Análise Molecular e Estrutural da Proteína Ligadora de Maltose (MalE) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Cristiane Santos de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

São Paulo 2009

Análise Molecular e Estrutural da Proteína Ligadora de Maltose (MalE) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Cristiane Santos de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Balan Fernandes

São Paulo

2009

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

reprodução não autorizada pelo autor

Souza, Cristiane Santos de.

Análise molecular e estrutural da proteína ligadora de maltose (MalE) de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* / Cristiane Santos de Souza. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular e estrutural de proteínas.

Versão do título para o inglês: Molecular and structural analysis of maltose binding protein (MalE) of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Descritores: 1. Transportadores do tipo ABC 2. *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* 3. Maltose 4. Cristalografia 5. Modelagem molecular 6. Espectroscopia I. Ferreira, Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB52/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Cristiane Santos de Souza.			
Título da Tese:	Análise molecular e estrutural da proteína ligadora de maltose (MaIE) de Xanthomonas.			
Orientador(a):	Luis Carlos de Souza Ferreira.			
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/////, considerou				

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cldade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438 e-mail: <u>ccp@icb.usp.br</u>

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 256/08, referente ao projeto intitulado: "Análise molecular e estrutural da proteína ligadora de maltose (MaIE) de Xanthomonas axonopodis pv citri" sob a responsabilidade de Cristiane Santos de Souza, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de maio de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEEA - ICB/USP

2 Nedto-

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À Andrea Balan Fernandes (A Chefa)

> "O tempo passa e rouba os dias e os anos As mudanças são muitas e freqüentes. Elas sempre acontecerão... Mas uma boa amizade dura a vida inteira." Lynne Gerard

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todos os dons recebidos, aqueles que conheço e os que desconheço também.

Aos meus pais, por seu amor e entrega incondicionais. Ao meu irmão Joel, um grande companheiro, amigo.

Aos meus familiares, principalmente tio Nilton, tia Nicinha. Os primos: Paulinho, Fernando, Badá, Valdeci, Ronaldo, Júlia, Karin e Luana (companheiros de baladinhas, sessões de filmes, boliche, viagens...). Agradeço especialmente à prima Eliane, pelos cuidados que ela dispensou e dispensa a mim e à minha família.

Ao meu padrinho Abilnael.

À amigona Tainá, companheira e cúmplice de todas as horas, momentos (bons e ruins).

Aos meus amigos: Armanda, Adriana Mendes, Adriana Cristina, Denise, Marcão, Maria Paula, Tatiana, Liliana, Regina Marques, Ronaldo Estevam, D. Carla, por serem sempre ótimas companhias neste período e sempre.

Ao professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, pelo apoio e confiança depositados.

À professora Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, por ter me acolhido no laboratório, me orientado na iniciação científica e me "encaminhado" para o SMolBNet.

Aos professores do Laboratório de Genética de Microrganismos, onde tudo começou: Dr.Sérgio Olavo Pinto da Costa, Dra.Ana Clara Schenberg, Dra.Elizabeth José Vicente, Dr. Gabriel Padilla. Agradeço pelo espaço cedido e pelo uso de todos os equipamentos que estavam disponíveis. Agradeço às técnicas: Kazui, Leninha e Norma. Aos amigos: Andréia Gouveia, Ronaldo e Diogo.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente as secretárias (Aninha, Naíde e Alice) pela ajuda na organização de documentos necessários para a realização da pós-graduação neste programa.

Aos colaboradores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, os quais ajudaram muito a viabilizar este projeto: Dr. João Alexandre Barbosa, Dr. Carlos Ramos. Dr. Javier Medrano, com quem tive muitas conversas proveitosas e me ajudou muito a expandir meu conceito de ciência. Dr. Avram Slovic, uma pessoa formidável, que me ajudou muito no final da tese. Aos técnicos: Fábio Scharbelle, Silvia, Andréia Meza, Celisa, Renata Rocha. À Andrea Balan, minha co-orientadora, chefa, amiga, confidente, cúmplice, irmã mais velha... Por tudo o que me ensinou durantes estes sete anos de convivência, trabalho. Anos que foram muito divertidos e proveitosos tanto do ponto de vista acadêmico quanto humano. Obrigado pela paciência (quando eu desanimava), carinho e dedicação!!!

Ao Pablito (Christian Suarez) pela amizade e ajuda nas clonagens dos transportadores ABC. À pupila Nadine, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do grupo SMolBNet (os brancaleones): Carolzinha (amiguita!!!), Fabiano (Fabianitcho) e Eduardo (Duduzinho). Obrigado pelo apoio, carinho e ajuda. Agradeço por me aturarem quanto estava muito chata, pentelha. Foi muito bom trabalhar com vocês durante esses anos, as noites viradas trabalhando no LNLS, as idas e vindas de Campinas com muito trabalho, mas com direito a intervalos para bater papo e tomar uma cervejinha.

Ao meu grande amigo e confidente Roberto, ou melhor, Robervaldo José Gumercindo.

Aos amigos e colegas do laboratório CEVAT2: Aline, Daniela, Bruna, Rafael, Loren, Renatinha (pupila querida!), Catarina, Alexandre, Juliana, Juliano, Priscila, Elisa, Milene, Sabrina, Mariana, Otto, Cariri, Vinícius, Jaime (oxente), Camila, Camila Calderon, Natalie, Milene, Wilson. Obrigada pela amizade, dicas de trabalho e momentos de descontração.

À Dr. Maria Elizabeth Sbrogio, por compartilhar sua experiência com todos do laboratório...

À Profa. Dra. Mariana Cabral de Oliveira, minha primeira orientadora, que me permitiu ter o primeiro contato com *Xanthomonas*.

Agradeço também a grande amiga Léia, pelos conselhos e momentos divertidos...

À Dr Dulce e Dr. Eliana, por me acompanharem e ajudarem durante esses anos.

À agência financiadora FAPESP, pelo auxílio financeiro na realização do trabalho.

A todos que de alguma forma (direta ou indireta) ajudaram a tornar este trabalho possível de ser realizado. Muito obrigada!!!

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos." Marie Curie

"Que estranha é a sina que cabe a nós, mortais! Cada um de nós está aqui para uma temporada, com que propósito não se sabe [...]. Os ideais que têm iluminado meu caminho, e repetidamente me têm renovado a coragem para enfrentar a vida com ânimo, são: a Bondade, a Beleza e a Verdade." Albert Einstein

RESUMO

SOUZA, C.S. Análise Molecular e Estrutural da Proteína Ligadora de Maltose (MalE) de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri.* 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

A captação de maltose em bactérias é feita por um sistema transportador do tipo ABC composto por uma proteína ligadora de substrato (MalE), duas proteínas transmembrana e uma ATPase. No presente trabalho descrevemos a clonagem, expressão e análise bioquímica e estrutural da proteína MalE da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis* pv citri (*Xac*) O gene *malE* de *Xac* foi clonado em vetor de expressão pET28a, a proteína recombinante foi expressa em *Escherichia coli* e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. Amostras da proteína solúvel foram analisadas quanto à estrutura secundária, interação com possíveis ligantes, estabilidade frente a diferentes condições físico-químicas. Ensaios de cristalização possibilitaram a obtenção de cristais em diferentes condições, um deles apresentou grupo espacial P6122, mas não foi possível resolver a estrutural para a proteína de *Xac* e foram feitas análises quanto à interação com trealose e maltose. Modelos estruturais dos componentes transmembrana (LacF e LacG) e ATPase (UgpC) do sistema transportador de maltose de *Xac* também foram gerados. Os resultados representam uma contribuição importante para o conhecimento sobre a fisiologia e sistemas de transporte de *Xac*.

Palavras – chave: Transportadores do tipo ABC. *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. Maltose. Cristalografia. Modelagem Molecular. Espectroscopia.

ABSTRACT

SOUZA, C. S.Molecular and Structural Analysis of the *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* Maltose Binding Protein (MalE). 2009. Doctor Tesis (Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Maltose uptake in bacteria is mediated by an ABC transporter comprising a substrate binding protein (MalE), two transmembrane proteins, and one ATPase. In the present study, we describe the cloning, expression and biochemical as well as structural analyses of the MalE protein of the phytopagen *Xanthomonas axonopodis* pv citri (*Xac*). The *malE* gene of *Xac* was cloned in the pET28a expression vector, the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* and, subsequently, purified by nickel affinity chromatography. Samples of soluble protein were analyzed regarding secondary structure, interaction with putative ligants and stability under different physico-chemical conditions. Crystallization trials were carried out under different conditions, one particular condition yielded crystal with a P6122space group, but the structure was not solved. Based on known ortholog structures, a structural model for *Xac* MalE was obtained allowing interaction with modeled threhalose and maltose. Structural models the transmembrane (LacF and LacG) and ATPase (UgpC) components were also obtained. The present results represent an important contribution to the knowledge of the physiology and transporter systems found in *Xac*.

Key words: ABC Transporter. *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. Maltose. Crystallography. Molecular Modelling. Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura da infecção da superfície abaxial das folhas de <i>Citrus paradisi</i> por <i>Xac</i> 19
Figura 2 – Lesões provocadas pelo cancro cítrico20
Figura 3 – Movimentação dos lóbulos na estrutura da proteína periplasmática ligadora de maltose em presença de ligante
Figura 4 – Estruturas cristalográficas de quatro importadores
Figura 5 – MalE de <i>E. coli</i> é mostrada na forma aberta (esquerda, código do PDB 10MP) e fechada (direita, código do PDB 1ANF)
Figura 6 – Representação esquemática do vetor pSmol2-1 construído após inserção do fragmento <i>malE</i> (1.321 pb) no vetor de expressão pET28a (5369 pb)50
Figura 7 - Expressão da proteína recombinante MalE de <i>Xac</i> em B_MBP152
Figura 8 - Cromatograma da purificação da proteína MalE por cromatografia de afinidade ao níquel a partir extratos solúveis obtidos após a indução das células B_MBP1 com IPTG53
Figura 9 - Cromatograma da purificação por gel filtração da proteína MalE54
Figura 10 – Espectros de Dicroísmo Circular da proteína MalE de <i>Xac</i> na ausência e presença de Maltose
Figura 11 – Efeito do pH no perfil de estrutura secundária da MalE em presença e ausência de maltose e trealose medidas por dicroísmo circular
Figura 12 – Estabilidade térmica da MalE de <i>Xac</i> na ausência e presença de maltose e trealose
Figura 13 – Transição de desenovelamento da proteína MalE de <i>Xac</i> (5 uM) na presença de 5 mM de maltose
Figura 14 – Espectro da emissão de fluorescência da proteína recombinante MalE de <i>Xac</i> sem maltose e com maltose
Figura 15 – Espectro de Fluorimetria da proteína MalE de <i>Xac</i> ao ser titulada com diferentes concentrações de maltose
Figura 16 – Efeito do pH medido por fluorescência intríseca MalE de <i>Xac</i> na presença e ausência de maltose e trealose

Figura 17 - Titulação calorimétrica isotérmica da proteína MalE de *Xac*. Os ensaios foram feitos em diferentes condições de concentração de proteína e titulação do ligante......64

Figura 18 - Cristais da proteína MalE de *Xac* em presença de maltose (200 μ M proteína: 400 μ M maltose) crescidos após o refinamento de diferentes condições obtidas anteriormente....67

Figura 19 – Padrão de difração do cristal da proteína MalE de *Xac* com resolução de 2.24 Å, obtido após seu crescimento em 0.1 M de Tris pH 8.0 e 3.5 M de formato de sódio......70

Figura 21 – Organização dos operons de maltose encontrados em microrganismos cujos ortólogos de MalE tiveram sua estrutura terciária resolvida......73

Figura 23 – Gráficos de Ramachandran para os modelos da MalE de *Xac* obtidos a partir das coordenadas estruturais das MBP......80

Figura 24 - Alinhamento estrutural de aminoácidos dos ortólogos de MBP com a estrutura modelo de MalE de *Xac* baseada nas coordenadas estruturais de *T. litoralis......*81

Figura 27 – Representação dos modelos da MalE na forma de superfície mostrando as posições dos resíduos de triptofanos......90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades dos sistemas transportadores segundo a classificação TC adaptada de Saier, 2000
Tabela 2 - Linhagens e vetores usados neste trabalho
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene malE de Xac40
Tabela 4 – Condições experimentais testadas para a produção da proteína MalE na forma solúvel pela linhagem recombinante B_MBP151
Tabela 5 - Dados espectroscópicos do dicroísmo circular e ensaios de fluorescência intrínsecada MalE de Xac em diferentes pH63
Tabela 6 – Condições em que a proteína MalE de <i>Xac</i> cristalizou66
Tabela 7 – Dados de coleta e processamento dos cristais da proteína MalE de Xac submetidos ao feixe de raios X
Tabela 8 - Estatísticas dos dados de coleta e do processamento do cristal da proteína MalE de <i>Xac</i> . Valores em parênteses correspondem ao dados observados na última camada de resolução 2.85 – 2.24 Å
Tabela 9 – Comparação dos ortólogos de LacF, MalF e UgpC de <i>Xac</i> presentes em bactérias fitopatogênicas e nos microrganismos cujas proteínas periplasmáticas ligadoras de maltose tiveram suas estruturas tri-dimensionais resolvidas
Tabela 10 – Identidade dos ortólogos da proteína MalE de Xacencontrados em diversosfitopatógenos e nos orólogos que obtiveram sua estrutura resolvida
Tabela 11 – Comparação entre os modelos da MalE de Xac obtidos e as estruturas dos ortólogos
Tabela 12– Resíduos envolvidos nas interações da MalE com maltose e trealose nos dois modelos construídos neste trabalho
Tabela 13 – Comparação dos resíduos que interagem com os ligantes na MalE de Xac e nos ortólogos analisados
Tabela 14 – Comparação estrutural dos modelos gerados para o operon <i>malElacFG</i> de <i>Xac</i> com a estrutura do transportador de maltose de <i>E. coli</i> resolvida por Oldham e colaboradores (2008), (código do PDB 2R6G)94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å - Angstron

ABC - ATP-Binding Cassette

BLAST P - Basic Local Alignment Search Tool

- CD Dicroísmo circular
- D.O. Densidade ótica
- DTT ditiotreitol
- GST Glutationa transferase
- IPTG Isopropyl â-D-thio-galactopyranoside

I/σ – Intensidade Média/Erro

K_d – Constante de dissociação

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

- MBP Maltose Binding Protein
- NCBI ⁻National Center for Biotechnology Information.
- PDB Protein Data Bank
- PEG Polietileno Glicol
- PEG MME Polietileno Glicol Etter Monometil
- PMSF Fluoreto fenilmetilsulfonil
- PVP polivinil-pirrolidona
- PTS fosfotransferase de açúcar fosfoenolpiruvato

RMSD - Root mean square deviation (desvio quadrado médio para os carbonos alfa)

SMOLBNET - Structural Molecular Biology Network

- T0 tempo zero (anterior à indução)
- T2 tempo 2 (pós indução)
- Tm temperatura de melting
- $[\theta]$ elipcidade residual molar

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Xanthomonas axonopodis pv citri e cancro cítrico	19
1.2 Genomas de Xac e outros fitopatógenos	20
1.3 Visão geral dos transportadores procarióticos	21
1.4 Transportadores do tipo ABC	25
1.5 Importadores ABC	26
1.6 Sistemas captadores dependentes de proteínas ligadoras	27
1.7 Estruturas dos importadores dependentes de proteínas ligadoras	28
1.8 Transportador ABC de maltose – maltodextrinas	
1.9 MalE ou MBP (Proteína ligadora de maltose/maltodextrinas)	de <i>E</i> .
coli	32
1.10 Proteínas ligadoras de maltose/maltotriose/trealose de org	ganismos
extremófilos	35
1.11 MalE de <i>Xac</i>	37
2 OBJETIVOS	
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Linhagens e vetores	
3.2 Meios de cultura, soluções e tampões	40
3.3 Isolamento de DNA genômico	40
3.4 Amplificação do gene <i>malE</i> de <i>Xac</i> por PCR	40
3. 5 Clonagem do fragmento obtido na reação de PCR no vetor pGEM T-Easy	41
3.6 Transformação de bactérias	41
3.7 Indução da expressão do gene malE em células de E. coli BL21	41
3.8 Otimização da extração da fração solúvel da proteína MalE expressa en	n <i>E. coli</i>
BL21 DE3	42
3.9 Quantificação das proteínas	42
3.10 Purificação da proteína de fusão utilizando a cromatografia líquida de perf	ormance
rápida	43
3.10.1. Cromatografia de afinidade a metal	43
3.10.2. Cromatografia de troca iônica	43
3. 10.3 Cromatografia por gel filtração	43

SUMÁRIO

3.11. Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com	SDS (SDS-
PAGE)	43
3.12 Concentração das amostras de MalE obtidas na purificação	
3.13 Dicroísmo circular	44
3.14 Fluorimetria	45
3.15 Titulação calorimétrica isotérmica	45
3.16 Análise de desnaturação térmica (Thermal shift) da MalE	45
3.17 Preparação de cristais	46
3.18 Irradiação e difração dos cristais	47
3.19 Substituição molecular	47
3.20 Produção de anticorpos anti-MalE em camundongos	
3.21 Detecção da proteína MalE em ensaios de imunoblot com a policionais	inticorpos
3.22 Busca por ortólogos com estrutura resolvida e comparação com a	MalE de
Xac	48
3.23 Construção do modelo estrutural da proteína MalE de Xac e das pro	oteínas de
membrana LacF e LacG	48
3.24 Alinhamento estrutural e identificação do bolsão do ligante	49
4 RESULTADOS	50
4.1 – Clonagem do gene <i>malE</i> no vetor de expressão pET28a	
4.2 Análise de Expressão e Solubilidade da Proteína MalE de Xac expressa em	células de
E. coli BL21(DE3) transformadas com o vetor pSmol2-1 (B_MBP1)	51
4.3 Purificação da Proteína Recombinante MalE de Xac	52
4.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade	52
4.3.2 Purificação por Gel Filtração	53
4.4 Dicroísmo Circular	55
4.4.1 Análise da MalE de Xac por dicroísmo circular	55
4.4.2 Dicroísmo circular da MalE de Xac variando-se o pH e pre	sença de
ligantes	55
4.4.3 Estabilidade Térmica da Proteína MalE na presença de	diferentes
açúcares	56
4.5 Ensaios de deslocamento térmico ("Thermal shift") da MalE em pro	esença de
açúcares	57
4.6 Fluorescência intrínseca dos triptofanos	59

4.6.1 MalE em presença de Maltose	
4.6.2 Fluorescência da MalE de <i>Xac</i> titulando-se maltose	59
4.6.3 Estabilidade da MalE na presença e ausência de maltose e trealose e	em diferentes
pHs	60
4.7 Calorimetria	63
4.8 Cristalização da MalE, coleta e processamento dos dados	65
4.9 Análises in silico da MalE e do transportador malElacFG por	métodos de
Bioinformática	72
4.9.1 Organização do operon <i>mal</i> em <i>Xac</i>	72
4.9.2 Alinhamentos da sequência de aminoácido da MalE de Xac com ortó	logos e busca
por domínios estruturais e funcionais conservados	75
4.9.3 Construção de um modelo da estrutura tri-dimensional o	la MalE de
Xac	77
4.9.4 Modelagem molecular das interações de MalE de <i>Xac</i> con maltose	m trealose e
4.9.5 Determinação da posição dos resíduos de triptofano em diferente	es modelos da
MalE	
4.9.6 Análise dos domínios trans-membrana do operon mal (LacF e LacG).	
4.10 Detecção da proteína MalE em extratos protéicos totais de Xan	thomonas por
"Western blot"	96
5 DISCUSSÃO	98
6 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Xanthomonas axonopodis pv citri e cancro cítrico

O gênero *Xanthomonas* pertence à subdivisão gama das proteobactérias que pertencem à mesma família, as *Xanthomonadaceae*. Todas as espécies conhecidas pertencentes a este gênero são fitopatógenas (Moreira et al., 2005).

Infecções induzidas por *Xanthomonas* spp. têm sido descritas para 124 monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas. Esta doença geralmente induz a necrose do tecido, doenças vasculares ou parenquimais, e danos nas folhas e frutos (Long e Staskawicz, 1993). As células de *Xanthomonas* apresentam um formato de bastão, com um diâmetro de $0,2 - 0,6 \mu m$ e um comprimento de $0,8 - 2,9 \mu m$ (Figura 1A e 1B), com um cromossomo com mais de 5 Mbp que pode estar associado com plasmídeos (Graham, et al., 2004)..



Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura da infecção da superfície abaxial das folhas de *Citrus paradisi* por *Xac*. A - Bactérias presentes na abertura de um estômato. B - Bactéria presente na matriz de polissacarídeo extracelular encontrada na superfície da lesão (Graham et al., 2004).

Xanthomonas axonopodis pv. *citri (Xac)* é o agente causador do cancro cítrico, uma doença caracterizada pela formação do cancro associado a lesões nos galhos e em folhas que ficam encharcadas, geralmente rodeadas por halos cloróticos (Figura 2A e B) (Gottwald e Graham, 2000). As lesões necróticas penetram a superfície dos frutos levando à abscisão deste e ao declínio da planta, causando grandes perdas na produção de citros e conseqüente perda econômica (Gottwald e Graham, 2000). Esta bactéria pode sobreviver e multiplicar-se fora do hospedeiro de forma epífita, mas ao entrar em contato com estômatos, hidatódios, poros de água ou lesões no tecido das plantas, podem colonizar o mesófilo produzindo os sintomas clássicos da doença em hospedeiros compatíveis (Figura 2C e D). Altamente contagiosa, ela é

resistente e consegue sobreviver em vários ambientes por vários meses. Em folhas, ramos e frutos com sintomas, a sobrevivência da bactéria pode durar vários anos. A disseminação e transmissão geralmente ocorrem através de exsudatos derivados das lesões através do vento e da chuva (Moreira et al., 2005). A dispersão do cancro cítrico em longas distâncias ocorre, principalmente, pelo movimento de material da planta contaminada e pela atividade humana, através da presença da bactéria em roupas e ferramentas (Golmohammadi et al., 2007). O controle do cancro cítrico tem sido feito principalmente pela identificação e erradicação das árvores infectadas (Graham et al., 2004).



Figura 2 – Lesões provocadas pelo cancro cítrico. A- Folhas com lesões circundadas por anel amarelado; B – detalhes das lesões corticosas nas duas faces da folha; C – lesões salientes nos ramos; D– lesões nos frutos. (http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html).

1.2 Genomas de Xac e outros fitopatógenos

Quatro espécies do gênero *Xanthomonas* tiveram seus genomas recentemente seqüenciados: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria, Xcv,* (Thieme et al., 2005); *Xanthomonas campestris* pv. *campestris, Xcc,* (ATCC33913) (Da Silva et al., 2002), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (306), *Xac* (Da Silva et al., 2002) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae,* (*Xom,* MAFF311018 e *Xoo,* KACC10331) (Lee et al., 2005). disponibilizados permitiram verificar a presença de uma série de genes envolvidos nos mecanismos de infecção e patogenicidade destas bactérias.

Xac (linhagem 306) possui um cromossomo circular com 5.175.554 pb e dois plasmídeos: pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb). A outra espécie de grande importância econômica para o país, Xcc, sendo responsável pela podridão negra que afeta crussíferas, como Arabidopsis e Brassica, possui um genoma com tamanho de 5.076.187 pb e não contém plasmídeos. A comparação dos genomas de ambas as espécies revelou diferenças significativas como a presença de vários genes exclusivos a cada uma delas. Em Xac, de 800 genes (18,5% do genoma) que não estão presentes em Xcc, somente 316 tem função definida. Já em Xcc, dos 15,4% de genes exclusivos desta bactéria (646 genes), apenas um terço apresentam função definida (da Silva et al., 2002). A diferença no genoma de ambas as bactérias é refletida nos mecanismos de infecção e patogênese distintos. A comparação entre os dois genomas mostrou que também nestes fitopatógenos, genes correspondentes aos transportadores do tipo ABC representam cerca de 1,5% a 1,7% do genoma, respectivamente para Xac e Xcc (Oshiro et al., 2006). Transportadores do tipo ABC são responsáveis pela captação ou efluxo de várias substâncias de variados tamanhos, desde íons a açúcares e peptídeos. Embora existam estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na patogenicidade desta bactéria e transportadores ABC serem associados a alguns mecanismos de infecção e patogênese (Mehta e Rosato, 2001; Romer, 2007; Buttner e Bonas, 2002), poucos trabalhos têm usado estas proteínas como alvo de estudo. Em bactérias, esses transportadores estão relacionados à captação de nutrientes (Webb et al., 2007), reciclagem de cerca de 50% dos muropeptídeos da parede celular (Park et al., 1998), respostas de quorumsensing (Rudner et al., 1991; Alloing et al., 1996, 1998), sensibilidade a peptídeos tóxicos e antibióticos aminoglicosídeos (Acosta et al., 2000; Kashiwagi et al., 1998; Lubelski, 2007), patogênese e infecção (Dassa e Bougie, 2001; Higgins, 1992).

1.3 Visão geral dos transportadores procarióticos

Transportadores ABC são um dos muito diferentes tipos de transportadores presentes em organismos dos reinos Arquea, Bactérias e Eucariotos. Transportadores têm uma importância crítica para todos os organismos vivos, pois medeiam a entrada de nutrientes essenciais no citoplasma da célula, o que permite que esta metabolize fontes externas de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo; a presença de transportadores também possibilita a regulação da concentração de metabólitos dentro da célula através da excreção de produtos metabólicos, como também são responsáveis pela extrusão de substâncias tóxicas para a célula. Podemos distinguir entre os diversos tipos de transportadores os canais, transportadores primários e transportadores secundários, de acordo com a fonte de energia utilizada (Saier *et al.*, 2000).

Dentre as principais categorias de transportadores classificados no sistema TC (Transporter Classification - http://www.tcdb.org/) estão:

 Canais e poros que catalisam a difusão facilitada de solutos com uma concentração abaixo do gradiente, um processo independente de energia. Na membrana externa das bactérias gram-negativas, canais chamados de porinas permitem a difusão através de um poro aquoso.

2 Transportadores dirigidos por potencial eletroquímico (carregadores): são aqueles que utilizam a energia acumulada em gradientes de íons para efetuar o transporte, eles podem transportar uma única substância (uniporte); duas substâncias em direções opostas (antiporte); duas ou mais substâncias na mesma direção (simporte).

3 Transportadores ativos primários: utilizam fonte de energia primária para transportar substâncias contra um gradiente de concentração;

4 Translocadores: esta categoria inclui o sistema transportador de fosfotransferase de açúcar fosfoenolpiruvato (PTS), que catalisa a captação de açúcares. A energia necessária para o transporte neste sistema provém de uma série de reações de transferência por meio de fosforilação. Este sistema está presente somente em procariotos;

Alguns exemplos de famílias e substratos destes tipos de transportadores estão presentes na tabela 1 (Saier, 2000).

	Categoria de Transportador	Família	Substrato	Exemplos
		VIC	Na ⁺ ,Ca ²⁺ , K ⁺ , múltiplos cátions	Canais sensíveis a voltagem, canais de voltagem de Na ⁺ , canais de voltagem de Ca ²⁺ , canais sensíveis a voltagem
	1 -Canal/ Poro - canal do tipo α formado por	MscL	Proteínas, íons (ligeiramente seletivo para cátions)	Grandes canais mecanosensitivos à íons de E. coli
	proteínas e peptídeos	MscS	Proteínas, íons (ligeiramente seletivo para cátions)	Canal mecanosensitivo à íons de pequena condutância (KefA) de <i>E. coli</i>
Canais de difusão facilitada	Porinas de membrana externa (estrutura β)	Várias proteínas de membrana externa e proteínas exportadoras		OmpF de <i>E. coli</i> , VDAC DE <i>Bos taurus</i> , Aida de <i>E.coli</i>
		Toxina RTX	Íons, pequenas moléculas	Hemolisina A (HlyA) de E. coli
	Toxinas	Bcl-2	Proteínas (citocromo c)	Regulador de Apoptose [Bcl-X(L)] de <i>Homo sapiens</i>
		Colicina V	Íons, pequenas moléculas	Colicina V de E. coli
		MFS	Várias pequenas moléculas	Lactose permease (LacY) de <i>E.coli</i> , permease de efluxo de drogas (EmrD) de <i>E</i> .
Transportadores dirigidos por potencial eletroquímico (carregadores):	Carregadores do tipo facilitadores	GPH SulP	Açúcares Sulfato	coli Permease de Melibiose de <i>E.coli</i> (MelB) Permease de Sulfato (SulP)de <i>Homo</i> sapiens
(curregauvres).	Energizadores dirigido por gradiente de íons	TonB	H ⁺ ? Direciona captação de soluto através da membrana externa bacteriana	Proteína de membrana externa TonB – ExbBD de <i>E. coli</i>

Tabela 1 – Propriedades dos sistemas transportadores segundo a classificação TC adaptada de Saier, 2000.

(Continua)

Tabela 1 - continuação

	Categoria de Transportadores	Famili	ia Substrato	Exemplo
	Transportadores mediados pela hidrólise de pirofosfato	ABC	Todos os tipos de moléculas orgânicas e inorgânicas, de simples íons até macromoléculas	Maltose permease (MalEFGK) de <i>E. coli</i> , proteína de multiresistência a drogas (MDR) de <i>Homo sapiens</i>
Transportadores		ArsAB	Arsenato,	Bomba de Efluxo de Arsenato ArsAB de <i>E. coli</i>
	Transportadores ativos por decarboxilação	Nat-DC	Na ⁺	Oxaloacetato decarboxilase de Salmonella typhimurium
	Transportadores ativos mediados por oxidoredução	PTH Na-NDH	H ⁺ (efluxo) Na ⁺ (efluxo)	PTH de <i>E. coli</i> Na ⁺ translocação NADH- quinol redutase de <i>Vibrio alginolyticus</i>
	Transportadores ativos mediados por luz	FAR	Efluxo de H ^{+,} captação de Cl ⁻	Bacteriorhodopisina de Halobacterium salinarium
Translocadores	Sistema de fosfotransferase	Glc	Glicose, N- glicosamina, α e β glicosídeos	Glicose IICB-IIA de E. coli
		Lac	Lactose, celobiose	Lactose IICB-IIA de Staphylococcus aureus

1.4 Transportadores do tipo ABC

Transportadores ABC (ATP-binding cassette) estão presentes em todos os organismos e contribuem para várias doenças humanas e para resistência à drogas nas células cancerosas. Em bactérias, eles catalisam a captação de nutrientes essenciais ou a retirada de, entre outros, substâncias tóxicas, contribuindo assim para resistência de micróbios patogênicos, drogas e antibióticos (Dawson et al., 2007, Fichant et al., 2006, Dassa e Bougie, 2001). Membros desta família também podem estar envolvidos em vários processos, como: transdução de sinal, secreção de proteínas, apresentação de antígenos, patogênese bacteriana, esporulação (Scheneider e Huncke, 1998).

Este tipo de sistema utiliza a energia vinda da hidrólise do ATP para realizar uma grande variedade de fenômenos essenciais, compreendendo não só o transporte transmembrana, mas também vários processos não relacionados a transporte, tais como tradução, elongação e reparo de DNA (Dassa e Bougie, 2001).

Sistemas ABC podem ser divididos entre três categorias funcionais principais. A primeira categoria são os importadores que medeiam a captação de nutrientes em procariotos. A natureza dos substratos que são transportados é muito ampla, incluindo mono e oligossacarídeos, íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, sideróforos, metais, cátions de poliaminas, opinas e vitaminas. A segunda categoria é a de exportadores que estão envolvidos na secreção de várias moléculas como peptídeos, lipídeos, drogas hidrofóbicas, polissacarídeos, e proteínas, incluindo toxinas como hemolisina. A terceira categoria do sistema tem alguns membros envolvidos na tradução de mRNA e no reparo de DNA (Davidson et al., 2008).

Comparando-se o número total de sistemas do tipo ABC contra o tamanho dos genomas procariotos, foi possível verificar uma relação linear com a observação que o número de todos os transportadores de todas as categorias (gradiente iônico, PTS, ABC e proteínas facilitadoras) é aproximadamente proporcional ao tamanho do genoma. Bactérias com genomas na faixa de 0.5 a 1,5 Mb tem cerca de 15 sistemas ABC. O genoma relativamente pequeno de *Thermotoga marítima* (1,86 Mb) possui um número acima do esperado para espécies com este tamanho de genoma, o que pode ser devido à amplificação de operons codificadores de sistemas do tipo ABC provavelmente envolvidos na captação de oligossacarídeos (11) e oligopeptídeos (12). *E. coli* (4.6 Mb) e *Bacillus subtilis* tem 78 e 84 sistemas ABC, respectivamente, estando proporcional com o tamanho do genoma. Já

Mycobacterium tuberculosis (genoma de 4.4 Mb) possui poucos sistemas (38), fenômeno provavelmente causado pelo estilo de vida intracelular desta bactéria. Quando analisamos bactérias encontradas no solo, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Mezorhizobium loti* (5.67 e 7.6 Mb, respectivamente), verificamos que há mais de 200 sistemas do tipo ABC. Essa presença em grande quantidade se deve provavelmente ao ambiente altamente competitivo no solo ou nos nódulos da planta. Eucariotos exibem um número menor de proteínas ABC em relação ao tamanho do genoma de procariotos, como demonstrado para *Sacharomyces cerevisiae*, um microrganismo de vida livre que compartilha o mesmo nicho ecológico de muitas bactérias (Davidson et al., 2008).

A organização básica de um transportador ABC consiste de dois domínios transmembrana que formam uma passagem para o substrato e dois domínios citoplasmáticos ligadores de nucleotídeo que ligam e hidrolisam ATP. Nos importadores do tipo ABC, os domínios transmembrana e citoplasmáticos são cadeias polipeptídicas separadas. Nos exportadores bacterianos, pelo contrário o domínio transmembrana é fusionado ao ligador de nucleotídeo, formando um homodímero ou heterodímero. O domínio ligador de nucleotídeos é caracterizado por dois motivos na sua estrutura primária (Walker A: GXXGXGKS/T, X pode variar, Walker B: hhhhD, sendo que h é um resíduo hidrofóbico. O motivo Walker B é imediatamente precedido por uma seqüência (motivo) altamente conservada (peptídeo LSGGQQ/R/KQR) que é único na família de transportadores ABC (seqüência assinatura) e tem sido utilizado como ferramenta na identificação de novos membros da família (Schneider e Hunke, 1998).

