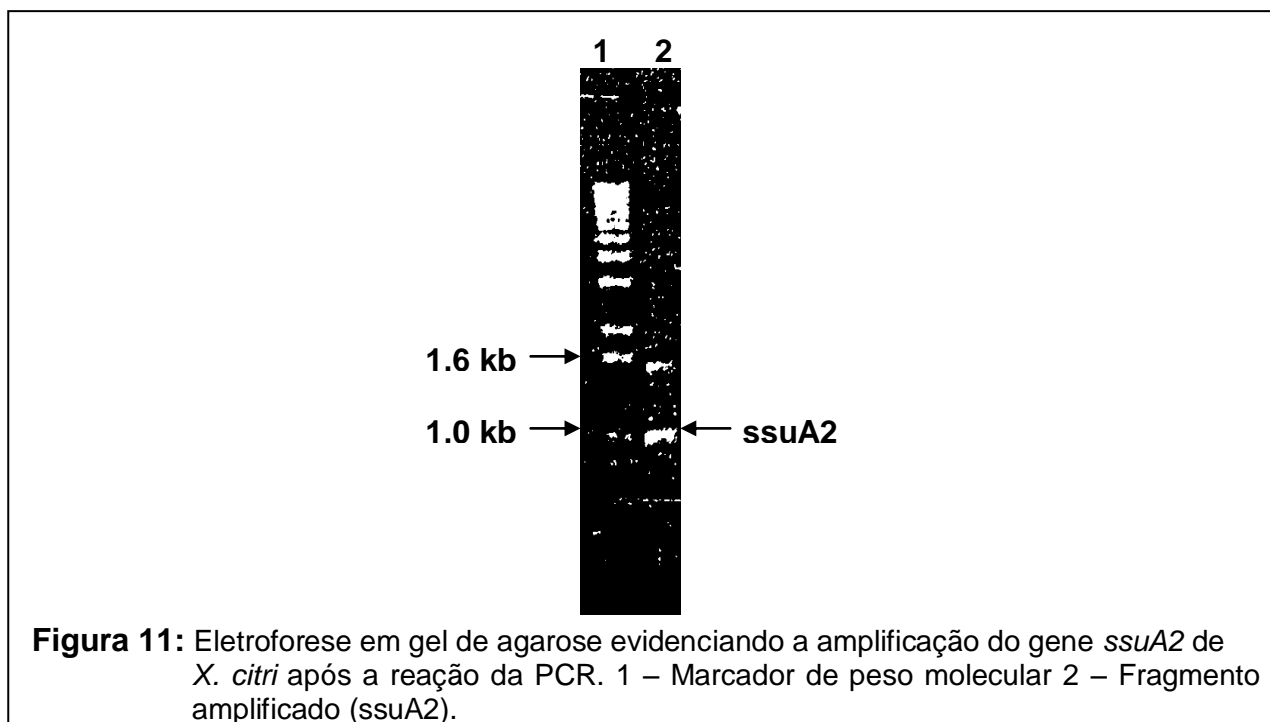


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Clonagem do gene *ssuA2* e obtenção do vetor pET28a/*ssuA2*

O gene *XAC3198* (gi:21243924 –*ssuA2*) de *X. citri* possui 1023 pb e sintetiza uma proteína com 341 aminoácidos (Figura 10 A e B). Após a reação de PCR, o fragmento referente ao gene *ssuA2* foi amplificado com o tamanho esperado, conforme mostra a figura 11. A reação de PCR também originou uma banda inespecífica de aproximadamente 1.6 kb. Neste caso, o fragmento de interesse foi eluído do gel, digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* e clonado diretamente no vetor pET28a.

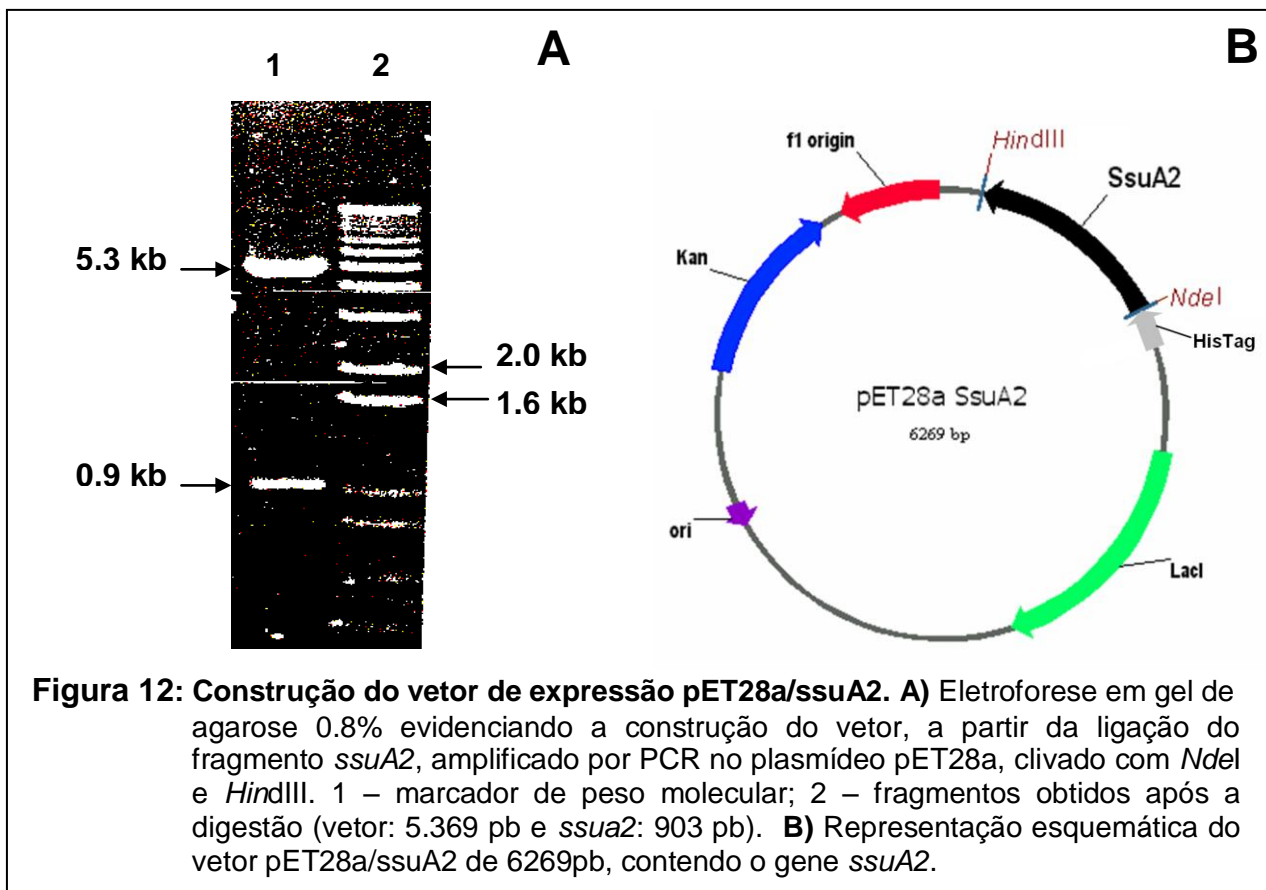




**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose evidenciando a amplificação do gene *ssuA2* de *X. citri* após a reação da PCR. 1 – Marcador de peso molecular 2 – Fragmento amplificado (*ssuA2*).

Células de *E. coli* XL1 Blue foram usadas para transformação com a mistura de ligação e a obtenção do plasmídeo recombinante foi confirmada por análise de restrição (Figura 12A). A clivagem liberou dois fragmentos referentes ao vetor vazio (5,3 kb) e o inserto contendo o gene *ssuA2* (aprox. 1,0 kb). O plasmídeo resultante foi denominado pET28a/*ssuA2* (Figura 12B). Quatro plasmídeos recombinantes foram usados para o seqüenciamento do gene *ssuA2*, sendo que todos apresentaram o gene correto sem mutações. A indução das células de *E. coli* BL21(DE3) portadoras do plasmídeo de interesse, levou à produção de uma proteína de fusão a uma cauda de 6 histidinas na região N-terminal, passível de purificação em coluna de afinidade à metal.

A estratégia de clonagem ainda envolveu a retirada da seqüência sinal (os primeiros 42 aminoácidos), avaliada no site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. O códon de início de transcrição foi originado a partir do sítio da enzima de restrição *NdeI*. Conseqüentemente, a proteína recombinante foi expressa em sua forma madura, no citoplasma das células de *E. coli* BL21(DE3), apresentando em sua região N-terminal uma seqüência adicional de 20 aminoácidos que corresponde a um fragmento do vetor que carrega a cauda de 6 histidinas.



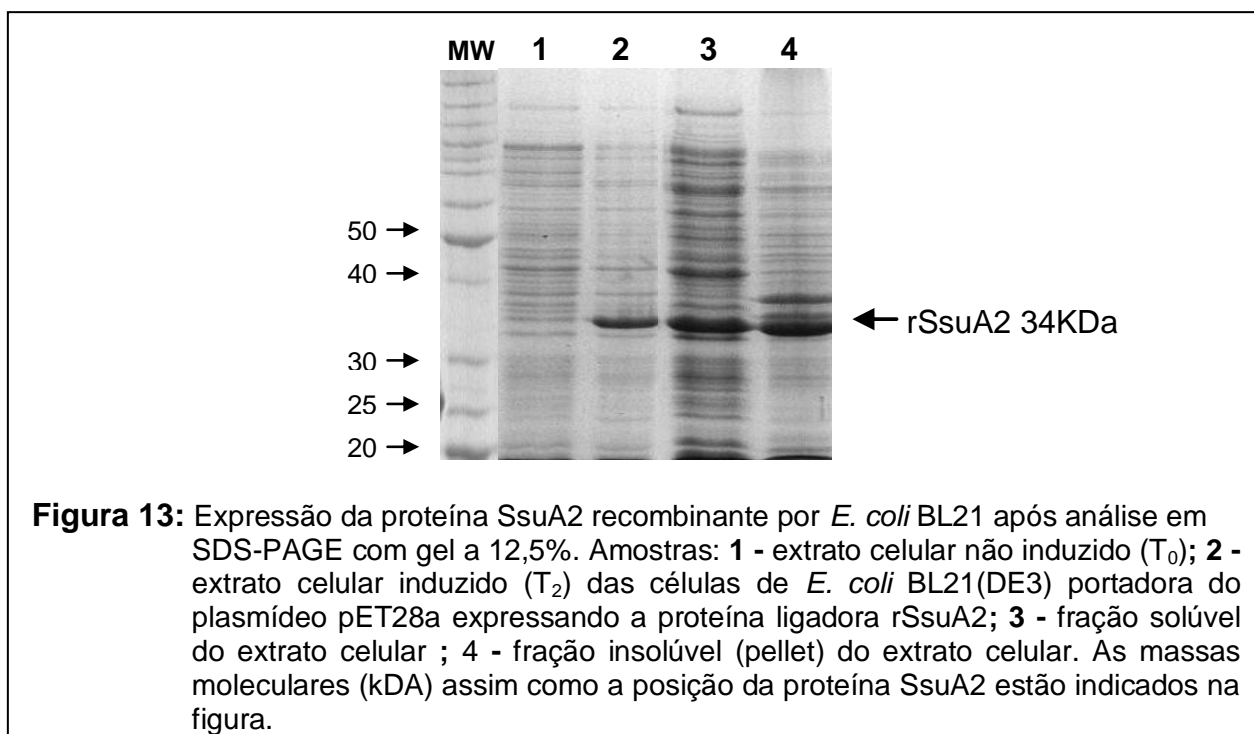
A seqüência de aminoácidos da proteína foi submetida à análise no programa ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) e os resultados revelaram que a rSsuA2 possui 320 resíduos com peso molecular de 34,089 kDa e ponto isoelétrico teórico ao redor de 10,12 (Figura 16A). A quantificação dos aminoácidos aromáticos revelou a presença de sete triptofanos (2,2%), seis tirosinas (1,9%) e nenhuma cisteína.

#### 4.2 Indução das células de *E. coli* BL21(DE3) e expressão da proteína SsuA2 recombinante (rSsuA2)

Após a obtenção e identificação dos transformantes, células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas e usadas para os ensaios de indução e expressão. Os transformantes portadores do vetor pET28a/ssuA2 foram pré-inoculados em 10 ml de meio LB com canamicina a 50 µg/ml e crescidos durante uma noite a 37°C. Inóculos foram feitos em 1 litro de meio LB+canamicina (proporção 1:100). A proteína rSsuA2 foi expressa no citoplasma das células de *E. coli* BL21(DE3), após a indução com 0,1 mM de IPTG a 37°C (Figura 13, canaleta 3), com o peso

molecular esperado de aproximadamente 34 kDa. Foram produzidos cerca de 25 mg de proteína por litro, dos quais somente 50 % se encontravam na forma solúvel (Tabela 6).

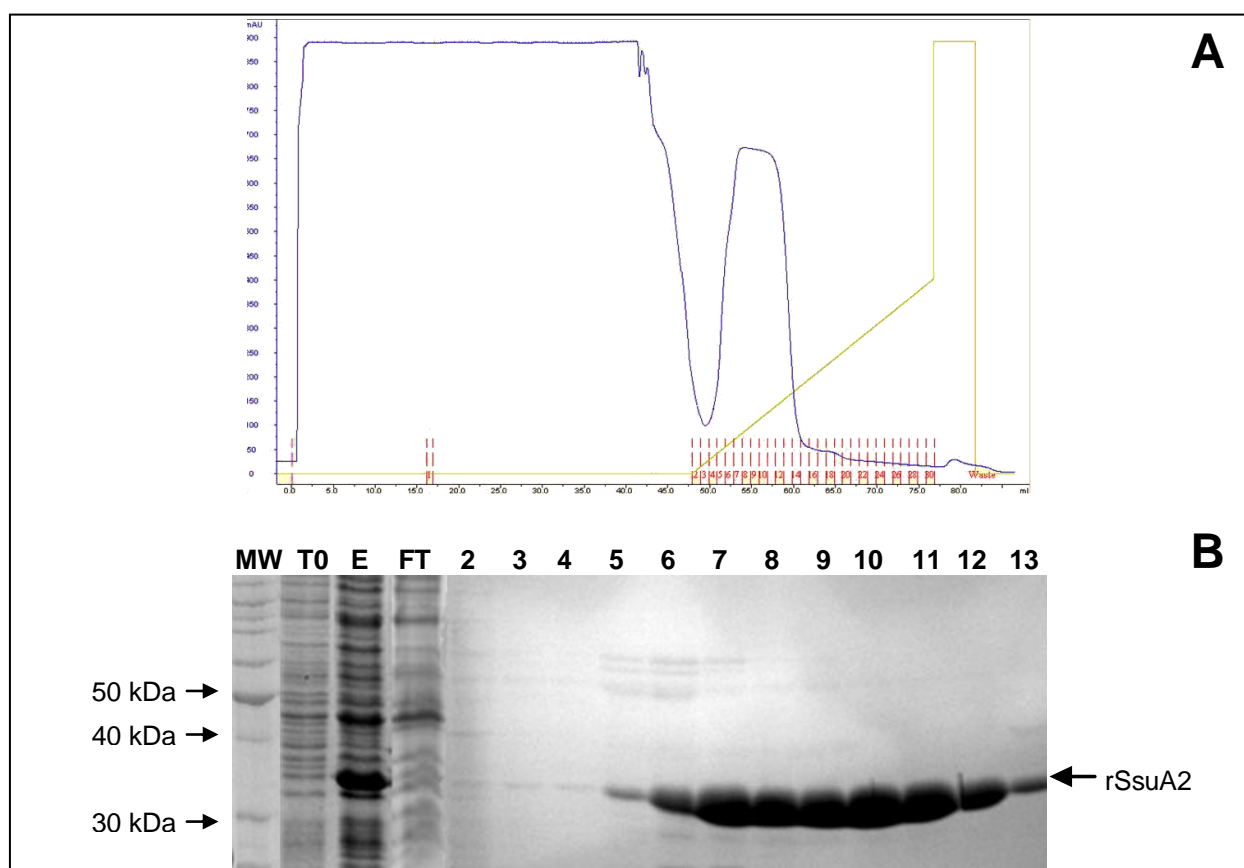
A partir da confirmação da expressão da rSsuA2, foram realizados ensaios de expressão em diferentes condições variando-se a temperatura de incubação, agitação, tempo de indução e aeração (resultados não mostrados) para verificação da melhor condição para a expressão da proteína na forma solúvel. Alíquotas de 1 ml de extrato sonicado foram centrifugadas a 20.000 x g e as frações correspondentes aos extratos solúveis e insolúveis foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12,5% mostrando que cerca de 50% da proteína recombinante expressa em *E. coli*, estava solúvel (Tabela 6) conforme mostrado na Figura 13 (canaletas 3 e 4).



