

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

DIORGE PAULO DE SOUZA

**Estudos Estruturais e de Interações Proteína-Proteína
Envolvendo Componentes de um Sistema de Secreção do
Tipo IV de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
12/02/2010

DIORGE PAULO DE SOUZA

**Estudos Estruturais e de Interações Proteína-Proteína
Envolvendo Componentes de um Sistema de Secreção do
Tipo IV de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo
2010

Diorge Paulo de Souza

Estudos Estruturais e de Interações Proteína-Proteína Envolvendo Componentes de um Sistema de Secreção do Tipo IV de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*“To our best friend, present past and beyond
Though you weren't with us too long
Life is the most precious thing we could lose
While you were here the fun was never ending
Laugh a minute was only beginning
Alex Pereira Rios, this one's for you!!!”*

Pennywise, Bro Hymm Tribute

*Dedico especialmente essa tese a Alex
Pereira Rios, o melhor amigo que alguém
poderia ter e meu irmão de coração*

(1982 - † 2000)*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, pelo grande apoio, amizade, pela sua mente aberta e pela oportunidade de me aprofundar no fantástico mundo das proteínas;

Ao Dr. Roberto Kopke Salinas, pela orientação, amizade, exemplo de tranquilidade nesse mar de loucos, por me mostrar que é essencial na vida manter o foco e relaxar para “não desenvolver um câncer”. Eu nunca vou me esquecer do que você fez por mim!!!

A toda a minha família, por ter tido paciência e suportado a distância espacial imposta nos últimos anos. À minha irmã Clarinha, “meu quiridu” irmão Diogo, meu cunhado Reinaldo “Caneca”, meus tios, primos e minha vovó Geruza. Em especial, agradeço a minha irmã Mônica, pelo exemplo de força, garra e luta, e a minha querida mãe Ângela, pelo exemplo de honestidade e caráter. Apesar de eu quase nunca dizer isso, eu amo vocês!!! Família Paulo para sempre!

Em especial, agradeço a minha namorada, companheira e melhor amiga, Nayara Cavalcante, a Nana, pela paciência, paixão, energia, dedicação e entrega, apesar de todos os obstáculos;

Aos grandes amigos que eu tive o prazer de morar nos últimos anos, Milton Yutaka, Paulo de Paiva (PCR) e Rodrigo Fandiño, pela paciência, amizade, companheirismo e excelentes momentos compartilhados... Os únicos defeitos de vocês são gostarem dos times errados e não terem o bom costume de lavar a louça!!!

Aos amigos de cerveja, churrasco, sinuca, conversas fiadas e oferendas a “Pacha Mama”: Bruno, Milton, Marcelão, PCR, Mariana, Fandiño, Vinícius “Fetão”, Yuri, Apuã, Max e em particular ao Julio Garcia (Cabron!!!), pela amizade, alegria e

empolgação de sempre tomar umas “brejinhas” e comer um frango à passarinho com a galera, regado a músicas bregas de Jukebox!

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), pela oportunidade de começar a fazer ciência, amizade e momentos divertidos compartilhados. Não pensem que eu esqueci de vocês!!! Em especial, agradeços aos Profs. Dr. Marcelo Brígido, Dra. Andréa Maranhão e a Dra. Ildinete Pereira, pelos exemplos de vida, dedicação e principalmente por me tornarem uma pessoa melhor, principalmente fora do mundo acadêmico;

Aos membros do Chuck Lab, passados e presentes, pela amizade, companheirismos e pelos momentos de descontração: Paola Cappelletti, Maxuel Andrade, Ângela Katsuyama, Cristiane Guzzo, Maycon Oliveira, Raphael Texeira, Cláudia Pereda, Pri(s)cila Hauk, Erika Rossi, Lucas Yanaguissawa (gato hambúrguer!!!), Clarissa Rocha, Rafael Bortoletto, Dr. Roberto Salinas, Amanda Franco, Giuliana Giuzio, Dr. Fernando Corrêa, Dra. Cássia Docena, Dra. Leonor de Botton, Dra. Myriam Marroquin, Alessandra Paiva, D. Cleuza, Dr. Marcos Alegria, Dr. Eric Vidisiunas, Dr. Luci Ribeiro, Pámela Zucker, Rafael Freitas e Taís Souza. Em especial, gostaria de agradecer a Ilda Costa e a Camila Schroeder, por darem alguma ordem na bagunça que é o nosso laboratório...

Aos amigos e colegas do Bloco 0, membros dos laboratórios dos Profs. Dr. Fredy Gueiros, Dra. Carla Columbano e Dr. Ronaldo Quaggio, por me tirarem do computador pra falar sobre qualquer coisa não científica;

Aos colegas e amigos de outros Blocos do IQ/USP, à galera do “Ciência com Cerveja” (CCC), do time de futebol de salão da Bioquímica, do curso de verão em Bioquímica 2006, da representação discente e ao pessoal das festas que eu entrei de penetra na praça de integração;

Ao Dr. Fábio Almeida, Dra. Ana Paula Valente, Dra. Ana Carolina Zeri, Dr. Maurício Sforça e Dra. Miriam Uemi, pelo suporte nos muitos experimentos de RMN realizados;

Ao Dr. Avram Slovic, Dra. Izaura Toma, Dra. Luci Navarro e Dra. Izaura Hirata pelo apoio técnico na realização de diversos experimentos;

Aos funcionários da secretária de pós-graduação, em especial ao Emiliano, e da secretária da Bioquímica, em particular à Simone, pelo suporte e festas compartilhadas;

A todas as bandas que eu ouvi ou pude ir a um show pra descontrair um pouquinho nos últimos anos, e principalmente por me darem forças pra continuar mais algumas horas madrugada adentro no Instituto de Química/USP. Em particular: Sick of it all, Hatebreed (I live for this!), Pennywise, Sepultura, Mudvayne, Chimaira, Pantera e Madball;

Ao Clube de Regatas Flamengo, por me trazer algumas tristezas e diversas alegrias, e por ser o maior time de futebol do planeta, porque um clube não é feito por títulos, e sim pelo amor de seus torcedores, o que nos faz sem dúvidas os maiores do mundo (apesar de também termos muitos títulos...);

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e à Fapesp pelo apoio financeiro dado ao Chuck Lab.

RESUMO

Souza, D.P. **Estudos estruturais e de interações proteína-proteína envolvendo componentes de um Sistema de Secreção do Tipo IV de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2010. 227p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) é o causador do cancro de plantas cítricas. Entre os potenciais fatores de virulência codificados por Xac, está o Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS), um grande complexo multiprotéico que atravessa o periplasma e as membranas interna e externa de bactérias Gram-negativas. O T4SS está envolvido com secreção de proteínas e/ou DNA para o meio extracelular ou diretamente no interior da célula do hospedeiro. Este Sistema requer tipicamente 12 proteínas para realizar suas funções: VirB1-VirB11 e VirD4. O T4SS codificado pelo cromossomo de Xac está aparentemente incompleto, devido a não codificar nenhuma proteína com similaridade de seqüência a VirB7. Os objetivos deste trabalho são estudar a estrutura, função e interações das proteínas do T4SS de *Xanthomonas*.

Foram clonados 23 genes que codificam proteínas ou domínios relacionados ao T4SS, e os polipeptídeos foram produzidos de forma recombinante em *E. coli*. Treze deles foram purificados e submetidos a estudos estruturais, espectroscópicos e de interações proteína-proteína. A estrutura em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foi resolvida, apresentando uma região N-terminal desenovelada de aproximadamente 30 resíduos e um domínio globular. Este polipeptídeo oligomeriza em troca química rápida na escala de tempo de RMN e o seu N-terminal desenovelado reconhece o domínio C-terminal de VirB9 (VirB9₁₅₄₋₂₅₅) em troca lenta. Análise de RMN demonstrou que VirB9₁₅₄₋₂₅₅ possui uma estrutura flexível em solução, sofrendo uma

marcante mudança conformacional na presença de Xac2622₂₄₋₁₃₉. Ambas proteínas se tornam rígidas após a interação.

Xac2622 é o equivalente a VirB7 em *Xanthomonas*, baseado na localização do seu gene no locus do T4SS, localização subcelular predita do polipeptídeo codificado e sua interação com VirB9. Porém, diferente de outras proteínas da família VirB7, Xac2622 possui um domínio globular adicional, com topologia e estrutura similares a domínios presentes apenas em proteínas associadas à membrana externa de bactérias Gram-negativas. Nocaute do gene *xac2622*, contudo, não afetou a virulência de *Xac* na infecção de plantas de laranja pêra.

O domínio enovelado de Xac2622 foi cristalizado, e os cristais obtidos difrataram até uma resolução de 1,0 Å, pertencendo ao grupo espacial C222₁. O modelo preliminar possui R_{factor} de 0,121 e R_{free} de 0,147. Foram obtidos cristais de outras 3 proteínas relacionadas ao T4SS de *Xac*, porém somente um deles difratou em alta resolução (2,0 Å, pertencendo ao grupo espacial C2).

O potencial sinal de secreção pelo T4SS de *Xanthomonas* é um domínio C-terminal conservado de aproximadamente 115 resíduos, encontrado nos substratos putativos do T4SS. Caracterizamos um destes domínios, presente na proteína Xac2609, e ele é intrinsecamente desestruturado. Essa observação pode ter implicações funcionais, visto que os substratos são desenovelados antes de sua passagem pelo canal de secreção do T4SS.

Palavras-chave: *Xanthomonas*, Sistema de Secreção do Tipo IV, Biologia Estrutural, Ressonância Magnética Nuclear, Cristalografia e Difração de Raios-X

ABSTRACT

Souza, D.P. **Structural and protein-protein interaction studies of Type IV Secretion System components from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2010. 227p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) is a gram-negative bacterial phytopathogen that infects citrus. One possible virulence determinant is a chromosomally encoded Type IV Secretion System (T4SS), a multiprotein complex that spans the bacterial periplasm and both inner and outer membranes. The T4SS is used by some bacteria to secrete proteins and/or DNA to the extracellular milieu or the host interior. The model T4SS from *Agrobacterium tumefaciens* is made up of twelve structural proteins: VirB1-VirB11 and VirD4. The *Xanthomonas* T4SS is apparently incomplete because of the lack of a polypeptide with sequence similarity to VirB7. The aim of this project is the study of structure-function relationships in the *Xanthomonas* T4SS.

Twenty-three T4SS protein-coding genes, including full-length proteins or domains, were cloned and the proteins were produced in different *E. coli* strains. Thirteen polypeptides were purified and some of them were submitted to structural, spectroscopic and protein-protein interaction studies. We used NMR to solve the solution structure of Xac2622₂₄₋₁₃₉ which consists of an unfolded N-terminal segment of ~30 residues followed by a globular domain. Xac2622₂₄₋₁₃₉ oligomerizes in fast exchange at the NMR time scale and interacts via its unfolded N-terminus with the VirB9 C-terminus (VirB9₁₅₄₋₂₅₅) in slow exchange. NMR analysis showed that VirB9₁₅₄₋₂₅₅ has a flexible structure in solution. However, this polypeptide undergoes a significant conformational modification in the presence of Xac2622₂₄₋₁₃₉ and both proteins become rigid upon interaction.

