

PÂMELA DE OLIVEIRA PENA

**Estudos estruturais e funcionais da proteína repressora PhoU na
sinalização de transporte de fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

PÂMELA DE OLIVEIRA PENA

**Estudos estruturais e funcionais da proteína repressora PhoU na
sinalização de transporte de fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Andrea Balan

Versão Corrigida

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pena, Pamela de Oliveira
Estudos estruturais e funcionais da proteína
repressora PhoU na sinalização de transporte de
fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* /
Pamela de Oliveira Pena; orientador Andrea Balan. --
São Paulo, 2017.
75 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Sistema de Dois Componentes. 2. Pho Regulon.
3. Sistema Pst. 4. *Xanthomonas citri*. 5. PhoU. I.
Balan, Andrea, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pamela de Oliveira Pena

Título da Dissertação: Estudos estruturais e funcionais da proteína repressora PhoU na sinalização de transporte de fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Orientador: Profa. Dra. Andrea Balan

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Arnaldo de Góes Oliveira", Buleriá, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

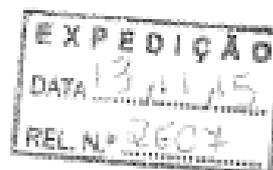
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 776/2015 referente ao projeto intitulado: "*Estudos Estruturais e Funcionais da Proteína Repressora PhoU na Sinalização de Transporte de Fosfato em Xanthomonas axonopodis pv. citri*" sob a responsabilidade de Pâmela de Oliveira Pena e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Andrea Balan Fernandes**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPSH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 04 de novembro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paulo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP



Aos meus pais dedico esse trabalho, pelo apoio incondicional, amor insondável e paciência infinita durante todo o meu processo de formação.

Muito Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, e por todos os caminhos nos quais me direcionou. Sem ele, nada do que foi feito se fez. A ele toda a gratidão!

Agradeço em especial, aos meus queridos pais Carla e Luís. Durante todos esses meses, meus pais tem sido minha base forte, meu apoio real! Sou muito grata por tê-los em minha vida, e pelo incentivo incondicional durante todo este mestrado! Eu amo vocês!

À Dra. Andrea Balan, eu agradeço imensamente! Obrigada por ser minha orientadora, e ter me aceitado como sua aluna. Agradeço por todos os conselhos, risadas, broncas, e por seu otimismo e confiança! Obrigada por me mostrar que com esforço tudo é possível! E também por me ensinar que ciência e elegância combinam e, muito!

À Msc. Cristiane Tambascia, (e quase Dra.!), meu muito obrigada! Obrigada por me ensinar a rotina do laboratório, por compartilhar material, por explicar protocolos, por orientações de “outras naturezas”. Ah, como sentirei falta dos dias, juntas! E muito obrigada por ser minha “mãezona”. A você, minha gratidão pra sempre! (Who Cares sempre será nosso elo, AHHA)

Ao doutorando Marcelo Oliveira, obrigada por cada momento compartilhado, cada almoço, cada doce que você trouxe da sua mãe (RSRS). Você me ensinou muito com sua amizade, e também com seu grande conhecimento! Meu muito obrigada! Sentirei muita falta de nossas conversas, experimentos, almoços e tudo mais que tínhamos direito! Mas desejo a você toda sorte do mundo, e que seu doutorado seja só sucesso!

Msc. Andréia Cerone obrigada pelas voltas no fretado, quando colocávamos nossos papos em dia, e conversávamos de coisas da vida. Obrigada por tão pacientemente me ensinar muitas coisas, com dedicação e cuidado! Você é um exemplo para mim!

Aos meus queridos colegas de laboratório, não tenho palavras de como vocês são especiais para mim. Sindy e Lilia, obrigada pelos momentos compartilhados, pelo carinho, e por tudo! Foi um prazer conhecer a Colômbia através de vocês! Gabriel, obrigada por ser esse garoto maravilhoso! Você me ensina como ser muito bom no que faz. Sentirei falta de todos vocês, incluindo

Cindy Lee, essa princesa e todos os outros que passaram por nós, incluindo Dra. Ana Letícia Lusa e outros! Pra sempre LBEA- Divisão Transportadores!

Meu agradecimento também deixo para cada aluno do LBEA – divisão FÁrmacos! Vocês são maravilhosos!!!! Obrigada por todos os momentos felizes! Todos vocês, do LBEA, ajudaram momentos de frustração a se tornarem momentos mais leves e mais divertidos de serem enfrentados! Meu muito obrigada!

Meus mais sinceros agradecimentos também:

À mestranda Natália Cerrone, com quem compartilhei uma casa, minha vida e muitas histórias do mestrado: minha flatmate e labmate, obrigada por tudo!

Ao Msc. Gerardo Libreiros, pelos conhecimentos em Thermal Shift.

À Msc. Larissa de Sá, pela ajuda com dados de bioinformática e pela amizade genuína.

Ao Mestrando João Pimenta, pela ajuda com ensaios de fluorescência.

À Msc. Tabata Cardoso, Catharina Santos e Priscila Bury por, em muitos dos dias, me fazer sentir melhor! Em especial, pelas nossas composições, não é mesmo, Tábata!?

À Dra. Vanessa Pegos, por me indicar para a Dra. Andrea Balan, e pelo projeto a mim confiado, como sucessora.

Ao professor Luiz Carlos de Souza Ferreira, pelos equipamentos dos quais dispôs ao nosso favor, assim como seus alunos Rubéns Prince dos Santos Alvez e Ana Carolina Ramos Moreno, pela produção de anticorpos.

Ao professor Patrick Spencer, pelo auxílio e disposição em ceder sua agenda ao FPLC, e também à sua aluna, Marcela Di Giácomo, pelo tempo e pela ajuda nas cromatografias.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, e ao departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, meu muito obrigada. Amo essa universidade, e agradeço muito por cada funcionário e professor que ali conheci.

Por fim, a cada um que contribuiu direta ou indiretamente para realização deste trabalho, seja com conhecimentos, palavras, conselhos, ombro amigo, estando longe ou perto!

A todos vocês meu muito obrigada!

Este projeto foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada, no Instituto de Biomédicas II, sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) número processo 2015/18712-2, a quem agradeço pela bolsa concedida.

“Sejam quais foram os resultados, com êxito ou não, o importante é que no final cada um possa dizer: fiz o que pude”.

Louis Pasteur

RESUMO

PENA, P. O. **Estudos estruturais e funcionais da proteína repressora PhoU na sinalização de transporte de fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A habilidade de sensoriar o ambiente extracelular e responder às suas mudanças é inerente para a maioria das bactérias. As concentrações de nutrientes direcionam os processos metabólicos relacionados à sobrevivência e proliferação. O fosfato inorgânico (Pi) é um dos nutrientes cuja regulação, sensoriamento e sinalização são bastante conservados em bactéria. Um dos mecanismos de captação do íon fosfato com alta afinidade é o sistema Pst, um transportador do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*), localizado na membrana interna das células. Este transportador, juntamente com as proteínas PhoR/PhoB que formam um sistema de dois componentes (*Two-Component Regulatory System*), são capazes de sensoriar e monitorar os níveis deste íon nas células. Ambos os sistemas pertencem ao chamado regulon Pho, conjunto de genes envolvidos no transporte, captação e metabolização do fosfato. Estudos tem mostrado que a interação entre os sistema Pst e o sistema dois-componentes PhoR/PhoB é mediada pela proteína PhoU, um regulador negativo cujo gene encontra-se no mesmo operon do transportador. Apesar de muito estudados em *Escherichia coli*, poucas informações existem sobre as características destes sistemas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, bactéria responsável pelo cancro cítrico e de grande importância econômica para o país. Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que *X. citri* conserva a maioria dos genes descritos como pertencentes ao regulon Pho, incluindo o sistema Pst, as proteínas PhoR/PhoB e PhoU. Este trabalho, portanto, tem como objetivos, a caracterização funcional e estrutural da proteína PhoU de *X. citri* e a análise da possível interação de PhoU com a proteína PhoR, a histidina quinase do sistema dois componentes. Para tal, as proteínas foram expressas em linhagens de *E. coli* Tuner e purificadas por cromatografia de afinidade a metal, seguida de exclusão molecular. Visando a caracterização biofísica e estrutural da proteína PhoU, foram realizados ensaios de dicroísmo circular, cristalização, análises de bioinformática e modelagem molecular. Os resultados de bioinformática mostraram que PhoU conserva características estruturais e funcionais quando comparada com ortólogos. Após sua purificação, a proteína foi produzida na sua forma enovelada e mostrou interação com ligantes, conforme descrito na literatura para ortólogos. A expressão da proteína PhoR também foi obtida e ensaios de *pull-down* foram realizados para a caracterização da interação entre PhoU-PhoR. Adicionalmente, foram realizados estudos de expressão das proteínas em diferentes condições de cultivo, utilizando-se anticorpos policlonais anti-PhoU e anti-PhoR. Os resultados apresentados neste projeto são de grande importância uma vez que se obteve a padronização dos processos de produção de ambas as proteínas e ensaios biofísicos e estruturais para a futura caracterização do complexo, o que será de grande relevância para a compreensão do papel destes sistemas na fisiologia da bactéria.

Palavras chave: Sistema de Dois Componentes. Pho Regulon. Sistema Pst. *Xanthomonas citri*. PhoU.

ABSTRACT

PENA, P. O. **Structural and functional studies of the repressor protein PhoU in phosphate signalling and uptake in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*** 2018. 75 f. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The ability to sensor the extracellular environment and respond to its changes is inherent to most bacteria. Nutrient concentrations direct metabolic processes related to survival and proliferation. Inorganic phosphate (Pi) is one of the nutrients whose regulation, sensing and signalling are quite preserved in bacteria. One of the mechanisms for phosphate ion uptake with high affinity is the Pst system, composed by an ABC transporter (ATP-Binding Cassette), located on the inner membrane of the cells. This transporter, along with the PhoR/PhoB proteins, which form a Two Component Regulatory System, are capable of sensing and monitoring the levels of phosphate in cells. Both systems belong to the called regulon Pho, set of genes involved in phosphate transport, uptake and metabolism. Studies have shown that the interaction between the Pst system and the two component PhoR/PhoB system is mediated by the PhoU protein, a negative regulator, whose gene is located in the same operon of Pst system. Although much studied in *Escherichia coli*, there are few information about of these systems in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the major causative of citric canker. Studies conducted by our group showed that *X. citri* conserves most of the genes described as belonging to regulon Pho, including the Pst system, the proteins PhoR/PhoB and PhoU. This work, therefore, aimed at performing functional and structural characterization of the *X. citri* PhoU protein and analyzing the possible interaction of PhoU with the PhoR protein, the histidine kinase of the Two Component System. For this, the proteins were expressed in *E. coli* Tuner strains and purified by metal affinity chromatography, followed by size exclusion chromatography. Aiming at the biophysical and structural characterization of the PhoU protein, we performed circular dichroism, crystallization, bioinformatics and molecular modeling. The results of bioinformatics showed that PhoU retains structural and functional characteristics when compared with orthologs. After purification, the protein was produced in its folded form and showed interaction with ligands, as described in the literature for orthologs. Expression of the PhoR protein was also obtained and Pull Down assays were performed for the characterization of the interaction between PhoU-PhoR. In addition, protein expression studies were carried out under different culture conditions using polyclonal anti-PhoU and anti-PhoR antibodies. The results presented in this project are of great importance, once the standardization of the production processes of both proteins has been obtained, as well as biophysical and structural information. These information will be important for future characterization of the complex, which will be of great relevance for the understanding of the role of these systems in the physiology of bacteria.

Keywords: Two component system. Pho Regulon. Pst System. *Xanthomonas citri*. PhoU.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de transdução de sinal do sistema de dois componentes (TCRS).....	19
Figura 2 - Ilustração de um transportador ABC do tipo II, característico para o Sistema Pst.....	22
Figura 3 - Esquema de sinalização do sistema Pst na captação e transporte de fosfato em <i>E. coli</i> , em diferentes condições nutricionais.....	24
Figura 4 - Modelo para regulação de PhoU em relação à limitação extracelular de fosfato em <i>Caulobacter crescentus</i>	25
Figura 5 - Características de <i>Xanthomonas citri</i> e consequências da infecção em citrus.....	27
Figura 6 - Resultados dos estudos realizados em <i>X. citri</i>	29
.....	43
Figura 7 - Análise de motivos, ligantes e alinhamento múltiplo de PhoU de <i>X. citri</i> com ortólogos.....	43
Figura 8 - Comparação do potencial eletrostático de PhoU entre diferentes espécies.....	44
Figura 9 - Comparação entre cromatogramas de purificação de PhoU de <i>X. citri</i> utilizando diferentes tampões.....	46
Figura 10 - Etapas de purificação da proteína PhoU por IMAC e SEC representada por cromatogramas e géis de poliacrilamida.....	47
Figura 11 - Resultados obtidos a partir de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).	51
Figura 12 - Espectro de Dicroísmo Circular para PhoU obtidos a partir de diferentes pHs.....	53
Figura 13- Espectro de Dicroísmo Circular para diferentes amostras de PhoU.	54
Figura 14 - Resultado de Dicroísmo Circular e Fluorescência Intrínseca dos aminoácidos aromáticos de PhoU na presença de manganês.....	56
Figura 15 - Verificação dos anticorpos anti-PhoR e anti-PhoU.....	58
Figura 16 - Verificação da expressão da proteína PhoU em diferentes condições de cultivo através de Western Blot.....	59

Figura 17 - Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína PhoR de <i>X. citri</i> e conservação de motivos.....	61
Figura 18 - Análises de Docking e Direct Coupling Analysis (DCA) mostram possível resíduos de interação entre PhoU e PhoR.....	62
Figura 19 - Análises de conservação de ortólogos da proteína PhoU pelo programa Consurf..	64
Figura 20 - Análises de conservação de ortólogos da proteína PhoR pelo programa Consurf ..	65
Figura 21 - Expressão e Purificação de PhoU e PhoR para ensaio de Pull Down.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Possíveis ortólogos da proteína PhoU de <i>X. citri</i> identificados em outros microrganismos fitopatógenos com o auxílio do programa Blastp contra o banco de dados não redundante (Blastp x nr).....	41
Tabela 2 - Ortólogos da proteína PhoU de <i>X. citri</i> com estrutura tridimensional resolvida identificados com o auxílio do programa Blastp contra o banco o Protein Data Bank (Blastp x PDB).	41
Tabela 3 - Condições de refinamento para cristalização da proteína PhoU.....	48
Tabela 4 - Condições específicas aonde foram encontrados supostos cristais da proteína PhoU	49
Tabela 5 - Ortólogos da proteína PhoR de <i>X. citri</i> identificados com o auxílio do programa Blastp contra Protein Data Bank (Blastp x PDB).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC - ATP Binding Cassete

ATP - Trifosfato de adenosina

Blast - Basic local alignment tool

CD - Dicroísmo circular

C-terminal - Carboxi-terminal

DLS - Espalhamento dinâmico de Luz

DO - Densidade óptica

DTT- Ditioneitol

g - Gravidade

IPTG - Isopropil-b-D- tiogalactosídeo

IMAC - Immobilized Metal Affinity Chromatography (Cromatografia de afinidade a metal imobilizado)

kDa - kilodaltons

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB - Luria-Bertani

mM - Milimolar

NaCl - Cloreto de Sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

N-terminal - Amino-terminal

PDB - Protein Data Banking

pH - potencial Hidrogeniônico

Pi - Fosfato Inorgânico

PMSF - Fluoreto fenilmetilsulfonil

PVDF- Fluoreto de polivinildelina

RNA - Ácido ribonucleico

SEC - Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de Exclusão Molecular)

SDS-PAGE- Gel de Poliacrilamida e Dodecil Sulfato de Sódio

Tris - Hidroximetil-aminamento

TCRS - Two Component Regulatory System (Sistema de Dois Componentes)

μM - micromolar

V - Volts

Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, ou *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 O sensoriamento do ambiente: resposta bacteriana às condições adversas de fosfato, através da transdução de sinais.	18
1.2 O Regulon Pho	20
1.3 PhoU, a proteína que conecta o sistema Pst e o sistema dois componentes PhoR-PhoB	22
1.4 O regulon Pho, o sistema PhoR-PhoB e o sistema Pst em <i>Xanthomonas citri</i>	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	31
<i>2.1.1 Etapa I – Caracterização por bioinformática, produção de proteínas e análises biofísicas e estruturais</i>	31
<i>2.1.2 Etapa II – Análises funcionais</i>	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Análises de Bioinformática	32
3.2 Produção das proteínas para ensaios funcionais e estruturais	33
<i>3.2.1 Produção da proteína PhoU</i>	33
<i>3.2.2 Purificação da proteína PhoU</i>	33
<i>3.2.3 Produção da proteína PhoR</i>	34
<i>3.2.3 Purificação da proteína PhoR</i>	34
3.3 Ensaios Biofísicos	35
<i>3.3.1 Dicroísmo circular da proteína PhoU e PhoR</i>	35
<i>3.3.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) das proteínas PhoU e PhoR</i>	36
<i>3.3.3 Ensaio de Fluorescência para determinação de interação com ligantes</i> . 36	
<i>3.3.4 Ensaios de cristalização da proteína PhoU</i>	37
3.4 Ensaios Funcionais	37

3.4.1	<i>Produção de anticorpos policlonais anti-PhoU e anti-PhoR</i>	37
3.4.2	<i>Análises por Western Blot para detecção de PhoU e PhoR em diferentes condições de cultivo</i>	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	PARTE I – Análises da proteína PhoU	40
4.1.1	<i>Identificação de motivos e regiões conservados em PhoU e modelagem molecular por homologia</i>	40
4.1.2	<i>Produção da proteína PhoU para ensaios funcionais e estruturais</i>	45
4.1.3	<i>Ensaio de cristalização da proteína PhoU</i>	47
4.1.4	<i>Ensaio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) da proteína PhoU</i>	50
4.1.5	<i>Avaliação da estrutura secundária de PhoU por Dicroísmo Circular – Influência do pH sobre a estrutura.</i>	51
4.1.5	<i>Análise de ligantes por Dicroísmo Circular e ensaio de fluorescência – Influência do manganês e do magnésio sobre a estrutura de PhoU</i>	53
4.1.6	<i>Ensaio Funcionais através de Western Blot: detecção de PhoU em diferentes condições de cultivo</i>	58
4.2	PARTE II – Análises da proteína PhoR	59
4.2.1	<i>Construção do modelo molecular de PhoR baseado em homologia</i>	59
4.2.2	<i>Análise das regiões de interação entre PhoU e PhoR</i>	62
4.2.3	<i>Expressão e purificação da proteína PhoR</i>	65
4.2.4	<i>Ensaio de Pull Down para verificação da interação entre as proteínas PhoU e PhoR de X. citri</i>	67
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sensoriamento do ambiente: resposta bacteriana às condições adversas de fosfato, através da transdução de sinais.

A habilidade de sensoriar o ambiente extracelular e responder às suas mudanças é inerente para a maioria das bactérias. As concentrações de nutrientes direcionam os processos metabólicos relacionados à sobrevivência e proliferação (LUBIN, et al., 2016). A capacidade das células de adquirirem à adaptação frente às condições externas é uma ferramenta evolutiva, capaz de submeter uma população inteira à seleção natural, de maneira a manter características essenciais, como a correta percepção do ambiente, e conseqüentemente, a geração de uma resposta eficaz para momentos necessários (MARQUES, 2012).

As células possuem diversos sistemas diferenciados para lidar com cada tipo de circunstância que as ameaça. Em primeiro lugar, existe o sinal originado a partir de um estímulo, que pode ser físico ou químico, seguido do mecanismo de transdução e por fim, uma resposta é gerada a partir dessas circunstâncias (MARQUES, 2012).

Dentre os sistemas capazes de sensoriar o ambiente, é comum encontrar um sistema do qual chamamos de dois componentes, ou TCRS (*Two Component Regulatory System*) que é bastante conservado em bactéria. O TRCS é constituído basicamente de uma proteína capaz de se auto-fosforilar em resíduos de histidina (Histidinas quinases, ou *Histidine Kinase*, em inglês - HK) e de sua parceira, proteína capaz de retirar o fosfato da HK e transferir para grupos aspárticos em sua própria molécula, sendo considerada a proteína reguladora de resposta (RR). Esse sistema traz muitos benefícios para as bactérias, visto que estes são capazes de mediar as mais distintas respostas, desde osmolaridade, estado de oxidorredução, densidade populacional e nutrientes (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; LUBIN et al., 2016; MARQUES, 2012).

Dentre os sistemas bacterianos de dois componentes, alguns são específicos na sinalização frente à presença/ausência de nutrientes. Um dos nutrientes cuja regulação é altamente controlada em bactéria é o fosfato

inorgânico (Pi). Seja nas membranas, ácidos desoxirribonucleicos, em lipídeos, proteínas, ou nas reservas energéticas da célula, o Pi é essencial para a sobrevivência e manutenção bacteriana e, portanto, a resposta para a limitação de fosfato é altamente conservada em bactéria. O TCRS responsável por sinalizar a limitação de fosfato é denominado PhoR-PhoB, em que PhoR é a proteína HK e PhoB, a RR (Figura 1). Entretanto, alguns dos mecanismos relacionados à transdução de sinal em condições de escassez de fosfato ainda não foram totalmente elucidados (CRÉPIN et al., 2011; LUBIN et al., 2016; PEGOS et al., 2014).