1.5 Importadores ABC

Importadores do tipo ABC necessitam de uma proteína extra citoplasmática ligadora de alta afinidade e são chamados de sistemas transportadores dependentes de proteínas ligadoras. As proteínas ligadoras são solúveis, localizam-se no espaço periplasmático no caso de bactérias gram-negativas. Nos organismos gram-positivos, que perderam o periplasma, elas estão ancoradas à face externa da membrana citoplasmática pelo N-terminal de grupos lipídicos (van der Heide e Poolman, 2002, Fichant et al., 2006). Em Arqueas, as proteínas ligadoras são lipoproteínas ou exibem uma seqüência sinal tipo III. Normalmente os genes que codificam um transportador são encontrados em um operon, mas também podemos encontrar em alguns organismos gram-positivos, uma única subunidade ABC sendo compartilhada por múltiplos transportadores (Davidson et al., 2008).

1.6 Sistemas captadores dependentes de proteínas ligadoras

Proteínas ligadoras interagem com seus substratos com alta afinidade, na faixa de 0,01 a 1 μ M. Esta ligação de alta afinidade é claramente responsável pela eficiência destes transportadores em uma baixa concentração de substrato, o que possibilita que as células concentrem seus nutrientes em até 10⁶ vezes quando os nutrientes estão presentes em baixíssimas concentrações (submicromolar) no meio externo (Dippel e Boos, 2005).

As proteínas ligadoras são monoméricas e tem sido caracterizadas por análises estruturais e cinéticas indicando que há somente um sítio ligador de substrato por proteína (Quiocho e Ledvina, 1996). As estruturas tridimensionais dos transportadores ModABC, BtuFCD e MalEFGK₂ resolvidas recentemente por cristalografia, revelaram que só uma proteína ligadora interage com o complexo de proteínas da membrana (Hollesnstein et al., 2007).

Estruturas de diversas proteínas periplasmáticas ligadoras resolvidas à alta resolução revelaram que todas compartilham muitas características formando um padrão de conformação similar, constituído por dois lobos ou domínios globulares, designados de lobos C e N desde que eles contenham o N ou C terminal da proteína. Estes lobos são conectados por uma ou mais cadeias polipeptídicas e o substrato liga-se entre eles, onde se localiza a fenda ligadora. Cada lobo é composto de uma conformação alfa-beta consistindo de folhas betas circundadas por alfa hélices e conectadas por alças. A cadeia polipeptídica é distribuída entre os dois domínios (Davidson et al., 2008).

Proteínas ligadoras são divididas em dois tipos: as do tipo I incluem as que ligam açúcares simples (arabinose e ribose) e aminoácidos de cadeia ramificada, as de tipo II incluem as ligadoras de maltose-maltodextrinas, fosfato e sulfato (Wilkinson e Verschueren, 2003). Quando não há presença de ligante na proteína, os domínios permanecem abertos, separados, o que permite o acesso do solvente à fenda ligadora. O ligante ocupa esta fenda e induz uma rotação substancial dos domínios, resultando no fechamento dos dois domínios (Figura 3). Mais recentemente, foi reconhecido um novo tipo de proteína ligadora incluindo as que ligam cátions divalentes (Mn^{2+} e Zn^{2+}) e ferro/sideróforos/vitamina B12. Nesta nova

classe, os dois lobos são formados por 5 folhas beta centrais circundadas por alfa-hélices e os domínios são conectados por uma única alfa-hélice. (Davidson et al., 2008).



Figura 3 – Movimentação dos lóbulos na estrutura da proteína periplasmática ligadora de maltose em presença de ligante. Estrutura da proteína ligadora de maltose na conformação aberta, sem açúcar (azul, código PDB: 1ANF) e fechada, ligada à maltose (rosa, código PDB: 1OMP). As conformações estão sobrepostas baseadas na posição dos carbonos α do lóbulo C (Davidson et al., 2008).

Diversas evidências demonstraram que as proteínas ligadoras do tipo I e tipo II permanecem abertas na ausência de ligante e fechadas na presença deste, levando a uma alteração conformacional induzida pelo ligante que é central para o mecanismo de translocação. Em adição a estruturas cristalográficas das proteínas no estado aberto e fechado, isto tem sido corroborado por uma variedade de testes feitos para monitorar a ligação ao substrato e mudanças conformacionais, incluindo o uso de fluorescência intrínseca (triptofanos), sondas de fluorescência extrínseca (de Lorimier *et al.*, 2002) e fluorescência de transferência de energia (Deuschle, 2005).

1.7 Estruturas dos importadores dependentes de proteínas ligadoras

Recentemente foram determinadas quatro estruturas de importadores bacterianos (Locker et al., 2002; Oldham et al., 2008; Pinkett et al., 2007, Kadaba et al., 2008). Todas essas estruturas fornecem informações detalhadas de como os domínios inter-membrana interagem com os domínios ABC. Além disto, elas revelam duas diferentes conformações do transportador, com as prováveis vias do substrato abertas em duas direções opostas (Figura 4).

Comparações estruturais mostraram como o substrato é alternadamente exposto nos lados opostos da membrana, o que é uma característica chave proposta para o transporte desta família (Davidson et al., 2008).

As estruturas de BtuCD (responsável pela captação de vitamina B12) e HI1470/1 (responsável pela captação de metais) parecem representar dois estados conformacionais diferentes dos transportadores ABC (Figura 4). A via de translocação predita em BtuCD é aberta no periplasma e fechada do lado citoplasmático da bicamada lipídica, enquanto que a via de translocação HII470/I está aberta somente para o citoplasma, correspondendo às conformações denominadas "outward-facing" e "inward-facing", respectivamente. As duas subunidades ligadoras de nucleotídeos de ambas as estruturas são diferentes, apesar de exibirem conformações abertas quando comparadas com uma estrutura fechada, como a da MalK ligada a ATP (Austermuhle et al., 2004).

A resolução da estrutura de um transportador de Arquea, o transportador de molibdato $MoDB_2C_2$ de *Archaeoglobus fulgidus* foi descrita recentemente e também apresenta características interessantes (Hollestein et al., 2007). Nesta estrutura a proteína ligadora, ModA, está acoplada ao sistema e as ATPases estão abertas, sem ATP, de forma que o transportador está com sua interface citoplasmática aberta. A proteína ligadora (ModA) está ligada ao transportador numa orientação que coloca a fenda ligadora sob a provável entrada do canal de translocação, e ambos os lobos da ModA fazem contato com as proteínas de membrana do transportador (Hollenstein et al., 2007) o que é consistente com o que já havia sido predito para a proteína ligadora de maltose (MalE) (Liu et al., 1999; Martineau et al., 1990).

A estrutura do transportador de maltose MalFGK₂ de *E. coli* foi determinada a uma resolução de 2.8 Å numa conformação intermediária que provavelmente representa um estado de transição para a hidrólise do ATP (Oldham et al., 2008). A substituição de um resíduo de glutamina pelo ácido glutâmico, importante resíduo catalítico (E159Q), levou a uma conformação do dímero de MalK fechada com o ATP ligado e com a proteína ligadora de maltose (MalE ou MBP) na conformação aberta fortemente ligada do lado oposto do transportador, formando parte de uma cavidade muito hidratada localizada numa região onde localizam-se as hélices transmembrana da MalF e MalG (Figura 4). A maltose permanece ligada num sítio de ligação na base desta cavidade (formada por MalF e MalG) (Davidson et al., 2008).

Comparações das estruturas $MalFGK_2$ e $ModAB_2C_2$ demonstraram que as conformações dos domínios transmembrana são muito similares (Oldham et al., 2008). Por

isso podemos assumir que estas duas estruturas são representativas para os dois estados conformacionais preditos para os transportadores ABC, nomeados de "inward-facing resting state" (Mod) e um "outward-facing transition mode" (Mal) (Davidson et al., 2008).



Figura 4 – Estruturas cristalográficas de quatro importadores. Em todos transportadores são evidenciadas quatro subunidades, as subunidades IM e as subunidades ligadoras de nucleotídeos. O transportador ModB₂C₂ foi co-cristalizado com ModA, a proteína ligadora periplasmática, numa conformação fechada, na qual podemos visualizar a presença do ligante, molibdato (vermelho). Abaixo das três estruturas temos o transportador MalFGK₂E, onde a proteína ligadora de maltose está ligada ao complexo MalFGK₂ (Davidson et al., 2008).

Outro importador com estrutura resolvida recentemente foi o de captação de metionina MetN1 de *E. coli*, este foi resolvido a uma resolução de 3,7Å. A arquitetura geral da MetN1 revelou duas cópias da ATPase MetN em complexo com as duas cópias dos domínios transmembrana MetI, com o transportador adotando uma conformação "inward-facing" exibindo domínios ligadores de nucleotídeo separados (Kadaba et al., 2008). A conformação de MetN e MetD é comum aos transportadores $ModB_2C_2$ e MalFGK₂, Um aspecto distinto da MetI é que o domínio trans-membrana contém número desigual de hélices trans-membrana, o N e C terminal estão em lados opostos da membrana (o periplasma e citoplasma, respectivamente), diferentemente dos demais caracterizados onde ambos os terminais são expostos ao citoplasma (Kadaba et al., 2008).

A ligação do substrato à proteína e não o substrato por si mesmo, que regula a atividade das ATPases do sistema. Em outras palavras, podemos dizer que a hidrólise do ATP não parece estar diretamente acoplada à entrada do soluto, mas particularmente à interação entre a proteína ligadora periplasmática e o transportador ABC. É bem sabido que o ligante induz mudanças conformacionais na proteína periplasmática, mas o mecanismo pelo qual a conformação ligada ao ligante da proteína periplasmática estimula a atividade ATPase do transportador ABC continua sendo uma incógnita. A resolução deste assunto nos ajudará a entender como a hidrólise do ATP é regulada nos transportadores ABC (Shilton, 2008).

1.8 Transportador ABC de maltose - maltodextrinas

Um dos transportadores ABC melhor caracterizados é o de captação de maltose de E. coli, que transporta maltooligossacarídeos contendo até sete unidades de glicose, podendo estar dispostos na forma linear ou cíclica. Este sistema é composto pela proteína periplasmática ligadora (MalE ou MBP), duas proteínas integrais de membrana, MalF e MalG e duas cópias da proteína citoplasmática que hidrolisa ATP, MalK. Estudos sobre o sistema ABC transportador de maltose tem sido realizados de diferentes formas para a compreensão da função deste sistema. A atividade do transporte tem sido reconstituída em vesículas de proteolipossomas, seguida de várias caracterizações bioquímicas. As estruturas cristalográficas dos estados aberto e fechado da MalE revelaram características comuns em proteínas ligadoras periplasmáticas. Sabe-se que a interação da MalE com os componentes da membrana MalF e MalFG estimula a hidrólise do ATP, o que assegura que o substrato seja transportado durante cada ciclo da hidrólise do ATP. Esta hipótese foi confirmada com a resolução da estrutura do transportador de maltose onde, verificou-se que a MalE está complexada com MalFGK₂ na presença de um estado análogo (Mg ADP-vanadato), sugerindo que a ligação da MalE induz uma mudança conformacional no transportador e ativa a hidrólise do ATP (Oldham et al., 2008).

Quando a maltose liga-se a MalE, ela interage primeiro com os grupos aromáticos do domínio C-terminal para formar uma conformação fechada estável. Em termos de um modelo geral para função de proteína ligadora, a MalE segue o "Venus Flytrap Model" onde a proteína adota um conformação fechada estável somente na presença do ligante (Shilton, 2008).

1.9 MalE ou MBP (Proteína ligadora de maltose/maltodextrinas) de E. coli

Proteínas ligadoras de maltose ou maltodextrinas (MalE ou MBP) correspondem à porção periplasmática do sistema ABC transportador de maltose, isto no caso de várias bactérias gram-negativas, este tipo de proteína tem como propriedade apresentar uma alta afinidade pelo ligante, ou seja, dissacarídeos como maltose, maltodextrinas longas e lineares ou ciclodextrinas, (Boos e Shuman, 1998).

Após a ligação, a proteína sofre uma mudança conformacional como um resultado direto dos movimentos dos lobos de torção e curvatura levando ao fechamento da fenda ligadora com o substrato em seu interior (Quiocho, 1997; Millet, 2003 e Telmer, 2003). Além da função de ligadora, a MalE possui função como quimio-receptor para taxia por maltose, através da formação de um complexo com a porção periplasmática da proteína Tar (Zhang, 1999).

A estrutura de MalE de *E. coli* (Eco_MBP) tem forma elipsóide com dimensões de 65 x 40 x 30 Å, sendo composta por dois domínios globulares separados por uma fenda. Cada domínio é composto de segmentos do C- terminal e N-terminal. Cada domínio tem um núcleo central de cinco folhas- β com duas α -hélices de um lado das folhas e três α -hélices do outro. MalE de Eco, é uma proteína α/β com 40% de aminoácido formando α -hélices, 20% folhas- β . O restante 40% é compreendido de alças. (Spurlino et al., 1991).

A ligação à maltose é feita principalmente por ligações de hidrogênico e contatos de van der Waals. A ligação da proteína à maltose resulta em 16 ligações de hidrogênio, sendo 11 feitas diretamente com 8 resíduos da MalE e 5 feitas por meio de moléculas de água (Spurlino et al., 1991).

Na presença do ligante, a região de dobradiça sofre uma movimentação que forma uma curvatura dos dois domínios que resulta no fechamento (ligada) ou abertura da fenda (não ligada) (Figura 5). Este movimento que tem sido observado em várias outras proteínas ligadoras, modulando o acesso ao ligante e da fenda ligadora, exerce um papel importante na sinalização do transporte ativo e quimiotaxia. Além disso, este movimento capacita que cada domínio da MalE participe de forma particular na ligação ao carboidrato – domínio I participando com as ligações de hidrogênio e domínio II com interação dos resíduos aromáticos (Quiocho et al., 1997) (Figura 5).



Figura 5 – MalE de *E. coli* é mostrada na forma aberta (esquerda, código do PDB 10MP) e fechada (direita, código do PDB 1ANF). Podemos notar a presença da fenda ligadora de substrato, a região de dobradiça, que confere movimento à proteína e a interface de balanceamento. Os dois domínios são submetidos a uma rotação para seqüestrar a maltose (quadrado amarelo) na fenda ligadora (Davidson et al., 2008).

As ligações de hidrogênio são altamente direcionais, exercendo uma função chave em conferir especificidade. Porém, uma característica crucial para o transporte ativo é que as ligações de hidrogênio são suficientemente estáveis para fornecer a afinidade ao ligante e suficientemente fracas para permitir uma dissociação rápida do ligante. Quase todos os contatos não polares são feitos com as cadeias laterais de resíduos aromáticos. A proximidade das cadeias laterais de resíduos aromáticos em ligações de carboidratos é uma característica recorrente de proteínas/enzimas que ligam estes compostos. MalE é notável entre as estruturas de proteínas/enzimas que interagem com carboidratos pela sua grande abundância de resíduos aromáticos, 16 dos quais estão localizados dentro ou próximos da fenda ligadora de maltose.

Cinco resíduos aromáticos da MalE são intimamente associados com a ligação à maltotriose ou maltotetraose e em quantidade menor com maltose (Quiocho et al., 1997).

A MalE de *E. coli* foi vastamente caracterizada através da obtenção de um grande número de mutantes. Essas mutações afetam a ligação à maltodextrinas, afetam o transporte de maltose e maltodextrinas *in vivo* e a quimiotaxia para maltose (Spurlino et al., 1991). O mutante MalE469 (T345I) não apresenta atividade de quimiotaxia, mas tem propriedades de fluorescência interessantes, mostrando um aumento na fluorescência na ligação à maltose (Kossman et al., 1988). O mutante WA158 também perde a quimiotaxia para maltose e não mostra deslocamento da fluorescência sobre a ligação a maltose (Matineau et al., 1990).

Outro resíduo importante é o Trp³⁴⁰, cuja substituição por uma alanina resulta numa proteína incapaz de ligar maltose ($K_d > 1 \text{ mM}$) (Martineau et al., 1990). Outras mutações envolvendo o Trp³⁴⁰ afetaram a ligação de maltose e dextrinas. Já a deleção das duas hélices terminais da MalE resultou numa proteína incapaz de transportar maltose (Duplay et al., 1987). Mutações no Trp⁶² (W62A) refletem um aumento do K_d em 10 vezes e substituições do resíduo Trp²³⁰ levam ao aumento do K_d em 5 vezes, o que condiz com a sua localização no sítio de ligação (Martineau et al., 1990). A substituição dos últimos 6 resíduos da hélice do C-terminal por 11 resíduos não afeta o transporte de maltose, mas torna a proteína incapaz de transportar dextrinas longas ou iniciar quimiotaxia (Spurlino et al., 1991).

Além de bem estudada, a MalE de *E. coli* é freqüentemente utilizada como uma cauda de afinidade para facilitar a purificação de proteínas recombinantes. É sabido que esta proteína possui a habilidade de aumentar a solubilidade das proteínas fusionadas uma vez que é altamente solúvel. MalEs estão presentes numa vasta variedade de microrganismos incluindo tanto bactérias mesófilas, termófilas e arqueas. Num estudo realizado por Fox e colaboradores foi comparada a habilidade das MalEs de seis microorganismos diversos (*E. coli, Pirococcus furiosus, Thermococcus litoralis, Vibrio cholerae, Thermotoga marítima* e *Yersinia pestis*) de promover a solubilidade de oito diferentes proteínas propensas a agregar em *E. coli*. Foi verificado que todas as MalEs são eficientes na produção de proteínas recombinantes solúveis, sendo mais efetivas do que a Glutationa transferase (GST). Os ortólogos de *P. furiosus* e *T. litoralis* são mais eficazes em promover a solubilidade do que a MalE de *E. coli* (Fox et al., 2003).

1.10 Proteínas ligadoras de maltose/maltotriose/trealose de organismos extremófilos

Muito do conhecimento existente sobre os transportadores ABC de bactérias tem sido acumulado dos estudos do sistema de transporte de maltose de alta afinidade em *E. coli*. Uma bateria de métodos de genética, bioquímica e biofísica tem produzido muita informação sobre a estrutura e propriedades de ligação da MalE de *E. coli* (EcoMBP) (Martineau et al., 1990; Spurlino et al., 1991, Sharff et al., 1992). Ainda não está claro, porém, até que grau estas observações podem ser aplicadas para outras proteínas ligadoras de maltose/maltodextrinas. Ou seja, quais são as similaridades e diferenças entre a MalE de *E. coli* e seus ortólogos?

Temos disponíveis poucas estruturas cristalográficas de proteínas ligadoras de maltose (MalE ou MBP): *Pyrococcus furiosus* (PfuMBP), (Evdokimov et al., 2001), *Thermococcus litoralis* (TMBP) (Diez et al., 2001), *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AcyMBP) (Schafer et al., 2004), *Thermus thermophilus* (TthMBP) (código do PDB 2GH9), *Themotoga maritima* (TmaMBP) (código do PDB 2GHA). Analisando-se a conformação da PfuMBP podemos notar que esta é muito similar ao ortólogo de *E. coli*, apesar do nível de identidade moderado entre as duas proteínas (27% de identidade, 46% de similaridade). EcoMBP liga maltose e maltotriose com afinidades similaridades. Já PfuMBP liga maltotriose muito mais fortemente do que maltose (Evdokimov et al., 2001).

PfuMBP é uma proteína excepcionalmente estável. Nenhuma mudança significativa é observada no espectro de dicroísmo circular (CD) em temperaturas até 85°C ou em 6M de hidrocloreto de guanidina (Evdokimov et al., 2001). Já a EcoMBP desenovela a aproximadamente 65°C ou em 1 M de hidrocloreto de guanidina (Ganesh et al., 1997). A grande estabilidade da PfuMBP é provavelmente devido a uma combinação de fatores que é compartilhado por proteínas de organismos que habitam regiões extremas, o que inclui uma abundância de pontes salinas, presença de resíduos de prolina em posições chave, tais como na posição 2 da folha- β e no começo e final de elementos estruturais, a presença de redes de resíduos de isoleucinas e outros resíduos hidrofóbicos no centro da proteína (Evdokimov et al., 2001).

O sistema de captação de *T. litoralis* aceita somente trealose e maltose (com um K_m de 20 nM) considerando uma K_d de 0.16 μ M para os dois substratos. Maltotriose é menos aceita na ligação e longas maltodextrinas não são aceitas. *In vivo*, esta proteína é ancorada à membrana, presumidamente via uma modificação lipídica da cisteína do N- terminal. A proteína cristalizada foi truncada no N-terminal, resultando numa proteína solúvel exibindo as mesmas características de uma proteína selvagem. A proteína demonstra características

relacionadas ao transporte, estando relacionada estruturalmente com EcoMBP, que consiste de dois lobos similares, cada um formado por folhas- β flanqueadas por α -hélices em ambos os lados. Os lobos são conectados por uma região de dobradiça consistindo de duas antiparalelas e uma α -hélice. Como na MalE, o substrato é ligado na fenda entre os lobos por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Porém, quando comparamos a MalE de *T. litoralis* com com a MalE de *E. coli*, notamos que há mais ligações de hidrogênio entre o substrato e a proteína do que contatos de van der Waals (Diez et al., 2001).

Proteínas ligadoras de transportadores ABC são bons candidatos para desenhos de biosensores altamente específicos para pequenas moléculas. O fato da proteína recombinante TMBP de *T. litoralis* ser altamente termoestável e ligar trealose e maltose com alta afinidade (K_d de 0,16 µM), torna esse proteína uma candidata para o desenvolvimento de um biosensor que teria uma alta estabilidade, com a propriedade de ligação a açúcares compostos por duas subunidades de glicose (maltose e trealose), esta proteína poderia resultar num biosensor fluorescente para pacientes diabéticos (Herman et al., 2006).

A proteína (AcyMBP) além de ser termoestável também é estável em pHs extremamente ácidos. O que provavelmente determina esta acido-estabilidade é a presença de certas características como a existência de um número menor de resíduos carregados expostos na superfície do que nas outras estruturas, compensado por um aumento no número de resíduos polares, de forma que os resíduos ácidos estão escondidos em seu interior. Também há uma maior exposição de pontes salinas em sua superfície (Schafer et al., 2001).

AcyMBP liga maltose com alta afinidade ($K_d 1.5 \mu M$) numa ampla faixa de pH (2.5 – 7.0) e em temperaturas de até 80°C. AcyMBP e MBPs hipertermófilas têm poucas e pequenas cavidades quando comparadas com as MBPs de organismos mesófilos, o que sugere que estas proteínas termoestáveis são geralmente mais compactas (Schafer et al., 2001).

Uma aplicação prática e vantajosa das MBPs termoestáveis (*Tli, Tma, Pfu*) pode ser a sua utilidade como agentes de solubilidade para proteínas que sofrem processo de reenovelamento. Por causa das MBPs termoestáveis serem bastante resistentes à altas concentrações de uréia e hidrocloreto de guanidina, as proteínas fusionadas podem ser desnaturadas e subseqüentemente re-enoveladas enquanto estiverem fusionadas à MalE enovelada. Desta maneira pode-se obter um grande aumento do rendimento de proteínas enoveladas obtidas pela técnica de reenovelamento, o rendimento seria maior do que se estas proteínas estivessem num estado não fusionado (Fox et al., 2003).

36
1.11 MalE de Xac

Estudos voltados para a definição da funcionalidade dos sistemas de transporte em bactérias que causam doenças em plantas podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o controle de infecção, como por exemplo, o uso de drogas tóxicas que possam ser transportadas para o interior da bactéria, ou ainda, por meio de manipulação genética do hospedeiro, de forma a torná-lo resistente aos fitopatógenos.

Foram encontrados diversos transportadores do tipo ABC em *Xac* como: transportadores de molibdato, sulfato, alcanosulfatos, sulfonato, nitrato/taurina, putrescina, fosfato, D-metionina, maltose. Já em *Xcc* os transportadores do tipo ABC encontrados foram os de sulfato,sulfonato/nitrato/taurina, molibdato, putrescina, glicerol fosfato, fosfato, fosfonato, D-metionina. Em ambas as espécies, não encontramos transportadores para açúcares simples, como D-xilose, L-arabinose, por exemplo. Já *Xac* possui o transportador ABC para oligopeptídeos que não é encontrado em *Xcc*.

A habilidade de utilizar açúcares e polissacarídeos representa uma característica importante de bactérias que vivem em associação com plantas. A disponibilidade dos genomas seqüenciados de vários fitopatógenos possibilitou a verificação da presença de transportadores ABC para açúcares nestas bactérias apresentando um alto grau de conservação.

Neste trabalho foi escolhido o sistema transportador de maltose de *Xac*, com ênfase principalmente na proteína periplasmática MalE de *Xac*. Descrevemos um modelo estrutural da proteína gerado com base em ortólogo com estrutura resolvidas depositada no PDB (Protein Data Bank) e identificamos aminoácidos importantes na interação com diferentes ligantes e com as proteínas de membrana LacF e LacG e com a provável proteína ligadora de nucleotídeo (UgpC).

A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21DE3 e sua funcionalidade e características conformacionais foram avaliadas em testes *in vitro* (Balan *et al.*, 2005), como ensaios de ligação da proteína MalE de *Xac* com diferentes açúcares e a influência de fatores físicos como pH e temperatura na interação com tais substratos. Além disso, apresentamos várias tentativas de cristalização da proteína, onde cristais tiveram seus dados coletados e posteriormente processados (Souza et al., 2009).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização bioquímica e estrutural da proteína periplasmática MalE do sistema de transporte tipo ABC de *Xac*. Para tal, as seguintes etapas foram realizadas:

2.1. Clonagem do gene malE, no vetor de expressão pET28a;

2.2. Avaliação da expressão e solubilidade da proteína MalE após a variação nas condições de indução;

2.3. Purificação da proteína pelo método de cromatografia de afinidade a metal (níquel);

3.4. Produção e teste de anticorpos policionais mono-específicos em camundongos Balb/c;

2.4. Ensaios espectroscópicos de Dicroísmo Circular e Fluorimetria para avaliar a estabilidade e características estruturais da proteína;

2.5. Ensaios de cristalização e obtenção de cristais da MalE;

2.6. Processamento dos dados de difração e determinação de parâmetros estruturais dos cristais;

2.7. Construção de modelos tri-dimensionais das proteínas MalE, LacF e LacG, baseado nas coordenadas atômicas de ortólogos com a estrutura cristalográfica resolvida;

2.8. Modelagem molecular das possíveis interações da MalE com diferentes açúcares;

2.9. Comparação da MalE e das proteínas de membrana de *Xac* com os ortólogos com estrutura resolvida.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e vetores

Todas as linhagens e vetores utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens	s e veto	res usados	s neste	trabalho.
----------------------	----------	------------	---------	-----------

Linhagens		Características	Fonte		
	E. coli DH10B	F^{-} mcrA $\Delta(mrr-hsaRMS - mcrBC) \phi 80 lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ deo recA1 araD139 $\Delta(ara, leu)7697$ gaN ga/k λ^{-} rpsL nupG.	Invitrogen		
	E. coli XL1Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 $F'[::Tn10 \text{ proAB}^+ \text{ lacI}^q \Delta(\text{lacZ})M15] \text{ hsdR17}(r_K^- m_K^+)$	Stratagene		
	E. coli BL21(DE03)	F^- ompT gal dcm lon hsdS _B (r_B^- m _B ^-) λ (DE3 [lac]	Novagen		
	E. coli Roseta (DE3)	F ompT hsDS _B (r_{B} m ^B) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen		
	E. coli BL21 Star Xac 306	$F \ ompT \ hsDS_B \ (r_B \ m_B) \ gal \ dcm \ me131 (DE3)$ Causadora do cancro cítrico	Novagen da Silva <i>et al.</i> , 2002		
	Xanthomonas campestris pv campestris ATCC 39313	Causadora da podridão negra em crucíferas	da Silva <i>et al.</i> , 2002		
	Xanthomonas bromi Xantomonas codiae	Infecta a planta <i>Bromus carinatus</i> Infecta a planta <i>Codiaeum variegatum</i> var. pictum	Gonçalves e Rosato,2002 Gonçalves e Rosato 2002		
	X_malE_1	XL1Blue + SMol1.1	Presente estudo		
	X_malE_2	XL1Blue + SMol2.1	Presente estudo		
	X_malE_3	XL1Blue + SMol1.2	Presente estudo		
	X_malE_4	XL1Blue + SMol2.2	Presente estudo		
	D_malE_1	BL21 DE3 + SMol2.1	Presente estudo		
	D_malE_2	BL21 DE3 + SMol2.2	Presente estudo		
	R_malE_1	E. coli Roseta (DE3) transformada com pSmol2.2	Presente estudo		
	S_malE_2	E. coli Star (DE3) transformada com pSmol2.2	Presente estudo		
Vetores	pGEM T-EASY pET28a pET29a pSMol1.1	<i>lacZ Amp^r lacI Kan^{r,}</i> vetor de expressão <i>lacI Kan^r</i> , vetor de expressão pGEM T-Easy Vector + gene <i>malE</i>	PROMEGA NOVAGEN NOVAGEN Presente estudo		
	pSMol2.1	pET28a + gene <i>malE</i>	Presente estudo		
	pSMol1.2	pGEM T-Easy Vector + gene malE (para clonagem no	Presente estudo		
		vetor pET29a)			
	pSMol2.2	pET29a + gene <i>malE</i> (sem a cauda de histidina)	Presente estudo		

3.2 Meios de cultura, soluções e tampões

As soluções, meios de cultura e tampões comumente utilizados nos ensaios de biologia molecular foram preparados segundo Sambrook *et al.*. (1989). Soluções e tampões específicos são descritos nas seções correspondentes a cada experimento.

3.3 Isolamento de DNA genômico

Alíquotas (50 μ L) de uma cultura de *Xac* crescida durante uma noite em meio LB a 28°C foi homogeneizada com 450 μ L de H₂O Milli-Q e centrifugado por 10 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 500 μ L de tampão de extração. A preparação foi homogeneizada mais 1 vez em vortex e incubada por 60 minutos à temperatura ambiente sob agitação contínua. Após este período centrifugou-se por 5 minutos a 5000 g. e 450 μ L de sobrenadante foram transferidos para outro tubo. Adicionou-se 450 μ L de isopropanol, a mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 60 minutos a 13.000 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco a vácuo e ressuspenso em 100 μ L de H₂O Milli-Q estéril (Llop, 1999).

3.4 Amplificação do gene malE de Xac por PCR

O fragmento referente ao gene *malE* de *Xac*, que codifica para a proteína madura sem o peptídeo sinal, foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem 306. Os oligonucleotídeos sintéticos usados estão descritos na tabela 3.

Oligonucleotídeos	Sítio de restrição	Sequência*
FmalEpET28a	NdeI	5' GCA GGT CAT ATG GGA TGC GAA 3'
RmalEpET28a	HindIII	5' CCG AAG CTT TCA TCG TGC 3'
FmalEpET29a	Ndel	5' CAT ATG TGC GAA CGC TCC GAT 3'
RmalEpET29a	Hind III	5' AAG CTT TCA TCG TGC GGC TCC 3'

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene *malE* de *Xac*.

* Sítios de restrição estão marcados em negrito.

Para possibilitar a clonagem direcional foram acrescentados sítios de restrição aos oligonucleotídeos. Todas as reações foram preparadas para um volume final de 50 µl com TaqDNA polimerase High Fidelity (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, em um

termo-ciclador PTC100/MJ. O protocolo de preparação da reação foi: 200 ng de DNA, 200 μ M de Dntps, 10 pMoles de iniciadores, 50 mM de MgCl2, 5 U de Taq, 5 μ l de tampão de reação (10 x concentrado). O ciclo de amplificação foi: 1) 96°C, 2 min, 2) 96°C, 1min 30 s , 3) 58°C, 1min 30 s, 4) 72°C, 1 min 30 s., 5) Passo 2 29X, 6) 73°C, 8min 30 s.

3.5 Clonagem do fragmento obtido na reação de PCR no vetor pGEM T-Easy

O fragmento obtido na reação de amplificação do gene *malE* foi inserido no vetor de clonagem pGEM T-easy. Alíquotas (2μ L) das misturas de ligação (volume total de 5 μ l) foram usados para a transformação por eletroporação das células de *E. coli* XLIBlue. Os plasmídeos de interesse foram extraídos de colônias brancas e após mini-prep dos mesmos foram clivados com as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III para liberação do fragmento de interesse o qual foi sub-clonado no vetor de expressão pET28a, previamente digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III. O mesmo procedimento foi utilizado para a clonagem do gene *malE* no vetor pET29a.

3.6 Transformação de bactérias

As bactérias usadas como hospedeiras dos plasmídeos foram transformadas por eletroporação ou "heat shock" (Sambrook *et al.*, 1989). Para estoque e propagação dos vetores, foi usada a linhagem de *E. coli* XL1Blue (Stratagene) e DH10B (Invitrogen) e para a expressão da proteína de interesse usamos a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3).

3.7 Indução da expressão do gene malE em células de E. coli BL21

Os transformantes escolhidos após a análise de restrição foram pré-analisados para a expressão da proteína de interesse em inóculos de 5 ml de meio LB acrescido de canamicina, em condições padrões: 37° C e 200 rpm durante 2 horas no shaker modelo 4430 (Innova). Após a confirmação da expressão da MalE de *Xac* em *E. coli*, diferentes condições foram testadas, com variações na temperatura de incubação, meios de cultura, tempo, agitação e aeração. Uma vez determinada a melhor condição para expressão da proteína, ensaios de expressão em grande quantidade foram realizados. Para tal, as células portadoras do plasmídeo de interesse foram pré-inoculadas em 10 ml de LB (+50 µg/ml de canamicina) e crescidas durante uma noite a 37° C. Inóculos na proporção de 1:100 foram feitos em 2 frascos

tipo erlenmeyer de 3 litros contendo 1 litro de meio LB+canamicina e as células foram incubadas a 37° C com agitação de 200 rpm até que a D.O. a 600 nm atingisse aproximadamente 0,5-0,6. Ao atingir a D.O desejada, foi acrescentado o IPTG na concentração final de 0,1 mM, seguindo a indução a 200 rpm e 37° C durante duas horas e meia. Após este período o meio de cultura foi centrifugado a 4° C, 6.000 x *g* durante 20 minutos para a precipitação das células que foram estocadas durante 16 horas a -20° C. Alíquotas de 1 ml foram retiradas antes (T_0) e depois da indução (T_2) e, após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os precipitados foram ressupensos em tampão de amostra. A expressão das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE em géis de polilacrilamida 12,5%.