Xac2622 is the *Xanthomonas* VirB7, based on the chromosomal localization of its gene, predicted subcellular localization and protein interaction analysis. But surprisingly, unlike other VirB7 proteins, Xac2622 has an extra C-terminal folded domain whose topology and structure are strikingly similar to that of periplasmic domains found in outer membrane proteins of many bacterial Secretion Systems. Knockout of the *xac2622* gene, however, does not affect the *Xac* virulence in orange leaf infection assays.

The Xac2622 folded domain was also crystallized, and these crystals diffracted up to 1.0 Å resolution and belong to the space group C222₁. The preliminary refined model has R_{factor} of 0.121 and R_{free} of 0.147. Crystals of three other T4SS proteins have been obtained, but only one of them diffracted to high resolution (2.0 Å; space group C2).

Xac2610 is a hypothetical protein whose gene is located in the T4SS locus, and its interactions were studied with VirB9, VirB11 and Xac2609, a putative T4SS substrate.

The potential T4SS secretion signal is a conserved, approximately 115 residues, C-terminal domain found in the putative substrates of the *Xanthomonas* T4SS. This sequence mediates interactions with VirD4. We have characterized this domain from one substrate and it is mainly unfolded. This observation may have functional implications, as the substrates are unfolded before their secretion through the T4SS channel.

Keywords: *Xanthomonas*, Type IV Secretion System, Structural Biology, Nuclear Magnetic Resonance, X-ray Crystallography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	24
Figura 2.....	27
Figura 3.....	31
Figura 4.....	38
Figura 5.....	47
Figura 6.....	50
Figura 7.....	52
Figura 8.....	62
Figura 9.....	72
Figura 10.....	81
Figura 11.....	98
Figura 12.....	98
Figura 13.....	99
Figura 14.....	99
Figura 15.....	101
Figura 16.....	102
Figura 17.....	102
Figura 18.....	103
Figura 19.....	103
Figura 20.....	104
Figura 21.....	107
Figura 22.....	107
Figura 23.....	108
Figura 24.....	108
Figura 25.....	109
Figura 26.....	110
Figura 27.....	111
Figura 28.....	113
Figura 29.....	116
Figura 30.....	118
Figura 31.....	119
Figura 32.....	121
Figura 33.....	122
Figura 34.....	126
Figura 35.....	127
Figura 36.....	128
Figura 37.....	129
Figura 38.....	133
Figura 39.....	134
Figura 40.....	134
Figura 41.....	135
Figura 42.....	136
Figura 43.....	137
Figura 44.....	138
Figura 45.....	139
Figura 46.....	142
Figura 47.....	143
Figura 48.....	144

Figura 49.....	145
Figura 50.....	146
Figura 51.....	148
Figura 52.....	150
Figura 53.....	152
Figura 54.....	154
Figura 55.....	155
Figura 56.....	156
Figura 57.....	158
Figura 58.....	159
Figura 59.....	161
Figura 60.....	161
Figura 61.....	162
Figura 62.....	164
Figura 63.....	166
Figura 64.....	168
Figura 65.....	169
Figura 66.....	170
Figura 67.....	172
Figura 68.....	172
Figura 69.....	173
Figura 70.....	174
Figura 71.....	176
Figura 72.....	178
Figura 73.....	191
Figura 74.....	193
Figura 75.....	195
Figura 76.....	199

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	58
Tabela 2.....	60
Tabela 3.....	63
Tabela 4.....	68
Tabela 5.....	92
Tabela 6.....	97
Tabela 7.....	114
Tabela 8.....	120
Tabela 9.....	122
Tabela 10.....	125
Tabela 11.....	151
Tabela 12.....	153
Tabela 13.....	175
Tabela 14.....	184

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A₆₀₀ – Densidade celular a 600 nm
ADP – Adenosina difosfato
APB – Tampão de fosfatase alcalina
ATP – Adenosina trifosfato
BCIP – 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BMRB – “Biological Magnetic Resonance Data Bank”
BSA – Albumina sérica bovina
C12E5 – Pentaetilenoglicol monododecil eter
CCD – Dispositivo de carga acoplada
CD – Dicroísmo circular
CFU – unidades formadoras de colônia
CSI – “Chemical shift index”
CV – Volumes de coluna
D₂O – Água deuterada
DA – Dalton
DNA – Ácido desoxirribonucléico
ECF – “Extracytoplasmic function”
EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético
EPS – Polissacarídeo extracelular
FID – “Free induction decay”
FPLC – Cromatografia líquida de performance rápida
G – Gravidade
HADDOCK – “High ambiguity driven protein-protein docking”
HPA – “*hrp*-associated”
HRC – “*hrp* conserved”
HRP – Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade
HSQC – “Heteronuclear single quantum coherence”
IPTG – Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
KD – Constante de dissociação
KDA – Quilodalton
KB – Quilopares de bases
MALDI-ToF – Dessorção de matriz assistida por laser / Tempo-de-Vôo
MPD – 2-Metil-2,4-pentanediol
NBT – “Nitroblue tetrazolium”
NLS – Sinal de localização nuclear
NOE – “Nuclear Overhauser effect”
NOESY – “NOE spectroscopy”
ORF – Fase aberta de leitura
PB – Pares de bases
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDB – “Protein Data Bank”
PEG – Polietilenoglicol
PET – “Plasmid for expression by T7 RNA Polimerase”
PH – Potencial hidrogeniônico
PPM – Partes por milhão
PV – “Pathovar”
PVDF – Polivinilideno Fluorado
RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – Raiz quadrada da média dos quadrados
RPM – Rotações por minuto
RTBD – Receptor TonB-dependente
SDS – Sódio dodecilsulfato
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SEC – Secreção
SSDNA – Ácido desoxirribonucléico de fita simples
T1SS– Sistema de Secreção do Tipo I
T2SS– Sistema de Secreção do Tipo II
T3SS– Sistema de Secreção do Tipo III
T4PBS – Sistema de Biogênese do Pilus do Tipo IV
T4SS– Sistema de Secreção do Tipo IV
T5SS– Sistema de Secreção do Tipo V
T6SS– Sistema de Secreção do Tipo VI
TAT – “Twin-Arginine Translocation”
TFE – 2,2,2-trifluoroetanol
TOCSY – “Total correlation spectroscopy”
TM – Temperatura de hibridização
Tris-HCl – Solução de tris-(hidroximetil)-aminometano, com pH ajustado pela adição de ácido clorídrico
TSP – 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)propionato
U – Unidade
UA – Unidade assimétrica
XAC – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
XCC – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
XCV – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
XOO – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. A bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>.....	21
1.1.1. A citricultura no Brasil.....	21
1.1.2. O cancro cítrico.....	22
1.1.3. O gênero <i>Xanthomonas</i>	25
1.2. Sistemas de Secreção de proteínas em bactérias Gram-negativas.....	26
1.2.1. Sistema de Secreção do Tipo I (T1SS).....	28
1.2.2. Sistema de Secreção do Tipo II (T2SS).....	28
1.2.3. Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS).....	29
1.2.4. Sistema de Secreção do Tipo V (T5SS).....	31
1.2.5. Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS).....	32
1.3. O Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS).....	33
1.3.1. Patógenos que utilizam o T4SS para secretar proteínas efetoras.....	33
1.3.2. O T4SS de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
1.3.3. Proteínas do Sistema de Secreção do Tipo IV.....	39
1.3.4. Sinais para secreção via Sistemas de Secreção do Tipo IV.....	47
1.3.5. O canal do T4SS na membrana externa.....	49
1.3.6. O Sistema de Secreção do Tipo IV no gênero <i>Xanthomonas</i>	51
1.3.7. O T4SS codificado pelo cromossomo de <i>Xac</i>	52
2. OBJETIVOS.....	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1. Clonagem, expressão e purificação de proteínas.....	57
3.1.1. Desenho de oligonucleotídeos e amplificação por PCR de genes que codificam proteínas.....	57
3.1.2. Clonagem de genes em vetores de expressão de proteínas.....	60
3.1.3. Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	63

3.1.4. Purificação de proteínas heterólogas.....	64
3.1.5. Remoção da cauda de poli-histidina por trombina.....	67
3.2. Caracterização de proteínas.....	69
3.2.1. Experimentos de fluorescência.....	69
3.2.2. Experimentos de dicroísmo circular.....	71
3.2.3. Ensaio de proteólise limitada.....	72
3.2.4. Espectrometria de massa.....	73
3.2.5. Sequenciamento N-terminal de proteínas.....	73
3.3. Interações proteína-proteína.....	74
3.3.1. Ensaio de “Pull down”.....	74
3.3.2. Produção de anticorpos policlonais.....	75
3.3.3. “Western Blot” e “Overlay”.....	75
3.3.4. Ligação cruzada com glutaraldeído.....	77
3.3.5. Simulações de “docking” proteína-proteína.....	77
3.4. Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	78
3.4.1. Marcação isotópica de proteínas com ^{15}N e ^{13}C	78
3.4.2. Preparação de amostra e coleta de dados de RMN.....	79
3.4.3. Assinalamento de frequências de ressonância.....	80
3.4.4. Determinação estrutural em solução por RMN.....	82
3.4.5. Estudos de relaxação de ^{15}N	83
3.4.6. Coleta de acoplamentos dipolares residuais (RDCs).....	86
3.4.7. Estudo de interações proteína-proteína por RMN.....	87
3.5. Cristalografia e difração de raios-X.....	88
3.5.1. Ensaio de cristalização.....	88

3.5.2. Coleta e processamento de dados cristalográficos.....	88
3.5.3. Resolução das fases cristalográficas.....	89
3.5.4. Refinamento de dados cristalográficos.....	90
3.6. Nocaute do gene <i>xac2622</i>	91
3.6.1. Construção do plasmídeo pNPTS- Δ <i>xac2622</i>	91
3.6.2. Produção de mutantes não polares do gene <i>xac2622</i> em <i>Xac</i>	92
3.6.3. Ensaio para verificar a virulência no hospedeiro.....	93
3.6.4. Curvas de crescimento <i>in planta</i>	94
4. RESULTADOS.....	95
4.1. Expressão, purificação e caracterização de proteínas.....	95
4.1.1. Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	95
4.1.2. Purificação de proteínas heterólogas.....	99
4.1.3. Produção de anticorpos policlonais.....	110
4.1.4. Caracterização espectroscópica das proteínas recombinantes.....	111
4.1.4.1. Fluorescência intrínseca do triptofano de proteínas.....	111
4.1.4.2. Experimentos de dicroísmo circular.....	114
4.2. Estudos estruturais e funcionais das proteínas <i>Xac2622</i> e <i>VirB9</i>	117
4.2.1. Assinalamento das ressonâncias de <i>Xac2622</i> ₂₄₋₁₃₉	117
4.2.2. Determinação da estrutura em solução de <i>Xac2622</i> ₂₄₋₁₃₉	123
4.2.3. A oligomerização de <i>Xac2622</i>	130
4.2.4. Estudos da interação <i>Xac2622</i> - <i>VirB9</i>	138
4.2.5. Medidas de relaxação de <i>Xac2622</i> ₂₄₋₁₃₉	146
4.2.6. Estrutura cristalográfica de <i>Xac2622</i> ₅₁₋₁₃₄	148
4.2.7. Nocaute do gene <i>xac2622</i> e experimentos <i>in planta</i>	155
4.2.8. Estudo de RMN de <i>VirB9</i> ₁₅₄₋₂₅₅	157
4.2.9. Cristalização de <i>VirB9</i> ₁₅₄₋₂₅₅	159