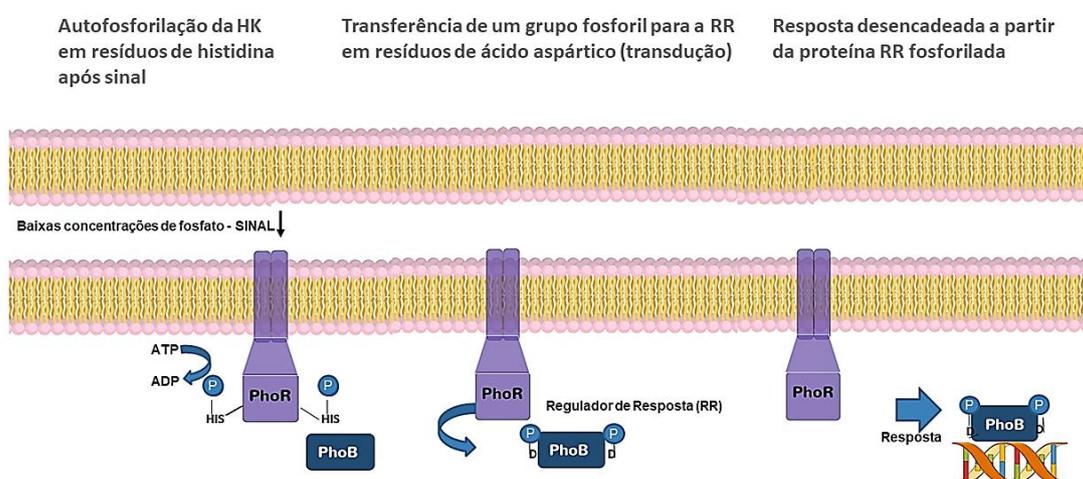


Figura 1 - Processo de transdução de sinal do sistema de dois componentes (TCRS). PhoR, a histidina quinase recebe um estímulo e se auto-fosforila em resíduos de histidina. Em seguida, PhoR transfere os grupos fosforis para sua parceira, a proteína reguladora de resposta (PhoB), que fosforilada, se torna ativada e disponível para se ligar às regiões específicas do DNA, dando início ao processo de transcrição de genes necessários para o momento, o que caracteriza a resposta perante o estímulo. Elaborado pelo próprio autor.

A transdução de sinal, por sua vez, não tem outro intuito senão o de modificar o padrão de expressão gênica frente à ausência do nutriente - nesse caso, o Pi - de maneira que, através da sinalização, ocorra a metabolização de fontes de fosfato dentro da bactéria, para que o déficit seja diminuído e a célula bacteriana volte para seu equilíbrio (CRÉPIN et al., 2011; WANNER, 1990; WANNER, 1996)

A modificação do padrão de expressão gênica é tão importante para a célula, quanto a própria sinalização. O princípio que gere esse tipo de organização celular é o princípio da economia de energia. Nas células bacterianas, genes são transcritos somente quando necessários e são organizados em operons (genes cuja transcrição estão sob o comando de um

mesmo promotor), regulons (genes cuja transcrição estão sob o efeito de um mesmo fator de transcrição) e estimulons (genes cuja transcrição estão sob o comando de um mesmo estímulo) (MARQUES, 2012). Dessa forma, a célula consegue de uma só vez, ativar genes relacionados à vias inteiras, suprimindo carências nutricionais, como por exemplo, a de Pi. Os genes relacionados ao metabolismo e captação de Pi na célula, na carência do mesmo, são aqueles que estão sob o comando do mesmo fator de transcrição, a proteína reguladora de resposta do TCRS, PhoB. Todo o conjunto de genes regulados por PhoB caracteriza um regulon, conhecido como “regulon Pho” (CRÉPIN et al., 2011; GARDNER et al., 2014; LEE et al., 2014; LUBIN et al., 2016; WANNER, 1990; WANNER, 1996).

1.2 O regulon Pho

Dentre os elementos indispensáveis para o desenvolvimento celular, o fósforo é um dos mais abundantes nos organismos vivos. O fósforo representa 3% da massa celular e está envolvido em diversas reações celulares importantes, desde a fosforilação de proteínas, biossíntese de ácidos fosfolipídicos e ácidos nucleicos, até ao processo de produção de energia (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; WANNER, 1996), sendo o fosfato inorgânico (PO_4^{3-} ou Pi) a fonte de fósforo mais assimilada pela célula (ALVAREZ-MARTINS et al., 2012; PEGOS et al., 2014). Estudos realizados em *Escherichia coli* demonstraram que a sinalização e a regulação do regulon Pho, iniciam-se em condições nas quais os níveis de Pi encontram-se abaixo de 4 μ M. Por consequência, respostas adaptativas de sobrevivência e patogenicidade são desencadeadas na ausência de fosfato como, por exemplo, diminuição da motilidade (RASHID; RAO; KORNBERG, 2000), super expressão de genes de virulência, acúmulo de polifosfato intracelular, diminuição da capacidade de colonização, diminuição de formação de biofilme, dentre outras características (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; LUBIN et al., 2016; PEGOS et al., 2014; SANTOS-BENEIT et al., 2015).

Os genes envolvidos com a assimilação e regulação dos níveis de fosfato em *E. coli* foram primeiramente descritos por Wanner (1993 e 1996) como parte do denominado regulon Pho (BAEK; LEE, 2006; HAN et al., 1999; HARRIS et

al., 2001). A conservação e importância deste sistema, portanto, tem sido demonstrada desde então, em diversos microrganismos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (BRAIBANT et al., 1996; LEE et al, 2014; LUZ et al., 2012).

A partir da ativação de PhoB, por meio de fosforilação efetuada por PhoR, uma série de genes relacionados à assimilação e metabolismo de fosfato são induzidos. Tais genes apresentam em sua região promotora uma sequência conservada denominada de *Pho boxes*, altamente reconhecida por PhoB. Em *E. coli*, PhoB regula diretamente a transcrição de 31 genes, incluindo *phoA*, *phoBR*, *phoE*, *phoH*, *psiE*, *phnC-P*, *ugpB-Q*, (todos relacionados à metabolização de fosfato) e, em especial, os genes *pstSCAB* que codificam o transportador de alta afinidade de fosfato do tipo ABC (do inglês *ATP Binding Cassette*), também chamado de sistema Pst (*Phosphate Specific Transporter*). Este sistema, além de internalizar fosfato para o ambiente citoplasmático, também é descrito como um transportador que possui participação na regulação da sinalização juntamente com o sistema de dois componentes PhoR-PhoB. (CRÉPIN et al., 2011; GARDNER et al., 2014; LEE et al., 2014; LUBIN et al., 2016).

O sistema Pst é constituído de duas proteínas integrais de membrana, PstA e PstC (heterodímero), também identificadas como domínios TMD ou *Transmembrane Domains* (domínios transmembranares), e outra molécula do tipo ATPase, PstB, ou NBD *Nucleotide-Binding Domain* (domínio de ligação a nucleotídeos) que neste caso, apresenta-se como dímero e localiza-se no lado citoplasmático do complexo. Adicionalmente, como qualquer sistema transportador ABC do tipo importador, existe uma proteína ligadora periplasmática (*Periplasmatic-Binding protein*) (WANNER, 1996), responsável pela afinidade e especificidade do transporte e que pode ser denominada PstS, PhoS, ou PBP (Figura 2). Em condições nas quais a disponibilidade de fosfato é baixa, as proteínas periplasmáticas devem capturá-lo com alta eficiência e disponibilizá-los às proteínas de membrana. Após a interação da proteína periplasmática com o fosfato e, conseqüentemente, com as proteínas de membrana no sistema Pst, ocorre uma série de mudanças conformacionais que engatilham a hidrólise do ATP pelas ATPases (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; PEGOS et al., 2014).

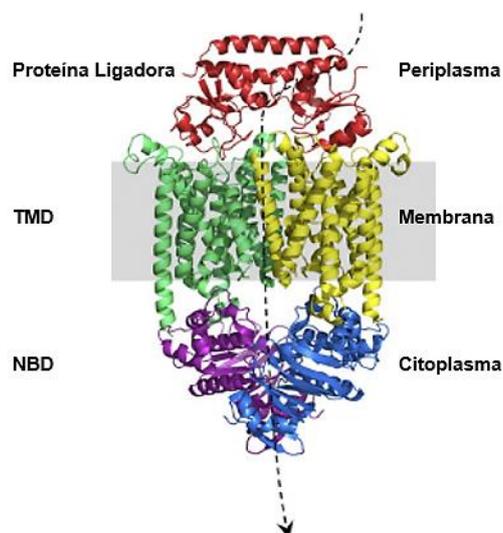


Figura 2 - Ilustração de um transportador ABC do tipo II, característico para o Sistema Pst. Imagem ilustra a topologia do transportador ABC do tipo II baseado no transportador de Vitamina B12, BtuCD-F. Binding Protein, é a proteína periplasmática capaz de se ligar ao nutriente com alta afinidade. TMD é o domínio integral, transmembranar, responsável por formar um poro de passagem para o transporte e internalização do alvo. NBD é o domínio cuja hidrólise de ATP ocorre, mediada por mudanças conformacionais do transportador. Retirado e modificado de Locher (2016).

Além da função de transporte propriamente dita, a proteína PstS, também atua como coadjuvante na sinalização celular quando o sistema de transporte está ativo ou mesmo quando o transporte e sinalização são inativos (HSIEH et al., 2010; WANNER, 1996). O transporte e captação de fosfato, por sua vez, nada mais é do que uma das respostas secundárias, promovidas através da sinalização na limitação de Pi, no sentido de restabelecer o equilíbrio do nutriente no ambiente intracelular.

Neste contexto, onde o equilíbrio é restabelecido pela sinalização, associada às mudanças conformacionais das proteínas, e também pelo transporte do nutriente, destaca-se o papel de mais uma proteína, denominada PhoU, cujo gene em *E. coli* e em muitas outras bactérias, é localizado no mesmo operon que codifica o sistema Pst (*pstSCABphoU*). A função de PhoU ainda é amplamente discutida e não completamente elucidada (GARDNER et al., 2014, 2015; ZHENG et al, 2016).

1.3 PhoU, a proteína que conecta o sistema Pst e o sistema de dois componentes PhoR-PhoB

A revisão da literatura mostra que apesar de PhoU pertencer ao mesmo operon que codifica o sistema Pst, sua função não é de captação como a das

outras proteínas do operon (STEED; WANNER, 1993). Por outro lado, PhoU, apresenta uma função moduladora tanto das vias de sinalização de Pi (TCRS PhoR-PhoB), quanto sobre as proteínas do sistema Pst (LAMARCHE et al., 2008; LEE et al., 2014; LUBIN et al., 2016; SANTOS-BENEIT, 2015).

Estudos realizados por Wanner e colaboradores (1991) já relatavam a importância de PhoU e a dinâmica dessa proteína na modulação do regulon Pho. Em um primeiro momento, foi observado que a deleção do gene *phoU* não interferia no transporte de fosfato pelo sistema Pst, mas levava à diminuição drástica do crescimento celular. Posteriormente, PhoU foi associada à uma função específica no processo de sinalização, uma vez que sua ausência levava à constitutividade da expressão de PhoR, tanto na presença quanto na ausência de fosfato, fato que causava um grave desequilíbrio à célula (WANNER, 1996).

Estudos recentes têm mostrado que, na abundância de fosfato, ocorre a formação de um complexo repressor entre os sistemas Pst e PhoRB, mediado concomitantemente pela interação de PhoU com PstB e PhoR (GARDNER et al., 2014; GARDNER et al., 2015; LEE et al., 2014; GIBSON et al., 2015). O mecanismo pelo qual PhoU liga-se às proteínas do complexo ainda não foi totalmente elucidado, porém Gardner e colaboradores demonstraram que PhoR possui um domínio denominado *PAS* (do inglês *Per-ARNT-Sim*), pelo qual PhoU poderia interagir. Da mesma maneira, PhoU também se ligaria a PstB, bloqueando a hidrólise de ATP (GARDNER et al., 2014, 2015). Mais recentemente, Vuppada e colaboradores (2018) passaram a sugerir que PhoU seria a intermediadora das mudanças conformacionais promovidas pelo sistema Pst, através de seus estados *outward facing* (conformação aberta para o periplasma) e *inward facing* (conformação aberta para o citoplasma) o que levaria ao estado de quinase e fosfatase de PhoR.

Nesse contexto, a desativação do complexo repressor envolveria uma cascata de reações desencadeadas pelo sistema de dois componentes e pode ser gerada tanto por mudanças conformacionais no sistema Pst, devido à baixa ocupação de fosfato no transportador, como também por sinais no domínio regulatório de PhoR. Dessa forma, quando PhoU é liberada do complexo, PhoR pode novamente se autofosforilar em resíduos de histidina e passa a exercer a função de quinase, rapidamente transferindo o grupo fosforil para PhoB, que os recebe em resíduos de aspartato (VUPPADA et al, 2018). A fosforilação de PhoB

facilita sua ligação com o DNA nas regiões promotoras *Pho boxes*, de forma que PhoB recrute a RNA polimerase (subunidade sigma 70), o que facilita o início da transcrição dos genes. A desativação de PhoB e a desfosforilação mediada por PhoR seria estimulada de alguma forma ainda não elucidada. Estudos relatam, porém, que quando a concentração de fosfato no ambiente intracelular volta ao equilíbrio necessário, PhoR recebe este sinal e desfosforila PhoB, o que leva ao término da transcrição e conseqüentemente, ao retorno do complexo repressor (GARDNER et al., 2014).

O retorno à conformação inicial do complexo repressor ocorreria lentamente, de uma condição de escassez para um ambiente em crescente disponibilidade de fosfato. Lamarche e colaboradores (2008) relatam que PhoU e PstB são requeridas para a desfosforilação de PhoB (também chamada de phospho-PhoB, quando ativada). Adicionalmente, Wanner (1996) sugere que PhoU é essencial para a repressão do Regulon Pho, sob condições das quais o fosfato esteja abundante, observação essa, que se mantém até os dias de hoje. (Figura 3).

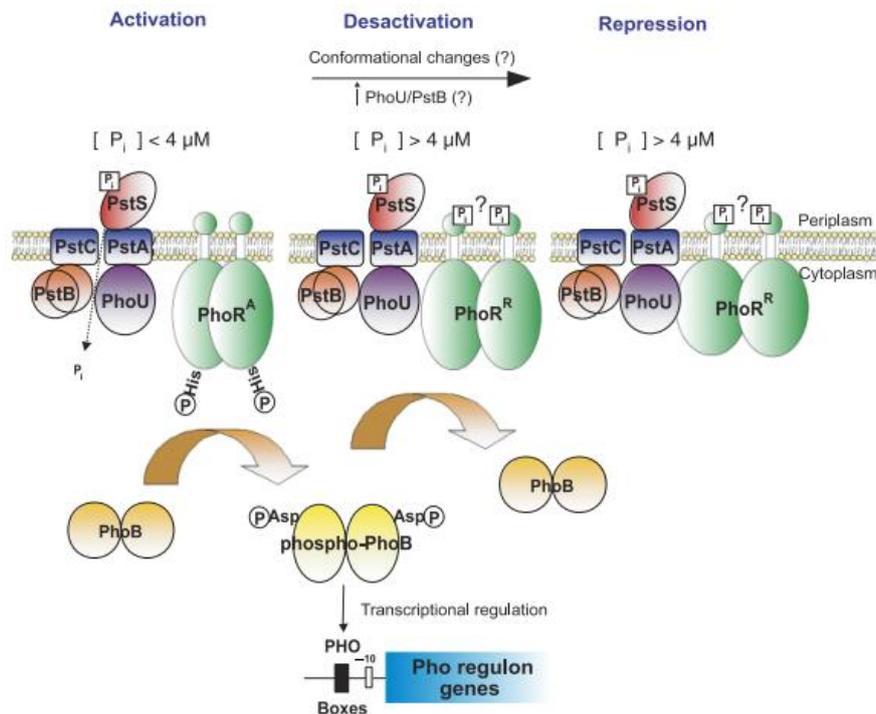


Figura 3 - Esquema de sinalização do sistema Pst na captação e transporte de fosfato em *E. coli*, em diferentes condições nutricionais. A ativação do regulon ocorre em condições de carência de fosfato ($P_i < 4\mu M$), a qual induz a ação das proteínas de membrana, PstS, PstA, PstB, PstC e PhoU a captarem o P_i . O P_i por sua vez, é utilizado para fosforilação de PhoB e posterior ativação dos genes. Quando o fosfato

está em excesso, PhoR se desfosforila e um complexo repressor é formado com a participação das proteínas PhoR, PhoU e PstB. Retirado de Lamarche et al. (2008).

Apesar do mecanismo de repressão dos complexos ser largamente caracterizado em *E. coli*, ainda há muitas questões a serem respondidas, especialmente em outros organismos. Lubin e colaboradores (2016), por exemplo, relataram em *Caulobacter crescentus*, que PhoU não possui influência sobre a proteína PhoB ou PhoR, mas estaria relacionada à metabolização de fosfato inorgânico na célula, logo após o transporte (Figura 4). Esta hipótese foi corroborada pela presença de grânulos de polifosfato em células portadoras de deleção no gene *phoU*. Os autores sugerem duas alternativas: (I) PhoU regularia a importação de Pi pelo sistema Pst; ou (II) PhoU regularia o metabolismo de fosfato intracelular. Tais resultados indicam que há variações nos mecanismos do Regulon Pho em diferentes microrganismos.

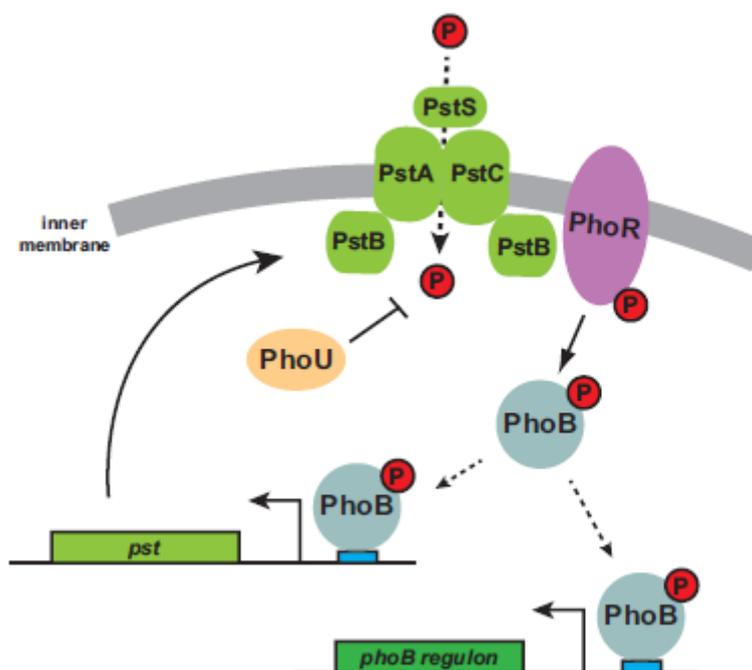


Figura 4 - Modelo para regulação de PhoU em relação à limitação extracelular de fosfato em *Caulobacter crescentus*. O sistema de alta afinidade Pst importa fosfato inorgânico (em vermelho) para o citoplasma. Quando o fluxo de transporte decai, a proteína PhoR, é ativada e se autofosforila, consequentemente fosforilando PhoB, sua parceira. PhoB fosforilada, se liga às regiões *pho* boxes (azul) dos genes alvos, incluindo os genes do transportador *pst*. PhoU, não conecta o transportador Pst a PhoR, ao invés disso, PhoU supostamente inibe a captação de fosfato pelo sistema Pst ou possivelmente regula o metabolismo interno de Pi. Retirado de Lubin et al. (2016).

Uma vez que em comum, tais mecanismos significam sobrevivência, manutenção e aumento de virulência e patogenicidade de microrganismos

(LAMARCHE et al, 2008), é de suma importância que estudos adicionais sejam realizados nos mais diversos tipos de microrganismos para caracterização das proteínas envolvidas nessas vias essenciais.

1.4 O regulon Pho, o sistema PhoR-PhoB, e o sistema Pst em *Xanthomonas citri*

Diante da diversidade entre as bactérias, é de relevância que estudos das vias de sinalização e captação de fosfato sejam realizados para diferentes organismos que não somente *E. coli*, incluindo aqueles de relevância médica ou econômica, como os fitopatógenos (PEGOS, 2015). Um dos gêneros mais relevantes para a agricultura brasileira é o gênero *Xanthomonas*, da Família Xanthomonadaceae, Ordem Xanthomonadales, Classe Gammaproteobacteria, Filo Proteobacteria. As espécies deste gênero podem atacar arroz, tomate, banana, feijão, todas as espécies de citros e algodão (KNAAK; BERLITZ; FIUZA, 2014).

