Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

THIAGO GERONIMO PIRES ALEGRIA

**Caracterização cinética e busca de
inibidores de Ohr (Organic Hydroperoxide
Resistance protein) de *Xylella fastidiosa*.**

São Paulo
2012

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

THIAGO GERONIMO PIRES ALEGRIA

**Caracterização cinética e busca de
inibidores de Ohr (Organic Hydroperoxide
Resistance protein) de *Xylella fastidiosa*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador: Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo

2012

Alegria, Thiago Geronimo Pires

Caracterização cinética e busca de inibidores de Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) de *Xylella fastidiosa*.

125 páginas

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Palavras Chave: 1. Peroxidase dependente de tiol. 2. Ohr. 3. Hidroperóxidos de lipídeos. 4. *Xylella fastidiosa*

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto
Orientador

Aos meus pais,

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela oportunidade, pela orientação, atenção, paciência, conselhos e ensinamentos constantes. Um exemplo inspirador de competência.

Ao Dr. José Renato Rosa “Chefinho” Cussiol, pela amizade, em primeiro lugar. Mas também, pela confiança depositada, ensinamentos incansáveis, paciência, discussões (científicas ou não), risadas, futebol... Enfim, por anos inesquecíveis de ciência e diversão.

Ao Dr. José Freire, pela amizade, pelos ensinamentos sobre *Xylella*, microbiologia, recombinações, genes, plasmídeos e muito mais. Dedicção incansável.

À Dra. Karen Discola, pela paciência de outro mundo para explicar conceitos de cristalografia, pela ajuda nas eternas placas de cristalização, pelas conversas, amizade, congressos...

Ao Dr. Gustavinho “Femônemo” Monteiro Silva, pela amizade, pelos momentos divertidíssimos em qualquer lugar e a qualquer hora, pelas conversas sobre ciência e sobre a vida, e também pelo auxílio na elaboração desta dissertação.

À Profa. Dra. Gisele Monteiro “Silva” e ao Dr. Bruno “Habib” Horta, por muitas conversas, discussões, dicas, conselhos, análises de resultados... Assim como todos citados acima, exemplos a serem seguidos.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio e a Profa. Dra. Sayuri Miyamoto, pela colaboração, atenção e discussões científicas.

À Profa. Dra. Marilis de Valle, pela colaboração e as discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Marcão Oliveira pelas colaborações e risadas garantidas.

À Profa. Dra. Antônia do Amaral e o Dr. Alberto Malvezzi, pela colaboração na tentativa de inibição da Ohr.

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira, pela síntese das drogas candidatas a inibidor de Ohr.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, por disponibilizar seu laboratório de cristalografia.

À Dra. Marilene, por disponibilizar seu laboratório sempre que precisamos.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelos tempos de linha concedidos.

À Simone, por todo auxílio, confiança depositada e amizade. À Andressa, pela realização dos testes de inibição de Ohr, o auxílio nas culturas de *X. fastidiosa* e amizade.

Aos companheiros e amigos de laboratório: Marcela, Lucas “Mica”, Rafa, Dudu, Tati, Aline, Daiane, Gabriel, André, Tamyé, Mayara, que fizeram a rotina do dia-dia não ser uma rotina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e o suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao pessoal do Fleury, principalmente à Flávia Helena e à Patrícia Sacramento, pela amizade ainda recente, pela confiança depositada e pela paciência e compreensão no período de elaboração desta dissertação.

Ao meu primo, Dr. Marcos Alegria, pelas eternas conversas sobre escolhas, vida profissional, vida acadêmica, estudos... Sempre disponível e com ótimos conselhos.

Às famílias Biosal e Joganopagode, pelas medalhas (poucas), conquistas (nem tantas), lágrimas (às vezes), risadas (o tempo todo) e amizade (pra toda a vida). Um pouco de futebol e uma overdose de diversão.

Aos amigos da facul (Chefe, CET, Leucócito, CPF, Gozzoli, Pelúcia, Mimimi, Dé, Burzum, Brian, entre outros...). Discussões sem sentido, provas, trabalhos, festas, encontros, congressos, viagens e tudo mais que se precisa para ter momentos incríveis ao lado de pessoas especiais.

Aos eternos “Galléticos” (Marcellow, Pipa, Galleti, Cheroso, MikeAsmático, Minero, Carlos Vinícios, Dan, entre outros..), pelo futebol arte, açaí e risadas a toda hora.

Aos amigos de antes e sempre (André, Léo, Paulinho, Juba, Diogo, Vicente), por tudo que representaram e representam em minha vida.

Aos meus avós verdadeiros (Deolinda e José) e aos postiços também (Tia Nilva e Tio Caetano), pelo carinho e preocupação de sempre.

À Ana Carolina, por momentos inesquecíveis e especiais. Lágrimas, risos, descobertas, confirmações, sonhos, conquistas, realizações, decepções... Uma vida cheia de sentimentos e emoções intensas. Uma mulher sem igual.

Ao meu irmão, pelas risadas diárias, pelas conversas, pelo carinho, pela divisão das tarefas de casa (Ah tá....), pelos favores (Já vou... pera aí). Enfim, pela autenticidade e por me fazer ver o mundo de forma diferente.

Ao meu pai, que nunca mediu esforços para me dar tudo que eu precisei e que preciso. Uma vida dedicada ao trabalho incessante.

À minha mãe a quem devo tudo que sou e que ainda serei. Uma vida de dedicação, que por mais que eu tente, eu nunca conseguirei retribuir.

“Para compreender o universo no nível mais profundo,
precisamos saber não somente *como* ele se comporta,
mas também *por quê*.”

Stephen Hawking e Leonard Mlodinow,
em “O grande projeto”, 2010, p. 10.

Resumo

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa, colonizadora do xilema e é o agente responsável por doenças em plantas cultivadas. No Brasil, a principal doença causada por esta bactéria é a CVC (Clorose Variegada dos Citros), a qual traz grandes prejuízos à produção de laranja dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Apesar do atual controle da doença, ainda não se desenvolveu um método específico para o controle da bactéria. Durante a interação planta-patógeno ocorre uma geração exacerbada de oxidantes por parte do hospedeiro, na tentativa de eliminar o patógeno de seu organismo. Dessa forma, os patógenos são expostos a hidroperóxidos derivados de ácidos graxos, formados a partir da ação de lipoxigenases ou ainda pela reação direta de lipídeos com espécies oxidantes. Durante o processo evolutivo, foram selecionados mecanismos de defesa contra estas espécies oxidantes por parte dos patógenos. Dentre estes mecanismos, encontra-se a enzima Ohr (*Organic Hydroperoxide Resistance* protein), uma peroxidase baseada em resíduos de cisteínas, dependente de grupos lipoil e que possui alta atividade frente à hidroperóxidos orgânicos. Esta proteína provavelmente atua na proteção da célula bacteriana e possui algumas particularidades que fazem dela um alvo em potencial para o desenvolvimento de drogas. Os objetivos deste projeto foram caracterizar possíveis substratos fisiológicos de Ohr de *X. fastidiosa*, e ainda, buscar moléculas capazes de inibir a atividade peroxidásica desta enzima. Inicialmente demonstramos que Ohr é capaz de reduzir hidroperóxidos de ácido graxo com alta eficiência ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e, além disso, estes hidroperóxidos são capazes de inativar Ohr em um processo dose dependente, provavelmente devido à alta afinidade entre estes e a enzima. Porém, a enzima não apresentou atividade frente à hidroperóxido de fosfolípídeo (fosfatidilcolina) e hidroperóxido de colesterol. Ademais, elucidamos a estrutura de Ohr na conformação oxidada (ponte dissulfeto), auxiliando no entendimento da dinâmica do ciclo catalítico da enzima. Por fim, selecionamos um composto capaz de inibir a atividade peroxidásica de Ohr *in vitro*, e temos indícios de que este é capaz de afetar o crescimento bacteriano em situação de estresse oxidativo.

Abstract

Xylella fastidiosa is a gram-negative bacterium that colonizes the xylem and is the causative agent for several plant diseases. In Brazil, the main disease caused by this bacterium is the CVC (Citrus Variegated Chlorosis), which provokes large losses to the orange production in São Paulo and Minas Gerais states. Despite the current disease control, it has not been yet developed a specific method to eliminate the bacterium. During the plant-pathogen interactions, hosts produce an exacerbated amount of oxidants, in an attempt to eliminate the pathogen. Among them, fatty acids hydroperoxides are formed by the lipoxygenase action or even by the direct reaction between lipids and oxidant species. During the evolutionary process, pathogen defense mechanisms against oxidative species have evolved. Among them, Ohr (Organic Hydroperoxide Resistance protein) that is a Cys-based, lipoyl dependent peroxidase, displaying high activity towards organic hydroperoxides. This protein probably plays a central role in oxidative stress response and presents some particularities, which make it a potential target for drug design. The objectives of this project were to characterize possible physiological substrates of Ohr from *X. fastidiosa* and search for molecules capable of inhibiting its peroxidase activity. Initially, we demonstrated that Ohr reduced fatty acid hydroperoxides with high efficiency ($k_{cat}/K_M \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Moreover, these hydroperoxides inactivated Ohr in a dose-dependent manner, probably due to the high affinity between them and the enzyme. However, the enzyme did not display any activity towards phospholipids (phosphatidylcholine) hydroperoxides and cholesterol hydroperoxide. Besides, we elucidated the structure of Ohr in the oxidized form (disulfide bond), which gave us insights on the dynamics of structural elements in the catalytic site. Ultimately, we identified a compound that was able to inhibit the peroxidase activity of Ohr *in vitro*, and we gained evidences that this compound can affect the bacterial growth under oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. CVC e <i>Xylella fastidiosa</i>	17
Figura 2. Geração de oxidantes	20
Figura 3. Reação de Fenton	20
Figura 4. Reação de Haber-Weiss	21
Figura 5. Mecanismo detalhado da reação catalisada pelas LOXs	21
Figura 6. Formação de hidroperóxidos de lipídeo	23
Figura 7. Equação da atividade de peroxidases dependentes de tiol	25
Figura 8. Ciclo catalítico de Prxs	27
Figura 9. Reação catalisada por Gpxs	28
Figura 10. Indução da expressão de <i>ohr</i> na presença de ROS	30
Figura 11. Domínios conservados entre exemplares de Ohr	31
Figura 12. Estruturas de Ohr de <i>X. fastidiosa</i> (PDB 1ZB9) e Trx de <i>E. coli</i> (PDB 1ZCB) ..	32
Figura 13. Sítio ativo de Ohr (PDB 1ZB9)	32
Figura 14. Indução da expressão de <i>ohr</i> (A) e <i>ahpC</i> (B) por <i>northern blot</i> em <i>X. campestris</i>	33
Figura 15. Interação da molécula de PEG no sítio ativo de Ohr	34
Figura 16. Ciclo catalítico de Ohr	35
Figura 17. Fluxo de elétrons na redução de (hidro)peróxidos por Ohr	36
Figura 18. Análise da síntese de hidroperóxidos derivados de ácido oléico (A) e de ácido linoléico (B) por cromatografia de camada delgada	48
Figura 19. Análise da Purificação do hidroperóxidos derivados de ácido oléico (A) e linoléico (B)	50
Figura 20. Quantificação de hidroperóxidos por iodometria	51
Figura 21. Mutagênese por recombinação homóloga	53
Figura 22. Purificações das proteínas recombinantes	57
Figura 23. Atividade de Ohr na presença de Tween 20.....	59
Figura 24. Atividade redutora de Ohr	60
Figura 25. Comparação de sistemas redutores	60
Figura 26. Curva da velocidade pela concentração de substrato	61
Figura 27. Ciclo catalítico de Ohr e a possibilidade de superoxidação	63
Figura 28. Atividade comparativa de Ohr em diferentes condições	64
Figura 29. Curva da velocidade pela concentração de substrato	64
Figura 30. Curva da velocidade pela concentração de substrato	65
Figura 31. Ensaio de atividade de Ohr com FosfolipOOH e ChOOH	69
Figura 32. Análise da inativação de Ohr por superoxidação da Cys61.....	71
Figura 33. Análise da inativação de Ohr após incubação com hidroperóxidos	72
Figura 34. Inativação de Ohr após tratamento com hidroperóxidos orgânicos na presença de Tween-20	74
Figura 35. Ancoramento (<i>docking</i>) de hidroperóxidos de ácidos graxos monoinsaturados no sítio ativo de Ohr de <i>X. fastidiosa</i> (PDB 1ZB9)	76
Figura 36. Análise da formação do dímero de Ohr	77
Figura 37. Inativação de Ohr após tratamento com hidroperóxidos orgânicos na presença de Triton	78
Figura 38. Dados de atividade específica e de pK _a (Ohr WT e mutantes)	81
Figura 39. Comparação de parâmetros com e sem Triton X-100.....	82

Figura 40. Comparação da atividade de Ohr na redução de OLOOH (WT e mutantes)	83
Figura 41. Localização das fenilalaninas mutadas para tirosinas em Ohr de <i>X. fastidiosa</i>	84
Figura 42. Cristal de Ohr WT e padrão de difração	86
Figura 43. Arranjo de três moléculas na unidade assimétrica	87
Figura 44. Mapa de densidade eletrônica.....	89
Figura 45. Diagrama de Ramachandran da estrutura de Ohr no estado oxidado	89
Figura 46. Alinhamento de estruturas de Ohr	90
Figura 47. Alinhamento de estruturas de Ohr de <i>X. fastidiosa</i> e <i>P. aureginosa</i>	91
Figura 48. Alinhamento de estruturas de Ohr de <i>X. fastidiosa</i>	91
Figura 49. Contato cristalino entre duas unidades assimétricas	92
Figura 50. Sítio ativo de Ohr com alça aberta	93
Figura 51. Substratos de Ohr	94
Figura 52. Representação da superfície de Ohr de <i>X. fastidiosa</i>	94
Figura 53. Análise da localização de Ohr por <i>Western blot</i>	95
Figura 54. Curva de crescimento de linhagens de <i>E. coli</i>	98
Figura 55. Influência do IPTG no crescimento e na expressão de Ohr	99
Figura 56. Curvas de crescimento de linhagens mutantes de <i>E. coli</i> submetidas a estresse oxidativo	100
Figura 57. Análise da inibição da atividade de Ohr pelo composto 21	102
Figura 58. Curvas de crescimento de <i>X. fastidiosa</i> na presença de inibidor de Ohr ..	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de clonagem e expressão de genes alvo	41
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para realização de mutações	43
Tabela 3. Atividade de Ohr na presença de diversos solventes/detergentes	58
Tabela 4. Efeito de detergentes nos valores de parâmetros enzimáticos Ohr ..	66
Tabela 5. Parâmetros enzimáticos Ohr WT e mutantes	86
Tabela 6. Estatística dos dados de difração de Ohr	87
Tabela 7. Estatística do refinamento da estrutura de Ohr	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhpC	alquil hidroperóxido redutase subunidade C
AhpF	alquil hidroperóxido redutase subunidade F
AhpR	sistema alquil hidroperóxido redutase
BSA	albumina bovina sérica
CHP	hidroperóxido de cumeno
CVC	clorose variegada dos citros
Cys _p	cisteína peroxidásica
Cys _r	cisteína de resolução
DHLA	ácido dihidrolipóico
DO	densidade óptica
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
DTT	1,4-ditiotreitol
Gpx	glutathione peroxidase
GS	glutamina sintetase
GSH	glutathione reduzida
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HR	Resposta Hipersensitiva (<i>Hypersensitive Response</i>)
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LAOOH	hidroperóxido de ácido linoléico
LOOH	hidroperóxido de lipídeo
LOX	lipoxigenase
Lpd	dihidrolipoamida desidrogenase
LpdA	dihidrolipoamida desidrogenase A
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzido
NOX	NADPH oxidase
<i>ohr</i>	<i>organic hydroperoxide resistance gene</i>

Ohr	<i>Organic Hydroperoxide Resistance Protein</i>
OLOOH	hidroperóxido de ácido oléico
<i>osmC</i>	<i>osmotically inducible gene</i>
OsmC	<i>osmotically inducible protein</i>
PEG	polietileno glicol
PHGpx	glutaciona peroxidase de hidroperóxido de fosfolípídeo
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
Prx	peroxirredoxina
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
SH	sulfidrila reduzida
SOH	ácido sulfênico
SOD	superóxido dismutase
SucB	dihidrolipoamida aciltransferase
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trx	tiorredoxina
TrxR	tiorredoxina redutase
Tsa	<i>thiol-specific antioxidant</i>
WT	selvagem (<i>wild type</i>)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1. A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> e a CVC.	17
1.2. Interação planta-patógeno e a peroxidação lipídica.	19
1.3. A Defesa antioxidante.....	23
1.4. Peroxidasas dependentes de tiol.	24
1.4.1 Peroxirredoxinas	25
1.4.1 Glutathione peroxidases	28
1.4.1 Família protéica Ohr/OsmC.....	29
2. Objetivos.....	38
3. Materiais e métodos.....	39
3.1. Reagentes	39
3.2. Detergentes/Solventes orgânicos testados	39
3.3. Meios de cultura	39
3.4. Kits e enzimas	40
3.5. Vetores	40
3.6. Linhagens	40
3.7. Superexpressão de genes de <i>X. fastidiosa</i> em <i>E. coli</i>	41
3.8. Solubilização de ácido lipóico pelo método do pH alcalino	42
3.9. Mutação sítio-dirigida	42
3.10. Sequenciamento de plasmídeos resultado de mutagênese	43
3.11. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	43
3.12. Reações de PCR	44
3.13. Preparação do extrato protéico e purificação da proteína de interesse	44
3.14. Análise de proteínas em gel (SDS-PAGE).....	45
3.15. <i>Western blot</i>	46
3.16. Quantificação de proteínas	46
3.17. Superexpressão de Ohr de <i>X. fastidiosa</i> em linhagens mutantes de <i>E. coli</i> ...	46
3.18. Redução de lipoamida livre por borohidreto de sódio (NaBH ₄).....	46
3.19. Quantificação de dihidrolipoamida por DTNB (reagente de Ellman)	47

3.20. Ensaio de atividade peroxidásica NADH dependente mediada por Ohr	47
3.21. Síntese de hidroperóxidos derivados de ácido graxo	48
3.22. Análise por cromatografia líquida em camada delgada	49
3.23. Purificação de hidroperóxidos derivados de ácido graxo	49
3.24. Quantificação de hidroperóxidos por iodometria	50
3.25. Atividade da fosfolipase A ₂	51
3.26. Análise da superoxidação de Ohr	52
3.27. Tentativa de construção da linhagem Δ ohr de <i>X. fastidiosa</i>	52
3.28. Transformação de células competentes de <i>X. fastidiosa</i>	54
3.29. Separação e detecção de proteínas da fração extracelular de <i>X. fastidiosa</i> ..	54
3.30. Cristalização e refinamentos	54
3.31. Cristalografia de raios-X e análise dos dados estruturais	56
3.32. Processamento de dados	56
4. Resultados e Discussão.....	57
4.1. Caracterização enzimática de Ohr	57
4.1.1. Expressão e purificação de enzimas recombinantes de <i>Xylella fastidiosa</i>	57
4.1.2. Efeito de detergentes na atividade de Ohr sobre hidroperóxidos orgânicos	57
4.1.3. Atividade de Ohr sobre hidroperóxidos de fosfolipídios e de colesterol	68
4.1.4. Inativação de Ohr	70
4.1.5. Avaliação dos mutantes de Ohr	80
4.2. Análise estrutural de Ohr	85
4.2.1. Elucidação da estrutura de Ohr de <i>X. fastidiosa</i> na forma de dissulfeto intramolecular (oxidada).....	85
4.3. Análises do papel fisiológico de Ohr	94
4.3.1. Separação e detecção de proteínas da fração extracelular de <i>X. fastidiosa</i>	94
4.3.2. Tentativas de construção da linhagem Δ ohr de <i>X. fastidiosa</i>	96
4.3.3. Papel fisiológico de Ohr de <i>X. fastidiosa</i> em sistema heterólogo.	97
4.3.4. Testes de inibição de crescimento em culturas de <i>X. fastidiosa</i>	101
5. Conclusões	105
6. Perspectivas	106
7. Referências Bibliográficas	107
8. Anexo	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. A bactéria *Xylella fastidiosa* e a CVC.

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa, não flagelada, restrita ao xilema e que causa danos a uma gama de plantas de diferentes grupos taxonômicos, entre elas videiras, café, amendoeira, oleandro e citros (Hopkins & Purcell, 2002). Esta bactéria é responsável por um grande impacto na agricultura mundial, principalmente no continente americano (Lambais *et al.*, 2000). Um dado interessante é que as plantas que apresentam os sintomas são em sua maioria exóticas, enquanto plantas nativas se apresentam como hospedeiros tolerantes (Redak *et al.*, 2004).

No Brasil, a principal doença causada pela bactéria é a clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como amarelinho, a qual traz grandes prejuízos principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais. As primeiras plantas que apresentavam os sintomas da doença foram detectadas em 1987, em pomares do triângulo mineiro e norte e nordeste do estado de São Paulo (Rosseti *et al.*, 1990). Em meados do ano 2000, a doença já infectava árvores em aproximadamente 90% dos pomares deste estado (Lambais *et al.*, 2000).

O patógeno é transmitido e disseminado nos campos de cultivo por insetos vetores popularmente conhecidos como cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) (Purcell & Hopkins, 1996). Estes insetos adquirem a bactéria ao se alimentarem da seiva de plantas contaminadas podendo, a partir de então, transmiti-la para plantas sadias. (Brlansky *et al.*, 1983).

Durante a infecção, os primeiros órgãos vegetais a apresentarem sintomas são as folhas. Estes sintomas passam posteriormente para os frutos e acabam afetando toda a planta (Purcell *et al.*, 1996). Com o passar do tempo e o agravamento da doença, os frutos tornam-se queimados pelo sol, com tamanho reduzido, endurecidos e apresentam maturação precoce (figura 1-A). Nesse estágio, os frutos são imprestáveis para o comércio (Fundecitrus, 2011).

Ainda hoje, o mecanismo pelo qual a bactéria estabelece a infecção ainda não foi totalmente elucidado, porém a idéia mais aceita é que os sintomas apresentados se devam ao estresse hídrico em decorrência do entupimento dos vasos condutores do xilema vegetal. Este entupimento pode ser relacionado ao bloqueio direto pelas

células bacterianas (figura 1-B), as quais formam agregados e produzem um polissacarídeo extracelular (de Souza *et al.*, 2003), ou ainda, por bloqueios derivados da resposta da planta à infecção (Chatterjee *et al.*, 2008).

Figura 1. CVC e *Xylella fastidiosa*. A. Exemplos de folhas e frutos de uma planta contaminada (esquerda) em comparação aos de uma planta sadia (direita). Retirado de Hopkins & Purcell, 2002. B. Micrografia eletrônica mostrando *X. fastidiosa* em vasos do xilema de uma videira. © Dr. Doug Cook, UC Davis.

Devido ao grande impacto econômico da doença, em 1997 foi lançado o programa de seqüenciamento do genoma da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*, responsável pela CVC. Ao final deste projeto foram anotados 2849 genes, somando-se o cromossomo circular e os dois plasmídeos naturais. Além da importância para um melhor entendimento da doença, este estudo representou o primeiro seqüenciamento genômico completo de um patógeno vegetal. (Simpson *et al.*, 2000).

A partir deste momento se tornaram necessários os estudos funcionais para um melhor conhecimento da bactéria e sua patogenicidade. Em 2001, foram obtidos transformantes das linhagens encontradas em citros, utilizando plasmídeos híbridos contendo a origem de replicação (*oriC*) do cromossomo de *X. fastidiosa* (Monteiro *et al.*, 2001), ou plasmídeos endógenos da bactéria ligados a vetores de *Escherichia coli*. (Qin & Hartung, 2001).

Posteriormente, foram descritos os primeiros mutantes por recombinação homóloga em *X. fastidiosa*. Estes foram criados utilizando-se vetores contendo a origem de replicação da bactéria, tanto a origem de replicação (*oriC*) do cromossomo circular (Gaurivaud *et al.*, 2002), quanto à origem de replicação de um plasmídeo endógeno (da Silva Neto *et al.*, 2002).

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando-se a estratégia de criação de mutantes de *X. fastidiosa* e a caracterização de seus fenótipos. Estes trabalhos avaliam principalmente características que parecem ser importantes na virulência, como formação de biofilme, sinalização célula-célula, motilidade, entre outros (Feil *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2010; Cursino *et al.*, 2011).

Porém, focando-se no controle da doença, pouco tem se enfatizado sobre o controle específico da bactéria, como por exemplo, a análise do efeito de peptídeos antimicrobianos sobre a expressão gênica de *X. fastidiosa* (Fogaça *et al.*, 2010). O combate da doença na atualidade se dá principalmente pela poda, eliminação de plantas doentes e mais antigas, além da utilização de inseticidas no combate dos insetos vetores. Portanto, devido à gravidade do problema e a ausência de soluções eficazes, é interessante a idéia da obtenção de uma droga específica contra o patógeno.