4.3. Caracterização e interações das proteínas Xac2609, Xac2610 e VirD4.....	160
4.3.1. Análise da interação entre as proteínas Xac2609-Xac2610.....	160
4.3.2. Interações de Xac2609 e Xac2610 com outros componentes do T4SS.....	165
4.3.3. O domínio Xac2609 ₃₁₁₋₄₃₁ é majoritariamente desenovelado e enovela com variações das condições do meio.....	167
4.3.4. Estudos cristalográficos de Xac2610.....	170
4.3.5. Cristalização de VirD4 _{His-83-557}	175
5. DISCUSSÃO.....	177
5.1. Xac2622 corresponde a VirB7 do T4SS de <i>Xanthomonas</i>	177
5.2. A oligomerização de Xac2622.....	179
5.3. A interação Xac2622-VirB9.....	181
5.4. Similaridade estrutural do domínio enovelado de Xac2622.....	183
5.5. Caracterização das proteínas hipotéticas Xac2609 e Xac2610.....	193
5.6. O domínio C-terminal de Xac2609, responsável pela interação à VirD4, é intrinsecamente desenovelado.....	196
5.7. Especulações sobre a função do T4SS codificado pelo cromossomo de <i>Xac</i>	200
6. REFERÊNCIAS.....	202
SÚMULA CURRICULAR.....	223

1. INTRODUÇÃO

1.1. A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

1.1.1. A citricultura no Brasil

A citricultura é de fundamental importância na atividade agrícola brasileira, e o Brasil é o principal produtor e o maior exportador de suco de laranja. O Sistema Agroindustrial Citrícola representa 1,87% da pauta total de exportações brasileiras, e 4,47% das exportações brasileiras de produtos do agronegócio. O estado de São Paulo concentra 79% da produção brasileira de laranja, em mais da metade de seus municípios, sendo responsável por 95% das exportações de suco de laranja (Neves *et al.*, 2004). São Paulo possui aproximadamente 212 milhões de pés de laranja plantados em 659 mil hectares, produzindo 13,4 milhões de toneladas de frutas e com exportações anuais de aproximadamente US\$ 2 bilhões, representando 63% da produção de suco de laranja concentrado do mundo e empregando 400 mil pessoas no estado (Bove e Ayres, 2007).

O cultivo de plantas cítricas no Brasil e no mundo é alvo de inúmeras pragas que causam queda da produtividade e da qualidade dos frutos. Várias doenças têm grande importância para esse setor, como as causadas pelos vírus CiLV (leprose dos citros (Locali-Fabris *et al.*, 2006; Pascon *et al.*, 2006)) e CTV (tristeza dos citros (Moreno *et al.*, 2008)), ou pelas bactérias *Xylella fastidiosa* (clorose variegada dos citros (Chatterjee *et al.*, 2008; Redak *et al.*, 2004)), '*Candidatus Liberibacter* spp.' (greening ou huanglongbing (Bove e Ayres, 2007)) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (cancro cítrico (Brunings e Gabriel, 2003)).

1.1.2. O cancro cítrico

O cancro cítrico é uma das pragas mais importantes que afetam citros. Mundialmente, milhões de dólares são gastos anualmente em prevenção, quarentenas, programas de erradicação e controle dessa doença. Uma vez identificados os sintomas, não só as árvores contaminadas, bem como todas as árvores em um raio de 30 m, precisam ser destruídas. Contudo, a consequência mais séria do cancro cítrico é o impacto no comércio, resultando em restrições de transporte interestadual e internacional de frutas originárias de áreas infectadas (Das, 2003).

O agente causal do cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), afeta todos os cultivares de cítricos comerciais. Entretanto, algumas plantas são mais suscetíveis que outras. Como exemplos, lima ácida é altamente suscetível, limão e laranja doce são moderadamente suscetíveis, enquanto tangerina é moderadamente resistente (Das, 2003).

Xac é altamente contagiosa e pode persistir por meses em restos vegetais, não necessitando de um vetor de transmissão específico, sendo facilmente transferida entre cultivares através do vento, da chuva ou do próprio homem. A bactéria presumivelmente persiste como epífita na superfície da planta, até que ocorre a penetração dos tecidos vegetais por meio de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, ou por lesões causadas por ventos fortes e insetos (Belasque e De Jesus, 2006; Buttner e Bonas, 2009).

Uma vez no espaço mesofílico do hospedeiro, *Xac* prolifera nos espaços intercelulares, secretando fatores de virulência e polissacarídeos extracelulares (EPS), principalmente goma xantana. Nas folhas, os sinais iniciais ocorrem com a

formação de pequenas pústulas circulares e oleosas, com até 1 cm de diâmetro, na superfície abaxial das folhas, e posteriormente, na face adaxial. Com o tempo, a lesão aumenta de tamanho e forma pústulas na forma de erupções com relevo áspero e de coloração marrom no seu interior e um halo circundante amarelo (Figura 1A) (Amaral, 2004).

O cancro em si, que é a principal manifestação da doença, é causado pela excessiva divisão (hiperplasia) e aumento do tamanho celular (hipertrofia) do mesófilo foliar onde houve a infecção, provocando o rompimento da epiderme (por necrose) e erupção das bactérias no meio da lesão, disponíveis agora para infectar novas plantas (Amaral, 2004). Além dos fenômenos citados acima, a diminuição dos espaços intercelulares e o acúmulo de goma xantana resultam em um aspecto de encharcamento (“water-soaking”) no tecido infectado: a água do xilema é aprisionada devido ao potencial higroscópico da goma (Brunings e Gabriel, 2003).

Nos frutos e ramos, o cancro cítrico provoca lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada e aspecto eruptivo (Figuras 1B e 1C), sintomas semelhantes aos que se observam nas folhas. Infecções severas podem induzir desfolha, queda de frutos e morte de ramos. Essa doença causa perdas no valor comercial dos frutos, variando da queda prematura a perda completa da qualidade devido às lesões, que fazem com que o fruto não seja aceitável para venda (Belasque *et al.*, 2005; Belasque e De Jesus, 2006). Avanços nos conhecimentos genéticos e moleculares do gênero *Xanthomonas* e, em particular, de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, serão de grande utilidade para se gerarem novas estratégias de combate ao cancro cítrico.

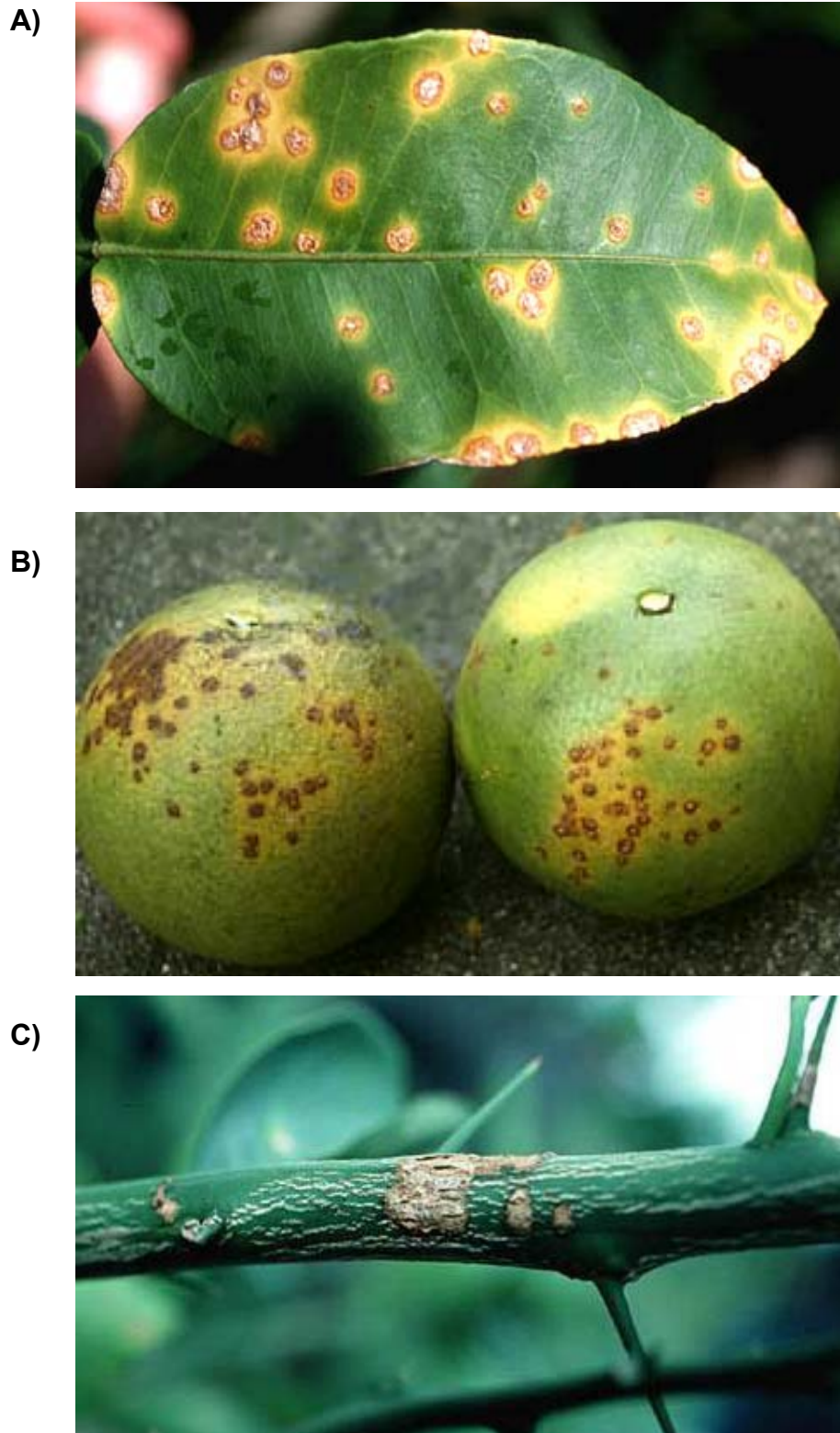


Figura 1. Lesões provocadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em (A) folhas, (B) frutos e (C) ramos de diferentes plantas cítricas. Fotos obtidas no endereço eletrônico: www.apsnet.org/education/Lessonsplantpath/CitrusCanker/.