Xanthomonas citri subsp. *citri* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica estrita, com crescimento ótimo entre 28° C a 30° C e com flagelo polar, que utiliza açúcares como glicose, sacarose, frutose, xilose e galactose como fontes de carbono (KIM et al., 2004; TUNG; KUO, 1999). Uma característica importante desta bactéria é a produção de um polissacarídeo denso e amarelo (devido ao pigmento xantomonadina) conhecido como goma xantana, que tem muitas funções, mas, principalmente, é relacionado à maior capacidade de infecção e patogenicidade (Figura 5A). *X. citri*, por sua vez, possui capacidade de infectar várias espécies de citrus, especialmente laranjas, através de veiculação hídrica, o que pode acarretar em perdas econômicas significativas. Os impactos relacionados à presença de *X. citri* na plantação incluem desfolha de plantas, depreciação da qualidade da produção, presença de lesão em frutos, queda prematura de frutos e restrição da comercialização (FUNDECITRUS, 2017) (Figura 5B). (Fundecitrus, 2017).

O primeiro surto envolvendo infecção por *X. citri* foi primeiramente reportado no século XIX na China e Índia e, a partir de 1820, foram registrados os primeiros relatos de seu aparecimento no continente americano (PEGOS, 2015). Uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de laranja e seu suco, estados como São Paulo, o maior representante do segmento, é um dos mais

afetados pelo microrganismo, que atualmente, possui estratégias específicas para evitar a contaminação, através de medidas práticas como barreiras vivas, e inspeção rotineira. (FUNDECITRUS, 2017).

Em relação à patogenicidade das espécies do gênero *Xanthomonas*, alguns dados vêm sendo levantados para caracterização de genes que potencializem a virulência da bactéria. Resultados obtidos em diversos estudos têm revelado que aproximadamente 50 a 100 genes estão direta ou indiretamente relacionados com a capacidade das bactérias causarem doenças em plantas. Esses genes codificam, em sua maioria, proteínas que se localizam no envoltório celular, como proteínas transportadoras, ou proteínas que são secretadas para o meio extracelular. O envoltório representa, portanto, um dos componentes celulares mais importantes envolvidos na patogenicidade e na evasão de sistemas de defesa do hospedeiro (DA SILVA, 2002).

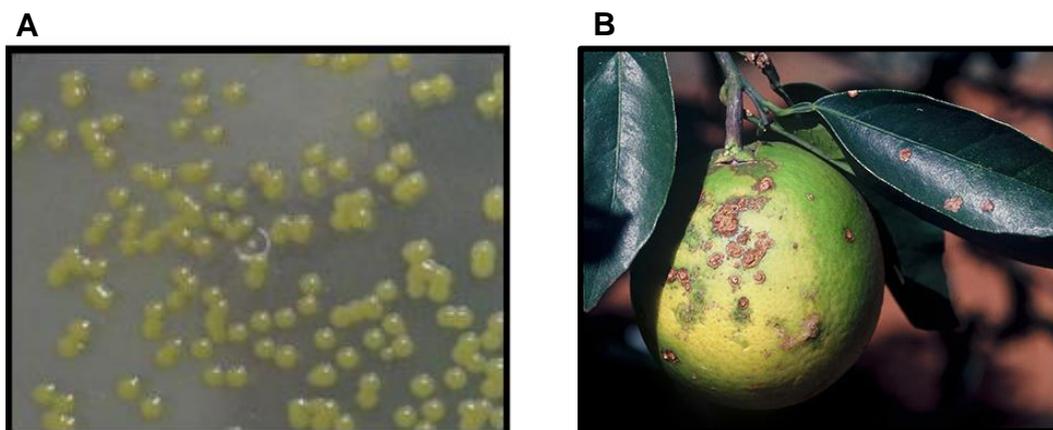


Figura 5 – Características de *Xanthomonas citri* e consequências da infecção em citrus. A. *X. citri* crescida em meio Lúria Bertani. A colônias apresentam coloração amarelada devido à produção da goma xantana e o pigmento xanthomonadina. Retirado de Sampaio, 2014. p20. B. Foto de cancro cítrico provocado pela Xac em *Citrus sinenses*. Fonte: Fundecitrus,2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em: 23/11/2017.

Uma vez que o sistema Pst e componentes do regulon Pho têm sido relacionados à respostas biológicas secundárias envolvendo os mecanismos de virulência e patogenicidade de microrganismos (LAMARCHE, et al., 2008; PEGOS et al., 2014; PEGOS, 2015; SANTOS-BENEIT, 2015; WANNER, 1990; WANNER, 1996), o estudo destes componentes é de grande interesse, especialmente, em bactérias patogênicas como *X. citri*.

Experimentos realizados pelo nosso grupo, sobre o sistema de transporte Pst de *X. citri*, mostraram similaridades e também diferenças significativas quando comparado com o sistema Pst de *E. coli*. As análises iniciais mostraram que o operon codificador do sistema Pst e PhoU é similar ao de *E. coli*, mas que *X. citri* tem um gene de uma segunda proteína ligadora de Pi, codificada pelo gene *phoX*, pertencente ao operon *pstSCAB – phoU/oprOphoX* (Pegos et al, 2014), (Figura 6A). A proteína PhoX foi então, caracterizada estruturalmente, o que revelou sua importância para o sistema, pela primeira vez. Análises filogenéticas ainda revelam que PstS e PhoX foram originadas a partir de uma duplicação gênica e possuem ancestral comum, *Desulfatibacterium alkenivorans*, uma bactéria que possui duplicação do gene *pstS* (Figura 6B). Em concordância com estes resultados, análises de bioinformática, mostraram que PhoX conserva todos os resíduos da interação com fosfato, em relação à PstS, porém, PhoX apresenta-se pouco mais estável sob altas temperaturas e pode possuir uma afinidade diferente por Pi. Contudo, mutantes *pstS* demonstram constitutivação do sistema e consequente super expressão de PhoX, evidenciando seu caráter compensatório (Pegos, 2015), (Figura 6C).

Adicionalmente, estudos realizados em meio A, (meio mínimo, padrão para caracterização de fosfatase alcalina, descrito por Levinthal; Signer; Fetherolf, em 1962) e meio A+Pi mostraram, através de espectrometria de massas, as diferenças relacionadas à presença e ausência das proteínas nessas condições, especialmente àquelas pertencentes ou relacionadas ao regulon Pho. As análises identificaram 232 proteínas, divididas em 19 categorias. Essas análises mostraram a expressão de algumas proteínas do Pho Regulon tanto na ausência quanto na presença de fosfato em *X. citri*. Na presença de fosfato, as proteínas PstS, PhoX, que são proteínas ligadoras de fosfato, foram ativamente mais expressas, assim como proteínas receptoras como OprO. Em contrapartida, todas as proteínas envolvidas no transporte e sinalização de Pi apresentaram aumento na expressão em mais de 30% na ausência de fosfato, indicando a relevância do sistema e um mecanismo similar ao que ocorre em *E. coli*, como mostra a figura 6D (Pegos, 2014). Esses resultados indicam que *X. citri*, apesar de ter uma proteína periplasmática a mais que *E. coli*, ainda assim, conserva o mesmo mecanismo de transporte e sinalização, descritos desde a década de 1990 (Lamarche et al., 2008; Wanner, 1990).

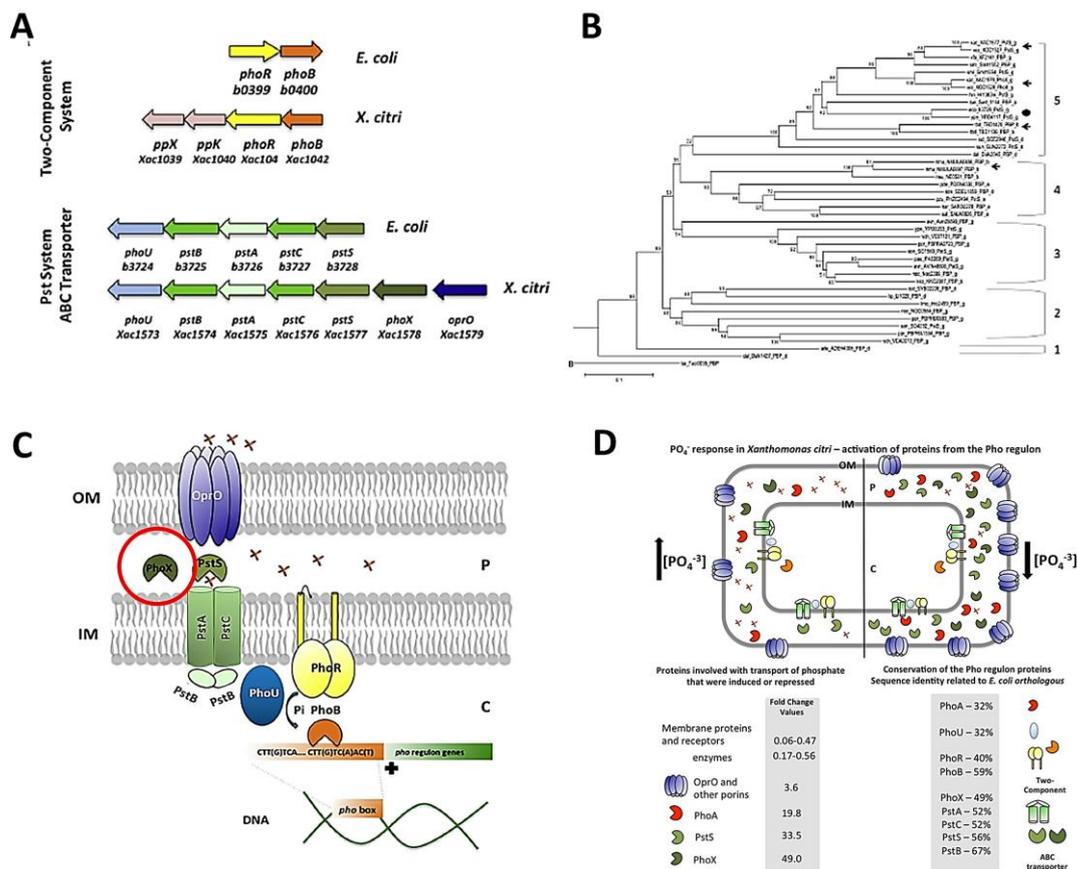


Figura 6 – Resultados dos estudos realizados em *X. citri* evidenciam diferenças e similaridades em relação à *E. coli*. A. Operons ilustrados dos sistemas TCRS e Pst. Em ambos os operons, é possível observar genes adicionais para *X. citri*, como ppX e ppK para o operon do TCRS e phoX e oprO para o sistema Pst. B. Árvore filogenética é dividida em 5 grupos e mostra ancestral comum entre PstS e PhoX. Setas e o círculo ilustram, respectivamente, duplicação gênica e transferência horizontal de genes. C. Esquema de sinalização do sistema Pst na captação e transporte de fosfato em *Xanthomonas citri*. Proteínas são mostradas em cartoon e a membrana é mostrada em cinza. PhoX está destacada em círculo vermelho e apresenta efeito compensatório na ausência de PstS. D. Análises de proteômica mostram as diferenças entre os cultivos de *X. citri* na presença e ausência de fosfato e consequentemente, evidenciam aumento da expressão de genes relacionados a transporte e sinalização quando fosfato é ausente. Retirado e modificado de Pegos et al, 2014; Pegos, 2015.

Portanto, caracterizar as vias de sinalização e captação de fosfato em *X. citri* torna-se importante para abranger os resultados sobre o regulon Pho e sobre como a regulação ocorre nesse microrganismo. Neste projeto, com a finalidade de compreender a regulação e sinalização do TCRS e também do sistema Pst, visamos caracterizar estruturalmente a proteína repressora PhoU de *X. citri* e entender como poderia acontecer sua interação com a proteína PhoR. Uma vez que o Pho Regulon não é somente um sistema regulatório para homeostase celular, mas também, uma complexa conexão para virulência bacteriana e resposta a estresse, este trabalho torna-se uma importante

ferramenta para posteriores estudos sobre virulência bacteriana e seu envolvimento no desenvolvimento da patogênese em *Xanthomonas citri*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar funcional e estruturalmente a proteína repressora PhoU de *X. citri* e sua interação com a proteína PhoR. Com este intuito, o projeto foi dividido em duas etapas apresentadas abaixo:

2.1.1 Etapa I – Caracterização por bioinformática, produção de proteínas e análises biofísicas e estruturais

- Análises de motivos, topografia e predição das estruturas secundárias de PhoU e PhoR
- Modelagem das proteínas por homologia
- Produção das proteínas recombinantes PhoU e PhoR a partir de células de *E. coli*
- Ensaio de cristalização e difração de cristais da proteína PhoU se possível, resolução da estrutura tridimensional da proteína;
- Ensaio biofísico das proteínas de interesse

2.1.2 Etapa II – Análises funcionais

- Produção de anticorpos contra proteínas PhoU e PhoR para análise da expressão das proteínas *in vitro* e *in vivo*
- Análises de interação da PhoU com PhoR utilizando ensaio de *pull-down*
- Predição de interação das proteínas utilizando ferramentas de bioinformática
- Análise da expressão de PhoU e PhoR em diferentes condições de cultivo utilizando RT-PCR e Western Blot

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análises de Bioinformática

As sequências de aminoácidos das proteínas PhoU e PhoR de *X. citri* foram obtidas no servidor Kegg (www.genome.jp/kegg/), do Instituto Central de Bioinformática para investigação em Química da Universidade de Kyoto (www.genome.jp), e posteriormente submetidas ao programa Blastp (blast.ncbi.nlm.nih.gov) contra o banco de dados não redundantes (Blastp X nr) e o banco de dados de proteínas com estruturas tri-dimensionais resolvidas (Blastp X PDB, *Protein Data Bank*). Em seguida, foram selecionadas sequências de ortólogos por identidade/similaridade, relevância na literatura e de fitopatógenos de importância. Todas as sequências foram comparadas após alinhamento no programa ClustalW (EMBL- EBI, 2016).

Os ortólogos que apresentaram estrutura resolvida e identidade superior a 30%, e também maiores coberturas, foram usados para a construção dos modelos tri-dimensionais das proteínas usando o programa Modeller 9.16 (WEBB; SALI, 2014). Os modelos de PhoU e PhoR foram baseados nas coordenadas estruturais dos ortólogos de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 4Q25) e *Streptococcus mutans* (PDB 4I5S), respectivamente.

As análises das regiões conservadas em ortólogos, entre PhoU e PhoR foram realizadas pelo programa Consurf (ASHKENAZY et al., 2016). As sequências homólogas foram coletadas a partir do UNIREF90, e o algoritmo de busca foi o HMMER. O alinhamento das sequências foi realizado a partir do programa MAFFT. As sequências foram alinhadas, com um valor mínimo de identidade de 35%. O método para cálculo das regiões conservadas foi o de Bayesian (MAYROSE et al., 2004). Todas as estruturas de proteínas e modelos, análises comparativas, assim como as imagens aqui demonstradas foram visualizadas ou preparadas no programa Pymol, versão 1.2.7 (SCHRÖDINGER, 2015).

3.2 Produção das proteínas para ensaios funcionais e estruturais

3.2.1 Produção da proteína PhoU

Cepas de *E. coli* Tuner (DE3) foram transformadas com o vetor pET28a.*phoU* contendo o gene *phoU* previamente clonado por Pegos (2015). As cepas recombinantes foram inoculadas em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina, até atingirem OD₆₀₀ de 0.5. A partir desse momento a expressão foi induzida pela adição de 0.4 mM de isopropiltiogalatosídeo (IPTG) a 200 rpm, a 37 °C por 3 horas. Uma alíquota de cultura foi retirada antes da indução, e também ao término do processo, e centrifugadas por 1 minuto a 21.000 g em centrífuga de bancada (Eppendorf, Hamburgo, HA, Alemanha), para análise de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. A extração das proteínas da fração solúvel foi realizada com 20 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 5% Glicerol, 1 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e 1 mM Ditioneitol (DTT). As amostras foram sonicadas por 6 minutos com intervalos de 30 segundos e centrifugadas por 60 minutos a 4 °C na velocidade de 28.000 g para clarificação do extrato. A fração solúvel foi separada da fração insolúvel e utilizada para as consequentes purificações. PhoU apresenta 26,4 kDa e pI de aproximadamente 5,3.

3.2.2 Purificação da proteína PhoU

A purificação das proteínas solúveis a partir dos extratos solúveis foi realizada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) através de resinas de níquel (Ni-NTA SuperFlow Quiagen, Califórnia, CA, USA) imobilizado em coluna de isopropileno (GE Healthcare Life Sciences, Califórnia, CA, USA) de 15 mL, de acordo com protocolo padrão de purificação manual (SAMBROOK, et al., 1989) e também utilizando equipamento de cromatografia líquida rápida para proteínas (*Fast Protein Liquid Chromatography*), o Akta Start (GE Healthcare). A coluna utilizada foi a HisTrap de 5 mL (GE Healthcare). A eluição das proteínas foi analisada em gradiente de imidazol de 0 mM a 1 M em tampão contendo 20 mM Tris pH 7.0, 500 mM NaCl, após lavagens com 10 volumes de coluna com tampão com concentrações baixas de imidazol (10 mM e 20 mM). Para testes

biofísicos, as proteínas recombinantes também foram purificadas por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*), utilizando-se coluna SuperDex 16/60 75 e 200 µg (GE Healthcare) em tampão contendo 20 mM Tris, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF e 1 mM DTT. As amostras foram concentradas em membranas de 10 MWCO (Amicon Millipore, Alemanha) para retirada de imidazol. A análise da expressão e purificação das proteínas foi realizada por meio de SDS-PAGE utilizando-se gel de poliacrilamida 12%.

3.2.3 Produção da proteína PhoR

Cepas de *E. coli* Tuner (DE3) foram transformadas com os vetores pET28a.*phoR* e pET28aMBP.*phoR*, (domínio PAS e HK de PhoR fusionado à proteína *maltose-binding protein*). O gene *phoR* foi clonado nos vetores de expressão pET28a fusionado no N-terminal com cauda de 6 histidinas e vetor pETMBP fusionado à MBP no N-terminal. Os clones foram confirmados por sequenciamento e PCR de colônia (PEGOS, 2015).

Adicionalmente, outras cepas foram testadas: Rosetta (DE3), BL21 (DE3), LEMO21 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3). As cepas recombinantes foram inoculadas em meio LB contendo 50 µg/ml de canamicina, com adição de cloranfenicol para a cepa Lemo21 (DE3), até atingirem OD₆₀₀ de 0.5. A partir desse momento a expressão foi induzida pela adição de 0.4 mM de IPTG, a 200 rpm, a 18 °C durante 18 horas. Uma alíquota de cultura foi retirada antes da indução, e também ao término do processo, e centrifugadas por 1 minuto à 13000 g em centrífuga de bancada (Eppendorf), para análise em gel SDS page, utilizando-se gel de poliacrilamida 12%. A extração das proteínas da fração solúvel foi realizada com 20 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 5% de Glicerol, 1 mM PMSF, 1 mM de DTT e 1% de Triton X-100. As amostras foram sonicadas por 6 minutos com intervalos de 30 segundos e centrifugadas por 60 minutos a 4 °C na velocidade de 28.000 g.

3.2.3 Purificação da proteína PhoR

Ambas as proteínas PhoR e PhoR_MBP foram purificadas a partir do lisado por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado utilizando-se

coluna HisTrap de Níquel e de Amilose de 5 mL (GE Healthcare), com auxílio de bomba peristáltica (GE Healthcare). A eluição da proteína PhoR foi feita com o mesmo tampão de lise, enquanto PhoR_MBP foi purificada em etapas, de 10, 20 e 150 mM de maltose em tampão 20 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT e 1% de Triton X-100. Para testes biofísicos, as proteínas recombinantes também foram purificadas por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*), utilizando-se coluna SuperDex 16/60 200 pg e 75 pg (GE Healthcare) em tampão contendo 20 mM Tris pH 7.0, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF e 1 mM DTT. A análise da expressão e purificação das proteínas foi realizada por meio de SDS-PAGE utilizando-se gel de poliacrilamida 12%.

A produção das proteínas para obtenção de anticorpos manteve os mesmos protocolos com a adição de 8 M de uréia, de forma que as proteínas fossem purificadas na forma desenovelada, processo que facilita a resposta antigênica.

3.3 Ensaios Biofísicos

3.3.1 Dicroísmo circular da proteína PhoU

Os espectros de CD das proteínas recombinantes de *X. citri* foram obtidos de 192 a 260 nm com o uso do espectropolarímetro JASCO J-810 no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Os espectros foram coletados em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm (Helma Analytics, Plainview, NY, USA). As amostras de proteína foram testadas em concentração de 10 µM, em tampão contendo 10 mM Tris pH 8.0 e 25 mM NaCl. Um total de 20 leituras consecutivas foram realizadas para cada amostra. Os dados foram corrigidos de acordo com a contribuição da linha base do tampão, e as elipticidades observadas (mdeg) foram convertidas em elipticidade residual média $[\theta]$, dando origem a um diagrama com a curva de estrutura secundária, segundo a fórmula a seguir (SHARPE, 2012):

$$\theta \text{ (deg. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{\text{Ellipticity(mdeg)} \cdot 10^6}{\text{Pathlength(mm)} \cdot [\text{Protein}](\mu\text{M}) \cdot n}$$

onde, *Ellipticity* refere-se ao dado bruto oriundo do aparelho em deg, *Path length*, o caminho óptico em milímetros, *[Protein]*, a concentração de proteína utilizada, em micromolar, e *n*, o número de ligações peptídicas da proteína em estudo.