3.8 Otimização da extração da fração solúvel da proteína MalE expressa em *E. coli* BL21 DE3

Após o período de indução, as células foram precipitadas centrifugando-as por 10 minutos a 6000 rpm, os pellets foram congelados a –20° C. As células foram ressuspendidas em tampão (100 mM de Tris pH 8.0; 500 mM de NaCl e 0,5 mM de PMSF, 20 mM de Imidazol), acrescido de 50ug/mL de lisozima, a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. As células foram rompidas por sonicação de 3 ciclos (4 pulsos de 15 segundos a uma amplitude de 30%) com o aparelho Branson Digital Sonifier 450 (117 V, 450 watts e 60 Khz). O extrato obtido foi centrifugado por 30 minutos a 17.000 rpm. As frações solúveis e insolúveis foram avaliadas por SDS-PAGE.

3.9 Quantificação das proteínas

As proteínas foram dosadas pelo método de Edelhoch (Edelhoch, 1967) utilizando-se espectrofotômetro modelo ULTROSPEC 2100 pro (Amersham Biosciences) em absorbância a 280 nm. As amostras foram diluídas 50 vezes em 1/5 do tampão de amostra tris 20 mM pH 8.0 NaCl 50 mM e 4/5 do tampão 25 mM fosfato pH 6,5 7,2 M guanidina para a exposição dos cromóforos (tirosina, triptofano e cisteína). Para o cálculo das concentrações foram utilizados os coeficientes de extinção a 280 nm da proteína, obtidos através da análise da seqüência de aminoácidos com o programa ProtParam (http://au.expasy.org/tools/protparam.html). O coeficiente de extinção a 280 nm foi calculado em 93850, para a MalE recombinante, incluindo a cauda de histidina.

3.10 Purificação da proteína de fusão utilizando a cromatografia líquida de performance rápida

3.10.1. Cromatografia de afinidade a metal

As frações solúveis dos extratos de células induzidas foram filtradas em filtros Millex (0,22 µm) e purificadas no aparelho AKTA FPLC da Amersham Pharmacia Biotech, com a coluna His trap HP (Amershan Biosciences), carregada com níquel. A coluna foi equilibrada com 10volumes de tampão de ligação (100 mM tris pH 8.0; 500 mM de NaCl; 20 mM de imidazol) e a proteína eluída com um gradiente de imidazol de 0 % a 100 % em 30 mL de tampão de eluição (100 mM de tris pH 8,0; 500 mM de imidazol). Após a purificação, seguiu-se a diálise da proteína em tampão tris 20 mM pH 8,0, 50 mM de NaCl.

3.10.2. Cromatografia de troca iônica

Amostras da proteína purificada e dialisada foram submetidas à cromatografia de troca iônica utilizando-se a coluna Resource Q de 1 mL (Amersham Biosciences). O equilíbrio da coluna foi feito com 10 volumes do tampão ligação (20 mM de Tris pH 8,0) e a proteína foi eluída com um gradiente 0 a 100% de tampão de eluição (20 mM de Tris pH 8,0; 500 mM NaCl). As amostras eluídas foram visualizadas pelos picos apresentados no cromatograma em seguida foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE.

3. 10.3 Cromatografia por gel filtração

As frações purificadas foram concentradas para um volume de 2 mL e uma concentração de 15 mg/mL. As amostras foram submetidas à cromatografia de gel filtração utilizando-se a coluna Hiload 16/60 Superdex 75 (Amershan Bioscience). O equilíbrio da coluna foi feito com dois volumes de tampão (20 mM de tris pH 8,0 com 150 mM de NaCl). As amostras eluídas, visualizadas pelos picos apresentados no cromatograma foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE.

3.11 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE foram feitas de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). A coloração foi feita com azul de Comassie e a descoloração por aquecimento do gel em água no forno de microondas por 3 minutos. Os marcadores de peso molecular utilizados foram: BenchMarkTM Protein Leadder, BenchMarkTM Pré-Stained Protein Leadder (Invitrogen) e Unstained Protein Molecular Weight Marker, Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

3.12 Concentração das amostras de MalE obtidas na purificação

As amostras contendo proteínas purificadas foram diluídas na proporção 1:100 em Tampão tris-Cl 20 MM pH 8.0 NaCl 50 mM e concentradas em filtros Amicon Ultra, PLGC Ultracel-PL Membrane (Millipore) de 15 ml com a membrana com poro de 30.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) a 4.000 x g e 4°C. Em seguida as amostras concentradas foram centrifugadas a 20.000 x g a 4°C durante 20 minutos, para a retirada de qualquer precipitado presente na amostra. As amostras coletadas foram quantificadas e analisadas em SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 12,5%.

3.13 Dicroísmo circular

Os ensaios de CD foram realizados em espectropolarímetro JASCO J-810 equipado com um controlador de temperatura tipo Peltier acoplado a um banho, utilizando-se cubetas de quartzo (l = 0.1 cm). As amostras de proteína com foram diluídas na concentração de 5 μ M em tampão 20 mM tris-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl. As medidas foram realizadas na presença e ausência dos diferentes açúcares: maltose, trealose. Ensaios de estabilidade ao pH e temperatura foram realizados. Os dados foram transformados em elipcidade residual molar [θ] utilizando-se a fórmula:

 $[\Theta] = mdeg \times PM (Da)$

onde os peso moleculare considerado para a proteína com cauda foi de e 51055,6 Da. As estimativas de estrutura secundária foram realizadas com o auxílio do programa CDNN (Deléage, 1993).

l (cm) x n° de resíduos x mg/mL x 10

3.14 Fluorimetria

Os ensaios de fluorescência foram feitos com o espectrofluorímetro Multifrequency Phase Fluoremeter (ISS K2), em cubeta com 1x1 cm, as aberturas de onda de excitação e emissão foram 2 e 4 nm, respectivamente. A fluorescência intrínseca da proteína foi medida após excitação em 295 nm e os espectros de emissão medidos entre 310 e 420 nm. As amostras da proteína MalE de *Xac* com cauda de histidina foram diluídas a uma concentração de 0,1 mg/mL em tampão 20 mM tris-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl. As medidas foram realizadas na presença e ausência de maltose ou trealose. Os dados foram corrigidos multiplicando-os pelo coeficiente de diluição da amostra. Os dados de fluorescência foram corrigidos para os efeitos de diluição e filtro interno.

Na titulação da maltose foram adicionadas alíquotas crescentes de açúcar na cubeta com a proteína numa concentração de 0,1 mg/mL. As variações foram de 0,5 μ M a 500 μ M e de 0,1 mM a 20 mM. Foi medido um espectro de fluorescência cada vez que uma alíquota de açúcar foi adicionado.

3.15 Titulação calorimétrica isotérmica

Alíquotas de 5 mL da proteína purificada foram diluídas (10x) e dialisadas contra 4 litros de tampão utilizados nos ensaios de titulação isotérmica calorimétrica (20 mM de tampão fosfato pH 7.4; 50 mM de NaCl, 1 mM de DTT).

Os experimentos de titulação microcalorimétrica foram feitos utilizando-se um microcalorímetro VP-ITC da Microcal (Northampton, MA). Amostras das proteínas e dos açúcares foram preparadas em 20 mM de fosfato de sódio pH 7,4; 100 mM de NaCl e 1 mM de DTT (dithiothreitol) (Sigma). A solução contendo a proteína foi inserida numa seringa e colocada na célula de amostra do aparelho (volume da célula = 1,34 mL). A amostra da proteína e do açúcar foram degasificadas com o intuito de diminuir o tempo de estabilização da linha de base. Amostras com 7 μ L da solução de carboidrato foram adicionados com uma seringa giratória (300 rpm) controlada pelo computador do aparelho, o período de tempo entre as injeções foi de 5 minutos. Os dados experimentais foram processados utilizando-se o software ORIGIN versão 2.9, fornecido pela Microcal.

3.16 Análise de desnaturação térmica (Thermal shift) da MalE

A desnaturação da proteína MalE foi feita com o corante fluorescente Sypro Orange. Sypro Orange é um corante sensível às mudanças ambientais. A desnaturação térmica expõe regiões hidrofóbicas da proteína e resulta em aumento da fluorescência, parâmetro utilizado para monitorar a transição da proteína entre o estado enovelado e desenovelado.

O ensaio de desnaturação térmica foi realizado no aparelho iCycler iQ Real Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA), originalmente projetado para ensaios de PCR. O sistema possui um dispositivo de aquecimento/resfriamento para controle de temperatura e um detector (CCD) que mostra mudanças na fluorescência nos poços das microplacas. Soluções contendo 10 µL da MalE de *Xac* (5µM), 5,5 µL de Sypro Orange (2x), 5 µL de açúcar (5 mM) e 20,5 µL do tampão da proteína (20 mM de tris pH 7,4, 50 mM de NaCl) foram adicionados nos poços da placa que foi aquecida de 25°C a 85°C a uma taxa de calor de 0,5°C/min. A intensidade da fluorescência foi medida com excitação/emissão de 490/530 nm.

3.17 Preparação de cristais

Amostras da proteína MalE de *Xac* (10 mg/ml), com e sem cauda de histidina, foram usadas para a preparação das placas de cristalização com os kits Hampton Research (Screen I e II, SaltRx, Index, PEG íon), Jena Biosciences (kits 1 ao 8) e Wizard I e II, segundo as instruções do fabricante. Foi usada a relação de 1 μ L de proteína para 1 μ l de tampão no método de vapor difusão. Nos primeiros ensaios as condições de cristalização foram feitas com a técnica da gota sentada, mas os cristais obtidos mostraram-se demasiadamente frágeis e não resistiram à manipulação. Desta forma, mudamos para a técnica da gota pendente a fim de facilitar o manuseio dos cristais para os testes na linha MX1.

As temperaturas para a cristalização foram de 18°C e 4°C. A observação das placas para identificação dos cristais foi feita com lupa Leica MZ 12,5. Após o aparecimento dos cristais da proteína em determinada condição, a mesma foi refinada variando-se sempre o pH do tampão e a concentração do precipitante, presença de diferentes açúcares como maltose, lactose, alfa-ciclodextrina e beta-ciclodextrina, na proporção de 1:2. Em algumas condições a concentração de açúcar foi aumentada na tentativa de estabilizar melhor o complexo (proteína/ligante).

Após o refinamento e identificação da condição que apresentava melhores dados, foram feitas placas de cristalização com aditivos (Additive Screen I e II Hampton Research). Para retardar o crescimento dos cristais foi colocada sobre o poço com a solução de cristalização uma camada de silicone ou parafina e do kit "Al's oil" (Hampton Research).

3.18 Irradiação e difração dos cristais

Dados cristalográficos foram coletados na linha D03B-MX1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas. O comprimento de onda do feixe foi ajustado para 1.421 Å e o detector *MARCCD* foi usado para gravar os dados. Os cristais foram mantidos em um fluxo de nitrogênio a 110K para minimizar os danos da radiação. Soluções nas quais os cristais foram obtidos foram acrescidas de glicerol e PEG 400 para evitar a formação de gelo. Os dados coletados foram processados utilizando-se o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997), o programa MOSFLM (Leslie, 1999) e o pacote CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

Dados cristalográficos também foram coletados na linha de cristalografia de proteínas 9-2 do Laboratório de Radiação Síncrotron de Stanford (SSRL, CA). O comprimento de onda foi de 0,82 Å e o detector utilizado para gravar os dados foi o CCD Mar Mosaic 325 (Mar USA). Os dados foram coletados com $\Delta \varphi = 0,25^{\circ}$. Os cristais foram protegidos contra o congelamento em um fluxo de nitrogênio a 100K para minimizar os danos da radiação. O conjunto de dados foi integrado utilizando-se o programa MOSFLM 6.2.6 (Leslie, 1999) e escalonado com Scala 3.2.19 (Evans, 1993).

3.19 Substituição molecular

Tentativas de resolução da estrutura da MalE de *Xac* foram feitas utilizando-se o programa MOLREP (Vagin e Teplyakov, 2002) utilizando-se como modelos a MBP de *T. litoralis* ligada a trealose (código do PDB 1EU8) e a MBP de E. coli ligada a maltose (código do PDB 1ANF).

3.18 Produção de anticorpos anti-MalE em camundongos

O método utilizado consistiu na inoculação subcutânea da proteína purificada, na forma desnaturada, com os respectivos adjuvantes (completo e incompleto), em camundongos BalbC. Foram realizadas quatro imunizações com intervalos de 2 semanas para a primeira imunização, a proteína $(1\mu g/\mu I)$ foi adicionada ao adjuvante completo de Freund na proporção de 1:1. Cada animal recebeu 50 $\mu g/dose$ do antígeno imunizante. As doses seguintes foram administradas com adjuvante incompleto de Freund na proporção de 1:1. As amostras do soro

foram retiradas individualmente do plexo oftálmico dos animais e incubadas por 1 hora a 37° C para retrair o soro. Os soros recolhidos foram incubados, a 4°C por 1 hora, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes retirados e mantidos à -20° C.

3.20 Detecção da proteína MalE em ensaios de imunoblot com anticorpos policionais

A transferência de proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi realizada usando o sistema do tipo semi-seco. Nesse sistema, o gel fica em contato com uma membrana de nitrocelulose e ambos permanecem entre folhas de papel de filtro, todas umedecidas com tampão de transferência (190 mM glicina, 20% metanol, 25mM tris-HCl pH 8,3 em água deionizada). O aparelho utilizado para transferência foi o Multiphor II (Pharmacia). A transferência foi feita por 1 hora com uma corrente de 0,8mA/cm² de gel. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 5% de leite desnatado Molico em PBS pH 7.4 + 0,05% tween 20, durante uma noite a 4°C. Após o bloqueio, a membrana é lavada com PBS-Tween por três vezes (5 min. cada) para adição do primeiro anticorpo (anti-MalE), na diluição 1:1.000. O tempo de incubação foi de 1 hora e 30 minutos. Para a adição do segundo anticorpo, conjugado anti-IgG-peroxidase (camundongo) diluído 1:3000, foram realizadas mais 3 lavagens sucessivas com PBS-Tween. A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência com o Kit Supersignal (Pierce, Rockford, I,USA).

3.21 Busca por ortólogos com estrutura resolvida e comparação com a MalE de Xac

As seqüências de aminoácidos da proteína MalE foram obtidas no servidor KEGG (http://www.genome.jp/kegg/), através do código do genoma *Xac*2310. A busca por ortólogos da proteína foi feita utilizando-se o programa BLASTP, disponível no site "National Center of Biotechnology Information server (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e o Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Os alinhamentos e as árvores filogenéticas foram feitas utilizando-se o programa "ClustalW" (www.ebi.ac.uk/clustalw).

3.22 Construção do modelo estrutural da proteína MalE de *Xac* e das proteínas de membrana LacF e LacG

Os modelos estruturais da proteína MalE de *Xac* foram construídos utilizando-se o programa Modeller 9v2 (Sali and Blundell, 1993) baseado nas coordenadas atômicas da MalE

de *T. litoralis* ligada a trealose (PDB 1EU8) e a MalE de *E. coli* ligada à maltose (PDB 1ANF). Para a construção dos modelos o alinhamento da sequência de aminoácidos da MalE de *Xac* com a sequência dos ortólogos de *T. litoralis, Termotoga maritima* e *E. coli* foi minuciosamente analisado para a formação de "gaps". Dez modelos estruturais diferentes foram gerados para cada tentativa e o melhor foi escolhido baseado na análise de validação feita com o programa Análise e Validação de Estrutura de Proteínas (SAVS) disponível no servidor "NIH-MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics Server" (http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/). As validações foram realizadas usando os Programas Procheck (Laskowski et al.., 1993) e Verify 3D (Bowie, 1991). Os resíduos com qualidade estereoquímica comprometida foram corrigidos usando o programa COOT (Emsley e Cowtan, 2004) e o modelo foi re-submetido à validação até que todos os parâmetros estivessem corretos.

Os modelos estruturais das proteínas LacF e LacG foram construídos utilizando-se o programa Modeller 9v2 (Sali and Blundell, 1993) baseado nas coordenadas atômicas das proteínas MalF e MalG e alinhamento de sequências de aminoácidos presentes na estrutura do transportador de maltose de *E. coli* (código do PDB 2R6G). Os modelos foram validados e analisados conforme metodologia descrita para a MalE.

3.23 Alinhamento estrutural e identificação do bolsão do ligante

O alinhamento estrutural do modelo da proteína MalE de *Xac* foi feito com o programa COOT (Emsley e Cowtan, 2004), utilizando-se as estruturas depositadas no PDB: *Escherichia coli* (3MBP, Rodseth, 1997); *Themotoga maritma* (2FNC Hellinga, 2007); *Pyrococcus furiosus* (1ELJ; Waugh, 2001); *Thermus thermophilus* (2GH9; Hellinga 2007); *Thermococcus litoralis* (1EU8; Welte, 2001); *Alyciclobacillus acidocaldarius* (1URD; Mowbray, 2004). A observação das características estruturais da proteína e a localização dos possíveis resíduos que interagem com os ligantes baseou-se no programa Pymol (DeLano, 2002) e no programa PISA (Krissinel e Henrick, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem do gene malE no vetor de expressão pET28a

O gene *malE* de *Xac* (*XAC*2310, gi 156381) possui 1371 pares de bases e codifica uma proteína com 456 aminoácidos (Figura 6A e B). O fragmento *malE* flanqueado com sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *Hin*dIII, com 1.321 pb, foi amplificado por PCR com os iniciadores FmalEpET28a e RmalEpET28a, sem a região codificadora do peptídeo sinal (19 aminoácidos). O fragmento foi eluído do gel, submetido à digestão com as enzimas de restrição para ser inserido diretamente no vetor pET28a (Novagen). A clonagem do fragmento foi confirmada por análise de restrição (Figura 6B) e o plasmídeo resultante foi denominado pSMol2-1.

Como o gene *malE* foi clonado no vetor pET28a sem a seqüência que corresponde ao peptídeo sinal, conforme determinado com o programa SignalP, o. códon de início de transcrição foi originado a partir do sítio da enzima de restrição *Nde*I. Conseqüentemente, a proteína recombinante foi expressa em sua forma madura, no citoplasma das células de *E*. coli BL21(DE3), apresentando em sua região N-terminal uma seqüência adicional de 20 aminoácidos, codificado pelo vetor, que inclui 6 histidinas.



Figura 6 – Representação esquemática do vetor pSmol2-1 construído após inserção do fragmento *malE* (1.321 pb) no vetor de expressão pET28a (5369 pb) (A). Análise de restrição do plasmídeo pSmol2-1 (B). O plasmídeo foi digerido com as enzimas *NdeI* e *HindIII* com a liberação de um fragmento de 1,321pb.

A seqüência de aminoácidos da proteína recombinante analisada pelo programa ProtParam apresentou 456 resíduos que conferem peso molecular de 51.055,6 Da e ponto isoelétrico teórico ao redor de 5.98. A quantificação dos aminoácidos aromáticos revelou a presença de resíduos aromáticos importantes para os ensaios de fluorescência como 13 triptofanos (2,6 %) e 15 tirosinas (3,3%). A presença de duas cisteínas (0.4%) sugere a formação de uma ponte dissulfeto na proteína madura.

4.2 Análise de Expressão e Solubilidade da Proteína MalE de *Xac* expressa em células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pSmol2-1 (B_MBP1)

A proteína recombinante MalE de *Xac* foi expressa e purificada da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) na forma solúvel fusionada a uma cauda de histidina na região N-terminal e uma seqüência adicional com o sítio de clivagem da trombina. Para obtermos a expressão da proteína MalE na forma solúvel foram testados diferentes protocolos de indução com variações na temperatura de incubação (temperatura ambiente, 28°C ou 37°C), aeração (com agitação ou sem) e tempo de indução. O maior nível de solubilidade da proteína MalE foi obtido com a indução em meio LB, temperatura ambiente (23°C) e sem agitação. Em todas as condições pode ser constatado que a aeração foi importante para determinar a solubilidade da proteína quando a indução foi feita a 37°C sob agitação (Figura 7), o nível de solubilidade da proteína recombinante foi menor nessas condições (Tabela 4).

Temperatura de	<i>Aeração^b</i>	Meio de Cultura ^c	Período de	Proteína	Proteína	% de Proteína Solúvel ^g
Indução ^a			Indução $(h)^d$	$Total^{e}$	Solúveľ	
					(g/L)	
37	+	LB	2	0,120	0,052	43,4
37	-	LB	4	0,110	0,064	58,2
37	+	M9	2	0,097	0,042	43,2
28	+	LB	2	0,126	0,073	58,0
28	-	LB	4	0,129	0,090	69,8
28	+	M9	2	0,120	0,032	26,6
28	-	M9	16	0,102	0,064	62,7
23	-	LB	16	0,150	0,150	100,0
23	-	M9	15	0,142	0,130	91,5

Tabela 4 – Condições experimentais testadas para a produção da proteína MalE na forma solúvel pela linhagem recombinante B_MBP1

a – Temperatura de incubação após a adição do indutor;

b – Culturas mantidas em shakers a 200 rpm (+) ou mantidos estáticos (-) durante a indução;

c – LB, Luria broth; M9, meio mínimo M9;

d – Culturas foram mantidas foram mantidas sob as condições de indução por 2h, 4h, ou "overnight" (16h)

e – *Rendimento de proteína total obtida com 1L de cultura mantidas em frascos Fernbach;*

f – Quantidade de proteína solúvel recuperada após purificação por afinidade ao níquel;

g – Razão de proteína solúvel recuperada (g/L)/proteína total (g/L) expressa em porcentagem.



Figura 7 - Expressão da proteína recombinante MalE de Xac em B_MBP1. Extratos totais das frações solúveis foram aplicados em gel de poliacrilamida após a indução por IPTG em meio LB a 23° C (linhas 3 a 4) ou 37°C (linhas 6 e 7). 1 – Padrão de peso molecular précorado (Invitrogen), 2 e 5, extrato total de células não induzidas, 3 e 6 – extrato das culturas celulares deixadas durante a noite sob condições de indução, 4 e 7 – Fração solúvel das culturas induzidas. Foram aplicadas quantidades similares de proteínas nos poços (30 ng/poço) do gel de acrilamida 12,5% corado com Coomassie brilliant blue. A seta indica a posição de 50 kDa no marcador.

4.3 Purificação da Proteína Recombinante MalE de Xac

4.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade

A proteína MalE de *Xac* foi expressa nas células B_MBP1 portadoras do vetor pSmol2-1 no citoplasma e após a obtenção dos extratos solúveis, estes foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade em coluna His Trap HP (Amersham Biosciences), de forma automatizada no aparelho Akta FPLC. A figura 8 mostra o cromatograma gerado e a eletroforese em gel de poliacrilamida das frações referentes aos picos encontrados. Para a eluição da proteína foi utilizado um gradiente crescente de imidazol (linha vermelha). Conforme mostra a figura 8B, a amostra de lavado apresentou pouca quantidade da proteína de interesse indicando que a maioria da proteína permaneceu ligada à coluna. As frações eluídas com 224 mM de Imidazol (6, 7, 8, 9, 10,11, 12), são correspondentes à proteína de interesse (Figura 8A e B).



Figura 8 - Cromatograma da purificação da proteína MalE por cromatografia de afinidade ao níquel a partir extratos solúveis obtidos após a indução das células B_MBP1 com IPTG. A proteína foi eluída com concentrações de imidazol de 12% a 36%. (linha azul = proteínas (UV 280 nm), linha vermelha = frações eluídas e linha verde = concentração do tampão B com 1 M de imidazol. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% das frações obtidas após a purificação da MalE de *Xac*. Foram aplicados no gel 10 µl de cada fração. MW: Marcador de peso molecular (Fermentas); FT: lavado; os números indicam as respectivas frações eluídas,.

Para obtenção de uma proteína com um maior grau de pureza, as frações obtidas na cromatografia de afinidade foram dialisadas em tampão Tris 20 mM pH 8,0 e submetidas à purificação por troca iônica com um gradiente de NaCl (concentrações de 0 até 500 mM). Apesar do cromatograma apresentar um pico único com um pequeno ombro (dados não mostrados), não foi possível separar os contaminantes.

4.3.2 Purificação por Gel Filtração

Após a purificação da MalE em cromatografia de afinidade ao níquel, as amostras obtidas foram submetidas à purificação por gel filtração. Normalmente eram aplicados 15 mg/mL de amostra em cada corrida, utilizando-se uma coluna Superdex 16/60 75, com o intuito de obtermos uma proteína com um maior grau de pureza. O resultado, apresentado na figura 9, mostra a presença de um único pico, correspondente à proteína MalE de *Xac*, aos 44 minutos da corrida (Figura 9), demonstrando que a mesma apresenta forma monomérica. A cromatografia por gel filtração mostrou-se mais eficaz na remoção dos contaminantes (Figura 9), já que foi possível observar dois picos característicos, sendo que o maior e mais acentuado (1800 mAu) é referente à proteína de interesse. Após a purificação, seguiram-se diálises da MalE purificada em diferentes tampões.



Figura 9 - Cromatograma da purificação por gel filtração da proteína MalE (A) (linha azul = proteínas (UV 280 nm), linha vermelha =frações eluídas. (B)- SDS-PAGE a 12,5 % das frações eluídas. 1- MW;Marcador de peso molecular (Fermentas). Os números correspondem às frações eluídas. Foram aplicados no gel 10 μ l de cada fração.

4.4 Dicroísmo Circular 4.4.1 Análise da MalE de *Xac* por Dicroísmo Circular

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína MalE foi realizada por ensaios de Dicroísmo Circular (Figura 10). A amostra foi utilizada na concentração de 10 μ M em tampão Tris 20 mM pH 8,2 contendo 50 mM de NaCl. A estimativa de estrutura secundária prevista pelo ensaio foi de: 36% de estruturas em forma de hélices-alfa, 17% de folhas beta, enquanto alças representaram 40%. Na presença de maltose foi possível detectar um aumento significativo nos sinais de CD a 208 e 222 nm correspondente a um ganho no conteúdo de estrutura secundária em forma de hélices-alfa.



Figura 10 – Espectros de Dicroísmo Circular da proteína MalE de Xac na ausência e presença de Maltose. A linha contínua mostra o espectro da proteína sem o ligante, a linha tracejada representa o espectro na presença de 20 uM de Maltose. O espectro da proteína MalE é característico de uma proteína onde as alfa hélices são predominantes.

4.4.2 Dicroísmo circular da MalE de *Xac* variando-se o pH e presença de ligantes

Uma vez que a MalE apresentou alteração no conteúdo de estrutura secundária na presença de maltose, diferentes condições foram testadas para avaliar o comportamento da proteína. Análises de dicroísmo circular foram realizadas para a proteína na presença de maltose e trealose em diferentes pHs (Figura 11, tabela 5). A proteína sofreu alterações no

conteúdo de estrutura secundária principalmente diminuição de hélices-alfa, quando submetida ao pH de 3.6, e os açúcares como maltose e trealose não tiveram efeito estabilizador (Figura 11A). Por outro lado, a proteína mostrou estabilidade e manteve suas características estruturais nos pHs 5.0, 8.0 e 10.0. A presença de maltose leva a um discreto aumento no conteúdo de hélices alfa, em pHs 5.0 e 8.0 (Tabela 5). Trealose parece não exercer nenhum efeito para ganho de estrutura secundária nos diferentes pHs testados.



Figura 11 – Efeito do pH no perfil de estrutura secundária da MalE em presença e ausência de maltose e trealose medidas por dicroísmo circular. A) - citrato de sódio 20 mM pH 3.6 e 50 mM de NaCl. B) - acetato de sódio 20 mM pH 5.0 e 50 mM de NaCl. C) - Tris 20 mM pH 8.0 e 50 mM de NaCl. D) - glicina 20 mM pH 10.0 e 50 mM de NaCl.

4.4.3 Estabilidade Térmica da Proteína MalE na presença de diferentes açúcares

A termoestabilidade da proteína MalE foi analisada pelo monitoramento do sinal de CD a 222 nm, durante o aumento consecutivo da temperatura de 0°C até 100°C. Os ensaios foram realizados com a proteína na concentração de 5 μ M e na presença de 10 μ M de cada um dos açúcares maltose, lactose, beta-ciclodextrina e trealose. Os resultados apresentados na

figura 12, mostram que a proteína desenovela em duas etapas, caracterizadas pela presença de um pequeno ombro no espectro e que a temperatura inicial de desenovelamento é 42°C e final de 44°C. A presença dos ligantes pareceu não afetar a estabilidade da proteína.



Figura 12 – Estabilidade térmica da MalE de Xac na ausência e presença de maltose e trealose. Os espectros obtidos foram medidos por Dicroísmo Circular, variando-se a temperatura de 0°C a 100°C.

4.5 Ensaios de deslocamento térmico ("Thermal shift") da MalE em presença de açúcares

É sabido que a presença de ligantes nas proteínas periplasmáticas aumenta a estabilidade das mesmas uma vez que levam ao fechamento dos lóbulos e formação de contatos entre os dois. Neste caso, a temperatura de desenovelamento das proteínas deveria ser diferente quando as mesmas estivessem em presença dos respectivos ligantes. Os resultados dos experimentos de dicroísmo circular, contudo, mostraram que aparentemente nem maltose ou trealose são capazes de alterar a estabilidade térmica, refletida num aumento da Tm. Estes ensaios, contudo, são muitas vezes questionados por não serem especialmente sensíveis à pequenas variações nas temperaturas. Estudos de interações proteína/ligante têm

sido monitorados com maior precisão através de experimentos de deslocamento térmico ou thermal shift, nos quais as proteínas são incubadas com os ligantes na presença de um cromóforo (dye Sypro Orange) que se liga às regiões hidrofóbicas da mesma. O desenovelamento da proteína expõe regiões hidrofóbicas e o aumento na fluorescência é medido. Estes ensaios, realizados em aparelhos de PCR real time, normalmente são mais sensíveis do que os de dicroísmo circular e pequenas variações na temperatura de desenovelamento podem ser detectadas. A proteína MalE de *Xac* foi submetida ao ensaio de thermal shift e os resultados estão apresentados na figura 13. Foram testados os açúcares maltose, trealose, alfa-ciclodextrina e maltotriose, mas o melhor resultado foi obtido apenas na presença de maltose. A temperatura de desenovelamento térmico da MalE foi aumentada em 3°C na presença deste açúcar e não houve, ao contrário do resultado apresentado no ensaio de CD, o desenovelamento em duas fases.



Figura 13 – Transição de desenovelamento da proteína MalE de *Xac* (5 uM) na presença de 5 mM de maltose .

4.6 Fluorescência intrínseca dos triptofanos

4.6.1 - MalE em presença de Maltose

O espectro de fluorescência intrínseca de uma proteína reflete a soma dos espectros de fluorescência dos triptofanos e os valores encontrados, portanto, são uma avaliação da média do comportamento desses resíduos. A proteína MalE de *Xac* possui 13 triptofanos, e os resultados mostram a média da fluorescência emitida pelo total destes resíduos aromáticos. A

MalE de *Xac* apresentou o máximo da intensidade do comprimento de onda (λ_{max}) da fluorescência em 341 nm e o centro de massa da curva corresponde a 354 nm indicando que, na média, os triptofanos foram parcialmente expostos ao solvente (Figura 14). Na presença de 9 μ M de maltose, contudo, ocorre uma pequena diminuição, não significativa, no valor máximo de fluorescência, sem alteração do centro de massa.



Comprimento de onda (nm)

Figura 14 – Espectro da emissão de fluorescência da proteína recombinante MalE de Xac sem maltose e com maltose. A linha contínua corresponde à fluorescência da proteína não ligada e a linha tracejada corresponde à proteína na presença de 9 µM de maltose.

4.6.2 Fluorescência da MalE de Xac titulando-se maltose

A partir dos primeiros resultados apresentados da MalE em presença de maltose, foram realizados novos ensaios de fluorescência desta proteína durante a titulação de maltose. Neste ensaio seria possível obter a constante de dissociação do açúcar. A MalE foi titulada inicialmente com concentrações de maltose que variaram de 0.5 μ M a 500 μ M. Os resultados mostraram que houve diminuição da fluorescência da MalE de *Xac* associada ao aumento da concentração de açúcar evidenciando alterações conformacionais na proteína que alteram o ambiente dos triptofanos (Figura 15A). Por outro lado, os resultados mostram que não houve uma concentração saturante e o quenching dos triptofanos foi obtido em todas as concentrações de açúcar testadas. Desta forma não foi possível determinar o K_d. Neste caso, novas concentrações foram avaliadas aumentando a concentração de maltose (variando entre 0,1 mM até 20 mM). Também foi observado quenching dos triptofanos, mas novamente não houve uma concentração saturante (Figura 15B).



Figura 15 – Espectro de Fluorimetria da proteína MalE de *Xac* ao ser titulada com diferentes concentrações de maltose. A – Titulação de 0,5 μM à 500 μM.
B - Titulação de 0,1 mM à 20 mM.