1.1.3. O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo de bactérias Gram-negativas fitopatogênicas, pertencendo a subdivisão γ das Proteobacteria. *Xanthomonas* spp. possuem tipicamente forma bacilar e um único flagelo polar, são aeróbios obrigatórios e crescem em uma temperatura ótima de 25-30 °C. Suas colônias são usualmente amareladas devido a presença de um pigmento ligado a membrana denominado de xantomonadina, o qual presumivelmente protege a bactéria de danos causados por luz (Buttner e Bonas, 2009).

Diferente de outras bactérias associadas a plantas como *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Erwinia*, membros do gênero *Xanthomonas* são sempre associados a plantas (apesar de nem sempre serem patogênicas), e nenhum membro é de vida livre ou associado ao solo. Cada linhagem é limitada a uma faixa muito restrita de hospedeiros, frequentemente um conjunto de gêneros dentro de uma família vegetal ou um grupo de espécies em um gênero (Brunings e Gabriel, 2003). Membros do gênero *Xanthomonas* infectam mais de 120 plantas monocotiledôneas e 260 dicotiledôneas, possuindo grande importância econômica em regiões com clima quente e úmido (Chan e Goodwin, 1999).

O genoma de *Xac* linhagem 306 foi o primeiro do gênero a ser seqüenciado (Da Silva *et al.*, 2002), juntamente com o genoma de outra espécie de *Xanthomonas* (*X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) ATCC 33913, agente causal da podridão negra em crucíferas, como repolho, couve e brócolis). *Xac* possui um cromossomo circular de aproximadamente 5,2 milhões de pares de bases (pb) e dois plasmídeos: pXAC33 (aproximadamente 34 quilopares de bases (kb)) e pXAC64

(aproximadamente 65 kb), apresentando mais de 4300 ORFs (“Open Reading Frames”, ou Fases Abertas de Leitura) (Da Silva *et al.*, 2002).

Posteriormente, para uma melhor compreensão desse grupo de fitopatógenos, foram sequenciados os genomas de outras espécies e linhagens, como *Xcc* 8004 (Qian *et al.*, 2005) e B100 (Vorholter *et al.*, 2008), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) 85-10 (Thieme *et al.*, 2005), que infecta tomate e pimenta, além do genoma de três cepas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), que causa doença em arroz (KACC10331 (Lee *et al.*, 2005); MAFF311018 (Ochiai *et al.*, 2005); PXO99A (Salzberg *et al.*, 2008).

As sequências dos genomas de *Xanthomonas* possibilitaram uma maior compreensão dos mecanismos de patogenicidade molecular que estas bactérias utilizam para infectar seus hospedeiros. Para se estabelecer com sucesso, *Xanthomonas* deve ser capaz de aderir na superfície da planta, invadir o espaço intercelular do tecido vegetal, adquirir nutrientes e suprimir respostas de defesa do hospedeiro (Buttner e Bonas, 2009). Infecções bem sucedidas em plantas dependem de Sistemas que secretam proteínas no meio extracelular ou translocam fatores de virulência diretamente no citossol da célula vegetal.

1.2. Sistemas de Secreção de proteínas em bactérias Gram-negativas

Secreção de macromoléculas desempenha um papel central na modulação das interações entre bactérias e o ambiente que as circunda. Para bactérias Gram-negativas secretarem proteínas para o meio extracelular, esses compostos necessitam atravessar a membrana interna, o periplasma e a membrana externa. Diferentes estratégias surgiram ao longo da evolução desses organismos para

cumprir essa tarefa, e estas soluções são classificadas em 6 grandes grupos (Sistemas de Secreção do Tipo I – VI) (Economou *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2009), baseadas no número e localização dos componentes, similaridade de sequência e relação filogenética com outros complexos macromoleculares (Figura 2). É possível que novos Sistemas de Secreção sejam identificados, pelo sequenciamento de novos genomas bacterianos e estudos de estrutura-função de proteínas de papel desconhecido. O Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS) será discutido com mais detalhes em um tópico a parte (1.3).

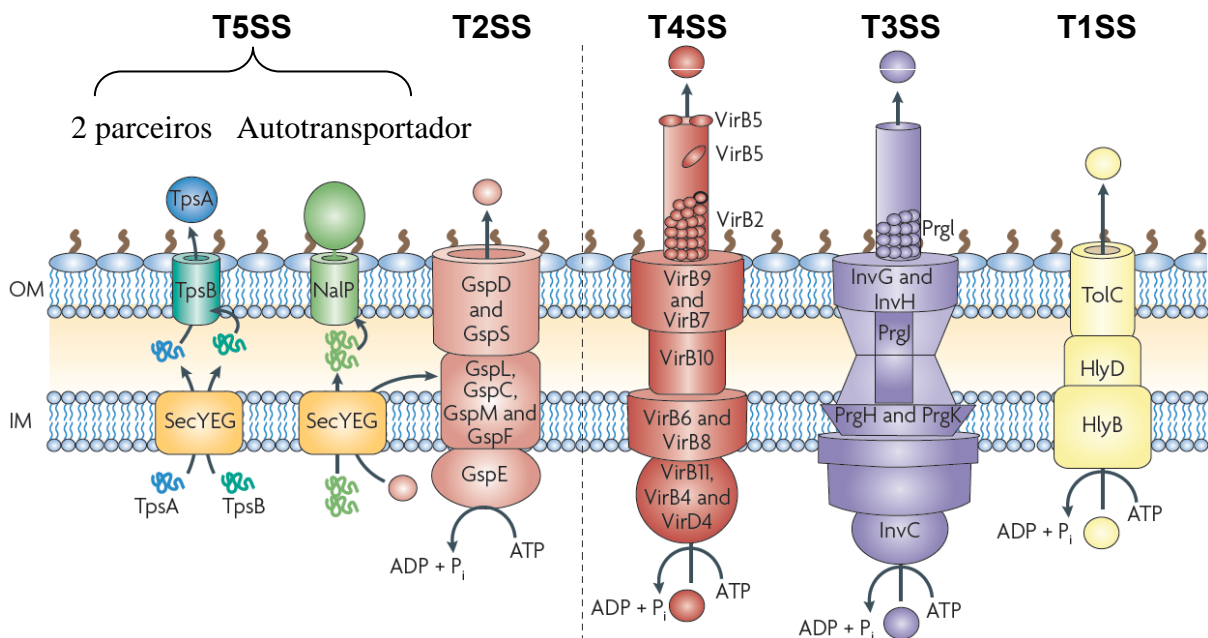


Figura 2. Representação esquemática dos principais Sistemas de Secreção de bactérias Gram-negativas. Exemplos mostrados: T1SS (Sistema de Secreção de hemolisinas de *E. coli*); T2SS (Sistema Gsp, amplamente distribuído em Gram-negativas); T3SS (Sistema de Secreção de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium); T4SS (Sistema VirB/D de *Agrobacterium tumefaciens*) e T5SS (Sistemas Autotransportador NalP de *Neisseria meningitidis* e de 2 parceiros TpsA/TpsB, amplamente distribuído em Gram-negativas). O T6SS não está representado na figura, por não se saberem muitos detalhes sobre função e localização de seus componentes. IM: membrana interna; OM: membrana externa. Os T2SS e T5SS são dependentes do Sistema Sec (SecYEG). Adaptado de (Fronzes *et al.*, 2009a).

1.2.1. Sistema de Secreção do Tipo I (T1SS)

O T1SS é composto por apenas 3 proteínas, um transportador ABC (“ATP-Binding Cassette”) localizado na membrana interna, uma proteína adaptadora periplasmática (MFP – “Membrane Fusion Protein”) que conecta a membrana interna à membrana externa e uma proteína que forma um canal na membrana externa (OMF – “Outer Membrane Factor”) (Holland *et al.*, 2005). A secreção ocorre em um passo único, do citoplasma diretamente para o meio externo, sem intermediários periplasmáticos, pelo reconhecimento de um sinal C-terminal não processado nos substratos (Holland *et al.*, 2005).

O T1SS está envolvido com a secreção de citotoxinas, proteínas de superfície, adesinas, proteases, lipases, bacteriocinas e proteínas de aquisição de heme em patógenos de animais e plantas (Delepelaire, 2004). Recentemente, foi demonstrado que um peptídeo sulfatado, conservado no gênero *Xanthomonas* e secretado pelo T1SS, é importante para a interação planta-patógeno, sendo reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro (Lee *et al.*, 2009).

1.2.2. Sistema de Secreção do Tipo II (T2SS)

Grande complexo composto por 12-16 polipeptídeos diferentes, o T2SS é relacionado evolutivamente com a maquinaria de montagem do *pilus* do Tipo IV (Peabody *et al.*, 2003). Apesar da distribuição dos seus componentes no citoplasma, periplasma e ambas as membranas de bactérias Gram-negativas, o transporte dos substratos do citossol para o periplasma ocorre via Sistema Sec (Gold *et al.*, 2007) ou Sistema Tat (Bruser, 2007).

Diversos patógenos de animais e de plantas secretam proteínas via T2SS, sendo que estes substratos são transportados enovelados através da membrana externa (Johnson *et al.*, 2006). Determinantes de virulências secretados por T2SSs incluem as toxinas envolvidas com ADP-ribosilação de *Escherichia coli* enterotoxigênica (toxina termolábil) e *Vibrio cholerae* (toxina da cólera), além de pectato liases, celulasas e proteases em *Xanthomonas campestris* (Cianciotto, 2005).

1.2.3. Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS)

O Sistema III é requerido para virulência em diversas bactérias Gram-negativas que infectam animais, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. e *E. coli* enterohemorrágica e enteropatogênica, ou que infectam plantas, como *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas* spp. (Cornelis, 2006; Lindeberg e Collmer, 2009). O T3SS é capaz de injetar, em um passo único, substratos do citoplasma bacteriano diretamente dentro da célula do hospedeiro, onde estas proteínas podem modular uma grande variedade de funções celulares eucarióticas, interferindo com processos celulares e suprimindo respostas de defesa do hospedeiro. Porém, existem casos em que os efetores são simplesmente secretadas para o meio extracelular (Grant *et al.*, 2006).