#### 4.3 Purificação da proteína rSsuA2 por cromatografia de afinidade a metal imobilizado em coluna pré-empacotada

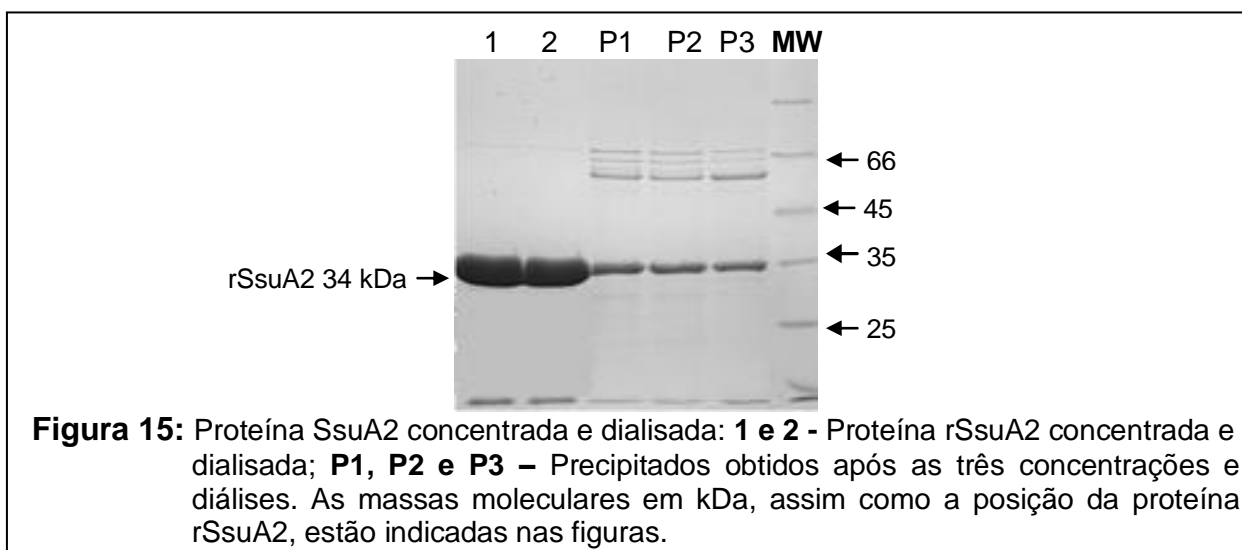
Os primeiros testes de purificação da rSsuA2 foram realizados em colunas de polipropileno com resina niquelada empacotada manualmente (purificação de bancada), mas os resultados, não foram satisfatórios (dados não mostrados).

Purificações em maior escala foram realizadas utilizando-se o aparelho AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) com a coluna HisTrap HP 1ml (Amersham Bioscience) carregada com níquel. Nessa purificação foi possível aplicar um volume maior de extrato. Os resultados estão apresentados na Figura 14. Após a saída das proteínas não aderidas à coluna (lavado) (Figura 14A, primeiro pico largo), a rSsuA2 foi eluída a partir da concentração de 3,2% de imidazol (32 mM) até 20,3% (203 mM), conforme demonstrado pela presença de um pico único (Figura 14A, pico menor, frações 5 a 13). A análise do conteúdo das frações por eletroforese em gel de poliácridamida 12,5%, mostrou que o pico referente às frações 5 a 13 corresponde à rSsuA2 purificada, com peso molecular de 34 kDa (Figura 14B). Também é possível identificar a presença de principalmente 2 proteínas contaminantes, com massas moleculares de 60 kDa e 66 kDa (Figura 14B), que diminuem a partir da fração 6. A proteína pura e concentrada após a diálise (Figura 15) foi calculada em 18 mg/L, conforme mostra a Tabela 6.



**Figura 14:** **A)** Cromatograma da purificação por cromatografia de afinidade a níquel de extratos solúveis obtidos após a indução das células de *E. coli* BL21(DE3) com IPTG. A proteína foi eluída com as concentrações de imidazol de 12% a 36%. (linha azul = proteínas (UV 280 nm), linha vermelha = frações eluídas e linha verde = concentração do tampão B com 1 M de imidazol. **B)** Eletroforese em gel de poliácridamida a 12,5% das frações obtidas após a purificação da rSsuA2. Foram aplicados no gel 10 µl de cada fração. A numeração superior corresponde ao número das frações, T<sub>0</sub>: extrato celular não induzido, E: fração solúvel do extrato celular, FT: lavado e os números às frações eluídas, respectivamente.

Após a purificação, as frações 5 à 13 foram somadas e quantificadas dando um total de aproximadamente 25.5 mg de proteína pura por 2 litros de meio cultivado (ou 12.5 mg/L) (Tabela 6). Durante a concentração e diálise das amostras, as mesmas foram centrifugadas 3 vezes a 20.000 x g, 4°C durante 20 minutos para a retirada de proteína precipitada (Figura 15: P1, P2 e P3). Cerca de 3.5 mg de proteína foram perdidos por precipitação, e no final, foram obtidas cerca de 9 mg de proteína purificada para a realização dos ensaios espectroscópicos.



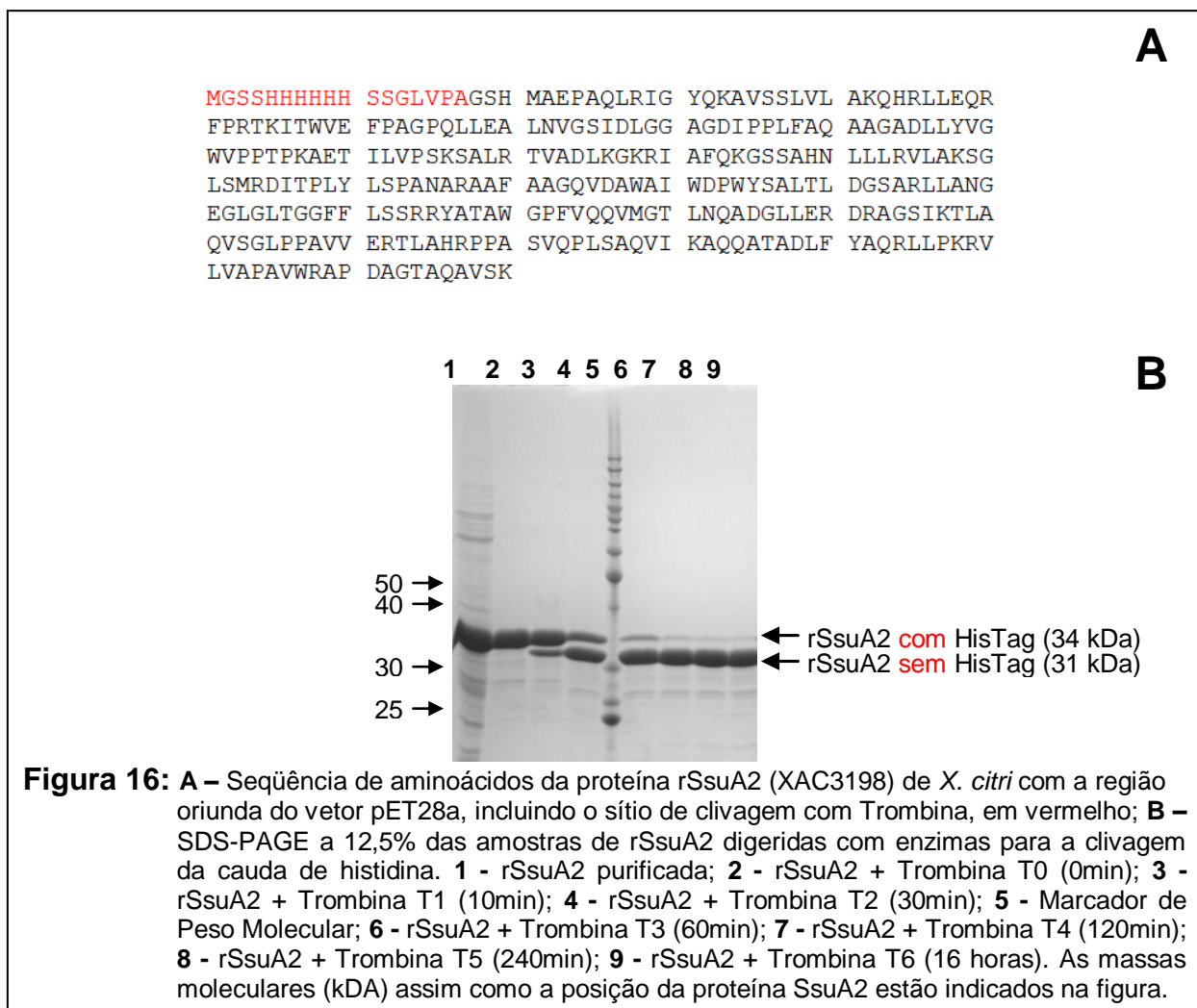
**Tabela 6:** Análise da produção e recuperação nas diferentes etapas de obtenção da rSsuA2 de *X. citri*.

ETAPA DO TRABALHO	[ ] de proteína	%
Expressão (Total)	25 mg/L	100
Extração de proteína na fração insolúvel	12.5 mg/L	50
Extração de proteína na fração solúvel	12.5 mg/L	50
Purificação	12.5 mg/L	100
[ ] final de proteína pura e dialisada	9 mg/L	72
Perda durante a diálise	3.5 mg/L	28

#### 4.4 Clivagem da cauda de histidina (6HisTag)

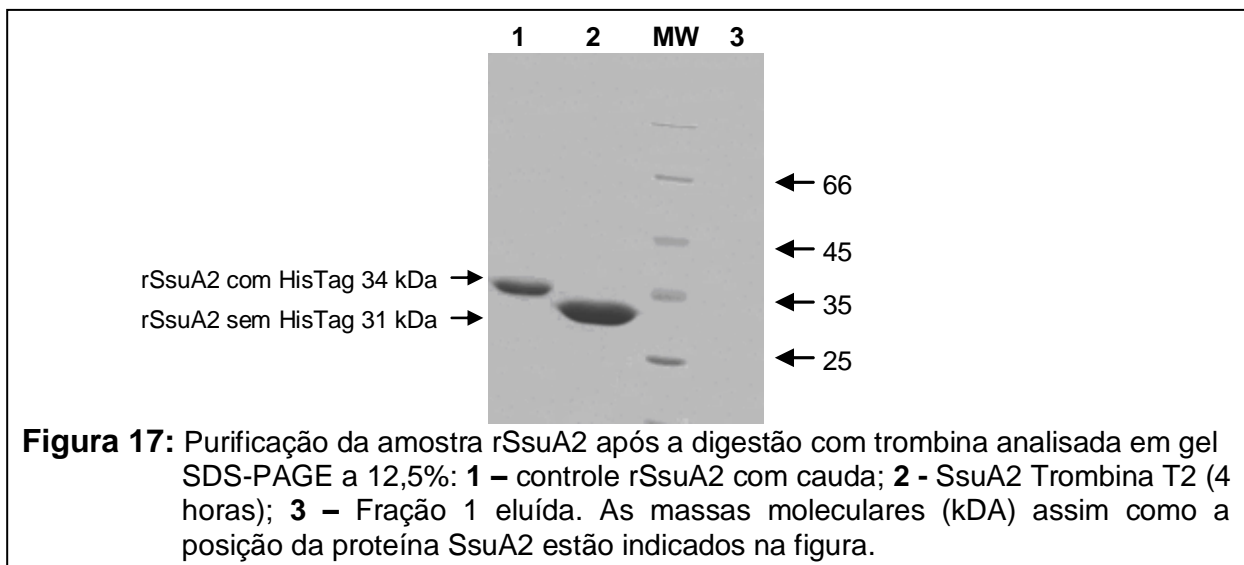
A rSsuA2 expressa em *E. coli*, foi produzida como proteína de fusão a uma cauda de histidina (Figura 16A), fundamental para os ensaios de purificação em resina de afinidade. A presença da cauda de histidina tem sido associada à uma maior instabilidade de determinadas proteínas e pode afetar os experimentos de cristalização, já que em sua maioria, esta cauda permanece desenovelada e com mobilidade. Para verificar se a presença da cauda de histidina na rSsuA2 era fator de instabilidade, amostras da proteína foram submetidas à clivagem com trombina. Os resultados mostram que a enzima foi capaz de clivar a cauda de histidina de maneira eficiente (Figura 16B).

A partir de 10 minutos de incubação já é possível visualizar o aparecimento de uma banda de aproximadamente 32 Kda (canaleta 3), o que corresponde ao tamanho teórico da rSsuA2, sem a cauda, conforme previsto no site ProtParam tool (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>). Após 2 horas (T4), toda a proteína da amostra já estava clivada (canaleta 7). Todos os ensaios de espectroscopia da proteína sem cauda foram realizados com amostras submetidas à 6 horas (240 minutos) de digestão.



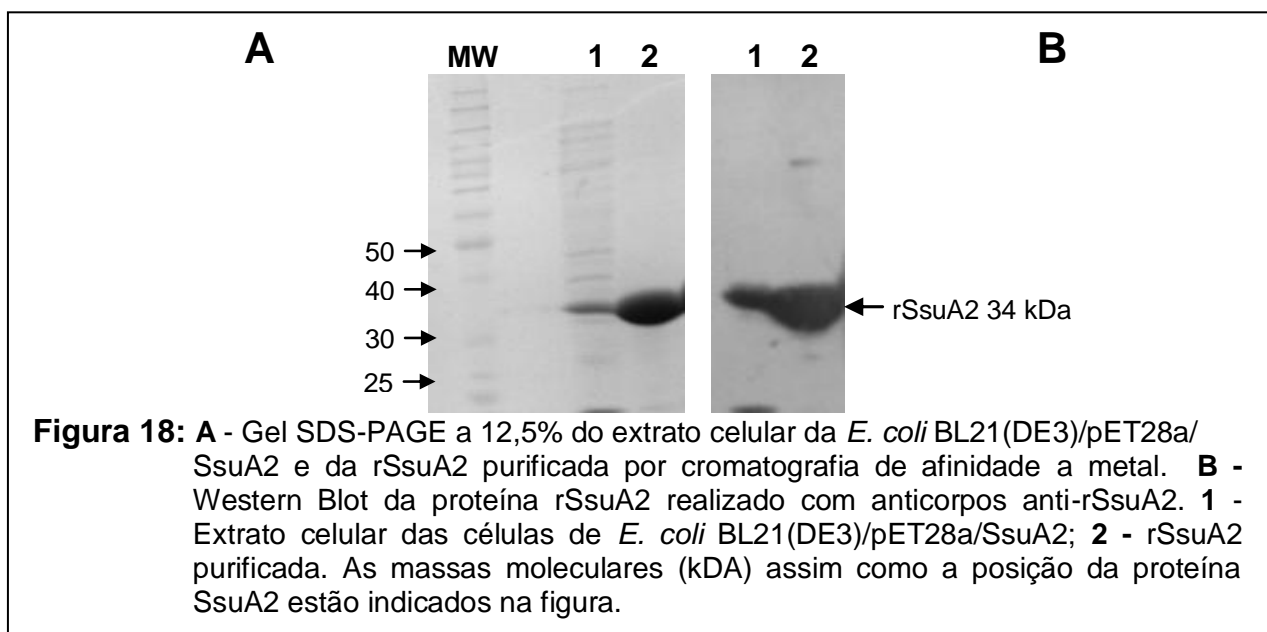
Após a clivagem da rSsuA2 com trombina, para verificar se ainda havia proteína com cauda, a amostra digerida foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em coluna pré-empacotada (foram utilizados os mesmos procedimentos do item 4.3). O resultado desta purificação é apresentado na figura 17, onde é possível notar que a proteína sem cauda saiu na amostra do lavado (canaleta 2) e que não há traços da proteína com cauda na fração eluída com imidazol (canaleta 3).





#### 4.5 Determinação da presença da SsuA2 em extratos protéicos totais de *Xanthomonas* por Western Blot

Anticorpos contra a rSsuA2, obtidos após inoculação da proteína pura desnaturada, foram capazes de identificar a proteína recombinante pura como também à proteína presente nos extratos celulares de *E. coli* BL21(DE3) portadoras do plasmídeo pET28a/SsuA2 (Figura 18A e B).

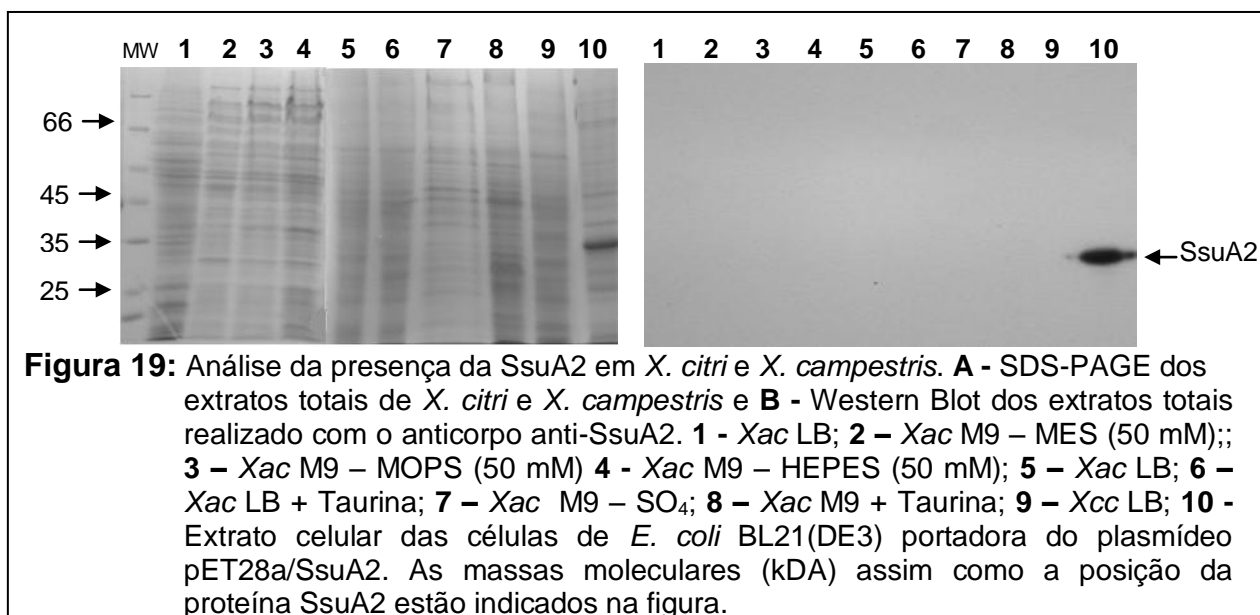


Após demonstrar o reconhecimento da rSsuA2 pelos anticorpos, os mesmos foram usados para checar a presença da proteína em extratos celulares totais de *X. citri* e *X. campestris*, obtidos a partir de culturas crescidas em diferentes meios de cultivo (Tabela 7). A linhagem de *X. citri* 306 não foi capaz de crescer em meio mínimo sem nitrogênio e em água de torneira, mas apresentou crescimento no restante dos meios, conforme apresentado na Tabela 7. Como esperado, as células cresceram mais rapidamente em meio completo LB. Para verificar a presença da SsuA2 nas bactérias, as células foram lisadas e as amostras dos extratos totais e periplasmáticos foram diluídas em tampão de amostra e analisados em SDS-PAGE a 12,5% (Figura 19A e B). Na tentativa de obtermos extratos periplasmáticos mais concentrados foram realizados dois protocolos diferentes, embora sem êxito. A presença da SsuA2, contudo, não foi detectada em nenhuma das condições analisadas, sugerindo fortemente que nas condições analisadas a proteína não é expressa *in vivo*.