4.6.3 Estabilidade da MalE na presença e ausência de maltose e trealose e em diferentes pHs

Os efeitos das alterações de pH e presença de açúcares no comportamento dos 13 resíduos de triptofanos da proteína foram medidos por espectroscopia de fluorescência. A proteína MalE de *Xac* quando submetida ao aumento do pH sofreu um aumento na fluorescência (λ_{max}) dos triptofanos e um deslocamento do centro de massa de um ambiente

hidrofóbico para um ambiente mais hidrofílico (Figura 16A). Maltose e trealose induzem a um quenching dos triptofanos em pH 5.0 e 8.0 (Figura 16B e 16C, respectivamente). Em pH 3.6, não há mudanças detectáveis na fluorescência (λ_{max}) ou deslocamento do centro de massa tanto na presença quanto na ausência de açúcares (Tabela 5, Figura 15A B e C). A proteína está protonada e positivamente carregada (pI teórico calculado em 5.9) e assume uma conformação num ambiente hidrofóbico que esconde os triptofanos, sofrendo também uma perda no conteúdo de hélices alfa, como demonstrado pela diminuição de sinal no CD a 222 nm (Tabela 5). Por outro lado, em pH mais alto, a proteína sofre mudanças conformacionais no conteúdo de estrutura secundária, caracterizado essencialmente pelo ganho de hélices alfa e exposição dos resíduos de triptofanos em um ambiente mais hidrofílico, isto é evidenciado pelo deslocamento do centro de massa da fluorescência em pH 5.0, 8.0 e 10.0 (Tabela 5).

A análise do comportamento da proteína em diferentes pH revela que embora os açúcares apresentem estrutura similar eles induzem diferentes respostas na proteína (Figura 15B e 15C, respectivamente). A presença da maltose altera os resultados de fluorescência intrínseca promovendo um "quenching" dos triptofanos em pH 5.0 e mais acentuadamente em pH 8.0. Já a trealose provoca o apagamento dos triptofanos somente em pH 8.0.



Figura 16 – Efeito do pH medido por fluorescência intríseca MalE de Xac na presença e ausência de maltose e trealose. Amostras de proteínas foram preparadas a 0,1 mg/mL e a concentração de açúcar foi 100 μM. Os tampões utilizados foram: pH 3,6 = 20 mM de Citrato de Sódio pH 3.6 e 50 mM de NaCl; pH 5.0 = 20 mM de Acetato de Sódio pH 5.0 e 50 mM de NaCl; pH 8.0 = 20 mM de Tris pH 8.0 e 50 mM de NaCl; pH 10.0 = 20 mM de Glicina pH 10.0 e 50 mM de NaCl. A - MalE de Xac em diferentes pHs, B - proteina MalE de Xac em difentes pHs na presença de maltose; C - proteína MalE de Xac em diferentes pHs na presença de trealose.

Proteína	CD a 222nm	Fluorescência (λ _{max})	Centro de Massa
			da
			Fluorescência
рН 3.6			
MalE	- 10108,7	341	343
MalE + maltose	-9312,71	342	344
MalE + trealose	-9562,22	342	341
рН 5.0			
MalE	-13985,6	342	351
MalE + maltose	-15132,9	342	352
MalE + trealose	-13807,9	342	352
рН 8,0			
MalE	13573,9	343	352
MalE + maltose	14126,9	344	350
MalE + trealose	12659,6	343	346
рН 10.0			
MalE	13347,6	343	353
MalE + maltose	13763,3	343	353
MalE + trealose	13112,7	343	353

Tabela 5 - Dados espectroscópicos do dicroísmo circular e ensaios de fluorescência intrínseca daMalE de Xac em diferentes pH.

4.7 Calorimetria

Apesar dos ensaios de fluorescência intrínseca dos triptofanos sugerirem a associação da MalE com maltose, ainda não tinha sido possível determinar o K_d . Neste sentido, realizamos ensaios de titulação calorimétrica isotérmica da proteína com maltose, maltotriose e trealose. A figura 17 mostra os dados experimentais para a titulação da MalE em diversas concentrações com seus possíveis ligantes também em diferentes concentrações, variando-se a temperatura.

Foram feitas diversas tentativas de ensaios de titulação calorimétrica da MalE de *Xac*. Nos ensaios realizados variou-se a concentração da proteína na célula do calorímetro ($20 \mu M$, $50 \mu M$, $150 \mu M$ e $200 \mu M$) e concentrações de açúcar na pipeta ($100 \mu M$, $200 \mu M$, 3 mM e 4 mM), utilizando-se a temperatura de 10° C, 20° C, 30° C. Apesar das diferentes tentativas de encontrar uma condição ideal para a ocorrência da ligação e conseqüente liberação de calor no ensaio, não foi possível detectar troca de calor em nenhum dos ensaios (Figura 17).



Figura 17 -Titulação calorimétrica isotérmica da proteína MalE de Xac. Os ensaios foram feitos em diferentes condições de concentração de proteína e titulação do ligante. A - Dados experimentais para a titulação de 1,322 mL de MalE de Xac a 20 µM com 200 µM de Maltose, a 20°C; B - - Dados experimentais para a titulação de 1,322 mL de MalE de Xac a 20 µM com 100 µM de Maltose, a 20°C; C - Dados experimentais para a titulação de 1,322 mL de MalE de Xac a 150 µM com 3 mM de Maltose, a 30°C; D -Dados experimentais para a titulação de 1,322 mL de MalE de Xac a 50 μM com 500 μM de beta-ciclodextrina, a 20°C; E - Dados experimentais para a titulação de 1,322 mL de MalE de Xac a 20 µM com 200 µM de maltotriose, a 20°C; F - Dados experimentais para a titulação de 1,322 mL de MalE de Xac a 250 µM com 100 µM de trealose, a 20°C. Os painéis superiores mostram os picos gerados por 25 injeções de 8 µL cada, e os painéis inferiores mostram o fitting da curva para um único sítio feito pelo software do calorímetro.

4.8 Cristalização da MalE, coleta e processamento dos dados

As primeiras condições de cristalização da proteína MalE foram obtidas em presença de MES ou Hepes como agente tamponante, em intervalo de pH entre 6,5 e 7,5 e PEG como precipitante (Tabela 6). Os cristais, em sua maioria, apresentaram essencialmente a forma bipiramidal (Figura 17) e quando submetidos ao feixe de raios X difrataram com baixa resolução (máximo 7 Å), mesmo após várias tentativas de refinamento alterando-se o pH e a concentração de precipitante. Com o objetivo de encontrar melhores condições de cristalização, foram feitos novos testes apresentados na tabela 6. Alguns dos cristais obtidos nas novas condições chegaram a difratar com resolução de 3,4 Å. O processamento destes dados contudo, não foi suficiente para determinar parâmetros de célula unitária e dados estruturais suficientes para a determinação da estrutura tri-dimensional da proteína. Essencialmente, o processamento foi dificultado pela presença de pontos de difração muito próximos uns dos outros, indicativos de célula unitária grande.

Novamente ensaios de cristalização foram realizados em pH variando de 6.5 a 8.5 e PEG como precipitante, mas desta vez, além de cristais com forma bipiramidal, foram obtidos cristais em forma de bastão (figura 17 A e D). A melhor condição encontrada nestas novas tentativas foi: Tris pH 8.0 0,1 M; 0,2 M Sulfato de Lítio, 20% de PEG 4000. O refinamento desta condição originou cristais que difrataram a 2.9 Å e 3.2 Å, cujos dados foram coletados e processados. Novamente, o processamento dos dados, mostrou que apesar de haver pontos em resolução suficiente, estes não eram considerados nas análises. Neste caso, os parâmetros completeza e mosaicidade foram tremendamente comprometidos. Os limites de resolução final deveriam ser melhor do que 3.0 Å.

Tabela 6	 Condi 	ções em o	que a prote	eína MalE	de Xac	cristalizou.
----------	---------------------------	-----------	-------------	-----------	--------	--------------

CONDIÇÕES

	,
1	0.1M Na HEPES pH 7.5; 12% PEG 20000
2	0.1M MES pH 6.5; 12% PEG 20000
3	0.1M Na HEPES pH 7.5; 0.2 Acteto de Na; 20% PEG 3000
4	25% PEG MME 2000
5	0.1M NaHEPES pH 7,5; 0.2M Acetato de Sódio, 20% PEG 3000
6	0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 0,2Sulfato de Lítio; 20 % PEG 4000
7	4% PEG 8000
8	0,1 M Na MES pH 6,5; 0,6 Cloreto de Sódio; 20% PEG 4000
9	0,01 M Cloreto de Magnésio; 10% PEG 6000
10	5% Glycerol, 15% PEG 6000
11	0,05 M Imidazol-HCl pH 8,0; 20% PEG 6000
12	0,1 M Acetato de Sódio; 0,05 M Acetato de Magnésio;10% PEG 8000
13	0,2 M Acetato de Magnésio; 10% PEG 8000
14	0,1 M Cloreto de Potássio, 5% Glycerol, 12% PEG 8000
15	0,1 M Na MES pH 6,5; 0,2 M Acetato de Sódio; 15% PEG 6000
16	0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M de Sulfato de Lítio o, 18% PEG 8000
17	0,1 M Imidazol pH 8,0; 14% PEG 10.000
18	0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 16% PEG 10.000
19	0,1 M Na Mês pH 6,5; 10% PEG 20.000
20	0,1M Tris-HCl pH 8,0; 5% Isopropanol, 10% PEG 3350
21	0,1M Tris-HCl pH 8,0; 5% Isopropanol, 10% PEG 3350
22	1 M Tartarato de KaNa, 0,1M Imidazol pH 8,0; 0,2 M NaCl
23	0,1 M Hepes pH 7,5; 20% PEG 8000
24	0,1 M Imidazol pH 8,0; 0,2 M Ca (OAc)2; 10 % PEG 8000
25	0,1 M Fosfato de Na/K pH 6,2; 0,2 M NaCl; 10% PEG 8000
26	1,26 M (NH ₄) SO ₄ ; 0,1 M Hepes pH 7,5
27	0,1 M Mes pH 6,0; 0,2 M Ca(OAc) ₂ ; 20% PEG 8000
28	3,5 M de Formato de Sódio
29	0,7 M Citrato Dihidratado de Sódio; 0,1 M de Bis- Tris propano pH7,0
30	3,5 M de Formato de Sódio; 0,1M Tris pH 8,0
31	1,0 M Succinato de sódio pH 7,0; 0,1M de Bis-Tris Propano pH 7,0
32	1,2 M de Tartarato de Potássio e Sódio ; 0,1M de Bis-Tris Propano pH 7,0
33	0,2 M de Formato de Amônio pH 6,6; 20% PEG 3350

34 0,05 M de Cloreto de Potássio; 0,01M Cloreto de Magnésio; 15% PEG 6000

Os refinamentos da melhor condição obtida até então (0,1M Tris pH 8.0, 0,2 M de sulfato de lítio, 18% de PEG 8000) foram realizados primeiramente com a adição de aditivos, e de diferentes açúcares como lactose, alfa-ciclodextrina e beta-ciclodextrina. Apesar de todas as mudanças, ao testarmos os novos cristais, nenhum apresentou resolução melhor do que as obtidas anteriormente. Os cristais em forma de bastão, com resolução ao redor de 3,0 Å, foram encontrados principalmente em presença de formato de sódio e tartarato de potássio, imidazol e pH 8.0 (Tabela 7). No caso dos cristais com formato de sódio não foi necessário o uso de solução crioprotetora, e aparentemente a presença da alta concentração de sal protegeu o cristal dos danos causados pela temperatura. O processamento deste novo conjunto de dados, contudo, também não originou dados estatísticos aceitáveis, como Rmerge muito alto, baixa completeza, mosaicidade e parâmetros de intensidade como o I/ σ . Mais uma vez, todos os cristais apresentaram padrão de difração com pontos muito próximos.



Figura 18 - Cristais da proteína MalE de *Xac* em presença de maltose (200 μM proteína: 400 μM maltose) crescidos após o refinamento de diferentes condições obtidas anteriormente. A– cristais em 0,1 M Tris pH 8.0; 0,2 M Sulfato de Lítio, 17% PEG 4000 (refinamento da condição 02, Jena Bioscience B05).
B – cristais em 0.1M MES pH 6.5; 12% PEG 20000 (refinamento da condição 22 Hampton Research II);C – cristais em 0,1 M Na Hepes pH 7,5; 0,2 M Acetato de Sódio, 20% PEG 3000 (Condição D5 do kit Jena Bioscience); D- cristais em 0.1M Tris pH 8.5; 0.2 Sulfato de Lítio; 17% PEG 4000 (Refinamento da condição Jena Bioscience 2 condição B05), E – cristais em 0,1 M Na Hepes pH 7,4; 0,2 M Acetato de Sódio, 20% PEG 3000 (Refinamento da condição D05 Jena Bioscience) + 0.1M Trimetilamine HCl (aditivo); F – cristais em 0,1 M Na Hepes pH 7,4; 0,2 M Acetato de Sódio, 20% PEG 3000 (Refinamento da condição D05 Jena Bioscience) + 30% dioxane (aditivo).

Padrão de Difração	Condição	Estratégia de coleta	Resolução	Grupo Espacial	Célula Unitária	R _{Sym}
2,58A	3.5 M de Formato de Sódio, 0,1 M de Tris pH 8.0	D = 110 mm; 150 imagens	2,7 Å	Р3	a = 112,3 b= 112,3 c = 302,7	0,579 (0,803)
	3.5 M de Formato de Sódio,	D = 200 mm, 181 imagens	3,6 Å	P3	a = 118,96, b = 118,96, c = 293,54	0,509 (0,603)
$\overline{}$	0,1 M de Tris pH 8.0		3,7 Å	C2	a = 117,73 , b -= 206,2, c = 293,76	0,647 (0,756)
	3.5 M de Formato de Sódio,	D = 200 mm, 2 Theta 11°, 360 imagens	2,75 Å	P3	a=120,2b = 120,2 c=300,41	0,709 (0,512)
	0,1 M de Tris pH 8.0		2,77 Å	P2	a =117,405 b = 290,823 c =116,47	0,526 (0,912)
			3,32 Å	C2	a =115,942 b = 205,877 c 292,506	0,558 (0,246)
			2,8 Å	C222	a =115,722 b = 205,826 c 292,325	0,506 (0,837)
	200-0010-0010 No. 21 12		3,99 Å	P1	a =118,788 b= 119,546 c =295,330	0,175 (0,409)
	1,0 M de Tartarato de Potássio e Sódio; 0,1 M	Phi = 0,2°, distancia de 120 mm, 556 imagens	3,55 Å	P3	a=115,876b=115,876c288,686	0,435 (0,429
-	Imidazol pH 8		3,55 Å	C2	a =120,083 b = 206,209 c=288,411	0,216 (0,163)
			3,84 Å	P2	a =115,83 b = 288,166 c =116,768	0,435 (0,429)
			3,76 Å	C222	a =116,73 b = 206,542 c =293,058	0,424 (0,450)

Tabela 7– Dados de coleta e processamento dos cristais da proteína MalE de *Xac* submetidos ao feixe de raios X.

Ainda como tentativa de melhorar a qualidade dos cristais da proteína MalE, a cauda de histidina foi removida com as proteases termolisina e subtilisina, já que as tentativas de remover a sequência com trombina não funcionaram. Pela predição do sítio de clivagem da termolisina, houve remoção de 33 aminoácidos da MalE de Xac de acordo com a predição do (http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/). programa "Peptide cutter" Tais amostras, submetidas aos ensaios de dicroísmo circular apresentaram perda de sinal a 222 nm, perda de estrutura secundária em forma de hélices alfa, quando comparadas com a proteína com cauda, principalmente em presença de maltose. Os ensaios de cristalização destas proteínas não geraram cristais (dados não mostrados). A cristalização da MalE na melhor condição obtida até então (0.1 M de Tris pH 8.0 e 3.5 M de formato de sódio), foi realizada com amostras de proteína preparadas em maior concentração de tampão, 50 mM de Tris pH 8.0 e não 20 mM como nos ensaios anteriores. Pela primeira vez, foi possível obter dados de um cristal com difração e resolução máxima de 2,24 Å (Figura 19), com simetria e ausências sistemáticas de um grupo espacial ortorrômbico P6122. A tabela 8 resume as estatísticas da coleta de dados. O coeficiente de Matthews (Matthews, 1968) calcula o conteúdo de solvente presente num

dado cristal, que pode ser feito medindo-se sua densidade. A densidade do solvente em equilíbrio com o cristal pode ser usada para determinar qual a fração do cristal é ocupada pelo solvente e qual fração é ocupada pela proteína. O coeficiente é facilmente calculado através da fórmula:

Volume da célula unitária Peso molecular da proteína *Z*X

onde Z é o número de unidades assimétricas existentes na célula unitária e X é o numero de moléculas na unidade assimétrica.

Para a MalE de *Xac* o coeficiente de Matthews foi calculado para 3,29 e o conteúdo do solvente foi de 62,59% o que corresponde a 2 moléculas dentro da unidade assimétrica. Os dados apresentados foram publicados recentemente (Souza et al., 2009).

Apesar dos dados estatísticos deste cristal serem muito bons, as tentativas de resolução da estrutura pelo método de substituição molecular, através do qual usaríamos as coordenadas estruturais de ortólogos com estrutura resolvida, não foi possível. As tentativas de substituição molecular foram feitas utilizando-se diferentes estruturas proteicas como modelo. A primeira tentativa foi feita com a proteína ligadora de trealose e maltose de *Termococcos litoralis* (TMBP_*Tli*, código do PDB 1EU8), ortólogo que compartilha a maior identidade de sequência de aminoácidos com a MalE de *Xac*. As soluções de fases encontradas pelo programa MolRep (Vagin e Teplyakov, 2002) não foram adequadas, com estatísticas e valores de Rfree maiores que 60%, indicativo de que o modelo gerado não se encaixa nos dados experimentais. Outras coordenadas estruturais de ortólogos com estrutura resolvida também foram usadas, como as da MalE de *E. coli* ligada a maltose (MBP_*Eco*, código do PDB 1ANF), mas também não foi possível encontrar a fase para a resolução da estrutura.



Figura 19 – Padrão de difração do cristal da proteína MalE de *Xac* com resolução de 2.24 Å, obtido após seu crescimento em 0.1 M de Tris pH 8.0 e 3.5 M de formato de sódio.

Tabela 8 - E	Estatís	sticas dos	dad	os de coleta	e do processam	iento	do cris	tal da proteír	na N	IalE de
	Xac.	Valores	em	parênteses	correspondem	aos	dados	observados	na	última
	cama	da de res	oluçã	ão 2.85 − 2.2	24 Å.					

Grupo Espacial	P6122
Parâmetros de Célula Unitária (Å)	a = 123.59, b = 123.59, c = 304.20 α = 90.00, β = 90.00, γ = 120.00
Mosaicidade (°)	0,24
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	0.84
Oscilação (°)	1
Distância do detector (mm)	325
Número de imagens	360
Limites de resolução (Å)	50 - 2.24 (2.36 - 2.24)
I/σ(I) após merging	23.1 (4.5)
Completeza (%)	99.9 (99.8)
Multiplicity	10.9 (11.1)
R _{merge}	0.07 (0.45)
Número de reflexões	726568 (105326)
Número de reflexões únicas	66688 (9508)

4.9 Análises *in silico* da MalE e do transportador *malElacFG* por métodos de Bioinformática

4.9.1 Organização do operon mal em Xac

Em Xac o operon malELacFG (5' – 2699595..2702679 -3') é formado por três genes: XAC2308, XAC2309 e XAC2310 que codificam respectivamente, a proteína ligadora com 456 resíduos (MalE), uma permease com 294 resíduos (LacF) e outra permease com 278 resíduos (LacG) (Figura 20). A função do operon sugere transporte de açúcar, mas sem definir o tipo. Ao compararmos o operon malElacFG de Xac com os respectivos operons de outras bactérias fitopatogênicas com o genoma seqüenciado, nota-se a alta conservação refletida em valores de identidade de sequência acima de 70% (Tabela 19). A presença do gene que codifica a proteína ligadora de nucleotídeos ou ATPase não é identificada à jusante ou à montante do operon. Utilizando-se a sequência de aminoácidos da ATPase do transportador de *E. coli*, MalK, para buscar ortólogos no genoma de Xac, foi possível identificar uma proteína anotada como UgpC que apresenta 50% de identidade de sequência com MalK de *E. coli*, mas que se encontra em outra região do genoma, distante do operon de interesse, diferentemente do que acontece em *E. coli* e *Pirococcus furiosus*, onde o gene que codifica a ATPase faz parte do mesmo operon (Figura 21).

Enquanto a MalF de *E coli* possui um tamanho de 514 resíduos, os ortólogos encontrados nas espécies do gênero *Xanthomonas* analisados, apresentam 294 resíduos e compartilham uma alta identidade de sequência (em torno de 97%). Alta identidade em relação à LacF de *Xac* (82%) também é evidenciada para o ortólogo de *Xylella fastidiosa* que possui 293 resíduos. Por outro lado, a análise dos ortólogos de LacF nos organismos que apresentam as proteínas ligadoras com estrutura resolvida como *T. litoralis, A. acidocaldarius, P. furiosus, Thermus thermophilus* e *Termotoga marítima,* mostra que estes apresentam tamanhos variados, bem como as identidades de sequência de aminoácidos. MalF de *A. acidocaldarius* apresentou maior identidade com a MalF de *E.coli,* com tamanhos similares (321 resíduos e 514 resíduos, respectivamente). Em relação à LacF de *Xac,* a proteína que possui maior identidade é a MalF de *T. litoralis,* como evidenciado para a proteína periplasmática (Tabela 9).


Figura 20 – Organização gênica do possível operon de maltose em Xac e em outras bactérias fitopatógenas com o genoma recentemente seqüenciado. Xac (Xanthomonas axonopodis pv citri); Xcc (Xanthomonas campestris pv campestris ATCC 33913); Xcb (Xanthomonas campestris pv. campestris 8004); Xcv (Xanthomonas campestris pv. vesicatoria); Xom (Xanthomonas oryzae MAFF311018); Xoo (Xanthomonas oryzae KACC10331), Xop (Xanthomonas oryzae PXO99A); Xfa (Xylella fastidiosa 9a5c); Xft (Xylella fastidiosa Temecula1); Xfm (Xylella fastidiosa M12)



Figura 21 – Organização dos operons de maltose encontrados em microrganismos cujos ortólogos de MalE tiveram sua estrutura terciária resolvida. Eco (Escherichia coli K-12 MG1655); Pfu (Pirococcus furiosus); Tth (Thermus thermophilus), Tma (Thermotoga maritima); Acy (Alyciclobacillus acidocaldarius); Tli (Thermococcus litoralis).

Tabela 9 – Comparação dos ortólogos de LacF, MalF e UgpC de Xac presentes em
bactériasfitopatogênicas e nos microrganismos cujas proteínas periplasmáticas
ligadoras de maltose tiveram suas estruturas tri-dimensionais resolvidas.

0 1/1

Ortologos de Lacr								
Organismo	n° de resíduos na proteína	Identidade com Xac	Identidade com E. coli					
Xac_LacF	294	100 %	27%					
Xcc	294	97%	27%					
Xcv	294	98%	27%					
Xoo	294	98%	27%					
Xyl	293	82%	27%					
Eco	514	27%	100%					
Tli	300	32%	28%					
Acy	321	27%	33%					
Pfu	298	27%	31%					
Tth	442	28%	27%					
Тта	823	13%	10%					

TE

Ortólogos de LacG

Organismo	Tamanho (n° de resíduos)	Identidade com Xac	Identidade com E. coli
Xac	278	100%	23%
Xcc	278	95%	26%
Xcv	278	98%	26%
Xoo	278	98%	24%
Xyl	278	78%	24%
Eco	296	23%	100%
Tli	278	26%	29%
Acy	301	27%	32%
Pfu	415	24%	29%
Tth	439	26%	38%
Тта	577	18%	18%

Ortólogos de UgpC

Organismo	Tamanho (nº de resíduos)	Identidade com <i>Xac</i>	Identidade com <i>E_coli</i>	
Xac	362	100%	49%	
Xcc	364	92%	49%	
Xcv	362	98%	50%	
Xoo	365	96%	49%	
Xyl	364	70%	48%	
Eco	371	49%	100%	*
Tli	372	49%	45%	Α
Acy	384	52%	46%	s
Pfu	372	49%	45%	
Tth	376	53%	49%	i,
Тта	369	51%	45%	d e
				c

ntidades referem-se à identidade de sequência de aminoácidos, obtidas após o alinhamento das proteínas com o programa Align (http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/).

Diferentemente da MalF de *E. coli*, que apresenta 514 resíduos, a outra permease, a MalG é constituída de 296 resíduos. Em termos de tamanho de proteína, A LacF é semelhante em seus ortólogos presentes em fitopatógenos como também nos ortólogos de *E. coli, T. litoralis* e *A. acidocaldarius.* Os ortólogos diferentes são os de *T. thermophilus, T. maritima* e *P. furiosus.* As identidades de sequências novamente seguem o padrão apresentado para a proteína LacF, onde os ortólogos de LacG em fitopatógenos apresentam alta identidade e nas diferentes bactérias, identidades menores variando de 18% a 27% (Tabela 9). A proteína de *Xac* apresenta uma maior identidade quando comparada com os ortólogos presentes nas bactérias extremófilas como *T. litoralis* e *P. furiosus.* Quando analisamos as ATPases presentes observamos um maior grau de conservação da UgpC de *Xac* com todos os ortólogos, o que era esperado, pois esta proteína tem sido reportada como a mais conservada em sistemas do tipo ABC (Tabela 9).

4.9.2 Alinhamentos da sequência de aminoácido da MalE de *Xac* com ortólogos e busca por domínios estruturais e funcionais conservados

O alinhamento de seqüências de aminoácidos da MalE de *Xac* com diferentes ortólogos revelou padrões semelhantes aos observados com as demais proteínas do operon, com valores elevados de identidade entre as bactérias fitopatógenas (mais de 90%) e *X. fastidiosa* (73%) (Tabela 10). O alinhamento de seqüência de aminoácidos da MalE de *Xac* com seis ortólogos com a estrutura tri-dimensional resolvida experimentalmente revelou baixa identidade de seqüência com valores mais baixos encontrados para o ortólogo de *P. furiosus* (15,%) e mais altos para o ortólogo de *T. litoralis* (22,2%). A busca por domínios estruturais conservados na proteína MalE, com o auxílio do programa "Domain Search", disponível no site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), mostra que esta proteína conserva domínios de proteínas ligadoras periplasmáticas (SBP, substrate binding protein), transportadores de açúcares (UgpB), proteínas ligadoras de maltose e maltodextrinas (MBP) e proteínas ligadoras de espermina e putrescina (PotF) (Figura 22).

Organismo	Nº de	Identidade
X 7 J J 1 i i	restauos	1000 Ad
Xanthomonas axonopodis pv citri	456	100%
Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10]	456	97%
Xanthomonas oryzae pv. oryzae MAFF 311018	456	94%
Xanthomonas oryzae pv. oryzae KACC10331	456	94%
Xanthomonas campestris pv. campestris str. 8004	448	90%
Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913	448	90%
Xylella fastidiosa	430	73%
Escherichia coli	396	19%
Thermococcus litorali	450	22%
Pyrococcus furiosus	372	16%
Thermotoga maritma	391	21%
Thermus thermophilus	398	19%
Alyciclobacillus acidocaldarius	427	18%

Tabela 10 – Identidade dos ortólogos da proteína MalE de Xac encontrados em
diversos fitopatógenos e nos orólogos que obtiveram sua estrutura
resolvida.

- *As identidades referem-se à identidade de sequência de aminoácidos, obtidas após o alinhamento das proteínas com o programa Align (http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/).



Figura 22 – Análises de domínios estruturais e funcionais conservados da MalE de Xac baseado na comparação com outras proteínas periplasmáticas ligadoras, como determinado pelo proprama "Conserved Domain Search". A barra e os números no topo da figura (peptídeo sinal em cinza, seqüência madura em preto) referem-se ao tamanho em aminoácidos da MalE de XacAs caixas indicam as classes das proteínas ligadoras que compartilham domínios estruturais e funcionais com a proteína MalE de Xac, como indicado: SBP: proteína ligadora solúvel extracelular; UgpB: proteína ligadora de açúcares ,e PotD: proteínas ligadoras de putrescina/espermina. O número de acesso de cada classe de proteína que compartilha similaridade com a MalE de Xac estão indicados, bem como os valores de similaridade calculados com , expressos em porcentagem da MalE de Xac utilizada nesta análise (SBP, 330 resíduos; UgpB, 403 resíduos: MalE, 420 resíduos, e PotD, 363 resíduos).

4.9.3 Construção de um modelo da estrutura tri-dimensional da MalE de

Xac

Baseados no fato de que as proteínas ligadoras apresentam baixa identidade de sequência mas conservam alta homologia estrutural, achamos que seria possível usar as estruturas disponíveis dos ortólogos de MalE para a construção de um modelo desta proteína. O primeiro passo após a realização da comparação das sequências, que havia indicado que o ortólogo com maior identidade era a proteína ligadora de trealose e maltose de T. litoralis, com 22% de identidade, foi analisar o alinhamento individual entre a MalE de Xac e cada um de seus ortólogos com o objetivo de identificar as regiões de inserções e deleções que poderiam ser usadas ou retiradas para a construção de um modelo mais adequado. Notadamente, a MalE de Xac apresenta uma região de 40 resíduos no C-terminal não evidenciada em nenhum outro ortólogo (Arg⁴¹²-Ala⁴⁵²), e que não poderia ser usada na construção do modelo já que esta região ficaria sem estrutura. A região referente ao peptídeo sinal (primeiros 21 resíduos, conforme análise do programa SignalP) também foi retirada. Neste caso, dois modelos foram construídos utilizando-se as coordenadas estruturais dos ortólogos da MalE de T. litoralis (ligada à trealose) e E. coli (ligada à maltose). Em princípio, a escolha do ortólogo com estrutura resolvida para a construção do modelo deveria ser baseada na maior identidade de sequência de aminoácidos, o que nos levou ao ortólogo de T. *litoralis*. Contudo, este ortólogo mostrou habilidade em ligar trealose melhor do que maltose, visto que sua estrutura foi resolvida com este açúcar. Os experimentos da MalE de Xac (dicroísmo circular, fluorescência e cristalização) sugeriram que o melhor ligante era maltose e não trealose. Neste caso, também escolhemos o ortólogo de E. coli ligado à maltose para a construção de um segundo modelo da MalE de Xac. Posteriormente, para análise e discussão dos dados de fluorescência, a disponibilidade de um modelo de Termotoga maritima sem o ligante também foi interessante e um terceiro modelo foi construído para a MalE de Xac não ligada.

Dez modelos foram gerados para cada estrutura usada e todos eles foram analisados individualmente para suas qualidades estereoquímicas, primeiramente, utilizando-se o programa SAVS (http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/), e posteriormente usando o programa COOT para refinamento. Finalmente, um modelo de cada ensaio foi escolhido para as futuras análises.

Os três modelos finais foram validados com o programa Procheck e apresentaram uma boa qualidade estereoquímica. A análise do gráfico de Ramachandran (Ramachandran, 1963) mostrou que 90% dos resíduos de aminoácidos nos modelos com ligantes encontram-se em regiões favoráveis, sendo que para o modelo baseado em *T. litoralis*, não há resíduos em regiões não permitidas. O modelo de *E. coli* apresenta também boa qualidade estereoquímica,

mas 0.6% dos resíduos posicionam-se em posições não permitidas. (Figura 23). Primeiramente, este modelo tinha 1,4% de seus resíduos em regiões não satisfatórias, número reduzido após o refinamento da estrutura usando o programa Coot. Além da validação com o PROCHECK, usamos o programa Verify 3D que também mostrou que os modelos apresentavam boa qualidade esteroquímica, uma vez que 80%, 87% e 85% dos resíduos de aminoácidos dos modelos estavam bem avaliados.

Após o refinamento de cada um dos modelos, estes foram comparados com as estruturas dos ortólogos, através da sobreposição dos carbonos alfa tendo por base o modelo da MalE de *Xac* sem ligante, o programa utilizado para sobrepor os modelos e as estruturas dos ortólogos foi o Coot (Emsley e Cowtan, 2004), (Tabela 11). Notamos que ao superpomos os modelos da MalE de *Xac* aberto e fechados, obtivemos um rmsd maior, que se deve, provavemente, às diferenças nos modelos com ligante (MalE_Tli e MalE_Eco) e sem ligante (MalE_Tma).

Para comparação da estrutura da MalE com as demais, foi realizado um alinhamento da sequência de aminoácidos de todos os ortólogos com estrutura resolvida, incluindo a MalE de *Xac* com o programa ClustalW2. Este alinhamento sequencial teve os resíduos corrigidos manualmente para formação de um alinhamento estrutural, baseado nas superposições realizadas no programa COOT. Neste caso, o modelo da MalE de *Xac* baseado em *T. litoralis* foi usado. O alinhamento revela que as proteínas conservam os elementos de estrutura secundária (helices alfa em cinza escuro, alças e folhas beta em cinza claro) organizados (Figura 24).

Os modelos de MalE baseados nas estruturas com ligantes (códigos PDB 1EU8 e 1ANF) revelaram uma organização tri-dimensional conservada, consistindo de dois domínios (domínios I e II), formado por duas seqüências não contínuas de estruturas em folhas beta cercadas por hélices-alfa, delimitando a fenda ligadora de açúcar. No modelo baseado no ortólogo de *T. litoralis*, os resíduos de 1 até 118 e 279 a 330 estão organizados em 5 folhas beta antiparalelas rodeadas por 8 hélices-alfa. Similarmente, o domínio II é caracterizado por três folhas beta antiparalelas flanqueadas por 9 hélices-alfa, definidas pelos resíduos 121-273 e 331-391 (Figura 25A). A comparação entre os três modelos gerados não mostra diferenças significativas em termos de estrutura secundária, mas evidencia os resíduos estão localizados em alças e folhas betas que localizam-se na região de dobradiça das proteínas ligadas com a proteína sem ligante (figura 25C e D) a distância equivalente entre esses resíduos varia de 4 Å a 9 Å.

Além disso há uma diferença nas dimensões das proteína ligadas e não ligada, a MalE de *Xac* sem ligante possui uma largura (resíduo Gly⁴ até o Val¹⁵⁶) de 73,25 Å, já na proteína ligada esta medida sofre uma redução para 55,58 Å. A distância entre os mesmos resíduos (Gly²¹³ e Hist³⁷⁴) do modelo aberto e com maltose é 24, 52 Å e 22,59 Å, respectivamente. Na presença de trealose as medidas entre estes resíduos são 20,98 Å e 24,09 Å (Figura 25C e D). A variação nas dimensões das proteínas na ausência e presença de ligante demonstra o movimento da proteína provocado pela ausência ou presença de ligante.