A previsão de estrutura secundária foi obtida após a análise dos dados do servidor online Dichroweb (WHITMORE; WALLACE, 2004). Os ensaios para análise de PhoU em diferentes pHs foram realizados com tampão citrato/fostato pHs 4.0, 5.6, 7.0 e 8.0 numa concentração final de 10 mM. Também foram avaliadas possíveis modificações estruturais na proteína PhoU em decorrência da interação com íons Magnésio ($MgCl_2$) e Manganês ($MnCl_2$), conforme mencionado na literatura (GARDNER et al., 2014). Várias concentrações foram testadas, mas os ensaios finais foram realizados com uma concentração de 25 μM para os íons e 10 μM de proteína, em volume de 200 μL .

3.3.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) da proteína PhoU

DLS é uma técnica que fornece informações sobre o raio hidrodinâmico da proteína e sobre a homogeneidade da amostra (padrões de monodispersividade e polidispersividade, dependendo das populações e estados oligoméricos da amostra). Resultados satisfatórios são requeridos para ensaios de cristalização e espalhamento de raio-x à baixos ângulos (*Small Angle X-ray Scattering – SAXS*) (WÄRDELL; JAKOBSSON; NILSSON, 1993). As análises foram realizadas à uma temperatura de 20 °C, utilizando 30 μL das amostras na concentração final de 38 μM , em aparelho ZetaSizer (MALVERN, Malvern, MA, UK), em parceria com o Laboratório de Espectrometria e Calorimetria, no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas – SP).

3.3.3 Ensaio de Fluorescência para determinação de interação com ligantes.

Os ensaios de fluorescência foram monitorados no fluorímetro Multifrequency Phase Fluorimeter do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do LNBio, CNPEM, Campinas, SP. As bandas de excitação e emissão foram de 4 e 8 nm, respectivamente. As cubetas utilizadas possuem caminho óptico de 10 mm e a temperatura controlada por termostato foi de 20 °C. A Fluorescência foi medida no comprimento de onda de excitação de 280 nm

(para detecção de ambos aminoácidos: triptofanos e tirosinas) e o espectro de emissão foi coletado no intervalo de 300 a 400 nm. Todas as medidas foram realizadas no tampão contendo 10 mM Tris pH 7.0 e 50 mM NaCl, a 20 °C, na presença dos dois ligantes: Manganês e Magnésio (GARDNER, 2014). A concentração utilizada de proteína PhoU foi de 2 µM, e as concentrações de ligantes foram tituladas nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 500 µM, a partir de solução estoque de 1 mM de MgCl₂ e MnCl₂. Os ligantes magnésio e manganês foram lidos somente em tampão, nas mesmas condições, como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata, cujas médias foram calculadas, e os valores subtraídos dos valores do tampão.

3.3.4 Ensaio de cristalização da proteína PhoU

Foram testados, inicialmente, 2 kits comerciais (SaltRx™ 1, SaltRx™ 2, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA), disponíveis no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada – LBEA. As placas de 24 poços foram montadas com gotas contendo 1 µL da solução do poço, adicionadas de 1 µL de amostra de proteína, com concentrações variadas de 4,5 a 18 mg/ml. Outras proporções foram testadas: 1:1, 1:2 e 2:1 (concentração de proteína em razão da proporção de solução). Utilizou-se o mecanismo de difusão de vapor através do método da gota pendurada (*hanging drop*). As placas foram incubadas a 18 °C. A visualização das placas foi feita por meio de microscópio (Leica, Wetzlar, HE, Alemanha), e as fotos foram obtidas a partir do software do próprio equipamento.

3.4 Ensaio Funcionais

3.4.1 Produção de anticorpos policlonais anti-PhoU e anti-PhoR

A produção dos anticorpos anti-PhoU e anti-PhoR foi feita em colaboração com o grupo dos Professores Luis Carlos Ferreira e Rita Ferreira do ICB II-USP. Para a obtenção dos anticorpos, amostras de 250 µL da proteína PhoU e PhoR (2 mg/ml) foram misturadas com adjuvante LST (toxina de *Escherichia coli*) na proporção 1:1 para cada dose. Foram realizadas três inoculações sub-cutâneas (doses) em 1 camundongo fêmea do tipo Balb-C para cada proteína. O intervalo de tempo entre as doses foi de quinze dias. O soro retirado do plexo oftálmico

foi limpo por centrifugação, titulado e testado em ensaios de Western Blot na diluição de 1:1000, 1:5000 e 1:10000 e 1:15000.

3.4.2 *Análises por Western Blot para detecção de PhoU e PhoR em diferentes condições de cultivo*

PhoU é uma proteína induzida na carência de fosfato, enquanto PhoR é produzida de forma constitutiva, porém, com maior rendimento também na carência de fosfato, devido à ativação do regulon. Para detecção desses mecanismos *in vitro*, *X.citri* foi inoculada em diferentes condições de cultivo. As cepas de *Xanthomonas citri* (XAC306) foram crescidas em meio mínimo A (descrito por Levinthal, 1962), e em meio A com adição de 10 mM de fosfato, o qual chamamos de A+Pi. Dessa forma, seria possível avaliar se as proteínas seriam produzidas, como descrito na literatura. Além disso, um controle foi realizado (meio LB) para analisarmos o comportamento das proteínas em meio rico. As células foram crescidas a 30 °C, centrifugadas a 5000 g, e lavadas com água três vezes, seguidas de centrifugações a 3100 g. Posteriormente, os inóculos já padronizados a uma $O.D_{600nm} = 0,2$ foram adicionados aos diferentes meios de cultura, que foram incubados a 30 °C em plataformas com rotação a 180 RPM. Amostras foram retiradas em 24h, 48h, 72h e 96h. Aliquotas foram centrifugadas, preparadas com tampão de amostra (para SDS-PAGE) e refrigeradas para posterior aplicação em gel. A detecção das proteínas nas diferentes condições de cultivo foi feita através de Western Blot.

Para detecção da viabilidade dos anticorpos anti-PhoU e anti-PhoR nesses ensaios, foi utilizado protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Amostras de PhoU e PhoR em meio A, A+Pi e LB foram fervidas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Após a corrida, o gel foi submerso no tampão de transferência (150 mM Tris, 50 mM Glicina e 20% de Metanol), assim como a membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Merck, Kenilworth, NJ, USA.) e filtros de papel. Depois de 10 minutos imersos, a corrida de transferência foi realizada por 30 minutos, a 100 V, através de sistema de transferência (BioRad, Santo Amaro, SP, Brasil). Terminada a corrida, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão Tris-Buffer-Saline (TBS – 150 mM Tris, 50 mM NaCl) e foram lavadas

sucessivamente com TBS 1 X. Em seguida, foram submetidas aos anticorpos anti-PhoU, e anti-PhoR, nas diluições de 1:15000, 1:10000, 1:5000 e 1:1000, durante uma noite, sob leve agitação. Depois desse período, as membranas foram lavadas sucessivamente, e por fim, o anticorpo secundário IgG Mouse, conjugado à fosfatase alcalina (Merck) foi diluído na proporção de 1:20000 e incubado por duas horas. A revelação da membrana foi realizada por meio de reação colorimétrica derivada da reação da fosfatase alcalina e seu substrato NBT-BCIP AP (Merck).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor clareza dos resultados, os mesmos foram apresentados em duas partes: parte I referente à caracterização de PhoU, através das análises de bioinformática, purificação e ensaios biofísicos e a parte II, referente às análises de bioinformática, expressão e purificação de PhoR.

4.1 PARTE I – Análises da proteína PhoU

4.1.1 Identificação de motivos e regiões conservados em PhoU e modelagem molecular por homologia

PhoU de *X. citri* é uma proteína de 236 aminoácidos, o que equivale a uma massa molecular de 26,37 kDa. Seu ponto isoelétrico é estimado em 5.37, e sua estrutura secundária predita é predominantemente de α -hélices, como evidenciado também em ortólogos da literatura (LEE et al., 2014; LIU et al., 2005; OGANESYAN et al., 2005.).

Os ortólogos de PhoU já publicados e disponíveis no *Protein Data Bank* demonstram que a proteína pode se apresentar na forma de dímeros, ou até mesmo trímeros, sempre contendo seis α -hélices em cada molécula (*bunch*). Como não há informações sobre a função ou estrutura de PhoU de *X. citri*, realizaram-se análises de bioinformática essenciais para as etapas posteriores em bancada.

A sequência de PhoU foi obtida no Banco de dados KEGG (referência T00084, XAC1573) e submetida ao software Blast x *nr* (dados não redundantes), para identificação de ortólogos em outras espécies, conforme mostrado na Tabela 1. Os dados demonstram que PhoU além de ser conservada no gênero *Xanthomonas*, também o é entre diversas espécies de fitopatógenos, incluindo, *Xylella fastidiosa* (cobertura de 99% e identidade de 80%) e *Agrobacterium sp.*, (cobertura de 97% e identidade de 45%), o que reitera sua importância para o desenvolvimento desses microrganismos (Tabela 1). Em seguida, o Blastp X PDB foi realizado para identificar proteínas com estrutura resolvida que apresentam similaridade estrutural com PhoU de *X. citri*. Seis estruturas de proteínas que apresentaram conservação com PhoU foram identificadas como

proteínas regulatórias do sistema Pst e comparadas com a sequência da PhoU de *X. citri* (Tabela 2).

Tabela 1 - Possíveis ortólogos da proteína PhoU de *X. citri* identificados em outros microrganismos fitopatógenos com o auxílio do programa Blastp contra o banco de dados não redundante (Blastp x nr).

PhoU			
Microrganism	Protein/ Role	Query Coverage	Identity
<i>Xanthomonas campestris</i>	Phosphate Specific Transport System Regulatory Protein	100%	99%
<i>Xylella fastidiosa</i>	Phosphate Specific Transport System Regulatory Protein	99%	80%
<i>Agrobacterium sp</i>	Phosphate Specific Transport System Regulatory Protein	97%	45%
<i>Pseudomonas syringae</i>	Phosphate Specific Transport System Regulatory Protein	96%	35%
<i>Ralstonia sp</i>	Phosphate Specific Transport System Regulatory Protein	88%	35%
<i>Burkholderia megalo-chromosomata</i>	Phosphate Specific Transport System Regulatory Protein	57%	35%

Tabela 2 - Ortólogos da proteína PhoU de *X. citri* com estrutura tridimensional resolvida identificados com o auxílio do programa Blastp contra o banco o *Protein Data Bank* (Blastp x PDB).

PhoU					
Microrganism	Protein/ Role	Query Coverage	Identity	PDB	Reference
<i>Aquifex Aelicus</i>	PhoU like protein - Phosphate Uptake Regulator	91%	33%	1T8B A	Oganesyan et al, 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Phosphate Uptake Regulator	94%	35%	4Q25	Lee et al, 2014
<i>Aquifex Aelicus</i>	Phosphate Uptake Regulator	83%	35%	1T72 A	Oganesyan et al, 2005
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Phosphate Transport System Regulatory Protein	91%	27%	2I0M	Zhang et al, 2006
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Phosphate Uptake Regulator	96%	35%	1XWM	Oganesyan et al, 2005
<i>Thermotoga maritima</i>	Phosphate Uptake Regulator	74%	30%	1SUM	Liu et al, 2005

As sequências dos ortólogos com estruturas já publicadas no PDB, descritas no material e métodos, foram submetidas a um alinhamento múltiplo

feito por ClustalW e posteriormente submetidas ao programa ESPrit, (ROBERT; GOUET, 2014) para identificação de domínios ou regiões conservados. Para a construção do modelo tri-dimensional de PhoU de *X. citri*, utilizou-se o programa Modeller 9.16 (WEBB; SALI, 1993) e as coordenadas estruturais da proteína de *P. aeruginosa* (LEE et al., 2014; código PDB 4Q25), a qual apresenta identidade de 35% e cobertura (94%), além de ser um ortólogo filogeneticamente mais próximo de *X. citri* (dados não mostrados).

O modelo de PhoU apresenta seis estruturas de hélices alfa, organizadas paralelamente em um conjunto (Figura 7A). A sobreposição das estruturas já depositadas no PDB, em relação à PhoU de *X. citri*, mostrou que o modelo se adequa às demais estruturas, e que estas possuem conservação estrutural entre as espécies, uma vez que todas apresentaram R.M.S.D (Route Mean Square Deviation) entre si, menor que 1.2 Å (Figura 7B).

Adicionalmente, o modelo de PhoU de *X. citri* foi funcionalmente validado pois apresentou em posição e sequência, a conservação dos quatro motivos identificados em toda a família PhoU, sequências do tipo $E(D)xxxD$, (LEE et al, 2014; LIU, et al., 2005; OGANESYAN et al, 2005). Estes motivos foram primeiramente descritos por Liu e colaboradores (2005) os quais mostraram a interação destes resíduos com íons metálicos, classificando PhoU como uma metaloproteína. Os motivos do N-terminal, formados a partir das hélices 2 e 3, foram descritos como formadores de um sítio tetranuclear, enquanto os motivos do C-terminal, nas hélices 5 e 6, formariam o sítio trinuclear de ligação a metal (Figura 7C). Segundo o mesmo artigo, esses sítios são importantes para a formação do dímero de PhoU em *Thermotoga maritima*, além da possível contribuição de íons metálicos como co-fatores para o funcionamento de PhoU, no sistema Pst-PhoRB.

Os motivos $E(D)xxxD$ continuaram a ser estudados por outros pesquisadores. Em 2014, Lee e colaboradores também demonstraram uma importante correlação desses resíduos, conservados da família PhoU, com a formação de dímeros e ligação a metais, como Zinco e Ferro, mas sem evidências diretas em relação à sua influência para o correto funcionamento da proteína PhoU. Gardner e colaboradores (2014) mostraram que manganês é um ligante de PhoU e que este poderia influenciar a localização da proteína à membrana, o que discutiremos na sessão 4.1.5. Uma vez que PhoU de *X. citri*

conserva todos os motivos encontrados nos ortólogos funcionalmente caracterizados, supõe-se que sua função e mecanismo de ação seja similar no fitopatígeno.

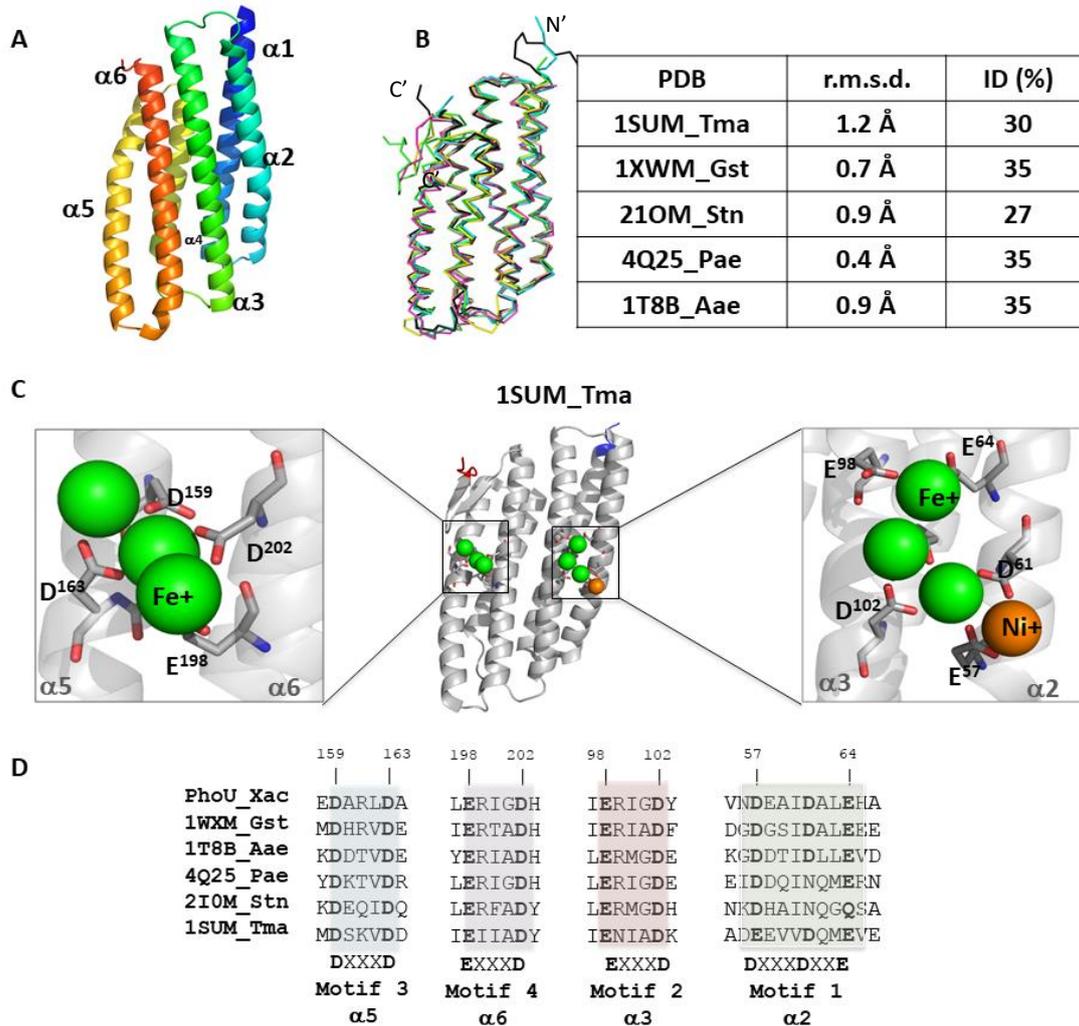


Figura 7 - Análise de motivos, ligantes e alinhamento múltiplo de PhoU de *X. citri* com ortólogos. A. Modelo da estrutura tridimensional da proteína PhoU baseado em ortólogo de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 4Q25). **B.** Sobreposição de estruturas de PhoU publicadas no Protein Data Bank, com seus respectivos r.m.s.d e identidade de sequência. **C.** Identificação dos motivos conservados como sítios de ligação a metais. Dados publicados pela primeira vez em 2005, relatando os sítios em *Thermotoga marítima* (PDB 1SUM). No detalhe, aminoácidos conservados em destaque. À esquerda, sítio trinuclear de ligação a metal, e à direita, sítio tetranuclear. Esferas verdes representam Ferro como ligante, enquanto a esfera laranja representa Níquel. **D.** Alinhamento realizado utilizando o programa ClustalW (EMBL-EBI, 2016) evidenciando a conservação de aminoácidos. Os 4 motivos conservados estão ordenados conforme sua disposição na imagem C: 1° motivo DxxxDxxE, 2°Motivo: ExxxD, 3°Motivo: DxxxD, 4° Motivo: ExxxD. Elaborado pelo *Pymol*, versão 1.2.7. (SCHRÖDINGER, 2016).

Adicionalmente, em comparação com estudos realizados por Lee e colaboradores (2014), foi possível também, comparar o potencial eletrostático das superfícies com algumas das proteínas citadas no trabalho. Os autores identificaram as semelhanças e diferenças entre Pae_PhoU (4Q25), Aae_PhoU (1T8B) e Tma_PhoU (1SUM). Diante dessas informações, o mesmo foi realizado para Xac_PhoU. Os resultados demonstram que, assim como Tma_PhoU, e Ae_PhoU, Xac_PhoU possui centro da cavidade dimérica carregado negativamente, enquanto Pae_Phou possui cavidade carregadas positivamente (Figura 8A). O mesmo pode ser observado para as proteínas enquanto monômeros. Os resultados sugerem que PhoU de *X. citri* pode manter as características dos sítios trinucleares e tetranucleares de ligação à íons metálicos, relatado por Liu e colaboradores (2005) (Figura 8B).