Em patógenos de plantas, o T3SS é codificado pelos genes *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”, ou resposta de hipersensibilidade e patogenicidade), determinantes essenciais da patogenicidade bacteriana, requeridos para causar doença em plantas suscetíveis e para elicitar resposta de hipersensibilidade em plantas resistentes (Buttner e He, 2009). Os genes *hrp* estão

normalmente arranjados em seqüência em regiões específicas de cromossomos ou plasmídeos, as chamadas ilhas de patogenicidade, e estas regiões apresentam diferentes características em relação ao restante do genoma, como diferente conteúdo de G + C, indicando transferência horizontal (Gurlebeck *et al.*, 2006). Os genes *hrp* codificam mais de 20 proteínas, que estão envolvidas na formação de um aparato de secreção atravessando a membrana, o qual é associado com uma estrutura filamentosa extracelular semelhante a uma agulha, capaz de secretar as proteínas efetoras (Moraes *et al.*, 2008).

Pelo menos nove genes *hrp* são conservados (chamados *hrc* para “*hrp* conserved”), tanto em patógenos de plantas como de animais, e a maioria dos genes *hrc* também possui parálogos nos componentes de montagem flagelar. A similaridade de seqüência existente entre os componentes do T3SS e da maquinaria de montagem do flagelo em procariotos indica que ambos possuem uma origem evolutiva comum (Gurlebeck *et al.*, 2006; Journet *et al.*, 2005). Proteínas Hrc presumivelmente constituem os componentes centrais do aparato de secreção III na membrana interna e externa.

A região *hrp* também contém os genes associados a *hrp* (*hpa*; Figura 3), o qual não são essenciais para elicitar a resposta de hipersensibilidade ou para patogenicidade bacteriana, mas contribuem para a interação com o hospedeiro. Em contraste aos genes *hrc*, o papel preciso dos genes *hrp* não conservados permanece por ser investigado (Gurlebeck *et al.*, 2006).

Patogenicidade de *Xanthomonas* depende de um T3SS conservado, capaz de injetar mais de 25 proteínas efetoras diferentes na célula da planta. O papel da maioria dos efetores é desconhecido, porém alguns deles possuem funções e atividades enzimáticas caracterizadas (Kay e Bonas, 2009; White *et al.*, 2009). Como

um exemplo, a família de proteínas AvrBs3/PthA é central para a patogenicidade no gênero *Xanthomonas*, mimetizando ativadores transcricionais na planta e sendo capaz de manipular o transcriptoma do hospedeiro (Kay *et al.*, 2007; Romer *et al.*, 2007).

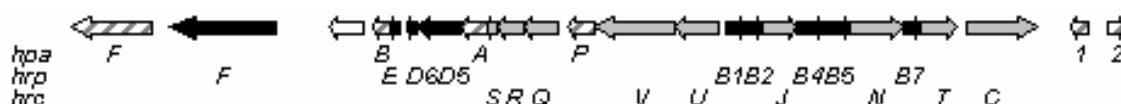


Figura 3. O locus *hrp* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Alegria *et al.*, 2004). Genes *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”), preto; genes *hrc* (“*hrp* conserved”), cinza; genes *hpa* (“*hrp*-associated”), listrado e genes codificando proteínas hipotéticas, branco.

1.2.4. Sistema de Secreção do Tipo V (T5SS)

Assim como o T2SS, o T5SS depende do Sistema Sec para transporte dos substratos do citoplasma para o periplasma. Talvez o mecanismo de secreção mais simples, por ser codificado por apenas 1 ou 2 polipeptídeos, o Sistema V é classificado em 2 grupos distintos, os designados de auto-transportadores (Dautin e Bernstein, 2007) e os de 2 parceiros (“two-partner secretion system”) (Mazar e Cotter, 2007). Estes se diferenciam pelo fato da proteína secretada e o potencial barril- β transportador de membrana externa serem codificados no mesmo polipeptídeo ou em cadeias diferentes, respectivamente. Recentemente, estudos estruturais sugerem que o barril- β é incapaz de transportar sozinho seus substratos, necessitando de uma proteína auxiliar para facilitar a translocação pela membrana externa (Bernstein, 2007).

O T5SS é distribuído de forma ubíqua em genomas de bactérias Gram-negativas, contribuindo para a virulência de diversos patógenos de animais e

plantas, sendo que centenas de substratos são conhecidos, incluindo adesinas, proteases, lipases e citolisinas (Henderson *et al.*, 2004). Uma proteína semelhante a hemaglutinina, envolvida em virulência de *Xac*, é aparentemente secretada via T5SS da classe de 2 parceiros (Gottig *et al.*, 2009).

1.2.5. Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS)

Denominado apenas recentemente (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006), o T6SS está presente em dezenas de bactérias patogênicas Gram-negativas, tais como *V. cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium* e *E. coli* enteroagregativa (Shrivastava e Mande, 2008). Composto por 15-25 subunidades (Pukatzki *et al.*, 2009), é evolutivamente relacionado ao aparato de injeção de DNA e proteínas semelhante a agulha de bacteriófagos de cauda longa (“long-tailed-phages spike-like injectisome”), como T4, T2, Mu e λ (Leiman *et al.*, 2009; Pell *et al.*, 2009).

Como os T3SS e T4SS, o Sistema VI é capaz de injetar diretamente efetores protéicos dentro da célula do hospedeiro eucariótico (Cascales, 2008). O T6SS aparentemente está presente no genoma de *Xanthomonas* spp. patogênicas e ausente em cepas não patogênicas (Shrivastava e Mande, 2008), e, portanto, deve estar envolvido com virulência. Porém, sua função ainda não foi caracterizada (Buttner e Bonas, 2009).

1.3. O Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS)

Sistemas de Secreção ancestralmente relacionados à maquinaria de conjugação bacteriana são referidos como Sistemas de Secreção do Tipo IV (Juhás *et al.*, 2008). Conjugação bacteriana é realizada por um subconjunto de T4SSs, que envolve a transferência de DNA, tipicamente plasmidial, de uma bactéria para outra, importante para a disseminação de resistência à antibióticos entre estes microorganismos (Schroder e Lanka, 2005). Além de mediar a transferência de DNA entre bactérias, T4SSs estão envolvidos com a secreção de substratos protéicos e complexos proteína-DNA diretamente nas células-alvo eucarióticas durante a infecção (Baron, 2005). Também foram descritos T4SSs atuando para facilitar transformação bacteriana, seja por secretar DNA diretamente no meio extracelular (Hamilton *et al.*, 2005) ou por captar DNA do ambiente (Hofreuter *et al.*, 2001).

1.3.1. Patógenos que utilizam o T4SS para secretar proteínas efetoras

Componentes do tipo IV são usados por diversos patógenos de plantas, animais e humanos para auxiliar na colonização do hospedeiro, e muitos outros T4SSs serão identificados como importantes para virulência nos próximos anos. A seguir, uma breve descrição de algumas bactérias Gram-negativas cujos T4SSs foram mais bem caracterizados. O Sistema do Tipo IV mais estudado é o Sistema VirB/D de *Agrobacterium tumefaciens*, que será descrito a parte (tópico 1.3.2).

Bordetella pertussis: causador da coqueluche, *B. pertussis* utiliza um T4SS denominado Ptl para a secreção da toxina pertussis, constituída por uma subunidade A efetora e 5 cadeias B acessórias. O Sistema Ptl é uma exceção entre

os T4SSs, pois um único substrato, a toxina pertussis, é transportado do citoplasma para o periplasma via Sistema Sec, e a maquinaria do tipo IV é requerida apenas para secreção do efetor do periplasma para o meio extracelular, não o introduzindo diretamente na célula do hospedeiro (Backert e Meyer, 2006). No ambiente extracelular, as cadeias B interagem com a superfície da célula eucariótica, facilitando a introdução da cadeia A no citoplasma. Esta cadeia ADP-ribosila uma subunidade da proteína G, causando desregulação da via de Adenilato Ciclase / AMPc (Shrivastava e Miller, 2009).

Helicobacter pylori: agente etiológico de gastrite crônica, úlcera duodenal e carcinoma gástrico em humanos. Linhagens virulentas de *H. pylori* codificam um T4SS codificado pela ilha de patogenicidade cag (cagPAI) (Backert e Selbach, 2008). Este T4SS possui equivalentes para todos os componentes do aparato de secreção VirB/D de *A. tumefaciens*, com exceção de VirB5 (Kutter *et al.*, 2008). Porém, é provável que a proteína CagL de *H. pylori* seja um equivalente a VirB5, apesar da baixa similaridade de sequência (Backert *et al.*, 2008). CagA é a única proteína efetora conhecida secretada por esse T4SS, interferindo com rearranjos globais do citoesqueleto de actina e ativando múltiplos fatores de sinalização, que regulam crescimento, motilidade e polaridade celular, cuja consequência final é o desenvolvimento de câncer de estômago (Hatakeyama e Higashi, 2005).

Legionella pneumophila: parasita intracelular facultativo, encontrado primariamente associado com protozoários e amebas ambientais, é também o agente causal de uma pneumonia denominada doença do Legionário (Shin e Roy, 2008). *L. pneumophila* é fagocitada por macrófagos alveolares, mas não sofre lise subsequente devido à inibição da fusão fagossomo-lisossomo, criando um vacúolo especializado no qual a bactéria replica robustamente (Franco *et al.*, 2009). Um

T4SS denominado Dot/Icm é absolutamente requerido para sobrevivência de *L. pneumophila* no hospedeiro eucariótico, secretando mais de 140 efetores identificados. Alguns substratos foram demonstrados manipular atividades celulares do hospedeiro, e se acredita que a grande maioria das proteínas translocadas tenham algum papel funcional durante a infecção (Burstein *et al.*, 2009).

Bartonella henselae: patógeno zoonótico que infecta gatos e pode ser transmitido para humanos, resultando na doença do “arranhão de gato” (“cat scratch disease”). *Bartonella* pode infectar eritrócitos e causar uma bacteremia persistente, mas também infecta células endoteliais e da medula óssea (Pulliainen e Dehio, 2009). Esta bactéria codifica dois T4SSs, designados VirB/D e Trw, requeridos para *Bartonella* colonizar, invadir e persistir em células endoteliais vasculares e eritrócitos, respectivamente (Schroder e Dehio, 2005). Sete substratos translocados pelo Sistema VirB/D foram identificados, BepA-BepG, importantes para invasão celular, ativação pro-inflamatória e inibição da apoptose (Dehio, 2008).

Brucella spp.: bactérias do gênero *Brucella*, como *B. suis*, *B. abortus* e *B. melitensis*, são patógenos intracelulares capazes de sobreviver e replicar em macrófagos de células de mamíferos, causando uma doença conhecida como brucelose (Celli, 2006). O Sistema de Secreção do Tipo IV VirB de *Brucella* é crucial durante infecção de macrófagos, sendo requerido para a internalização por estas células e fusão das vesículas contendo o microorganismo com o Reticulo Endoplasmático, para estabelecimento de seu nicho replicativo (Rambow-Larsen *et al.*, 2009). Baseado nestes resultados, os efetores do T4SS provavelmente são requeridos para tráfico dentro da célula, interação com o Reticulo Endoplasmático e sobrevivência no hospedeiro. Dois efetores putativos do Tipo IV, VceA e VceC, foram recentemente identificados (De Jong *et al.*, 2008). Estas proteínas são

secretadas de uma maneira Sec-independente e VirB-dependente no citossol de macrófagos infectados.