Modelo baseado	Madala basada am	
	modelo baseado em	Modelo baseado
em T. litoralis	E. coli	em T. maritima
285/ 3,3	310/ 3,8	390/
329/ 2,17	390/	310/ 3,8
390/ -	329/ 2,17	285/ 3,38
388/ 0.5	335/ 2,2	340/2,1
334/ 2.2	350/2,7	370/ 2,0
331/2.1	320/ 2,2	350/ 2,8
330/ 2.2	323/ 2,6	315/ 2,9
318/ 2.2	315/ 2,7	317/ 2,6
326/ 2.1	350/ 2,1	320/ 2,7
	em <i>T. litoralis</i> 285/ 3,3 329/ 2,17 390/ - 388/ 0.5 334/ 2.2 331/ 2.1 330/ 2.2 318/ 2.2 326/ 2.1	em T. litoralisE. coli285/3,3310/3,8329/2,17390/390/-329/2,17388/0.5335/2,2334/2.2350/2,7331/2.1320/2,2330/2.2323/2,6318/2.2315/2,7326/2.1350/2,1

Tabela 11 – Comparação entre os modelos da MalE de *Xac* obtidos e as estruturas dos ortólogos.

r.m.s.d = *desvio quadrado médio para os carbonos alfa*



Resíduos em regiões favoraveis - 90,4%Resíduos em regiões permitidas adicionais - 9,3%Resíduos em regiões generosamente permitidas - 0,3%Resíduos em regiões não permitidas - 0,0%

Resíduos em regiões favoráveis – 89,8% Resíduos em regiões permitidas adicionais - 8,7% Resíduos em regiões generosamente permitidas - 0,9 Resíduos em regiões não permitidas – 0,6 %



Figura 23 – Gráficos de Ramachandran para os modelos da MalE de Xac obtidos a partir das coordenadas estruturais das MBP de (A) *T. litoralis* ligada a trealose (código do PDB 1EU8); (B) *E. coli* ligada a maltose (código do PDB 1ANF) e (C) *T. maritima* sem ligante (2GHB).



Cinza escura = hélices-alfa

Cinza claro = folhas-beta

Sublinhado = resíduos que formam o bolsão de ligação ao ligante

- Negrito = resíduos que fazem ligação de hidrogênio com os açúcares
- **Figura 24** Alinhamento estrutural de aminoácidos dos ortólogos de MBP com a estrutura modelo de MalE de *Xac* baseada nas coordenadas estruturais de *T. litoralis*. As sequências foram obtidas no Protein Data Bank e correspondem à: *Eco_MBP* (Eco_1ANF + maltose)), *Tli_MBP* (Tli_1EU8 + trealose), *Tth_MBP* (Tth_ 2GH9 + maltotriose), *Pfu_MBP* (Pfu_1ELJ + maltotriose), *Tma_MBP* (Tma_2FNC + maltotriose) and *Acy_MBP* (Acy_1URG + maltose). As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTALW2 (Thompson et al.., 1997) e corrigidas por inspeção visual das estruturas sobrepostas. O resíduos coloridos em cinza claro (folhas- β) e cinza escuro (hélices-alfa) indicam a estrutura secundária compartilhada pela MalE de *Xac* com seus ortólogos. As caixas numeradas de I a X indicam regiões envolvidas com a interação com maltose ou trealose, de acordo com o modelo da MalE de *Xac*. Resíduos marcados em negrito estão localizados no bolsão que contém a fenda ligadora e aqueles sublinhados em negrito interagem especificamente com a molécula de açúcar. A sequência da MalE de *Xac* não apresenta os primeiros 21 resíduos do N-terminal, codificadores do peptídeo sinal e os 40 últimos resíduos do C-terminal.



Figura 25 – Modelo Tri-dimensional da proteína MalE de Xac. A) Ilustração do modelo da estrutura terciária de MalE Xac feito a partir da MBP DE T. litoralis. N e Cterminais estão descritos e os domínios I e II estão coloridos em azul e roxo, respectivamente. As folhas-betas e hélices estão marcadas com símbolos e números romanos na ordem da seqüência do polipetídeo. B) Sobreposição das cadeias principais das estruturas de MBP: Xac (azul), Eco (vermelho), Tli (verde). As figuras foram produzidas utilizando-se o programa Pymol (De Lano, 2002) e a sobreposição foi gerada com o programa COOT (Krissinel e Henrick, 2004); C) sobreposições das cadeias principais dos Modelos MalE sem ligante (baseado no PDB 2GHB de T. marítima sem ligante, em verde) e MalE com maltose (baseado no PDB 1ANF de E. coli com maltose, em rosa); D) sobreposições das cadeias principais dos Modelos MalE sem ligante e MalE com trealose (baseado no PDB 1EU8 de T. litoralis com trealose, em azul). As setas indicam o deslocamento entre resíduos idênticos nas proteínas analisadas (His³⁷⁴ e G²¹³), evidenciando essencialmente a movimentação do domínio II para originar os estados aberto e fechado. Os resíduos Gly⁴ e Val¹⁵⁶ posicionamse nas extremidades dos domínios I e II, respectivamente, quando a proteína é observada na sua face frontal, com a fenda para cima.

A sobreposição da MalE de *Xac* com o ortólogo de *T. litoralis* (figura 25B) revelou duas folhas anti-paralelas adicionais em *T. litoralis* formada pelos resíduos Leu¹⁹⁵-Pro²⁰⁵. Comparação da MalE de *Xac* com a de *E. coli* revelou três alças extras na MalE de *Xac* formada pelos resíduos Ala⁸⁷-Asp⁹⁶, Gly¹³⁴-Met¹³⁸ e Gln²⁵²-Glu²⁵⁷

A organização estrutural do domínio I e II com relação às folhas beta é -1, +2, +2, -1 e -1, +2, de acordo com a nomenclatura proposta por Richardson (Richardson, 1977). A conexão entre os lóbulos envolve duas alças (resíduos 119 - 120 e 274 - 278, respectivamente) estando situados ao fundo do bolsão que contém a fenda ligadora de acúcar, do lado oposto a entrada da fenda. O conteúdo de estrutura secundária do modelo estrutural da MalE de Xac contém 15% de folhas β , 40% de alças e 45% de hélices-alfa que estão de acordo com o os valores encontrados (16%, 45% e 49%, respectivamente) nos experimentos de dicroísmo circular (Balan et al., 2005). Baseado na predição de estrutura realizada pelo programa PsiPred, os últimos 40 aminoácidos da região C-terminal formam duas hélices-alfa conectadas por uma alça (dados não mostrados). Utilizando-se da estrutura tri-dimensional do ortólogo de MBP de T. maritima, resolvida na sua forma aberta, sem ligante, os modelos da MalE de Xac obtidos a partir das estruturas de E. coli e T. litoralis, foram sobrepostos à estrutura de T. maritima para identificar as possíveis movimentações ocorridas nas proteínas. A análise mostra que o domínio II é responsável pela abertura da fenda, nas dois modelos, para a entrada do ligante a partir da movimentação dos resíduos na alça de interligação. Quando as proteínas estão em sua forma fechada, a distância entre os resíduos Gly⁴ e Val¹⁵⁶, localizados em extremidades opostas, é de aproximadamente 55 Å e 56 Å, para os modelos baseados em E. coli e T. litoralis, respectivamente. Já nas formas abertas, ocorre um aumento nestas distâncias de aproximadamente 18 Å e 13 Å, para as mesmas proteínas.

4.9.4 Modelagem molecular das interações de MalE de *Xac* com trealose e maltose

Como os resultados espectroscópicos indicaram alterações da estrutura secundária da MalE na presença de maltose e em menor quantidade trealose, resolvemos avaliar através da modelagem molecular ("docking") as possíveis interações de tais açúcares nos modelos propostos. O modelo da MalE de *Xac* baseado nas coordenadas estruturais do ortólogo de maior identidade (22 % *T. litoralis* ligado a trealose) mostrou que o bolsão de ligação mantém um espaço onde é possível acomodar tanto trealose como maltose. Porém, sabemos que a

habilidade da ligação não está correlacionada somente com espaço, mas também com as interações possíveis entre a proteína e o açúcar em questão, por isso o posicionamento da trealose foi realizado com o modelo da MalE baseado na estrutura de Tli e o posicionamento da maltose foi realizado utilizando-se o modelo da MalE de *Xac* criado com base nas coordenadas da MalE de *E. coli* ligada a maltose (19% de identidade). Os dois modelos foram construídos e validados de acordo com o que foi descrito no material e métodos. Apesar dos dois modelos apresentarem diferenças (r.m.s.d. entre ambos de 1,9 Å), o bolsão ligador mantém preservados os resíduos que interagem com os açúcares (Figura 26, resíduos em vermelho).

O docking foi realizado utilizando-se os programas contidos no "package GOLD Suite version 4.0", através da minimização de energia dos açúcares durante 10 ns, foram geradas 5 possibilidades de posições para a trealose e 10 para a maltose, todas avaliadas quanto à energia mínima, posição do ligante e interação. Dois modelos, um de cada ligante, foram escolhidos e avaliados nas respectivas estruturas.

A tabela 12 apresenta os resíduos que interagem com os açúcares através de ligações de hidrogênio. O bolsão ligador da MalE de *Xac* é formado por uma fenda entre os domínios I e II, a ligação da maltose e trealose foi modelada sem moléculas de água, e envolvem principalmente ligações de hidrogênio (Figura 26 e tabela 12). A maltose é mantida por 12 interações polares com as cadeias laterais dos resíduos Glu¹⁶ (alça entre α 1e β 1), Trp⁶⁹ (α 3), Asp¹¹⁹ (final da β 5), Arg¹²¹, (alça entre β 5 e β 6), Glu¹⁶⁹ (α 8), Ser²⁷⁹ (β 9) e uma interação com a cadeia principal do resíduo Gly⁶⁶ (final da β 3) (Figura 26A e tabela 12).

Ao compararmos os resíduos que interagem com os açúcares nos ortólogos e na MalE de *Xac* (Tabela 13), verificamos que o conteúdo de estrutura secundária e os tipos de resíduos envolvidos na ligação aos açúcares estão relacionados (Figura 24 e tabela 13). O grupo das bactérias termofílicas incluindo *E. coli*, conserva muitos resíduos alinhados estruturalmente, como observamos para Asp e Trp da região III, Glu da região IV, Tyr, Phe e resíduos não polares da região V e, Trp da região VII (Figura 24 e tabela 13)

Cinco dos oito resíduos que interagem com a maltose pertencem ao domínio I e somente Asp^{119} é conservado em posição com o encontrado no ortólogo de *E. coli*. O resíduo Glu^{16} é estruturalmente conservado e alinhado com Glu^{17} da MalE de *T. litoralis*. Dos 8 resíduos envolvidos na formação de ligações de hidrogênio com a maltose, verificamos que seis deles são polares, dos quais 5 são carregados. Os dois restantes são apolares, sendo que um deles é um aromático (Trp⁶⁹).

As interações polares com a trealose envolvem as cadeias laterais dos resíduos Tyr¹¹⁷, Asp¹¹⁹, Asn²²⁵ e Asp³¹⁵ (Figura 26B). Somente os dois primeiros são estruturalmente alinhados com a MalE de Tli (Tabela 13). Na ligação com trealose existem somente resíduos polares, sendo que 50% deles são carregados e um dos polares neutros é um aromático (Tyr¹¹⁷). Apesar da MalE de Xac apresentar maior identidade com o ortólogo de Tli, a interação com trealose apresentou somente quatro contatos, enquanto que a MalE de Tli apresenta oito resíduos interagindo com o ligante. Analisando-se os resíduos que interagem com os açúcares em todos os ortólogos com estrutura resolvida podemos verificar a presença de 10 regiões (caixas de I a X, Figura 24). As regiões que possuem um maior número de resíduos conservados são as de número I, III, IV, V, VII e VIII. Foi observado um alto grau de conservação dos resíduos polares e ácidos da região IV e aromáticos (Trp) da região III demonstra a importância destas regiões na interação com o açúcar. Verificamos também que todos os ortólogos compartilham a presença dos resíduos hidrofóbicos Trp e Met na região X, apesar destes resíduos não estarem alinhados estruturalmente. Um fato curioso é que todos os ortólogos analisados têm um grande número de resíduos aromáticos (Trp e Tyr) na composição de sua sequência de aminoácido (18 em T. thermophilus a 35 em T. litoralis, e 28 para Xac). Análises filogenéticas mostraram que as MalEs de Xac, T. litoralis e P. furiosus partilham o mesmo ramo filogenético.

No decorrer do trabalho, anotações do gene *malE* foram alteradas e a função deste foi associada à ligação de lactose e arabinose. A modelagem da MalE de *Xac* com ambos os açúcares apresentou somente interações fracas com os resíduos Asp^{119} (OD2-O1A, 3.03 Å) e Glu¹⁶⁹ (OE1-O2B, 3.40 Å e OE2-O3A, 3.02 Å). O "docking" baseado no modelo de *T. litoralis* possui também interações fracas feitas pelos resíduos : Asp^{119} (OD2-O6B, 2.35 Å), Asn^{225} (ND2-O2B, 3.54 Å) e Gly²⁷⁸ (N-O6B, 2.84 Å). O alinhamento da seqüência da MalE de *Xac* com a da proteína ligadora de arabinose (GI 16129851) mostrou uma identidade de somente 4%.



Figura 26 - Representação ilustrada das interações de MalE de Xac obtidas através de modelagem molecular. (A) Interações com maltose e (B) com trealose. As estruturas secundárias da proteína são mostradas em cores (azul claro para hélices alfa e roxo para as folhas beta), e os resíduos que interagem com os açúcares são mostrados em forma de stick (palitos). As linhas pontilhadas simbolizam ligações de hidrogênio.

MalE_maltose			MalE_threhalose		
Resíduose	Açúcar	Distância	Resíduos	Açúcar	Distância
		(Å)			(Å)
Glu16/OE2**	Glc372/O3	3.35	Tyr117/OH**	Tre414/O1	2.47
Gly66/N*	Glc371/O4	3.14	Tyr117/OH**	Tre414/O5P	2.68
Thr68/OG1*	Glc371/O1	3.01	Tyr117/OH**	Tre414/O6P	3.13
Thr68/OG1*	Glc371/O3	3.31	Asp119/OD2**	Tre414/O1	2.73
Thr68/OG1*	Glc371/O5	3.16	Asp119/OD2**	Tre414/O2	2.83
Trp69/NE1*	Glc371/O6	3.33	Asp119/OD2**	Tre414/O2P	2.72
Asp119/OD2*	Glc372/O2	3.34	Asn225/ND2*	Tre414/06	2.99
Asp119/OD2*	Glc372/O3	2.37	Asp315/OD1*	Tre414/O2	2.98
Arg121/NH2	Glc372/O6	3.15	Asp315/OD1*	Tre414/O3	3.18
Glu169/OE1	Glc371/O2	3.13	Asp315/OD2*	Tre414/O3	3.47
Glu169/OE1	Glc372/O6	2.62			
Ser279/OG*	Glc372/O3	3.25			

 Tabela 12– Resíduos envolvidos nas interações da MalE com maltose e trealose nos dois modelos construídos neste trabalho.

1 – Os anéis de glicose (Glc) são identificados como Glc1 e Glc2, nomeados da forma reduzida para a não-reduzida.

Xac_TRE	<i>Tli</i> _TRE	Xac_MAL	Eco_MAL	Eco_MTT	Acy_MAL	Acy_MTT	Pfu_MTT	Tth_MTT	Tma_MTT
								H8/ND1 XO1	S12 /OG AO2
			D14/OD1 AO1				Q15/N AO1	Ho/NDI AO2	
							-		E13/OE2 XO1
			K15 /NZAO2	K15 /NZAO2					
	E17/OE2 AO6	E16/OE2 BO3	KIJ/INZAOI	K15/INZAOI			E18/OE1 AO2		
	T46/N AO2								
	D40/NIL1 AO2					Q38/NE2AO3			
	R49/NH1 AO3								
			W62/NE1 BO2	W62/NE1B2O2 W62/NE1B2O3			W65/NE1 CO2		
	D70/OD1 AO3	G66/N AO4	D(5/0D1 D02		D05/0D2 CO2		D(0/0D1 CO2		D(()0D1 CO2
		T68/OG1 AO1 T68/OG1 AO5	D65/0D1 B02		D95/0D2 CO3		D68/0D1 CO2	D65/0D1 CO2 D65/0D2 CO3	D66/OD1 CO2
		T68/OG1 AO3			270,021,002			2007022000	200,022000
		W69/NE1 AO6	R66/NE BO3	R66/NE CO2	N96/ND2O3	N96/ND2 AO3	W69/NE1 CO3	W66/NE1 O3C	W67/NE CO3
V117/OH AO5	Y121/OH AO4		R00/NE BO4	K66/NE CO3					
Y117/OH BO1	Y121/OH AO6								
D119/OD2 AO2	D123/OD2 AO2	D119/OD2 BO2	E111/OE2 AO2		Q141/NEBO2	Q141/NE2 BO2	E116/OE2 BO2	E113/ OE2 BO2	E111/OE2 BO2
D119/OD2 BO1 D119/OD2 BO2		D119/0D2 B03							
210/022202		R121/NH2 BO6							
		E169/OE1 BO6							
		E169/OE1 AO2	E153/OE1BO6	E153/OE1CO6	N177ND2 BO6	N177ND2 BO6	N159/ND2 BO6	D155/0D1 CO6	N156/ND2 BO6
			Littl, olliboo	E153/OE1BO6	N177ND2 CO6	N177ND2 CO6	1110/11/02 000	D155/OD2 BO6	N156/OD1 CO6
N225/ND2 BO6	E239/OE2 BO6		V155 MDOC	V155/NDO(V1(1/N CO2		
	G294/N BO2		¥ 155/NBO6	Y 155/NBO6			¥ 161/ N CO3		
	G294/N BO3								
	W295/NE1 BO1	S279/OG BO3					K266/NZ AO3	Q269/NE2 BO2	Q266/ NE2 AO3
D315/OD2 BO2	W295/NET BO2							R305/NH2 AO2	Q266/ NE2 BO2 R303/NH1 AO3
D315/OD2 BO3								R305/NH1 AO3	R303/NH2 AO2
	D2(ANUIA DO2								
	K364/NH2 BO3 R364/NH1 BO4								
						W366/NE1CO3		W345/NE1 CO3	
				Y341/OHCO3					

Tabela 13 – Comparação dos resíduos que interagem com os ligantes na MalE de Xac e nos ortólogos analisados.

1- Todos os resíduos que interagem com o açúcar estão presentes;
 2- Resíduos presentes na mesma linha estão alinhados estruturalmente

4.9.5 Determinação da posição dos resíduos de triptofano em diferentes modelos da MalE

Resíduos de triptofano são utilizados como sondas em ensaios de fluorescência intrínseca, onde também pode-se medir a meia vida destes, bem como determinar a K_d , através da titulação de ligante. Os ensaios de fluorescência intrínseca da MalE de *Xac* mostraram alterações significativas quando a proteína estava em presença de maltose, principalmente apagamento da fluorescência dos triptofanos por movimentação dos mesmos para um ambiente mais hidrofóbico. A partir da construção dos modelos de MalE baseados nos ortólogos de *T. litoralis* e *E. coli* foi possível verificar a posição dos resíduos de triptofano na estrutura da proteína e identificar aqueles mais próximos do ligante no caso de interação. Adicionalmente, a disponibilidade da estrutura do ortólogo de *T. maritima* na forma não ligada, permitiu a construção de um modelo que simulava a MalE antes da possível interação com os açúcares, ou e sua forma aberta. Os 13 resíduos estão distribuídos na estrutura posicionados em diferentes regiões, mas é possível evidenciar que principalmente próximo à região do bolsão, que contém a fenda ligadora de açúcar e no próprio bolsão existem resíduos importantes (Figura 27).

A comparação dos modelos das proteínas em suas formas não ligada (Figura 27^a) e ligada à maltose ou trealose (Figura 27B e C) revela que ocorre o fechamento da fenda durante a interação do açúcar com a proteína, de forma que os lóbulos ou domínios são aproximados. Esta movimentação permitiria que regiões importantes da proteína sofressem alterações, inclusive aquelas onde há a presença de resíduos de triptofano. Alguns destes ocupam posições relevantes na estrutura como os Trp²²⁷, Trp²⁴³, Trp³⁵³, Trp⁶⁹, Trp¹¹ e Trp¹¹⁶. De acordo com Martineau (1990), na MalE de *E. coli*, os resíduos de Trp^{230/232} e Trp³⁴⁰ estão envolvidos com a diminuição da fluorescência em cerca de 23%. Na MalE de *Xac* estes resíduos estão alinhados com os resíduos Trp²⁴³ e Trp³⁵³, respectivamente (Figura 24). Na presença dos ligantes vários resíduos de Trp são escondidos quando ocorre o fechamento da proteína para a captação do açúcar. Estes modelos explicam os resultados obtidos nos ensaios anteriores.



Figura 27 – Representação dos modelos da MalE na forma de superfície mostrando as posições dos resíduos de triptofanos. (A) MalE de *Xac* sem ligante (aberta); (B) MalE de *Xac* ligada à maltose e (C) MalE de *Xac* ligada à trealose. Alguns dos resíduos de triptofanos estão representados em vermelho, em verde a maltose e em amarelo os N- e C- terminais.

4.9.6 - Análise dos domínios trans-membrana do operon *mal* (LacF e LacG)

A estrutura do transportador de maltose foi resolvida recentemente por Oldham e colaboradores (2008). O transportador encontra-se em um estado intermediário, com a MalE complexada às proteínas de membrana e com a maltose dentro dos domínios trans-membrana, no poro. Dado que as proteínas periplasmáticas apresentaram grande conservação estrutural, perguntamos se esta conservação poderia ser também estendida ao transportador como um

todo. A análise dos componentes do transportador de maltose de *E. coli* revelou algumas peculiaridades interessantes como a presença na proteína de membrana de um domínio extra que entra em contato com a proteína periplasmática. Neste caso, seria interessante verificar se os respectivos ortólogos dos transportadores de maltose também apresentavam esta alça ou outras peculiaridades. O transportador de maltose de *Xac* é constituído pela MalE e pelas proteínas trans-membrana LacF e LacG, como descrito anteriormente. A ATPase não foi identificada no operon, mas identificamos uma proteína, UgpC, codificada pelo gene *ugpC* em outra região no genoma, que apresenta 49% de identidade com a proteína ligadora de nucleotídeo MalK de *E. coli* (Tabela 9).

Para a comparação e construção de um modelo do operon em *Xac*, o primeiro passo foi identificar as proteínas de membrana de cada transportador e as proteínas citoplasmáticas, ou ATPases, para em seguida, realizarmos o alinhamento de seqüências. A análise das proteínas de membrana (MalF e MalG nos ortólogos e LacF e LacG em *Xac*) não mostra grandes similaridades. Dos sete resíduos da MalF de *E. coli* que interagem com a maltose na estrutura cristalográfica, somente a Tyr³⁹⁰ (Tyr¹⁷³ na LacF *de Xac*) são conservados nos ortólogos (Figura 28). Verificamos também que estes resíduos são altamente conservados nos ortólogos de LacF de outras espécies de *Xanthomonas* como: *X. orizae*, *X. campestris*, *X. vesicatoria* e também, *Xylella fastidiosa* (dados não mostrados). Os ortólogos da MalF de *A. acidocaldarius* e *T. thermophilus*, que possuem 33% e 27% de identidade com a MalF de *E. coli*, mantém três resíduos importantes para a interação com o açúcar (Asp³⁸³, Asp⁴³⁷ e Asp⁴⁴⁰).

Notamos também que apesar da baixa identidade de sequência da proteína MalF de *T. maritima* com os demais ortólogos, esta proteína é a única que possui inserções na sua região N-terminal (170 resíduos adicionais) semelhantes às de MalF de *E. coli*. Também é encontrada uma região entre os resíduos Glu¹⁸¹ e Leu⁴²⁶ (Val³ a Asp²⁴⁸ na MalF de *E. coli*) que é equivalente aos 3 domínios extras formados por três hélices trans-membrana encontrados no ortólogo de *E. coli* (Oldham et al.., 2007) (Figura 30). Apesar da baixa identidade de sequência entre os ortólogos de MalG, que varia entre 10% a 32%, os resíduos desta proteína que interagem com a MalK são bastante conservados nos ortólogos analisados (Figura 28B). Somente o ortólogo de *T. maritima* se destaca, apresentando uma região extra que não é encontrada nas outras proteínas estudadas (dados não mostrados).

Como era esperado, as proteínas ligadoras de nucleotídeo são altamente conservadas em todos os ortólogos analisados, com identidades de 46% para MalK de *A. acidocaldarius* X MalK de *E. coli*, 99% para a MalK de *T. litoralis* X MalK de *E. coli*) e 49% para a UgpC de *Xac* X MalK de *E. coli*. Todos os motivos e assinaturas típicos de um transportador ABC são conservados: Walker A e B e o Q loop. O alinhamento das ATPases revela que os resíduos que interagem com as proteínas de membrana em *E. coli* também são altamente conservados nos 5 ortólogos analisados (Figura 28C).

Com o objetivo de construirmos um modelo estrutural das proteínas LacFG, as coordenadas estruturais do transportador de *E. coli* (código do PDB 2R6G), foram usadas para a modelagem molecular (Figura 30). Os modelos das permeases foram validados com o programa Procheck, bem como os gráficos de Ramachandran (Figura 29A e 29B). A proteína LacF apresenta 27% de identidade em relação à MalF de *E. coli* e o modelo mostra que a alça citoplasmática e as três hélices na região trans-membrana são ausentes na LacF. Já a proteína LacG de *Xac* possui 32% de identidade quando comparada com a MalG de *E. coli* (296 resíduos e 301 resíduos, respectivamente), e a modelagem desta proteínas trans-membrana do possível transportador de maltose de *Xac* seriam mais parecidas com as proteínas dos transportadores de molibdato (Hollenstein et al.., 2007), metal (Pinkett et al.., 2007) e metionina (Kadaba et al.., 2008).

- 14	٤.
- 7	ъ.
£	-
	Å

Pfu	PWALPLL	123	IEVWLAYPFM	178	DV	LIE	AAII	DGANY	W	RLRH	VLPV	/VGKP	IAFAT	FILTS	AAS	FQYF	244
Acy	PWAVPNL	137	V VWAGFP M	192	TD	QYE	AAEI	DGA <mark>NW</mark>	7WQ	VFRY	TMPS	SVWRI	SLPLI	LIP <mark>F</mark> F	SYN	FNNF	249
Tth	SWALPGV	256	V LWLGFP M	310	DE	LYE	AKV	DGA <mark>T</mark> F	≥w <mark>ç</mark>	ALFR	TLP	LEKP	MLPI	LLSAF	AF <mark>N</mark>	FN <mark>I</mark> F	367
Tma	AFITTTV	612	FAYLTNIAN	692	TS	LEE	AIV	DGA <mark>T</mark> F	RFC	SFYK	IIP	ARPI	LTVVI	FLLVF	IGT:	FNEY	756
Tli	PWAVPTI	128	ADVWKTTPLM	182	QD	LYE	ALI	DGASM	IFE	RFKS	TLP	LKPV	LIVA	LILRT	IDA:	LRVF	239
Xac	PVVTTLV	120	FAVWKNFG	174	QD	LYE	ARI	DGASF	WK	QFVH	TVPN	4LGVL	MVVG	VITIS	GYF	QLFA	231
Eco	PYAVPF	330	VNTWLGYP.M	391	DD	LYE	ASAM	DGA <mark>G</mark> F	F	NFFK	TLP	LIKP	LTPLN	4IA F	AF	FNNF	441
					in the second												

	_
	1.2
_	

		-						
Eco	TIDSS	LEEA.	AALDG.	ATPW	AFRL	LLPI	S	211
Tth	SISPS	EEA.	AMV <mark>DG</mark>	ATRW	VFTKI	LLPI	S	353
Acy	SVPKE	DEA.	AVIDG	ATTW	RFIH	TLPI	s	215
Tli	QLPKD	DEA	AMIDG.	ASRI	KTLTTI	ILL	s	191
Pfu	SISPD	DEA	LVDG.	SYL	IIRY	LLPM	A	329
Xac	SIPDE	IEA	ARIDG	ASEM	RIFFQI	UVL PM	IL	193
Tma	SIPPE	YEV	AAIDG	AGRFI	RREVHI	TFPI	L	482
	1.000 0.000 0.000 0.000					_		

C	Walker A	
Acy	MARVLLEHIYKTYPGQTEPTVKDFNLDIQDKEFTVFVGPSGCGKTTTL <mark>R</mark> MI <mark>A</mark> G <mark>L</mark> EDIT	58
Tth	MAKVRLEHVWKRFGKVVAVKDFNLETEDGEFVVFVGPSGCGKTTTL <mark>R</mark> MI <mark>A</mark> G <mark>L</mark> EEIS	56
Pfu	MAGVRLVDVWKVFGEVTAVRELSLEVKDGEFMILLGPSGCGKTTTL <mark>R</mark> MI <mark>A</mark> G <mark>L</mark> EEPS	56
Tli	MAGVRLVDVWKVFGEVTAVREMSLEVKDGEFMILLGPSGCGKTTTL <mark>R</mark> MI <mark>A</mark> GLEEPS	56
Tma	MRMAQVVLENVTKVYEN-KVVAVKNANLVVEDKEFVVLLGPSGCGKTTTL <mark>R</mark> MI <mark>A</mark> G <mark>L</mark> EEIT	59
Xac	MAKVQLEGVRKVYDN-GQVAVQGASFEVADGELMVLVGPSGCGKSTLLRMIAGLEDIS	57
Eco	MASVQLQNVTKAWGEVVVSKDINLDIHEGEFVVFVGPSGCGKSTLL <mark>R</mark> MI <mark>A</mark> G <mark>L</mark> ETIT	56
	Q loop	
Acv	EGNLYIGDERVNDVPPKDEDIAMVFONYALYPHMTVYONMARCIKIEKVPKAEI	112
Tth	EGNIYIGDRLVNDVPPKDRDIAMVFONYALYPHMNVYENMAFGLRLRRYPKDEI	110
pfu	RGOIYIGDRLVADPEKGIFVPPKDRDIAMVFOSYALYPHMTVYDNIAFPLKLRKVPROEI	116
tli	RGOIYIGDKLVADPEKGIFVPPKDRDIAMVFOSYALYPHMTVYDNIAFPLKLRKVPROEI	116
tma	DGKIYIDGKVVNDVEPKDRDIAMVFONYALYPHMTVYENMAFGLKLRKYPKDEI	113
xac	AGTLKIGERVVNDVAPKDRDIAMVFOSYALYPHMTVAENLAFGLKLRGHPKOVI	111
eco	SGDLFIGEKRMNDTP <mark>PA</mark> ERG <mark>VG</mark> MVFQSY <mark>ALYPH</mark> LSVAENMS <mark>FG</mark> LKLAGAKKEVI	110
	Assinatura Walker B	
Acy	DRRVQEAAKILDIAHLLDRKPKALSGGQ <mark>R</mark> QRVALGRAIVREPQVFLMDEPLSNLDAKLRV	172
Tth	DRRVKEAARILKIEHLLNRKPRELSGGQ <mark>R</mark> QRVAMGRAIVREPKVFLMDEPLSNLDAKLRV	170
pfu	DQRVREVAELLGLTELLNRKPRELSGGQ <mark>R</mark> QRVALGRAIVRKPQVFLMDEPLSNLDAKLRV	176
tli	DQRVREVAELLGLTELLNRKPRELSGGQ <mark>R</mark> QRVALGRAIVRKPQVFLMDEPLSNLDAKLRV	176
tma	DRRVREAAKILGIENLLDRKPRQLSGGQ <mark>R</mark> QRVAVGRAIVRNPKVFLFDEPLSNLDAKLRV	173
xac	AERVNNAAELLGLTPMLDKLPKAMSGGQ <mark>R</mark> QRVALGRAMVRESSVFLLDEPLSNLDAKLRH	171

NQRVNQVAEVLQLAHLLDRKPKALSGGQRQRVAIGRTLVAEPSVFLLDEPLSNLDAALRV 170 eco Figura 28 - Alinhamento das seqüências dos ortólogos de MalF, MalG e MalK do transportador de maltose de E. coli. Somente as regiões de maior interesse são mostradas. (A) MalF de E. coli e ortólogos (incluindo LacF de Xac). Os resíduos coloridos em vermelho e azul escuro são aqueles que interagem com MalK e maltose, respectivamente, no transportador de E. coli e que são conservados. (B) MalG de E. coli e ortólogos (incluindo a LacG de Xac); (C) MalK e ortólogos (UgpC de Xac). Os resíduos nos ortólogos da MalK em verde fazem pontes salinas com MalF e MalG, os roxos formam interações Van der Waals com MalF e MalG e os em azul formam ligações de hidrogêncio com MalF e MalG ou somente com uma das proteínas de membrana.

As duas cadeias das proteínas ligadoras de nucleotídeos de *Xac* (UgpC) foram modeladas tendo por base as cadeias da MalK presente na estrutura do transportador de maltose (código do PDB 2R6G). A identidade destes ortólogos é de 49% (Tabela 9), sendo a maior entre os componentes do operon. Os modelos gerados foram validados quanto a sua qualidade esteroquímica utilizando-se os programas Verify 3D e Procheck (figura 29). Após a obtenção dos modelos estes foram sobrepostos com a estrutura do transportador de maltose utilizando-se o programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004), a fim de podermos obter o r.m.s.d. e a porcentagem de resíduos alinhados (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação estrutural dos modelos gerados para o operon malElacFG deXac com a estrutura do transportador de maltose de E. coli resolvida porOldham e colaboradores (2008), (código do PDB 2R6G).