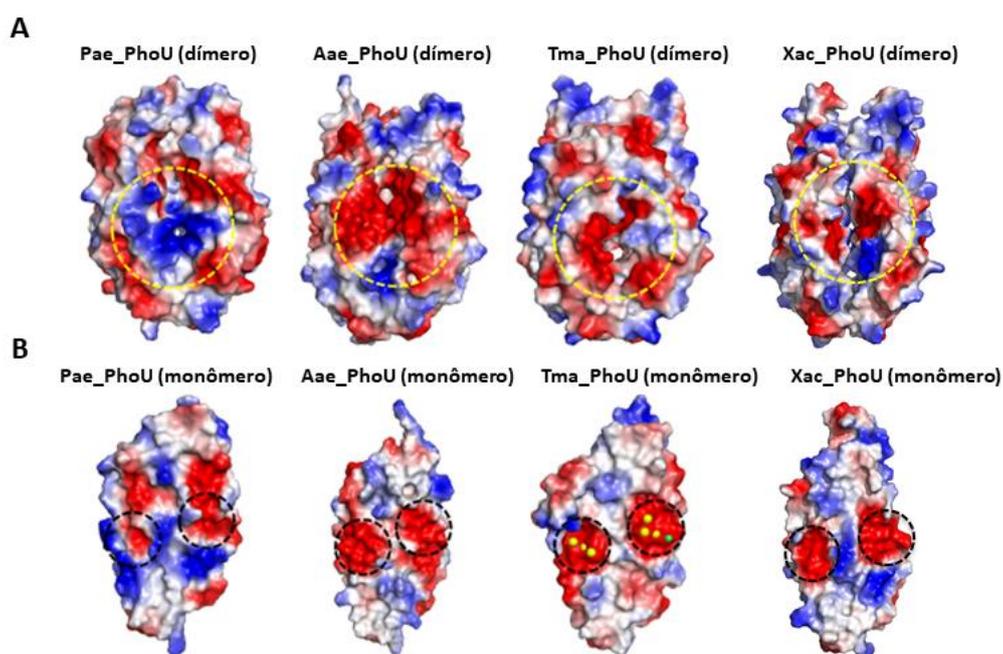


Figura 8 - Comparação do potencial eletrostático de PhoU entre diferentes espécies. A. Comparação entre as formas diméricas das proteínas. Círculo tracejado em amarelo mostra a cavidade e identificam a carga dessas regiões. Quanto mais vermelhas, mais negativas, quanto mais azuis, mais positivas. B. Comparação entre os potenciais na forma monomérica. Círculos tracejados em preto mostram a superfícies dos motivos E(D)XXXD. Esferas amarelas e verde identificam os íons metálicos ferro e níquel, respectivamente, em Tma_PhoU. Xac_PhoU apresenta perfil parecido ao de Tma_PhoU, podendo conservar as características dos sítios de ligação a metal. As figuras de Pae_PhoU, Aae_PhoU e Tma_PhoU foram retiradas e modificadas de Lee et al. (2014) e Xac_PhoU teve seu potencial eletrostático calculado através do Pymol, versão 1.2.7. (SCHRÖDINGER, 2016).

4.1.2 Purificação da proteína PhoU para ensaios funcionais e estruturais

O gene *phoU* foi amplificado e clonado no vetor pET28a (PEGOS, 2015). O vetor foi inserido na linhagem de *E. coli* Tuner DE3 por transformação através de eletroporação. O lisado proteico contendo PhoU foi extraído inicialmente com tampão (10 mM Tris, pH 8.0, NaCl 500 mM,) e sonicação conforme descrito em material e métodos. Após a purificação de afinidade a metal, realizada manualmente e no AKTA, PhoU foi eluída com gradiente de imidazol de 0 a 1 M. Tanto na purificação manual, quanto na cromatografia automatizada, PhoU foi purificada mas apresentou-se pouco solúvel logo após a IMAC.

Estratégias foram adotadas para tentar diminuir a perda de proteína, incluindo (I) adição de agentes solubilizantes como detergentes (Triton X-100), (II) adição de DTT, (III) eluição da amostra diretamente em tampão para assim, promover diluição instantânea da proteína e conseqüentemente, do Imidazol, (IV) diálise da proteína para retirada de imidazol e (V) mudança de tampão. Foram também testados os tampões HEPES, pH 7.0 e Fosfato pH 7.0 juntamente com aditivos (Figura 9). Entretanto, o tampão Tris permaneceu a melhor opção para a proteína.

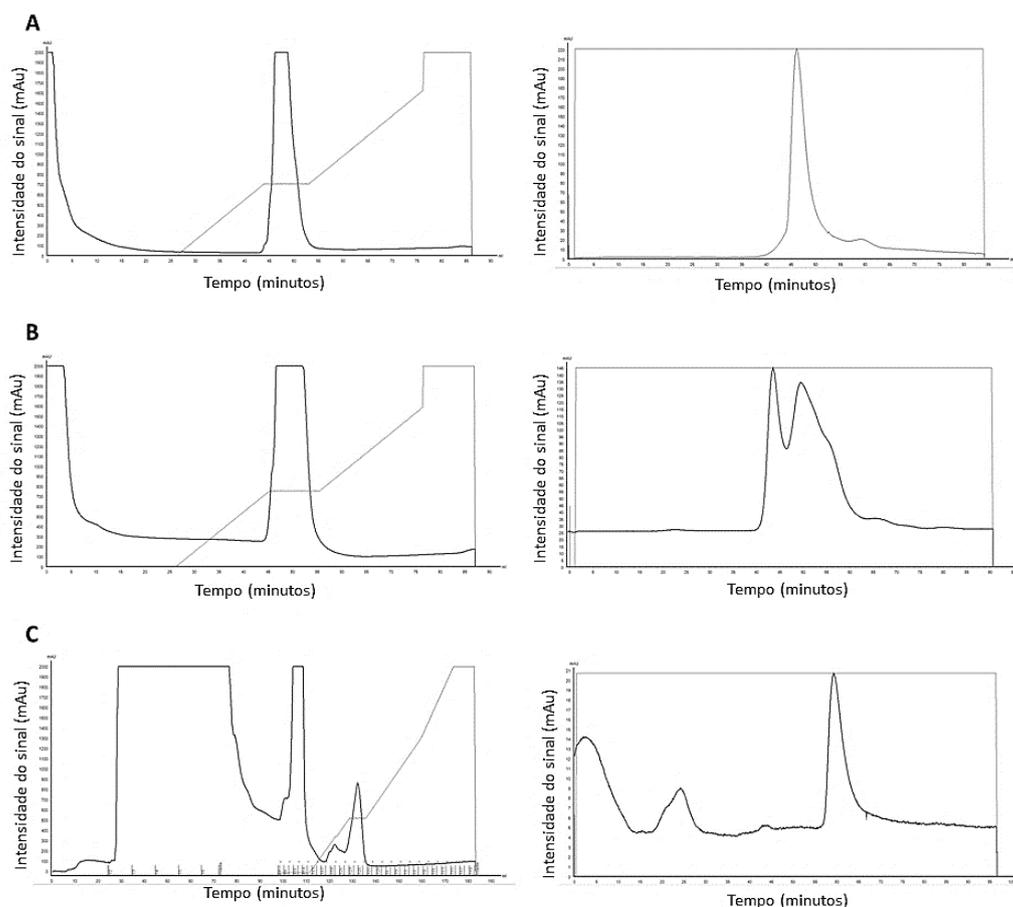


Figura 9 - Comparação entre cromatogramas de purificação de PhoU de *X. citri* utilizando diferentes tampões. A. IMAC e SEC com tampão Tris 20 mM pH 7.0. B. IMAC e SEC em tampão HEPES 20 Mm, pH 7.0. C. IMAC e SEC em tampão Fosfato 20 mM pH7.0. As amostras em tampão Hepes e Fosfato apresentaram grandes perdas, entre uma purificação e outra. Os resultados das SEC demonstram picos com menos de 100 mAu para Hepes e Fosfato, mostrando que o tampão Tris é a melhor opção para o protocolo de purificação de PhoU.

Contudo, apesar de identificarmos Tris como melhor tampão para PhoU de *X. citri*, nenhuma das abordagens testadas foi satisfatória em diminuir a precipitação da proteína. Nesse sentido, utilizamos como alternativa a adição de arginina ao tampão, o que tem sido indicado como um fator de solubilização e estabilização de proteínas em solução (ARAKAWA; KITA, 2014; HONG et al., 2017). A adição de arginina foi feita diretamente nas amostras de PhoU purificadas após IMAC e também, ao tampão de purificação da cromatografia de exclusão molecular.

Após a purificação por IMAC observou-se, nitidamente, que houve redução da precipitação ao final desta etapa, dada a diminuição da turbidez da amostra. Entretanto, os resultados da SEC mostraram que a amostra foi totalmente degradada, impedindo a continuação deste protocolo (dados não mostrados). Por fim, a obtenção de PhoU foi padronizada com tampão 20 mM

Tris, pH 7.0, 500 mM NaCl, 1 mM PSMF, 1 mM DTT e 5% de glicerol para IMAC, e redução de NaCl para 150 mM, para a SEC, o que favoreceu os melhores resultados para ambas as cromatografias (Figura 10A e 10B). A purificação por SEC foi realizada no Akta Start (GE Healthcare) conforme material e métodos. PhoU apresentou dois picos de eluição por volta de 46 e 60 mL, sendo o maior pico, em 46 mL. Este resultado sugeriu que a grande maioria da proteína se encontra em estado oligomérico complexo. A amostra referente ao maior pico foi aplicada em gel de SDS-PAGE não redutor (sem beta-mercaptoetanol) e apresentou-se, pelo menos, na forma de dímeros em solução (Figura 10F). Estes dados foram reprodutíveis em todas as análises realizadas, como discutiremos nas próximas sessões. O rendimento final após a SEC corresponde em média a 5.0 mg/mL (Figura 10).

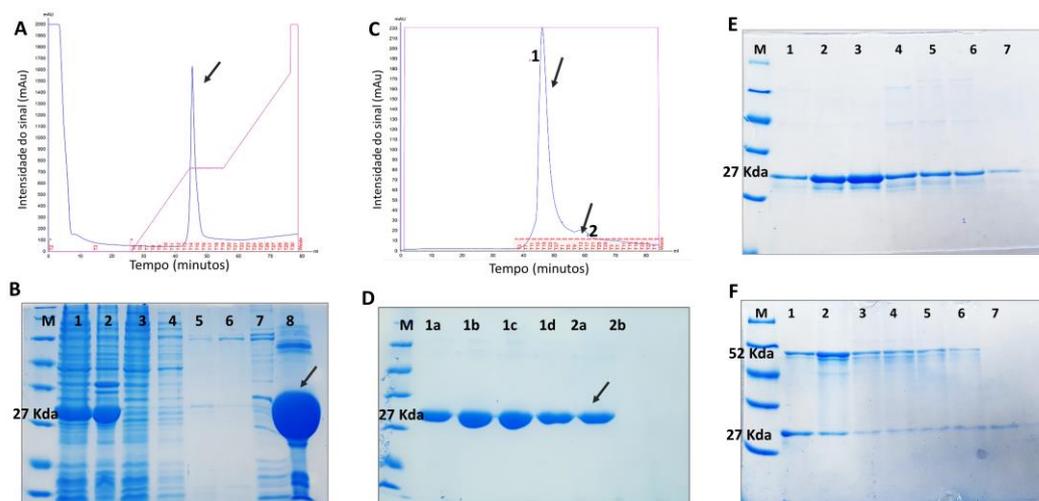


Figura 10 - Etapas de purificação da proteína PhoU por IMAC e SEC representada por cromatogramas e géis de poliácridamida. A. Cromatograma de afinidade mostra o pico da proteína PhoU eficazmente eluído. B. Gel de poliácridamida 12% mostra processo de produção e purificação da proteína PhoU. M – Marcador. 1- Amostra de cultura após indução. 2- Amostra de l'isado. 3- Amostra de cultura antes da indução. (Controle negativo). 4 a 8 – purificação da proteína PhoU por Imac. 4 – *Flow Through*. 5 a 7 – lavagens com tampão contendo de 20 a 50 mM de imidazol. 8 – PhoU eluída com 500 mM de Imidazol. C. Cromatograma da purificação de PhoU por SEC demonstra a presença de dois picos. D. Gel de poliácridamida 12% mostra as amostras oriundas da SEC. 1a-1c são frações do pico 1, enquanto 2a e 2b, do pico 2. E F. Comparação de amostras purificadas após SEC em gel redutor (E) e gel não-redutor (F) mostra que PhoU pode se apresentar na forma de dímeros (ou mais) em solução. As amostras da figura 9E e 9F são referentes ao pico 1 da SEC.

4.1.3 Ensaios de cristalização da proteína PhoU

A proteína PhoU, produzida de forma recombinante, foi utilizada para ensaios de cristalização. Os Kits Salt RX1-HRE109 e SaltRX2 – HRE112

(Hamptom Research) foram utilizados para os *screenings* iniciais. A concentração da proteína utilizada inicialmente foi de 8.5 mg/ml.

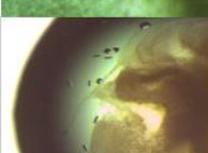
Dentre as condições e variações testadas, somente na condição com 1.5 M de fosfato de amônio e 0.1 M de Tris pH 8.5 (kit Salt RX1), foi possível observar o aparecimento de um cristal triangular, com dimensões pequenas. Todos os ensaios de refinamento foram então, baseados nesta condição mais promissora. As condições de refinamento para a condição citada acima, assim como a proporção de proteína para a condição em cada gota estão presentes na tabela 3.

Tabela 3 – Condições de refinamento para cristalização da proteína PhoU. A tabela mostra quantidade de sal (Fosfato de Amônio) contra o pH utilizado, tendo como base o tampão TRIS-HCL. A proporção da quantidade proteína: solução de cristalização para é indicada, sendo padronizada para todas as condições.

Concentração Sal	pH 7.2	pH 7.6	pH 8.0	pH 8.3	pH 8.5	pH 8.7
1.3 M	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2
1.4 M	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2
1.5 M	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2
1.6 M	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2	1:1, 2:1, 1:2

No refinamento, muitos cristais foram observados com formatos diferentes, conforme apresentado na Tabela 4. Os cristais foram formados em média após dois meses da preparação das gotas, e foram levados para a linha de luz MX2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, São Paulo, para serem submetidos à difração de raio-X. Porém, nenhum dos cristais obtidos difratou. Muitos dos cristais apresentaram padrão correspondente a cristais de sal, muito provavelmente devido à alta quantidade de fosfato na condição. Outros cristais eram demasiadamente pequenos, o que pode ter dificultado a qualidade da difração.

Tabela 4- Condições específicas aonde foram encontrados supostos cristais da proteína PhoU

Protein	Salt (M)	Buffer (M)	Protein Concentration	Cristal
PhoU	1.4 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.5	18 mg/ml	
PhoU	1.4 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.5	4.5 mg/ml	
PhoU	1.6 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.7	9 mg/ml	
PhoU	1.3 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.0	18 mg/ml	
PhoU	1.3 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.7	9 mg/ml	
PhoU	1.6 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.0	9 mg/ml	
PhoU	1.6 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.0	18 mg/ml	
PhoU	1.6 Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.5	4.5 mg/ml	
PhoU	1.6 M Ammonium Phosphate	0.1 Tris pH 8.0	9 mg/ml	

Novos ensaios de cristalização foram realizados, porém sem sucesso. Foram observadas muitas gotas com precipitados, e, nesse sentido, foram realizadas diversas diluições da proteína para diminuir esse problema. Entretanto, não foram encontrados cristais em condições cujo fosfato estivesse

ausente. Adicionalmente, foram realizados ensaios de desenovelamento térmico da PhoU em diferentes tampões para verificação das melhores condições para estabilização da proteína. Apesar de alguns tampões terem mostrado o aumento da temperatura de desenovelamento de PhoU, em nenhum deles foi possível obter a proteína em larga escala, sem precipitação.

Uma das hipóteses para esse impasse pode estar relacionada à qualidade da proteína quanto a sua polidispersividade. Em ensaios de DLS, com diferentes replicatas, foi possível verificar que a proteína se encontrava com alto índice de polidispersividade, como veremos no tópico a seguir.

4.1.4 Ensaio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) da proteína PhoU

Ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dinamic Light Scattering*) são capazes de fornecer informações sobre o raio hidrodinâmico da proteína e conseqüentemente, informações sobre a monodispersividade populacional (homogeneidade estrutural). Essas características são imprescindíveis para o sucesso de ensaios de cristalização e de espalhamento de raios-X à baixos ângulos (SAXS) (WÄRDELL; JAKOBSSON; NILSSON, 1993). Nesse sentido, ensaios de DLS foram realizados para proteína PhoU, após a cromatografia de exclusão molecular. Diferentes amostras foram analisadas durante o andamento do projeto, no sentido de acompanhar as melhorias dos métodos de purificação.

Os resultados obtidos durante o trabalho demonstram avanços em se tratando da monodispersividade da proteína (Figura 11). Porém, ainda que atingindo melhores resultados, a proteína PhoU ainda permaneceu polidispersa, o que pode ter dificultado enormemente os ensaios de cristalização. Tentativas de obter informações através da técnica de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*), na linha SAXS 2, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, também foram inviabilizadas, provavelmente, devido à essas características. A técnica de SAXS é importante para obter informações a respeito do envelope da proteína, e, portanto, suas características superficiais. Entretanto, apesar dos esforços constantes em tornar a proteína monodispersa, as tentativas não foram bem-sucedidas durante o tempo em que este projeto foi desenvolvido. Como relatado no processo de purificação da proteína, aditivos e trocas de tampão

melhoraram as condições finais de purificação (Figura 11B), mas não foram suficientes para obtenção de uma proteína monodispersa. Entretanto, apesar da última amostra (Figura 11B) ter apresentado média de 75% de polidispersividade, devido a um pico maior que 1000 nm de raio hidrodinâmico (não mostrado na figura), é possível ver que uma melhora significativa ocorreu na obtenção da proteína, e, portanto, futuramente, resultados melhores podem ser obtidos.

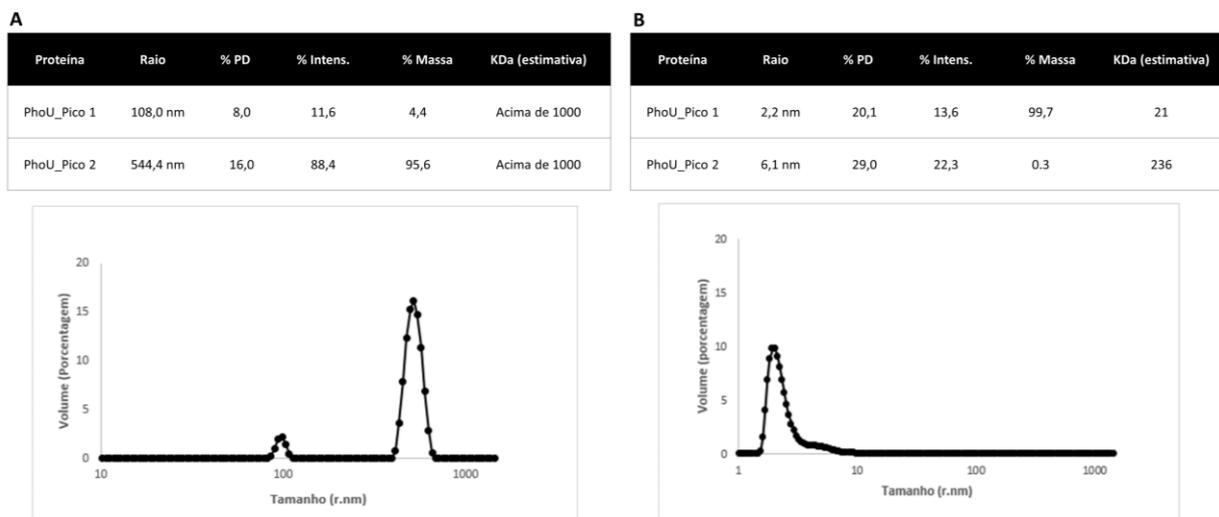


Figura 11- Resultados obtidos a partir de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). A. Amostra de PhoU mostra polidispersividade alta e picos que correspondem a agregados de proteínas, com estimativa de 10000 KDa. B. Amostra de PhoU apresenta picos menos agregados, e o pico 1 corresponde, provavelmente ao monômero em solução. Ambas as amostras são derivadas de purificação por cromatografia de exclusão molecular, e são correspondentes ao mesmo pico no cromatograma. Raio – corresponde ao raio hidrodinâmico coletado pelo aparelho. %PD – porcentagem de polidispersividade. %Intens. – Intensidade do espalhamento em porcentagem. % Massa – quantidade de proteína que aquele pico representa no todo. kDa estimativa – estimativa dado pelo aparelho a respeito do peso molecular das amostras. Dados obtidos diretamente das análises brutas no aparelho de DLS (MALVERN), do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria, no Laboratório Nacional de Biociências, em Campinas, São Paulo.

4.1.5 Avaliação da estrutura secundária de PhoU por Dicroísmo Circular – Influência do pH sobre a estrutura.

A utilização do espectropolarímetro é uma técnica espectroscópica que utiliza luz circular polarizada para avaliação do enovelamento e determinação de estrutura secundária de proteínas e outras moléculas. Isso se deve ao fato de a proteína possuir ligações peptídicas assimétricas que acabam por promover o fenômeno de dicroísmo circular (CORRÊA; RAMOS, 2008).

As análises para dicroísmo circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) foram preparadas conforme descrito em material e métodos de maneira em que

a concentração fosse de 10 μM em um volume final de 200 μL na cubeta. Para as análises de ligante, foram considerados 25 μM para cada ligante, MgCl_2 e MnCl_2 . Já em relação às análises de pH, 10 μM da proteína foram adicionadas aos tampões com pH 4.0, 5.6, 7.0 e 8.0 (tampão padrão da proteína), em concentração final de 10 mM.

Os resultados gerados nessa análise confirmaram que PhoU possui estrutura secundária característica de alfa-hélice (Figura 12) em tampão padrão de 10 mM Tris e de 25 mM NaCl, pH 7.0, em uma faixa de absorção de 200 nm a 260 nm. Nesses ensaios, foi possível observar que PhoU purificada encontrava-se enovelada com o perfil similar ao de seus ortólogos – perfil de alfa-hélice, com picos proeminentes em 208 e 222 nm, assim como também foi observado nos ensaios de bioinformática (Figura 12).