1.3.2. O T4SS de *Agrobacterium tumefaciens*

O T4SS mais estudado é o utilizado pelo patógeno de plantas *A. tumefaciens* para a transferência de DNA e proteínas para o hospedeiro, induzindo o crescimento de tumores em tecidos infectados e causando uma doença denominada de galhada-coroa. Uma porção do plasmídeo Ti, o T-DNA, é transferido para a célula da planta, integrado no DNA nuclear e expresso. Isto causa a produção de enzimas que catalizam síntese de hormônios vegetais, responsáveis pelo crescimento do tumor, e formação de um conjugado açúcar-aminoácido, denominado opina. A síntese deste conjugado pelas células transformadas serve como fonte de carbono e nitrogênio para *A. tumefaciens*, mas não para outras bactérias presentes no local, que não possuem a via metabólica de utilização de opinas (McCullen e Binns, 2006).

Após ativação por sinais secretados pelo hospedeiro ou pelo contato com acetosiringona, uma molécula fenólica que é um potente indutor de *Agrobacterium* (Stachel *et al.*, 1986), ocorre expressão de genes envolvidos com virulência (*vir*) localizados no plasmídeo Ti, levando a excisão de uma cópia fita simples do T-DNA (Fita-T) por um heterodímero VirD1-VirD2. Fita-T, covalentemente ligada à proteína VirD2, é então exportada para a célula hospedeira pelo T4SS codificado pelo operon *virB* e pelo gene *virD4* (Christie, 2004). Independentemente do complexo VirD2-Fita-T, várias proteínas Vir, como VirE2, VirE3, VirF e VirD5, são também exportadas para o citoplasma da célula eucariótica pelo T4SS (Juhas *et al.*, 2008). Uma vez dentro do hospedeiro, VirD2-Fita-T interagem com múltiplas cópias da proteína

VirE2, o que permite importação deste complexo para o núcleo da célula hospedeira. Isso ocorre com o auxílio de vários fatores eucarióticos e bacterianos, e finalmente o T-DNA é integrado no genoma da planta por um mecanismo desconhecido (Gelvin, 2000; Tzfira e Citovsky, 2002; Tzfira *et al.*, 2004).

A capacidade para transferência de DNA levou ao desenvolvimento de *A. tumefaciens* como um vetor de genes. A transferência do T-DNA não é sequência específica, o que permitiu seu uso biotecnológico por substituição dos genes originais do T-DNA por qualquer gene de interesse. Virtualmente qualquer DNA clonado no T-DNA pode ser transferido para células vegetais, gerando plantas férteis que transferem o DNA modificado para sua progênie (McCullen e Binns, 2006). O número de hospedeiros naturais de *Agrobacterium* no reino vegetal é extenso e inclui membros da maioria das famílias de plantas. Recentemente, foi mostrado que *Agrobacterium* é capaz, em condições laboratoriais, de modificar geneticamente organismos eucarióticos não vegetais, como leveduras, fungos filamentosos, cogumelos e células humanas em cultura (Lacroix *et al.*, 2006). Essa capacidade permitirá utilizar *Agrobacterium* em pesquisa biológica e melhoramento biotecnológico de espécies fora do reino vegetal.

O aparato transmembrana envolvido com seleção e secreção de substratos em *A. tumefaciens* é constituído por 12 proteínas, denominadas VirB1-VirB11 e VirD4 (Figura 4). Neste organismo, todas as proteínas VirB/D são absolutamente requeridas para o funcionamento do T4SS, com exceção de VirB1 (Schroder e Lanka, 2005). Ocorre extensivo reconhecimento envolvendo os componentes, interações importantes para a montagem e função do Sistema IV, e muito se tem avançado recentemente para a determinação destas interações e de onde e quando ocorrem (Fronzes *et al.*, 2009a; Ward *et al.*, 2002). O T4SS atravessa o periplasma e

as membranas interna e externa do microorganismo, e conecta os efetores produzidos no citoplasma bacteriano diretamente ao citossol da célula alvo por meio de um *pilus* extracelular. Apesar dos T4SSs variarem extensivamente na sua composição e número de subunidades, a maioria das maquinarias do Tipo IV é composta de um subconjunto ou de todos os componentes do Sistema VirB/D de *A. tumefaciens* (Alvarez-Martinez e Christie, 2009). As proteínas VirB1-VirB11 e VirD4 serão discutidas com mais detalhes a seguir (tópico 1.3.3).

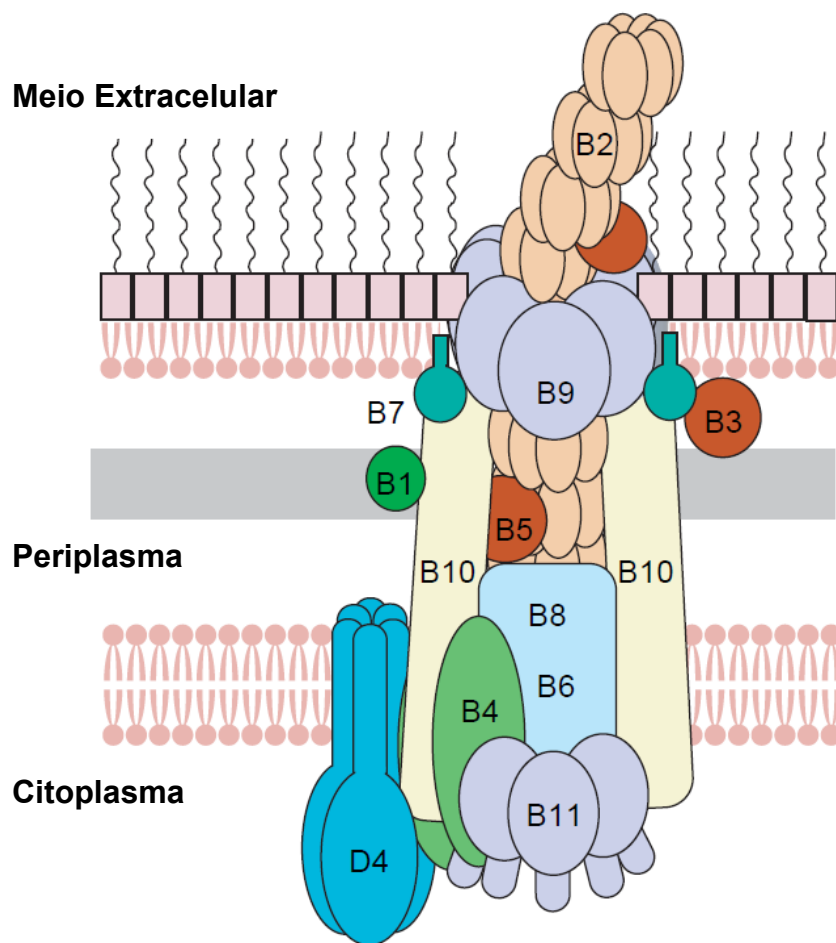


Figura 4. Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo IV de *A. tumefaciens*. Adaptado de (Li *et al.*, 2005).

1.3.3. Proteínas do Sistema de Secreção do Tipo IV

Segue uma breve descrição sobre cada componente que forma o canal do T4SS, que se inicia no citoplasma bacteriano e forma um *pilus* extracelular.

VirB1: pequena proteína periplasmática com 150-250 resíduos, pertencente à superfamília das transglicosilases líticas, que clivam ligações glicosídicas β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e a N-acetilglucosamina (GlcNAc). Portanto, membros dessa família são capazes de romper a parede de peptideoglicana que envolve bactérias, o que facilitaria a montagem do canal periplasmático do T4SS (Zahrl *et al.*, 2005). Em *A. tumefaciens*, ausência de VirB1 não elimina a função do T4SS, mas atenua a virulência, indicando que a clivagem da parede da bactéria facilita a montagem do T4SS, mas não é essencial (Llosa *et al.*, 2000). A proteína VirB1 de *Agrobacterium* é processada em 2 fragmentos, sendo que o N-terminal possui a atividade de muramidase, enquanto o C-terminal é secretado para o meio extracelular, onde promove formação do *pilus* (Zupan *et al.*, 2007).

VirB2: proteína pequena e pouco conservada, VirB2 é o principal componente do *pilus* do T4SS. Em *A. tumefaciens* e no polipeptídeo codificado pelo plasmídeo conjugativo RP4, sofre um processamento envolvendo clivagem e ciclização, onde as extremidades N- e C-terminais são ligadas covalentemente (Eisenbrandt *et al.*, 1999; Eisenbrandt *et al.*, 2000). Recentemente, foram identificadas proteínas na superfície da célula de *Arabidopsis thaliana* que podem servir como receptores para a ligação de VirB2 de *A. tumefaciens*, e, portanto, podem ser importantes para a conexão do T4SS com o hospedeiro (Hwang e Gelvin, 2004). Este fato indica que, além de formar o canal de secreção e *pilus* conjugativo, VirB2 pode atuar como adesina (Backert *et al.*, 2008).

A função precisa do *pilus* é controversa, pois existem dois modelos vigentes. O primeiro estabelece que o *pilus* serve para reconhecer a célula doadora, seguido de sua retração, fazendo com que as células doadora e receptora estabeleçam contato íntimo, quando a transferência do DNA pode acontecer, sem que ocorra transferência dos substratos pelo *pilus* (Christie, 2004). A principal evidência deste modelo se baseia na observação de que a existência de um *pilus* detectável não é requerida para a transferência dos substratos, apesar da presença de VirB2 ser essencial (Eisenbrandt *et al.*, 2000).

A segunda teoria sobre a função do *pilus* acredita que os substratos são transferidos através do lúmen central do *pilus* e injetados diretamente no interior da célula receptora. Novas observações mostram que o DNA pode ser transferido por uma longa distância, presumivelmente via *pilus*, apesar de ocorrer em uma frequência relativamente baixa (Babic *et al.*, 2008). Um trabalho recente de microscopia crio-eletrônica mostrou que o lúmen central do F-*pilus* possui diâmetro de aproximadamente 30 Å, suficiente para a passagem de ssDNA ou substratos protéicos desenovelados (Wang *et al.*, 2009). Esses fatos, juntamente com a evidência de que VirB2 interage diretamente com o substrato durante sua passagem pelo T4SS de *A. tumefaciens* (Cascales e Christie, 2004b), favorecem o segundo modelo.