1.2. Interação planta-patógeno e a peroxidação lipídica

Devido ao fato das plantas estarem relativamente restritas ao local onde vivem, foram desenvolvidas estratégias apropriadas de defesa aos patógenos existentes, as quais incluem processos bioquímicos e de biologia celular. Dentre estes processos, podemos citar a produção de compostos microbicidas (dentre eles, espécies reativas de oxigênio), reforços na parede celular, e ainda a morte celular programada, a qual limita o estabelecimento e a propagação do patógeno dentro do corpo do vegetal (Abramovitch & Martin, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês 'Reactive Oxygen Species') são formadas no processo de redução do oxigênio molecular a água, podendo ser radicalares ou não. A definição de radical livre é qualquer espécie de existência independente que possua pelo menos um elétron desemparelhado (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A produção exacerbada de ROS por plantas foi caracterizada como resposta a invasão de um patógeno, visando eliminar este de seu organismo (Bolwell & Wojtaszek, 1997). Esta produção provém, dentre outras, da atividade enzimática da NADPH oxidase (NOX) presente na membrana plasmática da célula vegetal. Neste

contexto, Lamb & Dixon (1997) relataram que em muitas espécies de vegetais, a NADPH oxidase origina anion radical superóxido, o qual é posteriormente dismutado a peróxido de hidrogênio pela atividade da superóxido dismutase (figura 2).

Além desta, existem outras potenciais fontes, de origem apoplástica, responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), como peroxidases, amino oxidases e oxalato oxidases (Robertson *et al.*, 1995).

Figura 2. Geração de oxidantes. A. reação catalisada pela enzima NADPH oxidase, na qual ocorre a formação e ânion radical superóxido. B. reação catalisada pela enzima superóxido dismutase, gerando H₂O₂.

O H₂O₂ é uma molécula capaz de difundir pela membrana plasmática e apresenta toxicidade para maioria das células em concentrações de 10µM a 100µM. Porém, muitos dos danos a macromoléculas são causados indiretamente, devido à formação do radical hidroxila (·OH), o qual é capaz de reagir rapidamente com moléculas de seu entorno, em decorrência de seu alto poder oxidante (potencial redox = +2.31V). Sua formação pode ocorrer a partir da reação de H₂O₂ com íon ferro ou cobre presentes no citoplasma (Reação de Fenton – figura 3) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Figura 3. Reação de Fenton. Formação de radical hidroxila a partir da reação de Fenton.

O peróxido de hidrogênio também é capaz de reagir com o ânion radical superóxido gerando também radical hidroxila pela reação Haber-Weiss (figura 4). Esta reação é catalisada por metais de transição como ferro e cobre (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Figura 4. Reação de Haber-Weiss. Formação de radical hidroxila a partir da reação de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio.

Outras enzimas importantes na resposta de plantas à patógenos são as lipoxigenases (LOX). Estas enzimas são dioxigenases que apresentam ferro, porém sem a presença do grupo heme. As lipoxigenases são capazes de realizar a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados utilizando oxigênio molecular, sendo que este processo consiste de quatro reações elementares (abstração de hidrogênio, rearranjo radical, inserção de oxigênio e redução do radical peroxil - figura 5).

Figura 5. Mecanismo detalhado da reação catalisada pelas LOXs. A enzima LOX catalisa a oxidação do ácido graxo em quatro reações consecutivas: Abstração do hidrogênio, rearranjo (deslocamento) do radical, inserção do oxigênio molecular e redução do radical peroxil pelo ganho de um próton. Retirado de Ivanov *et al.* (2010)

A função das LOXs na defesa contra patógenos é relacionada à síntese de hidroperóxidos de ácido graxo os quais por si só já apresentam toxicidade. Além disso,

estes hidroperóxidos podem dar origem a produtos voláteis com atividade microbicida (Croft *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1999). Sendo assim, as vias relacionadas às LOXs são essenciais na resposta de defesa de hospedeiros contra a invasão de patógenos (Casey & Hughes, 2004). Ademais, a atividade das LOXs pode iniciar a síntese de moléculas sinalizadoras ou induzir mudanças metabólicas nas células, as quais podem levar a morte celular. Este processo tem sido denominado Resposta Hipersensível (HR, do inglês “Hypersensitive response”) (Maccarrone *et al.*, 2001).

Além da reação enzimática discutida acima, lipídeos insaturados como colesterol e fosfolipídios podem sofrer dano oxidativo causados pela reação direta com ROS. Esta reação pode ocorrer em decorrência de processos fisiológicos naturais, como vazamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, assim como, exposição a agentes externos químicos ou físicos, e se desenvolve sob condições de estresse oxidativo.

Dentre os oxidantes capazes de causar peroxidação lipídica encontramos ROS, como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), radical hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot$), oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$), e ainda, espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês ‘Reactive Nitrogen Species’) como peroxinitrito (ONOO^-) e dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Tanto radical hidroxila, quanto peroxinitrito podem gerar peroxidação lipídica via abstração de um hidrogênio alílico de um lipídeo insaturado (LH). O radical lipídico formado ($\text{L}\cdot$) reage rapidamente com O_2 gerando um radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$), o qual propaga a peroxidação abstraindo um hidrogênio de um lipídeo insaturado na proximidade, tornando-se um hidroperóxido (LOOH) (figura 6-A). Já o oxigênio singlete pode gerar um hidroperóxido reagindo diretamente com um lipídeo insaturado, com a deslocação da dupla ligação e retenção do hidrogênio (figura 6-B).

Na ausência de agentes redutores e/ou íons metálicos, como cobre e ferro, os hidroperóxidos formados podem se acumular. Como consequência na célula, um dos principais efeitos da peroxidação lipídica de ácidos graxos componentes da membrana plasmática é a diminuição da fluidez da mesma, podendo alterar potencialmente as propriedades das proteínas ligadas à membrana, entre outros aspectos (Richter, 1987).

Figura 6. Formação de hidroperóxidos de lipídeo. **A.** Formação de hidroperóxido de lipídeo a partir de uma reação em cadeia. **B.** Formação de um hidroperóxido de lipídeo a partir da reação com oxigênio singlete. Adaptado de Girotti, 2008.

Hidroperóxidos derivados de ácidos graxos possuem uma maior meia vida quando comparados aos seus precursores ou produtos de radicais livres. Além disso, apresentam menor hidrofobicidade quando comparados aos lipídeos precursores. Estas características permitem uma maior facilidade na translocação em membranas, podendo migrar entre compartimentos celulares (Vila *et al.*, 2000).

Entretanto, na presença de íons cobre ou ferro os hidroperóxidos formados podem ser reduzidos em reação por um elétron, gerando assim radical alcóxil ($\text{LO}^\bullet$), o qual por sua vez pode propagar a reação de peroxidação lipídica (figura 6-A).

Alternativamente, hidroperóxidos formados podem ser reduzidos enzimaticamente, em uma reação de transferencia de dois elétrons, a qual reduz o hidroperóxidos aos alcoóis correspondentes. Neste contexto, pelo menos duas classes de enzimas antioxidantes intracelulares têm sido classicamente vinculadas a detoxificação de hidroperóxidos de lipídeo: glutathiona peroxidases e peroxirredoxinas.

1.3. Defesa antioxidante

Os hidroperóxidos, assim como outras ROS, são produzidos pelos hospedeiros em processos fisiológicos e também em situações de estresse, sendo que uma das possíveis funções de sua produção é a tentativa de eliminação de um patógeno. Em contrapartida, ao longo da evolução, foram selecionados diversos tipos de proteção antioxidante nos organismos patogênicos, sendo estes importantes em diferentes níveis e tipos de estresse.

Halliwell & Gutteridge (2007) definem antioxidante como: “qualquer substância que atrasa, previne ou remove danos oxidativos de uma molécula alvo”. Neste contexto temos como antioxidantes:

- Agentes que diminuem a formação de ROS (proteínas que diminuem a disponibilidade de pró-oxidantes como Fe e Cu).
- Compostos que reagem preferencialmente com ROS, preservando biomoléculas importantes (GSH, α -tocoferol, ascorbato, ácido dihidrolipóico).
- Proteínas que removem ROS cataliticamente (SOD, catalase, peroxidases).
- Proteínas que protegem biomoléculas de danos oxidativos por outros mecanismos (chaperonas).
- Sistema de reparo de biomolécula às lesões oxidativas (reparo de DNA, metionina sulfóxido redutase, glutathione peroxidase) (Netto, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Devido aos dados apresentados podemos concluir que o estresse oxidativo, o qual pode ser utilizado contra patógenos durante uma invasão, é danoso para as células. Portanto, a inibição de parte deste sistema nos parece uma estratégia interessante para o controle de um patógeno. Neste caso, o invasor estaria mais suscetível aos danos oxidativos provenientes das defesas do hospedeiro. Porém, para a escolha certa de um alvo dentro da gama de agentes protetores de estresse oxidativo, é necessário conhecimento detalhado da atuação destes agentes.

Devido à relevância neste trabalho, vamos nos ater apenas a um grupo dentro dos agentes que removem ROS cataliticamente, as peroxidases dependentes de tiol. Pois dentro deste grupo encontram-se as proteínas Ohr

1.4. Peroxidases dependentes de tiol

Enzimas antioxidantes atuam em reações redox, sendo responsáveis pela decomposição de ROS em reações de transferência de elétrons. Para desempenhar esta função, parte delas utiliza cofatores redox como NAD^+ , FAD, Heme, Cu, Fe entre outros. Porém, outras proteínas utilizam resíduos de aminoácidos de sua própria cadeia nessas reações redox. Entre estes resíduos podemos destacar a cisteína, um

aminoácido não essencial, hidrofóbico que possui um grupamento tiol (-RSH) em sua cadeia lateral.

A reatividade das cisteínas está relacionada com o pK_a da sulfidril, já que quando desprotonada ($-RS^-$) sua nucleofilicidade (afinidade por centros carentes de elétrons) é maior. Para comparação, a cisteína livre possui pouca reatividade em reações de transferência de elétrons e o pK_a de sua cadeia lateral está em torno de 8.5 (Benesch & Benesch, 1955). Ou seja, em pH fisiológico a sulfidril da cisteína livre encontra-se preferencialmente protonada. O mesmo ocorre com a maioria dos resíduos de cisteínas presentes em proteínas. Porém, em algumas enzimas, o enovelamento protéico pode gerar regiões que favorecem a reatividade das cisteínas. Proteínas envolvidas em processos redox possuem cisteínas reativas que são estabilizadas em sua forma tiolato (desprotonada) devido à proximidade a resíduo de aminoácido básico, geralmente lisina ou arginina (Netto *et al.*, 2006).

Entre estas proteínas que possuem resíduos de cisteínas reativos conservados em sua sequência, existe um grupo que necessita de agentes tiólicos para sua redução. Ou seja, só podem completar seu ciclo catalítico na presença de compostos/proteínas que contenham enxofre. Devido a esta necessidade, este grupo foi denominado peroxidases dependentes de tiol (figura 7). São integrantes deste grupo as peroxirredoxinas, glutathione peroxidases e a superfamília protéica Ohr/OsmC.

Figura 7. Equação da atividade de peroxidases dependentes de tiol. Equação demonstrando a redução de um (hidro)peróxido por uma peroxidase dependente de tiol. Em azul, os resíduos de cisteína de uma peroxidase dependente de tiol. Em verde um (hidro)peróxido. Quando $R^2 = H$, $R^2OOH = H_2O_2$ e $R^2OH = H_2O$.

1.4.1. Peroxirredoxinas

Em 1988, Kim *et al.* descreveram a purificação de uma proteína de 25kDa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que conferia proteção a inativação oxidativa de glutamina sintetase (GS), apenas em sistemas oxidantes que continham tiol. Devido ao fato dessa enzima proteger a glutamina sintetase, e outros alvos biológicos, apenas na presença de tióis como ditioneitol (DTT) e glutathione (GSH), e não na presença de

outros agentes redutores não-tiólicos (como ascorbato), a mesma foi denominada TSA (*Thiol Specific Antioxidant*).

Na sequência, foi verificado que o gene que codificava esta proteína não apresentava homologia com genes classicamente relacionados à proteção antioxidante como catalases, SOD ou peroxidases (Chae *et al.*, 1993). Posteriormente, Netto *et al.* (1996) mostraram que TSA era capaz de reduzir peróxidos e alquil hidroxiperóxidos na presença de um composto tiólico, apresentando atividade peroxidase dependente de tiol.

Posteriormente, foi demonstrado que o sistema contendo tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TR) era capaz de reduzir TSA. Neste ponto, enzimas codificadas por genes homólogos ao gene em questão foram denominadas tiorredoxinas peroxidases (Chae *et al.*, 1994). Entretanto, algum tempo depois foi demonstrado que nem todos os homólogos de TSA aceitam tiorredoxina como redutor, sendo assim, a família que agrupa essas enzimas foi denominada peroxirredoxinas (Prx) (Rhee *et al.*, 1999).

Em bactérias, as Prxs podem ser reduzidas por outros sistemas. Um dos mais bem descritos é o sistema enzimático da alquil hidroperóxido redutase (AhpR), o qual é responsável pela redução de alquil hidroperóxidos a seus correspondentes alcoóis. Este sistema é composto de duas subunidades e os respectivos genes apresentam-se em operon no genoma bacteriano: (1) AhpC (alquil hidroperóxido redutase subunidade C), uma peroxirredoxina com alta similaridade à TSA1 de *S. cerevisiae* (Storz *et al.*, 1989); e (2) AhpF (alquil hidroperóxido redutase subunidade F), uma flavoenzima que possui domínios funcionalmente similares à tiorredoxina e à tiorredoxina redutase (Chae *et al.*, 1994b), ou seja, apresenta em uma única proteína o sistema redutor tiorredoxina.

Foi descrito em *Salmonella typhimurium* que o mecanismo catalítico do sistema AhpR envolve a redução do hidroperóxido pela AhpC, seguida pela redução da AhpC oxidada pela proteína AhpF, as custas de elétrons provenientes do NAD(P)H (Tartaglia *et al.*, 1990). Na maioria dos organismos que não possuem AhpF, a proteína AhpC tem como doador de elétrons o sistema tiorredoxina (tiorredoxina e tiorredoxina redutase).

Em geral, as Prxs apresentam atividade protetora nas células devido a sua atividade peroxidásica, na qual H_2O_2 , peroxinitrito e uma gama de hidroperóxidos orgânicos são reduzidos e detoxificados. A importância dessa atividade pode ser observada na sua ampla distribuição entre os táxons, a qual inclui levedura, plantas, animais, bactérias e archea (Wood *et al.*, 2003).

Além disso, as Prxs têm sido envolvidas em processos de transdução de sinais, sendo que sua atividade peroxidásica pode ser regulada *in vivo* por fosforilação, proteólise e oxidação da cisteína peroxidásica (Wood *et al.*, 2003).

Atualmente, tem-se dado destaque ao estudo dos estados de oxidação da cisteína peroxidásica das Prxs, pois esta pode se apresentar em mais de um estado de oxidação *in vivo*. Neste contexto, H_2O_2 , que é um dos substratos naturais das Prxs, é capaz de oxidar o ácido sulfênico (-SOH) da cisteína peroxidásica a ácido sulfinico (-SO₂H), com subsequente perda de atividade peroxidásica por parte da enzima (Jacob *et al.*, 2004). Esta atividade pode ser restabelecida pela atividade da sulfirredoxina (Srx) a qual reduz o ácido sulfinico a sulfênico da cisteína peroxidásica de Prxs com gasto de ATP (Rhee *et al.*, 2005) (figura 8).

Figura 8: Ciclo catalítico de Prxs. Esquema demonstrando o ciclo catalítico, assim como, a desativação/ativação de 2-Cys Prxs. Retirado de Rhee *et al.*, 2005.

Entretanto, a presença de H_2O_2 não é suficiente para induzir a oxidação da cisteína catalítica de Prx I de ácido sulfênico a ácido sulfinico. Ao invés disso, todos os componentes catalíticos (H_2O_2 , Trx, TR e NADPH) são necessários, indicando que a superoxidação ocorre apenas quando Prx I está sendo re-reduzida pelo sistema

tiorredoxina, diminuindo a concentração no estado estacionário da forma oxidada (dissulfeto) (Rhee *et al.*, 2005).

1.4.2. Glutathione peroxidases

Glutathione peroxidases (Gpxs) é um grupo de enzimas que reduzem diversos (hidro)peróxidos, dentre os quais podemos citar peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de colesterol, de fosfolípidos e de timina. Para isto utilizam elétrons provenientes da glutathione (GSH - γ -glutamylcystenylglycine - figura 9).

Figura 9: Reação catalisada por Gpxs. Na redução de um peróxido ocorre a transferência dos elétrons provenientes da glutathione. Neste processo ocorre a oxidação da glutathione (GS-SG).

Gpx-1 foi primeiramente descrita em mamíferos, apresentando uma selênio-cisteína no sítio ativo, um resíduo de cisteína que possui um átomo de selênio (Se) ao invés de um enxofre em sua cadeia lateral. Posteriormente, outras Gpxs foram descritas, inclusive em plantas e bactérias, onde o resíduo de selênio-cisteína é substituído por uma enxofre-cisteína convencional (Toppo *et al.*, 2009). A glutathione, redutor *in vivo* da maioria das Gpxs, é amplamente encontrada em diferentes táxons como animais, plantas, e diversas bactérias aeróbias em concentrações intracelulares da ordem de milimolar (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Classicamente as Gpxs são divididas em quatro grupos, dentro dos quais, em sua maioria os exemplares são compostos por enzimas que contêm selênio-cisteína. A presença do selênio diminui o pK_a de aproximadamente 8,3 (quando -SH) para 5,2 (quando -SeH), favorecendo assim, a existência da forma desprotonada e com maior nucleofilicidade (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em *S. cerevisiae* e *E. coli*, existe uma classe de Gpx com um resíduo de enxofre cisteína conservado em seu sítio ativo. Assim como um grupo de enzimas homólogas de mamíferos (Gpx-4), essas Gpxs são capazes de reduzir hidroperóxidos de fosfolípidos, tendo sido denominadas Glutathione peroxidases de hidroperóxidos de fosfolípidos (PHGpxs) (Avery & Avery, 2001; Toppo *et al.*, 2009).

Os hidroperóxidos de fosfolípidos podem atuar como agentes centrais na cadeia de reações de peroxidação lipídica na membrana plasmática. Sendo assim, as PHGpx

estão envolvidas no reparo de lipídeos podendo ser reconhecidas como a principal linha de defesa do organismo contra danos oxidativos à membrana (Ursini *et al.*, 1995).

1.4.3. Família proteica Ohr/OsmC

A família Ohr/OsmC é composta por três subfamílias. As proteínas OsmC pertencem à subfamília do tipo I, proteínas Ohr a subfamília do tipo II e a subfamília do tipo III compreende proteínas de função ainda desconhecida na qual está inserida a proteína Yhfa de *E. coli*. Através de análise comparativa de estrutura demonstrou-se que dentre as três subfamílias, Ohr e OsmC são mais semelhantes entre si, possuindo identidade de sequência de amino ácidos em torno de 20% entre as subfamílias e cerca de 40-70% dentro de cada subfamília. Já o grupo III possui características peculiares, como uma maior abertura da cavidade catalítica e a ausência de um resíduo de arginina conservado no sítio ativo, o que poderia impossibilitar sua função como uma tiol peroxidase. Apesar das discrepâncias, as três subfamílias conservam um enovelamento protéico característico (Atichartpongkul *et al.*, 2001; Lesniak *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004).

O gene *ohr* foi primeiramente caracterizado em *X. campestris* pv. *Phaseoli* por Mongkolsuk *et al.* (1998). Neste estudo, linhagens de bactéria Δohr apresentavam maior susceptibilidade a hidroperóxidos orgânicos que a linhagem selvagem. Porém, o mesmo não ocorria em relação a peróxido de hidrogênio e geradores de ânion radical superóxido. Ademais, foi demonstrado que o gene *ohr* é altamente induzido na presença de hidroperóxido orgânico e não na presença de peróxido de hidrogênio (figura 10). E ainda, que a transformação de *E. coli* k-12, *P. aeruginosa*, e *Agrobacterium tumefaciens* com plasmídeos contendo o gene *ohr* aumentavam a resistência dessas bactérias perante *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP), quando comparado às linhagens selvagens. Este conjunto de resultados levou a denominação do gene como “organic hydroperoxide resistance gene”, até então de função bioquímica desconhecida.

Figura 10. Indução da expressão de *ohr* na presença de ROS. Análise por *western blot* (acima) e por *northern blot* (abaixo) de colônias de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* não induzida (UN) e induzida com 100 μ M de menadiona (MD), H₂O₂ e *t*-BHP (tBOOH). Adaptado de Mongkolsuk *et al.*, 1998.

Até então, postulava-se que o sistema da alquil hidroperóxido redutase (AhpR) era o único sistema responsável pela redução de alquilhidroperóxidos em procariotos (Jacobson *et al.*, 1989).

Posteriormente, a proteína Ohr de *X. fastidiosa* foi caracterizada por nosso grupo como uma peroxidase dependente de tiol, mostrando a existência de duas cisteína conservadas na sequência de diversas Ohrs (figura 11). Estes resíduos de cisteína estão diretamente relacionadas à atividade peroxidásica da enzima, pois mutações sítio dirigidas substituindo Cys por Ser anularam a atividade peroxidásica (Lesniak *et al.*, 2002; Cussiol *et al.*, 2003).

Diferentemente das Prxs, somente ditióis, (como DTT e β -mercaptoetanol) e não monotióis (como por exemplo, GSH) são capazes de sustentar a atividade peroxidásica de Ohr, ou seja, são capazes de doar elétrons para a proteína, reduzindo-a (Cussiol *et al.*, 2003). Ainda, foi observado que Ohr apresenta maior atividade sobre hidroperóxidos orgânicos comparativamente a H₂O₂, sendo necessária a utilização de aproximadamente uma concentração cem vezes maior de enzima para atingir velocidade similar de consumo de peróxido.

Figura 11. Domínios conservados entre exemplares de Ohr. Resíduos de cisteína altamente conservado dentre os diversos exemplares de Ohr. Modificado de Cussiol *et al.*, 2003.

Lesniak *et al.* (2002) elucidaram a estrutura de Ohr de *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando que a enzima possui um enovelamento característico: um homodímero de forma elíptica, no qual duas folhas β rodeiam duas hélices centrais. Outras peroxidases dependentes de tiol, como peroxirredoxinas e glutathione peroxidases apresentam o enovelamento clássico ao de tioredoxina, com uma folha beta central, flanqueada por alfa hélices (figura 12). Neste mesmo trabalho foi demonstrada a importância do resíduo de arginina presente no sítio ativo da proteína, pois a proteína mutante para esse resíduo (R19Q) apresentou atividade reduzida, quando comparada a proteína selvagem. No sítio ativo de Ohr de *X. fastidiosa* podemos observar que o resíduo de arginina (Arg19) realiza uma ligação de hidrogênio com a cisteína peroxidásica (Cys61), e uma ponte salina com um resíduo de glutamato (Glu51), sendo provavelmente responsável pela estabilização da cisteína peroxidásica na forma tiolato, levando a um decréscimo de pK_a da mesma (figura 13).

Figura 12. Estruturas de Ohr de *X. fastidiosa* (PDB 1ZB9) e Trx de *E. coli* (PDB 1ZCB). Comparação de enovelamentos protéicos entre uma Ohr e uma Trx. Figuras criadas utilizando software Pymol.

Figura 13. Sítio ativo de Ohr (PDB 1ZB9). Representação do sítio ativo de Ohr demonstrando as possíveis interações entre os resíduos importantes para a catálise. Figura criada utilizando software Pymol.

Outros estudos indicaram que a proteína Ohr estaria envolvida na resposta bacteriana a hidroperóxidos de ácidos graxos, visto que o gene era altamente induzido em sua presença, superando inclusive, a indução por *t*-BHP (Klomsiri *et al.* 2005). O mesmo não foi observado para o gene *ahpC*, o qual é classicamente relacionado à proteção contra hidroperóxidos orgânicos (figura 14).

Figura 14. Indução da expressão de *ohr* (A) e *ahpC* (B) por *northern blot* em *X. campestris*. Hidroperóxido de ácido linoléico (LOOH) leva a uma maior indução de *ohr* que *t*-BHP enquanto a mesma resposta não é observada para *ahpC*. Adaptado de Klomsiri *et al.*, 2005.

Posteriormente, nosso grupo elucidou a estrutura de Ohr de *X. fastidiosa*, na qual foi encontrada uma molécula de polietileno glicol (PEG - uma molécula de cadeia alifática longa) aderida ao sítio ativo da enzima, provavelmente estabilizada por interações hidrofóbicas existentes com os resíduos componentes do sítio ativo de Ohr (Oliveira *et al.*, 2006). O polietileno glicol poderia simular a interação do substrato fisiológico com a enzima Ohr, por ter capacidade de encaixar no sítio ativo. De fato, alguns trabalhos mostram que moléculas de PEG podem ocupar sítios e canais normalmente pertencentes a ácidos graxos de cadeia longa (Delker *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2004; Ambrosio *et al.*, 2005).

É interessante ressaltar que diferentemente de Gpxs e Prxs, nas quais as cisteínas envolvidas na catálise estão expostas ao solvente, na superfície da proteína, em Ohr as cisteínas encontram-se em um ambiente hidrofóbico, enterradas na estrutura. De fato, no trabalho de Oliveira *et al.* (2006) foi possível observar interações hidrofóbicas entre resíduos do sítio ativo da proteína (Phe68, Val124, Ala65, Phe96, Leu40, Val36 e Pro50) e a molécula de PEG (figura 15).

Figura 15. Interação da molécula de PEG no sítio ativo de Ohr. A. Representação das interações hidrofóbicas (em verde) existentes entre os resíduos de Ohr e a molécula de PEG. B. Representação da molécula de PEG inserida no sítio ativo de três diferentes Ohrs. Adaptado de Oliveira *et al.* (2006).