**Tabela 7:** Meios e condições de crescimento das linhagens de *X. citri* e *X. campestris*.

Linhagem	Meio de Cultura								DO	
	LB	M9*	Água de torneira	- SO <sub>4</sub>	- NO <sub>3</sub>	+ taurina	+ HEPES	+MES	+ MOPS	Crescimento Bacteriano
<i>X. citri</i>	X									1,2
<i>X. citri</i>	X					X				0,6
<i>X. citri</i>		X		X		X				0,4
<i>X. citri</i>		X		X						0,3
<i>X. citri</i>		X			X					0
<i>X. citri</i>		X		X		X				0,2
<i>X. citri</i>		X		X			X			0,5
<i>X. citri</i>		X		X				X		0,7
<i>X. citri</i>		X		X					X	0,6
<i>X. citri</i>			X							0
<i>X. campestris</i>	X									0,4

\* No meio mínimo (M9) foram acrescentados: 100 ug/ml de Metionina, Prolina, Triptofano e Histidina.

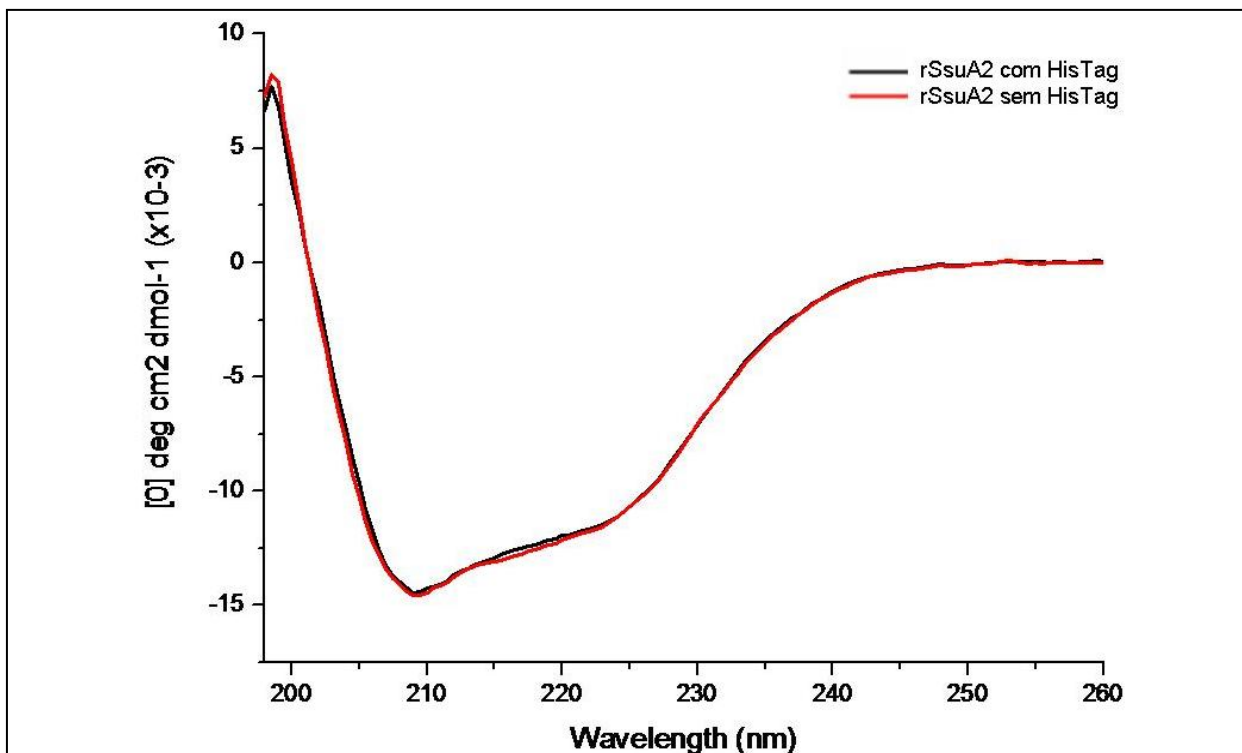


#### 4.6 Análises de Dicroísmo Circular da rSsuA2

A proteína rSsuA2 purificada foi usada nos ensaios de dicroísmo circular com os objetivos de: i) fazer uma estimativa do conteúdo de estrutura secundária, ii) analisar se a mesma encontrava-se enovelada, iii) verificar se havia diferenças entre a proteína recombinante com e sem cauda de histidina, iv) verificar a estabilidade das proteínas em diferentes pHs e v) analisar a sua estabilidade térmica.

As amostras de proteína foram utilizadas em diferentes concentrações (10, 15 e 20  $\mu$ M) dependendo do tipo de ensaio e antes de cada análise as mesmas foram deixadas à temperatura ambiente durante 20 minutos para estabilização. A termo-estabilidade da proteína rSsuA2 foi analisada com o monitoramento do sinal de CD a 222 nm durante o aumento da temperatura de 20°C a 95°C.

A Figura 20 apresenta o espectro de dicroísmo circular das amostras de rSsuA2 com e sem cauda de histidina em tampão com pH neutro (7.0), mostrando que ambas possuem picos idênticos de sinal do CD em -15 mdeg, revelando que a presença da cauda de histidina não altera o perfil do espectro. Praticamente, as duas proteínas apresentam a mesma quantidade de estrutura secundária, destacando-se apenas, um maior conteúdo de alfa-hélices na proteína com e sem cauda (40,7 % e 41,5 % respectivamente), conforme observado na Tabela 8.



**Figura 20:** Espectro de Dicroísmo Circular das amostras de rSsuA2 com (linha preta) e sem cauda (linha vermelha) de Histidina. As amostras foram diluídas na concentração de 10  $\mu$ M em tampão Tris 20 mM, pH 7.0 e NaCl 50mM. Os ensaios foram realizados a 20°C e o espectro de leitura foi de 198 a 260 nm.

**Tabela 8:** Previsão da quantidade de estrutura secundária da proteína rSsuA2 em Tris 20 mM pH 7.0, NaCl 50mM a 20°C. O programa utilizado foi o CDNN (Deléage, 1993):

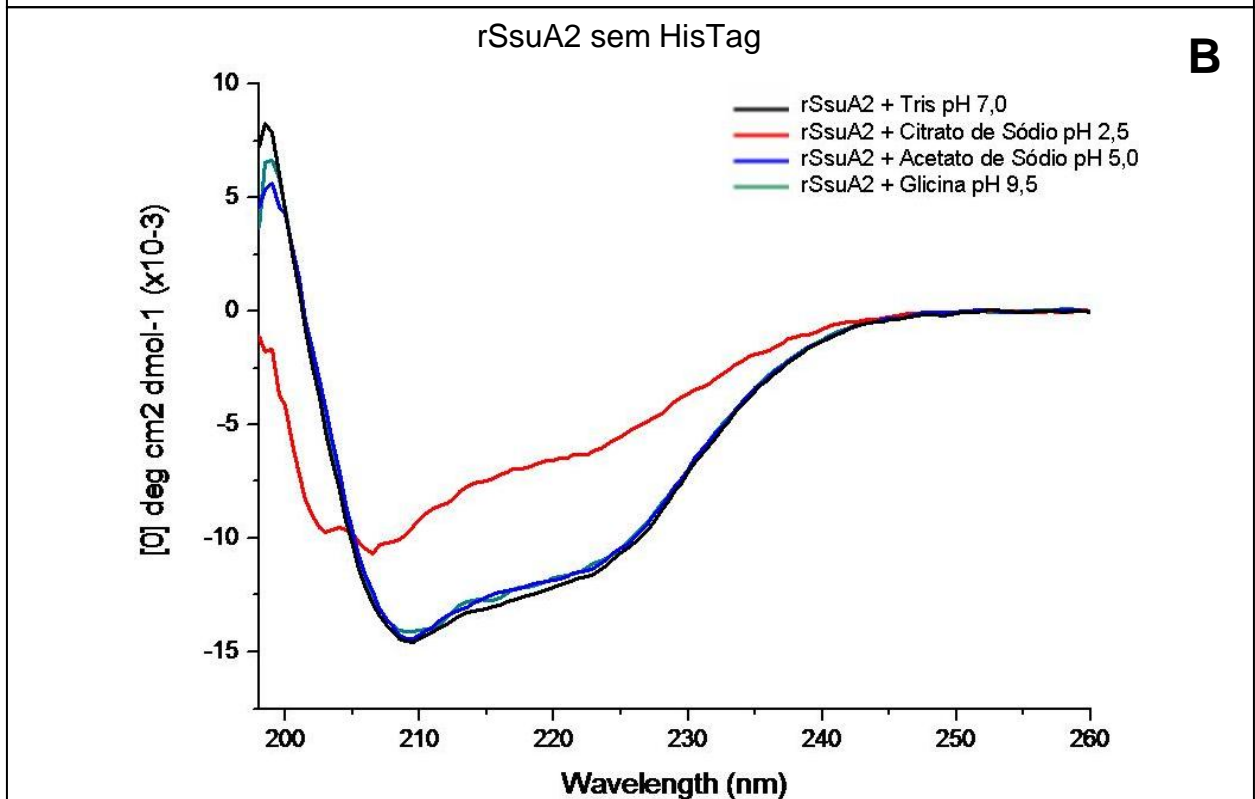
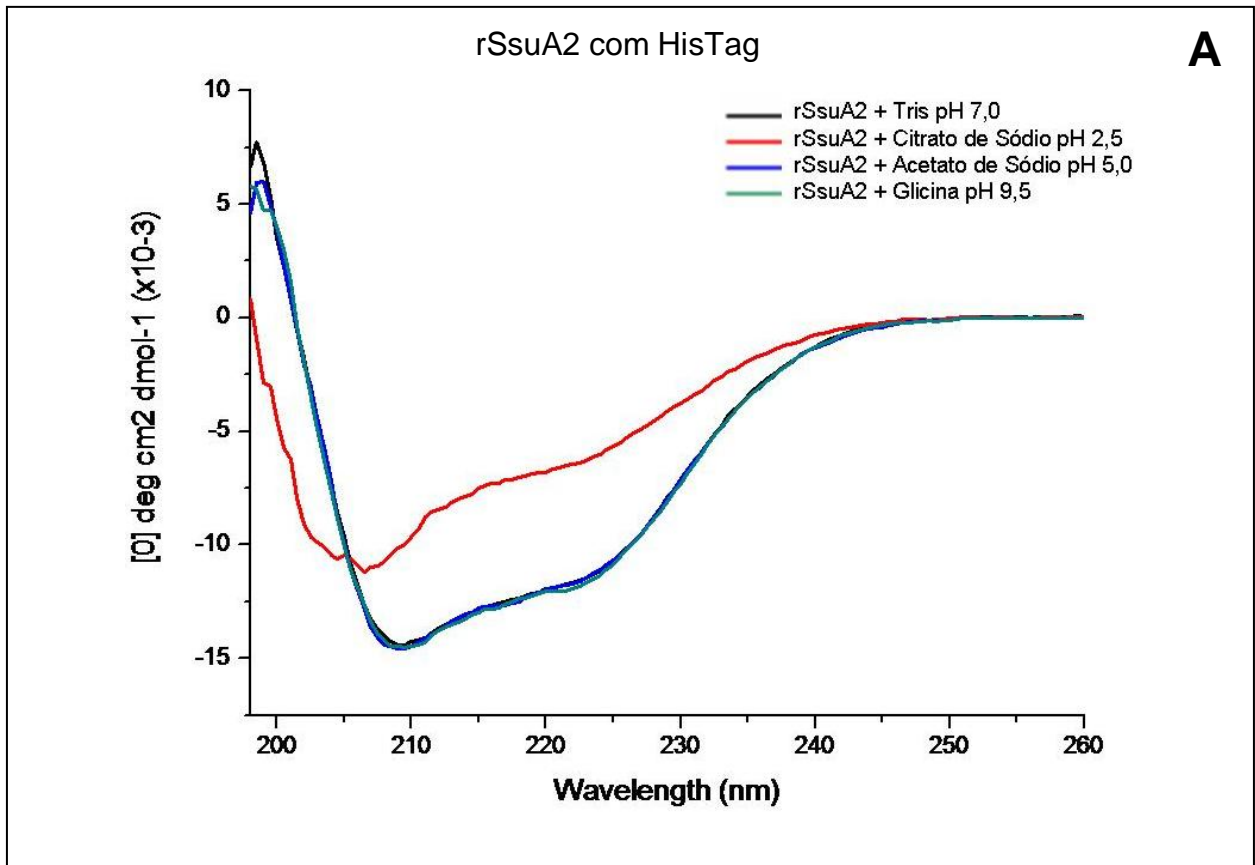
	rSsuA2	rSsuA2 - HisTag
<b>Alfa-Hélice</b>	40,7 %	41,5 %
<b>Antiparalela</b>	6,8 %	6,7 %
<b>Paralela</b>	6,9 %	6,7 %
<b>Folhas Beta</b>	15,8 %	15,7 %
<b>Alças</b>	26,8 %	26,2 %
<b>Total</b>	97,0 %	96,8 %

Em todos os experimentos a proteína apresentou um comprimento de onda de absorção molar típico de uma proteína constituída de estruturas alfa/beta (hélices alfa e folhas beta), característico de proteínas ligadoras periplasmáticas, apresentando 2 picos negativos distintos em 208 nm e 222 nm, e um positivo em 199 nm. A partir do momento em que a proteína foi submetida a diferentes pHs e