Proteína	Número de	Identidade de	Alinhamento
	Resíduos	Seqüência	Estrutural dos C a
	Alinhados	(%)	r.s.m.d.* (Å)
MalE_Xac	456	100	-
MalE_Eco	337	19	2,7
LacF_Xac	294	100	-
MalF_Eco	248	27	1,7
LacG_Xac	278	100	-
MalG_Eco	235	26	1,0
UgpC_Xac	362	100	-
MalK_Eco (cadeia A)	323	89	3,7
MalK_Eco (cadeia B)	323	89	3,3

*r.m.s.d = desvio quadrado médio para os carbonos alfa



Resíduos em regiões favoráveis - 87,1% Resíduos em regiões permitidas adicionais - 11,0% Resíduos em regiões generosamente permitidas - 1,6% Resíduos em regiões não permitidas - 0,4%



Resíduos em regiões favoráveis – 87,1% Resíduos em regiões permitidas adicionais – 11,0% Resíduos em regiões generosamente permitidas – 1,6% Resíduos em regiões não permitidas – 0,4 %





Ramachandran Plot



Resíduos em regiões favoráveis - 92,1%Resíduos em regiões favoráveis - 92,8%Resíduos em regiões permitidas adicionais - 7,50%Resíduos em regiões permitidas adicionais - 7,2%Resíduos em regiões generosamente permitidas - 0,5%Resíduos em regiões generosamente permitidas - 0%Resíduos em regiões não permitidas - 0 %Resíduos em regiões não permitidas - 0 %

180

135

Figura 29 – Gráficos ramachandran mostram a qualidade estereoquímica dos modelos gerados para os componentes do operon mal em *Xac*. (A) modelo da LaCF de *Xac* produzido com a coordenadas da estrutura da MaIF (cadeia F) de *E.coli* presente na estrutura do transportador de maltose (código do PDB 2R6G); (B) modelo da LaCG de *Xac* produzido com a coordenadas da estrutura da MaIG (cadeia G) de *E. coli* presente na estrutura do transportador de maltose (código do PDB 2R6G); (C) modelo da UgpC de *Xac* (cadeia A) produzido com a coordenadas da estrutura do transportador de maltose (código do PDB 2R6G); (C) modelo da UgpC de *Xac* (cadeia A) produzido com a coordenadas da estrutura da MaIK (cadeia A) de *E. coli* presente na estrutura do transportador de maltose (código do PDB 2R6G); (D)modelo da UgpC de *Xac* (cadeia B) produzido com a coordenadas da estrutura da MaIK (cadeia B) de *E. coli* presente na estrutura do transportador de maltose (código do PDB 2R6G);



Figure 30 – Representação em forma de cartoon do operon malElacFG de Xac construído por modelagem molecular baseada na estrutura do operon de *E. coli* (código do PDB 2RG6). A - Modelo do operon de Xac com a proteína periplasmática MalE em verde, as proteínas de membrana LacF (rosa) e LacG (azul claro) e a proteína citoplasmática UgpC (laranja e azul marinho, para as duas cadeias A e B, respectivamente). B - Sobreposição do modelo do transportador malElacFG de Xac com o transportador de maltose de *E. coli* mostrado inteiramente em cinza. Note a presença na MalF, das três hélices transmembrana e da alça periplasmática em contato com a MalE.

4.10 Detecção da proteína MalE em extratos protéicos totais de *Xanthomonas* por "Western blot"

Anticorpos contra a proteína MalE de *Xac* foram obtidos após a inoculação da proteína pura desnaturada em camundongos. Os anticorpos obtidos de amostras de soro dos animais imunizados foram capazes de identificar a proteína nos extratos periplasmáticos de *Xac*, linhagem 306. Da mesma forma, a presença de bandas na mesma altura da MalE presente em *Xac* foram identificadas, em menor quantidade, na linhagem 381 de *Xac* e nos extratos periplasmáticos de *X. codiae* (linhas 4 e 5 da figura 27) (Figura 31). Nas amostras de *X. melonis, X. sacchari, X. teichola* e *X. vesicatoria* não foi possível a identificação de nenhuma banda correspondente à proteína de interesse.



Figura 31 - Detecção por "Western blot" da MalE de Xac e de ortólogos presentes em extratos periplasmáticos de diferentes espécies de Xanthomonas usando-se anticorpos policionais específicos produzidos em camundongo. 1 – Proteína recombinante purificada MalE de Xac; 2 –Extrato periplasmático de Xac (306); 3 – Xac 381; 4 X. bromi; 5- X. cadiaei; 6 – X. melonis; X. sacchari; 8 - X. teichola; 9, X. vesicatoria. As setas indicam o peso molecular de 50 kDa, e as linhagens onde foram detectadas a proteína MalE de Xac.

5 DISCUSSÃO

A proteína MalE de *Xac* foi expressa e purificada na forma solúvel o que permitiu analisá-la quanto ao conteúdo de estrutura secundária, influência de ligantes sobre a proteína, estabilidade em diferentes temperaturas e pH. Ensaios de cristalização foram realizados de forma satisfatória uma vez que a proteína foi cristalizada em diferentes condições, em período curto de tempo, e com formas bipiramidais de bom tamanho. Por outro lado, apesar dos vários cristais, somente um originou dados de difração que puderam ser tratados e analisados com relação aos parâmetros estruturais (Souza et al., 2009). Ainda assim, a resolução da estrutura cristalográfica por substituição molecular não foi possível, bem como a obtenção de cristais derivados com átomos pesados.

A ausência de resultados cristalográficos nos levou a procurar a caracterização da MalE por métodos bioquímicos, de análises de sequências e métodos de modelagem molecular. A MalE de *E. coli* é uma proteína extensivamente estudada tanto do ponto de vista funcional como estrutural e uma série de dados estão disponíveis. Em virtude de sua alta solubilidade e aplicabilidade biotecnológica (é usada como proteína de fusão para purificação por afinidade), alguns ortólogos de microrganismos extremófilos também tem sido caracterizados e comparados em suas habilidades bioquímicas. Contudo, apesar do grande número de informações sobre estas proteínas, não existem dados sobre proteínas ligadoras de açúcares de bactérias fitopatogênicas.

O gene *malE* de *Xac* codifica um peptídeo precursor de 456 aminoácidos dos quais os 19 primeiros correspondem ao peptídeo sinal, como estimado pela aplicação dos "SignalP" "DAS" (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ programas e e http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/). A proteína MalE recombinante foi expressa em E. coli como uma proteína intracelular solúvel sem o peptídeo sinal e geneticamente fusionada a uma cauda His6 na extremidade N-terminal. A estratégia de expressar a proteína no citoplasma da célula e não no meio periplasmático onde ela é normalmente encontrada foi determinada após tentativas frustradas de expressão de outras proteínas ligadoras de Xac em E. coli. Na verdade, a análise comparativa das sequências sinal de algumas destas proteínas de Xac com os ortólogos de E. coli mostraram grande diferenças nos resíduos, incluindo os sítios de clivagem da peptidase (dados não mostrados), sugerindo que o sistema de secreção de E. coli não reconhece eficientemente as sequências sinal de Xac. A melhor condição de expressão desta proteína em E. coli foi em temperatura ambiente e sem agitação. As condições de aeração e a temperatura ótima de crescimento da *E. coli* produziam grandes quantidades de proteína, na verdade cerca de duas vezes mais proteína recombinante do que em temperatura ambiente, mas quase que totalmente em corpúsculos de inclusão. Assim, a incubação das células portadoras do plasmídeo de interesse em condições não tão favoráveis, permitiu um crescimento mais lento, menor produção de proteína recombinante e em solubilidade favorecida.

Foi possível obter a proteína recombinante MalE de *Xac* por meio de purificação por cromatografia de afinidade ao níquel, seguindo-se tanto o protocolo de purificação em bancada como o automatizado (FPLC). Ao final dos ensaios obteve-se quantidade de proteína suficiente para os ensaios cristalográficos e espectroscópicos, apesar das perdas que ocorrem nos processos de purificação, diálise, concentração, principalmente na concentração, pois ao aumentarmos a quantidade de proteína, esta apresentava uma propensão a agregar e precipitar, ao tentarmos recuperar a porção precipitada, não obtivemos sucesso, ao contrário do ortólogo de *E. coli*, em que o renovelamento foi obtido com sucesso (Ganesh et al., 2001).

Ensaios preliminares de Dicroísmo Circular da proteína MalE de Xac mostraram que a proteína preservou sua estrutura secundária que é típica de uma proteína do tipo alfa-beta (Figura 10), com sinal em 222 nm e 208 nm. A estimativa de estrutura secundária prevista foi de 36% de α -hélice, 17 % de folhas β , enquanto alças representam outros 40%. No ensaio de Dicroísmo Circular (CD) na ausência e presença de diferentes açúcares e em diferentes pHs (Figura 11), verificamos que há uma alteração no espectro de CD ao adicionarmos alguns dos açúcares, em especial, maltose no pH 5.0. Alterações no conteúdo de estrutura secundária de proteínas em ensaios de dicroísmo circular podem ser associadas a alguns fatores como variações de concentração protéica, alterações de tampão e pH que vão influenciar na força iônica, bem como interações com possíveis moléculas ligantes. Nos nossos ensaios, os primeiros dois fatores foram eliminados já que não houve alteração dos tampões e cada triplicata de experimentos foi realizada com a mesma amostra. Ainda assim, em dias diferentes, novas amostras foram usadas para fazer as novas triplicatas. Neste caso, as alterações observadas somente na presença de maltose e trealose, sugerem que ambos açúcares interagem de alguma forma com esta proteína de maneira a alterar sua conformação. A posição e a forma de interação contudo, não pode ser determinada neste tipo de experimento. É reconhecido e descrito por vários autores, que em proteínas periplasmáticas, a presença de ligantes dentro da fenda induz o fechamento dos domínios, aumentando as áreas de contato e as interações. Tais interações muitas vezes induzem pequenas alterações conformacionais como alças que se enovelam e hélices que são alongadas (Quiocho, 1997,

99

Martineau, 1990, Telmer, 2003). As variações no conteúdo de estrutura secundária encontradas nos nossos experimentos mostram que ocorre ganho de hélices alfa em presença de maltose. De outra forma, também analisamos o comportamento da proteína em variação de pH e na presença de ligantes, de forma que pudemos observar a influência da protonização dos resíduos na estrutura e interação com os açúcares. A MalE perde conteúdo de hélices alfa (37% para 29%) e ganha folhas (de 31% para 41%) em pH 3.6. Uma possível explicação para este resultado seria que a protonação da proteína levaria à movimentações de resíduos de forma que as hélices tendenciosamente seriam desorganizadas aumentando as estruturas desenoveladas ao mesmo tempo que aumentaria a exposição das folhas beta, que tenderiam à agregação. Nos outros pHs, a proteína mantém-se estável e com o conteúdo de estrutura secundária semelhante (38% de hélices, 16% de folhas, 40% de alças). O conteúdo de estrutura secundária em outras MalEs não varia significativamente, ocorrendo diferenças somente na posição e orientação de muitos elementos individuais de estruturas secundárias (Schafer et al., 2001). O ortólogo de *E.coli* se mostrou mais tolerante ao pH ácido do que a MalE de *Xac*, já que é estável numa faixa de pH de 4.0 a 10.5 (Ganesh, 1997).

A termo-estabilidade da proteína MalE foi analisada através do monitoramento do sinal de CD a 222 nm, durante o aumento consecutivo da temperatura de 0°C até 100°C. Os ensaios foram realizados com a proteína (5 µM) e na presença dos ligantes maltose, lactose, beta-ciclodextrina e trealose (1:2). Notamos que a proteína desenovela em duas etapas, caracterizadas pela presença de um pequeno ombro no espectro. O desenovelamento inicia-se a 43°C e finaliza a 46°C. A MalE de Xac foi muito sensível ao aumento de temperatura, com tendência a agregação causada pela interação de folhas beta que se associaram após a exposição das mesmas, e não apresentou alterações significativas na presença dos açúcares analisados, incluindo maltose. Este resultado foi bastante frustrante uma vez que quando interagindo com ligantes, as proteínas periplasmáticas demonstram aumento na estabilidade térmica decorrente da maior compactação da proteína e do maior número de interações que devem ser quebradas para o desenovelamento (Balan et al., 2006). Por outro lado, as interações entre os ortólogos e seus respectivos ligantes mostram que muitas destes contatos são ligações de H de longas distâncias (3.0 A) com moléculas de água e pontes salinas, o que de certa forma são interações mais fracas. Foi visto que o conteúdo de aminoácidos específicos como prolina é ligeiramente maior em ortólogos de organismos extremófilos, como Acy_MBP (6,7%) sendo este, associado à termoestabilidade. Contudo, embora a MalE de Xac apresente 6,4% de prolinas, conteúdo maior que o ortólogo de E. coli (5,7% de resíduos) este último é muito mais estável suportanto temperaturas de 50°C. Provavelmente,

outros fatores como maior compactação da proteína devido ao menor número de cavidades intramoleculares da proteína e diferenças na composição de aminoácidos são responsáveis por esta estabilidade. A MalE de *Xac* não é termodinamicamente reversível visto que ao ser aquecida, perde a estrutura e não é possível reenovelá-la.

Através de experimentos de deslocamento térmico, muito usados para a identificação de drogas que interagem com proteínas alvo, foi possível observar uma pequena variação da temperatura de desenovelamento da MalE quando em presenca de maltose (Figura13) que não foi observada com os demais açúcares (aumento de 41°C para 43°C). Estes ensaios são bem mais sensíveis às variações de desenovelamento e podem sugerir que de alguma forma a maltose interfere com a estabilidade da proteína. Ainda assim, mais uma vez, não fica claro que esta estabilidade estaria relacionada à presenca do ligante no bolsão de interação e da formação de contatos com a proteína. Poderia ser que a presença do açúcar tenha um efeito estabilizador geral, como no caso de sacarose em alguns ensaios de enovelamento de proteínas. Por outro tal efeito, contraditoriamente, não foi observado o mesmo efeito com nenhum outro açúcar.

Outro fator particular na caracterização da MalE de *Xac* e de seus ortólogos encontrados em outros fitopatógenos, é a presença de uma extremidade C-terminal com 40 aminoácidos adicionais do que os ortólogos com estrutura resolvida. Estudos com a proteína de *E. col*i revelaram que esta parte da proteína é importante na determinação do ligante ou mesmo na sua funcionalidade, uma vez que a deleção de hélices terminais impossibilita que a proteína ligue maltose, enquanto que a substituição de seis resíduos por 11 no C-terminal altera o modo de ligação da proteína (não liga maltodextrinas) e prejudica sua quimiotaxia (Spurlino et al., 1991).

A proteína MalE possui 13 triptofanos cujos comportamentos foram analisados em ensaios de fluorescência. Sabemos que o espectro observado na fluorescência é uma somatória do espectro de cada triptofano, o que torna possível avaliar termos apenas uma média do comportamento de todos os triptofanos. O aumento de fluorescência é normalmente dependente de mudanças conformacionais das proteínas, mas medidas estáticas da fluorescência são limitadas em suas habilidades em prover informações sobre aminoácidos específicos e movimentos espaciais envolvidos. A diminuição da fluorescência da MalE de *Xac* foi associada ao aumento da concentração de maltose em diferentes faixas (05 μ M – 500 μ M e 0,1 mM – 20 mM). O "quenching" dos triptofanos ocorreu nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M de maltose. Infelizmente não foi possível determinar o K_d da proteína por esse

ensaio, provavelmente devido ao grande número de resíduos de triptofano presentes na molécula.

Para eliminar o efeito de alterações decorrentes da concentração de ligante, a MalE de Xac foi saturada com maltose e trealose e analisada quanto ao espectro de fluorescência em diferentes pH. Tanto na ausência ou presença dos açúcares, o aumento de pH direciona os triptofanos para um ambiente mais polar, mas com efeitos de apagamento de fluorescência, sugerindo que os triptofanos podem ser escondidos pelo fechamento da molécula após a possível interação. Os efeitos da concentração dos açúcares nos resultados são excluídos por subtração dos dados gerados com amostras de tampão e acúcar sobre as amostras com proteínas. De acordo com o modelo estrutural da MalE de Xac, os doze triptofanos estão espalhados em diferentes regiões da proteína. Posições relevantes são apresentadas pelos resíduos de Trp que estão na entrada da fenda: (Trp²²⁷, Trp²⁴³, Trp³⁵³, Trp⁶⁹, Trp¹¹ e Trp¹¹⁶). O resíduo Trp³⁵³ pertence à hélice que provavelmente deve sofrer grande movimentação durante o processo de abertura e fechamento para captação do açúcar. De acordo com Martineau (1990), os resíduos Trp^{230/232} e Trp³⁴⁰ estão envolvidos na diminuição da fluorescência em 23% na MalE de E. coli. Para a MalE de Xac, esses resíduos estão alinhados com o Trp²⁴³ (localizado dentro do bolsão) e Trp³⁵³, respectivamente, sendo responsáveis pela diminuição da fluorescência na proteína de Xac. As análises dos modelos e dos ortólogos nos mostraram que o resíduo de Trp⁶⁹ está na região de interação com o ligante e é conservado em todos os ortólogos analisados.

A MalE revelou-se uma proteína de fácil cristalização, uma vez que foram obtidos cristais em 15 diferentes condições, de tamanhos variados e em período de tempo de uma a duas semanas (em geral 10 dias). Corroborando os ensaios de CD e fluorescência que mostraram maior estabilidade da MalE em pH 5.0 a 8.0, esta faixa de pH também foi a mais adequada para o crescimento dos cristais. Ainda, é interessante ressaltar que tais cristais cresceram somente na presença de maltose, mais uma vez corroborando os dados espectroscópicos que sugerem a interação da proteína com este açúcar. De fato, a presença de ligantes é comum em muitas das proteínas periplasmáticas com estrutura resolvida já que estes estabilizariam os domínios na forma fechada e evitam movimentações dos mesmos que desestabilizariam as condições de equilíbrio e saturação da gôta de cristalização. Apesar da facilidade em obtenção dos cristais, os mesmos não apresentaram boa resolução após a irradiação. Um dos fatores que podem ser apontados pela baixa resolução seria a presença de grande quantidade de água na unidade assimétrica, conforme analisado pela obtenção do coeficiente de Mattheus (3,29). Outro indicativo da fragilidade dos cristais foi a ausência de

resposta aos testes de anelamento, onde fluxo de nitrogênio no gonidiômetro, antes da irradiação do cristal, é bloqueado por alguns segundos, levando à uma variação de temperatura brusca e momentânea, frequentemente descrita como fator de compactação de um cristal. A presença de água nos canais da proteína facilita interações de átomos da proteína com a água e não com os pares na estrutura. A melhor condição de difração foi obtida após o aumento da concentração de sal nas amostras de proteína, do pH que passou de 7.5 a 8.0 (proteína com carga mais negativa) e da alteração no método de cristalização. Este último, foi importante porque durante a formação dos cristais, a fina película de proteína que era formada sob a gôta de cristalização, dificultou a manipulação e obtenção dos mesmos. O excesso de manipulação dos cristais pode levar à sua desestruturação. O método de gôta pendente facilitou a captura dos cristais já que os mesmos não depositavam com facilidade e eram encontrados livres na gota. Outras tentativas de obtenção de cristais de melhor qualidade foram o uso de temperaturas de cristalização diferentes (18°C e 4°C) e de açúcares. A temperatura pode alterar a velocidade de crescimento do cristal e estabilizar a proteína. Cristais que crescem mais lentamente poderiam contem interações e ligações mais compactas e estáveis do que os que crescem rapidamente, embora esse fenômeno também seja relacionado às características de cada proteína. Outra tentativa de melhorar a qualidade dos cristais foi a retirada da cauda de histidina da proteína recombinante, a qual poderia estar promovendo interações que alterassem a estrutura da própria proteína, como se estivesse desenovelada, levar à agregação e instabilidade protéica. Contrário às nossas expectativas, os ensaios de CD mostraram que a ausência da cauda, torna a MalE mais instável e susceptível à agregação.

Conforme os padrões de difração dos cristais que mostravam pontos muito próximos uns dos outros, o processamento dos dados de cristalização revelou que as células unitárias de todos os cristais analisados eram muito grandes. A proximidade dos pontos foi um dos fatores que mais prejudicou o processamento e obtenção de um conjunto de dados com definição de parâmetros de célula unitária e outros dados estruturais que pudessem ser usados para a resolução da estrutura tri-dimensional da proteína. Os dados de processamento obtidos ao final, com a condição 3,5 M de formato de sódio e 0,1 M de Tris pH 8.0, também não foram suficientes para a obtenção da estrutura, apesar de serem de ótima qualidade. Neste caso, acreditamos que o principal fator foi a baixa identidade de sequência de aminoácidos da MalE com os respectivos ortólogos com estrutura resolvida. O método de substituição molecular baseia-se exatamente no quão similares as proteínas seriam estruturalmente, de forma que as coordenadas estruturais de uma podem servir como molde para a outra. Segundo a identidade, menor que 30%, sabíamos que o método poderia não servir, mas baseados nos dados de literatura e nos nossos alinhamentos estruturais de todas as proteínas resolvidas, também sabíamos que todas as proteínas ligadoras de açúcares, em especial, maltose, maltotriose e trealose apresentavam estrutura extremamente conservada. Nosso modelo não fugiu a esta expectativa. A impossibilidade da utilização deste método para a determinação da estrutura terciária da MalE sugere que esta proteína pode apresentar fatores estruturais distintos em comparação com as demais o suficiente para torná-la um grupo a parte. A própria presença de uma região C-terminal muito maior já é prova disto.

Outra frustração foram os dados obtidos nos ensaios de calorimetria para a obtenção de K_d (constante de dissociação), os quais seriam a prova/evidência direta da interação da MalE com açúcar(es). Nestes ensaios, a interação da proteína com os açúcares deveria promover uma reação exotérmica com liberação de calor, mensurado no experimento. A titulação do ligante associada à parada na liberação de calor seria uma forma de observar a saturação ou estado em que a proteína atingiria o equilíbrio e que todas as moléculas estariam ligadas. Em nenhum dos experimentos houve troca de calor entre a MalE e os açúcares (Figura 17), incluindo maltose, denotando a falta de interação. Alterações nas condições metodológicas foram testadas principalmente basedas nos ensaios obtidos com ortólogos, sem contudo, resultados satisfatórios. Dado que a MalE de Xac deve apresentar diferenças em relação às demais estruturas, ainda que ela conserve características importantes de proteínas ligadoras de açúcares, estes ensaios ainda podem ser melhor otimizados. Contudo, baseado nestes experimentos a MalE não liga nenhum dos açúcares testados. Um fator importante no caso destes ensaios foi a qualidade das amostras. Em altas concentrações, como as utilizadas nos ensaios (mais de 14 mg/ml de proteína) a MalE apresentou a tendência à agregação e formação de complexos (amostras não monodispersas) e não apenas monômeros, como evidenciado em ensaios de DLS e experimentos de SAXS (dados não mostrados).

A modelagem molecular da MalE de *Xac* foi uma alternativa para a ausência de dados cristalográficos. Através dos modelos obtidos pudemos avaliar vários dos resultados experimentais de forma mais precisa. A construção de um bom modelo depende da estrutura cristalográfica que será usada como molde e do alinhamento trabalhado manualmente. Há uma variedade de maneiras de se construir um modelo. Um dos métodos é o de modelagem através da montagem de um corpo rígido. Outra metodologia é por meio de segmentos correspondentes, onde se aproximam posições de átomos conservados no modelo com os da proteína de interesse. E o terceiro grupo é o de modelo através da satisfação de restrições espaciais, cuja metodologia é utilizada pelo programa Modeller e baseia-se na técnica de

resolução de estruturas por ressonância magnética nuclear. As restrições são obtidas ao assumirmos que as distâncias e ângulos correspondentes no alinhamento do modelo e da estrutura alvo são similares, esses conjuntos de critérios geométricos geram uma função de probabilidade densidade para a localização de cada átomo na proteína. A homologia que é derivada destas restrições é suplementada por restrições estéreo químicas no comprimento e ângulos das ligações, contatos de átomo-átomo não ligados. O Modeller utiliza as restrições de distância e ângulos da sequência alvo derivada de um alinhamento com o molde da estrutura tridimensional. A construção de modelos pela satisfação de restrições pode ser feita utilizando-se tipos diferentes de informação sobre a seqüência alvo, o que torna a técnica utilizada pelo Modeller promissora em relação às outras técnicas (Martí-Renom, 2000). No caso do modelo da MalE de Xac e dos outros componentes do óperon, os alinhamentos para a construção dos modelos foram bastante satisfatórios, especialmente por não apresentarem "gaps" entre as sequências de MalE de Xac e as de E. coli, T. litoralis e T. maritima. Apesar da baixa identidade de aminoácidos (15% a 22%), A MalE de Xac apresentou alta conservação estrutural (rmsd de 0,5 a 2,8 Å), conforme descrito para outras proteínas periplasmáticas, incluindo algumas proteínas ligadoras de arabinose (BPA), sulfato (SBP), Dgalactose/D-glicose (GGBP), Leucina/Isoleucina/Valina (LIVBP) e leucina (LBP) (Spurlino, 1991 e Quiocho, 1997). Ainda assim, não podemos deixar de mencionar que como modelo, a conformação tri-dimensional adquirida segue o molde utilizado, o que de certa forma força a estrutura às coordenadas estruturais do molde. Por outro lado, através das análises de modelagem na presença do ligante, foi possível verificar que a proteína de Xac apresenta o bolsão de interação também muito característico de proteínas ligadoras de açúcar, incluindo condições estruturais importantes para a interação tanto com maltose como com trealose. Estes dados, apesar de apenas suportados por análises de modelagem molecular e docking, revelam importantes características em comum em todos os ortólogos, bem como diferenças significativas que podem refletir suas especificidades e afinidades por diferentes ligantes. A maioria dos resíduos que interagem diretamente com os açúcares nas estruturas são polares carregados, como os encontrados nas estruturas de proteínas ligadoras de monossacarídeos como as ligadoras de arabinose, ribose e glicose (Quiocho et al., 1997). As proteínas/enzimas que ligam carboidrato têm sido divididas, ou classificadas, em dois grupos com base na localização do seu sítio ligador. Os sítios em proteínas pertencentes ao grupo I (hexoquinase, proteínas periplasmáticas ligadoras de monossacarídeos, sítio ativo da fosforilase, membros da família dos repressores LacI, etc) estão escondidos e aptos a seqüestrar os carboidratos, enquanto que os sítios do grupo II (sítio de estocagem da fosforilase, lectinas,

imunoglobulinas, amilases) estão localizados mais próximos à superfície da molécula (Quiocho et al., 1997). Como as unidades de glicose da maltose e trealose ficam ocultas no modelo da MalE de *Xac*, constatamos que a proteína exibe características das proteínas pertencentes ao grupo I.

As regiões I, III, IV e V da figura 24 concentram resíduos envolvidos com a interação dos açúcares e também mostram certa conservação, especialmente entre os ortólogos de T. thermophilus, T. maritima, E. coli, P. furiosus e A. acidocaldarius. Nestas proteínas a conservação dos triptofanos e ácido aspártico na região III é evidente. O importante resíduo Trp⁶² da MalE de *E.coli*, cuja perda reflete um aumento de 10 vezes no K_d, se encontra nesta região. Em outras MBPs esse resíduo é conservado mas não alinhado na seqüência da MalE de Xac. O ácido glutâmico na região IV e aminoácidos carregados, tirosina e fenilalanina, formam o "bolsão" na região V. A MalE de Xac e de T. litoralis conservam uma tirosina alinhada que também está envolvida com a interação com trealose. A região VIII é caracterizada pela presença de resíduos de triptofanos localizados na região que interage com o ligante. Exceção é observada para a MalE de T. litoralis, onde esse resíduo é substituído por uma tirosina. As regiões II, VI e X revelaram mais propriamente os resíduos envolvidos na formação do bolsão ligador, mas é interessante notar que na região X, embora os resíduos de metioninas e triptofanos não estejam alinhados, eles são conservados. Na MalE de E. coli, a troca do Trp³⁴⁰ por uma alanina resulta na perda da capacidade de ligar maltose (Martineau et al., 1990). Esse resíduo é conservado, mas não está alinhado nas outras estruturas ortólogas (Figura 20). Muitos contatos Van der Waals são formados, nesses contatos há uma extensa participação das cadeias laterais dos resíduos aromáticos incluindo Trp⁶², Tyr¹⁵⁵, Trp²³⁰ e Trp³⁴⁰ (Quiocho, 1991). Verificamos que esses resíduos são conservados em todos os ortólogos, exceto Tyr¹⁵⁵ que não está presente somente na MalE de Xac.

O resíduo Gly¹³ da MalE de *E. coli* ligada e não ligada à maltose está sempre em contato com o resíduo Pro^{78} da MalG (Daus et al., 2007). Verificamos que esse resíduo é conservado, mas não alinhado, nos ortólogos *T. termophilus*, *A. acidocaldarius*, e *Xac*. Em *T. litoralis* este resíduo é conservado e alinhado e em *P. furiosus* esse resíduo é semiconservado, já que foi substituído por uma metionina, também de caráter apolar. A presença e conservação deste resíduo pode indicar sua importância para a interação da proteína periplasmática com a proteina de membrana MalG em quatro dos ortólogos que possuem a estrutura tri-dimensional resolvida e no nosso modelo. De qualquer forma, o importante nestes dados quando analisados conjuntamente é o fato de que embora não tenha sido demonstrada de forma direta a interação da MalE de *Xac* com a maltose ou qualquer outro açúcar, esta proteína apresenta as principais características de proteínas ligadoras destes componentes. As características do bolsão, como tamanho, resíduos e polaridade mostram que a MalE de *Xac* poderia se adaptar para a interação com alguns dos açúcares testados.

A presença de um ortólogo em sua forma aberta, ou seja, sem ligante, também permitiu verificarmos que a abertura da MalE de *Xac* expondo a fenda deve-se essencialmente à movimentação do domínio II, o que está de acordo com o que vem sendo descrito na literatura (Locher, 2002). De fato, o domínio I tem sido considerado em algumas estruturas como o domínio receptor, que promove as primeiras interações com o ligante, o qual em seguida, associa-se ao domínio II aproximado por afinidade. Estas movimentações observadas poderiam explicar alguns dos dados de CD (Figura11) onde ocorre ganho de estrutura secundária e nos experimentos de fluorescência (Figura 16, tabela 5), como discutido anteriormente.

A construção de um modelo do possível transportador em sua forma completa também nos ajudou a fundamentar alguns dados obtidos em relação à MalE. Por exemplo, ao sobrepormos os modelos das permeases LacG e LacF com as estruturas do transportador de E. coli, notamos que o poro formado por LacF e LacG é essencialmente apolar, como em E. coli. LacF e LacG são formadas por 11 α -hélices que organizam-se do mesmo modo do encontrado nos transportadores de molibdato (Hollenstein et al., 2007) e metionina (Kadaba et al., 2008). Notamos também que a proteína LacF não possui as três hélices e o domínio externo encontrado na MalF de E.coli (P2-loop), o qual exerce uma importante função na comunicação entre as subunidades da membrana e do periplasma, principalmente sendo responsável pela manutenção da MalE em contato muito estreito com o transportador (Daus et al., 2009; Jacso et al., 2009). Entre os ortólogos analisados, somente T. maritima e T. thermophilus possuem na seqüência de aminoácidos das MalFs uma região correspondente a este domínio de *E. coli* (P2-loop), mas estes ortólogos não conservam os resíduos Thr¹⁷⁷ e Ser²⁰⁵ utilizados para experimentos de "cross-linking" por Daus e colaboradores (2009). A ausência deste domínio extra nos outros ortólogos e em Xac nos leva a ponderar que a forma de sinalização das proteínas periplasmáticas com as de membrana nestes ortólogos ocorre de maneira diferenciada.

O sistema transportador de maltose de *E. coli* é um sistema de transporte de maltodextrinas otimizado para a utilização de maltose e maltodextrinas curtas, isso é evidenciado pela presença da maltoporina (LamB) e a presença de enzimas responsáveis pela degradação em *E. coli* (Boos e Shumam, 1998). *Xac* e os outros fitopatógenos não possuem

esta maltoporina, mas apresentam a proteína Tar que pode estar envolvida na quimiotaxia para maltose.