Sendo assim, foi proposto o ciclo catalítico de Ohr, no qual a enzima seria capaz de reduzir um hidropéroxido de ácido graxo. Primeiramente, o peróxido reage com o resíduo de cisteína peroxidásica (Cys_P) (na forma do ânion tiolato S⁻) tendo como resultado um álcool derivado do peróxido, além da formação de um ácido sulfênico (SOH) na Cys_P. O ácido sulfênico, por ser muito instável, reage rapidamente com a cisteína de resolução (Cys_R), formando uma ligação dissulfeto intramolecular e liberando uma molécula de água. A partir daí, é necessário um redutor biológico (ditiól) para tornar a enzima novamente ativa, reduzindo o dissulfeto intramolecular (Figura 16). Porém o redutor que atuaria *in vivo*, assim como os substratos oxidantes (peróxidos) de Ohr permaneciam desconhecidos até aquele momento.

Figura 16. Ciclo catalítico de Ohr. Redução de um hidroperóxido de ácido oléico por catálise da enzima Ohr. Em destaque, resíduos importantes na atividade enzimática. Adaptado de Oliveira *et al.* (2006).

No ciclo catalítico de Ohr é possível observar que a alça na qual está inserida a Arg19 está na sua conformação fechada, sendo estabilizada pelas interações que a arginina realiza com o Glu51 e a Cys61. Nos passos seguintes foi proposto que, após a oxidação da Cys61 ocorreria a desestabilização dessas interações, fazendo com que a alça se abrisse, podendo auxiliar na liberação do primeiro produto (figura 16).

Quanto à etapa de redução, recentemente demonstramos que enzimas lipoiladas, do metabolismo intermediário, interagem física e funcionalmente com Ohr, sendo provavelmente os redutores que atuam *in vivo*. Nesse sistema, dihidrolipoamida desidrogenase (Lpd) e dihidrolipoamida aciltransferase (SucB), componentes do complexo multi-enzimático da 2-oxoácido desidrogenase, assim como dihidrolipoamida desidrogenase A (LpdA) e dihidrolipoamida aciltransferase (PDHB), componentes do complexo piruvato desidrogenase, seriam intermediários da transferência de elétrons no ciclo catalítico e Ohr (Cussioli *et al.*, 2010 - figura 17).

Interessantemente, LpdA foi descrita em *Streptococcus pneumoniae* como uma dihidrolipoamida desidrogenase possuindo um sítio para ligação de ácido dihidrolipóico funcional, em sua porção N-terminal (Håkansson *et al.*, 2007). Portanto, se caracteriza como uma enzima que carrega seu próprio substrato, fato esse que foi observado também para LpdA de *X. fastidiosa* (Cussioli *et al.*, 2010).

Ainda, demonstramos que a enzima OsmC de *E. coli*, a qual também possui atividade peroxidásica, tem analogamente sua atividade sustentada pelo sistema lipoamida *in vitro*, mostrando que atuação desse sistema redutor não é restrito aos membros da subfamília Ohr. Concluindo, demonstramos que Ohr, assim como OsmC, apresenta uma atividade enzimática até então nunca descrita: peroxidase dependente de grupos lipoil (Cussiol *et al.*, 2010). Dessa forma, Ohr seria capaz de reduzir hidroperóxidos, utilizando para isso elétrons provenientes do NADH, tendo com intermediários desse processo enzimas classicamente relacionadas ao metabolismo intermediário (figura 17).

Figura 17. Fluxo de elétrons na redução de (hidro)peróxidos por Ohr. Enzimas do metabolismo intermediário participam do fluxo de elétrons na redução de oxidantes. Adaptado de Cussiol *et al.* (2010).

De acordo com estes resultados, associados a estudos de modelagem molecular demonstraram que uma molécula de ácido dihidrolipóico (DHLLA) é capaz de se encaixar no sítio ativo de Ohr de *Deinococcus. radiodurans* (Meunier-Jamin *et al.*, 2004). Interessantemente, a molécula de DHLLA tem sido descrita como um importante agente antioxidante, participando de reações de remoção de radicais livres e outras espécies oxidantes (Moini *et al.*, 2002).

Pouco tem sido explorado em relação à etapa de oxidação da enzima. Entretanto, recentemente foi demonstrado que Ohr de *Mycobacterium smegmatis* é capaz de reduzir hidroperóxido de ácido linoléico, assim como hidroperóxido de *t*-BHP e cumeno, com uma eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) em ordem de grandeza de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ por análise em estado estacionário. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou atividade de Ohr na redução de um hidroperóxido orgânico não sintético (Ta *et al.*, 2011).

Contraditoriamente, o gene *osmC* foi primeiramente descrito em *E. coli*, sendo sua indução dependente da fase de crescimento e da pressão osmótica do meio. Quando

células crescem em um meio com baixa pressão osmótica, sua indução se inicia imediatamente antes da entrada na fase estacionária. Porém, em meio com alta pressão osmótica sua indução ocorre no início do crescimento (Gutierrez & Devedjian, 1991; Gordia & Gutierrez, 1996).

Estudos posteriores demonstraram que uma linhagem $\Delta osmC$ de *E. coli* era mais sensível a exposição de *t*-BHP (experimentos de disco de inibição e unidades formadoras de colônia) do que a linhagem selvagem, sugerindo que assim como seu homólogo *ohr*, *osmC* estaria envolvido na defesa contra estresse oxidativo (Conter *et al.*, 2001), atuando provavelmente na redução dos hidroperóxidos, impedindo danos posteriores a outras biomoléculas importantes.

Estudos têm demonstrado a atividade peroxidásica de OsmC de diversos organismos, além de sua preferência por hidroperóxidos orgânicos (Lesniak *et al.*, 2003; Rehse *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008; Cussiol *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento, não se entende detalhadamente a relação entre sua indução e sua atividade bioquímica descrita. Outro aspecto relevante é que a atividade peroxidásica de OsmC determinada por k_{cat}/K_M é uma ou duas ordens de grandeza inferior a Ohr (Cussiol *et al.*, 2010). Apesar disso, existem alguns indícios que o choque osmótico poderia acarretar na geração de ROS, sendo que OsmC removeria peróxidos gerados por esse processo (Price & Hendry, 1991).

A família de proteínas Ohr/OsmC é encontrada exclusivamente em procariontes, sendo que o gene *ohr* está presente em diversos patógenos de animais e plantas como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Deinococcus radiodurans*, *Enterococcus faecalis*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Xanthomonas campestris* e *Xylella fastidiosa* (Shea & Mulks, 2002; Fuangthong *et al.*, 2001; Buchko *et al.*, 2009; Atichartpongkul *et al.*, 2001; Rince *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2008; Mongkolsuk *et al.*, 1998 e Cussiol *et al.*, 2003). Por outro lado, como mencionado anteriormente, a proteína Ohr possui um enovelamento característico, não compartilhado com proteínas eucarióticas. Portanto, o estudo e caracterização destas proteínas, assim como de seus possíveis substratos *in vivo*, podem auxiliar no desenvolvimento de novas drogas específicas de controle de patógenos procariontes.

2. OBJETIVOS

A proteína Ohr de *Xylella fastidiosa* parece ter um papel importante na detoxificação de hidroperóxidos orgânicos na célula bacteriana, podendo até mesmo ter uma ação protetora durante a relação hopedeiro-patógeno. Neste contexto, este trabalho tem como objetivos a caracterização cinética de Ohr frente a possíveis substratos fisiológicos, e ainda a busca por inibidores da atividade peroxidásica de Ohr, podendo estes, ser candidatos a futuras drogas de ação microbicida.

Durante a realização deste projeto tivemos três focos principais. No primeiro nos dedicamos ao entendimento da atividade enzimática de Ohr, através ensaios enzimáticos e experimentos de inibição. Em seguida nos dedicamos ao estudo estrutural da enzima por experimentos de cristalografia por difração de raios-X. Por último, nos preocupamos com o papel fisiológico na célula bacteriana, realizando experimentos de sobrevivência em células expressando Ohr.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Ácido lipóico, Acrilamida, agarose, ampicilina, bis-acrilamida (N,N'-metilenobis-acrilamida), BSA (albumina bovina sérica), canamicina, diamida, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)), DTT (1,4-ditiotreitol), Lipoamida, NADH (b-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido), NADPH (b-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzido), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), sulfato de amônio, sulfato de estreptomicina, *t*-BHP (*tert*-butilhidroperóxido), TCA (ácido tricloroacético), tetraciclina, Tris (tris(hidroximetil) aminometano) e uréia foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA). CHP (hidroperóxido de cumeno), H₂O₂ e β-mercaptoetanol foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Proteína A Sepharose foi obtida da GE Healthcare (Pittsburgh, Pensilvânia, USA). Brometo de etídeo, imidazol, e SDS (dodecil sulfato de sódio) foram obtidos da USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA). Marcadores de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder*, *Low DNA Mass Ladder*, *1 Kb Plus DNA Ladder* e *I DNA/Hind III Fragments*) foram obtidos da Invitrogen Corporation (Carlsbad, Califórnia, USA). T4 DNA ligase e as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Nde* I, *Nhe* I e *Xho* I foram obtidas da New England BioLabs, Inc. (Ipswich, Massachusetts, USA). Taq DNA polimerase, Hi-Fidelity Taq DNA polimerase e dNTPs foram obtidos da Fermentas Inc. (Glen Burnie, Maryland, USA). AMS (4-acetamido-4'-maleimidil-estilbeno-2,2'-dissulfonato) foi obtido da Molecular Probes (Invitrogen Hercules, Califórnia, USA). Peptona e extrato de levedura foram obtidos da Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Todos os demais reagentes empregados eram grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água tratada no sistema Milli-Q (Millipore Corporate, Billerica, Massachusetts, USA).

3.2. Detergentes/Solventes orgânicos testados.

Triton X-100 (USB); Tween[®] 20 (USB); Tween[®] 40 (USB); SDS (Merck); DMSO (Synth); Etanol (Merck); Metanol (Synth); Acetonitrila (EM Science).

3.3. Meios de cultura

Para *E. coli*:

- Meio LB: 1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de levedura.
- Meios sólidos: meio LB preparados com a adição de agarose 2%.
- Meios seletivos: LB acrescido de ampicilina (100ug/ml) e/ou canamicina (15ug/ml).

Para *X. fastidiosa*:

- Meio PWG: Fitona peptona 4g/l; tripticase peptona 1g/l; cloreto de hemina 0,001%; K₂HPO₄ 1g/l; MgSO₄.7H₂O 0,4g/l; glutamina 0,4%; glicose 0,5%.
- Meio sólido: meio PWG preparado com a adição de agarose 1,2%.
- Meios seletivos: PWG acrescido de ampicilina (10ug/ml).

3.4. Kits e enzimas

- Extração plasmidial: QIAprep® Miniprep (Qiagen).
- Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).
- DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare)
- Taq DNA polimerase (Fermentas).
- Taq DNA polimerase *Hi Fidelity* (Invitrogen).
- Enzimas de restrição: *Bam* HI; *Nde* I; *Xba* I; *Hind* III (New England Biolabs).

3.5. Vetores

- pET15b - 5708pb - vetor de superexpressão (Novagen).
- pET28a – 5369pb – vetor de superexpressão (Novagen).
- pProEX™-1 – 4733pb – vetor de superexpressão (Life technologies™).
- pGEM®-T Easy - 3015pb – vetor de clonagem (Promega)
- pUCBM21*oriC* - 3125pb - vetor utilizado para mutagênese por recombinação homóloga. Gerado através da junção do vetor pUCBM21 -2725pb - (Boehringer Mannheim) com um fragmento de 400pb contendo a origem de replicação cromossômica da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* (da Silva Neto *et al.*, 2007).

3.6. Linhagens

- *X. fastidiosa* J1a12: isolada de laranja pêra, transformável, não patogênica,

forma pequenos grumos (Monteiro *et al.*, 2001).

- *E. coli* DH5 α : [*endA1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA* ($Na^+ 1'$), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)_{U169} (*m80lacZ* Δ M15)]. (Novagen EMD Biosciences, Inc., Merck KgaA).
- *E. coli* BL21(DE3): [F^- , *amp T*, *hsdS_b* ($r_B^- m_B^-$), *gal*, *dcm* (DE3)]. (Novagen EMD Biosciences, Inc.).
- *E. coli* AD494(DE3): Δ (*ara leu*)7967 Δ *lacX74* Δ *phoA P_{vull} phoR* Δ *malF3* F' [*lac⁺ lacI^q pro*] *trxB::kan* (DE3) (Kan^R). (Novagen EMD Biosciences, Inc.).
- *E. coli* BW25113: *rrnB3* Δ *lacZ4787* *hsdR514* Δ (*araBAD*)567 Δ (*rhaBAD*)568 *rph-1*.
- *E. coli* JW1477: Δ *osmC* *rrnB3* Δ *lacZ4787* *hsdR514* Δ (*araBAD*)567 Δ (*rhaBAD*)568 *rph-1*.
- *E. coli* JW0598: Δ *ahpC* *rrnB3* Δ *lacZ4787* *hsdR514* Δ (*araBAD*)567 Δ (*rhaBAD*)568 *rph-1*. (Baba *et al.*, 2006) (<http://ecoli.aist-nara.ac.jp/>).

3.7. Superexpressão de genes de *X. fastidiosa* em *E. coli*.

As linhagens transformadas são crescidas em 1000 ml de LB na presença dos antibióticos específicos para cada linhagem de super expressão até atingir a D.O. desejada (entre 0.6-1.0). Na sequência, é adicionado IPTG ao meio de cultura de modo a ativar o promotor T7 presente no vetor de expressão, desencadeando assim a transcrição dos genes alvos e conseqüente superexpressão da proteína de interesse. As condições de expressão como concentração de IPTG, temperatura, tempo de indução e concentração dos respectivos antibióticos utilizados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de clonagem e expressão de genes alvo

Gene	Vetor	Linhagem	Antibióticos	Condições
<i>lpd</i>	pET-15b	AD494(DE3)	Ampicilina (100 μ g/ml) + Canamicina (15 μ g/ml)	0.5 mM IPTG, overnight, 20°C
<i>lpdA</i>	pET-15b	AD494(DE3)	Ampicilina (100 μ g/ml) + Canamicina (15 μ g/ml)	0.1 mM IPTG, ácido lipoico (300 μ g/ml), overnight, 20°C
<i>sucB</i>	pET-28a	BL21(DE3)	Canamicina (15 μ g/ml)	0.1 mM IPTG, ácido lipoico (300 μ g/ml), overnight, 20°C
<i>ohr</i> (WT e mutantes)	pET-15b	BL21(DE3)	Ampicilina (100 μ g/ml)	1 mM IPTG, 3h, 37°C

3.8. Solubilização de ácido lipóico pelo método do pH alcalino

Ácido lipóico é solubilizado em tampão fosfato de sódio pelo método do pH alcalino (Suzuki *et al.*, 1994). 300mg de ácido lipóico são adicionados em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 7.4. Nesse pH, ácido lipóico é insolúvel, portanto é adicionado hidróxido de sódio 5M até a total solubilização. De modo a corrigir o pH da solução para 7.4, é adicionado HCl 1M. Na sequência, o ácido lipóico solubilizado em tampão fosfato pH 7.4 é utilizado para enriquecer o meio de cultura no processo de indução, com o intuito que as enzimas recombinantes com sítio de ligação a ácido lipóico estejam 100% lipoiladas.

3.9. Mutação sítio-dirigida

Para realização das mutações sítio-dirigidas foi utilizado o kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis (Stratagene - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e um par de iniciadores contendo a mutação de interesse (tabela 2). Em 50 µL de reação de são adicionados: vetor molde 30 ng, cada oligonucleotídeo 12.5 pmol, dNTPs 200 µM e Pfu Turbo polimerase 2.5 U. Após amplificação e digestão do DNA molde com *DpnI* (uma endonuclease que somente reconhece a fita parental metilada digerindo-a). Os produtos de mutagênese são então transformados em células XL1-Blue por eletroporação e plaqueadas em meio sólido seletivo LB/Amp. Colônias resultantes são selecionadas para confirmação do inserto por PCR. Colônias no qual foi confirmado o inserto são crescidas em meio líquido LB/Amp e o vetor com o gene foi isolado (Kit de extração plasmidial). A região codificante do vetor isolado foi seqüenciada para verificação da geração das mutações desejadas. Os vetores com as respectivas mutações confirmadas foram transformados em linhagens de *E. coli* de expressão. A tabela 2 apresenta os oligonucleotídeos utilizados para geração de mutações sítio-dirigidas em Ohr.

Tabela2 – Oligonucleotídeos utilizados para realização de mutações.

Ohr	Sentido	Sequência (5' → 3')
V36S	<i>forward</i>	GTCAAGCTATCCT <u>TC</u> ACCACAGGGA
	<i>reverse</i>	AATCCCTGTGGT <u>IG</u> AGGATAGCTTGAC
L40T	<i>forward</i>	GTTCCACAGGGA <u>ACA</u> GGTGGCCCG
	<i>reverse</i>	CGGGCCACCT <u>TGT</u> TCCCTGTGGAAC
E51A	<i>forward</i>	GGTACCAATCCAG <u>GCG</u> CAACTGTTTG
	<i>reverse</i>	CAACAGTTG <u>CGC</u> TGGATTGGTACC
G95S	<i>forward</i>	GAAATCCCTGGT <u>TTC</u> TCGGCCTAGTC
	<i>reverse</i>	GACTAGGCCGAAG <u>GGA</u> ACCAGGGATTTC
F96Y	<i>forward</i>	GAAAT CCTGGTGGT <u>TAT</u> GGCCTAGTCGTAG
	<i>reverse</i>	CTACGACTAGGCC <u>ATA</u> ACCACCAGGGATTTC
P126H	<i>forward</i>	GCATCGTGTGTTGT <u>CAT</u> TACTCTAATGCAAAC
	<i>reverse</i>	GTTTGCATTAGAGTA <u>ATG</u> ACAAACACGATGC

3.10. Sequenciamento de plasmídeos resultado de mutagênese.

Os sequenciamentos dos plasmídeos foram realizados utilizando o sistema de análise de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare) do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o “DYEnamic ET Dye Terminator Kit” (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As sequências foram analisadas pelo software MegAlign, dentro do pacote DNASTar.

3.11. Transformação de células competentes de *E. coli*

O vetor de interesse e a bactéria eletrocompetente são colocados numa cubeta de eletroporação e sujeitos a um pulso de voltagem no eletroporador Gene Pulser II Electroporation System (Bio-Rad Laboratories), ajustado em 2,5 kV de voltagem e 25 µF de capacitância. Após o pulso de voltagem, as células são ressuspensas em 1 ml de LB sem antibiótico e deixadas sob agitação a 37°C, por 1 hora. Após esse período, são então plaqueadas em meio sólido seletivo LB na presença do respectivo antibiótico e incubadas *overnight* a 37°C. A presença de colônias representa a eficácia da transformação. A(s) colônia(s) selecionada(s) são então estriadas em uma nova placa

contendo antibiótico. Ao final, realiza-se PCR de colônia para confirmação da transformação com vetor contendo inserto de interesse.

3.12. Reações de PCR

Realizamos a purificação do DNA molde utilizando protocolo mais apropriado para cada situação. A amplificação sequência alvo foi realizada por reação de PCR (Condições específicas para cada experimento). Utilizamos o termociclador Perkin-Elmer 9700 (Applied Biosystems) e na reação a enzima Taq DNA polimerase (Fermentas) ou Taq DNA polimerase *Hi Fidelity* (Invitrogen) nas condições especificadas pelo fabricante. A amplificação da região desejada foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%. Em condição particular, realizamos o PCR de colônia. Este se baseia na utilização de uma pequena quantidade de bactérias (pequeno raspado de uma colônia crescida em placa) como fonte de DNA molde para a reação de PCR. As células bacterianas são adicionadas diretamente ao tubo de reação.

3.13. Preparação do extrato protéico e purificação da proteína de interesse.

Após o período de indução, as células são centrifugadas (5000 RPM por 10 min.), ressuspensas em tampão de lise celular (20 mM tampão fosfato de sódio pH 7.4, 500 mM NaCl e 20 mM imidazol) na presença de 100 µM PMSF e submetidas a diversos ciclos de sonicação no aparelho *Branson Digital Sonifier 450* (*Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA*) em amplitude de 40% por 25 segundos seguidos de 50 segundos de descanso em gelo. O lisado celular é tratado com estreptomicina 1% por 20 min., de modo a precipitar ácidos nucléicos presentes na amostra. A amostra é submetida à centrifugação (14000 RPM por 50 minutos a 4°C). Após a centrifugação o sobrenadante é filtrado utilizando-se filtros Durapore® de 0,45µm (Millipore).

Após a obtenção do extrato protéico, as proteínas são submetidas à purificação utilizando uma coluna de afinidade a níquel *His-Trap™ HP* (GE Healthcare) 5 ml e uma bomba peristáltica *P1™* (GE Healthcare). As etapas anteriores à purificação consistem em lavagem da coluna em água (5 volumes de coluna); aplicação de níquel 0.1 M (0.5 volume de coluna); lavagem em água (5 volumes de coluna); lavagem (10 volumes de

coluna) com tampão de ligação (20 mM tampão fosfato de sódio; 500 mM NaCl e 20 mM Imidazol).

Posteriormente a preparação da coluna é realizada a aplicação da amostra filtrada. Adiante, as amostras são purificadas com as seguintes soluções: inicialmente, tampão de ligação, e em seguida, tampão de eluição (20 mM tampão fosfato de sódio; 500 mM NaCl e 500 mM Imidazol). Nestas etapas, a amostra é lavada com tampão de ligação (10 volumes de coluna) para remover proteínas que interagem fracamente com a coluna. Por último, aplica-se o tampão de eluição (5 volumes de coluna) e as frações são coletadas em tubos *ependorf*. As etapas são realizadas sobre fluxo constante de 5 ml/min. De modo a refinar o grau de pureza das proteínas, realizamos uma purificação em gradiente de Imidazol. Nesse procedimento, entre as etapas de lavagem com tampão de ligação e eluição, há lavagens da coluna com concentrações crescentes de Imidazol (50, 100, 150 e 200 mM em 20 mM tampão Fosfato de sódio e 500 mM NaCl).

Após estes passos de purificação é realizada a análise do grau de pureza da proteína pela análise de SDS-PAGE. Posteriormente, realiza-se a troca de tampão através de filtração em gel utilizando-se a coluna PD-10 *desalting* (GE Healthcare). Primeiramente, a coluna é aberta e então o líquido presente na mesma se desloca por ação da gravidade e sai da coluna. Neste momento, é adicionado o tampão de eluição (20 mM tampão fosfato de sódio; 500 mM NaCl) a coluna (20 ml). Após a passagem deste volume, é adicionada a solução contendo a proteína (até 2,5 ml). Após a toda esta solução ter sido absorvida pela coluna, é adicionado tampão de eluição (3,5 ml) e a proteína é coletada em tubos *ependorf*.

3.14. Análise de proteínas em gel (SDS-PAGE).

Depois da etapa de purificação as amostras são submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (gel de separação - poliacrilamida 10%, gel de empacotamento – poliacrilamida 5%, SDS 0,1%). Utilizamos o sistema Mini Protean™ III (Bio-Rad) para a montagem dos géis e realizamos a corrida a 150V por 90 minutos em tampão Tris-Glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3). Logo após a corrida as proteínas são coradas em *comassie blue* 0,1% por 15 minutos e descoradas em solução 10% Metanol e 10% ácido acético glacial.

3.15. Western blot

Após o período de corrida, as amostras são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (1 hora; 250mA), utilizando aparato da NOVEX. Ao final da transferência é utilizado o reagente Ponceau para checar a qualidade da transferência. A membrana é então bloqueada com TBS/Leite 5% por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana é incubada com anticorpo primário anti-Ohr (produzido por nosso grupo) 1:1000 ou anti-ácido lipóico (cedido pelo Prof. Dr. Luke Ignatius Szveda - Free Radical Biology and Aging Research Program, Oklahoma Medical Research Foundation) 1:5000, em 20 ml de TBS-Tween 20, por 1 hora à temperatura ambiente e lavada 4x com TBS-Tween 20 por 5 minutos e 1x TBS por 10 minutos. Anticorpos secundários (anti-IgG de coelho) conjugados com fosfatase alcalina (Kirkegard and Perry laboratories) foram utilizados para revelar a membrana

3.16. Quantificação de proteínas

Para a quantificação das proteínas recombinantes foram utilizadas duas técnicas de medição. A primeira consiste na utilização do reagente Bradford (Kruger, 1994). O segundo método baseia-se na leitura de absorbância da proteína em solução tampão à 280nm, baseando-se na predição do peso molecular e coeficiente de extinção (ϵ) da proteína através da ferramenta *ProtParam Tool* (ExPASy).

3.17. Superexpressão de Ohr de *X. fastidiosa* em linhagens mutantes de *E. coli*.

As linhagens mutantes de *E. coli* foram transformadas com plasmídeo por eletroporação e crescidas em meio seletivo para análise dos transformantes (LB+Amp). Para os experimentos de superexpressão, são crescidos pré-inóculos “overnight” a 37°C e 180rpm. No dia seguinte, estes são diluídos para uma DO_{600nm} 0,05 e então foi adicionado IPTG (Concentração final 10 μ M). Posteriormente foram realizadas as análises de curvas de crescimento.