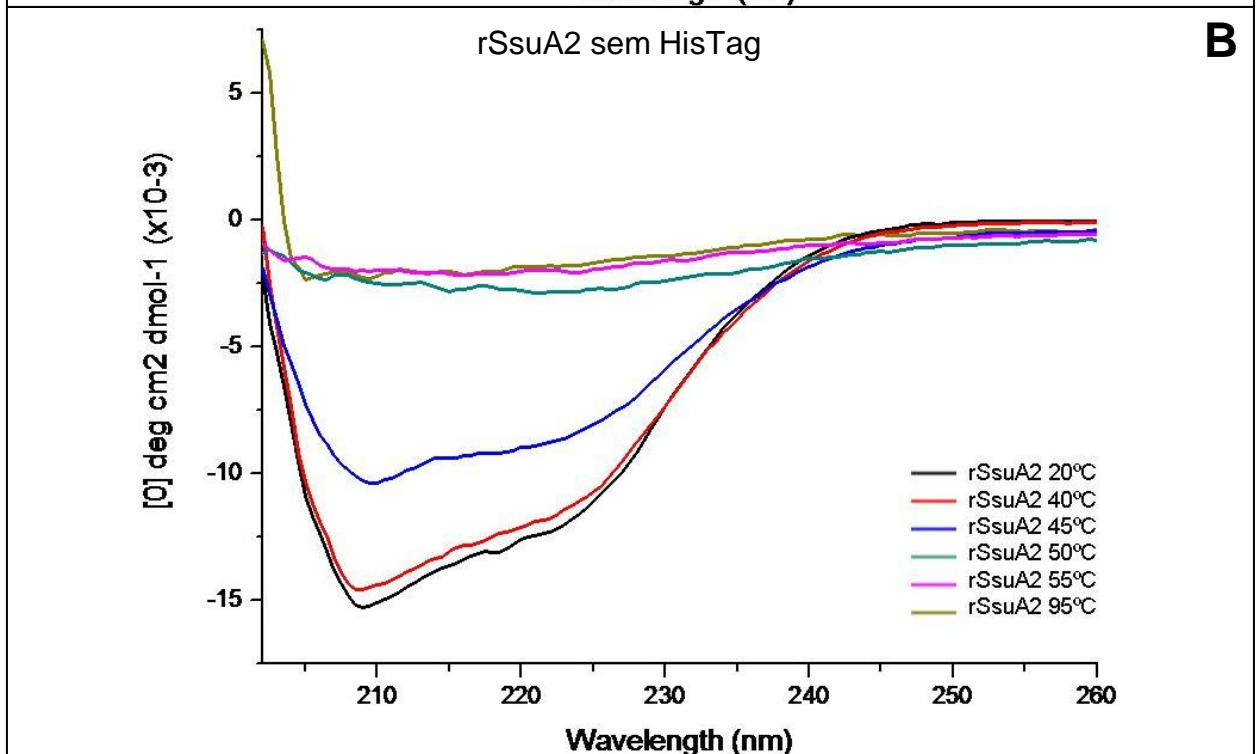
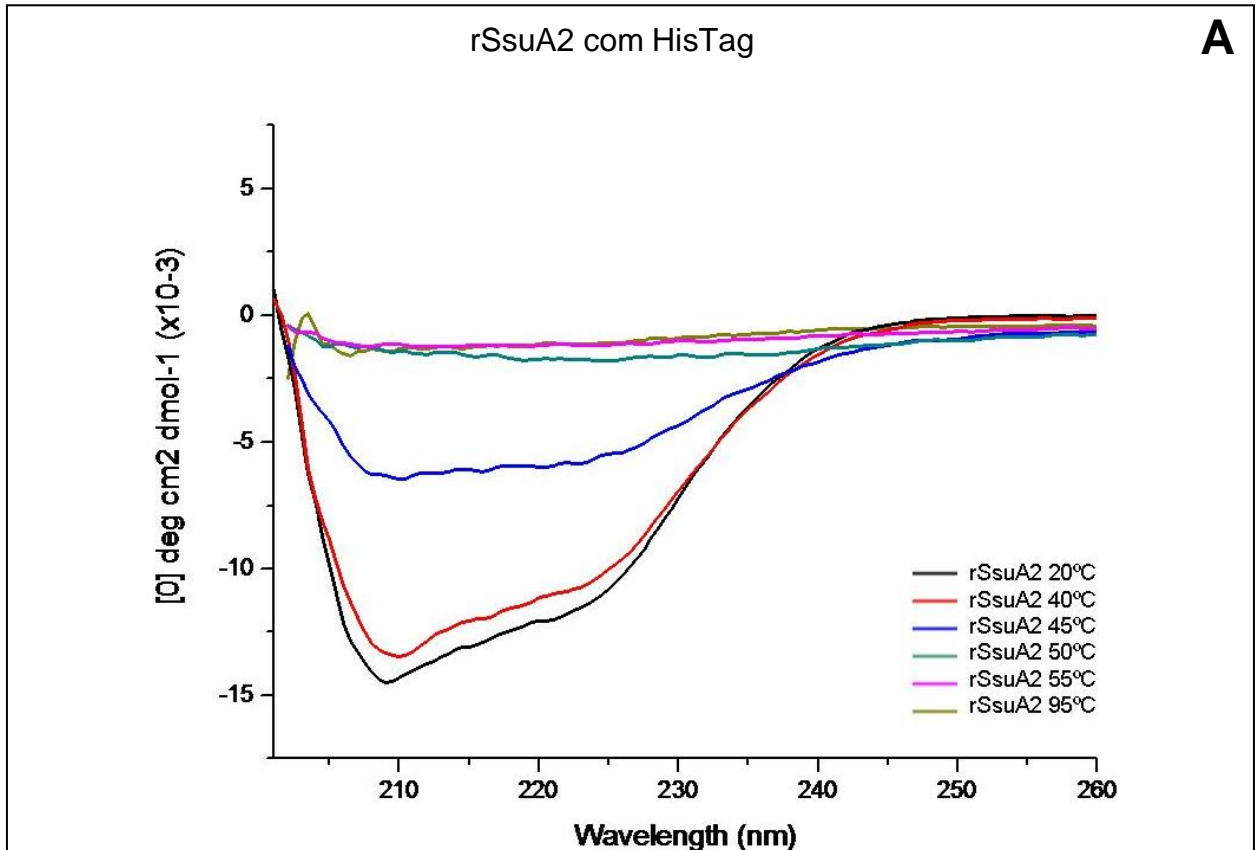
temperaturas, foi possível visualizar alterações no conteúdo de estrutura secundária nos perfis de CD, principalmente perda de hélices alfa, como medido pela diminuição de sinal nos picos negativos em 208 nm e 222 nm, e pelo deslocamento do espectro para a região positiva em 190 nm.

Os resultados da análise da estabilidade da rSsuA2 em diferentes pHs estão apresentados na figura 21 para as proteínas com e sem cauda. Novamente, observa-se que a presença da cauda de histidina não afetou a estabilidade da rSsuA2 em variação de pHs. As amostras apresentam-se estavelmente enoveladas nos pHs 5.0, 7.0 e 9,5 (Figura 21A e B). Os espectros apresentam 2 picos negativos em 208 nm e 222 nm e um positivo em 199 nm. Em pH ácido, contudo, ocorre perda de estrutura em forma de alfa-hélice (perda de sinal a 222 nm) e aumento de estruturas desenoveladas (deslocamento do espectro para a região de 190 nm). Apesar da proteína apresentar alta estabilidade, em pHs maiores do que 5.0, experimentos realizados na faixa de pH 9.5 e 10 foram comprometidos em virtude da agregação da proteína. Isto ocorreu devido ao fato deste pH ser muito próximo ao ponto isoelétrico da rSsuA2 calculado em 10.2.

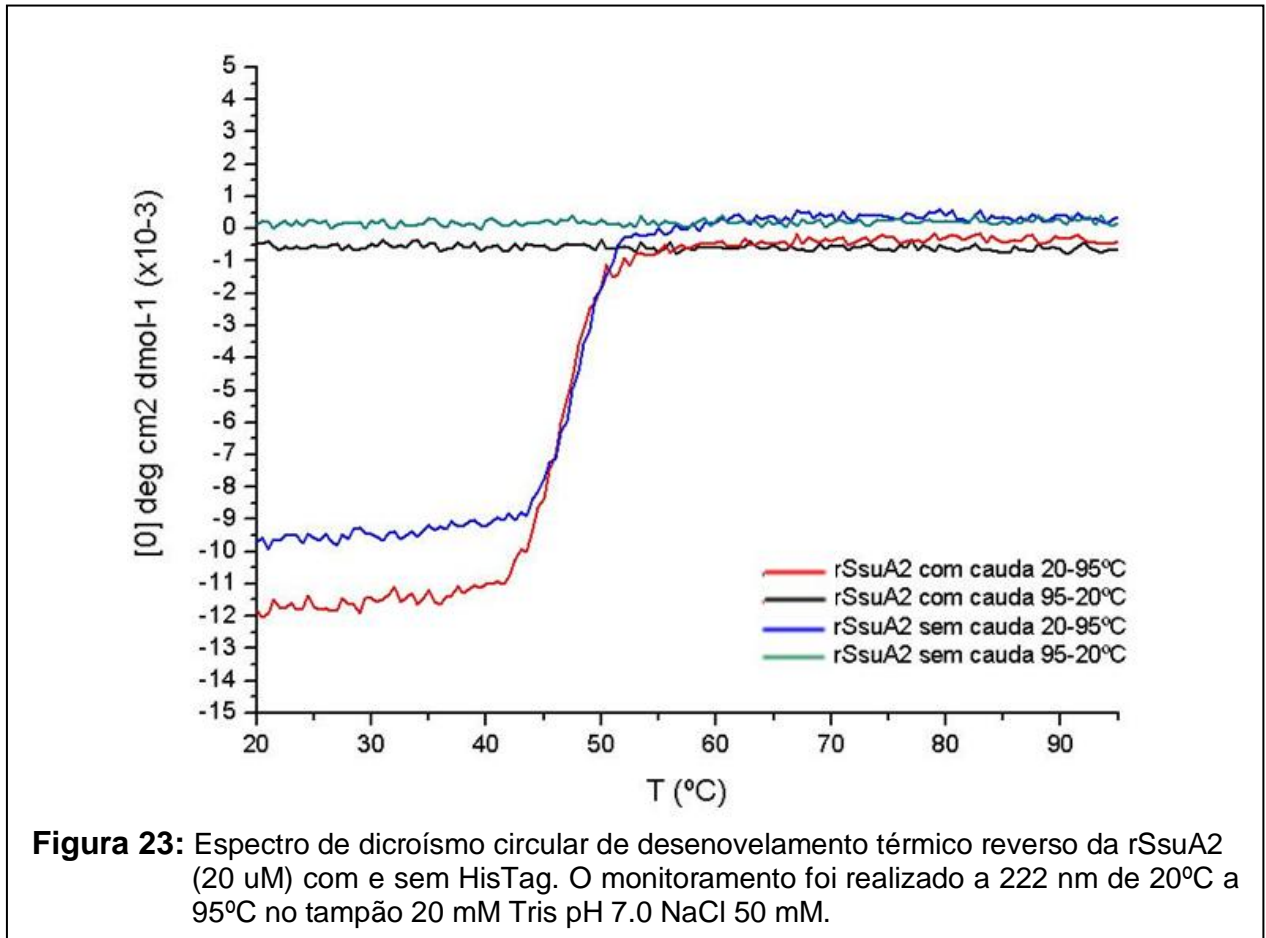
A estabilidade da rSsuA2 também foi monitorada em variação de temperatura. O desenovelamento térmico pontual da proteína ocorre gradativamente, conforme o aumento da temperatura (Figura 22 A e B), e neste caso, a proteína sem cauda parece ser mais estável. As temperaturas de desenovelamento da rSsuA2 com e sem cauda foram estabelecidas em 42°C e 44°C, respectivamente (Figura 23).



**Figura 21:** Análise por dicroísmo circular da estabilidade da proteína rSsuA2 com **(A)** e sem **(B)** cauda de histidina medida em diferentes pHs. A proteína foi diluída na concentração de 10  $\mu$ M, nos tampões: 20 mM de Tris pH 7,0, NaCl 50 mM; 20 mM de Acetato de Sódio pH 5,0, NaCl 50 mM; 20 mM de Citrato de Sódio pH 2,5, NaCl 50 mM e 20 mM de Glicina pH 9,5, NaCl 50 mM.



**Figura 22:** Desenovelamento térmico pontual da rSsuA2 (15  $\mu$ M) com (A) e sem (B) HisTag. A proteína foi diluída em tampão Tris 20 mM pH 7.0 e 50 mM NaCl. As temperaturas analisadas foram 20°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 95°C.

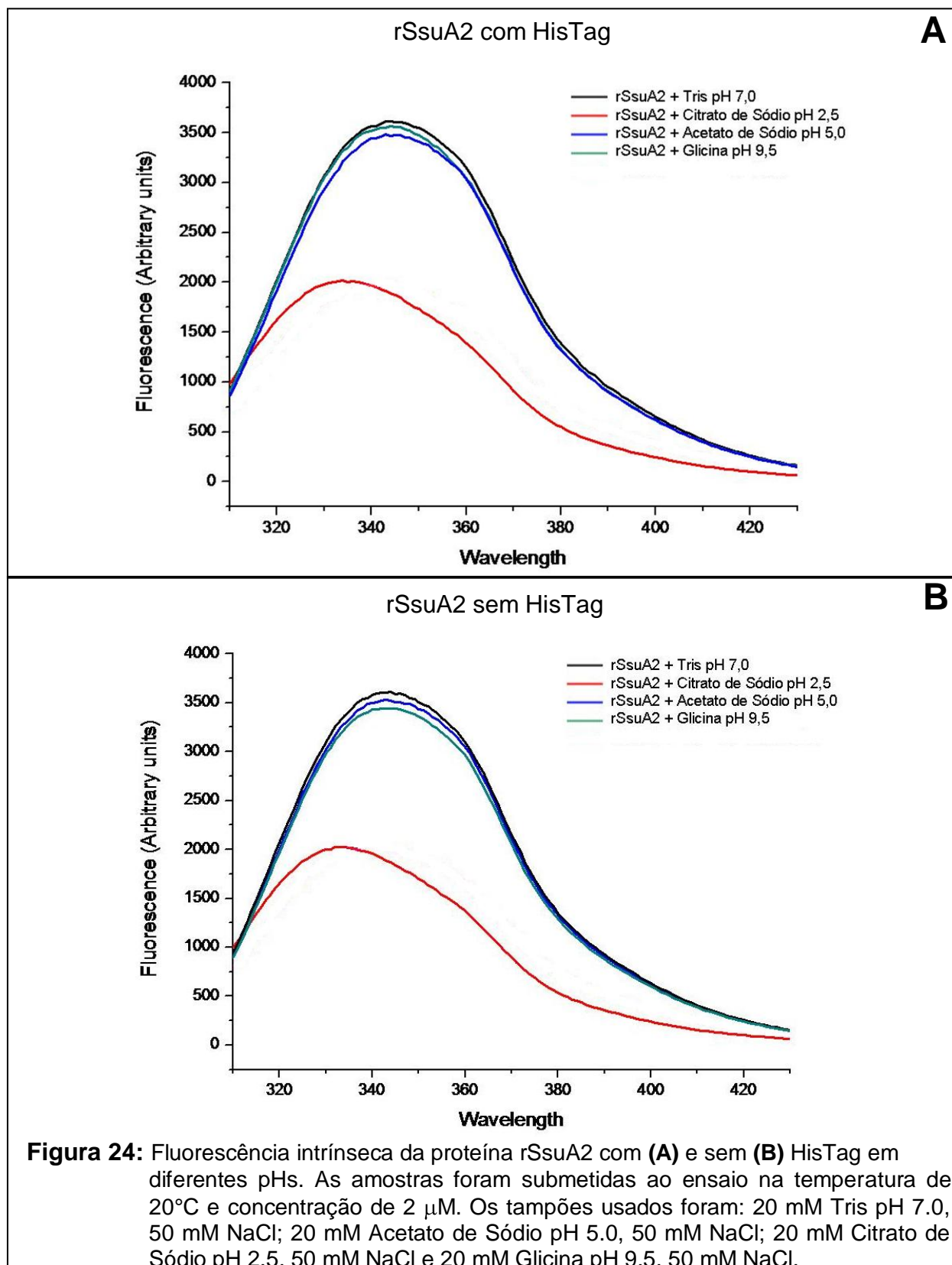


#### 4.7 Fluorescência

Alterações conformacionais nas estruturas de proteínas podem ser monitoradas pela alteração na fluorescência intrínseca dos triptofanos. Baseados nos resultados dos ensaios de CD que mostraram alterações nos perfis das proteínas em pHs extremos, as possíveis mudanças estruturais também foram avaliadas nos ensaios de fluorescência intrínseca. O perfil da rSsuA (com e sem cauda) em pH neutro atingiu o pico máximo de fluorescência centrado em 348 nm (Figura 24). Nos demais pHs testados houve apagamento (“quenching”) dos triptofanos, caracterizado pela diminuição da fluorescência intrínseca e evidenciando a alteração conformacional da proteína. O “quenching” dos triptofanos em pH 10 (perda de aproximadamente 30%) confirmou os resultados do CD os quais revelaram que a proteína agrega. Adicionalmente, a mudança drástica de pH para 2.5 mostra que a proteína sofre grande alteração estrutural, evidenciado tanto pelo “quenching” dos triptofanos como pelo deslocamento do máximo de fluorescência de



348 nm para 337 nm. Este resultado revela que os resíduos avaliados foram direcionados para ambientes mais hidrofóbicos.



Os resultados de CD e fluorimetria apresentados neste trabalho mostram que a proteína rSsuA2 (com cauda ou sem cauda de histidina) permanece enovelada em diferentes pHs, sem sofrer alterações significativas, exceção feita para os pHs extremos, e que não existem diferenças promovidas pela presença da cauda. Os resultados obtidos nestes ensaios permitiram avaliar uma faixa de maior estabilidade da rSsuA2, e direcionaram os experimentos de cristalização para condições com pHs em torno de 7.0.

#### **4.8 Cristalização da proteína rSsuA2, Obtenção de cristais e Dados de Difração**

##### **4.8.1 Cristalização e cristais da rSsuA2**

A cristalização foi realizada com a proteína na concentração de 6 mg/ml (182,2  $\mu$ M), os kits de cristalização utilizados foram: - Crystal Screen I, II e Grid Screen – Sulfato de Amônia (Hampton Research); The Classics 1, 2, 3 e 4 (NEXTAL); Wizard 1 e 2; além dos kits Screen Bulk 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 (Jena). O método utilizado foi de gota sentada para os Kits da Hampton Research, Jena e Wizard, e gota pendente (RHODES, 1993) para os kits da NEXTAL.


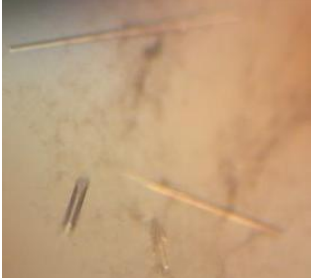
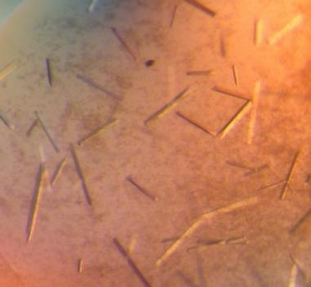
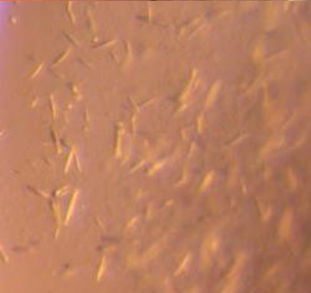

Obtivemos cristais em 5 condições diferentes (Tabela 9) sendo que todos foram testados para verificação do padrão de difração na linha MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Três condições das cinco geraram cristais de alta qualidade: i) 0.1 M Cloreto de sódio, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.6 M Sulfato de Amônia; ii) 0.1 M MES pH 6.5, 2% PEG 400, 2 M Sulfato de Amônia e iii) 0.2 M Sulfato de Amônia, 0.1 M MES pH 6.5, 30 % PEG 5000 MME. A partir destas condições foram realizados os refinamentos (variação de pH e precipitante) na tentativa de aumentar a resolução de 2.0 Å para 1.7- 1.8 Å. melhorando a qualidade dos cristais. As outras 2 condições formaram microcristais tão pequenos que não foi possível colocá-los na linha (tabela 10).