VirB3: hidrofóbica e pequena (103 resíduos em *Xac*), é a proteína menos estudada do aparato central de secreção de T4SSs. VirB3 é essencial para translocação dos substratos em *A. tumefaciens* (Berger e Christie, 1994), sendo provavelmente uma proteína integral de membrana, pois foi demonstrado que VirB3 se associa à membrana interna e, predominantemente, à membrana externa (Shirasu e Kado, 1993). Entretanto, seu papel pode estar intimamente ligado à

membrana interna, pelo fato de VirB3 ter sido identificada em alguns T4SSs como uma proteína de fusão com VirB4, que se localiza no citoplasma ou na membrana interna (Arechaga *et al.*, 2008; Draper *et al.*, 2006). Sua localização na membrana externa, que é estabilizada por VirB4 (Jones *et al.*, 1994), sua interação com VirB5 (Shamaei-Tousi *et al.*, 2004) e o fato de ser co-purificada em complexo com VirB2 e VirB5, indicam que VirB3 pode fazer parte do complexo de montagem do *pilus* (Yuan *et al.*, 2005).

VirB4: maior e mais conservada proteína do aparato de secreção do T4SS (817 aminoácidos em *Xac*). Somente recentemente foi demonstrado sem ambigüidade que um membro dessa família (TrwK, do plasmídeo conjugativo R388) possui atividade de ATPase (Arechaga *et al.*, 2008). O sítio de ligação a nucleotídeos de VirB4 é requerido para seu papel essencial na secreção de substratos em *A. tumefaciens* (Berger e Christie, 1993; Fullner *et al.*, 1994), devendo ser necessário para energizar a montagem e / ou a atividade da maquinaria de secreção (Alvarez-Martinez e Christie, 2009). Análise computacional prediz que VirB4 possui um domínio C-terminal homólogo a porção solúvel de VirD4, permitindo a formação de hexâmeros, como no caso da última proteína (Middleton *et al.*, 2005). Hexâmeros foram demonstrados experimentalmente, apesar de VirB4 ser majoritariamente purificada como monômero (Arechaga *et al.*, 2008). A localização clara de VirB4 é indefinida, pois existem evidências, a partir de estudos com diferentes T4SSs, de VirB4 ser apenas citoplasmática (Arechaga *et al.*, 2008; Rabel *et al.*, 2003), enquanto outros indícios mostram sua associação com a membrana interna (Cao e Saier, 2001; Dang e Christie, 1997; Draper *et al.*, 2006).

VirB5: contribui para a transferência dos substratos e para a montagem do *pilus* constituído por VirB2 em *A. tumefaciens* (Lai *et al.*, 2000; Schmidt-Eisenlohr *et*

al., 1999a). VirB5 se localiza no periplasma e também é um componente menos abundante do *pilus* (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b). VirB5 de *Agrobacterium* foi localizada na extremidade do T-*pilus* (Aly e Baron, 2007) e interage com a proteína de superfície celular da planta Tzs, envolvida com biossíntese de trans-zeatina, um hormônio vegetal (Aly *et al.*, 2008). Estes dados indicam que, assim como VirB2, VirB5 atua como uma adesina na interface entre o T4SS e a célula do hospedeiro (Backert *et al.*, 2008). A estrutura de VirB5 do plasmídeo conjugativo pKM101 foi determinada, mostrando que esta proteína possui um domínio único alongado, formado por α -hélices (Figura 5) (Yeo *et al.*, 2003).

VirB6: proteína integral da membrana interna, VirB6 possui descrições contraditórias quanto ao número de α -hélices transmembranares, que pode variar de 4 a 6, e em relação à localização citoplasmática ou periplasmática do N-terminal (Cao e Saier, 2001; Jakubowski *et al.*, 2004; Judd *et al.*, 2005b). VirB6 foi uma das primeiras proteínas identificadas como tendo localização polar em *A. tumefaciens*, e sua localização depende da presença de 5 outras proteínas, VirB7-VirB11 (Judd *et al.*, 2005b). Assim como VirB6 depende de outras proteínas para sua correta localização, a presença de VirB6 é requerida para expressão estável de VirB3 e VirB5 e formação do homodímero de VirB7 (Hapfelmeier *et al.*, 2000) e do heterodímero VirB7-VirB9 (Jakubowski *et al.*, 2003).

VirB6 interage diretamente com o substrato (Cascales e Christie, 2004b; Jakubowski *et al.*, 2004), sugerindo que esta proteína pode ser o canal na membrana interna do T4SS (Alvarez-Martinez e Christie, 2009). Os domínios de VirB6 mediando localização polar, interação com substratos e transferência destes efetores para outros componentes do T4SS foram delimitados (Jakubowski *et al.*, 2004; Judd *et al.*, 2005b; Judd *et al.*, 2005c). Estes dados em *A. tumefaciens*

claramente demonstram a importância de VirB6 como um fator central engajado em uma série de interações com substratos e componentes do T4SS (Schroder e Lanka, 2005).

VirB7: pequena proteína (45-60 resíduos) pouco conservada e somente encontrada em um subconjunto de T4SS (Alvarez-Martinez e Christie, 2009; Frank *et al.*, 2005). VirB7 possui um peptídeo sinal N-terminal seguido de um sinal de ligação a lipídeos, característico de lipoproteínas, que faz com que a proteína seja ligada covalentemente a moléculas de ácidos graxos em um resíduo conservado de cisteína, que após processamento passa a ser o aminoácido N-terminal (Tokuda e Matsuyama, 2004). A localização final de VirB7 em *A. tumefaciens* é predominantemente o periplasma, ancorada na membrana externa via sua porção lipídica (Fernandez *et al.*, 1996a), porém este peptídeo também é detectado no meio extracelular e associado à membrana interna e ao *pilus* (Sagulenko *et al.*, 2001b).

Foi demonstrado que VirB7 estabiliza várias outras subunidades do T4SS (Fernandez *et al.*, 1996b; Spudich *et al.*, 1996), particularmente VirB9, seu parceiro de interação em vários Sistemas IV estudados (Schroder e Lanka, 2005). Junto com VirB8, VirB9 e VirB10, VirB7 faz parte do complexo central de secreção do T4SS associado às membranas interna e externa (Christie e Cascales, 2005). A função da lipidação de VirB7 foi estudada, indicando que ela não é importante para a montagem do complexo de membrana externa que VirB7 faz parte, e sim para a localização deste complexo na membrana externa (Fronzes *et al.*, 2009b).

Apesar de essencial para a função de vários T4SSs, VirB7 não é requerida para infecção persistente de *Brucella abortus* (Den Hartigh *et al.*, 2008). VirB7 do plasmídeo conjugativo pKM101 teve sua estrutura resolvida em complexo com o domínio C-terminal de VirB9 (Figura 5) (Bayliss *et al.*, 2007) e em complexo com os

C-terminais de VirB9 e VirB10 (Figura 6) (Chandran *et al.*, 2009), estruturas que serão discutidas abaixo.

VirB8: localiza-se na membrana interna, com a maior parte da proteína exposta no periplasma (Das e Xie, 1998; Thorstenson e Zambryski, 1994). VirB8 interage com múltiplos parceiros, incluindo VirB1, VirB4, VirB5, VirB8, VirB9, VirB10 e VirB11 (Baron, 2006; Hoppner *et al.*, 2005; Paschos *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2005). Consistente com suas múltiplas interações, VirB8 parece ser central para a localização do T4SS em apenas um dos pólos de *A. tumefaciens*, servindo como um fator de nucleação para a montagem do Sistema IV e para uma correta localização dos outros componentes (Judd *et al.*, 2005a).

VirB8 interage com o substrato durante sua passagem pelo T4SS de *Agrobacterium* (Cascales e Christie, 2004b), e faz parte do complexo central de secreção, em conjunto com VirB7, VirB9 e VirB10 (Das e Xie, 2000; Kumar e Das, 2001). Porém, surpreendentemente, é possível se obter o complexo central codificado pelo plasmídeo pKM101 mesmo na ausência de VirB8 (Fronzes *et al.*, 2009b). As estruturas dos domínios periplasmáticos de VirB8 de *A. tumefaciens* e *B. suis* foram determinadas (Bailey *et al.*, 2006; Terradot *et al.*, 2005), apresentando um domínio globular composto por uma folha- β antiparalela com 4 fitas em contato com um conjunto de α -hélices (Figura 5).

VirB9: faz parte do complexo central de secreção do T4SS junto com VirB7, VirB8 e VirB10 (Das e Xie, 2000), e interage com os substratos na etapa final de transporte até o *pilus* em *A. tumefaciens* (Cascales e Christie, 2004b). Possui três regiões funcionais, os domínios N- e C-terminais, que são conservados e requeridos para a montagem e atividade do canal e biogênese do *pilus*; e o domínio central, que é pouco conservado (Jakubowski *et al.*, 2005). Foi resolvida por RMN a estrutura do

complexo composto por um peptídeo de VirB7 (resíduos 21-42 da proteína TraN de 48 aminoácidos) associado ao domínio C-terminal de VirB9 (resíduos 177-271 da proteína TraO de 294 aminoácidos) do sistema de conjugação pKM101 (Bayliss *et al.*, 2007). O domínio C-terminal de VirB9 possui um arranjo em sanduíche- β semelhante a um domínio de imunoglobulina, com um dos lados do sanduíche interagindo com o peptídeo estendido de VirB7 (Figura 5).

VirB10: constituída, do N- para o C-terminal, de um domínio citoplasmático curto, uma α -hélice que atravessa a membrana interna, um domínio rico em prolinas e um domínio globular periplasmático, composto por um barril- β modificado com um motivo hélice-laço-hélice (“helix-loop-helix”) se projetando do topo do barril, semelhante a uma antena (Jakubowski *et al.*, 2009; Terradot *et al.*, 2005) (Figura 5). Essa proteína interage com VirD4, VirB4 e VirB8, associadas à membrana interna, e com o complexo VirB7-VirB9, associado à membrana externa (Christie *et al.*, 2005). VirB10 pode assumir duas conformações em *A. tumefaciens*, dependendo da utilização de ATP por VirD4 e VirB11, mas não por VirB4 (Cascales e Christie, 2004a). O papel dessas múltiplas interações de VirB10 e as mudanças conformacionais sofridas por esta proteína serão discutidos com mais detalhes abaixo (tópico 1.3.5).

VirB11: proteína estruturalmente relacionada à uma grande família de ATPases comumente associadas com sistemas de tráfico macromolecular, incluindo o T2SS, a maquinaria de montagem do *pilus* do Tipo IV e o sistema de biogênese do flagelo de arqueobactérias (Cao e Saier, 2001; Planet *et al.*, 2001). VirB11 hidroliza ATP, e sua atividade é estimulada por lipídeos *in vitro*, consistente com a afinidade destas ATPases por membranas *in vivo*, fracionando como uma proteína citoplasmática ou como uma proteína de membrana interna periférica (Krause *et al.*,

2000; Machon *et al.*, 2002; Rashkova *et al.*, 1997). Essa proteína forma homohexâmeros, com cada subunidade sendo constituída por dois domínios, que formam dois anéis separados (Yeo *et al.*, 2000) (Figura 5). A estrutura de VirB11 de *H. pylori* foi determinada na ausência e presença de nucleotídeos, indicando as mudanças conformacionais sofridas durante o ciclo de utilização de ATP (Savvides *et al.*, 2003). Acredita-se que VirB11 energize a maquinaria do tipo IV para montagem do complexo, produção do *pilus* e/ou secreção de substratos (Christie *et al.*, 2005; Sagulenko *et al.*, 2001a).