3.18. Redução de lipoamida livre por borohidreto de sódio (NaBH₄).

Lipoamida (Sigma-Aldrich) oxidada é incubada com borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:10 por 1 hora à 37°C. Após esse tempo, é adicionado ácido clorídrico (1-2M) para reagir com o excesso de borohidreto ainda existente, gerando

H₂ que é eliminado na fase gasosa. Posteriormente, é adicionado 1 volume de diclorometano. A solução é então agitada e posteriormente deixada em repouso por 15 minutos, com o intuito de separar as fases (orgânica e aquosa). Após esse tempo, é coletada a fase orgânica na qual é adicionado sulfato de sódio para desidratar a solução. Em seguida o sobrenadante é finalmente transferido para tubo limpo e seco, no qual se borbulha N₂. O *pellet* resultante é ressuscitado em etanol absoluto e a concentração de lipoamida reduzida (dihidrolipoamida) resultante é estimada através de reação com DTNB (Sigma-Aldrich).

3.19. Quantificação de dihidrolipoamida por DTNB (reagente de Ellman).

O produto resultante da reação de tiol (SH) ou tiolato (S⁻) com DTNB gera o composto tionitrobenzonato (TNB), que pode ser quantificado por espectrofotometria a 412 nm (coeficiente de extinção molar de 13600 M⁻¹.cm⁻¹). Na reação entre DTNB e dihidrolipoamida ocorre a liberação de uma molécula de TNB para cada molécula de dihidrolipoamida existente.

3.20. Ensaio de atividade peroxidásica NADH dependente mediada por Ohr.

Nesse sistema heterólogo, adaptado ao utilizado por Bryk *et al.* (2002), dihidrolipoamida é primeiramente oxidada pela enzima Ohr (a qual por sua vez foi oxidada pelo hidroperóxido) e posteriormente reduzida pela Lpd (lipoamida desidrogenase) que por sua vez é reduzida pelos elétrons provenientes do NADH (Sigma-Aldrich).

O ensaio é realizado nas seguintes condições: tampão fosfato de sódio (20 mM) pH 7,4; DTPA (1 mM) pH 7,4 e NADH (0,2 mM). As concentrações das enzimas, dihidrolipoamida e dos hidroperóxidos utilizadas no ensaio variaram conforme o experimento. A reação é iniciada com a adição do hidroperóxido e o consumo de NADH ($\epsilon = 6290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é monitorado no comprimento de onda de 340nm. Anterior à adição de hidroperóxido, há um consumo inicial de NADH devido à redução da lipoamida pela Lpd. Dessa forma antes de adicionar o hidroperóxido é necessário

esperar que toda a lipoamida seja reduzida. As velocidades foram calculadas a partir da inclinação da reta resultante da diminuição da absorbância a 340nm (oxidação do NADH presente na reação).

Em uma variante deste ensaio, SucB (subunidade E2 do complexo α -cetoglutarato desidrogenase, uma enzima lipoilada) substitui a lipoamida livre e em outra, LpdA (um único polipeptídio que possui ácido lipóico ligado covalentemente a sua estrutura, além de atividade lipoamida desidrogenase dependente de FAD) substitui Lpd e lipoamida livre.

Quando são utilizados hidroperóxidos de ácido graxo ou colesterol este ensaio é realizado na presença de detergente ou solvente orgânico em concentração adequada (descrita em cada experimento).

3.21. Síntese de hidroperóxidos derivados de ácido graxo.

(realizada em colaboração com a Prof. Dra. Sayuri Miyamoto IQ-USP)

A síntese dos hidroperóxidos é realizada por reação de ácidos graxos com oxigênio singlete gerado fotoquimicamente. Para isto é utilizada uma solução contendo 1g de ácido graxo puro (oléico/linoléico - Supelco), 50 ml de clorofórmio, e azul de metileno (Merck) 50 mM. Esta solução é mantida sob iluminação (duas lâmpadas de 500 W), agitação, refrigeração e oxigenação (0,25kgf/cm) constantes durante 3 horas. Foram retiradas alíquotas de 50 μ l a cada hora e analisadas por cromatografia de camada delgada como descrito abaixo (figura 18).

Figura 18. Análise da síntese de hidroperóxidos derivados de ácido oléico (A) e de ácido linoléico (B) por cromatografia de camada delgada. As setas mostram as diferentes migrações dos diferentes compostos: ácido oléico (OL) e linoléico (LA) migram mais rapidamente na sílica, enquanto os respectivos hidroperóxidos, derivado de ácido oléico (OLOOH) e de linoléico (LAOOH), possuem maior tempo de retenção na sílica. Os números abaixo representam o tempo a partir do início da síntese, no qual foi retirada a determinada alíquota. Fase móvel: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, 90:6.

3.22. Análise por cromatografia líquida em camada delgada.

Nesta análise são utilizadas placas (TLC Sílica gel 60 – Merck) nas quais foram aplicados 2µl de diferentes alíquotas. Após a aplicação as placas são inseridas em um recipiente contendo o eluente ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, 90:6) responsável pela migração dos compostos na placa. Ao final do deslocamento do eluente pela placa estas são retiradas do recipiente, borrifadas com H_2SO_4 e colocadas sobre uma superfície aquecida. Após determinado tempo é possível observar os compostos na placa, e analisar comparativamente sua migração.

3.23. Purificação de hidroperóxidos derivados de ácido graxo.

A purificação dos hidroperóxidos do respectivo ácido graxo é realizada utilizando-se uma coluna de suspensão de sílica em hexano (preparada manualmente). Nesta coluna é aplicada a amostra e posteriormente diferentes gradientes de hexano:éster (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50) com o intuito de separar os compostos pelo grau de hidrofobicidade. Sendo a sílica um material hidrofílico, os compostos mais hidrofóbicos (por exemplo, os ácidos graxos não modificados) tendem a percorrer a coluna fase estacionária (sílica) mais rapidamente, pois interagem mais fortemente com a fase móvel, constituindo, portanto, as primeiras frações.

Já os compostos menos hidrofóbicos (por exemplo, os hidroperóxidos derivados dos ácidos graxos) tendem a interagir mais com a sílica, aumentando seu tempo de retenção na fase estacionária (sílica). Estes são eluídos à medida que aumenta a proporção de éster na fase móvel.

Durante toda eluição são coletadas alíquotas de 10 ml, as quais são analisadas posteriormente por cromatografia de camada delgada para a análise da purificação dos hidroperóxidos (figura 19). Finalmente, as alíquotas contendo hidroperóxido puro são misturadas, secas (retirada de todo o solvente) utilizando-se N_2 e ressuspensas em metanol.

Figura 19. Análise da Purificação do hidroperóxidos derivados de ácido oléico (A) e linoléico (B). As figuras 1 representam a cromatografia em camada delgada inicial, utilizando-se intervalos (a cada 5 ou 3 frações) entre as amostras para analisar em quais alíquotas se encontravam os hidroperóxidos. Já as figuras 2 representam as cromatografias posteriores para analisar mais detalhadamente quais frações estavam puras e poderiam ser unidas. Os números representam as frações correspondentes.

3.24. Quantificação de hidroperóxidos por iodometria.

Este método se baseia na habilidade do íon I^- reduzir hidroperóxidos pela seguinte reação:

Nesta análise, é construída uma curva padrão utilizando-se um hidroperóxido comercial (no caso foi escolhido *t*-BHP). Para a análise da curva padrão e dos hidroperóxidos recém sintetizados procede-se da seguinte maneira: utilizam-se tubos de ensaio âmbar e com tampa nos quais são adicionados o hidroperóxido (como

branco é utilizado apenas o solvente), ácido acético:CHCl₃ (3:2) e Iodeto de potássio (40 mM, dissolvido em água previamente borbulhada com N₂).

Aos tubos de ensaio é borbulhado N₂ por 5 segundos, estes são então agitados por 5 segundos e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo, é adicionado acetato de cádmio - 5% (m/v).

Ao final, os tubos são agitados e a absorbância da fase menos densa é lida em espectrofotômetro a 353nm. A partir da curva padrão criada, podemos estabelecer a quantidade de hidroperóxido sintetizado (figura 20).

Figura 20. Quantificação de hidroperóxidos por iodometria. Acima: curva padrão de iodometria construída utilizando-se *t*-BHP. Abaixo: tabela da quantificação dos hidroperóxidos recém sintetizados.

3.25. Atividade da fosfolipase A₂.

O ensaio da fosfolipase foi realizado com base no protocolo descrito por Menashe *et al.* (1986). Em solução contendo CaCl₂ 10 mM, KCl 35 mM, Tampão Tris 20 mM pH 8,0 é adicionada fosfatidilcolina para uma concentração final de 100μM. A solução é agitada abruptamente durante um minuto. Posteriormente foi adicionada a fosfolipase A₂ (10u final), e então a solução é incubada 15 minutos a 40°C sob agitação branda. Após este tempo são adicionados os componentes do sistema dihidrolipoamida e triton X-100 para testar a atividade de Ohr sobre fosfolipídios tratados com fosfolipase A₂.

3.26. Análise da superoxidação de Ohr.

Para realização desta análise, primeiramente Ohr recém purificada (aproximadamente 300 μ M) é reduzida durante 1h, na presença de DTT em excesso (100 mM). Após a redução, a proteína Ohr é separada do excesso de DTT através de uma filtração em gel por gravidade, utilizando uma coluna PD10 *Desalting* (GE Healthcare), como descrito acima (Preparação do extrato protéico e purificação da proteína de interesse).

A proteína recém reduzida é então quantificada através de leitura da absorbância a 280nm em espectrofotômetro e então incubada na presença de diferentes hidroperóxidos orgânicos durante 1h a 37°C nas seguintes condições: tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; DTPA (1 mM) pH 7,4; Triton X-100 0,15% (v/v) ou Tween 20.

Após os tratamentos, a proteína é novamente submetida a uma filtração em gel por gravidade utilizando-se PD10 *desalting* (GE healthcare), requantificada e posteriormente submetida ao ensaio de atividade peroxidásica NADH dependente, e em alguns casos, sujeitas a análise por SDS-PAGE.

3.27. Tentativa de construção da linhagem Δ ohr de *X. fastidiosa*.

Foi utilizado um vetor construído para tentar interromper o gene *ohr* por recombinação homóloga, o qual contém um fragmento de 400pb, correspondente a origem de replicação do cromossomo (*oriC*) de *X. fastidiosa* (da Silva Neto *et al.*, 2002). Para a realização deste, primeiramente foi realizada a purificação do DNA gênomico da linhagem J1 a 12 de *X. fastidiosa* segundo protocolo de Chen & Kuo (1993). Na seqüência realizamos uma reação de PCR (utilizando os seguintes oligonucleotídeos: Ohrkout-*foward* – 5' GCTCTAGAGTTGTATCTTCGGACAACGTG 3' e Ohrkout-*reverse* – 5' CCCAAGCTTATGCGCTTTGTCAAC 3' para amplificação da região interna de Ohr (aproximadamente 350pb).

O produto de PCR foi purificado e utilizado em reação de ligação com o vetor pGEM®-T Easy (segundo protocolo do fabricante). Em seguida o produto de ligação foi eletroporado em células de *E. coli* Dh5 α . A partir destas foram selecionadas algumas colônias que apresentavam o vetor, e em seguida foi realizada a extração dos plasmídeos.

O produto da extração plasmidial, assim como o vetor pUCBM21*oriC*, foram digeridos com enzimas de restrição (*Xba*I e *Hind* III). Foi realizada a purificação do DNA e o produto da purificação foi utilizado em reação de ligação utilizando-se a enzima T4 DNA ligase.

Este vetor foi introduzido em *X. fastidiosa* por eletroporação e os transformantes foram selecionados em placas PWG+Amp, sendo que oito foram selecionados e submetidos a diversas passagens. As culturas foram diluídas 1/10 a cada sete dias em 10 ml de meio líquido PWG+Amp, sendo que este procedimento foi considerado uma passagem.

Ao longo das passagens, amostras de células foram utilizadas para detecção de integração dos plasmídeos no gene *ohr*, por PCR de colônia. Nesta reação foi utilizado o par de oligonucleotídeos: *ohr*-Forward (correspondente ao início do gene *ohr*) e M13-Reverse os quais geram uma banda de aproximadamente 400pb.

Este par de oligonucleotídeos amplifica a banda esperada somente no caso de integração do vetor no gene alvo, pois os oligonucleotídeos hibridizam um na região do genoma e outro na região do vetor (figura 21).

Figura 21. Mutagênese por recombinação homóloga. Representação dos eventos ocorridos durante a integração do vetor contendo a parte interna do gene alvo no genoma, e da reação de PCR para a verificação da integração. Setas pretas representam genes vizinhos ao gene *ohr*. A seta branca corresponde ao gene responsável pela resistência a antibiótico (marca de seleção). A seta preta e vermelha representa o gene a ser interrompido (*ohr*).

3.28. Transformação de células competentes de *X. fastidiosa*

Células cultivadas em meio PWG durante sete dias são lavadas duas vezes com água milliQ estéril gelada e uma vez com glicerol 10% gelado. Após as lavagens, alíquotas concentradas de células ressuspensas em glicerol são misturadas a 5-10µl dos plasmídeos de interesse em cubetas de eletroporação.

As células são eletroporadas nas seguintes condições: 1,8kV, 200Ω e 25µF e imediatamente incubadas em 1 ml de meio PWG por 16 horas para recuperação das bactérias. Após esse tempo, 200µl das células são plaqueadas com alça de vidro em placas PWG com antibióticos adequados e cultivadas em temperatura ambiente por até dois meses sem serem descartadas.

3.29. Separação e detecção de proteínas da fração extracelular de *X. fastidiosa*

Para isolar proteínas secretadas assim como proteínas que interagem fracamente com a membrana celular, utilizamos protocolo modificado de Smolka *et al.*, 2003. Neste, 50 ml de cultura de *X. fastidiosa* são centrifugados e o *pellet* lavado duas vezes com tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 3 mM KCl; 50 mM NaCl, 5 mM EDTA e 1 mM PMSF. O sobrenadante de cada etapa de lavagem é precipitado com mistura gelada de etanol:acetona:ácido acético (50:50:0.1 v/v/v) a 4°C por 30 minutos e posteriormente solubilizado em 50 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.5% SDS, 5 mM EDTA e 1 mM PMSF. Após as etapas de lavagem, as células foram então lisadas com 200 µl de solução de lise 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), SDS 0.5% (p/v), 5 mM EDTA e 1 mM PMSF. Após a adição de 100 mM DTT, as proteínas (da fração celular e do sobrenadante) foram fervidas por 3 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 14% em condições redutoras. Após etapa de eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose por *Western blot*.

3.30. Cristalização e refinamentos.

Foram realizados os ensaios iniciais de crescimento de cristais de Ohr WT e Ohr C125S utilizando o mesmo tampão (cacodilato de sódio; concentração final 0,1M) e o mesmo precipitante (citrato de sódio), utilizados na obtenção do cristal de OhrB de *Bacillus subtilis* (Cooper *et al.*, 2007). A escolha desta condição se deve ao fato da mesma não possuir PEG em sua composição, molécula esta, que poderia prejudicar a

co-cristalização de Ohr com os compostos testados. Na tentativa de obtenção da melhor condição de cristalização foram utilizadas diversas combinações, de variações de pH (5,0-7,4) e de concentração final de citrato de sódio (0,2-1,2M).

As concentrações de proteína utilizadas nos ensaios de cristalização foram 8, 10 e 12 mg/mL em tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,4 para ambas. Foram realizados ensaios de cristalização com a Ohr WT pré-tratada com diamida (17:1 em excesso) por uma hora, submetidas a uma filtração em gel e concentradas para 8, 10 ou 12 mg/ml. Já para a Ohr C125S não foram realizados pré-tratamentos. Instantes antes da montagem das placas foram adicionados compostos (2:1 em excesso) na tentativa de co-cristalização. Ohr C125S: dihidrolipoamida, ácido oléico, hidroperóxido de ácido oléico e hidroperóxido de ácido linoléico. Ohr WT: dihidrolipoamida.

Exceto durante os tratamentos, as proteínas foram mantidas em banho de gelo até o término dos experimentos de cristalização. A temperatura de cristalização foi de 20°C.

Os ensaios foram realizados com o método da gota pendurada (*hanging drop*) e gota sentada (*sitting drop*). O volume final das gotas foi 8µl (4µl da solução de proteína e 4µl da solução de cristalização) e o volume utilizado da solução de cristalização no poço foi de 300µl.

Quando encontrados cristais em uma determinada condição de cristalização foram feitos refinamentos desta condição, variando o pH e a concentração de proteína e precipitantes, com o intuito de obter cristais maiores e de melhor qualidade. Além disso, ainda com o intuito de obter cristais melhores de ambas as proteínas, foram usados os kits de aditivos Additive Screen 1, 2 e 3 da Hampton Research. Neste caso, a gota com um volume total de 10 µl era composta por 4,5 µl da solução protéica, 4,5 µl da solução de cristalização (a mesma na qual haviam crescido os melhores cristais obtidos até o momento) e 1,0 µl da solução de aditivo do kit.

O aparecimento e crescimento dos cristais foram acompanhados quinzenalmente, com o auxílio de uma lupa. Tanto a preparação das placas, assim como o armazenamento e o acompanhamento das mesmas foram realizados no laboratório de cristalografia do Departamento de Bioquímica, IQ-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah (IQ – USP).

3.31. Cristalografia de raios-X e análise dos dados estruturais.

Com a obtenção de cristais apropriados foram realizados os experimentos de difração de raios-X, utilizando a radiação gerada pela Luz Síncrotron. Todos os procedimentos de coleta resultantes de difrações de raios-X foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), na Linha de Cristalografia de Macromoléculas 1 – DO3B-MX1, com auxílio da Dra. Karen Fulan Discola, pós-doutora em nosso laboratório.

Os cristais foram mergulhados em uma solução crio-protetora, antes dos experimentos de difração com raios-X. As soluções crio-protetoras foram feitas com base na composição da solução de cristalização e com acréscimo de 20% de glicerol.

As coletas foram realizadas em temperatura criogênica (110 K) através de fluxo de nitrogênio líquido sobre a amostra. O comprimento de onda utilizado foi 1.427 Å, e os dados de difração de raios-X foram coletados em detector MARCCD com 50 segundos de exposição.

3.32. Processamento de dados.

Os dados foram processados utilizando os programas MOSFLM (Leslie, 1992) e SCALA (Kabuch, 1988; Blessing, 1995), do pacote CCP4 (Collaborative Computacional Project, 1994). O número de moléculas por unidade assimétrica foi determinado através do cálculo do coeficiente de Matthews (Matthews, 1968). A estrutura cristalográfica de Ohr no estado oxidado foi resolvida por substituição molecular, com o auxílio do programa *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007), utilizando as coordenadas atômicas de Ohr superoxidada de *Xylella fastidiosa* (PDB ID: 1ZB9; Oliveira *et al.*, 2006).

Para os refinamentos das estruturas foi utilizado o programa *Refmac 5* (Pannu, 1998). O programa *Coot* v.0.5.2 (Emsley & Cowtan, 2004) foi utilizado para visualização, substituição de aminoácidos e ajustes da molécula no interior do mapa de densidade eletrônica. A análise estereoquímica dos modelos refinados foi realizada utilizando o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). As representações gráficas foram criadas com o programa *PyMOL* v.0.99rc6 (DeLano Scientific LLC, San Carlos, Califórnia, EUA; WWW.pymol.org). Os alinhamentos das estruturas foram feitos utilizando a função “SSM Superpose” do programa Coot.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Caracterização enzimática de Ohr.

4.1.1. Expressão e purificação de enzimas recombinantes de *Xylella fastidiosa*.

Os ensaios enzimáticos, assim como, os experimentos de cristalização foram realizados utilizando-se proteínas recombinantes de *X. fastidiosa*, as quais foram expressas em sistema heterólogo e purificadas como descrito em “Materiais e métodos”. O grau de pureza das enzimas recombinantes, após a purificação por afinidade a metal foi analisado por SDS PAGE (figura 22).

Figura 22. Purificações das proteínas recombinantes. SDS-PAGEs resultantes das purificações por afinidade a metal. **A.** alíquotas de Ohr e Lpd; **B.** alíquotas de LpdA; **C.** alíquotas de SucB. Raia 1: padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder - Invitrogen).

4.1.2. Efeito de detergentes na atividade de Ohr sobre hidroperóxidos orgânicos.

A enzima Ohr é capaz de reduzir hidroperóxidos orgânicos, entre eles, aqueles derivados de ácidos graxos (Oliveira *et al.*, 2006; Ta *et al.*, 2011), os quais apresentam baixa solubilidade em meio aquoso. Portanto, para a solubilização destes hidroperóxidos durante a realização de ensaios enzimáticos é necessário a utilização de solventes orgânicos ou detergentes. Por outro lado, solventes orgânicos e

detergentes afetam a estrutura de proteínas por interferir em ligações não covalentes como ligações salinas ou interações hidrofóbicas.

Neste contexto, testamos a presença de diferentes detergentes e solventes orgânicos no ensaio de atividade peroxidásica NADH dependente de Ohr. Estes ensaios preliminares visavam achar o melhor candidato, sendo este, um composto que conseguisse solubilizar os hidroperóxidos em meio aquoso, porém não afetasse demasiadamente a atividade do sistema enzimático.

Realizamos ensaios da atividade peroxidásica na presença de diferentes concentrações dos compostos selecionados, utilizando-se *t*-BHP como substrato oxidante, já que este apesar de possuir uma cadeia hidrofóbica, apresenta alta solubilidade em meio aquoso (tabela 3).

Tabela 3. Atividade de Ohr na presença de diferentes solventes/detergentes (%). Ensaio de atividade peroxidásica de dependente de NADH de Ohr frente a *t*-BHP, na presença de diferentes concentrações de diversos solventes/detergentes. A atividade foi analisada pela velocidade de consumo de NADH, sendo esta representada em porcentagem comparativamente a velocidade na ausência de solvente/detergente (100%). Condições dos ensaios: Ohr 0,05µM; LpD 0,5µM; lipoamida 50µM; *t*-BHP 100µM; NADH 200µM. O valor representado é a média aritmética de experimentos realizados em duplicata.

solvente/detergente	Triton	DMSO	TWEEN 20	TWEEN 40	Etanol	Metanol	Acetonitrila	SDS
0%	100	100	100	100	100	100	100	100
0,1%	76	94	95	88	98	96	94	0
0,25%	66	89	89	89	95	91	89	0
0,5%	67	87	84	83	89	90	86	0
1%	59	88	77	75	80	83	76	0
5%	31	61	46	44	10	26	16	0

Notamos que dentre a maioria dos compostos analisados não existe grande diferença na perda de atividade de Ohr, com exceção dos detergentes Triton X-100 e SDS, o qual elimina qualquer atividade enzimática mesmo em pequenas concentrações.

Em seguida, realizamos ensaios da atividade peroxidásica de Ohr comparando a perda de atividade na redução de *t*-BHP (provavelmente devido à perda parcial de estrutura protéica) e aumento de atividade na redução de LAOOH (devido ao aumento da solubilidade desse composto). Observamos que à medida que aumentamos a

concentração de detergente ou solvente no ensaio, ocorre uma queda de atividade de Ohr frente a *t*-BHP, porém ao mesmo tempo ocorre um aumento da atividade de Ohr frente à LAOOH. Isto ocorre provavelmente devido ao aumento da solubilidade de LAOOH, e como consequência maior acessibilidade do hidroperóxido de lipídeo para a ação enzimática (figura 21).

Nesta nova estratégia foi possível observar que dentre os compostos testados o detergente Tween 20 apresentou a melhor relação perda de atividade frente a *t*-BHP/aumento de atividade frente à OLOOH (figura 23).

Figura 23. Atividade de Ohr na presença de Tween 20. Comparação da velocidade (Vel.) de atividade frente a dois hidroperóxidos na presença de quantidades crescentes de detergente (Tween 20). Condições dos ensaios: Ohr 0,05 μ M; LpD 0,5 μ M; lipoamida 50 μ M; hidroperóxidos (*t*-BHP e LAOOH) 100 μ M. Os ensaios foram realizados em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada.

Decidimos então, utilizar uma concentração final de 0,2% de Tween 20 nos ensaios de atividade de Ohr sobre os hidroperóxidos derivados de ácido graxo, pois, este detergente, nesta concentração solubiliza o hidroperóxido sem causar grande perda da atividade do sistema enzimático.

Realizamos um ensaio comparativo utilizando diferentes substratos oxidantes em baixas concentrações, na tentativa de não haver grande interferência da solubilidade. O resultado observado sugere que Ohr apresenta eficiência similar na redução de hidroperóxidos de ácidos graxos (OLOOH e LAOOH) e *t*-BHP, nas condições trabalhadas (figura 24). Os hidroperóxidos e lipídeo (LAOOH e OLOOH) estão solubilizados em metanol. Portanto, calculamos a quantidade de metanol adicionado quando trabalhamos com hidroperóxidos de lipídeo, e em seguida, adicionamos esta quantidade no ensaio com *t*-BHP.

Figura 24. Atividade redutora de Ohr. Comparação de atividade de Ohr frente a diferentes hidroperóxidos utilizando sistema redutor com lipoamida livre. Condições do ensaio: Ohr 0,05µM; LpD 0,5µM; lipoamida 50µM; substratos 30µM. *Adição de Tween 20 0,2% e metanol 1 %. Ensaios foram realizados em duplicata e as barras de erro correspondem a variação encontrada.