Em relação ao comportamento da proteína PhoU frente às diferentes concentrações de pH, o que se pôde observar é que, conforme o pH declina, PhoU sofre mudanças conformacionais relevantes (Figura 12), tanto em termos de perda de estrutura secundária, como alteração do conteúdo destas estruturas, como pode-se verificar pela mudança dos perfis apresentados. Em pH 8.0, PhoU apresenta dois picos mínimos, um em 208 nm e um em 222 nm, o que corresponde a estrutura de alfa-hélices. Em pH 4.0, por exemplo, a estrutura é totalmente alterada em comparação com os demais. Essas características eram esperadas, uma vez que a quantidade de cátions presentes em pH ácido altera drasticamente a superfície eletrostática da proteína. Nesses resultados, porém, não foi possível obter a leitura em comprimento de onda abaixo de 200 nm, pois a corrente estava muito alta.

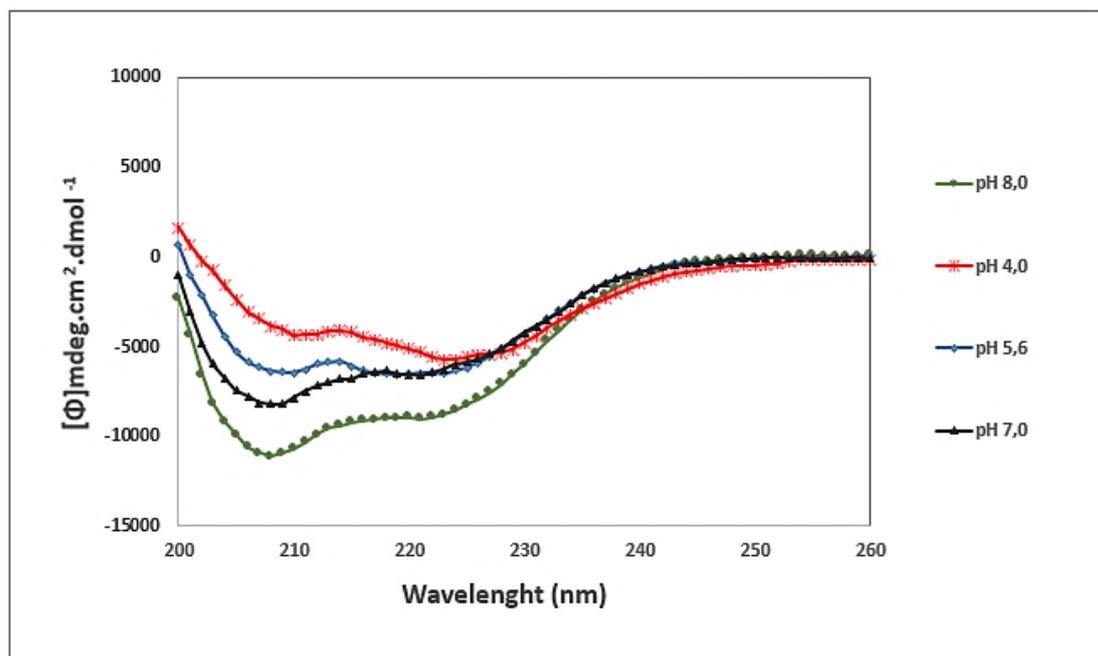


Figura 12- Espectro de Dicroísmo Circular para PhoU obtidos a partir de diferentes pHs. PhoU, como esperado, apresenta perda de estrutura conforme o pH declina, do pH 8.0 para pH 4.0. Análises realizadas em tampão Tris 10 mM, NaCl 25 mM, com concentração final de 10 μ M da proteína. Ensaios realizados no Laboratório de Calorimetria e Espectroscopia do CNPEM, em Campinas, São Paulo.

4.1.5 Análise de ligantes por Dicroísmo Circular e ensaio de fluorescência – Influência do manganês e do magnésio sobre a estrutura de PhoU

Gardner e colaboradores (2014), relataram que PhoU possui interação com os metais manganês e magnésio. Esses dados foram obtidos através de ensaios de fluorescência, facilitados pela mutação de um dos resíduos próximos aos supostos sítios de ligação. Os pesquisadores encontraram K_d (constante de dissociação) do ligante manganês de 18.8 μ M e 85 μ M do ligante magnésio em relação a PhoU. Nesse sentido, e ainda baseados nas análises de bioinformática apresentadas no item 4.1.1, avaliamos a possível interação de PhoU a metais.

Para conseguirmos realizar os ensaios de dicroísmo circular e fluorescência, primeiramente, três amostras da proteína PhoU foram obtidas. A primeira delas foi uma amostra diretamente oriunda da purificação por IMAC, a qual chamaremos a partir de agora de PhoU_IMAC. Em seguida, realizou-se ensaio de purificação por Exclusão Molecular, cujo cromatograma revela a presença de dois picos, os quais chamaremos PhoU_SEC1 e PhoU_SEC2. Essas amostras foram concentradas ou diluídas até atingir 1 mg/ml, o correspondente a aproximadamente 38 μ M, sendo posteriormente diluídas para

10 μM . A leitura acumulativa de cada amostra foi feita sem ligantes (Figura 13) e com ligantes (Figura 14). Quando na presença de ligantes, a concentração final, utilizada para cloreto de manganês e cloreto de magnésio, foi de 25 μM a partir de solução estoque de 1 mM.

As medidas acumulativas de leitura do dicroísmo circular mostram um padrão diferenciado para as amostras, quando observadas individualmente, sem ligantes. Aparentemente, PhoU_IMAC e PhoU_SEC1 apresentam perfis parecidos de estrutura secundária (Figura 13), o que é esperado, de acordo com os estados oligoméricos muito parecidos de perfil molecular em solução, para estas amostras. Já em relação à amostra PhoU_SEC2, o que se observa é uma proteína com estrutura menos ordenada, provavelmente na forma de monômero ou dímero em solução, devido à sua eluição mais tardia na cromatografia de exclusão molecular.

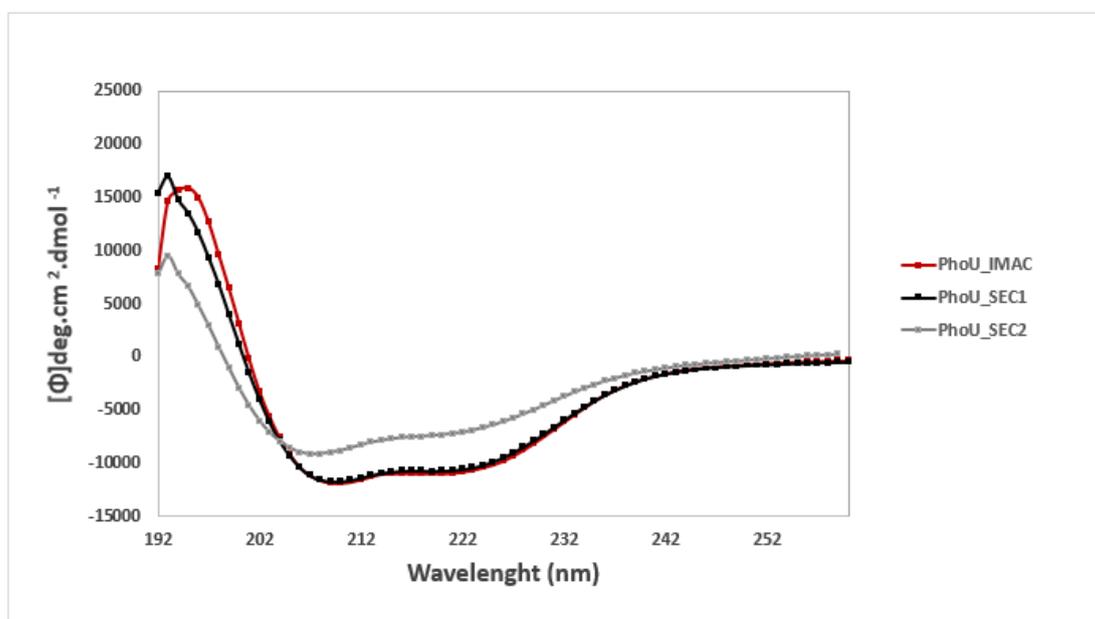


Figura 13 - Espectro de Dicroísmo Circular para diferentes amostras de PhoU. PhoU_IMAC e PhoU_SEC1 apresentam perfil espectral bastante parecido, característicos de α -hélices, com picos em 208 e 222 nm. PhoU_SEC2, por sua vez, apresenta pico espectral que difere do das outras amostras. Análises realizadas em tampão Tris 10 mM pH 7.0, NaCl 25 mM, com concentração final de 10 μM da proteína. Ensaios realizados no Laboratório de Calorimetria e Espectroscopia do CNPEM, em Campinas, São Paulo.

Curiosamente, a adição de manganês nas amostras PhoU_IMAC e PhoU_SEC1 proporcionou o mesmo comportamento da molécula, observando-se pouquíssima mudança estrutural. Em contrapartida, a adição de manganês na amostra PhoU_SEC2 provocou uma mudança drástica na estrutura da proteína (Figura 13). Isso sugere que a captação de ligantes pode estar ligada

diretamente ao estado oligomérico da amostra, uma vez que, em estados oligoméricos mais complexos, PhoU pode apresentar seus resíduos de ligação menos expostos, o que conseqüentemente, dificulta a interação com pequenos ligantes. Entretanto, quando a proteína se encontra na forma dimérica ou monomérica, os sítios de ligação, passam a ser mais expostos, favorecendo a interação com os ligantes, o que poderia explicar o comportamento observado nestes ensaios (Figura 14).

Os mesmos ensaios foram feitos para os metais magnésio e ferro. Porém, magnésio, apesar de ser substituto do manganês em muitas reações celulares (YANG, 1983), não mostrou nenhum efeito sobre as amostras. Já em relação ao ferro (utilizado na forma de FeSO_4), notou-se que sua adição causava um aumento na precipitação da amostra. Estes resultados poderiam indicar que na adição de ferro (e possível interação com o mesmo), a proteína sofre alterações estruturais que levam à agregação e à evidente precipitação.

Com a finalidade de validarmos os dados de interação da proteína PhoU com o ligante manganês, ensaios de fluorescência intrínseca de tirosina e triptofano foram realizados para detecção de mudanças nos padrões através da adição do ligante. Sabendo que próximo aos sítios de interação a metal existem duas tirosinas (Y103 e Y166), é possível obter um sinal satisfatório de fluorescência. Além disso, PhoU possui cinco tirosinas e um triptofano (W212, 10 resíduos de distância do motivo quatro), que podem gerar uma informação confiável (Figura 14). Dados da literatura também relatam que a excitação da tirosina promove uma conseqüente excitação do triptofano e, portanto, a adição do ligante poderia ser percebida de forma adequada (LAKOWICZ, 1999)

A proteína PhoU_SEC2 foi analisada na concentração de 2 μM juntamente com 25 μM de manganês. O resultado mostra que a proteína sozinha apresenta pico máximo de fluorescência na ordem de 4000 unidades arbitrárias (u.a) em 320 nm. Com a adição do ligante observou-se a redução drástica da fluorescência para 1000 u.a., sem deslocamento do comprimento de onda. Estes dados são condizentes com o ganho de estrutura observado nos resultados do CD, e com a possível interação da proteína ao ligante, especificamente na região esperada, de tirosinas e triptofano (Figura 13). Neste caso, a interação do manganês nos sítios seria a responsável pela diminuição do espectro. Adicionalmente, outro dado importante é tirado destas análises. O fato do comprimento de onda do pico

máximo de fluorescência não ser alterado mostra que a interação da proteína com os ligantes não promove deslocamento dos resíduos para regiões mais ou menos expostas, o que está de acordo com os dados publicados por Gardner e colaboradores (2014), sugerindo fortemente que o manganês possa, mesmo, ser um metal ligante de PhoU.

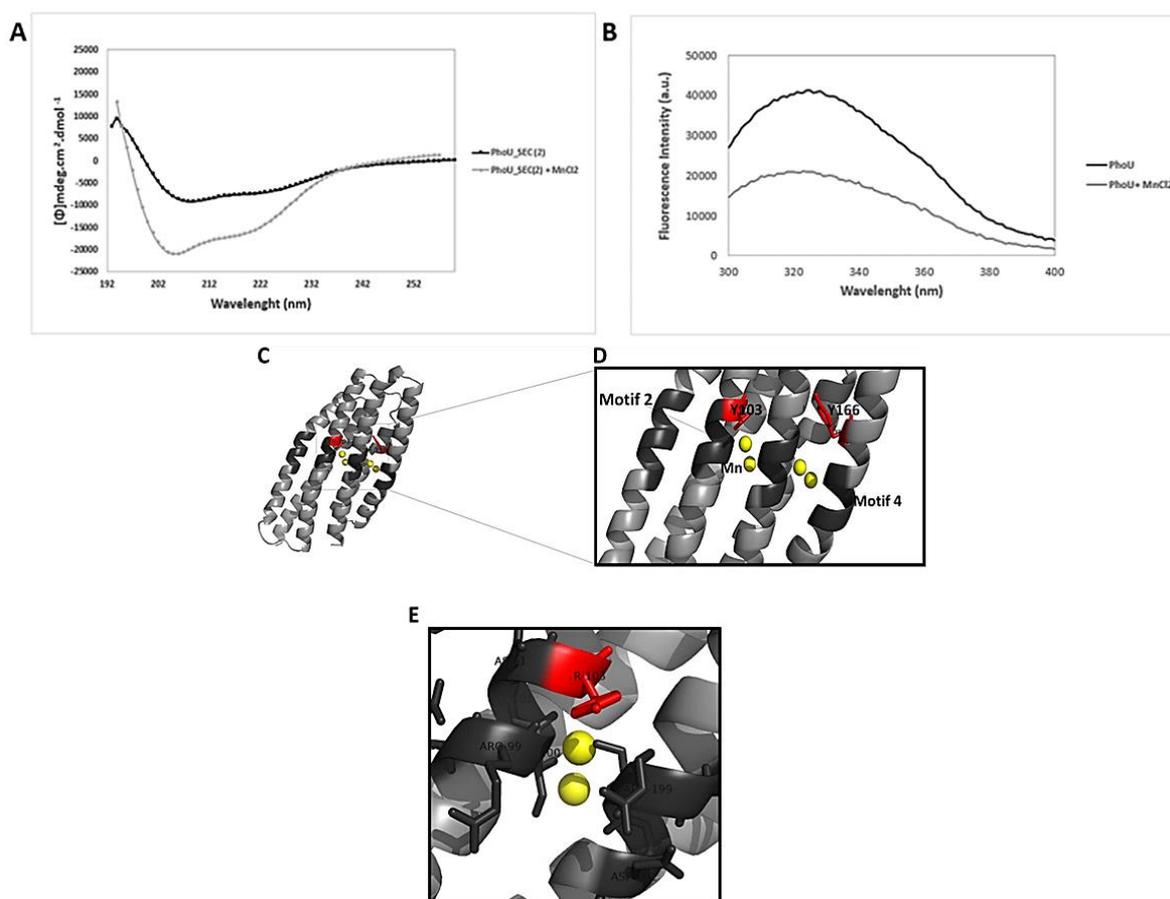


Figura 14 – Resultado de Dicroísmo Circular e Fluorescência Intrínseca dos aminoácidos aromáticos de PhoU de *X. citri* na presença de manganês. A. Espectro de dicroísmo circular da amostra evidencia um ganho de estrutura na presença do ligante Manganês ($MnCl_2$). B. Espectro de fluorescência mostra perda de unidades de fluorescência quando Manganês é adicionado. C. Representação da ligação de Manganês (esferas amarelas) à proteína PhoU de *X. citri* em cinza claro. Os motivos de interação a metal estão marcados de cinza escuro, e as tirosinas próximas ao sítio em vermelho. Figuras D e E representam os resíduos os motivos e resíduos em detalhe. Elaborado pelo *Pymol*, versão 1.2.7., de acordo com o modelo de PhoU_Xac.

A ligação de manganês para uma proteína supostamente repressora é tratada por Gardner e colaboradores (2014) como um fator essencial para a ativação de PhoU e sua consequente localização à membrana em *E. coli*. Lubin e colaboradores (2016), relatam também, que PhoU não formaria um complexo repressor em *Caulobacter crescentus*, mas que estaria próxima à membrana

para a sinalização do sistema Pst e Phor-PhoB. A questão é, porque o manganês é importante para proteínas e para a célula bacteriana?

A revisão feita por Papp-Wallace e Maguire (2006) relata que o manganês é primordial para a virulência bacteriana. Os transportadores ABC NrampI e NrampII para manganês são encontrados em diversas bactérias patogênicas, como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus anthracis*, dentre outras bactérias virulentas. Entretanto, o que tem chamado a atenção é o fato de o manganês poder substituir bioquimicamente, o ferro, magnésio e outros ligantes em enzimas específicas, mas ainda assim, possuir muitas proteínas dependentes somente de sua ação (manganês dependentes), como por exemplo, a enzima superóxido dismutase, cujos estudos são desenvolvidos baseados no transportador de manganês.

Papp-Wallace e Maguire (2006) relatam, ainda, a importância do manganês na fosforilação proteica, e aqui, o ponto chave de nossa discussão. *S. typhimurium* possui, por exemplo, duas fosfatases totalmente dependentes do íon manganês, a PrpA e PrpB. Estudos em busca de homólogos da proteína, encontraram também as Ser/Tre/Tir quinases YniA/YcfN, em eucariotos, das quais necessitam do íon para uma correta atividade.

Esses estudos, ainda que distantes dos objetivos aqui relatados, embasam este trabalho e garantem uma conexão pouco relatada: a importância do manganês para proteínas envolvidas em processos de fosforilação e desfosforilação bacteriana. O alinhamento entre a proteína PhoU e as enzimas PrpA e PrpB de *S. typhimurium* mostram que alguns resíduos são conservados, especificamente os resíduos localizados nos motivos de ligação a metal de PhoU (dados não mostrados). Esta análise estaria em concordância com a interação de PhoU com PhoR fosforilada e mostram que, de alguma forma, esses motivos são importantes para enzimas como essas, relacionadas à fosforilação ou desfosforilação de outras proteínas. Adicionalmente, demonstram a importância do manganês para a célula bacteriana e requerem maior direcionamento em relação a ensaios específicos, podendo ampliar as barreiras ainda existentes sobre o conhecimento de metaloproteínas, ainda pouco abordadas pela literatura.

4.1.6 Ensaios Funcionais utilizando Western Blot: detecção de PhoU em diferentes condições de cultivo

Com o intuito de testar os anticorpos produzidos para PhoU/PhoR, amostras derivadas de expressão proteica foram submetidas ao gel de poliacrilamida-SDS, transferidas para membrana de PVDF, e incubadas com anticorpos anti-PhoU e anti-PhoR. A figura 14 mostra que as amostras das proteínas, em diferentes concentrações, puderam ser reconhecidas pelos anticorpos, numa proporção de 1:15.000 (Figura 14). Este resultado demonstra que os anticorpos são capazes de reconhecer as proteínas recombinantes.

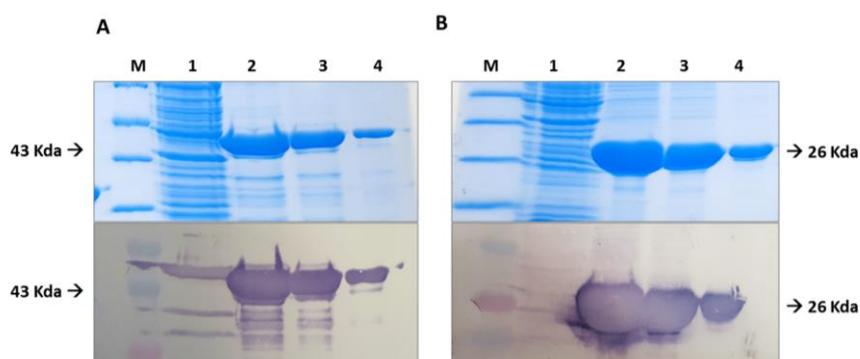


Figura 15 - Verificação dos anticorpos anti-PhoR e anti-PhoU por Western Blot A. Gel de poliacrilamida 12%, seguido de membrana de PVD revelada por reação colorimétrica com NBC-BCIP. A. O teste foi realizado com amostras da produção da proteína PhoR. M, Marcador; 1- Controle negativo (lisado de *E. coli*). 2- PhoR 4 mg/ml, 3 – PhoR 2 mg/ml, 4 – PhoR 1 mg/ml. B. M, Marcador; 1- Controle negativo (lisado de *E. coli*). 2- PhoU 4 mg/ml, 3 – PhoU 2 mg/ml, 4 – PhoU 1 mg/ml.