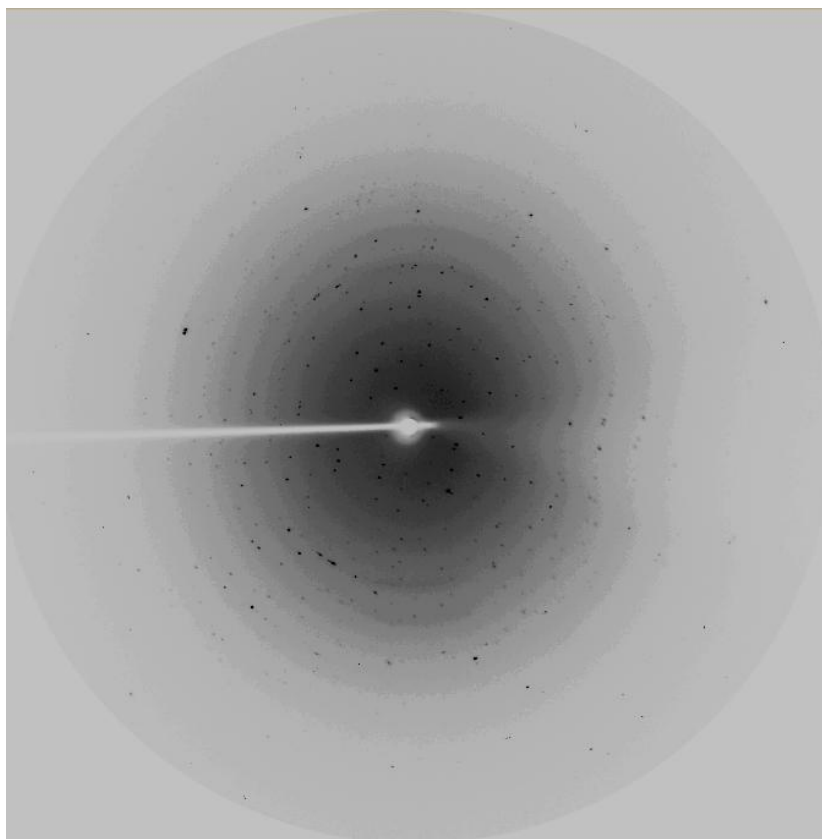
**Tabela 9:** Condições dos kits em que houve cristalização da proteína rSsuA2.

<b>Condição</b>	<b>Sal</b>	<b>Tampão</b>	<b>Precipitante</b>
32 HP II cristais	0.1 M NaCl	0.1 M HEPES pH 7.5	1.6 M Sulfato de Amônia
32 NEXTAL II cristais	0.1 M NaCl	0.1 M HEPES pH 7.5	1.6 M Sulfato de Amônia
C3 Jena Screen Bulk VI	–	0,1 M MES pH 6,5	5% PEG 400; 2M Sulfato de Amônia
26 HP II	0.2 M Sulfato de Amônia	0.1 M MES pH 6.5	30% PEG MME 5000
92 NEXTAL IV	0.2 M Sulfato de Amônia	0.1 M MES pH 6,5	30% PEG MME 5000
73 NEXTAL IV	–	0.1 M HEPES pH 7,5	2% PEG 400, 2M Sulfato de Amônia
39 HP I	–	0.1 M HEPES pH 7.5	2% PEG 400, 2M Sulfato de Amônia
50 NEXTAL III	–	0.1 M MES pH 6,5	10% diane; 1.6M Sulfato de Amônia

A condição de cristalização em que obtivemos o cristal com melhor difração foi a 0.1 M Cloreto de sódio, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.6 M Sulfato de Amônia (Tabela 10), que difratou a 1.7 Å conforme mostra a figura 25.

**Tabela 10:** Condição em que a proteína r SsuA2 cristalizou e resolução da difração por raio-X.

Condição de cristalização	Morfologia dos cristais	Difração
0.1M Cloreto de sódio 0.1M HEPES pH 7.5 1.6M Sulfato de Amônia		1.7 Å
0.1 MES pH 6,5 2% PEG 400 2 M Sulfato de Amônia		5Å
0.2 M Sulfato de Amônia 0.1 M MES pH 6.5 30 % w/v PEG 5000 MME		7Å
0.1 M HEPES - pH 7.5 2 % PEG 400 2.0 M Sulfato de Amônia		---
0.1 M MES pH 6,5 10% Diane 1.6M Sulfato de Amônia		---



**Figura 25:** Padrão de difração da proteína rSsuA2 com de resolução 1.7 Å. Os dados cristalográficos foram coletados na linha D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brazil. O comprimento de onda foi de 1.421 Å. O detector foi MARCCD.

#### 4.8.2 Processamento dos dados e obtenção de cristais com átomos pesados

Após a coleta dos dados de difração dos cristais obtidos no refinamento da condição 32 da Hampton Research, o processamento dos mesmos foi realizado utilizando-se o programa Mosflm. Os cristais pertencem ao grupo de alta simetria P21, com dimensões da célula unitária  $a = 30.93$ ,  $b = 86.00$ ,  $c = 47.20$ ,  $\alpha = 90.00^\circ$ ,  $\beta = 98.03^\circ$  e  $\gamma = 90.00^\circ$ . Somente uma molécula está presente na unidade assimétrica com conteúdo total de solvente calculado em 34%. Como a Ssua2 não possui nenhum ortólogo com estrutura definida que possa ser usado como modelo, tentamos o método de substituição isomórfica (Single Isomorphous Replacement). Este método consiste em incorporar metais pesados na proteína para ajudar na resolução da estrutura tridimensional. Para a incorporação dos átomos pesados aos cristais, foi escolhido o método de “quick-soaking”, onde os cristais são embebidos em uma solução com alta concentração dos átomos. Os metais pesados foram

diluídos na solução crioprotetora (solução da condição onde esta o cristal adicionada de 20% de glicerol) e os cristais da proteína rSsuA2 da condição 0.1 M NaCl; 0.1 M HEPES pH 7.3; 1.5 M Sulfato de Amônia foram colocados minutos antes da coleta, conforme indica a tabela abaixo:

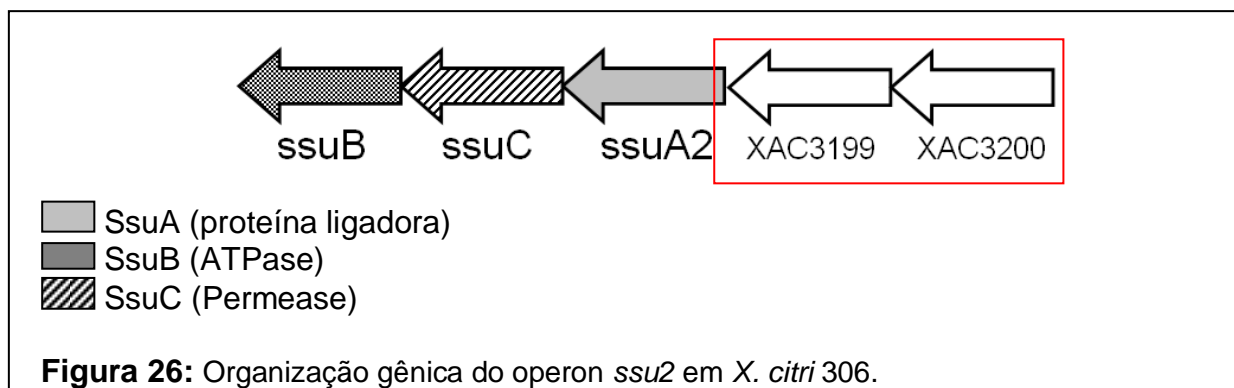
<b>Metal pesado</b>	<b>Crio-protetor</b>	<b>Annealing</b>	<b>Difração</b>
Iodeto de Sódio 500 mM	10% de glicerol	2'', 5''	2.2 Å
Cloreto de gadolínio 100 mM	10% de glicerol	2'', 5'', 2''	-
Cloreto de céσιο 500 mM	15% de glicerol	-	-
Acetato de Samário 20 mM	15% de glicerol	-	4.5 Å
Acetato de Samário 50 mM	20% de glicerol	-	3.8 Å
Cloreto de platina 20 mM	15% de glicerol	-	3.9 Å
Cloreto de platina 50 mM	20% de glicerol	-	2.4 Å

A incorporação dos átomos foi checada após o processamento dos dados no programa SCALA dentro do pacote CCP4. Apenas o conjunto de dados com iodo revelou sinal anômalo. Outros metais (Nitrato de Prata e Cloreto de Ouro) também foram tentados, embora sem sucesso.

#### **4.9. Bioinformática.**

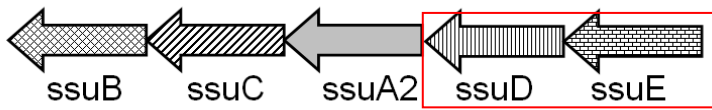
##### **4.9.1 Organização do operon *ssu* em *Xanthomonas citri***

Em *X. citri* o operon *ssu2* (5'- 3762334....3763196 - 3') é formado por 3 genes: *XAC3196*, *XAC3197* e *XAC3198* (Figura 26) que codificam respectivamente: uma ATPase com 291 resíduos (*SsuB2*), uma permease com 264 resíduos (*SsuC2*) e uma proteína ligadora com 341 aa (*SsuA2*). Existe também um outro operon *ssu1* (5'- 1007503....1009376 - 3') composto pelos genes *XAC0847*, *XAC0848*, *XAC0849*, *XAC0850* que codificam: uma ATPase com 252 resíduos (*SsuB1*), uma permease com 283 resíduos (*SsuC1*), uma proteína ligadora com 334 resíduos (*SsuA1*) e uma mono-oxigenase com 387 resíduos (*SsuD1*) (resultados não mostrados). A função de ambos os operons ainda não foi estabelecida em *X. citri*, mas os dados sugerem envolvimento na captação de alceno sulfonatos.



Procurando identificar se os genes *XAC3199* e *XAC3200* também poderiam fazer parte do operon *ssu2*, ambos foram submetidos às análises de domínio seqüência (BlastCD e BlastP). Os resultados revelaram que o gene *XAC3199* codifica para uma proteína que apresenta alta homologia e domínios conservados (98.6%) e de seqüência (84%) com mono-oxigenases, assim podendo representar o gene *ssuD*. As análises realizadas com o gene *XAC3200* por sua vez, mostraram alta homologia de seqüência (75%) e domínios conservados de famílias de oxiredutases (95.1%), representando o gene *ssuE*. Essas análises mostram que o operon *ssu2* em *X. citri* é conservado e se apresenta completo, como identificado em outros microrganismos (Figura: 27).

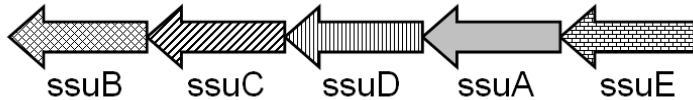
*Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* str 306



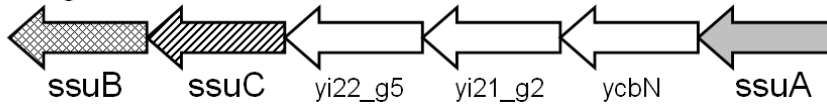
*Yersinia pestis* CO92



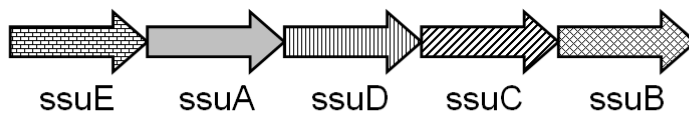
*Escherichia coli* K-12 W3110



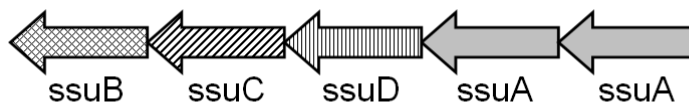
*Shigella flexneri* 2a str 301



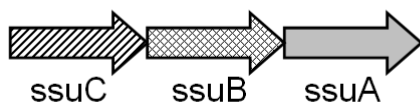
*Pseudomonas putida*



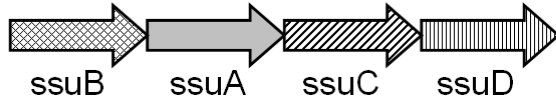
*Acinetobacter* sp. ADP1








*Agrobacterium tumefaciens* C58



*Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* str 168



-  SsuA (proteína ligadora)
-  SsuB (ATPase)
-  SsuC (Permease)
-  SsuD (Monoxigenase)
-  SsuE (Oxiredutase)

**Figura 27:** Organização dos operons *ssu* em diferentes microrganismos e comparação com *X. citri*. Todas as proteínas SsuA, exceto a de *X. citri* estão anotadas como transportadoras de alceno sulfatos.



A presença do operon *ssu1* e suas características também foi analisada e revelou alta homologia de domínio e seqüência com proteínas do operon *tau* de outros organismos (resultados não mostrados), responsável pelo transporte de taurina.

#### **4.9.2 A proteína SsuA2 de *Xanthomonas citri***

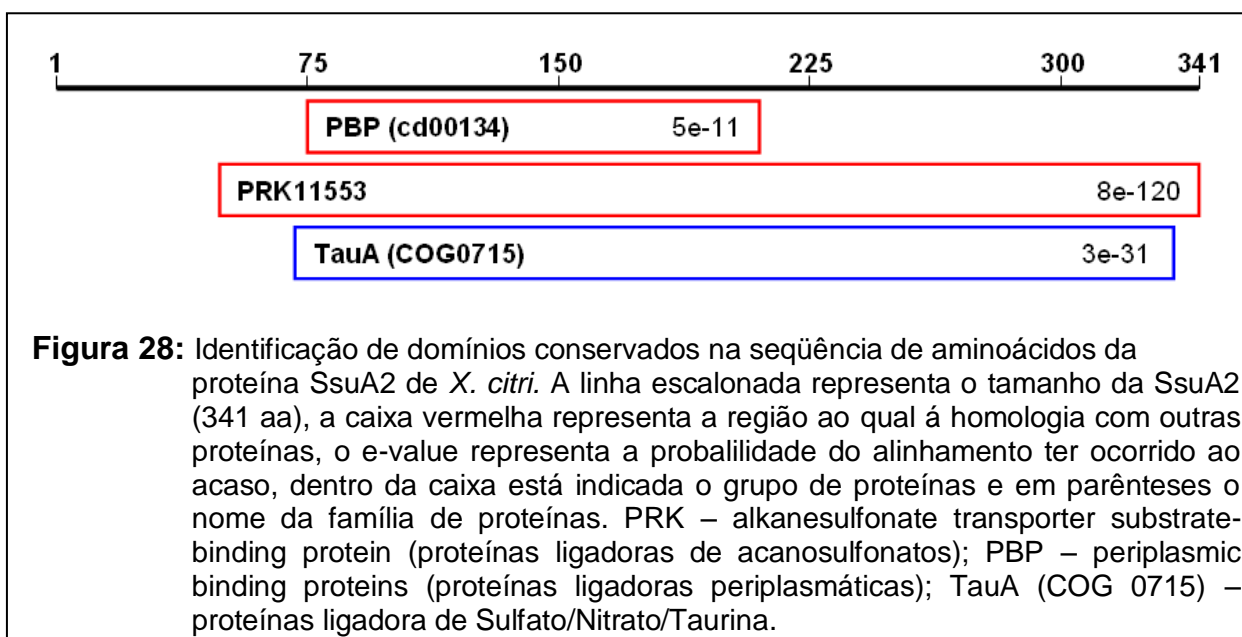
A proteína SsuA2 foi, primeiramente, anotada como proteína periplasmática ligadora de nitrato, anotação realizada pelo projeto genoma (ONSA – FAPESP) baseada em homologia de seqüências (DA SILVA et al., 2004). Posteriormente, essa anotação foi corrigida e a proteína atualmente a proteína é descrita como proteína ligadora de alcano sulfonatos.

A proteína SsuA2 madura possui 341 resíduos, dos quais 42 foram identificados como parte do peptídeo sinal. Neste trabalho, esses resíduos foram removidos e a proteína quando expressa adquiriu 20 novos resíduos, correspondentes ao fragmento do vetor pET28a que contém a cauda de histidina (MGSSHHHHHSSGLVPRGSH). As seqüências da proteína com cauda (320 resíduos) e da proteína sem cauda (303 resíduos) foram submetidas à análise no programa ProtParam (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>). A rSsuA2 apresentou peso molecular de 34.0892 kDa, ponto isoelétrico teórico de 10.12 e 13 aminoácidos aromáticos (7 Triptofanos e 6 Tirosinas). O coeficiente de extinção (280 nm) usado para os cálculos de concentração foi de 47440 e absorção a 0.1% de 1.392 mg/ml. Já a rSsuA2 sem cauda (303 resíduos) apresentou diferenças no peso molecular de 32,292 kDa e na absorção a 0,1% de 1,469 mg/ml. Os demais parâmetros foram os mesmos da proteína com cauda.

#### **4.9.3 Análise de Domínios Conservados pelo programa BLAST CD (Basic Local Alignment Search Tool Conserve Domain)**

A busca de domínios conservados no programa BLASTCD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), foi realizada utilizando-se da seqüência de aminoácidos da proteína SsuA2. Os resultados revelaram que a SsuA2 de *Xac* apresenta domínios de proteínas relacionadas ao transporte de íons, principalmente das proteínas ligadoras alcano sulfonatos. Os melhores resultados são os que possuem o e-value (probabilidade do alinhamento ocorrer ao acaso) próximos de 0.