Ohr de *Xylella fastidiosa* tem sua atividade peroxidásica sustentada por dihidrolipoamida livre, assim como por enzimas lipoiladas (Cussiol *et al.*, 2010), ou seja, enzimas que possuem moléculas de ácido lipóico ligadas covalentemente a sua estrutura. Portanto, na etapa seguinte testamos os diferentes sistemas redutores de Ohr (dihidrolipoamida livre, SucB ou LpdA), na presença de Tween 20 (figura 25). Os ensaios que não utilizaram dihidrolipoamida livre foram realizados na presença e na ausência de etanol (0,5% v/v), pois a dihidrolipoamida adicionada ao ensaio encontra-se dissolvida neste solvente, devido a sua hidrofobicidade.

Figura 25. Comparação de sistemas redutores. Comparação dos diferentes sistemas redutores de Ohr na redução de OLOOH (C.f. 50µM). Condições dos ensaios: Ohr 0,1µM; Lpd 5µM; lipoamida 5µM; SucB 5µM; LpdA 5µM e Tween 20 0,2%. Cada ponto foi feito em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada.

Nas condições utilizadas, Ohr apresentou maior atividade com dihidrolipoamida livre. É importante ressaltar que a utilização de LpdA não é facilmente comparável aos outros sistemas, pois esta enzima carrega seu próprio substrato (ácido lipóico) ligado covalentemente a sua estrutura (Håkansson & Smith, 2007), diferentemente de outras Lpds. Além disso, nesse sistema, mesmo na ausência de hidroperóxido (o qual é adicionado para o início da reação), já ocorre um consumo de NADH maior que nos outros sistemas. Este consumo é proporcional a quantidade de LpdA adicionada. Portanto, existe uma restrição no tempo de incubação do ensaio além da concentração da própria enzima a ser utilizada.

Para as análises posteriores decidimos por utilizar o sistema redutor com dihidrolipoamida livre, devido à possibilidade de trabalharmos com altas concentrações do redutor, e também por evitar a utilização de outra enzima no ensaio. Como estudos com hidroperóxidos derivados de lipídeo envolvem uso de detergente, o efeito deste na estabilidade e atividade enzimática teria que ser avaliado para outra enzima.

Iniciamos uma caracterização cinética de Ohr frente os hidroperóxidos de cadeia longa, sendo que primeiramente utilizamos como substrato LAOOH. Para isto, repetimos o ensaio de atividade peroxidásica NADH dependente na presença de Tween 20 (0,2%) para diferentes concentrações finais de LAOOH (figura 26-A).

Figura 26. Curva da velocidade pela concentração de substrato. Condições dos ensaios: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; lipoamida 50μM e Tween 20 0,2%. **A.** Todas as concentrações testadas. **B.** Apenas as concentrações na ascensão da atividade. Cada ponto foi feito em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada. Parâmetros cinéticos calculados utilizando o programa GraphPad Prism.

Podemos observar que em baixas concentrações de substrato, à medida que aumentamos a concentração de hidroperóxido no meio, ocorre o aumento da

velocidade da reação. Porém, a partir de determinadas concentrações de hidroperóxido (aproximadamente 20 μ M de LAOOH) ocorre o inverso. A partir desse ponto, à medida que aumentamos a concentração de hidroperóxido, a velocidade de reação diminui, indicando uma inibição da atividade de Ohr por substrato (figura 26-A). Apesar disso, pudemos obter os parâmetros enzimáticos utilizando somente os pontos com concentrações de hidroperóxido inferiores a 20 μ M (figura 26-B).

Foram propostas duas hipóteses para explicar a diminuição da velocidade: a formação de micelas pela união de várias moléculas de LAOOH em meio aquoso; e/ou a superoxidação da cisteína peroxidásica (Cys61) a ácido sulfínico (Cys-SO₂H⁻) ou a ácido sulfônico (Cys-SO₃H⁻) e consequente inativação de Ohr. Este último processo já foi observado após a pré-incubação da enzima com altas concentrações de *t*-BHP (Oliveira *et al.*, 2006). É importante ressaltar que as duas hipóteses não são mutuamente exclusivas.

Para testar essas hipóteses realizamos ensaios de atividade peroxidásica aumentando a concentração de Tween 20 (com o objetivo de impedir a formação de micelas) e/ou a concentração de dihidrolipoamida (com o intuito de aumentar a chance de superoxidação) (figura 27). Caso a diminuição da velocidade mostrada na figura 26-A fosse decorrente da formação de micelas entre as moléculas de LAOOH, a adição de Tween 20 acarretaria no aumento da velocidade quando comparado ao controle.

Porém, caso a diminuição da velocidade no ensaio fosse consequência da superoxidação da Cys61 de Ohr, o aumento da concentração de dihidrolipoamida levaria a uma queda da velocidade de reação devido à maior chance de ciclagem do dissulfeto de Ohr, levando a uma diminuição da concentração do dissulfeto de Ohr no estado estacionário (figura 27). Dessa forma, a concentração no estado estacionário de Ohr na forma reduzida seria aumentada, favorecendo o aumento da concentração de ácido sulfênico (Cys₆₁ – SOH) o que aumentaria a probabilidade deste ser convertido a ácido sulfínico (Cys₆₁ – SO₂H⁻), o qual não pode ser reduzido por dihidrolipoamida (figura 27).

Figura 27. Ciclo catalítico de Ohr e a possibilidade de superoxidação. Ciclo catalítico de Ohr com destaque para as cisteínas e a possibilidade de superoxidação devido à reação com duas (formação de ácido sulfinico) ou três (formação de ácido sulfônico) moléculas de hidroperóxido (ROOH). Setas em preto representam a cadeia polipeptídica de Ohr com destaque para as cisteínas (Cys61 – cisteína peroxidásica, Cys125 – cisteína de resolução).

Observamos que o aumento da concentração de dihidrolipoamida livre levou a uma aceleração da atividade peroxidásica (Figura 28). Nossa premissa de que o aumento da concentração de dihidrolipoamida acarretaria no aumento da chance de superoxidação, se baseia no fato de que peroxirredoxinas são suscetíveis a superoxidação apenas na presença de tiorredoxina, ou seja, peróxido e sistema redutor (Rhee *et al.*, 2005). Porém, observamos a aceleração da atividade peroxidásica decorrente do aumento da concentração de dihidrolipoamida (figura 28). Talvez, a aceleração da redução do dissulfeto da Ohr por dihidrolipoamida esteja limitando a reação global determinada pelo consumo de NADH. De qualquer forma, a presença do redutor ainda deve permitir a superoxidação de Ohr (devido ao aumento da ciclagem de Ohr) em níveis difíceis de serem mensurados.

Na análise do aumento da concentração de Tween-20, observamos que a formação de micelas é um fator importante. Quando aumentamos a concentração de Tween, observamos o aumento da velocidade (figura 28). Portanto, provavelmente, o efeito de micelas deve ser preponderante sobre a superoxidação na queda de velocidade observada nos resultados descritos na figura 26-A. Quando adicionamos concentrações de hidroperóxido acima de 20μM (figura 26) no meio de reação, provavelmente esta concentração é suficiente para parte do substrato forme micelas. Porém, não podemos descartar que, ao mesmo tempo, a superoxidação da Cys61 de

Ohr esteja ocorrendo, resultando na inativação da enzima. De fato, abaixo mostraremos que Ohr é inativada através de superoxidação por hidroperóxidos.

Figura 28. Atividade comparativa de Ohr em diferentes condições. Condições do ensaio: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; LAOOH 100μM. Os ensaios foram realizados em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada. Tw – Tween 20.

Observamos um ganho considerável de atividade entre a primeira (Tween 20 0,2% e lipoamida 50μM) e a última condição de ensaio (Tween 20 0,8% e lipoamida 100μM) (figura 28), portanto decidimos repetir a obtenção da curva de velocidade por concentração de substrato (LAOOH). Porém, desta vez, utilizando lipoamida e Tween 20 nas novas condições estabelecidas (figura 29).

Figura 29. Curva da velocidade pela concentração de substrato. Condições do ensaio: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; lipoamida 100μM; Tween 20 0,8%. **A** – Todas as concentrações testadas. **B** – Apenas as concentrações na ascensão da atividade. Cada ponto foi feito em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada. Parâmetros cinéticos calculados utilizando o programa GraphPad Prism.

Neste caso, observamos apenas uma leve queda na velocidade de Ohr observada na curva anterior (figura 26-A). Além disso, nos pontos que representam as menores concentrações de LAOOH no ensaio, observamos uma queda na velocidade inicial de consumo de hidroperóxido pela enzima Ohr. As novas condições estabelecidas (lipoamida 100 μ M; Tween 20 0,8%) beneficiam a atividade de Ohr em altas concentrações de hidroperóxidos, provavelmente por evitar a formação de micelas pelas moléculas de substrato. Em contrapartida, em baixas concentrações de hidroperóxido, é possível observar que a presença de detergente (Tween 20) afeta a atividade do sistema.

Como a formação de micelas parecia ser um fator importante para a queda de velocidade a altas concentrações de substrato (figura 26-A), decidimos utilizar o detergente Triton X-100 para análise cinética de Ohr frente aos hidroperóxidos de lipídeo. Apesar de nossos testes iniciais mostrarem que Triton é mais danoso ao sistema que Tween (tabela 3), existem diversas descrições de sua utilização em ensaios enzimáticos (Kuo *et al.*, 2006; Santangelo *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2008; Crichton *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2005). Dessa forma, utilizamos duas diferentes concentrações do detergente a fim de comparar as curvas resultantes, assim como os parâmetros cinéticos (figura 30).

Figura 30. Curva da velocidade pela concentração de substrato. Condições do ensaio: Ohr 0,05µM; LpD 0,5µM; lipoamida 100µM; Triton 0,1% (A e B)ou 0,2%(C). **A** – Todas as concentrações testadas (Triton 0,1%). **B** – Apenas as concentrações na ascensão da atividade (Triton 0,1%). **C** – Todas as concentrações testadas (Triton 0,2%) Cada ponto foi feito em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada. Parâmetros cinéticos calculados utilizando o programa GraphPad Prism.

O aumento da concentração de detergente (independente de qual seja) causa a diminuição da velocidade máxima e o aumento do K_M . A diminuição da velocidade máxima provavelmente ocorre devido a desestabilização da estrutura tanto de Ohr quanto de Lpd (a outra enzima presente nos ensaios), já o aumento do K_M pode ser explicado pela mudança do ambiente da reação. Quando a concentração de detergente é menor, provavelmente os hidroperóxidos interagem mais fortemente com o sítio ativo de Ohr, pois o ambiente se apresenta “menos hidrofóbico”. Na presença de maior concentração de detergente, existe uma maior chance dos hidroperóxidos interagirem com as moléculas de detergente e, portanto, menor interação com o sítio ativo de Ohr. Como consequência, observamos o aumento do valor de K_M . Nessa análise, percebemos diferenças nos parâmetros dependendo do detergente utilizado. Estas diferenças podem ser melhor observadas na tabela abaixo (tabela 4).

Tabela 4 – Efeito de detergentes nos valores de parâmetros enzimáticos Ohr.

	Tween 0,2%	Tween 0,8%	Triton 0,1%	Triton 0,2%
$V_{máx_{ap}} (\mu M.s^{-1})$	1,79	1,10	2,96	2,47
$K_{M_{ap}} (\mu M)$	7,32	10,89	39,94	43,61
$k_{cat} (s^{-1})$	35,8	22,0	59,2	49,4
$k_{cat}/K_M (s^{-1}.M^{-1})$	$4,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$

Ensaio utilizando Tween foram realizados frente a LAOOH, e ensaios utilizando Triton foram realizados frente a OLOOH. Parâmetros cinéticos calculados utilizando o programa GraphPad Prism.

Apesar da modificação dos parâmetros devido ao aumento da concentração de detergente, observamos que a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) da enzima se apresenta na mesma ordem de grandeza, independente do detergente e da concentração utilizados. Neste ponto, fica evidente a dificuldade de obtenção dos parâmetros cinéticos da enzima quando trabalhamos com substratos insolúveis em água. Além dos diferentes resultados obtidos, dependentes do detergente e da concentração utilizados, é importante ressaltar que estamos trabalhando em um sistema multi-enzimático em nosso ensaio. Sendo assim, as interferências dos detergentes podem ocorrer não apenas em Ohr, como também em Lpd, fato que dificulta a interpretação dos resultados. Apesar disso, os parâmetros obtidos nestes experimentos são similares aos valores obtidos na redução de *t*-BHP, no qual também foi encontrada eficiência catalítica de sexta ordem ($10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Cussiol *et al.*, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que Ohr de *Mycobacterium smegmatis* é capaz de reduzir hidroperóxidos orgânicos (*t*-BHP, CHP e LAOOH) com eficiência catalítica menor ($10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Ta *et al.*, 2011). Neste caso, provavelmente a queda de atividade observada em maiores concentrações de hidroperóxido (fato que nesse trabalho foi observado com LAOOH, assim como com CHP e *t*-BHP) interferiu na análise, devido ao cálculo subestimado da velocidade máxima. Ainda, é confirmada a maior eficiência de Ohr na redução de hidroperóxidos orgânicos quando comparada a H_2O_2 , assim como foi demonstrado por nosso grupo (Cussiol *et al.*, 2010). Nos nossos estudos, não observamos queda na velocidade enzimática em altas concentrações de CHP e *t*-BHP, o que não provocaria uma sub-estimativa da velocidade máxima (Cussiol *et al.*, 2010).

Os dados aqui apresentados são derivados de ensaios realizados na presença de detergentes (Tween-20 e Triton X-100), os quais provavelmente afetam negativamente a atividade enzimática, porém sem os quais não seria possível determinar os parâmetros apresentados. Já os ensaios de Ohr de *M. smegmatis* (Ta *et al.*, 2011), são realizados na ausência de detergentes, portanto os resultados referentes a atividade frente a hidroperóxidos de lipídeo devem ser comparados com ressalvas. A ausência de detergentes ou solventes na reação provavelmente acarretam em valores subestimados da atividade de Ohr de *M. smegmatis*. Nesse trabalho, não é mencionado o volume de LAOOH que é adicionado ao ensaio. Por sua alta hidrofobicidade, LAOOH geralmente é mantido em solução estoque de solvente (em

nosso caso, metanol absoluto), portanto o volume adicionado na reação é um dado importante para entender a solubilidade do hidroperóxido na reação.

É importante salientar que nos ensaios de atividade de Ohr de *M. smegmatis*, assim como em nossos dados, ocorreu queda na atividade enzimática em decorrência do aumento das concentrações de hidroperóxido de lipídeo. Esta queda, diretamente proporcional a concentração de hidroperóxido adicionada, foi justificada pelo autor apenas como inativação da enzima Ohr (Ta *et al.*, 2011), não havendo menção a formação de micelas do substrato. Porém, neste trabalho, observamos e analisamos os dois tipos de interferência e utilizamos a inativação como análise comparativa da “preferência” de Ohr (ver item 4.1.4).

4.1.3. Atividade de Ohr sobre hidroperóxidos de fosfolipídios e de colesterol.

Demonstramos que Ohr é capaz de reduzir hidroperóxidos de ácidos graxos (LAOOH e OLOOH), porém, estes se apresentam em sua maioria como constituintes da membrana plasmática, principalmente na forma de fosfolipídios, ligados covalentemente a um grupo polar e não como ácidos graxos livres.

Além destes, outro lipídeo importante na constituição da membrana celular é o colesterol. No entanto, este não se apresenta como constituinte comum de membranas bacterianas, tendo sido caracterizado apenas em algumas espécies, como por exemplo, *Mycoplasma hominis*. Nesta espécie, a proporção de colesterol na membrana pode chegar a 40% (Rottem & Razin, 1973).

Até o momento os hidroperóxidos de ácidos graxos são o mais próximo do que se chegou dos possíveis substratos *in vivo* de Ohr. Portanto, se mostrou importante o teste da atividade de Ohr frente ao hidroperóxidos derivados dos constituintes da membrana celular, como fosfolipídeos e colesterol. Levantamos a hipótese de que Ohr poderia reduzir hidroperóxido de fosfatidilcolina de ovo, pois este apresenta em sua composição, OLOOH e LAOOH.

Realizamos ensaios de Ohr na presença de hidroperóxido de colesterol e hidroperóxido de fosfatidilcolina de ovo (ambos sintetizados em colaboração com os professores Dra. Sayuri Miyamoto e Dr. Paolo Di Mascio do IQ-USP). Foram utilizadas as mesmas condições do ensaio já padronizado de Ohr, porém com Ohr em uma concentração dez vezes maior (0,5µM). Observamos que Ohr não é capaz de reduzir

esses hidroperóxidos, enquanto consegue reduzir LAOOH e *t*-BHP (figura 31-A), como já demonstrado anteriormente.

Figura 31. Ensaio de atividade de Ohr com FosfolipOOH e ChOOH. Ensaio de atividade de Ohr medido pela queda da absorbância a 340nm (consumo de NADH). Condições do ensaio: Ohr 0,5µM, Lpd 0,5 µM, lipoamida 50 µM e hidroperóxido 100µM. **A.** Diferentes substratos. **B.** Ensaio realizado na ausência e na presença de fosfolipase A₂ (incubação de 15 e 30 minutos).

A molécula de fosfatidilcolina é composta de um grupo colina, ligado a um ácido glicerofosfórico, que por sua vez está ligado a dois ácidos graxos. Um destes ácidos graxos saturado e o outro insaturado. Em nosso caso, o grupo insaturado, na verdade é o hidroperóxido de ácido graxo. Portanto, testamos também a atividade de Ohr frente ao hidroperóxido de ácido graxo recém liberado da molécula de fosfatidilcolina pela ação da fosfolipase (figura 31-B).

Realizamos os ensaios de atividade de Ohr na presença de fosfatidilcolina após o tratamento com Fosfolipase A₂ (figura 31-B), como descrito em Menashe *et al.* (1986). A fosfolipase A₂ age liberando o ácido graxo insaturado (neste caso, o hidroperóxido de ácido graxo).

Ohr foi capaz de reduzir os hidroperóxidos de ácido graxo liberados da fosfatidilcolina após o tratamento com fosfolipase A₂, porém não é capaz de reduzir os hidroperóxidos presentes na molécula íntegra (figura 31-B), sugerindo que Ohr não é capaz de atacar a bicamada lipídica. Portanto, os dados existentes até o momento indicam que Ohr atuaria na detoxificação de hidroperóxidos derivados de ácidos graxos livres, ou então derivados da membrana e posteriormente liberados após a ação de uma fosfolipase.

Não podemos descartar com esses dados que Ohr pode ser capaz de reduzir hidroperóxidos de lipídeos presentes em bicamadas. Neste caso, os hidroperóxidos de

fosfatidilcolina e colesterol em solução (na presença de detergentes) poderiam dificultar a ação da enzima. Para esta análise seria interessante a utilização de hidroperóxidos presentes em lipossomos, um modelo mais próximo da membrana celular. Porém, a presença de lipossomos causa a turbidez do meio, o que dificulta nossas análises por absorbância. Teríamos que elaborar um protocolo experimental que envolveria extrações e análises de produtos das reações.

4.1.4. Inativação de Ohr.

A inativação de Ohr por hidroperóxidos mostrou-se uma estratégia interessante para análise da afinidade de Ohr por diferentes hidroperóxidos. Isso porque para Ohr ser inativada por superoxidação, sua cisteína peroxidásica deve reagir com dois hidroperóxidos (figura 27). Dessa forma, quanto menor a concentração de hidroperóxido necessária para induzir inativação de Ohr, maior deve ser a afinidade dessa peroxidase frente ao substrato em questão.

Nesse sentido, elaboramos um experimento que consistiu em inicialmente determinar a atividade peroxidásica de Ohr, utilizando LAOOH como substrato, e na sequência, após a estabilização do consumo de NADH (formação de um platô), adicionamos de *t*-BHP (Figura 32). A formação deste platô poderia ser decorrente de dois fatores: (1) a inativação do sistema, provavelmente pela superoxidação da Cys61 de Ohr, ou (2) o consumo total do substrato (LAOOH) pela enzima. Dessa forma, após a adição de *t*-BHP, dois resultados diferentes podem ocorrer: novo consumo de NADH, sendo este o resultado no caso do consumo total do LAOOH. Ou ainda, não ocorrer o consumo de NADH, caracterizando a inativação do sistema.

Na figura 32, é possível observar que à medida que aumentamos a concentração de LAOOH, o platô forma-se mais precocemente e a adição de *t*-BHP acarreta em consumo cada vez menor de NADH (figura 32 A, B e C), sugerindo a inativação do sistema através de superoxidação de Cys61 por LAOOH. Além disso, quando aumentamos a concentração de Tween 20 no meio de 0.2% para 0.8%, parece ocorrer um atraso na formação e do platô inicial e na formação de um segundo, após a adição de *t*-BHP.

Figura 32: Análise da inativação de Ohr por superoxidação da Cys61. Análise do consumo de NADH (queda na absorbância) Eixo y: absorbância à 340nm; Eixo x: tempo de reação. À esquerda (painéis A, B e C) na presença de Tween 20 a 0,2%, à direita na presença de Tween 20 a 0,8% (painéis D, E, F e G). As setas mostram o momento da adição dos hidroperóxidos. Em todos os experimentos ocorreu a adição de ambos os hidroperóxidos (primeiramente LAOOH e depois *t*-BHP), porém as flechas não estão representadas para evitar a poluição da figura. As interferências na linha de base indicam o momento que ocorreu a adição dos peróxidos. Condições dos ensaios: Ohr 0,05µM; LpD 0,5µM; lipoamida 50µM; NADH 200µM; Tween 20 0,2% ou 0,8%. Adição de 200µM *t*-BHP em todas as situações.

Observa-se que com o aumento da concentração de LAOOH, ocorre a diminuição da inclinação das retas que representam o consumo de NADH, tanto antes como após a adição de *t*-BHP. A diminuição da inclinação antes da adição de *t*-BHP demonstra que a inativação do sistema se dá rapidamente após a adição de LAOOH. Já a diminuição da inclinação da reta referente ao consumo de NADH após a adição de *t*-BHP, confirma a

hipótese da inativação do sistema, descartando a idéia de ausência de queda na absorbância por consumo total de substrato.

É possível perceber que ao utilizarmos Tween 0,8%, a inclinação após a adição de LAOOH aumenta de 20 μ M para 50 μ M, e decresce em 100 μ M. Este fato repete as situações antes analisadas (figuras 26, 29 e 30), nas quais o aumento da concentração de LAOOH acarreta em aumento da velocidade (inclinação) até concentrações próximas a 50 μ M. Deste ponto em diante, o aumento da concentração de LAOOH utilizada tem como consequência a diminuição de atividade.

A inativação do sistema como um todo foi observada. Porém, não havíamos demonstrado que a inativação do sistema se dava pela superoxidação da cisteína peroxidásica de Ohr. Para análise desta hipótese, a enzima foi previamente incubada com LAOOH ou *t*-BHP, na presença ou ausência de Tween 20 (1h, 37°C). Em seguida foi realizada uma filtração em gel, para remoção do excesso de hidroperóxido, e posteriormente a sua atividade foi analisada frente a *t*-BHP (Figura 33).

Figura 33. Análise da inativação de Ohr após incubação com hidroperóxidos. A enzima foi incubada durante uma hora na proporção enzima: hidroperóxido de 1:10. Descrições no eixo x representam tratamento prévio, após o qual excesso de reagentes foi removido por filtração em gel (PD-10 *desalting*). Cada tratamento foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão. Condições dos ensaios pós-tratamento: Ohr 0,05 μ M; LpD 0,5 μ M; lipoamida 50 μ M; *t*-BHP 200 μ M.

Após incubarmos a enzima na presença dos hidroperóxidos, esta perde parcialmente sua atividade. Este fato reforça a hipótese que a inativação da enzima ocorre devido à superoxidação da Cys61, formação de ácido sulfínico ($-\text{SO}_2\text{H}^+$) ou sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}^+$). A formação de ácido sulfônico em Cys61 já foi observada pelo nosso grupo na resolução da estrutura de Ohr, na qual foi realizado um tratamento na

presença de excesso de *t*-BHP. Nesse mesmo trabalho foi realizada análise da amostra por espectrometria de massa, a qual confirmou a superoxidação da Cys61 (Oliveira *et al.*, 2006).

Interessantemente, a enzima Ohr é inativada pelo excesso de substrato oxidante mesmo na ausência do sistema redutor, o que não ocorre com as peroxirredoxinas (Rhee *et al.*, 2005). Para estas enzimas, existe a necessidade do sistema redutor presente no ensaio para que ocorra a inativação por superoxidação. O sistema redutor é responsável por diminuir a concentração de enzimas oxidadas (ponte dissulfeto) no estado estacionário. Após a formação da ponte dissulfeto não é possível ocorrer a superoxidação, portanto, esta ocorre quando a enzima no estado reduzida reage com duas (forma-se ácido sulfinico $\text{-SO}_2\text{H}^-$), ou três (forma-se ácido sulfônico- SO_2H^-) moléculas de hidroperóxido.

Outra análise desses resultados é que a incubação com LAOOH parece ser mais drástica para a inativação de Ohr do que a incubação com *t*-BHP. Este fato poderia ser explicado pela maior afinidade de hidroperóxidos derivados de ácido graxo (devido a sua cadeia longa e hidrofóbica) no sítio ativo de Ohr (Oliveira *et al.*, 2006).