Acreditamos que em *Xac* como em outras bactérias, o transporte ativo de açúcares como fonte de energia seja fundamental. Como o habitat natural deste fitopatógeno é uma planta onde há disponibilidade de amido, a bactéria deve dispor de mecanismos para degradar e utilizar esta fonte de energia. *Xac* apresenta alguns genes para o metabolismo de açúcar como para a degradação de maltose (4-alfa-glucanotransferase, *Xac*0428 e alfa-glucosidase, *Xac*2599), trealose (threhalase, *Xac*0608), glicogênio em dextrinas (alfa-amilases, *Xac*798), UDP-glicose em D-glicose (trealose-6-fosfato sintase, *XAC*3211; trealose-6-fosfato fosfatase, *Xac*3209; e threhalase (*Xac*0-0604) e finalmente, a enzima para conversão da maltose em alfa-alfa-trealose (e vice-versa) (trealose sintase, *Xac*0155). A MalE, juntamente com os outros componentes do operon como a LacF e LacG de *Xac*, seriam importantes por transportarem açúcar para dentro da bactéria e assim permitir que esta o utilize como fonte de energia.
6 CONCLUSÕES

- A proteína recombinante MalE de *Xac* foi expressa na forma solúvel pela linhagem D_MalE1 transformada com o plasmídio SMol2 e purificada somente após as cromatografias de afinidade ao níquel e a purificação pelo método de gel filtração;
- v Ensaios de dicroísmo circular mostraram que a proteína é estável em pH ácido, neutro e básico, e que a adição de maltose e trealose promove alterações no conteúdo de estrutura secundária, sugerindo a interação destes com a MalE;
- V Os ensaios de fluorimetria associados aos dados estruturais obtidos com os modelos, sugerem a importância dos resíduos de triptofano 69, 243 e 353, conservados e presentes na fenda e entrada da proteína;
- v A titulação da maltose no ensaio de fluorescência gerou um "quenching" dos triptofanos, mas não foi possível obter-se o K_d por este método, já que a fluorescência não parou de diminuir;
- A proteína recombinante MalE de *Xac* cristalizou em diversas condições (36), numa faixa de pH entre 6.0 e 8.0, tendo o reagente polietilenogliol (PEG) como principal agente precipitante;
- A maioria dos cristais apresentou uma difração ruim com baixa resolução; dados preliminares de coleta e processamento mostram que a baixa qualidade dos cristais pode estar relacionada ao fato da célula unitária ser muito grande e presença de grande quantidade de água;
- A condição de cristalização 3,5 M de Formato de sódio e 0,1 M de Tris pH 8.0 produziu cristais de boa qualidade, cujo processamento de dados revelou simetria e ausências sistemáticas do grupo espacial ortorrômbico P6122;

- Tentativas de resolver a estrutura da proteína MalE de *Xac* com estes dados pelo método de substituição molecular não foram bem sucedidas, provavelmente devido à baixa identidade de sequência entre entre os ortólogos com estrutura resolvida;
- Alinhamentos de sequência de aminoácidos mostraram que os ortólogos da MalE de Xac em outras fitopatógenos compartilham uma alta identidade, de forma que os dados obtidos podem ser extrapolados para estas proteínas;
- Foi possível construir modelos da proteína MalE de *Xac* utilizando-se as coordenadas atômicas dos ortólogos com estrutura resolvida de *T. litoralis* ligada a trealose(código do PDB 1EU8) e *E. coli* ligada a maltose (código do PDB 1ANF) que apresentaram características estruturais conservadas, evidenciando um pocket com afinidade por açúcares como maltose, trealose, e maltotriose;
- Como observado entre os ortólogos de MBP, a MalE de *Xac* conserva a organização estrutural destas proteínas, sendo formadas por dois lobos ligados por uma região denominada de dobradiça, no meio destes lobos encontra-se a fenda ligadora de substrato;
- Análises de modelagem molecular de interações da proteína com maltose e trealose, mostraram que a MalE de *Xac* apresenta maior número de resíduos conservados e interações com maltose do que trealose, apesar de sua sequência ser mais próxima filogeneticamente da proteína de *T. litoralis*;
- Através da modelagem dos componentes de membrana do operon *malElacFG* de *Xac*, ficou evidenciado que a proteína de membrana LacF é bem diferente de seu ortólogo por não apresentar a alça periplasmática que faz contato com a MalE e as três hélices transmembrana laterais, e que a proteína MalG é essencialmente muito conservada;
- v Em sua estrutura geral, o transportador de *Xac* mais similaridades com os transportadores de molibdato e metionina, do que ao de maltose;
- v A alta conservação de sequência de aminoácidos da MalE com os ortólogos de bactérias fitopatogênicas e a conservação estrutural apresentada entre os ortólogos

com estrutura resolvida, mostram resíduos importantes para a função de ligação, interação com o transportador e movimentação dos domínios, de forma que os dados obtidos neste trabalho podem ser usados para estudos posteriores e construção de mutantes que caracterizem as funções *in vivo* desta proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M.B.R.; FERREIRA, R.C.C.; PADILLA, G.; FERREIRA, L.C.S.; COSTA, S.O.P. Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical Escherichia coli strains.. **J. Med. Microbiol**, v. 49, p. 409-413, 2000.

ALLOING, G.; GRANADEL, C.; MORRISON, D.A.; CLAVERYS, J. P. Competente Pheromone, oligopeptide permease, and induction of competent in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol*, v. 21, n° 3, p. 417-418, 1996.

ALLOING, G.; MARTIN, B.; GRANADEL, C.; CLAVERYS, J.P. Development of competence in Streptococcus pneumonaie: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. **Mol. Microbiol**, v. 29, n°1, p. 75-83. 1998

AUSTERMUHLE, M. I.; HALL, J. A.; KLUG, C. S.; DAVIDSON, A. L. Maltose binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport. **J Biol. Chem**, v. 279, p. 28243 – 28250, 2004.

BALAN, A.; DE SOUZA, C. S.; MOUTRAN, A.; FERREIRA, R. C.; FRANCO, C. S.; RAMOS, C. H.; DE SOUZA, FERREIRA, L. C. Purification and in Vitro characterization of the maltose-binding protein of the plant pathogen *Xanthomonas citri*. **Protein Exp. Purif**, v.43, p. 103 -110, 2005.

BALAN, A.; SANTACRUZ, C. P.; MOUTRAN, A.; FERREIRA, R. C. C.; MEDRANO, F. J.; PÉREZ, C. A.; RAMOS, C. H. I.; FERREIRA, L. C. S. The molybdate-binding protein (ModA) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Prot. Expr. Purif**, v.50, p 1215 – 222, 2006.

BOOS, W.; SHUMAN, H. Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. **Micro. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 204 – 229, 1998.

BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold_into a known three-dimensional structure. *Science*. v. 253, p. 164 – 170, 1991.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO J**, v. 21, p. 5313 – 5322, 2002

DA SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B., MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA JR.;N.F., ALVES; L.M.C., DOAMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.B.; COUTINHO, L.L.; CURSINOSANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, R.C.C.; FERRO, M.I.T.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE JR.R.P.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.M.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA JR., H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.F.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomesof two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-63, 2002.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res. Microbiol**, v.152, p. 211-29, 2001.

DAUS, M.L.; GROTE, M.; SCHNEIDER, E. The MalF-P2 loop of the ATP-binding cassete (ABC) transporter MalFGK2 from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium interacts with maltose binding protein (MalE) throughout the catalytic cycle. **J. Bacteriol**, v. 191, p.754-61, 2009.

DAUS, M. L.; BERENDT, S.; WUTTGE, S.; SCHNEIDER, E. Maltose binding protein (MalE) interacts with periplasmic loops P2 and P1, respectively, of the MalFG subunits of the maltose ATP-binding cassette

transporter (MalFGK₂) from *Escherichia coli/Salmonella* during the cycle. **Mol. Microbiol**, v. 66, p. 1107 – 1122, 2007.

DAUS, M. L.; GROTE, M.; SCHNEIDER, E. The MalF P2 loop of the ATP-binding cassette transporter MalFGK2 from Escherichia coli and Salmonella enterica serovar typhimurium interacts with maltose binding protein (MalE) throughout the catalytic cycle. **J. Bacteriol**, v. 191, p. 754 – 761, 2009.

DAVIDSON, A.L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microb and Mol. Biol. Reviews**, v. 72, n° 2, p. 317 – 364, 2008.

DAWSON, R. J.; LOCKER, K. P. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP. **FEBS Lett**, v. 581, p. 935 – 938, 2007.

DELANO, W. L. The PyMOL molecular graphics system on World Wide web. http://www.pymol.org, 2002.

DELÉAGE, G.; GEOURJON, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structures content of proteins from circular dichroism spectrum. **Comp. Appl. Biosc**, v. 9, p. 197-199, 1993.

DE LORIMIER, R. M.; SMITH, J. J.; DWYER, L. L.; LOOGER, K. M.; SALI, C. D.; PAAVOLA, S. S.; RIZK, S.; SADIGO V.; CONRAD, D.W.; LOEW, L.; HELLINGA, H. W. Construction of a fluorescent biosensor family. **Protein Sci**, v. 11, p. 2655 – 2675, 2002.

DEUSCHLE, K.; OKUMOTO, S.; FEHR, M.; LOOGER, L. L.; KOZHUKH, L.; FROMMER, W. B. Construction and optimization of a familiy of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. **Protein Sci**, v. 14, p. 2304 – 2314, 2005.

DIEZ, J.; DIEDERICHS, K.; GRELLER, G.; HORLACHER, R.; BOOS, W.; WELTE, W. The crystal structure of a liganded trehalose/maltose-binding protein from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis* at 1.85 A. **J. Mol. Biol**, v. 305, p. 905-15, 2001.

DIPPEL, R.; BOOS, W. The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. **J. Bacteriol**, v. 187, p. 8322 – 8331, 2005.

DUPLAY, P.; SZMELCMAN, S.; BEDOUELLE, H.; HOFNUNG, M. Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of Escherichia coli K12. Transport of maltose. **J. Mol. Biol**, v. 194, p. 663 – 673, 1987.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. COOT: model-building tools for molecular graphics. J. Appl. Cryst, v. 26, p. 283 – 291, 1993.

EDELHOCH, H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. **Biochemistry**.v. 6, p. 1948-1954, 1967.

EVANS, P. R. Proceeding of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey. **Warrington: Daresbury Laboratory**, p. 114 – 122, 1993.

EVDOKIMOV, A. G.; ANDERSON, D. E.; ROUTZAHN, K. M.; WAUGH, D. S. Structural basis for oligosaccharide recognition by *Pyrococcus furiosus* maltodextrin binding protein. **J. Mol. Biol.** v.305, p. 891-904, 2001.

FOX, J. D.; ROUTZAHN, K. M.; BUCHER, M. H.; WAUGH, D. S. Maltose-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. **FEBS Letters**, v.537, p. 53 – 57, 2003.

FICHANT, G.; BASSE, M. J.; QUENTIM, Y. ABCdb: an online resource for ABC transporter repertories from sequenced archaeal and bacterial genomes. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 256, n°2, p. 333 – 339, 2006.

GANESH, C.; ZAIDI, F. N.; UDGAONKAR, J. B.; VARADARAJAN, R. Reversible formation of on-pathway macroscopic aggregates during the folding of maltose binding protein. **Protein Science**, v. 10, p 1635 – 1644, 2001.

GANESH, C.; SHAH, A.N.; SWAMINATHAN, C.P.; SUROLIA, A.; VARADARAJAN, R. Thermodynamic characterization of the reversible, two-state unfolding of maltose binding protein, a large two-domain protein. **Biochemistry**, v. 36, p. 5020 – 8, 1997.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. M.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S., *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol. Pl. Pathol**, v. 5, p. 1 – 15, 2004.

GOLMOHAMMADI, M.; CUBERO, J.; PENALVER, J.; QUESADA, J. M.; LÓPEZ, M. M.; LLOP, P. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. J. Appl. Microbiol, v. 103, n°6, p. 2309 – 2315, 2007.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. Bacterial diseases. In Compendium of Citrus Diseases. Ed. LW Timmer, SM Garnsey, JH Graham. St. Paul: APS Press. 2000

HERMAN, P.; STAIANO, M.; MARABOTTI, A.; VARRIALE, A.; SCIRE, A.; TANFANI, F.; VECER, J.; ROSSI, M.; D'AURIA, S. D-trehalose/D-maltose-binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: the binding of trehalose and maltose results in different protein conformational states. **Proteins**, v. 63, p. 754 – 767, 2006.

HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganism to man. Annu. Rev. Cell. Biol, v. 8, p. 67 – 113, 1992.

HOLLENSTEIN, K.; FREI, D. C.; LOCHER, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature.** v.446, p. 213–216, 2007.

JACSO, T.; GROTE, M.; DAUS, M.; SCHMIEDER, P.; KELLER, S.; SCHENEIDER, E.; REIF, B. The periplasmic loop P2 of the MalF subunit of the maltose ATP binding cassette transporter is sufficient to bind the maltose binding protein MalE. **Biochemistry**, 2009

KASHIWAGI, K.; TSUHAKO, M. H.; SAKATA, K.; SAISHO, T.; IGARASHI, A.; COSTA, S.O.P.; IGARASHI, K. Relationship between Spontaneous Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli* and a Decrease in Oligopeptide Binding Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n° 20, p. 5484 – 5488, 1998.

KADABA, N.S.; KAISER, J.T.; JOHNSON E.; LEE, A.; REES, D. C. The high-affinity E. coli methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation. **Science**, v. 321, p. 250 – 253, 2008.

KOSSMANN, M.; WOLFF, C.; MANSON, M. D. Maltose chemoreceptor of *Escherichia coli*: interaction of maltose-binding protein and the tar signal transducer. **J. Bacteriol**, v. 170, p. 4516 – 4521, 1988.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Crystallogr. Section D- Biol. Crystallogr, v.60, p. 2256-2268, 2004.

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

LASKOWSKI, R. A.; MCARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst**, v. 26, p. 283 – 291, 1993.

LEE, B.; PARK, Y.; PARK, D.; KANG, H.; KIM, J.; SONG, E.; PARK, I.; YOON, U.; HAHN, J.; KOO, B.; LEE, G.; KIM, H.; PARK, H.; YOON, K.; KIM, J.; JUNG, C.; KOH, N.; SEO, J.; GO, S. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 577 – 586, 2005.

LESLIE, A. G. Integration of macromolecular diffraction data. Acta Cryst D, v.55, p. 1696-1702, 1999.

LIU, P. Q.; LIU, C. E.; AMES, G. F. Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATPbinding domains of an ABC transporter, the histidine permease. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 18310 – 18318, 1999. LOCHER, K. P.; LEE, A. T.; REES, D. C.; The *E. coli* BtuCD structure a framework for ABC transporter architecture and mechanism. **Science**, v. 296, p. 1091 – 1098, 2002.

LONG, S.R.; STASKAWICKZ, B. J. Prokaryotic plat parasites. Cell, v. 73, n°5, p. 921 – 935, 1993.

LLOP P.; CARUSO P.; CUBERO J.; MORENTE C.; LOPES M. M. A simple extraction Procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in Plant material by polimerase reaction. J Microbiol, Methods. v. 37, p. 23–31. 1999.

LUBELSKI, J.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 71, p 463 – 476, 2007.

MARTINEAU, P.; SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; SPURLINO, J. C.; and QUIOCHO, F. A. Progress in the identification of interaction sites on the periplasmic maltose binding protein from *E. coli*. **Biochimie**, v. 72, p. 97 – 402, 1990.

MARTI-RENON, M. A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct**, v. 29, p. 291 – 325, 2000.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. J Mol. Biol, v. 33, p. 491 -497, 1968.

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

MILLET, O.; HUDSON, R. P.; KAY, L. E. The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci,** v. 100, p. 12700 – 12705, 2003.

MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F.; DIGIAMPIETRI, L.A.; DA SILVA, A. C. R.; SETUBAL, J. C. Comparative Analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* Complete Genomes. **Journal of Integrative Biology**, v. 9, p. 43 – 76, 2005.

OLDHAM, M. L.; KHAREI, D.; QUIOCHO, F.A.; DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. **Nature**, v. 450, p. 515 – 522, 2007.

OSHIRO, E. E.; NEPOMUCENO, R. S. L.; FARIA, J. B.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Sitedirected gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 65, p. 171 – 179. 2006

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. **Methods** in Enzymology, v. 276. p. 307 – 326, 1997.

PARK, J. H.; CHOI, E. A.; CHO, E. W.; HAHM, K. S.; KIM, K. L. Maltose binding protein (MBP) fusion proteins with low or no affinity to amylose resins can be single-step purified using a novel anti-MBP monoclonal antibody. **Molecular Cells**, v.8, n° 6, p. 709-716. 1998.

PINKETT, H. W.; LEE, A. T.; LUM, P.; LOCHER, K. P.; REES, D. C. An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. **Science**, v. 315, p. 373 – 377, 2007.

QUIOCHO, F. A.; LEDVINA, P. S. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. **Mol. Microbiol**, v. 20, p. 17 -25, 1996.

QUIOCHO, F. A.; SPURLINO, J. C.; RODSETH, L. Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. **Structure**, v. 5, p. 997 – 1015, 1997.

RICHARDSON, J. S. Beta-Sheet topology and the relatedness of proteins. Nature, v. 268, p. 495 -500, 1977.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **J. Mol. Biol**, v. 7, p. 95 -99, 1963.

ROMER, P.; HAHN, S.; JORDAN, T.; STRAUSS, T.; BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistantce gene. **Science**, v. 318, n° 5850, p. 645 – 648, 2007.

RUDNER, Z. D.; LEDEAUX, J. R.; IRETON, K.; GROSSMAN, A. D. The spo0K Locus of *Bacillus subtilis* is Homologous to the Oligopeptide Permease Locus and Is Required for Sporulation and Competence. Journal of **Bacteriology**, v. 173, n°4, p. 1388-1398. 1991.

SAIER, M.H.J. A functional-phylogenetic classification system for transmembrana solute transporters. **Micro.** and **Mol. Biology Rev**, v. 64, p. 354 – 411, 2000.

SALI A, BLUNDELL TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints . J Mol Biol. v. 234, p. 779 – 815, 1993.

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

SCHAFER, K.; MAGNUSSON, U.; SCHEFFEL, F.; SCHIEFNER, A.; SANDGREN, M.O.; DIEDERICHS, K.; WELTE, W.; HÜLSMANN, A.; SCHNEIDER, E.; MOWBRAY, S.L. X-ray structures of the maltosemaltodextrin-binding protein of the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* provide insight into acid stability of proteins. **J. Mol. Biol**, v. 335, p. 261-274, 2004.

SCHENEIDER, E.; HUNKE, S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. **FEMS Microbiol. Rev**, v. 22, p. 1 – 20, 1998.

SHARF, A. J.; RODSETH, L.E.; SPURLINO, J. C.; QUIOCHO, F. A. Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. **Biochemistry**, v. 31, p. 10657 – 10663, 1992.

SHILTON, B. H. The dynamics of the MBP-MalFGK(2) interaction: a prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n° 9, p. 1772 – 1780, 2008.

SPURLINO, J. C.; LU, G. Y.; QUIOCHO, F. A. The 2,3- A resolution of the maltose or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. **J. Biol. Chem,** v. 266, n° 8, p. 5202-5219, 1991.

SOUZA, C.S.; FERREIRA, L.C. S.; THOMAS, L.; BARBOSA, J. A. R.G.; BALAN, A. Crystallization, data collection and processing of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* Maltose-Binding Protein (MalE). Acta Crystallographyc Section F, v. 65, p. 105 – 107, 2009.

TELMER, P.G.; SHILTON, B. H. Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants. **J. Biol. Chem,** v. 278, p. 34555 – 34567, 2003.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BUTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; MCHARDY, A. C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D. H.;NIESBACH-KLOSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RUCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S.C.; VORHOLTER, F.; WEBER, E.; PUHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D.; KAISER, O. Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* Revelead by the Complete Genome Sequence. Journal of Bacteriology, v. 187, n° 21, p. 7254 – 7266, 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p. 4673 – 4680, 1994.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. An approach to multi-copy search in molecular replacement, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr, v.56, p. 1622 – 1624, 2002.

VAN DER HEIDE, T.; and POOLMAN, B. ABC transporters: one, two or four extracytoplasmatic substratebinding sites? **EMBO Rep**, v. 3, p. 938 – 943, 2002.

WEBB, A. J.; HOMER, K. A.; HOSIE, A. H. Two closely related ABC transporters in *Streptococcus mutans* are involved in disaccharide and/or oligosaccharide uptake. J. Bacteriology. v. 190, p. 168 – 178, 2007.

ZHANG, Y.; GARDINA, P. J.; KUEBLER, A. S.; KANG, H. S.; CHRISTOPHER, J. A.; MICHAEL, D. M. Model of maltose-binding protein/chemoreceptor complex supports intrasubunit signaling mechanism. **Cell Biology**, v. 96, p. 939 – 944, 1999.

Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications

ISSN 1744-3091

C. S. Souza,^a L. C. S. Ferreira,^a L. Thomas,^b J. A. R. G. Barbosa^c* and A. Balan^c*

^aDepartamento de Microbiologia, Instituto de Cie^ancias Biome^a dicas II, Universidade de Sa^ao Paulo, Sa^ao Paulo, SP, Brazil, ^bHoward Hughes Medical Institute, Division of Biology, California Institute of Technology, 1200 East California Boulevard, Pasadena, California, USA, and ^cCenter for Structural Molecular Biology (CeBiMe), Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), CP 6192, Campinas, SP 13084-971, Brazil

Correspondence e-mail: joao@Inls.br, abalan@usp.br

Received 27 October 2008 Accepted 9 December 2008



2009 International Union of Crystallography All rights reserved

Crystallization, data collection and data processing of maltose-binding protein (MalE) from the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri

Maltose-binding protein is the periplasmic component of the ABC transporter responsible for the uptake of maltose/maltodextrins. The Xanthomonas axonopodis pv. citri maltose-binding protein MalE has been crystallized at 293 K using the hanging-drop vapour-diffusion method. The crystal belonged to the primitive hexagonal space group P6₁22, with unit-cell parameters a = 123.59,

b = 123.59, c = 304.20 A, and contained two molecules in the asymetric unit. It diffracted to 2.24 A resolution.

1. Introduction

Maltose- or maltodextrin-binding proteins (MBPs) are located in the periplasm of Gram-negative bacterial species, where they interact with substrates such as the disaccharide maltose, longer linear maltodextrins and even larger and more complex cyclodextrin molecules before uptake to the interior of the cell (Boos & Shuman, 1998; Tam & Saier, 1993). In Escherichia coli K12, the active transport of maltose and maltodextrins requires MBP and an ATPdependent membrane-associated transport system made up of two integral membrane proteins (MalF and MalG) and two copies of an ATP-hydrolyzing subunit (MalK) (Hall, Ganesan et al., 1997; Hall, Gehring et al., 1997; Hall, Thorgeirsson et al., 1997). Similar to other ABC-type transport binding components, MBP or MalE typically consists of two nearly symmetrical lobes separated by a hinge region in which the substrate-binding site lies (Spurlino et al.., 1991). After binding, the protein undergoes a conformational change as a direct result of bending and twisting movements of the lobes towards each other, leading to substrate enclosure (Quiocho et al.., 1997; Saul et al., 2003; Millet et al., 2003; Telmer & Shilton, 2003). MBPs have also been characterized as chemoreceptors for maltose taxis after interaction of the bound complex with the periplasmic portion of the Tar protein (Zhang et al., 1999).

Much of the existing knowledge about microbial ABC transporters has been gleaned from studies of the high-affinity maltose-transport system in E. coli. Indeed, E. coli MBP (Eco_MBP) has been subjected to a battery of genetic, biochemical and biophysical studies that have produced a wealth of information about the structure and ligand-binding properties of Eco_MBP (Martineau et al.., 1990; Spurlino et al.., 1991; Sharff et al.., 1992). However, it is unclear to what degree these observations can be generalized to other bacteria: that is, what are the structural similarities and differences between Eco_MBP and MBPs from distant relatives such as bacteria living in different habitats or host organisms? The crystal structures of six bacterial MBPs have been reported from Pyrococcus furiosus (PDB code 1elj; Evdokimov et al.., 2001), Thermococcus litoralis (1eu8; Diez et al.., 2001), Alicyclobacillus acidocaldarius (1urg; Schafer et al.., 2004),

E. coli (1anf; Spurlino et al.., 1991), Thermus thermophilus (2gh9; M. J. Cuneo, A. Changela, L. S. Beese & H. W. Hellinga, unpublished work) and Thermotoga maritima (2fnc; M. J. Cuneo & A. Changela, unpublished work) and they all share a similar structural organization irrespective of the relatively low amino-acid sequence conservation.

The crystal structures of MBPs in the closed and open states reveal a cleft between two lobes in which the oligosaccharide substrate binds

crystallization communications

Table 1

Crystallization conditions and resolution obtained for the Xac_MalE crystals.

Nd, no diffraction.

Crystallization condition	Additive	Cryoprotectant	Ligand	Resolution (A)
4% PEG 8000	_	20% glycerol	Maltose	Nd
25% PEG MME 2000	_	15% glycerol	Maltose	Nd
0.1 M Na MES pH 6.5, 0.6 M sodium chloride, 20% PEG 4000	_	20% glycerol	Maltose	Nd
0.1 M Na MES pH 6.5, 12% PEG 20 000	_		Maltose	10.0
0.1 M Na HEPES pH 7.5, 12% PEG 20 000	_	_	Maltose	7.0
0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M sodium acetate, 20% PEG 3000	30% dioxane	15% glycerol	Maltose	3.7
0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M sodium acetate, 20% PEG 3000	_		Maltose	3.4
0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M sodium acetate, 20% PEG 3000	0.1 M trimethylamine-HCl	_	Maltose	3.4
0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.2 M lithium sulfate, 17% PEG 4000		20% glycerol	Maltose	3.2
1.2 M sodium tartrate, 0.1 M bis-Tris propane pH 7.0	_	25% glycerol	Maltose	2.8
3.5 M sodium formate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0	_		Maltose	2.24

and is completely engulfed by rotation of the lobes. While delivering the substrate to the transmembrane subunits, the binding protein seems to stimulate ATP hydrolysis. The observation that MBP is trapped in a complex with MalFGK₂ in the presence of a transitionstate analogue (Mg, ADP, vanadate) suggests that the binding of MBP induces conformational changes in the transporter and thereby triggers ATP hydrolysis (Oldham et al.., 2007).

However, maltose/maltodextrin-binding proteins from plant-associated bacteria have not been functionally or structurally characterized. The genus Xanthomonas comprises a diverse and economically important group of bacterial phytopathogens that belong to the 3-subdivision of the proteobacteria. Xanthomonas axonopodis pv. citri is the causative agent of citrus canker, a disease that affects several citrus cultivars around the world and that results in significant economic losses worldwide (Brunings & Gabriel, 2003). Definition of the complete genome sequence of X. axonopodis pv. citri revealed that approximately 4% of the genomic content encoding structural genes is dedicated to the synthesis of ATP-dependent transport systems, represented mainly by ABC transporters (da Silva et al., 2002). Most of the maltose-uptake system is present in a single operon encompassing three cistrons (malElacFG) that encode the periplasmic binding protein MalE and two trans-membrane proteins LacF and LacG. The nucleotide-binding domain corresponding to the MalK protein was identified in another region of the genome (the UgpC gene, which shares 50% sequence identity to E. coli malK). The periplasmic protein contains 456 amino acids, including a putative 19-amino-acid signal peptide, and should drive both the specificity and affinity of the maltose/maltodextrintransport system in this plant pathogen. Previous evidence has suggested that recombinant X. axonopodis pv. citri MalE (Xac_MalE) binds maltose (Balan et al., 2005), but the functionality of this operon in X. axonopodis pv. citri is still unclear. In order to determinate the threedimensional structure of this protein in the presence of maltose, we report the crystallization, data collection and initial structural analysis of recombinant Xac_MalE expressed in E. coli. The X-ray crystal structure of the present protein is expected to reveal structural features that may be common to MBPs from other phytopathogenic microorganisms, since the amino-acid sequences of MalE and of the other components of the transporter share more than 80% identity.

2. Crystallization

The nucleotide sequence encoding mature MalE (without the initial 19amino-acid signal peptide) was amplified by PCR from X. axono-podis pv. citri var. 306 and cloned into a pET28a vector (Novagen) for production of a cytoplasmic protein with a His₆ tag genetically fused at the N-terminal end. The recombinant protein was purified from

soluble extracts by immobilized nickel-affinity chromatography (1 ml HisTrap HP from Amersham Biosciences; Balan et al., 2005). Samples dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl were kept at 277 K at a final concentration of 40 mg ml³¹. Samples of recombinant Xac_MalE protein (10 mg ml³) in the absence and the presence of various sugars including maltose, trehalose, lactose, 3-cyclodextrin and 3cyclodextrin (the protein:sugar ratio was 1:2) were submitted to crystallization trials using both the sitting-drop and hanging-drop vapourdiffusion methods. Screenings were performed using Crystal Screens 1 and 2, Index Screen, SaltRX and PEG/Ion Screen (all from Hampton Research), JBScreen 1-5 (Jena Bioscience) and Wizard I and II (Emerald Biostructure) according to the instructions of the manufacturers. Drops were prepared by mixing equal volumes (2 ml) of protein and reservoir solution and were equilibrated against 400 ml reservoir solution at 294 K. Refinement of the crystallization condi-tions was carried out by varying the precipitant and salt concentra-tions as well as the pH and by the incorporation of additives.

3. Data collection and processing

The final crystallographic data were collected on protein crystallography beamline 9-2 of the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (Menlo Park, California, USA), a national user facility operated by Stanford University on behalf of the US Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences and Biological and Environmental Research. The wavelength was 0.82 A and a MarMosaic



Table 2

Data-collection and processing statistics of X. axonopodis pv. citri MalE crystal.

Space group	P6122			
a , Datafyrmenn (k.	a = 90.00, a = 90.00, a = 120.00			
Mosaicity (3)	0.24			
Temperature (K)	100			
Oscillation (3)	0.25			
Crystal-to-detector distance (mm)	325.0			
No. of frames	360			
V_(I) after merging	23.1 (4.5)			
Completeness (%)	99.9 (99.8)			
Multiplicity	10.9 (11.1)			
R	0.07 (0.45)			
No. of reflections	726568 (105326)			
No. of unique reflections	66688 (9508)			

325 CCD detector was used to record the oscillation data with $s' = 0.25^3$. Crystals were cooled in a stream of nitrogen gas at 100 K in order to minimize radiation damage. The data sets were integrated using MOSFLM v.6.2.6 (Leslie, 1999) and scaled with SCALA v.3.2.19 (Evans, 1993). The Matthews coefficient was calculated using the CCP4 package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

4. Results and discussion

The single-step purification by affinity chromatography was sufficient to produce crystallization-quality protein (Balan et al.., 2005). Crystal growth usually occurred in 6 d, leading to bipyramidal crystals with dimensions ranging from 100 to 500 mm. Crystals were obtained in more than 15 different crystallization conditions containing poly-ethylene glycol (PEG), MES or HEPES in the pH range 6.5–7.5, but were only obtained in the presence of maltose. However, none of these crystals were capable of generating diffraction patterns with resolution better than 7 A. Cryoprotection with 15–20% glycerol or PEG 400 and annealing (1–15 s) were tested in order to increase the resolution, with no success. Refinement of all crystallization condi-tions revealed that crystals grown in 0.1 M HEPES pH 7.5 or 0.1 M Tris pH 8.0 with lithium sulfate, sodium acetate or sodium formate

showed an increase in the resolution limit to around 3.2–3.4 A (Table 1). All crystallization trials with sugars other than maltose were unsuccessful.

In order to further improve the quality of the crystals, the salt concentration in the samples was increased from 20 to 50 mM Tris– HCl and the pH was increased to 8.0. Finally, good diffraction data

were obtained to a maximum resolution of 2.24 A on increasing the pH from 7.0 to 8.0 in 0.1 M Tris–HCl and 3.5 M sodium formate (Fig. 1). Crystals showed the symmetry and systematic absences of the primitive hexagonal space group $P6_{1}22$. The data-collection statistics are summarized in Table 2. The Matthews coefficient (Matthews,

 $^{\circ 3}$ $_{Da}$ $^{\circ 3}$ $_{Da}$ a1 and the solvent content was 63.4% assuming the presence of two molecules in the asymmetric unit.

Ongoing experiments will elucidate the structural organization of Xac_MalE , which will shed light on the mechanism of sugar transport in Xanthomonas species as well as in other phytopathogenic bacteria. Elucidation of the crystal structure of Xac_MalE will also reveal possible conserved structural and functional features that are shared with other substrate-binding proteins of maltose ABC transporters reported from other bacterial and archaeal species.

This work was supported by Fundac a o de Amparo a Pesquisa do Estado de Sa o Paulo (grants 01/07540-3, 04/02716-4 and 00/10266-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientí fico e Tecnolo gico (CNPq), Associac a o Brasileira de Tecnologia de Luz Sı ncrotron (ABTLuS) and the US Department of Energy. We would like to thank Andre a N. Meza and Camila Calderon for their technical assistance and Dr Pamela Bjorkman for allowing part of this research to be carried out in her laboratory.

References

- Balan, A., de Souza, C. S., Moutran, A., Ferreira, R. C., Franco, C. S., Ramos, C. H. & Ferreira, L. C. S. (2005). Protein Expr. Purif. 43, 103–110.
- Boos, W. & Shuman, H. (1998). Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 204-229.
- Brunings, A. M. & Gabriel, D. W. (2003). Mol. Plant Pathol. 4, 141–157. Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). Acta Cryst. D50,
- 760–763.
- da Silva, A. C. et al.. (2002). Nature (London), 417, 459-463.
- Diez, J., Diederichs, K., Greller, G., Horlacher, R., Boos, W. & Welte, W. (2001). J. Mol. Biol. 305, 905–915.
- Evans, P. R. (1993). Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 114–122. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M. & Waugh, D. S. (2001). J. Mol. Biol. 305, 891–904.
- Hall, J. A., Ganesan, A. K., Chen, J. & Nikaido, H. (1997). J. Biol. Chem. 272, 17615–17622.
- Hall, J. A., Gehring, K. & Nikaido, H. (1997). J. Biol. Chem. 272, 17605–17609. Hall, J. A., Thorgeirsson, T. E., Liu, J., Shin, Y. K. & Nikaido, H. (1997). J. Biol.
- Chem. 272, 17610–17614.
- Leslie, A. G. W. (1999). Acta Cryst. D55, 1696–1702.
- Martineau, P., Saurin, W., Hofnung, M., Spurlino, J. C. & Quiocho, F. A. (1990). Biochimie, 72, 397–402.
- Matthews, B. W. (1968). J. Mol. Biol. 33, 491–497.
- Millet, O., Hudson, R. P. & Kay, L. E. (2003). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 100, 12700–12705.
- Oldham, M. L., Khare, D., Quiocho, F. A., Davidson, A. L. & Chen, J. (2007). Nature (London), 450, 515–521.
- Quiocho, F. A., Spurlino, J. C. & Rodseth, L. E. (1997). Structure, 5, 997–1015.
 Saul, F. A., Mourez, M., Vulliez-Le, N. B., Sassoon, N., Bentley, G. A. & Betton, J. M. (2003). Protein Sci. 12, 577–585.
- Schafer, K., Magnusson, U., Scheffel, F., Schiefner, A., Sandgren, M. O., Diederichs, K., Welte, W., Hu⁻Ismann, A., Schneider, E. & Mowbray, S. L. (2004). J. Mol. Biol. 335, 261–274.
- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. & Quiocho, F. A. (1992). Biochemistry, 31, 10657–10663.
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y. & Quiocho, F. A. (1991). J. Biol. Chem. 266, 5202–5219.
- Tam, R. & Saier, M. H. Jr (1993). Microbiol. Rev. 57, 320–346. Telmer, P. G. & Shilton, B. H. (2003). J. Biol. Chem. 278, 34555–34567.
- Zhang, Y., Gardina, P. J., Kuebler, A. S., Kang, H. S., Christopher, J. A. & Manson, M. D. (1999). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96, 939–944.