As melhores homologias com domínios conservados foram: com a família PKR11553 de proteínas ligadoras de alceno sulfonatos (SsuA) com e-value =  $8e^{-120}$ , com a família PBP(cd00134) de proteínas ligadoras periplasmáticas com e-value =  $5e^{-11}$  e com família COG0715 de proteínas ligadoras de sulfato/nitrato/taurina (TauA) com e-value =  $3e^{-31}$  (Figura 28).



#### 4.9.4 Busca por ortólogos da SsuA2 no banco de dados e homologia de seqüências

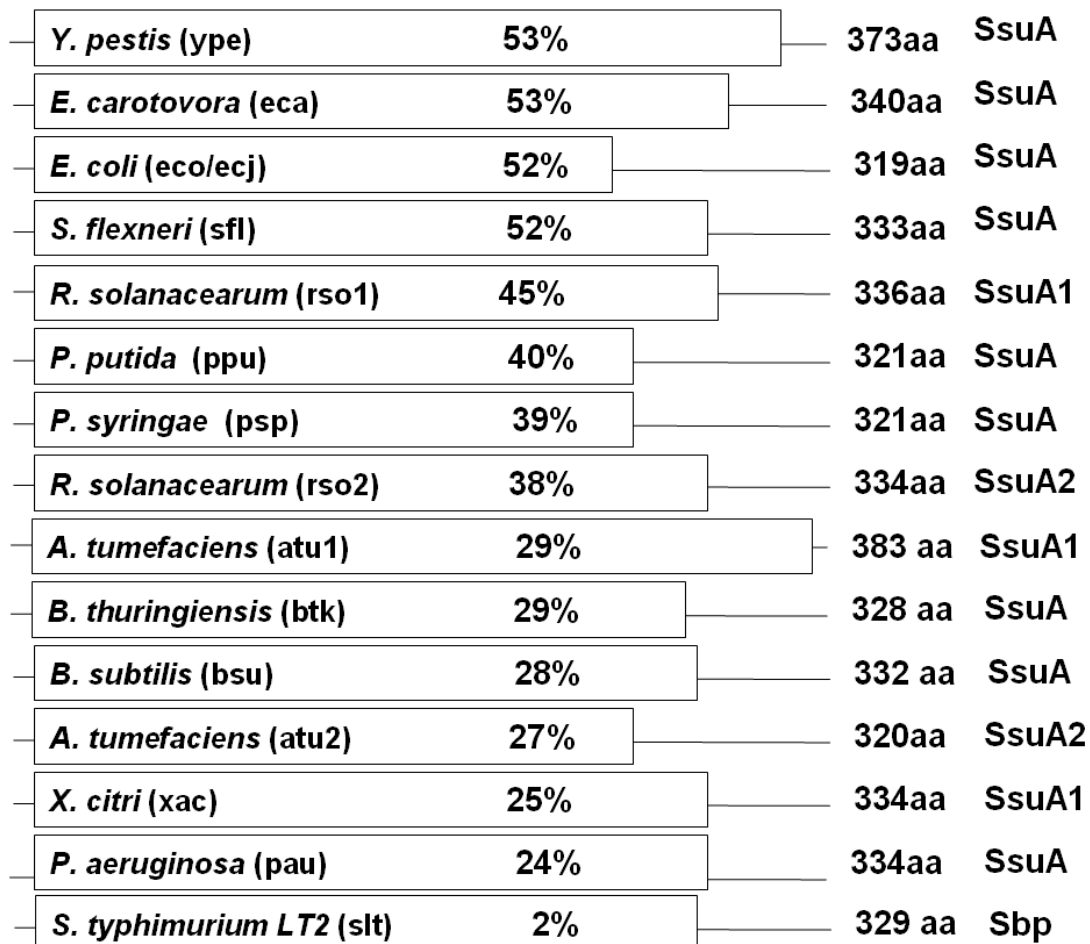
O programa BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi utilizado para a comparação da seqüência de aminoácidos da proteína SsuA2 com outros ortólogos disponíveis nos bancos de dados. Foi identificada uma série de proteínas com funções de transportadoras de alceno sulfatos. As proteínas que apresentam maior similaridade e identidade foram comparadas na tabela 11.

**Tabela 11:** Comparação da seqüência de aminoácidos da SsuA2 com outras proteínas do banco de dados do NCBI.

<b>Organismo</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função</b>	<b>No. AA</b>	<b>% Identidade</b>	<b>% Similaridade</b>
<i>Y. pestis KIM</i>	SsuA	ligadora de alcanosulfonato	378	64	76
<i>E. carotovora.</i>	-	Hipotética ligadora de alcanosulfonato	340	62	75
<i>E. coli</i>	SsuA	ligadora de alcanosulfonato	333	59	73
<i>S. flexneri</i>	-	Hipotética ligadora de alcanosulfonato	333	59	73
<i>P. syringae</i>	TauA COG0715	ligadora de Nitrato/sulfonato/bicarbonato	311	57	75
<i>R. solanacearum</i>	SsuA	Hipotética ligadora de alcanosulfonato	336	47	61
<i>P. putida</i>	SsuA	ligadora de alcanosulfonato	321	47	58

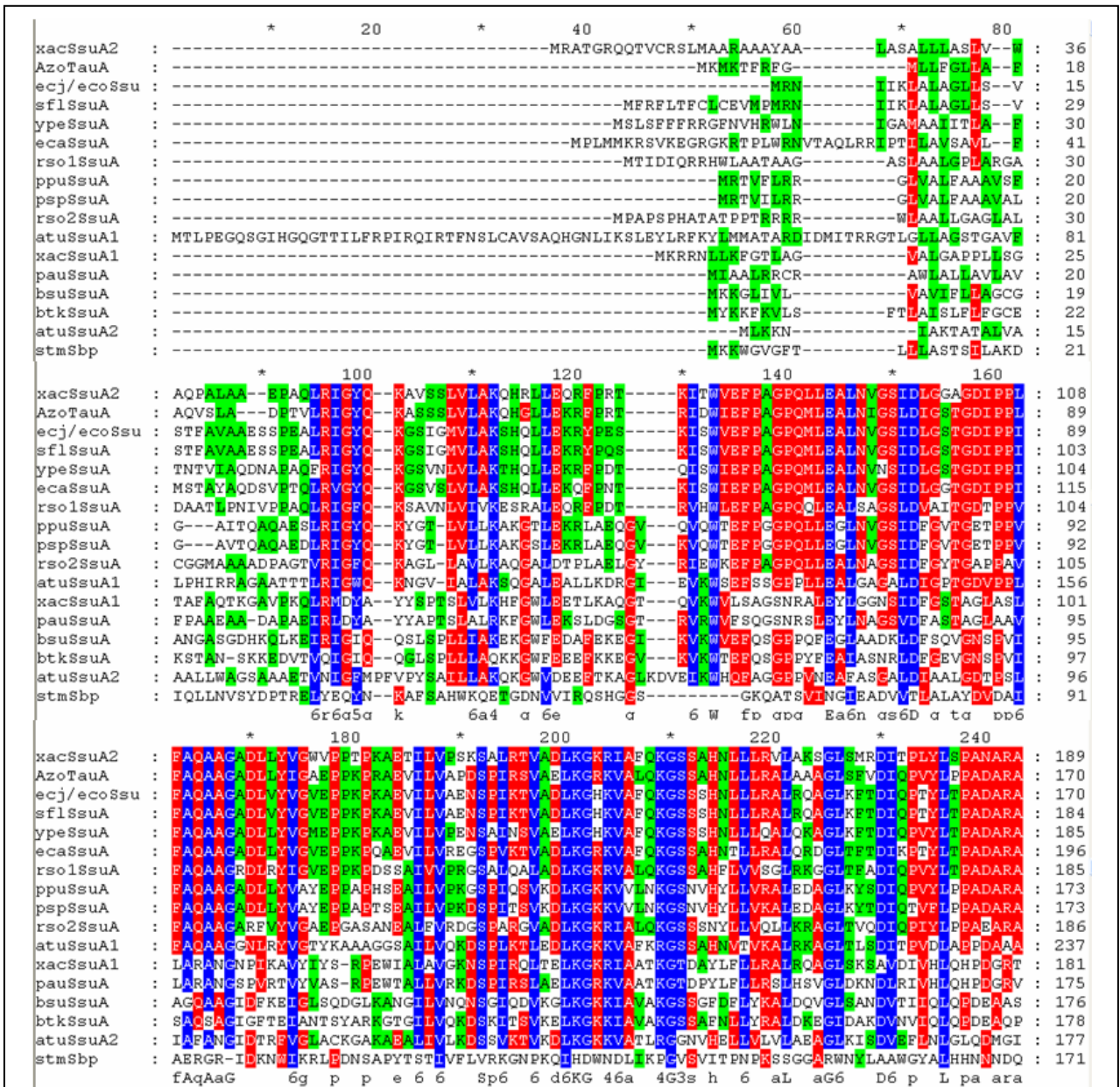
Os resultados apresentados mostram que a SsuA2 de *Xac* apresenta maior homologia com a proteína SsuA de *Y. pestis* (64%). Altas similaridades também foram encontradas com os possíveis ortólogos de *Erwinia carotovora*, *E. coli* e *S. flexneri* (ao redor de 75%) (Tabela 11). Em todos os casos de maior identidade a função das proteínas é a de ligadora de alcano sulfonatos, confirmando que a anotação da proteína seja correta.

A partir desses resultados, as seqüências foram usadas para realizar um alinhamento comparativo com a seqüência da SsuA2 de *X. citri*. Os alinhamentos de múltiplas seqüências de aminoácidos foram realizados pelo programa CLUSTALW (foram usados os bancos de dados do NCBI, KEGG e EXPASY). A seqüência de aminoácidos da proteína SsuA2 de *X. citri* foi comparada com outras seqüências de proteínas ligadoras de alcano sulfatos, incluindo a proteína ligadora de sulfato de *S. typhimurium* cuja estrutura já foi resolvida (PFLUGRATH e QUIOCHO, 1985), proteínas ligadoras de nitrato, e taurina (Figura 29). A figura apresenta as porcentagens de identidade entre a SsuA2 de *Xac* e SsuAs de diversos organismos. Resultados com porcentagens abaixo de 20% (alinhamento da SsuA2 de *Xac* com transportadores de nitrato, taurina e bicarbonato) não foram incluídos.

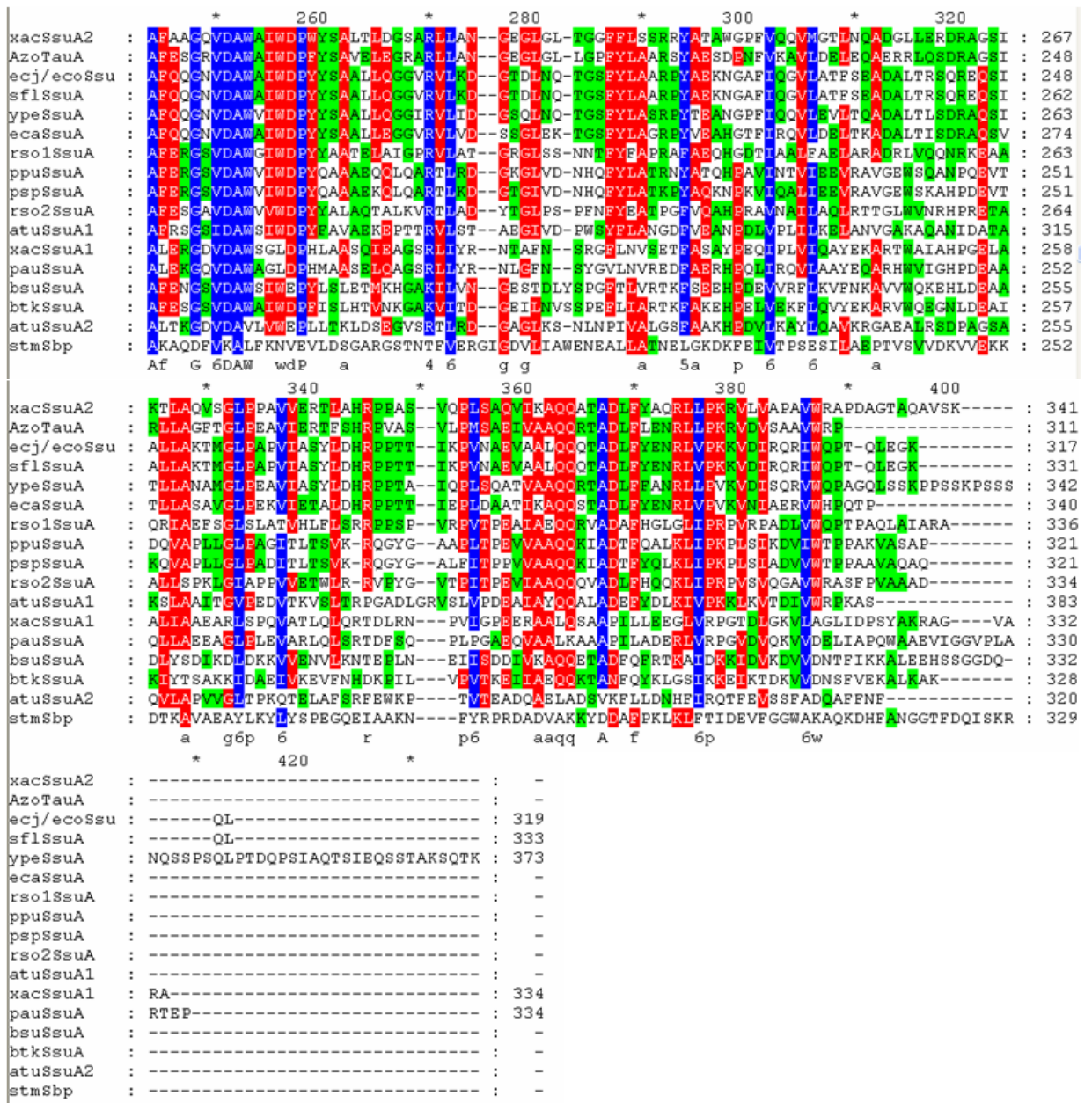


**Figura 29: Alinhamento de diferentes ortólogos da SsuA em comparação com a SsuA2 de *X. citri* (ClustalW).** *Y. pestis* GI: 15981545; *E. coli* K-12 W3110 GI: 89107786; *S. flexneri* GI: 56383327; *R. solanacearum* GMI1000 GI: 17428353; *P. putida* GI: 26986980; *R. solanacearum* GMI1000 GI: 17431856; *Acinetobacter* sp. ADP1 (*ssuA*) GI:50083331; *A. tumefaciens* C58 GI: 17935774; *B. thuringiensis* GI:49330624; *B. subtilis* GI: 2633207; *X. citri* GI: 21241619; *S. typhimurium* LT2 GI:16767329.

O alinhamento das proteínas, realizado com o auxílio do programa ClustalX, foi visualizado com o programa GeneDoc (Figura 30). As regiões de maior homologia são encontradas nas regiões centrais da proteína.



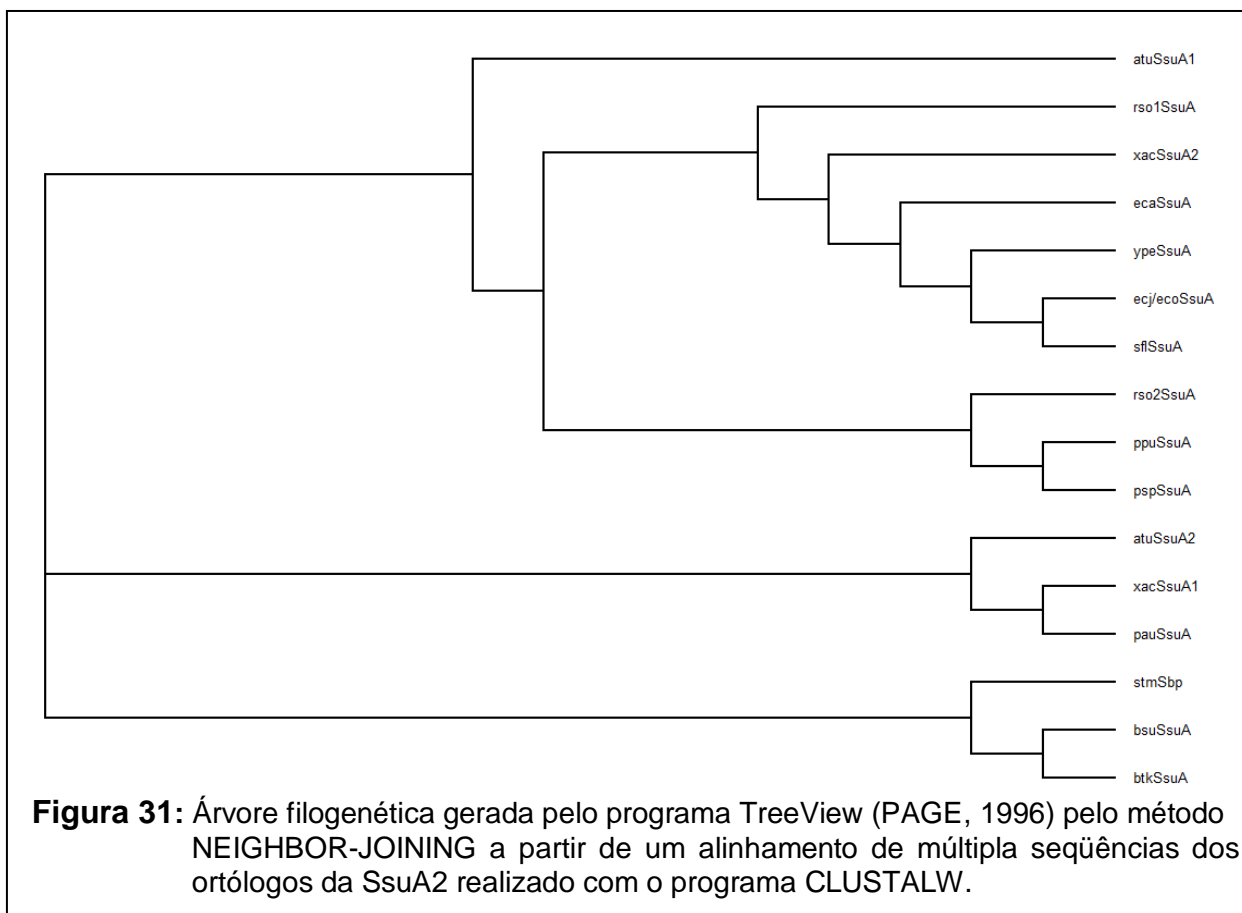
**Figura 30:** Alinhamento de seqüências dos ortólogos da proteína SsuA2 de *X. citri*. Azul = 90% de identidade; Vermelho = 60% de identidade e Verde = 30% de identidade.