Para análise da afinidade entre a enzima a diferentes tipos de hidroperóxidos, realizamos testes em diferentes proporções enzima:hidroperóxido (1:1, 1:2, 1:5 e 1:10). Inicialmente, incubávamos Ohr (previamente reduzida) com as diferentes concentrações de hidroperóxido, para posteriormente analisar sua atividade frente a *t*-BHP. Como controle, realizamos a incubação de Ohr apenas na presença do detergente.

Este ensaio tinha como intenção analisar uma possível “preferência” de Ohr por determinados tipos de hidroperóxidos. Para isto foram realizados tratamentos com cinco diferentes hidroperóxidos orgânicos de estruturas diversas (LAOOH, OLOOH, *t*-BHP, CHP e ChOOH). As incubações foram realizadas primeiramente na presença de Tween 20 0,2%. Após a incubação realizamos os ensaios de atividade peroxidásica NADH dependente e um SDS-PAGE (discutido abaixo) para a análise dos diferentes tratamentos (figura 34).

Figura 34. Inativação de Ohr após tratamento com hidroperóxidos orgânicos na presença de Tween-20. a) OLOOH; b) LAOOH; c) *t*-BHP; d) CHP; e) ChOOH. Painéis a esquerda: Atividade NADH dependente comparativa de Ohr após incubação com diferentes concentrações de hidroperóxido. Condições do ensaio: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; lipoamida 50μM; *t*-BHP 200μM. Cada ponto foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão. Painéis à direita: SDS-PAGE (não redutor) das diferentes incubações. Raia 1: padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder Invitrogen); raia 2: Ohr reduzida; raia 3: controle (incubação apenas na presença do detergente); raia 4: Ohr tratada com hidroperóxido na proporção 1:1; Raia 5: Ohr tratada com hidroperóxido na proporção 1:2; Raia 6: Ohr tratada com hidroperóxido na proporção 1:5; Raia 7: Ohr tratada com hidroperóxido na proporção 1:10. As letras representam as diferentes formas de Ohr: A-Dímero, B-Forma com ausência de ponte dissulfeto intramolecular, C-Presença de ponte dissulfeto intramolecular (Oliveira *et al.*, 2006). Em cada raia foram aplicados aproximadamente 2μg de proteína total.

Dentre os hidroperóxidos testados, os derivados de ácido graxo (OLOOH e LAOOH) são capazes de inativar Ohr em proporções menores. Possivelmente a maior capacidade de inativação de Ohr reflete uma maior afinidade destes hidroperóxidos com o sítio ativo da enzima. Portanto, seria possível a entrada de mais de uma molécula de hidroperóxido no sítio ativo da enzima, possibilitando a superoxidação da Cys61 (figura 27). Este resultado reforça a idéia que estes hidroperóxidos podem representar os substratos da enzima *in vivo*.

Outro fato que reforça a idéia da preferência de Ohr por hidroperóxidos hidrofóbicos de cadeia alongada, é a ausência de inativação por parte do hidroperóxido de colesterol, sobre o qual Ohr não havia apresentado atividade anteriormente (figura 31-A).

Análises de *Docking*, realizadas em colaboração com Napoleão F. Valadares e o Dr, Richard C. Garratt (IFSC-USP) demonstraram uma notável adequação dos hidroperóxidos derivados de ácido graxo ao sítio ativo de Ohr (figura 35 - dados não publicados). O grupo peróxido (-OO-H) das moléculas se ancorou na direção da cisteína peroxidásica (Cys61) em 100% dos casos, e quando os resultados dos hidroperóxidos são dispostos no mapa de densidade eletrônica, a posição de grande parte dos hidroperóxidos “ancorados” é no interior da densidade eletrônica ocupada pela

molécula de PEG. Estes dados reforçam a hipótese de que hidroperóxidos orgânicos derivados de ácidos graxos atuam como substratos fisiológicos de Ohr de *X. fastidiosa*. Nesta análise foram utilizados apenas hidroperóxidos derivados de ácidos graxos monoinsaturados, entre eles ácido oléico e palmitoleico, os quais parecem ser abundantes na membrana do *X. fastidiosa* (Osiro *et al.*, 2004)

Figura 35. Ancoramento (*docking*) de hidroperóxidos de ácidos graxos monoinsaturados no sítio ativo de Ohr de *X. fastidiosa* (PDB 1ZB9). Na figura estão sobrepostos isômeros (cis e trans) de diversos hidroperóxidos derivados de ácidos graxos monoinsaturados. A peroxidação se direciona para a cisteína peroxidásica (C_p 61) em 100% dos casos. A cisteína peroxidásica esta representada no modelo *Ball e stick*.

Na análise dos SDS-PAGEs, podemos observar a existência de três bandas distintas: A- dímero formado por ponte dissulfeto intermolecular; B- monômero com ausência de ponte dissulfeto intramolecular, o qual pode estar na forma reduzida ou superoxidada e; C- monômero apresentando ponte dissulfeto intramolecular, a qual representa a forma oxidada da proteína.

Podemos observar que à medida que aumentamos a concentração de hidroperóxido, ocorre o aumento da quantidade de proteína que representa a banda B. Neste caso, como o aumento desta banda coincide com a inativação de Ohr, podemos afirmar que a mesma representa a migração da forma superoxidada da enzima.

Anteriormente, nosso grupo já havia demonstrado migração diferencial dependendo do estado de oxidação da enzima (Cussioli *et al.*, 2003, Oliveira *et al.*,

Para confirmar os dados observados anteriormente, assim como analisar a possibilidade do detergente Tween 20 auxiliar a superoxidação de Ohr, repetimos o experimento, porém desta vez na presença de Triton X-100, o outro detergente utilizado na obtenção dos parâmetros cinéticos. Novamente não utilizamos NEM antes da realização do SDS-PAGE, pois queríamos uma análise comparativa da eletroforese (figura 37).

Figura 37. Inativação de Ohr após tratamento com hidroperóxidos orgânicos na presença de Triton.

a) OLOOH; b) LAOOH; c) *t*-BHP; d) CHP; e) ChOOH. Painéis a esquerda: Atividade NADH dependente comparativa de Ohr após incubação com diferentes concentrações de hidroperóxido. Condições do ensaio: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; lipoamida 50μM; *t*-BHP 200μM. Cada ponto foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão. Painéis a direita: SDS-PAGE (não redutor) das diferentes incubações. Raia 1: Ohr reduzida; raia 2: padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder Invitrogen); raia 3: controle (incubação apenas na presença do detergente); raia 4: Ohr tratada com hidroperóxido na proporção 1:1; Raia 5: Ohr tratada com hidrperóxido na proporção 1:2; Raia 6: Ohr tratada com hidroperóxido na proporção 1:5; Raia 7: Ohr tratada com hidroperóxido na concentração de 1:10. As letras representam as diferentes formas de Ohr: A-Dímero, B-Forma com ausência de ponte dissulfeto intramolecular, C-Presença de ponte dissulfeto intramolecular. Em cada raia foram aplicados aproximadamente 2μg de proteína total.

Podemos observar que os resultados são similares aos apresentados anteriormente, porém com algumas ressalvas. Tanto *t*-BHP como CHP, mesmo em altas proporções, inativaram menos Ohr em comparação a experimentos anteriores. Além disso, foi possível observar o não surgimento da banda correspondente ao dímero de Ohr pós-tratamento com *t*-BHP e CHP, além da diminuição da mesma nos tratamentos com OLOOH e LAOOH. Estes fatos nos indicam novamente que o detergente Tween 20 (utilizado nos experimentos anteriores) facilitava a superoxidação de Ohr.

Quanto à superoxidação observada, os hidroperóxidos de ácido graxo (OLOOH e LAOOH) são capazes de inativar Ohr com maior eficiência que *t*-BHP e CHP. Além disso,

foi possível observar novamente que ChOOH foi incapaz de inativar Ohr mesmo nas proporções mais altas. Como a inativação envolve a entrada de duas moléculas de hidroperóxido no sítio ativo, esse processo deve refletir a afinidade de Ohr pelo substrato e/ou impedimento estérico para a entrada de mais de uma molécula no sítio ativo.

Demonstramos que os hidroperóxidos derivados de ácidos graxos (cadeias alifáticas) são capazes de inativar Ohr com maior facilidade. Neste sentido, acreditamos que essa facilidade se deve a maior afinidade, assim como, melhor encaixe no sítio ativo de Ohr. A molécula de PEG co-cristalizada com Ohr mostrou-se um bom indício da estrutura molecular do substrato de Ohr. Além disso, a análise de interação da molécula de PEG com resíduos presentes no sítio ativo de Ohr parece ser uma abordagem interessante para descrever a relevância destes aminoácidos na atividade enzimática.

4.1.5. Avaliação dos mutantes de Ohr.

Outra forma de entender melhor a catálise de Ohr, e a interação entre a enzima e seu substrato é a utilização de enzimas mutantes. Neste tipo de estudo, podemos encontrar resíduos que apresentam papel fundamental na interação entre a enzima e seu substrato. Estes estudos complementam estudos estruturais e bioquímicos, como os descritos acima. De qualquer forma, é importante levar em consideração que muitas vezes mutações produzem efeitos de difícil interpretação pelo fato de aminoácidos apresentarem múltiplas interações.

Além disso, um dos objetivos deste projeto é a busca por inibidores da enzima Ohr. Neste tipo de estudo é de grande relevância o conhecimento dos resíduos importantes na catálise enzimática, pois estes podem ser utilizados como alvos para a interação de drogas, assim, impedindo ou dificultando o ciclo catalítico.

Durante a realização deste projeto o Dr. José Renato Cussiol realizou ensaios de atividade de mutantes de Ohr, os quais foram criados levando-se em conta alguns resíduos que interagem com a molécula de PEG na estrutura de Ohr na forma superoxidada (Oliveira *et al.*, 2006). Estas interações possivelmente mimetizam as interações que estabilizam o esqueleto carbônico de uma molécula de hidroperóxido

de ácido graxo, ou então uma molécula de ácido dihidrolipóico, dentro do sítio ativo de Ohr. É importante ressaltar que estes resíduos são em sua maioria hidrofóbicos.

Acreditávamos que a troca de resíduos hidrofóbicos por resíduos polares com volume semelhante, poderia dificultar as interações existentes entre os substratos e a enzima, ocasionando a diminuição da atividade enzimática quando comparada a enzima selvagem. De fato, a análise realizada pelo Dr. José Renato com os mutantes de Ohr demonstra que a atividade enzimática de alguns dos mutantes de Ohr diminui em ensaios realizados com *t*-BHP (figura 38-A). Neste ensaio utiliza-se uma concentração saturante de *t*-BHP, sendo assim, o valor obtido representa o valor da velocidade máxima das enzimas para este substrato nas condições analisadas. Além disso, foi determinado o pK_a da cisteína peroxidásica de cada um dos mutantes pelo método de alquilação com monobromobimano que é baseado no fato de que este composto se adiciona preferencialmente ao tiol na forma desprotonada (Cys-S^-), inibindo a atividade enzimática (Discola *et al.*, 2009). Esta determinação é importante para demonstrar que a diferença de atividade (quando presente) é provavelmente devido à ativação da cisteína peroxidásica (figura 38-B).

Figura 38. Dados de atividade enzimática e de pK_a (Ohr WT e mutantes). **A.** Atividade peroxidásica de Ohr WT e mutantes foi monitorada através de consumo de NADH à 340nm ($\epsilon = 6290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em incubações contendo Ohr ($0.2 \text{ } \mu\text{M}$); Lpd ($2 \text{ } \mu\text{M}$); SucB ($2 \text{ } \mu\text{M}$) e *t*-BHP ($200 \text{ } \mu\text{M}$). Mistura de reação continha 50 mM tampão fosfato Sódio ($\text{pH } 7.4$); 50 mM NaCl e 1 mM DTPA. Os ensaios foram realizados em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão. **B.** Determinação do pK_a do grupo tiol da Cys 61 de Ohr através da alquilação 1 por monobromobimano em função do pH. No ensaio foi utilizado Ohr ($10 \text{ } \mu\text{M}$) previamente reduzida na presença de monobromobimano ($2.8 \text{ } \mu\text{M}$) e dos respectivos tampões (50 mM); NaCl (500 mM). Foi realizada uma cinética por 20 minutos à 37°C e os resultados foram analisados utilizando a equação de Henderson-Hasselbach.

Nesses estudos, utilizou-se *t*-BHP como substrato oxidante, um hidroperóxido orgânico de cadeia curta. Porém, a análise para criação dos mutantes foi realizada a partir das interações entre os resíduos do sítio ativo de Ohr e os átomos da molécula de PEG, uma molécula alongada. Portanto, existe a possibilidade que no caso dos mutantes que não apresentaram decréscimo na atividade peroxidásica, não ocorra interação entre o resíduo modificado e o *t*-BHP, já que este apresenta uma cadeia curta. Portanto, neste caso, a ausência de decréscimo de atividade das proteínas mutantes em relação à selvagem não refletiria perda interações hidrofóbicas do complexo enzima-substrato.

Dessa forma, realizamos ensaios de atividade de Ohr (WT e mutantes) utilizando um hidroperóxido de cadeia alongada (OLOOH) e variando a concentração deste, com o intuito de calcular os parâmetros cinéticos das diferentes enzimas.

Primeiramente comparamos a atividade de Ohr WT com *t*-BHP na presença e na ausência do detergente Triton X-100. Este substrato, apesar de ser hidrofóbico, é solúvel em água. Por consequência, as diferenças apresentadas são, principalmente, em decorrência da interferência do detergente no sistema. Portanto, nas análises realizadas utilizando hidroperóxidos de ácido graxo concluímos que os parâmetros estão subestimados, já que o detergente interfere na atividade do sistema (figura 39).

Figura 39. Comparação de parâmetros com e sem Triton X-100. Condições do ensaio: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; lipoamida 100μM; Triton 0,15% (somente em B). Cada ponto foi feito em duplicata e as barras de erro representam a variação encontrada. Parâmetros cinéticos calculados utilizando o programa GraphPad Prism.

No passo seguinte, realizamos ensaios de atividade peroxidásica dos diferentes mutantes de Ohr frente ao OLOOH. Estes ensaios foram realizados mantendo as

mesmas condições para uma posterior análise comparativa dos parâmetros obtidos (figura 40).

Pela observação dos gráficos (atente para as diferentes escalas utilizadas), é possível notar diferença de atividade apresentadas pelos mutantes V36S, G95S e L40T (este último mutante foi construído recentemente, portanto ainda não obtivemos os dados de pK_a da cisteína peroxidásica). Os resultados obtidos com os dados relativos à redução de OLOOH por Ohr se assemelham com os obtidos na redução de *t*-BHP (dados de atividade específica – figura 38-A). Em ambas as análises, é possível observar uma menor velocidade máxima do mutante V36S e posteriormente do mutante G95S, comparativamente a Ohr selvagem.

Figura 40. Comparação da atividade de Ohr na redução de OLOOH (WT e mutantes). Condições do ensaio: Ohr 0,05μM; LpD 1μM; lipoamida 45μM; Triton 0,15%. Cada ponto foi feito em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão. Curvas criadas no programa GraphPad Prism.

Interessantemente, o mutante L40T apresentou o maior decréscimo de atividade comparativamente, sendo que a enzima chega à saturação com baixas concentrações de hidroperóxido.

Já os mutantes F68Y e F96Y, assim com na análise anterior, não apresentaram grande diferença de atividade quando comparados a selvagem. Uma possível interpretação para este fato é que os substratos por serem hidrofóbicos, interagem com o anel aromático do resíduo de fenilalanina, sendo que este anel também está presente no resíduo de tirosina. A presença de um grupo hidroxila na extremidade da cadeia lateral da tirosina não seria capaz de desestabilizar as interações hidrofóbicas que ocorrem entre os substratos e o anel aromático presente nos resíduos.

De fato, ambos os resíduos de fenilalanina, apesar de hidrofóbicos, situam-se a superfície da proteína (figura 41). Portanto, parece que a existência de um grupo hidroxila na extremidade da cadeia lateral não é capaz de desestabilizar interações hidrofóbicas que se dêem mais próximas das cisteínas.

Figura 41. Localização das fenilalaninas mutadas para tirosinas em Ohr de *X. fastidiosa*. Estrutura de Ohr de *X. fastidiosa* (PDB 1ZB9). Figura criada utilizando software Pymol.

Para melhor observação das diferenças existentes entre os mutantes de Ohr e a selvagem, podemos observar a tabela contendo os parâmetros calculados a partir dos dados obtidos. Apesar das observações descritas acima, não houve mudança considerável na eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) dos diferentes mutantes criados em relação à enzima selvagem. Todos os mutantes apresentam eficiência da ordem de 10^6 (tabela 6). Por outro lado, a inspeção visual dos gráficos de Michaelis-Menten claramente indicam que para alguns mutantes as propriedades enzimáticas são

bastante distintas em relação à proteína selvagem. No caso do mutante L40T, o decréscimo no valor de $V_{\text{máx}}$ pode ter levado a um decréscimo também no valor de K_M , mantendo a razão k_{cat}/K_M . Dessa forma, pretendemos determinar valores de atividades específicas dos mutantes comparativamente com a selvagem.

Tabela 5 – Parâmetros enzimáticos Ohr WT e mutantes

	$V_{\text{máx}}_{\text{ap}} (\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_{\text{M ap}} (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})$
WT	3,17	31,2	63,4	$2,0 \times 10^6$
V36S	1,36	8,2	39,9	$4,9 \times 10^6$
F68Y	3,47	35,7	69,4	$1,9 \times 10^6$
G95S	1,64	9,1	32,8	$3,6 \times 10^6$
F96Y	2,69	32,2	53,8	$1,7 \times 10^6$
L40T	0,55	2,8	11,0	$3,9 \times 10^6$

Parâmetros cinéticos calculados por regressão não linear (equação de Michaelis-Menten), a partir de dados da figura 40, utilizando o programa GraphPad Prism.

4.2. Análise estrutural de Ohr.

Realizamos diferentes tipos de análises cinéticas com o intuito de entender melhor a atividade peroxidásica de Ohr e sua “preferência” por determinados substratos oxidantes. Estudos de estrutura proteica podem complementar no entendimento desse fenômeno, bem como identificar mudanças conformacionais durante o ciclo catalítico, e ainda na interação com possíveis moléculas inibidoras.

4.2.1. Elucidação da estrutura de Ohr de *X. fastidiosa* na forma de dissulfeto intramolecular (oxidada).

Recentemente, demonstramos que a enzima Ohr é reduzida por ácido dihidrolipóico ligado covalentemente a proteínas do metabolismo intermediário (Cussioli *et al.*, 2010), e nossos dados demonstram que Ohr atua preferencialmente na redução de hidroperóxidos de ácido graxo. Portanto, decidimos realizar ensaios de cristalização de Ohr (selvagem – WT e mutante – C125S) na presença de seus substratos (redutor – dihidrolipoamida e oxidantes LAOOH e OLOOH). A co-

cristalização de Ohr com seus substratos seria importante para entender como se dá a interação entre os compostos e os resíduos da proteína.

Nesses experimentos utilizamos uma enzima mutante da cisteína de resolução (Cys125), para impedir a formação de dissulfetos que poderiam prejudicar a obtenção de cristais contendo os hidroperóxidos/ácido graxo interagindo com a proteína.

Obtivemos cristais de Ohr WT e Ohr C125S em diversas condições, porém a maioria destes não apresentou qualidade suficiente para experimentos de difração de Raios-X. Após sequências de refinamentos, obtivemos cristais de Ohr WT na presença de dihidrolipoamida 1,2mM, de aparente qualidade para coleta de dados (figura 42-A).

Figura 42. Cristal de Ohr WT e padrão de difração. A. Cristal obtido em tampão cacodilato de sódio pH 6,0; citrato de sódio 0,4M e dihidrolipoamida 1,2mM. Cristais surgiram após três semanas da preparação das placas. Régua: 100 = 1 mm. **B.** Amostra de padrão de difração obtido.

Realizamos a coleta de dados de difração de diversos cristais. Dentre estes um apresentou estatísticas melhores após o processamento de dados. Este cristal difratou a uma resolução de 2,15 Å. Foi coletado um conjunto de dados de difração desse cristal com 180 imagens com $\Delta\phi=1^\circ$ (figura 42-B). A estatística do conjunto de dados está representada na tabela 7.

TABELA 6 – Estatística dos dados de difração de Ohr

Grupo espacial	C2
Parâmetros de célula unitária (Å)	a = 87,81; b = 83,69; c = 60,76
Resolução (Å)	43.81 – 2.15
Nº de reflexões totais	229678
Nº de reflexões únicas	25723
Completeza (%)	99.9 (99.9)
Multiplicidade (%)	3.1 (3.0)
R_{sym}	0.088 (0.349)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13.9 (3.0)

Utilizando o programa Phaser (Read, 2001) e as coordenadas da estrutura de Ohr superoxidada (PDB 1ZB9; Oliveira *et al.*, 2006) para a substituição molecular, encontramos uma solução para as fases de Ohr oxidada. Foram encontradas três moléculas na unidade assimétrica (figura 43).

Figura 43. Arranjo de três moléculas na unidade assimétrica. Monômeros representados em verde, azul (pertencentes ao mesmo dímero) e magenta (pertencente a outro dímero). Representação elaborada utilizando o programa Pymol.

O refinamento do modelo da Ohr oxidada foi realizado com o programa *Refmac5* (Pannu, 1998). O primeiro ciclo de refinamento do modelo gerou um $R_{factor} = 0,292$ e um $R_{free} = 0,348$, após 17 ciclos de refinamento, chegamos a um $R_{factor} = 0,176$ e $R_{free} = 0,223$. As estatísticas do refinamento da estrutura de Ohr oxidada estão mostradas na tabela 8. Pudemos observar logo nos primeiros ciclos de refinamento a existência de uma ligação dissulfeto intra-molecular entre as cisteínas de Ohr (figura 44-A). Porém, nenhuma densidade eletrônica compatível com uma molécula de dihidrolipoamida foi encontrada durante os ciclos de refinamento.

Acreditamos que a formação do cristal de Ohr se deu após a oxidação de toda a dihidrolipoamida, presente no meio, e da oxidação da proteína. Este fato pode ter permitido a formação e crescimento do cristal de forma lenta.

TABELA 7 – Estatística do refinamento da estrutura de Ohr

R_{factor}	0.176
R_{free}	0.223
Número de átomos não hidrogênio	3394
Número de águas	435
RMSD ligação (Å)	0,01
RMSD ângulo (Å)	1,539
B fator médio (Å²)	
Cadeia principal	20,240
Cadeia lateral	22,441
Análise de Ramachandran (%)	
Regiões favorecidas	91,9
Regiões permitidas adicionais	8,1

Figura 44. Mapa de densidade eletrônica. A. ligação dissulfeto entre as duas cisteínas de Ohr no estado oxidado. **B.** alça contendo a arginina 19. Carbonos em verde, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em laranja. Figura criada utilizando software Pymol.

Na análise do diagrama de Ramachandran (figura 45), observamos que 91,9% dos resíduos encontram-se em regiões mais favorecidas, 8,1% encontram-se em regiões adicionalmente permitidas e que nenhum resíduo de aminoácido encontra-se em regiões não permitidas, evidenciando a qualidade do modelo proposto.

Figura 45. Diagrama de Ramachandran da estrutura de Ohr no estado oxidado.

Como já era esperado, Ohr de *Xylella fastidiosa* no estado oxidado se apresenta como homodímero em forma elíptica (a mesma estrutura quaternária encontrada no estado superoxidado, PDB 1ZB9, previamente elucidado por nosso grupo), no qual duas folhas- β rodeiam quatro hélices (Oliveira *et al.*, 2006). A sobreposição das estruturas superoxidada (1ZB9) e oxidada mostra que não ocorrem grandes modificações globais para as estruturas em diferentes estados de oxidação (figura 46). O alinhamento destas estruturas resulta em um Rmsd = 1,208 Å.

Figura 46. Alinhamento de estruturas de Ohr. Em ciano a estrutura de Ohr oxidada (este trabalho), em verde a estrutura da Ohr superoxidada (PDB 1ZB9). RMSD = 1.208 Å. Figura criada utilizando software Pymol.

Análises estruturais anteriores (Oliveira *et al.*, 2006) mostraram que a estrutura de Ohr de *X. fastidiosa* na forma superoxidada apresenta uma conformação similar quando comparada a estrutura na forma reduzida da Ohr de *P. aureginosa* (Lesniak *et al.*, 2002). Em ambas as estruturas, a arginina 19 encontra-se proximamente a cisteína peroxidásica (Cys61), provavelmente refletindo a estabilização do respectivo tiolato (RS^-) (figura 47). Porém, em nossa nova estrutura, no estado oxidado, tanto a alça que contém a arginina, quanto esta própria encontram-se deslocadas do sítio ativo.

Figura 47. Alinhamento de estruturas de Ohr de *X. fastidiosa* e *P. aureginosa*. Em verde estrutura superoxidada de *X. fastidiosa* (1ZB9, Oliveira *et al.*, 2006) e em magenta estrutura reduzida de *P. aureginosa* (1N2F, Lesniak *et al.*, 2002), RMSD = 1.104 Å. Cadeias laterais de resíduos em destaque em visualização “bola bastão”. Figura criada utilizando software Pymol.

O movimento da alça contendo a arginina já havia sido proposto por nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2006); o qual poderia auxiliar a liberação do primeiro produto da reação de redução de um hidropéroxido catalisada pela Ohr. Nesse sentido, a movimentação da alça funcionaria como uma catapulta (figura 48), expulsando o primeiro produto da reação (um álcool correspondente a redução de um hidropéroxido) de dentro do bolsão do sítio ativo da enzima. Acreditamos que a movimentação da Arg19 se deva a ruptura da ligação de hidrogênio realizada com a Cys61 (Oliveira *et al.*, 2006) (figura 13).