Nesse sentido, foram realizados ensaios para determinação da expressão das proteínas dos extratos celulares de *X. citri* em diferentes condições de cultivo. Para isso, cepas de *X. citri* foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) sem sal, Meio A e Meio A+Pi, conforme a literatura (Pegos, 2014, 2015). Os inóculos de meio A foram crescidos em triplicata por 72 horas e os inóculos em meio LB sem sal foram crescidos por 24 horas, ambos a 30 °C. Os extratos foram centrifugados a 10.000 g por 15 minutos, e foram ressuspensos de maneira que todos fossem padronizados para uma OD_{600 nm} de 0.4.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, transferidas para membrana de PVDF, e incubadas com anticorpo anti-PhoU, conforme seção 3.4.2. O meio LB sem sal foi utilizado como controle, enquanto que o Meio A é um meio mínimo, definido, escasso em muitos nutrientes e indicativo para ativação de proteínas do regulon Pho. Era esperado que a proteína PhoU fosse

detectada nesse meio, uma vez que, em tese, o gene de *phoU* somente é expresso na ausência de fosfato. Em meio A+Pi, supriríamos a carência de fosfato e a proteína não deveria ser produzida. Entretanto, os resultados demonstraram a presença de bandas inespecíficas após a revelação. Para diminuir a possível interação inespecífica, testes com maior tempo de bloqueio foram feitos, porém sem sucesso. Estes resultados ainda são preliminares e devem ser repetidos. É possível, por outro lado, que o anticorpo que fora produzido com a proteína desenhovelada, não seja capaz de reconhecer a proteína nativa. Além disso, os extratos das amostras de *X. citri* não apresentam resolução no gel, talvez devido ao tempo de fervura, à qualidade de preparação das amostras ou ao processo de revelação não muito sensível. Diferentes tipos de revelação devem ser testados, como por exemplo, a que utiliza corante fluorescente (Figura 16).

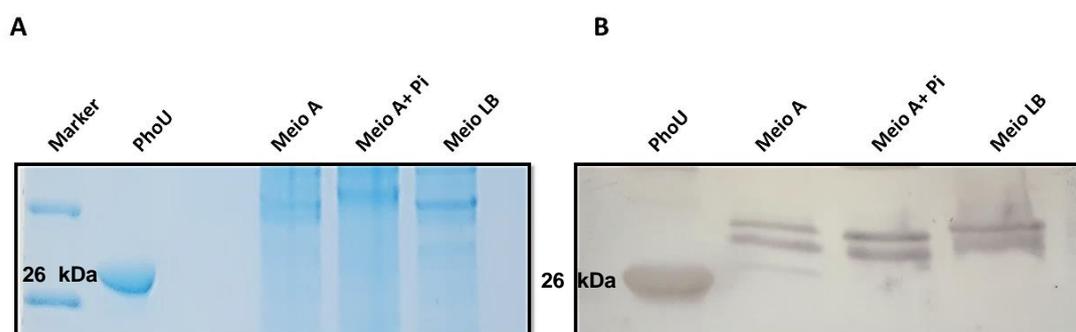


Figura 16 - Verificação da expressão da proteína PhoU em diferentes condições de cultivo através de Western Blot. A. Gel de poliacrilamida 12%. B. Membrana de PVDF revela bandas inespecíficas através do método de revelação colorimétrica com NBT-BCIP. Meio A+ Pi significa a adição de 10 mM de fosfato ao meio mínimo A. LB – Meio Luria Bertani. PhoU é o controle positivo da revelação.

4.2 PARTE II – Análises da Proteína PhoR

4.2.1 Construção do modelo molecular de PhoR baseado em homologia

PhoR, a histidina quinase do sistema de dois-componentes de *X. citri*, é uma proteína com peso molecular de 49.7 kDa, possui 447 aminoácidos e ponto isoelétrico teórico de 9.23, sendo constituída em sua grande parte por estruturas secundárias em forma de hélices e alças. Utilizando-se a ferramenta Blastp X nr e Blastp X PDB evidenciamos que a sequência de PhoR de *X. citri* apresenta

conservação com algumas proteínas ou domínios de outras histidina-quinases, inclusive com estrutura resolvida (Tabela 5).

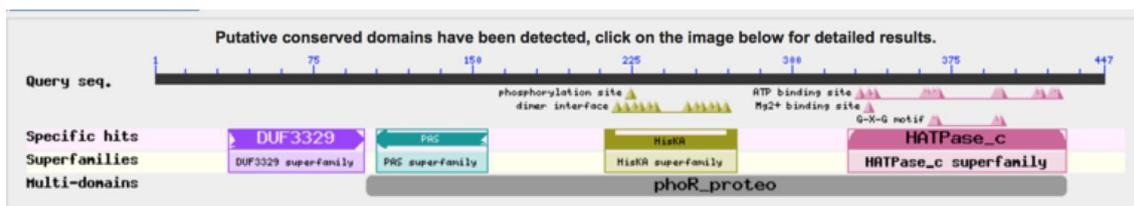
Baseados nestas similaridades e reproduzindo a metodologia descrita para PhoU, o modelo da proteína PhoR foi construído com as coordenadas estruturais do ortólogo de *Streptococcus mutans* (WANG, et al, 2013; código PDB 4I5S), dada sua maior cobertura de alinhamento (81%), e identidade de 28% (Tabela 5).

Tabela 5 - Ortólogos da proteína PhoR de *X. citri* identificados com o auxílio do programa Blastp contra Protein Data Bank (Blastp x PDB).

PhoR					
Microrganism	Protein/ Role	Query Coverage	Identity	PDB	Reference
<i>Streptococcus mutans</i>	Histidine Kinase	81%	28%	4I5S	Wang et al, 2013
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Histidine Kinase	49%	32%	4U7N	Cai et al, 2015
<i>Caulobacter crescentus</i>	Histidine Kinase	50%	36%	4Q20	Childers et al, 2014
<i>Thermotoga maritima</i>	Transferase Signaling Protein	50%	35%	4JAS	Podgornaia et al, 2013
<i>Thermotoga maritima</i>	Histidine Kinase	50%	36%	2C2A	Marina, et al 2015
<i>Thermotoga maritima</i>	Transferase Signaling Protein	50%	33%	3DGE	Casino et al, 2009
<i>Escherichia coli K-12</i>	Transferase Signaling Protein	47%	30%	4BIU	Mechaly et al, 2012
<i>Escherichia coli K-12</i>	Transferase Signaling Protein	47%	30%	4BIV	Mechaly et al, 2014
<i>Escherichia coli K-12</i>	Transferase Signaling Protein	47%	29%	4BIW	Mechaly et al, 2015

Quatro domínios diferenciados são descritos, conforme apresentado na Figura 17 : (i) o domínio Duff (único transmembranar), cuja função é desconhecida; (ii) domínio PAS, (*Per Aint Sim*, nomeados a partir de proteínas de *Drosophila*) e responsável pela interação com ligantes; (iii) domínio histidina quinase, responsável pela fosforilação e desfosforilação; e (iv) o domínio ATPase, responsável pela quebra de ATP (PODGORNAIA et al, 2013; WANG et al, 2013). Todos os domínios foram conservados em PhoR de *X. citri*.

A



B

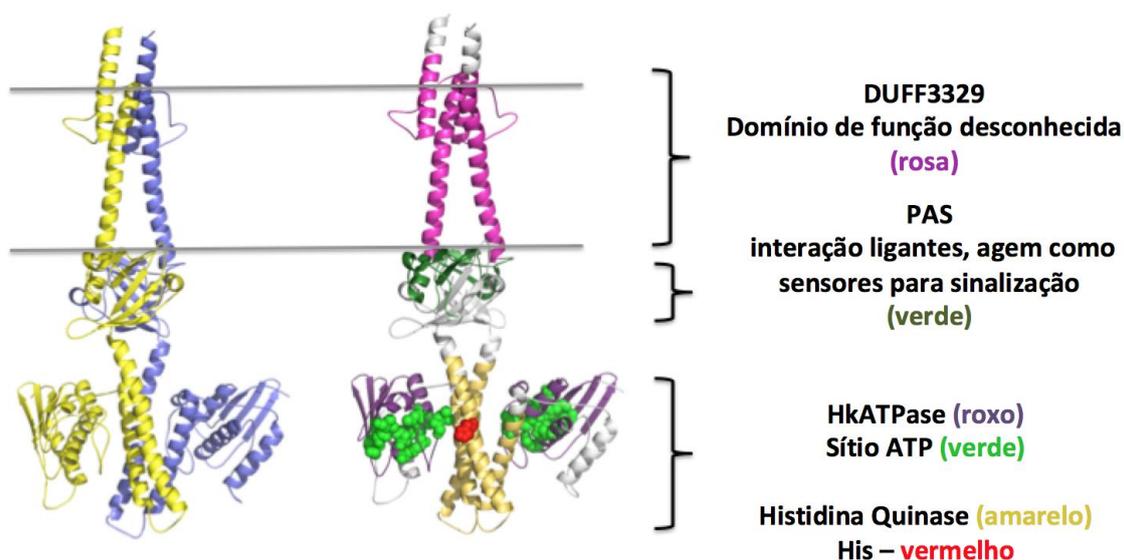


Figura 17 – Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína PhoR de *X. citri* e conservação de motivos. A. Resultado do Blastp evidenciando os domínios encontrados na sequência de PhoR. B e C. Modelo da PhoR de *X. citri*, gerado a partir das coordenadas estruturais da proteína PhoR de *S. mutans* mostrado em cartoon em duas versões: evidenciando a formação do dímero (duas moléculas coloridas de amarelo e azul, respectivamente) e apresentando a localização dos domínios preditos. Os domínios são: Duff: domínio transmembrana sem função conhecida (em rosa); PAS: do inglês *per-aint-sim*, domínio de interação com ligantes (verde anil); HK, domínio Histidina Quinase (amarelo e cinza), no qual ocorre fosforilação e desfosforilação. ATPase: domínio aonde ocorre ligação do ATP (em verde). Figura gerada no programa *Pymol*, versão 1.2.7. (SCHRÖDINGER, 2016).

Segundo Wang e colaboradores (2013), o domínio Duff, também denominado HAMP (oriundo das primeiras letras onde pode ser encontrado, - em inglês - *Histidinas kinases, Adenylyl, Methyl acceptance and Phosphate proteins*) ou ainda TMD (*Transmembrane Domain*), pode ter um papel importante na mediação dos sinais transmembranares nas mais diferentes condições. Porém, em se tratando do regulon Pho, diferentemente do que ocorre com outras proteínas histidinas quinases, acredita-se que os sinais possam ser gerados a partir de respostas citoplasmáticas mediadas por PhoU e pelo sistema Pst (Vuppada et al., 2018).

4.2.2 Análise das regiões de interação entre PhoU e PhoR

O mecanismo de interação entre PhoU e PhoR em *E. coli* vem sendo estudado por Gardner e colaboradores (2014; 2015), visando compreender quais seriam os resíduos envolvidos, papel dos metais e mecanismos de sinalização. Baseados em análises de mutantes, verificaram que Ala147 e Arg148 de PhoU poderiam ser responsáveis pela interação com PhoR em *E. coli*. Utilizando a metodologia de varredura de mutagênese, os autores mostraram que em PhoR, alguns resíduos do domínio PAS, localizado logo após o domínio TMD pareceram essenciais para interação com PhoU. Tais resíduos estariam localizados nas regiões dos aminoácidos 141-146 e 157-162.

Para testar essas informações, os autores ainda realizaram ensaios de *docking*, que foram validados por ensaios de *Direct Coupling Analysis*, um método que identifica covariância entre resíduos, através da medição do poder que um resíduo pode exercer sobre outro. Os modelos de *docking* mostraram que PhoU de *E. coli* possui potencial para interagir tanto com o domínio PAS quanto com o domínio histidina quinase de PhoR, indicando a atuação da PhoU como auxiliadora na ação quinase ou fosfatase de PhoR. Os autores supõem que as conformações de PhoR seriam dependentes da interação com PhoU em *E. coli*, e que estariam sujeitas também à interação de PhoU com o sistema Pst (Figura 18).

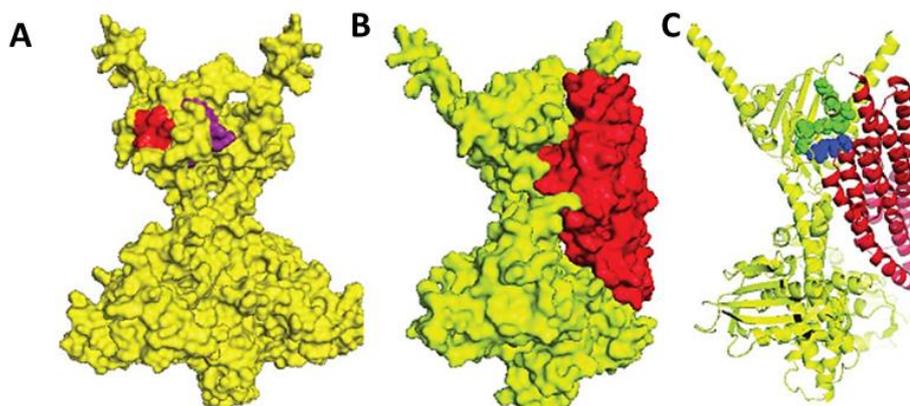


Figura 18 - Análises de Docking e Direct Coupling Analysis (DCA) mostram possível resíduos de interação entre PhoU e PhoR de *E. coli*. A. Modelo de PhoR em superfície. Em vermelho, resíduos 141-146, em roxo, 157-162. B. Modelo de interação gerado através de *Docking*. Em amarelo, PhoR, e em vermelho, PhoU. C. Representação em *cartoon* da interação entre PhoU e PhoR. Esferas verdes representam os resíduos K157-S162, enquanto as esferas azuis representam os resíduos A147 e R148. Retirado de Gardner et al. (2015).

Para avaliarmos se os resíduos identificados nas proteínas de *E. coli* identificadas atuantes no processo de interação entre PhoU e PhoR eram conservados em geral, e nas proteínas de *X. citri*, realizamos análises de conservação com o programa ConSurf, um website responsável pela identificação de regiões funcionais em proteínas e outras informações (ASHKENAZY et al., 2016).

O algoritmo, neste caso, encontra as sequências homólogas, remove as redundâncias e as sequências não relacionadas e alinha as sequências que considerar relevantes através de softwares como ClustalW ou MAFFT. Em seguida, o programa reconstrói árvores filogenéticas (caso necessário) e calcula a conservação através de algoritmos específicos, como o Bayesian (MAYROSE et al., 2004). Por fim, os resultados obtidos podem ser projetados em 3D e visualizados pelo Pymol. O padrão de cores gerado no ConSurf para representar a conservação de resíduos entre proteínas, varia do azul para o roxo, da menor para a maior conservação, respectivamente.

Primeiramente, realizamos a caracterização da conservação de PhoUs utilizando como *input* a estrutura de PhoU de *E. coli* para as análises do programa. O cálculo de conservação foi inicialmente avaliado utilizando-se 2727 sequências de ortólogos de PhoU e os resultados são apresentados na estrutura de PhoU com os resíduos coloridos conforme o grau de conservação. Observou-se que dos resíduos descritos por Gardner e colaboradores (2015), Asp150 apresentou alto grau de conservação na maioria das sequências, seguido por Ala147 e Arg148, os quais não são conservados (Figura 19A, resíduos mostrados como esferas). Estes resíduos estão localizados próximos à extremidade C-terminal da proteína em uma interface que em geral, também não apresenta conservação (Figura 19B, maioria dos resíduos coloridos em tons de azul). Por outro lado, evidenciamos que na interface oposta de PhoU e da localização dos resíduos (após giro de 180°), o padrão de conservação dos resíduos é significativamente alto. Este dado poderia sugerir que esta região é importante funcionalmente, talvez para a formação de dímeros de PhoU, como encontrados no ortólogo de *T. maritima* (LIU et al., 2005), para a interação com PstB, a ATPase do sistema Pst, ou até mesmo, interação com a própria PhoR. Além disso, verificamos que a região de maior conservação apresenta os

resíduos de interação com os metais ou motivos da família PhoU, conforme apresentado anteriormente.

Ainda, usando as sequências de ortólogos com estrutura resolvida, comparamos a região onde localizam-se os resíduos de *E. coli* e mostramos que *X. citri* só conserva o Asp 150 (Figura 18C), sugerindo que este resíduo também em *X. citri*, seria importante para manter a estrutura e cargas da PhoU para interação com PhoR.

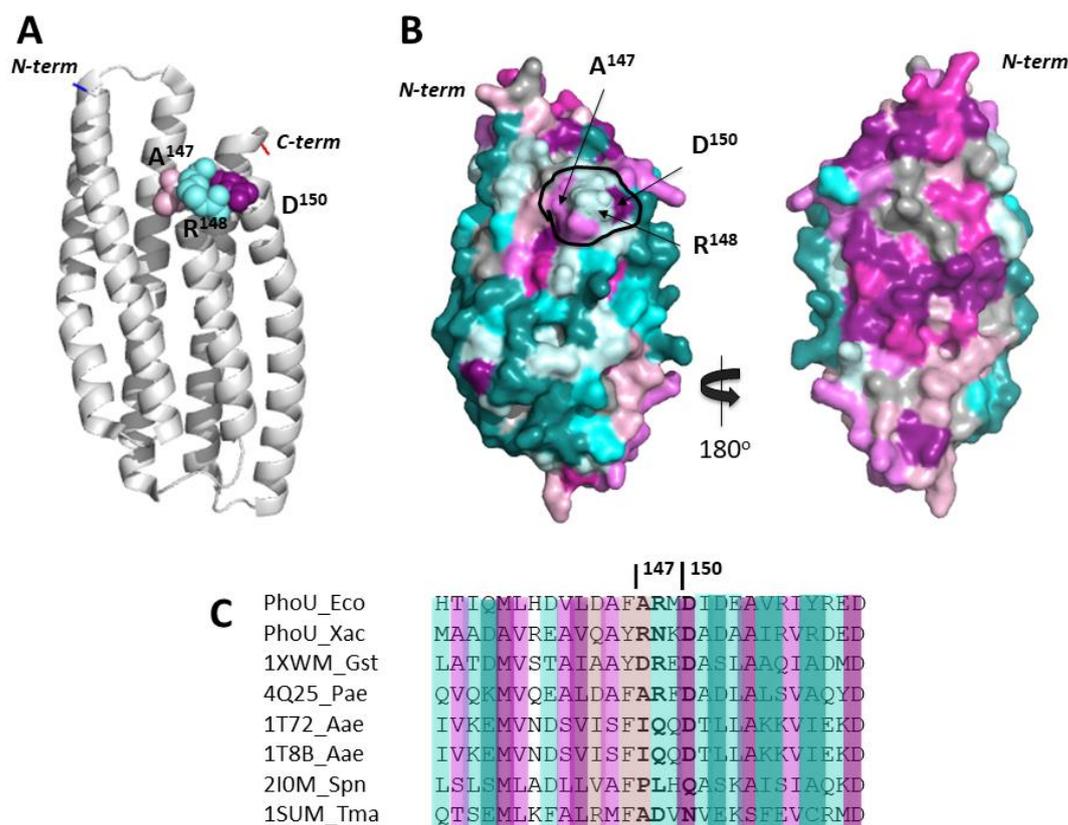


Figura 19 – Análises de conservação de ortólogos da proteína PhoU pelo programa Consurf. A. PhoU de *E. coli* representada em cartoon cinza evidenciando os três resíduos identificados por Gardner e colaboradores (2015) que supostamente interagem com PhoR. Os resíduos são apresentados em esferas e coloridos de acordo com o padrão de cores de conservação determinado pelo programa Consurf. B. Estruturas apresentadas em superfície mostrando a conservação dos resíduos. A maior conservação (coloração pink e púrpura) é evidenciada em uma das faces da proteína, oposta à da posição dos resíduos. C. alinhamento da região onde se localizam os resíduos de *E. coli* com as demais sequências de PhoU de ortólogos. Os resíduos de interação A147, R148 e D150 são numerados e grifados.

Após a análise de conservação de PhoU, prosseguimos com as análises de PhoR. 817 sequências foram comparadas e usadas nas análises do programa para determinação da conservação. Os resultados são apresentados na Figura 20.