**Figura 30:** Alinhamento de seqüências dos ortólogos da proteína SsuA2 de *X. citri*. Azul = 90% de identidade; Vermelho = 60% de identidade e Verde = 30% de identidade.

A árvore filogenética (Figura 31) apresenta três ramos principais e mostra que a rSsuA2 de *Xac* está mais próxima dos ortólogos de protobactérias como *Ralstonia* (RSO), *Yersinia* (YPE), *E. coli* (ECJ) e *Shiguelia* (SFL) sendo que a proteína SsuA1 de *Agrobacterium* (ATU) *Pseudomonas* (PPU) é a mais distante de todas as analisadas. A proteína SsuA1 (XAC0849), encontrada no segundo operon de captação de sulfato em *Xac* foi classificada em um segundo ramo juntamente com as proteínas hipotéticas SsuA de *Agrobacterium* (ATU), SsuA de *Pseudomonas*

(PAU), *Bacillus* (BSU, BTK) que provavelmente fazem parte do operon *tau*. No terceiro ramo encontramos a proteína SsuA de *Bacillus* (btk e btu) junto com a proteína Sbp de *Salmonella* (stm).



#### 4.10 Modelo da estrutura tri-dimensional

A busca por um modelo estrutural que pudesse ser usado para a resolução da estrutura tri-dimensional da SsuA2 foi realizada com o auxílio do programa Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>). Devido à baixa similaridade (abaixo de 25%) da SsuA2 com estruturas tridimensionais protéicas conhecidas não foi possível gerar nenhum modelo aplicável. A única proteína ligadora de sulfato que consta no PDB é a de *S. typhimurium*, cuja homologia é extremamente baixa ou quase nula (2% de identidade) como já citado anteriormente. Neste caso a resolução da estrutura da proteína deverá ser feita por métodos de substituição isomórfica e espalhamento anômalo (SIR).

## 5 DISCUSSÃO

O gene *ssuA2* de *X. citri* codifica um peptídeo precursor de 341 aminoácidos dos quais, os 42 primeiros correspondem ao peptídeo sinal, como estimado pela aplicação da ferramenta PROTPARAM. A proteína SsuA2 recombinante foi expressa em *E. coli* como uma proteína intracelular solúvel sem o peptídeo sinal e geneticamente fusionada com uma cauda His<sub>6</sub> na extremidade N-terminal codificada pelo vetor de expressão pET28a. Tentativas de expressão da proteína rSsuA2 de *X. citri* com o peptídeo sinal intacto e cauda de His<sub>6</sub> na extremidade C-terminal, falharam na secreção mesma para o espaço periplasmático de *E. coli*, sugerindo que o sistema de secreção de *E. coli* não reconhece eficientemente as seqüências sinal de *X. citri*. De fato, estes resultados também foram verificados por nosso grupo durante a expressão das proteínas MalE, ModA e OppA de *X. citri* (dados não mostrados). A proteína rSsuA2 foi expressa com sucesso no sistema pET28a e a melhor condição de expressão para síntese de proteína solúvel foi a 28°C, com 200 rpm de agitação.

Os resultados dos ensaios de purificação da rSsuA2 por cromatografia de afinidade ao níquel em colunas de polipropileno foram bastante insatisfatórios em termos de qualidade de proteína pura. Após as 5 purificações consecutivas do mesmo extrato houve perda de proteína nas frações de 20mM e 50mM devido à presença de contaminantes. Tentativas de minimizar a presença destes contaminantes foram realizadas diminuindo a quantidade de resina e aumentando o tempo de incubação do extrato com a mesma, mas os resultados também não foram satisfatórios. A presença dos contaminantes aumentou de forma significativa a instabilidade da rSsuA2 evidenciada pelo alto grau de precipitação das amostras durante os ensaios de concentração e diálise.

O problema dos contaminantes foi resolvido após a purificação da rSsuA2 em coluna pré-empacotada (cromatografia líquida de performance rápida). Além da diminuição dos contaminantes, o rendimento final da purificação passou de 1 para 9 mg/ml de proteína recombinante por litro de meio de cultura. A rSsuA2 foi purificada com êxito por cromatografia de afinidade em coluna pré-empacotada livre de contaminantes sendo que as quantidades obtidas durante a expressão e purificação da rSsuA2 foram mais do que suficientes para a realização de vários ensaios



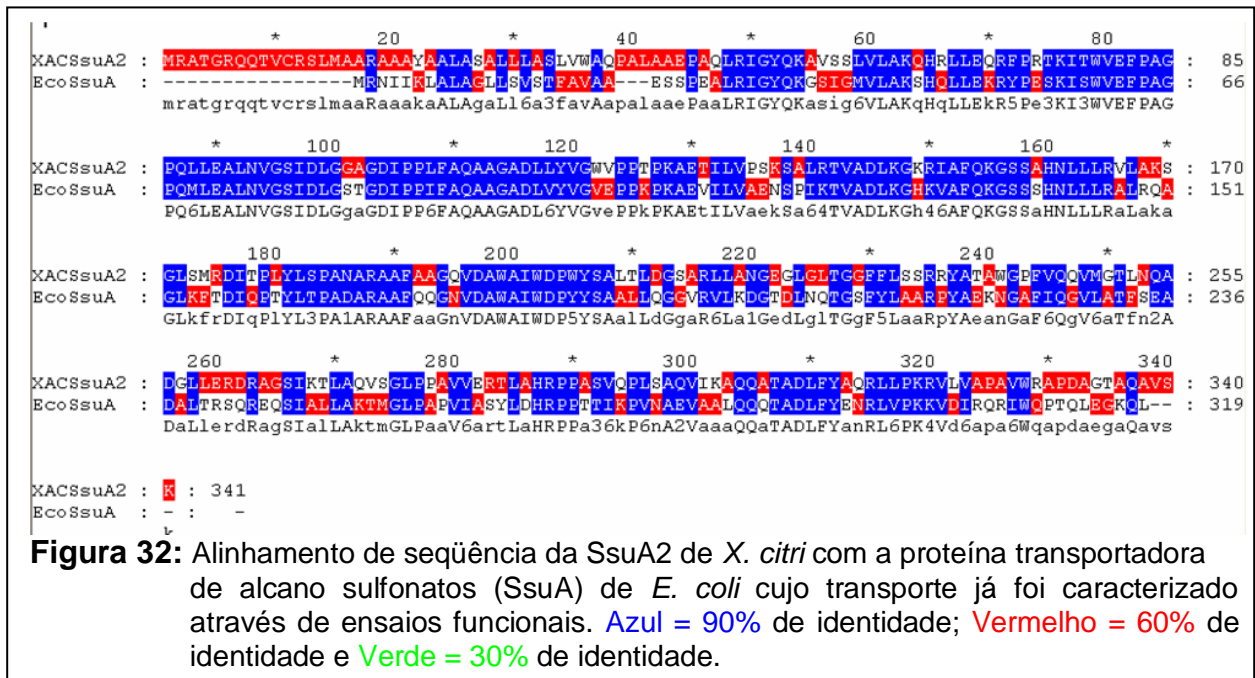
bioquímicos e estruturais, incluindo a produção de cristais para a resolução da estrutura tri-dimensional por cristalografia.

Os resultados dos estudos espectroscópicos mostraram que a rSsuA2 é expressa com estrutura conformacional coerente com a esperada segundo as análises de bioinformática (conteúdo de hélices alfa e folhas beta) e que a presença da cauda de histidina não interfere na estrutura secundária da proteína. Adicionalmente foi possível determinar uma faixa de pH ótima para a manutenção da estabilidade da proteína e direcionamento dos ensaios de cristalização. De fato, a maioria dos cristais obtidos foram crescidos em pH na faixa de 6.5 a 7.5. Ensaios de dicroísmo circular também foram realizados para análises de termo estabilidade. O desenovelamento térmico da proteína ocorrido em temperaturas próximas de 45°C revelou que a rSsuA2 foi muito sensível ao aumento de temperatura, com tendência a agregação causada pela interação de folhas beta que se associaram após a exposição das mesmas. Esse resultado indicou que a proteína sofreu um desenovelamento irreversível durante o processo de desnaturação, e restringiu a aplicação de experimentos termodinâmicos nos estudos.

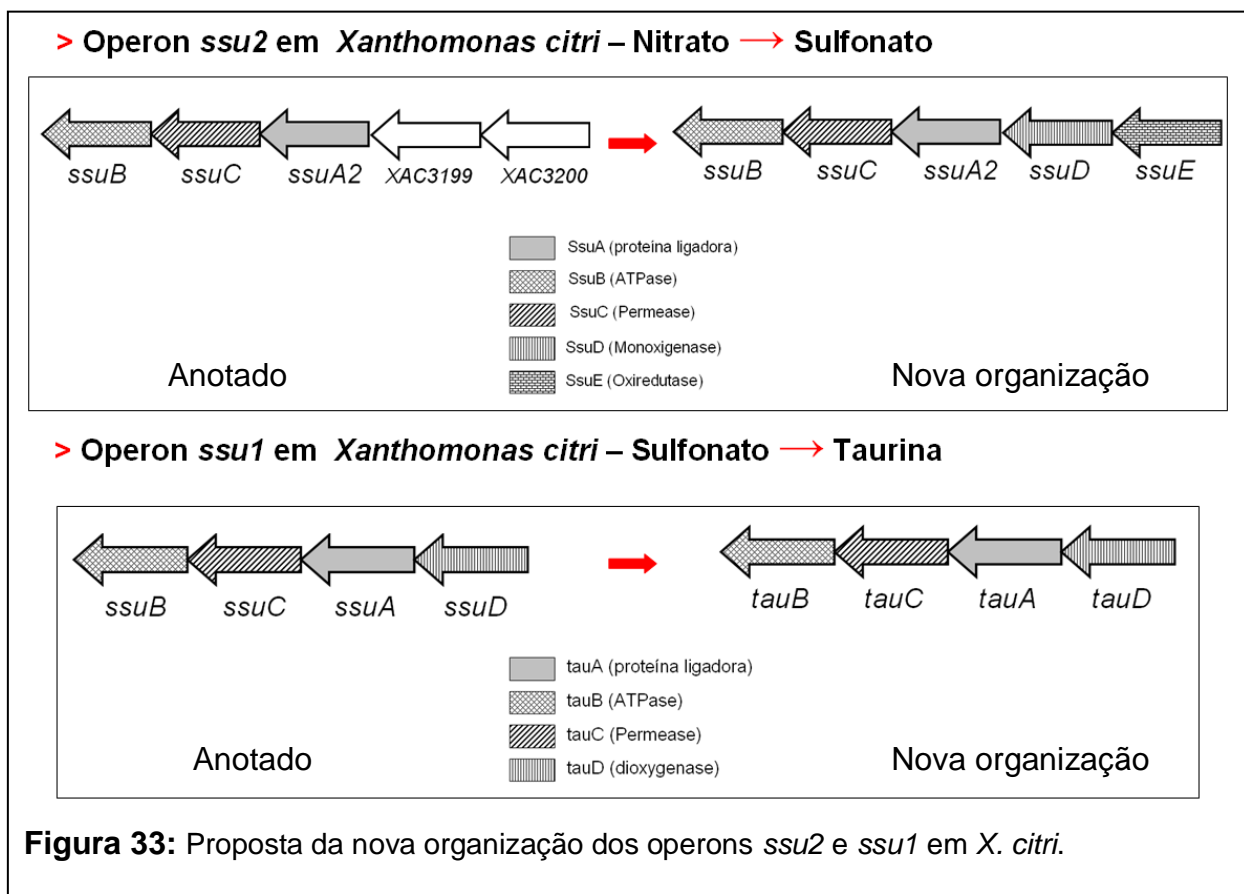
Ensaios espectroscópicos também foram direcionados para a determinação de um possível ligante para a rSsuA2. Infelizmente, nenhum dos resultados obtidos foi reprodutível e as análises permaneceram inconclusivas. Algumas observações mostraram variações nos perfis de dicroísmo circular da proteína na presença de taurina e sulfato de amônia, sugerindo uma possível interação desta proteína com tais compostos. Os dados de cristalização também corroboram esta hipótese, uma vez que os cristais só cresceram em tampões compostos por sulfonatos e em altas concentrações de sulfato de amônia (1.6 M a 3.3 M).

Uma importante parte do trabalho foi realizada através da comparação das seqüência de aminoácidos da rSsuA2 com as seqüência de outros ortólogos. As análises permitiram identificar grupos de proteína com maior identidade/similaridade com a rSsuA2. Estes grupos, em sua maioria eram compostos por proteínas ligadoras de alceno sulfonatos, sulfatos e taurina, todas com massa molecular em torno de 34 kDa. A comparação das seqüências de aminoácidos da SsuA2 com proteínas SsuA de diferentes espécies bacterianas, revelou que a proteína de *X. citri* apresenta 52 % de identidade com a proteína SsuA de *E. coli*, conforme mostra o alinhamento da figura 32. O operon ao qual a proteína pertence já foi caracterizado e é composto de 5 genes: *ssuA*, *ssuB*, *ssuC*, *ssuD*, *ssuE*. Uma avaliação preliminar

do genoma de *X. citri* mostrou que a SsuA2 pertence ao operon *ssuABC2* composto de três genes. Na verdade, a análise mais detalhada dos genes adjacentes revelou que estes dois genes seriam os componentes SsuD (monoxigenase) e SsuE (óxido redutase), e que neste caso, o operon *ssuABC2* era homólogo ao *ssu* encontrado em *E. coli*.



A partir destas análises foi possível propor uma nova organização para os operons *ssu2* e *ssu1* de *X. citri* (ausente em *X. Campestris*), conforme demonstra a figura 33.



Com esta nova organização o operon *ssu2* em *X. citri* fica composto por 5 genes (*ssuBCADE*) organizado em uma única unidade policistrônica, semelhante à organização genética do operon *ssu* de *E. coli*, também composto por 5 genes (*ssuBCDAE*) e o operon *ssu1* em *X. citri* passa a representar o operon *tau* (*tauBCAD*), com organização genética semelhante ao operon *tau* de *E. coli* (*tauABCD*). Baseados nos dados de genoma de *E. coli*, cujo regulon *cys* apresenta 26 genes, procuramos os genes correspondentes no genoma de *X. citri*.

Dos 26, apenas 6 genes não foram encontrados, os quais estariam envolvidos com a regulação (Figura 5). Este fato pode indicar que em *X. citri* os mecanismos para captação de enxofre/sulfato/sulfonato podem ser diferentes de *E. coli*. Ainda foi possível verificar que a *X. campestris* não apresenta os operons *ssu* e *tau*, mas por outro lado, possui outros genes do regulon *cys* (Anexo 1). Embora acreditamos que uma análise de bioinformática mais profunda nos genomas de *Xac* e *Xcc* possa encontrar genes estes genes ausentes.

Dada a importância do enxofre no metabolismo celular para a formação de cisteínas e metioninas, surge uma intrigante questão de quais seriam as vias de captação deste elemento. Outro ponto importante é que apesar de fitopatógenas, *X.*

*citri* e *X. campestris* apresentam mecanismos de infecção e patogenicidade completamente distintos um do outro. Certamente, a elucidação dos mecanismos de captação de íons, como sulfato, nitrato entre outros, pode levar a um maior conhecimento dos mecanismos de patogênese e controle destas bactérias.

A produção da rSsuA2 pura a partir de culturas de *E. coli*, também foi importante para a obtenção de anticorpos anti-rSsuA2, que devem ser usados em ensaios fisiológicos, utilizando-se linhagens de *X. citri* mutadas no gene *ssuA2* e/ou no operon *ssu*, realizados pelo nosso grupo. Os primeiros testes com o anti-rSsuA2 mostraram que o anticorpo foi capaz de reconhecer a proteína recombinante no sobrenadante das culturas e nas frações purificadas, mas não a proteína nas amostras de extratos celulares de *X. citri*. Estes resultados devem ser melhor explorados e analisados, já que alguns fatores podem ter interferido na resposta como a pequena quantidade de proteína nos extratos, a não funcionalidade do sistema, entre outros. Mehta e Rosato (2001) mostraram que diversas proteínas são expressas quando a *X. citri* é cultivada em meio com extrato de folha de laranja (*Citrus sinensis*), entre elas, uma proteína que apresenta 88% de similaridade e 66% de identidade com a proteína transportadora de sulfato (Sbp) de *E. coli*. Este resultado sugere que alguns genes do regulon *cys* estão ativos em *X. citri*.