Figura 48. Alinhamento de estruturas de Ohr de *X. fastidiosa*. Em verde, a estrutura superoxidada (1ZB9, Oliveira *et al.*, 2006) e, em ciano, a estrutura oxidada, obtida neste trabalho. Cadeias laterais de resíduos em destaque em visualização “bola bastão”. Oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e enxofres em amarelo. Figura criada utilizando software Pymol.

Na estrutura obtida neste trabalho, tanto a alça contendo a arginina (Arg19), como o próprio resíduo, apresentaram uma alta densidade eletrônica (figura 44-B), característicos de porções protéicas com baixa mobilidade em solução. Por outro lado, não detectamos interações entre os resíduos da alça e os demais resíduos que explicassem a estabilização da alça em uma posição fixa. Normalmente, cadeias laterais de resíduos superficiais e estruturas como alças não apresentam densidade eletrônica bem definida devido a sua mobilidade.

Dessa forma, analisamos se havia interação entre resíduos da alça que contém a Arg19, com resíduos pertencentes ao outro dímero, através contatos entre unidades assimétricas de cristalização distintas (denominado contatos cristalinos). De fato, foi possível observar proximidade entre os resíduos de Arg19 e Asp20, presentes em uma unidade assimétrica e os resíduos de Asp20 e Arg19 de outra unidade assimétrica (figura 49).

Figura 49. Contato cristalino entre duas unidades assimétricas. Em verde, uma unidade assimétrica e, em magenta, outra unidade assimétrica. Cadeias laterais dos resíduos Arg 19 e Asp 20 em visualização “bola bastão”. Oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul. Figura criada utilizando software Pymol.

Apesar da estabilização da alça devido ao contato cristalográfico, acreditamos que esta interação só foi possível devido à abertura da alça, a qual ocorre em decorrência da formação da ligação dissulfeto entre as cisteínas e afastamento da Arg19 do sítio ativo. Esta abertura da alça já havia sido observada na estrutura de Ohr de *D. radiodurans* (PDB 1USP; Meunier-Jamin *et al.*, 2004), a qual também se encontra no estado oxidado (ligação dissulfeto entre as cisteínas).

Figura 50. Sítio ativo de Ohr com alça aberta . Alinhamento de estruturas de Ohr de *X. fastidiosa* (este trabalho - ciano) e *D. radiodurans* (PDB 1USP - verde). RMSD = 1.197 Å. Cadeias laterais de resíduos em destaque em visualização “bola bastão”. Oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e enxofres em amarelo. Figura criada utilizando software Pymol.

Podemos observar que apesar das duas estruturas de Ohr apresentarem a ligação dissulfeto e a alça em conformação aberta, não é possível montar a cadeia lateral do resíduo de arginina dentro da densidade eletrônica na estrutura de *D. radiodurans* (figura 50). Entretanto, isto foi possível em nossa estrutura, possivelmente devido ao contato cristalino. Este dado reforça a mudança conformacional proposta no ciclo catalítico de Ohr (Oliveira *et al.*, 2006).

Outra análise realizada é referente à comparação das superfícies das duas estruturas de Ohr de *X. fastidiosa*. Podemos observar que na estrutura superoxidada (compatível a forma reduzida) existe um sulco no qual as cisteínas estão inseridas (figura 52), podendo haver o encaixe de uma molécula alongada, na qual a função reativa esteja meio da cadeia alifática, por exemplo, um hidroperóxido de ácido oléico (figura 51-A). Oliveira *et al.* (2006) mostraram, através de modelagem, que é possível encaixar uma molécula de hidroperóxido de ácido oléico no sítio ativo de Ohr e que a função peróxido encontra-se próxima da cisteína peroxidásica. Além disso, nossos estudos de *docking* demonstram que hidroperóxidos derivados de ácidos graxos monoinsaturados se adequam ao sítio ativo de Ohr de *X. fastidiosa* (figura 35).

Já na estrutura oxidada, podemos observar que as cisteínas encontram-se no fundo de um sulco de fundo-cego (figura 52), portanto, nesse caso, poderia haver o encaixe de uma molécula que possua a função reativa na extremidade da cadeia alifática, por exemplo, uma molécula de ácido dihidrolipóico (figura 51-B). Este fato (encaixe de

uma molécula de ácido dihidrolipóico) foi observado por Meunier-Jamin *et al.* (2004) através de modelagem manual.

Figura 51. Substratos de Ohr. A. Representação de uma molécula de hidroperóxido de ácido oléico. B. Representação de uma molécula de ácido dihidrolipóico.

Figura 52. Representação da superfície de Ohr de *X. fastidiosa*. Estado superoxidado em verde (PDB 1ZB9) e oxidado em magenta (dados desse trabalho). Detalhe na região do sítio ativo mostrando a diferença na forma da cavidade. Cisteínas em amarelo. Figuras criadas utilizando software Pymol.

4.3. Análises do papel fisiológico de Ohr.

4.3.1. Separação e detecção de proteínas da fração extracelular de *X. fastidiosa*.

Como já foi descrito, dihidrolipoamida livre assim como enzimas lipoiladas são capazes de reduzir Ohr. Porém, necessitávamos demonstrar se este sistema possui

uma co-localização na célula bacteriana, fato que apoiaria a hipótese da função do sistema *in vivo*.

Realizamos análises de co-localização de Ohr e proteínas lipoiladas de *X. fastidiosa*, na tentativa de elucidar a relevância desses sistemas redutores para sustentar a atividade enzimática dessa peroxidase, através de co-precipitação, seguida por experimento de *Western blot* (figura 53). Utilizamos um anticorpo contra Ohr produzido por nosso laboratório em colaboração com a Dra. Mariz Vainzof (Departamento de Genética e biologia Evolutiva – IBUSP) e um anticorpo contra lipoamida gentilmente cedido pelo Dr. Luke Szweda (Free Radical Biology and Aging Research Program, Oklahoma Medical Research Foundation).

Figura 53. Análise da localização de Ohr por *Western blot*. Raias 1-4 correspondem a anti-Ohr (1:1000), e Raias 6-10 correspondem a anti-ácido lipóico (1:5000). 1: Ohr recombinante (0.1µg); 2: lisado de *X. fastidiosa*; 3: primeira lavagem do sobrenadante; 4: segunda lavagem do sobrenadante; 5: Padrão de peso molecular RainbowTM (Invitrogen); 6: LpdA recombinante (0.1µg); 7: SucB recombinante (0.1µg); 8: lisado de *X. fastidiosa*; 9: primeira lavagem do sobrenadante; 10: segunda lavagem do sobrenadante.

Ohr está presente tanto na interior da célula (citoplasma) como também na parte externa da célula, fracamente ligada à membrana (figura 53). Além disso, podemos observar que a enzima SucB também está presente em ambos locais, e ainda se apresenta em maiores concentrações do que a enzima LpDA, a qual só se apresenta na fração extracelular.

Este resultado nos faz supor que, *in vivo*, a enzima SucB seria o redutor direto de Ohr tanto externamente como internamente a célula, sendo assim Ohr teria sua atividade peroxidásica sustentada mesmo fora da célula.

A existência de Ohr na porção externa da célula bacteriana já havia sido sugerida por análise proteômica (Smolka *et al.*, 2003). Nesse trabalho, a enzima Ohr está entre

as principais proteínas encontradas na fração extracelular, assim como a enzima LpdA, portanto não podemos descartar a participação desta última na redução de Ohr.

4.3.2. Tentativas de construção da linhagem Δ ohr de *Xylella fastidiosa*

A construção de uma linhagem mutante para o gene *ohr* é de grande valor para um melhor entendimento do papel fisiológico da enzima na célula bacteriana, além de funcionar como controle em experimentos de inibição *in vivo* (um dos objetivos deste trabalho).

Iniciamos a construção de uma linhagem mutante para este gene, utilizando a estratégia de recombinação homóloga com um plasmídeo contendo a origem de replicação cromossômica da bactéria fusionado a um plasmídeo comercial (pUCBM21), como descrito em da Silva Neto *et al.* (2007).

O gene *ohr* foi clonado a partir do DNA genômico da linhagem J1 a J12 e na sequência realizamos a amplificação de uma região interna de do gene, a qual seria potencial alvo para recombinação homóloga. A região interna do gene foi inserida no vetor pUCBM21 e este plasmídeo foi utilizado para transformação em células de *X. fastidiosa* J1a12, como descrito nos materiais e métodos

Foram selecionados doze clones e estes crescidos em PWG/Amp líquido juntamente com a linhagem selvagem não transformada e um clone transformado com o vetor pUCBM21*oriC* vazio. Em seguida, foram realizados diversos repiques de todos os clones, porém não foi possível obter um clone no qual tivesse ocorrido a recombinação homóloga, a qual seria observada pela presença de uma banda na reação de PCR utilizando um *primer* do vetor em um *primer* da região final do gene *ohr*.

Devido ao insucesso da obtenção da linhagem mutante, duas hipóteses foram levantadas: *ohr* poderia ser um gene essencial para sobrevivência da bactéria, sendo que um clone que realizasse a recombinação não conseguiria sobreviver na falta do gene, impossibilitando a obtenção da linhagem mutante.

Esta hipótese provavelmente deve ser refutada, pois são inúmeros os exemplos da criação de linhagens de bactérias mutantes, para genes envolvidos na proteção antioxidante. Além disto, existem exemplos na literatura de espécies bacterianas

mutantes para o gene *ohr*, sendo estas viáveis (Mongkolsuk *et al.*, 1998) e mantendo sua patogenicidade (Atichartpongkul *et al.*, 2010; Fontenelle *et al.*, 2011).

Outra hipótese seria que o gene *ohr* seria importante na condição de cultivo de *X. fastidiosa* que realizamos no laboratório. O cultivo é realizado em PWG, ou seja, um meio rico, diferente das condições naturais de crescimento da bactéria que se dá dentro do xilema do vegetal. De fato, já foi demonstrado que bactérias crescidas em meios ricos apresentam multiplicação acelerada, além do aumento da expressão de genes relacionados à tradução (Tao *et al.*, 1999). E mais precisamente, em *X. fastidiosa* mostrou-se que existe diferença na expressão gênica (no nível transcricional) dependente do meio de cultura (Ciraulo *et al.*, 2010).

Neste último, é demonstrado que o gene *ohr*, assim como *sodA* (superóxido dismutase) e *gst* (glutathione S-transferase) são mais expressos no meio rico (PW) em comparação com o meio baseado no xilema (3G10R). Este fato coincide com uma maior taxa de crescimento da bactéria no meio rico, além de um maior taxa respiratória.

Acreditamos que a taxa de crescimento acelerada, assim como um maior consumo de O₂, podem acarretar em um aumento na produção de ROS, sendo necessário, para a sobrevivência da bactéria, o aumento da expressão de genes relacionados a detoxificação desses agentes oxidantes. Portanto, isto diminuiria as chances da obtenção de um mutante para o gene *ohr*.

4.3.3. Papel fisiológico de Ohr de *X. fastidiosa* em sistema heterólogo.

Devido ao insucesso na construção de uma linhagem de *X. fastidiosa* mutante para o gene *ohr*, decidimos estudar a atuação da enzima Ohr em linhagens de *E. coli* mutantes para genes antioxidantes. Dois mutantes foram escolhidos (mutantes para os genes *osmC* e *ahpC*).

Como já descrito anteriormente, o gene *ohr* foi caracterizado como um gene que confere resistência a hidróperóxidos orgânicos (Mongkolsuk *et al.*, 1998), pois a proteína traduzida a partir deste gene codifica uma peroxidase baseada em resíduos de cisteína (Lesniak *et al.* 2002; Cusioli *et al.*, 2003) e dependente de grupos lipoil (Cusioli *et al.*, 2010).

O gene *osmC* tem sua expressão induzida em situação de choque osmótico e em fase estacionária (Gutierrez & Devedjian, 1991; Gordia & Gutierrez, 1996). Porém a proteína também apresenta atividade peroxidásica (Lesniak *et al.*, 2003; Rehse *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008; Cussiol *et al.*, 2010) e é provavelmente dependente de grupos lipoil *in vivo* (Cussiol *et al.*, 2010). As proteínas Ohr e OsmC são membros da mesma família protéica devido a sua semelhança em estrutura primária, apesar dos genes em questão possuírem distintos padrões de expressão (Atichartpongkul *et al.*, 2001). Já o gene *ahpC* caracteriza uma peroxirredoxina classicamente envolvida na detoxificação de hidroperóxidos orgânicos (Storz *et al.*, 1989), e é especificamente reduzida por uma redutase (AhpF), em um sistema similar ao sistema tiorredoxina (Poole, 1996).

Tomando estas informações como contexto, realizamos experimentos na tentativa de entender melhor o papel fisiológico de Ohr de *X. fastidiosa*, além de elucidar se a mesma é capaz de reduzir hidroperóxidos orgânicos *in vivo*. Para isto utilizamos linhagens de *E. coli* mutantes para os genes *osmC* e *ahpC*. Essas linhagens de bactéria foram adquiridas de um banco de mutantes (Baba *et al.*, 2006) (ver materiais e métodos).

Primeiramente, realizamos curvas de crescimento das três linhagens de *E. coli* utilizadas (selvagem - WT, $\Delta ahpC$ e $\Delta osmC$), não tendo sido verificada diferença entre elas. (figura 54).

Figura 54. Curva de crescimento de linhagens de *E. coli*. Curva de crescimento para comparação das três linhagens de *E. coli* utilizadas nos experimentos: selvagem (WT), $\Delta ahpC$ e $\Delta osmC$. Experimento realizado em meio LB a 37°C e 180rpm.

Posteriormente, realizamos a clonagem do gene *ohr* de *X. fastidiosa* no vetor pProEx, e então transformamos as linhagens mutantes para os genes *osmC* (JW1477) e

ahpC (JW0598) de *E. coli* com o vetor contendo o gene *ohr* e também com o vetor vazio. Além disto, a linhagem selvagem (BW25113) foi também transformada com o vetor vazio.

Para a elaboração dos experimentos posteriores, realizamos previamente curvas de crescimento da linhagem $\Delta osmC$ transformada com o vetor pProEX contendo o gene *ohr*, na presença de diversas concentrações de IPTG (figura 55-A), com o intuito de avaliar a interferência do composto no crescimento da linhagem que superexpressa Ohr. No mesmo experimento, após três horas foram retiradas alíquotas para analisar se havia variação na expressão da proteína Ohr, por SDS-PAGE e Western-blot (figura 55-B e C).

Figura 55. Influência do IPTG no crescimento e na expressão de Ohr. A. Curva de crescimento da linhagem JW1477 transformada com pProEX-ohr crescida em meio LB sob agitação de 180rpm a 37°C na presença de diversas concentrações de IPTG. B e C: Análise da superexpressão de Ohr por SDS-PAGE (B) e Western-blot (C), após três horas de indução. Raias: 1-Ohr purificada, 2-Padrão de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen)-Esquerda e Full-range Rainbow (GE)-Direita, 3-Sem indução, 4-10 μ M IPTG, 5-25 μ M IPTG, 6-50 μ M IPTG, 7-100 μ M IPTG, 8-150 μ M IPTG, 9-300 μ M IPTG, 10-600 μ M IPTG.

É possível observar que, nas condições analisadas, concentração final de IPTG não altera o crescimento das células e também não tem grande influência na superexpressão de Ohr. A partir destes experimentos decidimos por utilizar a menor

concentração de 10 μ M final de IPTG mantendo altos níveis de expressão e evitando adicionais efeitos indesejados no sistema.

A seguir, realizamos curvas de crescimento das diferentes linhagens transformadas, na presença de *t*-BHP com intuito de analisar se a superexpressão de Ohr seria capaz de reverter o fenótipo das linhagens mutantes. Para isso, analisamos o crescimento simultaneamente da linhagem selvagem transformada com vetor pProEx vazio, a linhagem $\Delta osmC$ com vetor vazio e com o vetor contendo o gene *ohr*, e a linhagem $\Delta ahpC$, também com vetor vazio e com vetor contendo o gene *ohr* (figura 56).

Figura 56. Curvas de crescimento de linhagens mutantes de *E. coli* submetidas a estresse oxidativo. Curvas de crescimento das linhagens de *E. coli* transformadas com plasmídeo vazio ou plasmídeo contendo o gene *ohr* crescidas em LB+Amp em duas concentrações diferentes de *t*-BHT 10 μ M (A) e 100 μ M (B). Adição de *t*-BHP em DO_{600nm} de 0,2. Experimento realizado em meio LB a 37°C e 180rpm e repetido duas vezes, apresentando resultado similar.

Analisando as curvas de crescimento, vemos que a concentração de 10 μ M de *t*-BHP não afeta o crescimento das linhagens mutantes. Já na concentração de 100 μ M observamos que somente a linhagem $\Delta ahpC$ cresce mais lentamente, o que está de acordo com a função descrita para o gene (Storz *et al.*, 1989). A linhagem $\Delta osmC$ parece não sofrer interferência nas concentrações de *t*-BHP testadas. Esses dados discordam com resultados obtidos por Conter *et al.*, (2001), no qual uma linhagem $\Delta osmC$ de *E. coli* apresentou maior suscetibilidade a *t*-BHP comparado com a selvagem em experimentos de disco de inibição e de unidades formadoras de colônia, pós tratamento.

Apesar da existência de dados na literatura que demonstram a atividade peroxidásica de OsmC *in vitro* (Lesniak *et al.*, 2003; Rehse *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008; Cussiol *et al.*, 2010) e sua função antioxidante *in vivo* (Conter *et al.*, 2001), nas condições utilizadas neste trabalho não observamos a função descrita desta enzima.

Porém, pudemos observar que a enzima Ohr de *X. fastidiosa* é capaz de restaurar o fenótipo da linhagem $\Delta ahpC$, provavelmente reduzindo o hidroperóxido orgânico existente, impedindo que este causasse danos a célula interferindo em seu crescimento.

Além disso, este resultado reforça a idéia proposta que Ohr é reduzida por proteínas conservadas do metabolismo intermediário, pois sua função fisiológica é mantida mesmo em outra espécie. A atividade de Ohr de *X. fastidiosa* sendo sustentada por enzimas lipoiladas do metabolismo intermediário de *E. coli* já havia sido demonstrado em ensaios utilizando o extrato celular (Cussioli *et al.*, 2010).

Utilizamos esta mesma abordagem na tentativa de demonstrar a capacidade de Ohr proteger a células de *E. coli* do efeito danoso dos hidroperóxidos derivados de ácido graxo (LAOOH e OLOOH), porém não obtivemos sucesso. Em diversas tentativas, utilizando diferentes concentrações de hidroperóxidos (entre 50 e 150 μ M), não conseguimos um efeito danoso sobre nenhuma das linhagens utilizadas, inclusive a selvagem.

Dentre as possíveis causas da ausência de efeito estão a baixa solubilidade de LAOOH e OLOOH em meio aquoso, o que poderia diminuir o contato com as células bacterianas, devido a formação de micelas. Dessa forma, LAOOH e OLOOH não poderiam adentrar a célula bacteriana, devido ao seu tamanho e sua alta hidrofobicidade. Por outro lado, *t*-BHP seria capaz de adentrar a célula devido ao seu tamanho reduzido e sua característica anfipática.

Apesar disso, já houve demonstração da sensibilidade de células de *X. campestris* selvagem, em experimentos de expressão gênica (concentrações entre 10 e 100 μ M OLOOH) e de mutantes (Δohr e $\Delta ahpC$) em experimentos de disco de inibição (concentração de 50 μ M OLOOH) (Klomsiri *et al.*, 2005).

4.3.4. Testes de inibição de crescimento em culturas de *Xylella fastidiosa*.

A inexistência de formas de controle específicas para a bactéria *X. fastidiosa*, juntamente com a credibilidade da importância fisiológica da enzima Ohr no processo infeccioso, nos levaram a busca de compostos inibidores da atividade peroxidásica de Ohr.

Para isto, foram realizados diversos ensaios da atividade peroxidásica de Ohr na presença de compostos sintetizados pelo Prof. Dr. Leandro Helgueira (IQ-USP). Nestes ensaios, a técnica Andressa Yurie Silvestre Sakugawa monitorou a diminuição da atividade peroxidásica à medida que se aumentava a concentração de inibidor no ensaio. Além disso, era determinado o IC 50, o qual representa a concentração de inibidor necessária para inibir a atividade enzimática a metade da atividade na ausência do inibidor. Dentre diversos compostos testados, um (denominado composto 21) se destacou como um potencial inibidor de Ohr (figura 57).

Figura 57. Análise da inibição da atividade de Ohr pelo composto 21. Curva da atividade de Ohr pelo Log da concentração (M) de inibidor – C (log 10). Condições dos ensaios: Ohr 0,05μM; LpD 0,5μM; lipoamida 50μM BSA 0,1 mg/mL, TRITON 0,1% e t-BHP 200μM. IC 50 APROXIMADO 150μM.

A partir destes resultados, elaboramos um experimento para testar a ação do composto *in vivo*. Neste, realizamos o crescimento da linhagem J1 a 12 de *X. fastidiosa* na presença do inibidor (100μM), na presença de *t*-BHP (100μM), ou na presença de ambos (100μM). O experimento foi realizado duas vezes até o momento, não tendo apresentado resultados similares (figura 58), embora em ambos os experimentos, o tratamento duplo (composto 21 + *t*-BHP) provocou retardo no crescimento da bactéria.

Figura 58: Curvas de crescimento de *X. fastidiosa* na presença de inibidor de Ohr. Controle: etanol 0,2%; Composto 21: composto 21 100 μ M; t-BHP: t-BHP 100 μ M e etanol 0,2%; t-BHP + composto 21: ambos a 100 μ M. Culturas em 50ml de PWG sem agitação a T.A. Curvas de mesma cor com tons diferentes representam replicatas realizadas simultaneamente.

Em ambos os experimentos, foram acompanhadas três culturas de cada tratamento durante aproximadamente 40 dias. Nas culturas consideradas controle foi

adicionado etanol (0,2%), pois o composto 21 é solubilizado em etanol, e, após a adição de solução contendo o mesmo, a cultura apresenta uma concentração de 0,2% de etanol (v/v).

Observamos que a adição isolada do composto 21 não acarreta mudança no crescimento da cultura (experimento 1 e 2). Porém, tanto a adição de *t*-BHP quanto *t*-BHP + composto 21 prejudicam o crescimento das células, sendo que a presença do oxidante juntamente com o possível inibidor parece ser mais danosa que apenas a adição do hidroperóxido. As curvas do experimento 1 mostram que na presença de *t*-BHP juntamente com o composto, há um retardo no crescimento das células de quase 30 dias (duas de três culturas), enquanto que na presença apenas de *t*-BHP o retardo no crescimento é de aproximadamente 15 dias.

Ademais, ao analisarmos o gráfico das culturas crescidas na presença de *t*-BHP e composto (experimento 1), notamos que uma das culturas recupera o crescimento antes das outras. Acreditamos que este fato se deve a esta cultura possuir maior quantidade de células no início do experimento, fato que pode ser observado no ponto inicial da curva, o qual mostra uma maior DO para esta cultura em relação com as outras. Este erro se deve provavelmente a dificuldade de diluição das células no meio de cultura, já estas costumam formar grumos e crescerem coladas a parede do frasco.

Já no segundo experimento, observamos que a diferença entre as curvas de crescimento na presença de *t*-BHP e de *t*-BHP + composto é sutil (duas de três culturas), e ainda, uma das culturas na presença de *t*-BHP + composto apresentou crescimento similar a cultura na presença apenas de *t*-BHP. Uma das possíveis explicações da não reprodutibilidade do experimento é o fato dos experimentos terem sido realizados com diferentes passagens da linhagem, sendo que no segundo foi utilizada uma passagem mais alta.

Apesar da não reprodutibilidade total nos experimentos até o momento, acreditamos que o composto esteja inibindo Ohr, porém, em condições sem estresse, isso não acarreta em dano para as células. Já na condição de estresse oxidativo (adição de *t*-BHP), acreditamos que o composto inibiu a atividade de Ohr diminuindo sua eficiência na redução do hidroperóxido presente, sendo assim, uma maior quantidade de hidroperóxido presente foi capaz de interferir com maior eficiência no crescimento bacteriano.

4. CONCLUSÕES.

Este trabalho trouxe informações importantes a respeito da enzima Ohr de *X. fastidiosa*, como sua preferência por substratos oxidantes e comprovações do modelo de ciclo catalítico previamente proposto por nosso grupo. Além disso, identificamos um composto que afeta o crescimento de *X. fastidiosa*, provavelmente por inibir a atividade peroxidásica de Ohr.

Primeiramente, demonstramos que Ohr é capaz de reduzir hidroperóxidos de ácido graxo com eficiência similar a que reduz *t*-BHP, embora essa análise seja dificultada pela baixa solubilidade dos primeiros em soluções aquosas. Ainda, hidroperóxido de colesterol e de fosfatidilcolina possivelmente não representam substratos fisiológico de Ohr, apesar de este último conter em sua estrutura hidroperóxidos de ácido oléico e linoléico. Analisando em conjunto ensaios enzimáticos e bioquímicos (como inativação por superoxidação de Ohr), possivelmente Ohr atua sobre hidroperóxidos dos ácidos graxos presentes na membrana após a atuação de uma lipase. Além disso, resíduos hidrofóbicos presentes no sítio ativo de Ohr apresentam importância na interação com substratos.