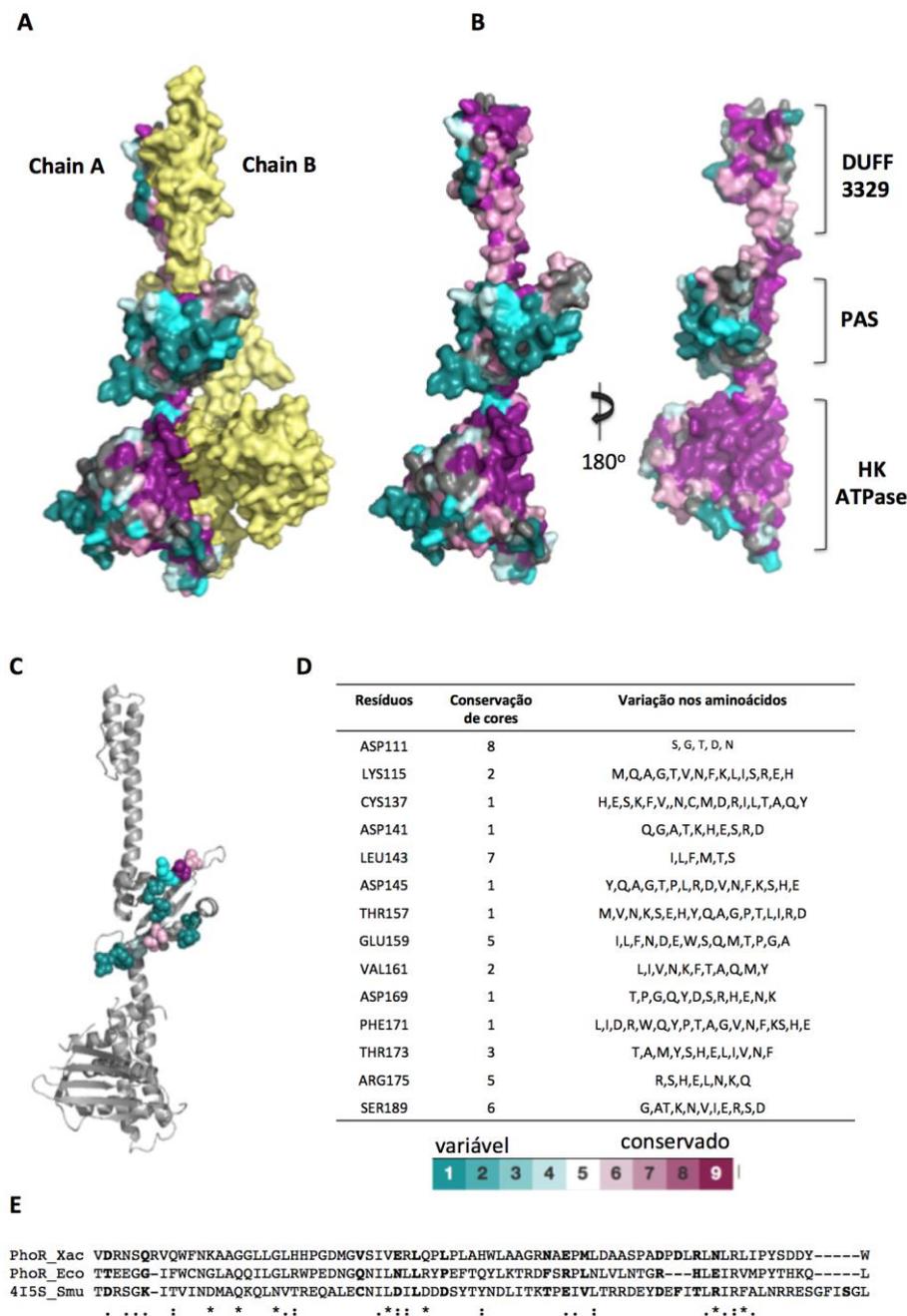


Figura 20 - Análises de conservação de ortólogos da proteína PhoR pelo programa ConSurf. A. Dímero de PhoR com a cadeia A mostrando a conservação de resíduos segundo códigos de cores do ConSurf e cadeia B (em amarelo) somente para evidenciar a localização no complexo. B. Representação da cadeia A em superfície mostrando a conservação de resíduos segundo o padrão de cores do programa ConSurf. A proteína apresenta alta conservação de resíduos (coloração púrpura) na região de interface entre as cadeias. A nomenclatura dos domínios é fornecida para uma das cadeias para que a visualização da conservação fosse facilitada. C. Cadeia A da PhoR de *S. mutans* em cartoon evidenciando apenas os resíduos do domínio PAS que, quando mutados, alteram a sinalização e interação. As cores são representadas de acordo com o programa. D. Resíduos de PhoR mutados em *E. coli* e a variação encontrada em 817 ortólogos de PhoR usados para a análise no ConSurf. E. Alinhamento das seqüências de PhoR de *X. citri*, *E. coli* e *S. mutans* evidenciando a conservação dos resíduos que mais alteraram o comportamento da proteína e interação com PhoU.

Nota-se, na proteína PhoR, que a região transmembrana e o domínio ATPase são as regiões de maior conservação entre o conjunto de ortólogos (Figura 20A e 20B). Adicionalmente, observa-se que, como evidenciado em PhoU, uma das interfaces de PhoR é altamente conservada em relação à outra face (180° de giro). Neste caso, sabemos que esta é a região de interação entre as duas cadeias, e que de fato, a conservação seria importante para a manutenção desta estrutura funcional. A conservação no domínio ATPase era esperada uma vez que proteínas que ligam ATP conhecidamente apresentam conservação. Por outro lado, fazendo uma análise da região PAS e dos resíduos putativos de interação com PhoU, notamos que a conservação é muito baixa, com destaque apenas para os resíduos de maior conservação que são Asp111, Leu143 e Ser189 (Figura 20C, coloridos em púrpura e rosa claro).

Finalmente, as análises das duas proteínas mostram que a conservação dos resíduos putativos de interação não é alta na maioria dos ortólogos, sugerindo que a interação poderia não ser mediada especificamente por um ou outro resíduo, mas por uma região inteira e suas características eletrostáticas. A análise deste perfil nas proteínas não foi efetuada porque as coordenadas estruturais do complexo PhoR e PhoU de *E. coli*, conforme obtido por Gardner e colaboradores (2015), não é disponível.

4.2.3 Expressão e purificação da proteína PhoR

Em relação à proteína PhoR, testes de expressão foram realizados para obtenção da proteína na forma solúvel, porém a proteína manteve-se insolúvel na maioria das cepas. O gene de *phoR*, (domínio PAS+HK) foi amplificado anteriormente e clonado nos vetores pET28a (PEGOS, 2015). O vetor foi inserido nas células de *E. coli* Tuner DE3, BL21 DE3, Rosetta DE3, por transformação através de eletroporação, e em *E. coli* C43, C41 e Lemo21, por transformação através de choque térmico. A indução foi realizada a 37 °C por 4 horas e a 18 °C durante 18 horas, em diferentes concentrações de IPTG, totalizando 60 condições. Apenas a cepa LEMO21 apresentou um baixo nível de expressão para *pET28a.phoR*, porém não satisfatório.

Segundo a literatura, PhoR, de fato, apresenta dificuldades em ser expressa na forma solúvel (WANG et al., 2013). Portanto, diferentes estratégias vêm sendo utilizados pelos mais diversos grupos, no sentido de expressar apenas determinados domínios, de maneira a facilitar sua solubilidade.

Alternativas foram então, utilizadas para produção da proteína como o uso de agentes solubilizantes como Triton 1-100x e glicerol, porém sem sucesso. A proteína PhoR, portanto, foi clonada em pET28a-MBP, cujo clone foi gentilmente cedido pela Dra. Vanessa Rodrigues Pegos. A cauda de MBP é capaz de proporcionar maior solubilidade à proteína, que somente foi obtida na forma solúvel quando expressa a 18 °C por 16 horas. PhoR_MBP foi expressa na cepa Tuner (DE3), com adição de 0.4 mM de IPTG, lisada e purificada em tampão 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2% Triton X-100 e 5% Glicerol em coluna His-Trap de Amilose, em etapas de lavagens (10 volumes de coluna de tampão + 20 mM Maltose) e eluída com solução de tampão + 150 mM Maltose (Figura 17). Uma vez que PhoR foi purificada de forma adequada, com rendimento médio final de 5 mg/ml, demos continuidade às análises que consistiam em realizar ensaio de *Pull Down*, para testar a interação entre as proteínas PhoU e PhoR.

4.2.4 Ensaio de *Pull Down* para verificação da interação entre as proteínas PhoU e PhoR de *X. citri*

Um dos objetivos deste trabalho consistia em verificar a interação das proteínas PhoU e PhoR por meio de ensaio de *pull down* e conseqüentemente, analisar os resultados por espectrometria de massas. Nesse sentido, delineamos um experimento onde PhoR deveria ser retida na membrana de amilose, e em seguida, PhoU seria adicionada. Ao final, após a adição de maltose, as amostras seriam aplicadas em géis nativos. Se PhoR interagisse com PhoU, deveríamos observar um padrão de migração diferente do que o apresentado para as proteínas isoladas.

Este ensaio foi realizado a partir de uma quantidade semelhante de PhoU e PhoR, oriundas da IMAC. A concentração das proteínas foi padronizada em aproximadamente 4 mg/ml. Em primeiro lugar, a proteína PhoR foi inserida na coluna. Em seguida, fizemos uma lavagem com tampão Tris 20 mM e NaCl 150

mM. Posteriormente, PhoU foi inserida na coluna, também seguida de lavagem com tampão. Por fim, eluímos as proteínas com tampão Tris 20 mM, NaCl 150 mM e 150 mM de maltose. Todas as amostras foram coletadas (Figura 21). Infelizmente, os resultados deste ensaio não foram conclusivos para evidenciar a interação entre ambas as proteínas. PhoU foi eluída durante a lavagem e a proteína PhoR foi eluída ao final, com 150 mM de Maltose (Figura 21).

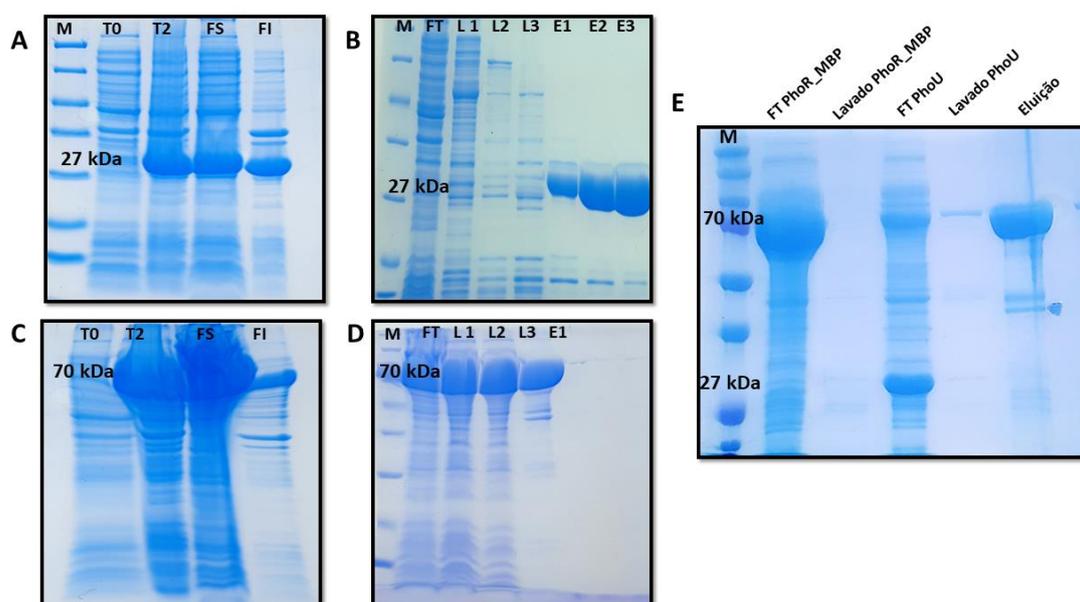


Figura 21 - Expressão e Purificação de PhoU e PhoR para ensaio de Pull Down. A. Expressão da proteína PhoU. B. Purificação de PhoU e obtenção da proteína Pura. C. Expressão da proteína PhoR. D. Purificação da proteína PhoR em afinidade de bancada utilizando coluna de Amilose para obtenção da proteína. Os resultados de expressão e purificação mostram que as proteínas foram produzidas com ótimo rendimento. Expressão em Meio LB, Indução por 0.4 mM IPTG e lise por sonicação. Purificação de bancada: M- Marcador de peso molecular; T0 – Antes da indução; TF- Amostra Final, após indução com 0.4 mM IPTG; FS- Fração solúvel; FI- Fração insolúvel. PhoU foi expressa a 37°C por 4 horas e PhoR_MBP a 18°C *overnight*. E. Resultado da análise de *Pull Down*. Os resultados demonstraram que PhoR foi retida na coluna, mas PhoU não. PhoR foi eluída sem a presença de PhoU. Gel de poliácridamida 12%.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a proteína PhoU de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* apresenta homologia com as proteínas PhoU de outros microrganismos, como *Xilela fastidiosa* e *Agrobacterium* sp., o que indica que sua presença seja importante para estes fitopatógenos. Além disso, mediante alinhamento de sequências e através da análise das estruturas já depositada no *Protein Data Bank*, foi possível observar que PhoU possui conservação estrutural entre as espécies, e, portanto, apresenta conservação de todos os motivos e resíduos funcionais, de acordo com a comparação com os seus respectivos ortólogos.

Ainda conseguimos mostrar que a proteína recombinante PhoU, apresentou enovelamento esperado e sofreu alterações conformacionais na presença de ao menos um dos seus possíveis ligantes, manganês. Estes dados corroboram as discussões da literatura, das quais relatam que a presença dos cátions ajudaria a localização da proteína próxima à membrana plasmática e, também, na interação com PhoR. Adicionalmente, ressaltamos que PhoU também pode interagir com PstB, a ATPase do sistema Pst, e que a presença destes elementos também seria um mecanismo para aumentar ou diminuir a interação entre as mesmas. Além disso, esses dados são importantes para estudos futuros, relacionando a importância de manganês aos mecanismos de fosforilação e desfosforilação proteica.

Também foi possível produzir e purificar a proteína PhoR, porém, não foi possível obter dados da interação entre ambas através de ensaios de *Pull Down*. Entretanto, os protocolos aqui gerados podem contribuir para a elucidação de aspectos importantes na sinalização do transporte de fosfato, futuramente.

Apesar de não terem sido obtidos os resultados de interação desejados, os ensaios de bioinformática, podem futuramente, facilitar a obtenção de informações do complexo inteiro de sinalização, por meio do direcionamento fornecido a partir do estudo dos resíduos específicos de interação.

Finalmente, este trabalho abriu uma série de perspectivas para o estudo sobre a regulação dos sistemas de captação e sensoriamento de fosfato em *X. citri*, o que ainda é pouco estudado. Uma vez que, desde a década de 80, quando

a proteína PhoU foi primeiramente descrita, até o atual momento, os mecanismos pelo qual a proteína interage ainda permanecem não elucidados, este trabalho representa importantes avanços na caracterização de PhoU em *X. citri*. Sua continuação será realizada por dois projetos de mestrado no grupo, e sua finalização será relevante para os sistemas aqui descritos e relatados.

REFERÊNCIAS*

- ALVAREZ-MARTIN, P. et al. A conserved two-component signal transduction system controls the response to phosphate starvation in *Bifidobacterium breve* UCC2003. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5258-5269, 2012.
- ARAWAKA, T; KITA, Y. Multi-Faceted Arginine: Mechanism of the Effects of Arginine on Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v.15, n.6, 2014.
- ASHKENAZY H. et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v.44, Volume 44, n. W1, p. W344–W350, 2016.
- BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*, **FEMS Microbiology**, v.24, p.449-467, 2000.
- BAEK, J, H., LEE, S.Y. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Lett**, v.264, p.104-109, 2006.
- CRÉPIN, S. et al. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.153, p. 82–88. 2011.
- DAS, A.K. Citrus canker – a review. **Journal of Applied Horticulture**. v.5, n.1, p.52-60, 2003.
- DAVIDSON, A.L., CHEN, J. ATP binding cassette transporters in bacteria. **Annual Review in Biochemistry**, v. 73, p 241-268, 2004.
- DAVIDSON, A.L. et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and molecular biology**. v.72, n.2, p. 317-364, 2008.
- DA SILVA, A.C.R et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.
- DROZDETSKIY, A. et al. Pred4: A Protein Secondary Structure Prediction server. **Nucleic Acids Research**. Web Server issue, v.43, p. 389-394, 2015.
- EMBL-EBI, Clustal Omega. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: Dezembro de 2015.
- GARDNER, S.G. et al. The PhoU Protein from *Escherichia coli* Interacts with PhoR, PstB, and Metals to Form a Phosphate-Signaling Complex at the Membrane. **Journal of Bacteriology**, v.196, n. 9, p. 1741–1752, 2014.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GARDNER, S.G. et al. Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in *Escherichia coli*. **BMC Genetics**, v.16, n. 2, 2015.

GIBSON, J.L. et al. Atypical Role for PhoU in Mutagenic Break Repair under Stress in *Escherichia coli*. **Plos One**, v.10, n.5, p.1-20, 2015.

HAN, J.S., et al. PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.262, p.448-452, 1999.

HARRIS, R.M., et al. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.17, p.5008-5014.

HONG, T. et al. Arginine prevents thermal aggregation of hen egg white proteins. **Food Research International**, v.97, p. 272-279, 2017.

HSIEH, Y.J., WANNER, B.L. Global regulation by the seven-component P_i signaling system. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, n.2, p.198-203, 2010.

KIM, J. G.; PARK, B. K.; YOO, C. H.; JEO, E.; OH, J.; HWANG, I. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* HRP pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 3155-3166, 2003.

KNAACK, N. *Xanthomonas* sp: Phytosanitary Threat to Brazil. **Rice Research Journal**, v.3, p.109.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy** 2nd Ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

LAMARCHE, M.G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology**, v. 32, p. 461–473, 2008.

LEE, S.J. et al. Crystal structure of PhoU from *Pseudomonas aeruginosa*, a negative regulator of the Pho regulon. **Journal of Structural Biology**, v.188, p.22-29, 2014.

LEVINTHAL, C., SIGNER, E., FETHEROLF, K. Reactivation and Hybridization of reduced alkaline phosphatase. **PNAS**, v.48, 1962.

LIU, J., et al. Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.15960–15966, 2005.

LOCHER, K. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.23, n.6., p.487-493, 2016.

LUBIN, E.A. et al. Identification of the PhoB Regulon and Role of PhoU in the Phosphate Starvation Response of *Caulobacter crescentus*, **Journal of Bacteriology**, v.198, p.187–200, 2016.

LUZ, D.E. et al. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. **Molecular Oral Microbiology**, v.27, n.3, p.172-181, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Education Inc. 2004.

MARQUES, M.V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

MAYROSE, I. et al. Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: empirical Bayesian methods are superior. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.1781-1791, 2004.

MOITRA, K.; LOU H.; DEAN M. Multidrug efflux pumps and câncer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 4, p. 491-502, 2011.

OGANESYAN, V., et al. Crystal structure of the “PhoU-like” phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.4238–4244, 2005.

PAPP-WALLACE, K.M; MAGUIRE, M.E. Manganese Transport and the Role of Manganese in Virulence. **Annual Review of Microbiology**, v.60, p.187-209, 2006.

PEGOS, V. R. et al. Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 108, p. 78-88, 2014.

PEGOS, V.R. **Caracterização estrutural e funcional do sistema de captação de fosfato da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2015. 238f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular de Microrganismos) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

PODGORNAIA, A.I. et al. Structural basis of a rationally rewired protein-protein interface critical to bacterial signaling. **National Institute of Health**, v. 21, n.9, 2013.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**. v.42, n.W1, p.W320-W324, 2014.

ROST, B., YACHDAV, G., LIU, J. The Predict Protein server. **Nucleic Acids Research**, v.32, n. Web Server issue, p. W321–W326, 2004.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS-BENEIT, F. The Pho Regulon: a huge regulatory network in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.402, p.1-13, 2015.

SHARPE, T. Circular Dichroism Unit Conversion. **Biozentrum Biophysics Facility**, p.única, 2012.

SCHRÖDINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.7

STEED, P.M.; WANNER B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the pstSCAB-phoU operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.21, p.6797-6.09, 1993.

TAM, R. SAIER, M.H. Pbp. Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **American Society for Microbiology**, v57, n.2, p.320-346, 1993.

TUNG, S. Y.; KUO, T. T. Requirement for phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus canker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5564-5570, 1999.

VANBOGELEN, R.A., et al. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.15, p. 4344-4366, 1996.

VUPPADA, R.K., et al. Phosphate signaling through alternate conformations of the PstSCAB phosphate transporter. **BMC Microbiology**, v.18, n.8, p. 1-9, 2018.

WANNER, B.L., BOLINE, J.A. Mapping and molecular cloning of the phn (psiD) locus for phosphonate utilization in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.3, p.1186-1196, 1990.

WANNER, B.L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.51, n1, p. 47-54, 1993.

WANNER, B.L. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. **Kidney International**, v.49, p.964-967, 1996.

WANNER, B. L. **Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon**. Em: Neidhardt, R.C.I., Ingraham, J.L., Lin, E.E.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbrager, H.E. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington: American Society for Microbiology, p. 1357–1381, 1996.

WANG, C. et al. Mechanistic Insights Revealed by the Crystal Structure of a Histidine Kinase with Signal Transducer and Sensor Domains. **Plos Biology**, v.11, n. 2, p.1-14, 2013.

WÄRDELL, K.; JAKOBSSON, A.; NILSSON, G. E. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. **Biomedical Engineering**, v. 40, p. 309-316, 1993.

WEBB, B., SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v.5, n.6, p.1-5, 2014.

WHITMORE L., WALLACE, B.A. Dichroweb, an online server for protein secondary structure analysis from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.668–673, 2004.

YANG, N.M. Magnesium as a natural substitute for manganese in concanavalin A and other lectins. **FEBS Letters**, v . 161 n. 2, p. 247-250, 1983.

YOSHIDA, Y. et al. Novel members of the phosphate regulon in Escherichia coli O157:H7 identified using a whole-genome shotgun approach. **Gene**, v. 512, p. 27-35, 2012.

ZHENG, J.J. et al. Physiological Roles of the Dual Phosphate Transporter Systems in Low and High Phosphate Conditions and in Capsule Maintenance of *Streptococcus pneumoniae* D39. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.6, n.63, p.1-17, 2016.