De fato, o funcionamento dos sistemas de captação de sulfato em *Xac* poderia ser melhor compreendido se os transportadores SsuA1 e Sbp fossem estudados. Inicialmente, as primeiras tentativas de clonagem destes genes pelo nosso grupo não foram realizadas.

Embora neste trabalho não tenha sido possível atribuir um papel fisiológico claro do operon *ssu2* em *X. citri*, foi possível fazer uma caracterização prévia levantando hipóteses a serem estudadas sobre o papel da mesma na *X. citri*, como também, a produção de proteína para as análises estruturais, principalmente a resolução da estrutura da SsuA2. Atualmente, os estudos funcionais de proteínas vêm sendo desenvolvidos em associação com estudos estruturais. Fica mais simples, a partir da estrutura, definir possíveis ligantes, moléculas inibidoras e outras características da proteína. O maior objetivo do nosso grupo tem sido a produção de proteínas para a cristalização e caracterização estrutural. Neste sentido, a expressão e purificação da rSsuA com sucesso permitiu o início da etapa de caracterização tri-dimensional. Os ensaios de cristalização revelaram que a rSsuA2 apresenta um período grande de adaptação e formação da matrix do cristal, que

variou de 3 semanas a 3 meses. Apesar dos cristais serem pequenos e em forma de bastão, eles difratam com resolução acima de 2 Å. O pH ótimo evidenciado nos ensaios de CD e fluorimetria foi importante para o direcionamento dos ensaios de cristalização e um fator importante revelado na cristalização é que a proteína só é capaz de formar cristais em altas concentrações de sulfato, o que de certa forma já dá indícios de sua afinidade por este íon ou compostos sulfonados. O processamento dos dados dos cristais revelou que os mesmos pertencem ao grupo de alta simetria P21, com dimensões da célula unitária  $a = 30.93$ ,  $b = 86.00$ ,  $c = 47.20$ ,  $\alpha = 90.00^\circ$ ,  $\beta = 98.03^\circ$  e  $\gamma = 90.00^\circ$ . Durante o processo de adição de átomos pesados aos cristais pelo método de “crio-soaking”, ficou demonstrado que os mesmos são bastante resistentes à altas concentrações dos átomos, embora somente o conjunto de dados coletados com NaI foi capaz de gerar sinal anômalo. Atualmente, a análise da estrutura da rSsuA2 vem sendo desenvolvida no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas.

Finalmente, a partir deste trabalho, foi possível caracterizar pela primeira vez, um componente periplasmático pertencente à família de Transportadores ABC em *X. citri* que seja associado ao transporte de enxofre/sulfatos/sulfonatos. É importante ressaltar que este é um trabalho pioneiro e que vai servir de modelo para os sistemas de transporte em outros ortólogos.

## 6 CONCLUSÕES

- A proteína SsuA2 recombinante foi expressa e purificada com êxito a partir da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o vetor pET28a/SsuA2;
- Anticorpos anti-rSsuA2, produzidos em camundongos a partir da proteína purificada foram capazes de reconhecer a proteína expressa em *E. coli*, mas não nos extratos totais da *X. citri*.
- A clivagem da cauda de histidina foi realizada eficientemente pela trombina;
- Experimentos de espectroscopia revelaram que a proteína recombinante é produzida de forma enovelada e que a cauda de histidina não altera os perfis de dicroísmo e fluorescência intrínseca;
- A temperatura de desenovelamento da rSsuA2 com cauda é 2°C abaixo da obtida para a proteína sem cauda, indicando que a mesma altera a estabilidade térmica da rSsuA;
- A rSsuA2 é estável em pHs próximo de 7,0;
- A fluorescência intrínseca da rSsuA2 em diferentes pHs mostrou que a proteína aparentemente conserva sua estrutura em uma ampla faixa de pHs (entre 9.5 e 5.0), entretanto ela é estável apenas em pHs próximos de 7.0.
- Os cristais obtidos foram de ótima qualidade e difrataram com resolução de 1.6 Å incluindo aqueles submetidos às soluções de átomos pesados, o que permitirá a realização do processo de resolução da estrutura tri-dimensional desta proteína.

## 7 PERSPECTIVAS

- Processamento dos dados de difração dos cristais da rSsuA2 nativos e derivados;
- Resolução da estrutura tri-dimensional da proteína SsuA2 de *Xac*;
- Identificação dos ligantes de rSsuA2 e possíveis moléculas inibidoras;
- Análises funcionais em *X. citri* utilizando linhagens mutadas e inibidores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIA, M.C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.I.; DA SILVA, A.C.R.; FARAH C.S. 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. of Bacteriol.**, v. 186, p. 6186–6197, 2004.
- ALEGRIA, M.C.; SOUZA, D.P.; ANDRADE, M.O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.I.; DA SILVA, A.C.R.; FARAH, C.S. 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, p.2315-25, 2005.
- ALMEIDA, A.G.; SAYAMA, K.; TSUYUMU S. Isolation of a Protein Bound to Canker-forming Factor from Citrus Plant. **J. Gen. Plant Pathol.**, v. 66, p. 138-143, 2000.
- ASTUA-MONGE G.; FREITAS-ASTUA J.; BACOCINA G.; RONCOLETTA J.; CARVALHO S.A.; MACHADO M.A.. Expression Profiling of Virulence and Pathogenicity Genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. of Bacteriol.**, v. 187, p. 1201–1205, 2005.
- BRAIBANT; M.; GILOT; P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microb. Rev.**, v. 24, p. 449-467, 2000.
- CHAN, J.W.Y.F; GOODWIN, P.H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnol. Adv.**, v. 17, p. 489–508, 1999.
- CHEN, J.; SHARMA, S.; QUIOCHO, F. A.; DAVIDSON, A.L. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport. **PNAS**, v. 98, p. 1525–1530, 2001.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; DE SOUZA, A.A.; NETO, J.R.; DESTEFANO, S.A.L.; HARTUNG, J.S.; MACHADO, M.A. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p. 279-285, 2005.
- DA SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B., MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA JR.;N.F., ALVES; L.M.C., DO AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.B.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, R.C.C.; FERRO, M.I.T.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE JR.R.P.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.M.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.M.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA JR.,H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.F.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-63, 2002.
- DASSA, E. ABC transport. **Encyclopedia of microbiology**. New York: Academic Press, v. 1, p. 1-12, 2000.
- DASSA, E.; BOUIGE P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 211–229, 2001.
- DAVIDSON A.L. Mechanism of Coupling of Transport to Hydrolysis in Bacterial ATP-Binding Cassette Transporters. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 1225–1233, 2002.
- DAVIDSON, A.L.; CHEN, J. ATP-Binding cassette transporters in bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 241–68, 2004.



- DELEAGE, G.; GEURJON, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structures content of proteins from circular dichroism spectrum. **Comp. Appl. Biosc.**, v. 9, p. 197-199, 1993.
- DWYER, M.A.; HELLINGA, H. W. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. **Struct. Biol.**, v. 14, p. 495-504, 2004.
- DAWSON, R.J. P.; HOLLENSTEIN, K.; LOCHER, K.P. Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. **Mol. Microbiol.**, v. 65, n. 2, p. 250-257, 2007.
- EICHHORN, E.; VAN DER PLOEG, J. R. Sulfonate-sulfur metabolism and regulation I *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.**, v. 176, p. 1-8, 2001.
- EICHHORN, E.; VAN DER PLOEG, J. R.; LEISINGER, T. Characterization of a Two-component Alkanesulfonate Monooxygenase from *Escherichia coli*\*. **J. Biologic. Chem.**, v. 274, n. 38, p. 26639-26646, 1999.
- EICHHORN, E.; VAN DER PLOEG, J. R.; LEISINGER, T. Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. **J. of Biol.**, v. 182, p. 2687-2795, 2000.
- EICHHORN, E.; DAVEY, C.A.; SARGENT, D.F.; LEISINGER T.; RICHMOND, T.J. Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD. **J. Mol. Biol.**, v. 324, p. 457-468, 2002.
- EDELHOCH H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, p. 1948-54, 1967.
- ELKINS, J. M.; RYLE, M.J.; CLIFTON, I.J.; HOTOPP, J.C.D.; LLOYD, J.S.; BURZLAFF, N.I.; BALDWIN, J.E.; HAUSINGER, R.P.; ROACH, P.L. X-ray Crystal Structure of *Escherichia coli* Taurine/R-Ketoglutarate Dioxygenase Complexed to Ferrous Iron and Substrates. **Biochemistry**, v. 41, p. 5185-5192, 2002.
- GUILLOUARD, I.; AUGER S.; HULLO, M.-F.; F.CHETOUANI. Identification of *Bacillus subtilis* CysL, a Regulator of the *cysJI* Operon, Which Encodes Sulfite Reductase. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 17, p. 4681-4689, 2002.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Plant Manage. Netw.**, p. 1-35, 2002.
- GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molec. Plant Pathol.**, v. 5, p. 1-15, 2004.
- GUO, W.W.; GROSSER, J.W. Transfer of a potential canker resistance gene into citrus protoplasts using GFP as the selectable marker. **Acta Horticulturae**, n. 632, 255-258, 2004.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 205-210, 2001.
- JONES, P.M.; GEORGE, A.M. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 187-202, 1999.
- KAHNERT, A.; VERMEIJ, P.; WIETEK, C.; JAMES P. The *ssu* Locus Plays a Key Role in Organosulfur Metabolism in *Pseudomonas putida* S-313. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 10, p. 2869-2878, 2000.
- KERTESZ, M.A. Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol.Rev.**, v. 24, p. 135-175, 1999.

KIM, H.-S.; PARK, H.-J.; HEU, S.; JUNG, J. Molecular and Functional Characterization of a Unique Sucrose Hydrolase from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 411–418, 2004.

LAEMMLI, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LINTON, K.J.; HIGGINS, C.F.. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 5–13, 1998.

LEE, B.-M.; PARK, Y.-J.; PARK, D.-S.; KANG, H.-W.; KIM, J.-G. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. 577–586, 2005.

LI, W.; BRLANSKY, R.H.; HARTUNG, J.S. Amplification of DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from historic citrus canker herbarium specimens. **J. Microbiol. Methods**, v. 65, p. 237–246, 2006.

LLOP, J.C. Are we calculating morphine consumption accurately. **Aten Primaria**, v. 23, p. 51-2, 1999.

LOCHER, K.P. Structure and mechanism of ABC transporters. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 14, p. 426–431, 2004.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; DEWEESE-SCOTT, C.; FEDOROVA, N.D. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 383-387, 2003.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. W327-31, 2004.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; CHERUKURI, P.F.; DEWEESE-SCOTT, C. CDD: a Conserved Domain Database for protein Classification. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. D192-6, 2005.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. W20-5, 2004.

MEHTA, A.; ROSATO Y.B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**, v. 1, p. 1111–1118, 2001.

MEHTA, A.; ROSATO Y.B. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA. **Genet. Mol. Biol.**, v. 28, p. 140-149, 2005.

OSWALD, C.; HOLLAND, I.B.; SCHMIT, T L. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? **Arch. Pharmacol.**, v. 372, p. 385–399, 2006.

PAGE, R.D.M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Cabios Appli. Note**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PARKA, D.S.; HYUNB, J.W.; PARKA, Y.J.; KIMA, J.S.; KANGC, H.W. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on hrpW gene sequences. **Microbiol. Res.**, v. 161 p. 145–149, 2006.

PFLUGRATH, J.W.; QUIOCHO, F.A. Sulfate sequestered in the sulphate-binding protein of *Salmonella typhimurium* is bound solely by hydrogen bonds. **Nature**, v.314, p. 357-360, 1985.

POLIKARPOV, I.; PERLES, L.A.; DE OLIVEIRA, R.T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E.E.; GARRATT, R.C.; CRAIEVICH, A. Set-up and Experimental Parameters of the Protein Crystallography Beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. **J. Synchrotron Radiat.**, v. 1, n. 5, pt. 2, p. 72-6,1998.

POLIKARPOV, I.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E.E.; GARRATT, R.C.; ARRUDA, P.; LEITE, A.; CRAIEVICH, A. The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A**, v. 405, n. 1, p. 159-164, 1998.

RHODES, G. **Crystallography made Crystal Clear**: A guide for users of macromolecular models. 2. ed. London: Academic Press., 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. v. 1-3, 2. ed. Melbourne: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, AK. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. citri (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. citri (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. aurantifolii (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. citrumelo (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. malvacearum (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. smithii nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. alfalfae (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. alfalfae (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. fuscans" of *X. campestris* pv. Phaseoli (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. fuscans sp. nov. **System. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 494–518, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SANGER, F.; COULSON, A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.**, v. 25;94, n 3, p. 441–448, 1975.

STEC, E.; WITKOWSKA-ZIMNY, M.; HRYNIEWICZ, M.M.; NEUMANN, P.; WILKINSON, A.J.; BRZOZOWSKI, A.M.; VERMA, C.S.; ZAIM, J.; WYSOCKI, S.; BUJACZ, G.D. Structural Basis of the Sulphate Starvation Response in *E. coli*: Crystal Structure and Mutational Analysis of the Cofactor-binding Domain of the Cbl Transcriptional Regulator. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 309–322, 2006.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C. Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria Revealed by the Complete Genome Sequence. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 7254–7266, 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-80, 1994.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 4876–4882, 1997,

TUNG, S.Y.; KUO, T.T. Requirement for Phosphoglucose Isomerase of *Xanthomonas campestris* in Pathogenesis of Citrus Canker. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 5564–5570, 1999.

TYRRELL, R.; VERSCHUEREN, K.H.G.; DODSON, E.J.; MURSHUDOV, G.N.; ADDY, C.; WILKINSON, A.J. The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. **Structure**, v. 5, n. 8, 1997.

VAN DER DOES, C.; TAMPE, R. How do ABC transporters drive transport? **Biol. Chem.**, v. 385, p. 927–933, 2004.

VAN DER PLOEG, J. R.; IWANICKA-NOWICKA, R.; KERTESZ, M.A.; LEISINGER, T.; HYNIEWICZ, M. Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the *tauABCD* operon and other sulfate starvation-inducible gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7671-7678, 1997.

VAN DER PLOEG, J. R.; IWANICKA-NOWICKA, R.; BYKOWSKI, T.; HYNIEWICZ, M; LEISINGER, T. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic

sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl.. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 29358-29365, 1999.

VILORIA, Z.; DROUILLARD, D.L.; GRAHAM, J.H.; GROSSER, J. W. Screening Triploid Hybrids of Lakeland Limequat for Resistance to Citrus Canker. **Plant Dis.**, v. 88, p. 1056-1060, 2004.

YANG, Y.; GABRIEL, D. Intragenic Recombination of a Single Plant Pathogen Gene Provides a Mechanism for the Evolution of New Host Specificities. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 4963–4968, 1995.

YOUNG, J.; HOLLAND, I.B. ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1461, n° 255, 177-200, 1999.

## ANEXO 1

Tabela listando os genes do regulon *cys* com suas respectivas funções presentes em *E. coli* e em diferentes espécies de *Xanthomonas*:

Proteína	Função do produto gênico	Bactéria				
		<i>Eco</i>	<i>Xac</i>	<i>Xcc</i>	<i>Xcv</i>	<i>Xoo</i>
<i>sbp</i>	proteína periplasmática ligadora de sulfato	X	X	X	-	X
<i>cysP</i>	proteína periplasmática ligadora de tiosulfato	X	-	-	X	-
<i>cysU (T)</i>	permease	X	X	X	X	X
<i>cysW</i>	permease	X	X	X	X	X
<i>cysA</i>	ATPase	X	X	X	X	X
<i>cysD</i>	sulfato adenililtransferase subunidade 2 (ATP-sulfurilase)	X	X	X	X	X
<i>cysN</i>	sulfato adenililtransferase subunidade 1 (ATP-sulfurilase)	X	-	-	X	-
<i>cysC</i>	cisteína sintase	X	-	-	-	-
<i>cysH</i>	fosfoadenosina fosfosulfato redutase (PAPS)	X	X	X	X	X
<i>cysI</i>	sulfito redutase (NADPH), subunidade alfa	X	X	X	X	X
<i>cysJ</i>	sulfito redutase (NADPH), flavoproteína subunidade beta	X	X	X	X	X
<i>cysG</i>	siroheme sintase fusionado e siroheme ferroquelatase	X	X (3)	X (2)	X	X (2)
<i>cysE</i>	serina O-acetiltransferase	X	-	-	-	-
<i>cysK</i>	cisteína sintase A	X	X	X	X	X
<i>cysM</i>	cisteína sintase B	X	X	X	-	X
<i>cysZ</i>	proteína hipotética transportadora de sulfato	X	-	-	-	-
<i>cysB</i>	Ligadora de DNA transcricional duplo regulador, O-acetil-L-serina	X	X(3)	X (2)	X	X (2)
<i>Cbl</i>	Ligadora de DNA transcricional ativadora da biosíntese de cisteína	X	-	-	-	-
<i>ssuA</i>	proteína periplasmática ligadora de alcano sulfonato	X	X	-	-	-
<i>ssuB</i>	ATPase	X	X	-	-	-
<i>ssuC</i>	permease	X	X	-	-	-
<i>ssuD</i>	Alcano sulfonato monooxigenase	X	X	-	-	-
<i>ssuE</i>	FMN redutase dependente de NAD(P)H	X	X	-	-	-
<i>tauA</i>	proteína periplasmática ligadora de taurina	X	X	-	-	-
<i>tauB</i>	ATP-ase	X	X	-	-	-
<i>tauC</i>	permease	X	X	-	-	-
<i>tauD</i>	taurina dioxigenase	X	X	-	-	-

X = presença do gene; - = ausência do gene; ( ) = nº de cópias do gene.