Elucidamos a estrutura de Ohr de *X. fastidiosa* no estado oxidado (ponte dissulfeto entre as cisteínas), a qual nos permitiu reforçar a proposição das mudanças conformacionais (deslocamento de uma alça contendo Arg conservada da cisteína reativa) durante o ciclo catalítico de Ohr.

Por último, mostramos que Ohr é capaz de conferir proteção contra hidroperóxidos orgânicos em sistema heterólogo, revertendo o fenótipo de uma célula mutante para o gene *ahpC*. E ainda, obtivemos um composto capaz de inibir a atividade peroxidásica de Ohr *in vitro*, e que apresenta indícios de ser capaz de afetar o crescimento de *X. fastidiosa* sob condições de estresse oxidativo. Este efeito deletério da inibição de Ohr provavelmente reflete a importância da enzima para a célula bacteriana em situações de estresse.

6. PERSPECTIVAS.

Como perspectivas imediatas geradas pelos resultados deste trabalho, pretendemos:

- Realizar ensaios da atividade peroxidásica de Ohr frente à hidroperóxidos derivados de outros tipos de ácido graxo (como ácido araquidônico, envolvido em resposta inflamatória) e outros tipos de fosfolipídios. Além de testar a possibilidade de Ohr reduzir hidroperóxidos presentes em lipossomos (tentativa de reproduzir situação *in vivo*). Neste último, é necessário a criação de um protocolo que permita observar a atividade de Ohr, já que a presença de lipossomos causa turbidez e, portanto dificulta a análise por absorbância.
- Determinar os parâmetros das proteínas mutantes de Ohr por análises enzimáticas de bi-substrato, na presença de hidroperóxidos de ácido graxo (substrato oxidante) e enzimas lipoiladas (substrato redutor), tentando entender em qual etapa do ciclo catalítico (oxidação/redução) esses aminoácidos são importantes.
- Realização de estudos de *docking* utilizando a estrutura elucidada neste trabalho e moléculas de dihidrolipoamida/ácido dihidrolipoico, na tentativa de demonstrar a interação entre elas e os possíveis resíduos envolvidos.
- Insistir na criação de uma linhagem Δohr de *X. fastidiosa*, utilizando meios de cultura mais próximos da situação *in vivo*, ou por mudança da metodologia (dupla recombinação).
- Realizar novos testes com a droga inibidora de Ohr, utilizando passagens mais recentes da linhagem J1 a J12 e a linhagem patogênica (9a5c). Além disso, realizar testes de inibição no sistema heterólogo criado (*E. coli* $\Delta ahpC$ superexpressando Ohr de *X. fastidiosa*) e realizar análises de *docking* do inibidor nas estruturas de Ohr (superoxidada e oxidada). Entender em qual etapa (oxidação/redução) ocorre a inibição e como esta se realiza.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovitch, R. B. & Martin, G. B. (2004) "Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses" *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**: 356-64.
- Ambrosio, A. L.; Nonato, M. C.; de Araujo, H. S.; Arni, R.; Ward, R. J.; Ownby, C. L.; de Souza, D. H., Garrat, R. C. (2005) "A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change" *J. Biol. Chem.* **280**: 7326–35.
- Atichartpongkul, S.; Fuangthong, M.; Vattanaviboon, P.; Mongkolsuk S. (2010) "Analyses of the regulatory mechanism and physiological roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a transcription regulator and a sensor of organic hydroperoxides" *J. Bacteriol.* **192**(8): 2093-101.
- Atichartpongkul, S.; Loprasert, S.; Vattanaviboon, P.; Whangsuk, W.; Helmann, J. D.; Mongkolsuk, S. (2001) "Bacterial OHR and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression" *Microbiology*, **147**(7): 1775-82.
- Atichartpongkul, S.; Loprasert, S.; Vattanaviboon, P.; Whangsuk, W.; Helmann, J. D.; Mongkolsuk, S. (2001) "Bacterial OHR and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression" *Microbiology*, **147**(7): 1775-82.
- Avery, A. M. & Avery, S. V. (2001) "*Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases" *J. Biol. Chem.*, **276**(36): 33730-35.
- Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K. A.; Tomita, M.; Wanner, B. L.; Mori, H. (2006) "Construction of *Escherichia coli* K-12 in frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection" *Mol. Syst. Biol.*, **2**: 2006.0008.
- Barrett, M. L.; Harris, R. L.; Antonyuk, S.; Hough, M. A.; Ellis, M. J.; Sawers, G.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S. (2004) "Insights into redox partner interactions and substrate binding in nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans*: crystal structures of the Trp138His and His313Gln mutants" *Biochemistry*, **51**: 16311–19.
- Benesch, R. E. & Benesch, R. (1955) "The acid strength of the –SH group in cysteine and related compounds" *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 5877-81.
- Blessing, R. H. (1995) "An empirical correction for absorption anisotropy" *Acta Crystallogr. A.*, **51**: 33-38.
- Bolwell, G. P.; Wojtaszek, P. (1997) "Mechanisms for the generation of reactive species in plant defense – a broad perspective" *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **51**: 347-66.

Brlansky, R. H.; Timmer, I. W.; French, W. J.; McCoy, R. E. (1983) "Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem limited bacteria" *Phytopathology*, **73**: 530–35.

Bryk, R.; Lima, C. D.; Erdjument-Bromage H.; Tempst P.; Nathan, C. (2002) "Metabolic enzymes of *Mycobacteria* linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein" *Science*, **295**: 1073-77.

Buchko, G. W.; Hewitt, S. N.; Napuli, A. J.; van Voorhis, W. C.; Myler, P. J. (2009) "Backbone and side chain ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR assignments for the organic hydroperoxide resistance protein (Ohr) for *Burkholderia pseudomallei*" *Biomol. NMR Assign.*, **3**(2): 163-66.

Casey, R.; Hughes, R. K. (2004) "Recombinant lipoxygenases and oxylipin metabolism in relation to food quality" *Food Biotechnology* **18**: 133-170.

Chae, H. Z.; Kim, I. H.; Kim, K. & Rhee, S. G. (1993) "Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.*, **268**: 16815-21.

Chae, H. Z.; Robison, K.; Poole, L. B.; Church, G.; Storz, G. & Rhee, S. G. (1994b) "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkylhydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7017-21.

Chae, H.Z.; Chung, S.J. e Rhee, S.G. (1994) "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast" *J. Biol. Chem.*, **269**: 27670-78.

Chatterjee, S.; Almeida, R. P.; Lindow, S. (2008) "Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*" *Annu. Rev. Phytopathol.*, **46**: 243-71.

Chatterjee, S.; Killiny, N.; Almeida, R. P.; Lindow, S.E. (2010) "Role of cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* biofilm formation, plant virulence, and insect transmission" *Mol. Plant Microbe Interact.*, **23**(10): 1356-63.

Chen, W. P.; & Kuo, T. T. (1993) "A simple and rapid method for the prepreparation of gram-negative bacterial genomic DNA" *Nucleic Acids Res.*, **21**(9): 2260.

Ciarulo, M. B.; Santos, D. S.; Rodrigues, A. C.; de Oliveira, M.V.; Rodrigues, T.; de Oliveira R. C.; Nunes, L. R. (2010) "Transcriptome analysis of the phytobacterium *Xylella fastidiosa* growing under xylem-based chemical conditions" *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**: 781365.

Conter, A.; Gangneux, C.; Suzanne, M.; Gutierrez, C. (2001) "Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products" *Res. Microbiol.*, **152**(1): 17-26.

Cooper, D. R.; Surendranath, Y.; Devedjiev, Y.; Bielnicki, J.; Derewenda, Z. S. (2007) "Structure of the *Bacillus subtilis* OhrB hydroperoxide-resistance protein in a fully oxidized state" *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **63**(12): 1269-73.

Crichton, P. G.; Affourtit, C.; Moore, A. L. (2007) "Identification of a mitochondrial alcohol dehydrogenase in *Schizosaccharomyces pombe*: new insights into energy metabolism" *Biochem. J.*, **401**(2): 459-64.

Croft, K.; Juttner F.; Slusarenko, (1993) "Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*" *Plant Physiol.*, **101**: 13–24.

Cursino, L., Galvani, C. D., Athinuwat, D.; Zaini, P. A.; Li, Y., De La Fuente, L., Hoch, H. C.; Burr, T. J.; Mowery, P. (2011) "Identification of na Operon, Pil-Chp, that controls twitching mobility and virulence in *Xylella fastidiosa*" *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**(10): 1198-206.

Cussiol, J. R. R.; Alegria, T. G. P., Szweda, L. I., Netto, L. E. S. (2010) "Ohr (Organic Hydroperoxide Resistance Protein) Possesses a Previously Undescribed Activity, Lipoyl-dependent Peroxidase" *J. Biol. Chem.*, **285**: 21943–50.

Cussiol, J. R. R.; Alves, S. V.; Oliveira, M. A.; Netto, L. E. S. (2003) "Organic Hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase" *J. Biol. Chem.*, **278**: 11570-78.

da Silva Neto, J. F.; Koide, T.; Gomes, S. L.; Marques, M. V. (2002) "Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*" *FEMS Microbiol. Letters*, **210**: 105-10.

da Silva Neto, J. F.; Koide, T.; Gomes, S. L.; Marques, M. V. (2007) "The single extracytoplasmatic-function sigma factor of *Xilella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism" *J. Bacteriology*, **189**: 551-560.

de Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Goldman, G. H.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; de Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. (2003) "Analisys of gene expression in two growth satates of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity" *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16**: 867-75.

Delker, S. L.; West, A. P.; Jr. McDermott, L.; Kennedy, M. W. & Bjorkman, P. J. (2004) "Crystallographic studies of ligand binding by Zn-alpha2-glycoprotein" *J. Struct. Biol.*, **205**: 213.

Discola, K. F.; Oliveira, M. A.; Cussiol, J. R. R.; Monteiro, G.; Bárcena, J. A.; Porras, P.; Padilla, A.; Guimarães, B. G. & Netto, L. E. S. (2009) "Structural aspects of the distinct biochemical properties of Glutaredoxin 1 and Glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Mol. Biol.* **385**: 889-901.

Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) "Coot: model-building tools for molecular graphics" *Acta Crystallog. sect. D*, **60**, 2126-32.

Feil, H.; Feil, W. S.; Lindow, S. E. (2007) "Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape" *Phytopathology*, **97**(3): 318-24.

Feng, B. Y.; Shelat, A.; Doman, T. N.; Guy, R. K.; Shoichet, B. K. (2005) "High-throughput assays for promiscuous inhibitors" *Nat. Chem. Biol.*, **1**(3): 146-48.

Fogaça, A. C.; Zaini, P. A.; Wulff, N.A.; da Silva, P.I.; Fázio, M.A.; Miranda, A.; Daffre, S.; da Silva, A.M. (2010) "Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*" **306**(2): 152-9.

Fontenelle, C.; Bianco, C.; Arrieta, M.; Dufour, V.; Trautwetter, A. (2011) "Resistance to organic hydroperoxides requires *ohr* and *ohrR* genes in *Sinorhizobium meliloti*" *BMC Microbiol.*, **11**: 100.

Fuangthong, M.; Atichartpongkul, S.; Mongkolsuk, S.; Helmann, J. D. (2001) "OhrR is a Repressor of *ohrA*, a Key Organic Hydroperoxide Resistance Determinant in *Bacillus subtilis*" *J. Bacteriol.*, **183**(14): 4134-41.

Fundecitrus (2008). Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>. Site consultado em março de 2011.

Gaurivaud, P.; Sousa, L. C.; Virgilio, A. C.; Mariano, A. G.; Palma, R. R.; Monteiro, P. B. (2002) "Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain" *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 4658-65.

Gibbons, H. S.; Reynolds, C. M.; Guan, Z.; Raetz, C. R. (2008) "An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A" *Biochemistry*, **47**(9): 2814-25.

Girotti, AW. (2008) "Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide induced oxidative damage and effector action" *Free Radicals Biology & Medicine*, **44**: 956-68.

Gordia, S.; Gutierrez, C. (1996) "Growth-phase-dependent expression of the osmotically inducible gene *osmC* of *Escherichia coli* K-12" *Mol. Microbiol.*, **19**(4):729-36.

Gutierrez, C. & Devedjian, J.C. (1991) "Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K12" *J. Mol. Biol.*, **220**: 959-73.

Håkansson, A. P. & Smith, A. W. "Enzymatic characterization of dihydrolipoamide dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* harboring its own substrate" *J. Biol. Chem.*, **282**(40): 29521-30.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007) "Antioxidant defences: endogenous and diet derived", In: Halliwell; B.; Gutteridge; J. M. C. (Ed.), "Free Radicals in Biology and Medicine" Fourth edition, Oxford: Oxford University Press, p. 79-186.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007) "Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive species" In: Halliwell; B.; Gutteridge; J. M. C. (Ed.), "Free Radicals in Biology and Medicine" Fourth edition, Oxford: Oxford University Press, p. 1-29.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007) "The chemistry of free radicals and related 'reactive species'", In: Halliwell; B.; Gutteridge; J. M. C. (Ed.), "Free Radicals in Biology and Medicine" Fourth edition, Oxford: Oxford University Press, p. 30-78.

Hopkins, D. L.; Purcell, A. H. (2002) "*Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases" *Plant. Dis.*, **86**: 1056-66.

Ivanov, I.; Heydeck, D.; Hofheinz, K.; Roffeis, J.; O'Donnell, V. B.; Kuhn, H.; Walther, M. (2010) "Molecular enzymology of lipoxygenases" *Arch. Biochem. Biophys.* **503**(2): 161-74.

Jacob, C.; Holme, A. L.; Fry, F. H. (2004) "The sulfinic acid switches in proteins" *Org. Biomol. Chem.*, **2**: 1953-56.

Jacobson, F. S.; Morgan, R. W.; Christman, M. F. & Ames, B. N. (1989) "An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties" *J. Biol. Chem.*, **264**:1488-96.

Jenkins, C.; Samudrala, R.; Geary, S. J.; Djordjevic, S. P. (2008) "Structural and functional characterization of an organic hydroperoxide resistance protein from *Mycoplasma gallisepticum*" *Journal of Bacteriology*, **190**(6): 2206-16.

Kabuch, W. (1988) "Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector" *J. Appl. Cryst.* **21**: 916-924.

Kim, K.; Kim, I. H.; Lee, K. Y.; Rhee, S. G. e Stadtman, E. R. (1988) "The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-functions oxidation system" *J. Biol. Chem.*, **263**: 4704-11.

Klomsiri, C.; Panmanee, W.; Dharmsthiti, S.; Vattanaviboon, P. & Mongkolsuk, S. (2005) "Novel roles of ohrR-ohr in *Xanthomonas* sensing, metabolism and physiological adaptative response to lipid hydroperoxide" *J. Bacteriol.*, **187**: 3277-81.

Kruger, N. J. (1994) "The Bradford method for protein quantitation" *Methods Mol. Biol.*, **32**: 9-15.

Kuo, J. M.; Hwang, A.; Yeh, D. B.; Pan, M. H.; Tsai, M. L.; Pan, B. S. (2006) "lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9-position" *J. Agric. Food Chem.*, **54**(8): 3151-56.

Lamb, C.; Dixon R. A. (1997) "The oxidative burst in plant disease resistance" *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 251-75.

Lambais, M. R.; Goldman, M. H.; Camargo, L. E.; Goldman, G. H. (2000) "A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity" *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**: 459-62.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993) "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures" *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283-91.

Leslie, A.G.W. (1992) *Joint CCP4/ESF-BCB News. Protein Crystallogr.* **26**. Daresbury Laboratory, Warrington, UK.

Lesniak, J.; Barton, W. A. & Nikolov, D. B. (2002) "Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr" *EMBO J.*, **21**(24): 6649-59.

Lesniak, J.; Barton, W. A. & Nikolov, D. B. (2003) "Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC" *Protein Science*, **12**: 2838-43.

Maccarrone, M.; Melino, G.; Finazzi-agro, A. (2001) "Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death" *Cell Death and Differentiation*, **8**: 776-84.

Matsumoto A.; Young, G. M.; Igo M. M. (2009) "Chromosome-based genetic complementation system for *Xylella fastidiosa*" *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(6): 1679-87.

Matthews, B. W. (1968) "Solvent content of protein crystals" *J. Mol. Biol.* **33**: 491-97.

McCoy, A. J. (2007) "Solving structures of proteins complexes by molecular replacement with Phaser" *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**: 32-41.

Menashe, M.; Romero, G.; Biltonen, R. L.; Cichtenberg, D. (1986) "Hydrolysis of dipalmitoylphosphatidylcholine small unilamellar vesicles by porcine pancreatic phospholipase A2" *J. Biol. Chem.* **261**(12): 5328-33.

Meunier-Jamin, C.; Kapp, U.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. (2004) "The Structure of the Hydroperoxide Resistance Protein from *Deinococcus radiodurans*" *J. Biol. Chem.*, **279**: 25830-37.

Moini, H.; Packer, L. & Saris, N. E. (2002) "Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid" *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**: 84-90.

Mongkolsuk, S.; Praituan, W.; Loprasert, S.; Fuangthong, M. e Chamnongpol, S. (1998) "Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (OHR)

gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*” *J. Bact.*, **180**: 2636-2643.

Monteiro, P. B.; Teixeira, D. C.; Palma, R. R.; Garnier, M.; Bové, J. M.; Renaudin, J. (2001) “Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids” *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 2263-69.

Netto, L. E. S. (2001) “Oxidative stress response in sugarcane” *Rev. Bras. Genet.*, **24**: 93-102.

Netto, L. E. S.; Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G. & Stadtman, E. R. (1996) “Removal of hydrogen peroxide is involved with the antioxidant properties of Thiol Specific Antioxidant (TSA). TSA possesses thiol peroxidase activity” *J. Biol. Chem.*, **271**: 15315-21.

Netto, L. E.; de Oliveira, M. A.; Monteiro, G.; Demasi, A. P.; Cussiol, J. R.; Discola, K. F.; Demasi, M.; Silva, G. M.; Alves, S. V.; Faria, V. G. & Horta, B. B. (2006) “Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more” *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, **146**(1-2):180-93.

Oliveira, M. A.; Guimarães, B. G.; Cussiol, J. R. R.; Medrano, F. J.; Gozzo, F. C.; Netto, L. E. S. (2006) “Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*” *J. Mol. Biol.* **359**(2):433-45.

Osiro, D.; Muniz, J. R.; Coleta Filho, H. D.; de Souza, A. A.; Machado, M. A.; Garratt, R. C.; Coinago, L. A. (2004) “Fatty acid synthesis in *Xylella fastidiosa*: correlations between genomestudies, ¹³C NMR data, and molecular models” **323**(3): 987-95.

Pannu, N. J., Murshudow, G. N., Dodson E. J., Read, R. J. (1998) “Incorporation of prior phase information strengthens maximum-likelihood structure refinement” *Acta Crystallogr. D.* **54**: 1285-94.

Park, S. C.; Pham, B. P.; Van Duyet, L.; Jia, B.; Lee, S.; Yu R.; Han, S. W.; Yang, J. K.; Hahm, K. S.; Cheong, G. W. (2008) “Structural and functional characterization of osmotically inducible protein C (OsmC) from *Thermococcus kadakaraensis* KOD1”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1784**:783-88.

Poole, L. B. (1996) “Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cysteine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction” *Biochemistry*, **35**: 65-75.

Price, A. H. & Hendry, G. A. F. (1991) “Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals” *Plant, Cell and Environment*, **14**: 477-84.

Purcell, A. H.; Hopkins, D. L. (1996) “Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens”, *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 131–51.

Qin, X.; Hartung, J. S. (2001) "Construction of a shuttle vector and transformation of *Xylella fastidiosa* with plasmid DNA" *Curr. Microbiol.*, **43**: 158-62.

Read, R. J. (2001) "Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood" *Acta Crystallog. sect. D*, **57**: 1373-82.

Redak, R. A.; Purcell, A. H.; Lopes, J. R.; Blua, M. J.; Mizell, R. F. III; Andersen, P. C. (2004) "The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology" *Annu. Rev. Entomol.*, **49**: 243-70.

Rehse, P. H.; Ohshima, N.; Nodake, Y.; Tahirov, T. H. (2004) "Crystallographic Structure and Biochemical Analysis of the *Thermus thermophilus* Osmotically Inducible Protein C" *J. Mol. Biol.*, **338**: 959-68.

Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K. (2005) "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling" *Free Radic. Med.*, **38**: 1543-52.

Rhee, S. G.; Kang, S. W.; Netto, L. E. S.; Seo, M. S. & Stadtman, E. R. (1999) "A family of novel peroxidases, peroxiredoxins" *Biofactors*, **10**(2-3): 207-209.

Richter, C. (1987) "Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes" *Chem. Phys. Lipids*, **44**: 175-89.

Rince, A.; Giard, J. C.; Pichereau, V.; Flahaut, S. e Auffray, Y. (2001) "Identification and characterization of gsp65, an organic hydroperoxide resistance (OHR) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*" *J. Bacteriol.*, **183**(4):1482-88.

Robertson, D.; Davies, D. R.; Gerrish, C.; Jupe, S. C.; Bolwell, G. P. (1995) "Rapid changes in oxidative metabolism as a consequence of elicitor treatment of suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.)" *Plant Molecular Biology* **27**: 59 67.

Rosseti, V.; Garnier, M.; Bove, J. M.; Bereta, M. J. G.; Teixeira, A. R. R.; Quaggio, J. A.; Denegri, J. D. (1990) "Présence des bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. (Tittle translation: Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet-orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil)" *C. R. Acad. Sci. Paris série III*, **310**: 345-49.

Rottem, S.; Razin, S. "Membrane lipids of *Mycoplasma hominis*" *J. Bacteriol.* **113**(3): 565-71.

Santangelo, R. T.; Nouri-Sorkhabi, M. H.; Sorrell, T. C.; Cagney, M.; Chen, S. C.; Kuchel, P. W.; Wright, L. C. (1999) "Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state" *J. Med. Microbiol.*, **48**(8): 731-40.

Shea, R. J.; Mulks, M. H. (2002) "OHR, Encoding an organic hydroperoxide reductase, is an in vivo-induced gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae*" *Infect. Immun.*, **70**: 794-802.

Shi, X. Y.; Dumenyo, C. K.; Hernandez-Martinez, R.; Azad, H.; Cooksey, D. A. (2009) "Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *gacA*" *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(8): 2275-83.

Shin, D. H.; Choi, I. G.; Busso, D.; Jancarik, J.; Yokota, H.; Kim, R. & Kim, S. H. (2004) "Structure of OsmC from *Escherichia coli*: a salt-shock-induced protein". *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, **60**(5): 903-11.

Simpson, A. J. *et al.* (2000) "The genome Sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*" *Nature* **406**: 151-57.

Smolka, M. B.; Martins-de-Souza, D.; Winck, F. V.; Santoro, C. E.; Castellari, R. R.; Ferrari, F.; Brum, I. J.; Galembeck, E.; Della Coletta Filho, H.; Machado, M. A.; Marangoni, S. & Novello, J. C. (2003) "Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution" *Proteomics*, **3**: 224-37.

Storz, E.; Jacobson, F. S.; Tartaglia, L. A.; Morgan, R. W.; Silveira, L. A. & Ames, B. N. (1989) "An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*" *J. Bacteriol.*, **171**: 2049-55.

Suzuki, J.; Tsuchiya, M. & Packer, L. (1994) "Determination of structure-antioxidant activity relationships of dihydrolipoic acid" *Methods in Enzymol.*, **234**: 454-61.

Ta, P.; Buchmeier, N.; Newton, G. L.; Rawat, M.; Fahey, R. C. "Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in *Mycobacterium smegmatis* mutants" *Journal of Bacteriology*, **193**(8): 1981-90.

Tao, H.; Bausch, C.; Richmond, C.; Blattner, F. R.; & Conway, T. (1999) "Functional genomics: Expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media" *J. Bacteriol.*, **181**: 6425-40.

Tartaglia, L. A.; Storz, G.; Brodsky, M. H.; Lai, A. & Ames, B. N. (1990) "Alkyl hydroperoxide from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thiorredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases" *J. Biol. Chem.*, **265**: 10535-40.

Toppo, S.; Flohé, L.; Ursini, F.; Vanin, S.; Maiorino, M. (2009) "Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme." *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**(11): 1486-500.

Ursini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohé, R.; Aumann, K. D.; Roveri, A.; Schomburg, D. & Flohé, L. (1995) "Diversity of glutathione peroxidases" *Methods Enzymol.*, **252**: 38-53.

Vila, A.; Korytowski, W. & Girotti, A. W. (2000) "Dissemination of peroxidative stress via intermembrane transfer of lipid peroxides: model studies with cholesterol hydroperoxides" *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**: 208–18.

Weber, H.; Chételat, A.; Caldelari, D.; Farmer, E. E. (1999) "Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves" *Plant Cell*, **11**: 485-93.

Wood, Z. A.; Schröder, E.; Harris, J. R.; Poole, L. B. (2003) "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins" *Trends Biochem. Sci.*, **28**: 32-40.

ANEXO

Cussiol, J. R. R.; Alegria, T. G. P.; Szweda, L. I.; Netto, L. E. S. (2010) "Ohr (Organic Hydroperoxide Resistance Protein) Possesses a Previously Undescribed Activity, Lipoyl-dependent Peroxidase" *J. Biol. Chem.*, **285**: 21943–50.