Available online at www.sciencedirect.com



Protein Expression and Purification 43 (2005) 103-110

Protein Expression Purification

www.elsevier.com/locate/yprep

Purification and in vitro characterization of the maltose-binding protein of the plant pathogen Xanthomonas citri

Andrea Balan^a, Cristiane Santos de Souza^a, Alexandre Moutran^a, Rita C. Cafe´ Ferreira^a, Christian Suarez Franco^a, Carlos Henrique I. Ramos^b, Luí´s Carlos de Souza Ferreira^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Instituto de Cie[^]ncias Biome[^]dicas II, Universidade de Sa[~]o Paulo, CEP 05508-000, Cidade Universita[^]ria, SP, Brazil ^b Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laborato[^]rio Nacional de Luz Si[^]ncrotron, Campinas, SP, Brazil

> Received 4 February 2005, and in revised form 16 March 2005 Available online 9 April 2005

Abstract

The uptake of maltose and maltodextrins in gram-negative bacteria is mediated by an ATP-dependent transport complex composed of a periplasmic maltose-binding protein (MBP) and membrane-associated proteins responsible for the formation of a membrane pore and generation of energy to drive the translocation process. In this work, we report the purification and in vitro functional analysis of MBP, encoded by the malE gene, of the plant pathogen Xanthomonas citri, responsible for the canker disease affecting citrus plants throughout the world. The X. citri MBP is composed of 456 amino acids, displaying a low amino acid identity (16% throughout the sequence) compared to the Escherichia coli K12 ortholog. The X. citri malE gene was cloned into a pET28a vector, and the encoded protein was expressed and purified by affinity chromatography as a His-tag N-terminal fusion peptide pro-duced by the E. coli BL21 strain. Enhanced levels of soluble protein were achieved with static cultures kept overnight at 23 LC. Abil-ity to bind immobilized amylose, the emission of intrinsic fluorescence and circular dichroism spectra indicated that the purified recombinant protein preserved both conformation and biological activity of the native protein. The availability of the recombinant MBP will contribute to the functional and structural analysis of the maltose and maltodextrin uptake system of the plant pathogen X. citri

3 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Maltose-binding protein; MPB; malE; Xanthomonas citri

Maltose- or maltodextrin-binding proteins (MBP)¹ are produced by and accumulated in the periplasm of several gram-negative bacterial species, where they inter-act with high affinity to substrates such as the disaccha-ride maltose, as well as with longer linear maltodextrins or even cyclodextrins, before uptake to the cell interior [1,2]. In Escherichia coli K12, the active transport of maltose and maltodextrins depends upon MBP and an ATP-dependent membrane-associated transport system comprised of two integral membrane proteins (MalF

Corresponding author. Fax: +55 11 30917354. E-mail address: lcsf@usp.br (L.C. de Souza Ferreira).

and MalG) and two copies of an ATP-hydrolyzing sub-unit (MalK) [3]. Similar to other ABC-type transport binding components, MBP or MalE typically contains two nearly symmetrical lobes separated by a hinge re-gion where the substrate-binding site lies [4]. After bind-ing, the protein undergoes a conformational change as a direct result of the lobes bending and twisting toward each other leading to substrate enclosure [4–7]. MBPs also participate in maltose taxis after interaction of the bound complex with the periplasmic portion of the Tar protein [8].

MBP orthologs from different gram-negative and gram-positive bacteria, such as the hyperthermophile Pyrococcus furiosus and Themococcus litoralis, have been cloned and expressed in E. coli K12 aiming to

 $[\]ensuremath{\,^1}$ Abbreviations used: MBP, maltose-binding protein; CD, circular dichroism.

^{1046-5928/\$ -} see front matter $_{\tt 3}$ 2005 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.pep.2005.03.018

define the three-dimensional structures and physiological features [9–11]. However, no ortholog derived from plant-associated bacteria has been reported so far. In such cases, identification, expression, and purification of components pertaining to the uptake transport sys-tem followed by functional and structural analyses rep-resent essential steps toward defining the physiological and functional role of the uptake system in regard to the nutritional strategies of the bacterial pathogen.

The genus Xanthomonas comprises a diverse group of bacterial phytopathogens, belonging to the c-subdivision of the proteobacteria. X. citri is the causative agent of the citrus canker, which affects most commercial citrus cultivars, resulting in significant economic losses worldwide [12]. The definition of the complete genome sequences of X. citri revealed that approximately 4% of the structural genes are devoted to the synthesis of ATP-dependent transport system components, including ABC-transporters [13]. Ability to use sugars and polysaccharides represents an important feature of bacterial species living in close association with plant hosts. Nonetheless, no previous attempts to identify and characterize ABC-transporters dedicated to the transport of maltose and maltodextrins in X. citri have been reported. In this work, we report the identification and purification of the X. citri MBP ortholog. The recombinant protein was expressed in E. coli BL21(DE3) and its functionality evaluated under in vitro conditions.

Materials and methods

Strains and plasmids

All strains and plasmids used in this work are listed in Table 1.

Cloning of the malE X. citri gene

The nucleotide sequence encoding the mature X. citri MBP (without the first 57 base pair encoding the 19 amino acid long signal peptide) was amplified by PCR (forward primer, 5^0 GCAGGTCATATGGGATGCGA 3^0

Table 1 Strains and plasmids used in this work

	Reference or gene ID
Strains	
E. coli DH5a E. coli BL21(DE3) X. citri 306	Laboratory stock Invitrogen 1156381
Plasmids pGEM T-easy pGEMMalE pET28a pETMalE	Promega This work Novagen This work

and reverse primer, 5⁰ CCGGAAGCTTTCATCGTGC 3) using Platinum high fidelity Tag polymerase (Invitrogen) using standard amplification conditions: an initial step of 5 min at 95 LC, 1 min at 95 LC; followed by 25 cycles of 1 min at 49.4 LC, 2 min at 72 LC; and followed by a final extension at 72 LC for 10 min. The forward primer included a Ndel site, and the reverse primer a HindIII site (underlined). The resulting amplified fragment, with a total length of 1311 nucleotides, was first cloned into the vector pGEM T-Easy (Promega) using standard cloning conditions. After transformation of E. coli DH5a cells and screening of recombinant colo-nies, recombinant plasmid, named pGEMMalE, was а selected, amplified, and cleaved with Ndel and HindIII enzymes (Invitrogen) to release the 1311 kbp fragment, which was purified from agarose gels and subsequently cloned into the expression vector pET28a (Novagen), previously treated with Ndel/HindIII. Transformation efficiencies of approximately 10' c.f.u./lg DNA were routinely achieved with chemically competent E. coli DH5a cells. One recombinant colony, selected out of 10 chosen colonies, was subjected to restriction analysis and nucleotide sequencing. The recombinant plasmid, named pETMalE, was further purified in larger quantities and transformed into the E. coli BL21(DE3) strain (Novagen). One recombinant clone chosen at random among a lawn of recombinant colonies was selected for further analysis of protein expression and purifica-tion. The recombinant X. citri MBP was expressed as a cytoplasmic protein with a His6-tag genetically fused at the N-terminal end (HT-MBP).

Computational analysis

The nucleotide and corresponding amino acid sequences of the X. citri malE gene (gene ID 1156381) were made available by the Xanthomonas project (http://genoma4.ig.usp.br/xanthomonas) and retrieved from the GenBank (Accession No. AE011868). Search of MBP ortholog sequences was first carried out using the KEGG2 program of the Bioinformatics Center Institute for Chemical Research Kyoto University (www.genome.jp). The alignments of MBP amino acid sequences were carried out using the BLASTP, available at the National Center of Biotechnology Information server http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and Clu-stalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/). Prediction of signal peptide and transmembrane sequences was determined with SignalP and DAS programs, respectively http:// (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/, and http://www.sbc. su.se/~miklos/DAS/). Protein parameters of the X. citri MBP were calculated with application of programs available at Molecular Biology the Expasy Server http://www.au.expasy.org/). Definition of conserved structural domains was carried out with the Conserved Domain Search program available at NCBI (http://

www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), as previously reported by Marchler-Bauer and Bryant [14]. The MBP sequences reported in Fig. 1 are those derived from X. campestris, Xylella fastidiosa, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, Yersinia pestis, Erwinia carotovora, E. coli, Pyrococcus furiosus, Thermococcus litoralis, and Alicyclobacillus acidocaldarius.



Fig. 1. Computational analysis of X. citri MBP comprising sequence alignments and definition of functional and structural domains. (A) Amino acid identity shared by different bacterial MBPs in relation to the X. citri protein. The open boxes indicate the amino acid identity values (expressed as percent of the total amino acid sequence of X. citri MBP) of MBP orthologs expressed by different bacterial species. The total numbers of amino acids of the MBPs expressed by the different bacterial species are indicated in the left side of the figure. Boxes in gray represent MBPs with solved structure available at the Protein Data Bank. (B) Analysis of conserved structural and functional domains of X. citri MBP based on comparison with other periplasmic binding proteins, as determined with the Conserved Domain Search program. The bar and numbers on the top of the figure (signal peptide in gray, mature sequence in black) refer to the size in amino acids of the X. citri MBP. The open boxes indicate the classes of binding proteins sharing conserved functional and structural domains with X. citri MBP, as indicated: SBP, bacterial extracellular solute-binding proteins; UgpB, sugar-binding proteins; MBP, maltose-binding pro-teins; and PotD, spermine/putrescine-binding proteins. The accession numbers of each protein class sharing similarity with X. citri MBP are indicated, as well as the calculated similarity values, expressed as percentages of X. citri MBP amino acid sequence used in the analysis (SBP, 330 residues; UgpB, 403 residues; MalE, 420 residues; and PotD, 363 residues).

Protein expression and purification

Cultures of the recombinant E. coli BL21(DE3) strain carrying pETMalE were grown aerobically in Erlenmeyer flasks containing LB or M9 medium with 50 Ig/mL kanamycin until mid-log phase (OD₆₀₀ 0.5– 0.6) before inducer adding (0.1 mM IPTG). The cul-tures were induced aerobically (200 rpm) either for 2 or 4 h or statically overnight at different temperatures (23, 28, and 37 LC). Optimal expression levels as well as higher solubility levels were defined after evaluat-ing different induction parameters including growth media, aeration, and temperature during the induc-tion period. Cells were collected by centrifugation

and stored at 320 LC for approximately 16 h before 1 L cultures were suspended in 10 mL Buffer 1 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 mM PMSF, and 3 mM imidazole) and incubated with lysozyme (final concentration of 100 lg/mL) for 1 h in an ice bath. Cells were maintained in ice and sonically disrupted after 4 pulses of 20 s. in a Branson Digital Sonifier (Model 450), with 30% amplitude, followed by centrifugation at 18,000 rpm for 20 min to obtain the soluble and non-soluble cellular frac-tions. The HT-MBP was purified from soluble protein extracts after addition of a nickel-charged Sepharose (ProBond, Invitrogen) slurry (1 mL of resin for 15 mg of total protein) previously washed with two volumes of water and one volume of Buffer 1, and incubated for 1 h under mild agitation. The charged resin was transferred to a plastic column and washed with 10 volumes with Buffer 1 followed by washing with three volumes of Buffer 2 (Buffer 1 plus 20 mM imidazole). The bound HT-MBP was serially eluted with buffers with increasing imidazole concen-

trations (Buffer 3, 50 mM; Buffer 4, 100 mM; Buffer 5, 200 mM; and Buffer 6, 500 mM). Eluted HT-MBP-containing fractions were dialyzed with 50 mM Tris-Cl and 100 mM NaCl. Samples were concentrated with Ultrafree MWCO 10,000 centrifugal filters (Amicon Millipore) to a final concentration of 10 mg/ mL. The eluted protein fractions were analyzed by SDS-PAGE using 12% acrylamide gels. Amylosebinding experiments were performed with purified HT-MBP in Buffer A (Tris 20 mM, pH 8.2, NaCl 50 mM, and 10 mM maltose) and amylose resin (Eng-land Biolabs). The protein was mixed with the resin at a ratio of 1 mL resin:3 mg protein and incubated for 1 h at room temperature. After two washes with Buffer A, the bound HT-MBP was eluted with Buffer A, which contained 150 mM maltose. All samples were analyzed by SDS-PAGE using 12.5% acrylamide gels stained with Coomassie blue. Protein concentration was determined spectrophotometrically using the Edelhoch method [15].

Circular dichroism

Experiments were performed with 10 IM MBP and 20 IM maltose in buffer Tris 20 mM, pH 8.2, NaCl 50 mM. Circular dichroism (CD) spectra were recorded using a JASCO J-820 spectropolarimeter equipped with a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system). The data were recorded from 260 to 200 nm at 21 LC using a quartz cell (Helma) with a path length of 1.0 mm. To improve the signal-to-noise ratio, a total of 20 accumulations were taken for each spectrum with a speed of 20 nm/min at a resolution of 0.5 nm, re-sponses of 1 s and bandwidth of 1.0 nm. Secondary structures were assigned using the DICROPROT pro-gram [16].

Fluorescence measurements

All fluorescence experiments were performed in 20 mM Tris–Cl, pH 8.2, 100 mM NaCl at 21 LC. Protein samples (1 IM) were incubated with maltose concentrations ranging from 1 to 9 IM before monitoring the emitted fluorescence on a Bowman Series 2 spectrofluorometer (AMINCO) set at an excitation wavelength of 295 nm. The fluorescence emission was recorded in wavelengths ranging from of 300 to 450 nm with spectral bandwidths of 2 nm. The fluorescence integer was calculated using the Origin software (Microcal), and the emission fluorescence center of mass (CM) was calculated with the following equation:

 $\begin{array}{ccc} X & m_i X \ F_i = X \\ \text{where } m_i \ \text{is the wavelength and } F_i \ \text{is the intensity at } m_i \\ [17]. \end{array}$

Results

Identification of the X. citri malE gene and sequence similarity analysis with orthologs

The search of X. citri malE orthologs led to the identification of one open reading frame (GI:21108556, 1368 base pair) and another one in the closely related phytopathogen X. campestris (GI:998803, 1344 base pair). Both genes were annotated as malE and would be responsible for the codification of MBP in these bacte-[14]. The X. citri malE gene encodes a rial species puta-tive protein with 456 amino acids, with a predicted signal peptide of 19 amino acids, while the X. campestris malE gene encodes a putative protein of 448 amino acids. Alignment of the X. citri MBP with different orthologs showed that the proteins expressed by two phytopathogens, X. campestris and X. fastidiosa, displayed the highest amino acid identity values, corresponding to 90 and 72% over the complete X. citri

MBP amino acid sequence, respectively (Fig. 1A). Other MBP orthologs found in genomes of different bacterial species displayed significantly reduced identity values ranging from 20%, in E. carotovora to 9% in S. flexneri (Fig. 1A). Further computational analysis based on the presence of conserved structural and functional domains [14] revealed that the X. citri MBP shares high similarity values over most of the mature protein length with other periplasmic substrate binding proteins such as: SBP, a group of bacterial extracellular solute-binding proteins; UgpB, a group of proteins represented by the binding component of ABC-type sugar transport systems; MalE of MBP, the maltose and maltodextrinbinding proteins; and and PotD, formed by proteins with the ability to bind spermidine/putrescine (Fig. 1B). Thus, in spite of the low amino acid identity shared with previously iden-tified orthologs, X. citri MBP preserves functional and structural domains, which are characteristic of periplas-mic substrate binding proteins expressed by diverse gram-negative bacterial species.

Expression and purification of recombinant X. citri MBP

The recombinant MBP of X. citri was expressed and purified from E. coli BL21 as a soluble cytosolic protein (HT-MBP) genetically fused at the N-terminal end with a His₆-tag and an additional sequence (20 aa) defining thrombin cleavage site. Attempts to express the recom-binant protein with an intact signal peptide and a C-ter-minal His6-tag failed to promote secretion to the periplasmic space of the recombinant strain, suggesting that the X. citri MBP signal peptide was not recognized by the E. coli membrane protein secretion apparatus (data not shown). A putative 19 amino acid long MBP signal peptide was identified with the SignalP program. Specific primers were thus designed to amplify a 1.3 kbp fragment containing the X. citri mature MBP se-guence to be cloned into the pET28a expression vector. The fragment was cloned in an intermediate vector (pGEM-T) before subsequent forced cloning into the Ndel and HindIII restriction sites of pET28a, which re-sulted in the pETMalE expression vector. The recombi-nant HT-MBP was expressed in E. coli BL21 under the control of the T7 phage promoter resulting in protein yields of approximately 100-150 mg/L, which corre-sponded to levels up to 40% of the total cell protein (Fig. 2). There is no evidence of growth impairment of bacterial colonies transformed with pETMalE under non-inducing conditions. However, a clear growth arrest was detected after addition of the inducer to the growth medium (data not shown). Different induction protocols based on variation of incubation temperature, aeration, culture media, and induction time were tested to opti-mize the expression yields of both total and soluble re-combinant protein (Table 2). Under the tested conditions, maximal yields of the soluble protein were



Fig. 2. Expression of recombinant HT-MBP in E. coli BL21(DE3). Whole-cell extracts or soluble fractions were loaded on polyacrylamide gels after IPTG induction in LB medium at 23 LC (lanes 2–4) or 37 LC (lanes 5–7). Lane 1, prestained molecular weight markers (Invitrogen); lanes 2 and 5, whole-cell extracts of non-induced cultures after overnight growth; lanes 3 and 6, whole-cell extracts of cultures kept overnight at the inducing conditions; and lanes 4 and 7, soluble fractions of cultures kept overnight at the inducing conditions. Similar protein amounts were loaded in each well (30 ng/well) and sorted in 12.5% polyacrylamide gels stained with Coomassie brilliant blue. The arrow indicates the position of the 50 kDa marker.

achieved in cultures prepared with LB medium kept overnight at 23 LC with low aeration levels, which resulted in an almost exclusively soluble protein at a concentration of 150 mg/ml (Table 2). Other tested conditions resulted in soluble recombinant protein at yields ranging from 91.5 to 26.6% of the total protein expressed (Table 2). For all conditions, the lack of aeration was an important factor for the observed increase in the solubility of the recombinant protein, particularly when the HT-MBP was induced at 28 LC. Similar high HT-MBP yields were obtained in cultures induced at 37 LC for 2 or 4 h when compared to samples incubated at lower temperatures for 16 h, but the solubility levels of the recombinant protein were clearly enhanced in cultures kept at 23 LC. Taken together, these data indicated that both aeration and induction temperature affect the expression of the recombinant protein, whereas conditions favoring reduced growth rates tended to enhance the solubility of the recombinant protein.

The protein was purified in a single step after elution of bound protein from loaded resin with imidazole-containing buffer at concentrations ranging from 50 to

(see Fig. 3A). Based on the elution 150 mM carried out with 50 mM imidazole and cultures induced at 23 LC for 16 h in LB medium, the total recombinant protein yield ranged from 0.120 to 0.150 g/L. The purified protein remained completely soluble at high concentrations (15–30 mg/mL) even after prolonged storage at 4 or ₃20 LC. To evaluate the integrity and biological activity of the purified protein, the sugar-binding prop-erty of the recombinant HT-MBP was evaluated in binding assays carried out with an amylose-containing



Fig. 3. Purification of HT-MBP and evaluation of amylose-binding property of the recombinant protein. (A) Purification of HT-MBP by affinity chromatography and elution with buffers containing different imidazole concentrations. Lane 1, flowthrough; 2, pre-stained molecular weight markers (Invitrogen); lanes 3–6, fractions eluted with buffers containing 50, 100, 200, and 500 mM imidazole, respectively.

(B) Ligation of HT-MBP to amylose resin. The purified protein was mixed with the amylose resin at a 3:1 ratio and samples of the protein were analyzed by SDS-PAGE. Lane 1, purified MBP (1 lg); lane 2, amylose resin; lane 3, amylose + MBP; lane 4; flowthrough; and lane 5, MBP eluted with 150 mM maltose.

Tab	le	2
-----	----	---

a

Induction temperature ^a (LC)	Aeration ^b	Culture media	Induction period (h)	Total protein ^e (g/L)	Soluble protein (g/L)	% Soluble protein ⁹
37	+	LB	2	0.120	0.052	43.4
37		LB	4	0.110	0.064	58.2
37	3 +	M9	2	0.097	0.042	43.2
28	+	LB	2	0.126	0.073	58.0
28		LB	4	0.129	0.090	69.8
28	3	MQ	2	0.120	0.032	26.6
28	·	M9	16	0.102	0.064	62.7
23	3	LB	16	0.150	0.150	100.0
23	3 3	M9	16	0.142	0.130	91.5

^a Incubation temperature following addition of inducer to the bacterial culture, as described in the text.

^b Cultures kept in flasks within an orbital shaker set at 200 rpm (+) or kept statically (3) during the induction period.

d Cultures were kept under inducing conditions for 2 h, 4 h or overnight (16 h).

^e Total protein yields as obtained with 1 L cultures kept in 3.6 L Fernbach flasks.

^f Amount of soluble HT-protein recovered after affinity purification with nickel-charged resin and elution with imidazole-containing buffer.

Ratio of recovered colluble protein (a/l)/ total protein (a/l) expressed in percentages 125

resin. As shown in Fig. 3B, the purified MBP remained fully capable of binding the amylose resin, from which the protein was eluted with buffer containing 150 mM maltose. Such experimental evidence indicated that the purified HT-MBP remained biologically active, an indication of preserved conformation as compared with the native protein expressed by X. citri.

Maltose-binding studies of the purified recombinant X. citri MBP

Further evidence that the recombinant HT-MBP preserved the structure and biological function of the native X. citri MBP was obtained by determination of CD (Fig. 4A) and intrinsic emission fluorescence (Fig. 4B) spectra of the recombinant protein at unbound and maltose-bound states. The CD spectrum of HT-MBP (Fig. 4A) is characteristic of an a-helical protein with minima at 208 and 222 nm. The predicted secondary structure of the recombinant protein, carried out with the DICRO-PROT program, indicated an overall structure of the maltose-bound form of 36% a-helices and 17% bstrands, while turns and random coils represented 40% of the predicted secondary structure. These percentages are similar to that described for E. coli maltose-bound MBP (40% a-helices and 16% b-strand) [18]. The far-UV CD recorded spectra indicated that in the presence of maltose HT-MBP has a higher a-helical content than

in the absence of maltose (Fig. 4A and Table 3). HT-MBP has 14 Trp residues and emission fluorescence spectroscopy was used to observe the environment of these residues (Fig. 4B). Since the observed fluorescence spectrum is a sum of each Trp fluorescence spectrum, only an average evaluation of the Trps environment is possible. The maximum intensity wavelength (k_{max}) of fluorescence was 341 nm and the emission fluorescence center of mass was 354 nm (Table 3) indicating that, on average, the Trps were partially exposed to the sol-vent. There was also a detectable change in the HT-MBP emission fluorescence spectrum, which decreased in the presence of maltose as detected by the integer of the spectra (Table 3). However, this change was almost negligible inside the error.

Discussion

Plant bacterial pathogens, such as the Xanthomonas species, rely on the ability to promote the active trans-port of essential nutrients from infected tissues to thrive and proliferate, leading to disease symptoms in suscepti-ble hosts. Maltose and maltodextrins (oligosaccharides up to 7 or 8 a-1,4-linked glucose units) are major poly-saccharides available for bacteria in plant tissues, and represent important sources of carbon and energy. The uptake of maltose/maltodextrin in E. coli requires a



Fig. 4. CD and intrinsic fluorescence emission spectra of unbound and maltose-bound HT-MBP. (A) CD spectra of HT-MBP. The continuous line shows the spectrum acquired without adding ligand; the interrupted line represents the spectrum acquired in the presence of 20IM maltose. The spectrum of HT-MBP is characteristic of an a-helical protein. (B) Intrinsic emission fluorescence of the recombinant protein in the presence or absence of maltose. The solid line represents the emitted fluorescence of unbound HT-MBP while the interrupted line represents the emitted fluorescence of the protein in the presence of 9 IM maltose.

Table 3 HT-MBP spectroscopic parameters

Protein	CD at 222 nm (deg cm ² dmol ³)	Fluorescence kmax(nm)	Fluorescence center of mass (nm)	Fluorescence integer
MBP	-1700	341	354	43
MBP + maltose	34700 38300	341	354	41

membrane-bound ABC-type transporter comprising two hydrophobic permeases (MalF and MalG), two copies of the ATPase subunit (MalK), and one binding protein (MBP or MalE), that confer specificity and affin-ity toward the transported solutes [1,19]. In spite of the obvious relevance of polysaccharide uptake systems in regard to understanding the nutritional strategies of plant pathogens, there has been no previous attempt to identify and characterize such proteins among Xanthomonas species. In this work, we describe the identification of the X. citri MBP-encoding gene and some of the properties of a recombinant protein while showing that both functional and conformational features of the protein are preserved.

Genes involved in maltose uptake have been identified in the annotated genomes of the plant pathogens

X. citri and X. campestris [13]. In contrast to E. coli and other bacterial species, the genes encoding the bind-ing component and the ATPase subunit of X. citri are not physically linked to those encoding the hydrophobic components, suggesting alternative regulatory pathways controlling the balanced expression of the transport system components. Moreover, comparison of the amino acid sequence of the X. citri maltose-binding component indicated that the protein, as well as those proteins derived from other plant pathogens (X. campestris and X. fastidiosa), has been engaged in a different phylogenetic branch. Despite the low similarity shared with orthologs expressed by other bacterial species, X. citri MBP possesses typical structural and functional domains of bacterial binding proteins involved in the active uptake of sugar and other nutrients, as demonstrated by the CD-Search program. The CD-Search multiple alignment tool supplies information on the presence of conserved conformational domains shared by groups of proteins displaying similar conformation and biological functions [14]. Taken together, these evidences suggest that X. citri MBP evolved distinctly from other ortho-logs yet preserving structural and functional features characteristic of ABC transporter ligand-binding components.

Attempts to express the X. citri MBP in recombinant E. coli strains have failed to promote secretion of the protein into the periplasmic space. Moreover, most of the expressed recombinant protein accumulated intracellularly as inclusion bodies. The X. citri MBP encompasses a mature polypeptide of 437 residues, including 47% non-polar, 28.8% uncharged polar, 12% acidic, and 12.2% basic amino acids, and a putative 19 amino acid long signal peptide. The failure to secrete the recombinant protein suggests that the secretion apparatus of E. coli does not efficiently recognize the signal sequence of X. citri MBP, an observation that could dictate further attempts to express X. citri secreted proteins. Nonetheless, successful expression of soluble MBP was achieved after removing the signal peptide

and fusion of the His₆-tag to the N-terminal region. Using such approach, we could routinely attain high recovery yields of completely soluble X. citri MBP, which allowed purification of the recombinant protein at a nearly homogeneous state. The same strategy has been used to express other ABC transporter ligand-binding components and represents an experimental alternative to the expression of X. citri proteins to be purified by metal-affinity chromatography (unpublished observations).

The high solubility of HT-MBP and preserved ability to bind amylose suggest that X. citri MBP also repre-sents a proper vehicle for the expression of target heterologous proteins in bacteria and eukaryotic systems. Previous comparison of different bacterial MBPs as fusion partners has indicated that proteins distantly related to the E. coli ortholog, such as those of P. furiosus and T. litoralis, can improve the solubility of recombinant heterologous proteins [20]. The successful expression of completely soluble MBP and the ability to purify protein through dual affinity chromatography point that further testing of X. citri MBP as a vehicle for expression of fused protein is worth pursuing.

The X-ray structures of E. coli maltose-free and maltose-bound MBP revealed that each monomer has two distinct globular domains separated by a groove wherein lies the ligand [4,21]. Upon maltose binding, a hinge bends repeatedly between the two globular domains, affecting the aromatic residues lining the binding cleft without significantly affecting the structure of the individual globular domains [4,21,22]. The aromatic residues involved in the hydrophobic interactions with the bound maltose are compressed against the sides of the binding cleft of the protein, restricting tryptophan, and tyrosine side chain mobilities, thus, reducing the static fluorescence emission of the protein [22]. Measurements of CD in the presence and absence of maltose confirmed that binding of maltose resulted in a large conforma-tional change of the protein, most probably reflecting the movement of the two lateral domains toward the substrate buried inside the cleft. These data also con-firmed that the purified recombinant protein preserved structural and functional features of the native protein expressed by X. citri.

Fluorescence enhancement appeared is usually dependent on conformational changes of proteins but static fluorescence measurements are limited in their ability to provide information on the specific amino acids and spatial movements involved. Sharff et al.. [21], and Telmer and Shilton [7] showed that in E. coli the residues trp62, trp230, and trp340 are involved in hydrophobic stacking interactions with the bound maltose. The W230A mutation caused an increase in maltose-induced quenching to 30%, whereas the W158A mutation resulted in a complete loss of maltose-induced quenching [7]. In X. citri MBP, the trp230 and trp340

residues are conserved but the specific roles of such res-idues on the emitted fluorescence of the protein and li-gand binding properties are still unknown. Further elucidation of MBP tridimensional structure will help in the general understanding of protein-ligand interac-tions and in the specific understanding of the putative roles of MBP on the physiology and pathogenicity of X. citri.

Acknowledgments

We thankfully acknowledge the helpful technical assistance of S.F.S. Lucas and continuous support of Dr. R. Meneghini. This work was supported by a FA-PESP (Fundac,a[°]o de Amparo a[°] Pesquisa do Estado de Sa^o Paulo) grant as part of the Structural and Molecular Biology Net Program (SMolBNet).

References

- [1] W. Boos, H. Shuman, Maltose/maltodextrin system of Escherichia coli: transport, metabolism, and regulation, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1998) 204-229
- [2] R. Tam, M.H. Saier, Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solutebinding receptors of bacteria, Microbiol. Rev. 57 (1993) 320-346.
- [3] J.A. Hall, K. Gehring, H. Nikaido, Two modes of ligand binding in maltose-binding protein of Escherichia coli, J. Biol. Chem. 272 (1997) 17605-17609
- [4] J.C. Spurlino, G.Y. Lu, F.A. Quicho, The 2.3A resolution structure of the maltose or maltodextrinbinding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis, J. Biol. Chem. 266 (1991) 5202-5219.
- [5] F.A. Saul, M. Mourez, B.V. Le-Normand, N. Sassoon, G.A. Bentley, J.-M Betton, Crystal structure of a defective folding protein, Protein Sci. 12 (2003) 577-585
- [6] O. Millet, R.P. Hudson, L.E. Kay, The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 12700-12705.
- [7] P.G. Telmer, B.H. Shilton, Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants, J. Biol. Chem. 278 (2003) 34555-34567.
- [8] Y. Zhang, P.J. Gardina, A.S. Kuebler, H.S. Kang, J.A. Christo-pher, M.D. Manson, Model of maltose-binding

protein/chemo-receptor complex supports intrasubunit signaling mechanism, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 939-944.

[9] D. Wassemberg, W. Liebl, R. Jaenicke, Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium Thermogota maritima: stability and binding properties, J. Mol. Biol. 295 (2000) 279-288.

- [10] J. Diez, K. Diederichs, G. Greller, R. Horlacher, W. Boos, W. Welte, The crystal structure of a liganded threalose/maltose-binding protein from hyperthermophilic archaeon Thermococcus litoralis at 1.85A, J. Mol. Biol. 305 (2001) 905–915.
- [11] K. Scha狄er, U. Magnusson, F. Scheffel, A. Schiefner, M.O.J. Sandgren, K. Diederichs, W. Welte, A. Hu旬smann, E. Schneider, S. Mowbray, X-ray structures of the maltose-maltodextrin bind-ing protein of the thermoacidophilic bacterium Alicyclobacillus acidocaldarius provide insight into acid stability of proteins, J. Mol. Biol. 335 (2004) 261–274.
- [12] A.M. Brunings, D.W. Gabriel, Xanthomonas citri: breaking the surface, Mol. Plant Pathol. 4 (2003) 141–157.
- [13] A.C da Silva, J.A. Ferro, F.C. Reinach, C.S. Farah, L.R. Furlan, R.B. Quaggio, C.B. Monteiro-Vitorello, M.A. Van Sluys, N.F. Almeida, L.M. Alves, A.M. do Amaral, M.C. Bertolini, L.E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chamb-ergo, L.P. Ciapina, R.M. Cicarelli, L.L. Coutinho, J.R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J.B. Faria, A.J. Ferreira, R.C.C. Ferreira, M.I. Ferro, E.F. Formighieri, M.C. Franco, C.C. Greggio, A. Gruber, A.M. Katsuyama, L.T. Kishi, R.P. Leite, E.G. Lemos, M.V. Lemos, E.C. Locali, M.A. Machado, A.M. Madeira, N.M. Martinez-Rossi, E.C. Martins, J. Meidanis, C.F. Menck, C.Y. Miyaki, D.H. Moon, L.M. Moreira, M.T. Novo, V.K. Okura, M.C. Oliveira, V.R. Oliveira, H.A. Pereira, A. Rossi, J.A. Sena, C. Silva, R.F. de Souza, L.A. Spinola, M.A. Takita, R.E. Tamura, E.C. Teixeira, R.I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S.M. Tsai, F.F. White, J.C. Setubal, J.P. Kitajima, Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities, Nature 23 (2002) 459-463.
- [14] A. Marchler-Bauer, S.H. Bryant, CD-Search: protein domain annotations on the fly, Nucleic Acid Res. 32 (2004) 327–331.
- [15] H. Edelhock, Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in protein, Biochemistry 6 (1997) 1948–1954.
- [16] G. Dele²/₂ge, C. Geourjon, An interactive graphic program for calculating the secondary structures content ofproteinsfrom circular dichroism spectrum, Comput. Appl. Biosc. 9 (1993) 197–199.
- [17] J.L. Silva, E.W. Miles, G. Weber, Pressure dissociation and conformational drift of the b-dimer of tryptophan synthase, Biochemistry 25 (1986) 5780– 5786.
- [18] F.A. Quiocho, J.C. Spurlino, L.E. Rodseth, Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution struc-tures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor, Struc-ture 5 (1997) 997–1015.
- [19] P. Duplay, H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin, M. Hofnung, Sequences of the malE gene and its product, the maltose-binding protein of Escherichia coli K12, J. Biol. Chem. 259 (1984) 10606–10613.
- [20] J.D. Fox, K.M. Routzhan, M.H. Bucher, D.S. Waugh, Malto-dextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers, FEBS

Lett. 537 (2003) 53-57.

- [21] A.J. Sharff, L.E. Rodseth, J.C. Spurlino, F.A. Quiocho, Crystal-lographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis, Biochemistry 31 (1992) 10657–10663.
- [22] G. Gilardi, G. Mei, N. Rosato, A.F. Agro, A.E.G. Cass, Spectro-scopic properties of an engineered maltose binding protein, Protein Eng. 10 (1997) 479–486.