VirD4: possui α -hélices transmembrana N-terminais ancoradas na membrana interna e a maior parte da sua cadeia polipeptídica no citoplasma (Gomis-Ruth *et al.*, 2002a). VirD4 é a proteína que seleciona os alvos secretados na maioria dos T4SSs, reconhecendo e recrutando a proteína-alvo ou a porção protéica do complexo proteína-DNA que será secretado (Fronzes *et al.*, 2009a). Recentemente, foi demonstrado que o ortólogo de VirD4 do sistema conjugativo R388 de *E. coli* (TrwB) possui atividade ATPásica, sendo esta atividade dependente da ligação à DNA (Tato *et al.*, 2005) ou à uma outra proteína específica (TrwA), envolvida com processamento do DNA que será transferido (Tato *et al.*, 2007).

As estruturas do domínio citoplasmático de TrwB foram determinadas na forma apo e em complexo com análogos de substrato e produto, mostrando que TrwB se constitui de anéis hexaméricos (Figura 5), que sofrem mudanças conformacionais no canal central após ligação e hidrólise de nucleotídeos (Gomis-Ruth *et al.*, 2002b; Gomis-Ruth *et al.*, 2001). O hexâmero se assemelha estruturalmente à F₁-ATPase, o domínio globular da ATP sintase (Von Ballmoos *et al.*, 2009). Baseado nesta similaridade, TrwB poderia usar a energia derivada da hidrólise de ATP para bombear DNA através do seu canal central, de forma similar

ao usado pela F_1 -ATPase para produzir um movimento rotatório da subunidade γ central (Cabezón e De La Cruz, 2006). Os sinais nas proteínas secretadas, reconhecidos por VirD4, serão discutidos a seguir.

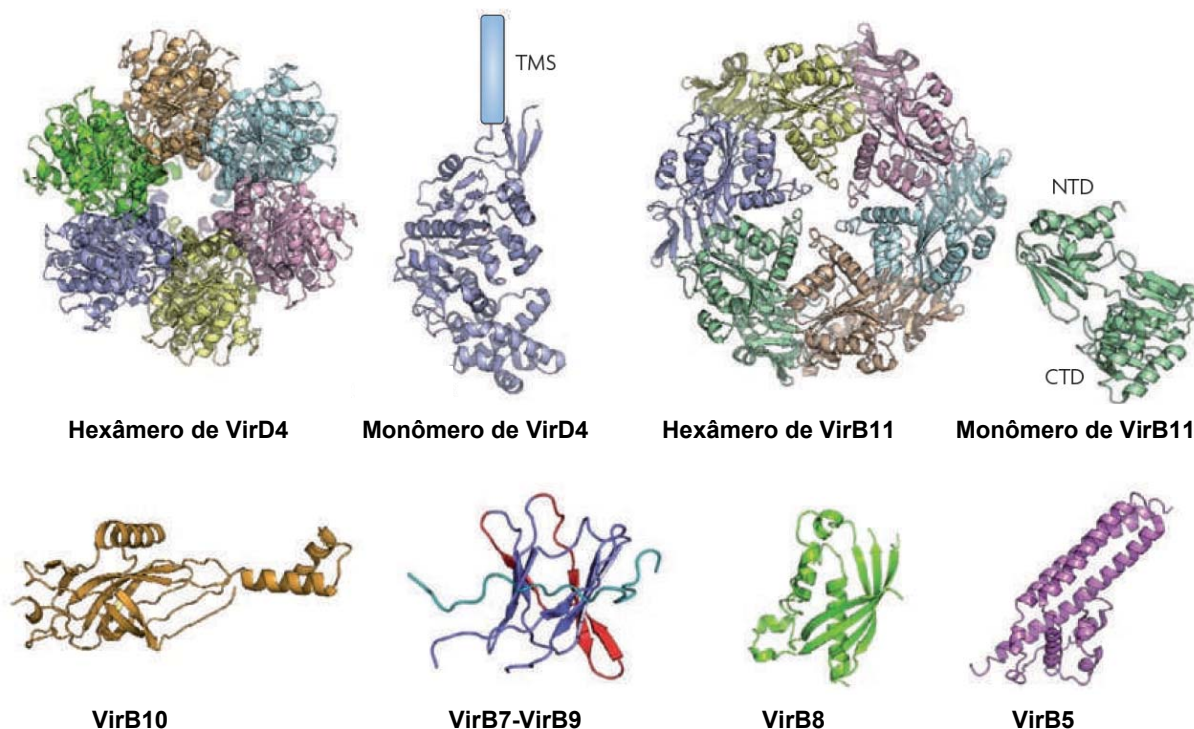


Figura 5. Estruturas de proteínas do T4SS. VirD4: TrwB do plasmídeo conjugativo R388 de *E. coli* (PDB: 1E9R) (Gomis-Ruth *et al.*, 2001); VirB11: HP0525 de *H. pylori* (PDB: 1G6O) (Yeo *et al.*, 2000); VirB10: Domínio C-terminal de ComB10 codificado por *H. pylori* (PDB: 2BHV) (Terradot *et al.*, 2005); VirB7-VirB9: complexo TraN (azul claro) - C-terminal de TraO (azul escuro e vermelho) do plasmídeo conjugativo pKM101 de *E. coli* (PDB: 2OFQ) (Bayliss *et al.*, 2007); VirB8: domínio C-terminal de VirB8 codificado por *B. suis* (PDB: 2BHM) (Terradot *et al.*, 2005) e VirB5: TraC do plasmídeo conjugativo pKM101 de *E. coli* (PDB: 1R8I) (Yeo *et al.*, 2003). NTD: domínio N-terminal; CTD: domínio C-terminal; TMS: segmento transmembrana. Adaptado de (Fronzes *et al.*, 2009a).

1.3.4. Sinais para secreção via Sistemas de Secreção do Tipo IV

Trabalhos recentes têm mostrado quais sinais são importantes para a seleção por VirD4 dos alvos secretados pelo T4SS. Sinais C-terminais nos efetores são essenciais, porém em alguns casos não são suficientes para correta secreção, e diferentes T4SSs parecem reconhecer características físico-químicas levemente

diferentes nas proteínas alvo. Em *A. tumefaciens*, o sinal C-terminal potencialmente reconhecido é um motivo positivamente carregado, rico em argininas (Vergunst *et al.*, 2005); em *L. pneumophila*, os últimos 20 resíduos são essenciais, contendo aminoácidos hidrofóbicos conservados (Nagai *et al.*, 2005) e em *B. henselae*, um domínio de aproximadamente 140 resíduos e um trecho C-terminal que possui resíduos positivos são requeridos (Schulein *et al.*, 2005).

Os C-terminais reconhecidos por VirD4 são possivelmente desenovelados e expostos ao solvente, como exemplificados pelas estruturas cristalográficas de RalF (Amor *et al.*, 2005) e VirE2 (Dym *et al.*, 2008), substratos secretados por *L. pneumophila* e *A. tumefaciens*, respectivamente. Em ambos os casos, as regiões C-terminais reconhecidas para secreção via T4SS não possuem densidade eletrônica detectável, indicando que são desenoveladas e livres para interagir com VirD4.

Os sinais para secreção via outros T4SSs também foram identificados, como em *Brucella* spp., em que os últimos 20 resíduos são essenciais, porém somente ocorre secreção quando os 115 aminoácidos C-terminais estão presentes (De Jong *et al.*, 2008). Em *H. pylori*, uma cauda C-terminal positivamente carregada é importante para translocação do substrato CagA; contudo, o N-terminal parece também contribuir para secreção (Hohlfeld *et al.*, 2006). Por fim, no T4SS cromossomal de *Xac*, um domínio C-terminal com um alto conteúdo de glutaminas interage com VirD4, indicando ser um sinal para secreção nas proteínas que contenham este domínio (veja abaixo) (Alegria *et al.*, 2005).

1.3.5. O canal do T4SS na membrana externa

Por vários anos, acreditou-se que o canal na membrana externa era constituído pelo complexo VirB7–VirB9, em particular o domínio C-terminal de VirB9 (Fronzes *et al.*, 2009b; Llosa *et al.*, 2009). Porém, surpreendentemente, a recém resolvida estrutura do complexo associado à membrana externa do T4SS codificado pelo plasmídeo pKM101, composto por VirB7 e os domínios C-terminais de VirB9 e VirB10, mostrou que a última proteína utiliza a projeção em forma de antena para atravessar a membrana externa (Chandran *et al.*, 2009). Como VirB10 também atravessa a membrana interna, esta é a primeira descrição de uma proteína que atravessa simultaneamente as duas membranas de bactérias Gram-negativas, e a primeira estrutura de um complexo heteromultimérico associado à membrana externa. Além disso, esse é o segundo exemplo descrito de um canal na membrana externa constituído por α -hélices (o primeiro sendo o octâmero de Wza, envolvido com secreção de carboidratos (Dong *et al.*, 2006)).

O complexo de membrana externa do T4SS é um tetradecâmero simétrico, com VirB10 localizado internamente, formando um canal, rodeado externamente por subunidades de VirB7 e VirB9 (Figura 6). Esta organização é contraditória em relação a alguns dados experimentais, como o fato de VirB9 interagir diretamente com o substrato, enquanto VirB10 não (Cascales e Christie, 2004b). Além disso, foi demonstrado que o C-terminal de VirB9 possui parte de sua cadeia exposta ao periplasma e parte acessível ao meio extracelular (Bayliss *et al.*, 2007), fato incompatível com a estrutura do complexo B7-B9-B10. O fato de VirB10 não interagir diretamente com o substrato indica que outra(s) proteína(s) poderia(m) formar uma

camada mais interna no canal de secreção, e uma opção é que o *pilus*, formado por VirB2, polimerize ainda no ambiente intracelular (Chandran *et al.*, 2009).

VirB10 interage com múltiplas proteínas do T4SS ao longo do envoltório bacteriano (Christie *et al.*, 2005) e sofre mudanças conformacionais induzidas pelas ATPases localizadas no citoplasma e membrana interna (Cascales e Christie, 2004a). Como VirB10 atravessa ambas as membranas bacterianas, esta proteína pode servir como uma ponte física entre as ATPases da membrana interna e o poro na membrana externa, e os dois estados conformacionais de VirB10 poderiam representar a abertura e o fechamento do canal do T4SS para a transferência do substrato (Chandran *et al.*, 2009). Novos dados experimentais e estruturais serão necessários para elucidar com mais detalhes o funcionamento do intrigante macrocomplexo associado à membrana externa codificado pelo T4SS.

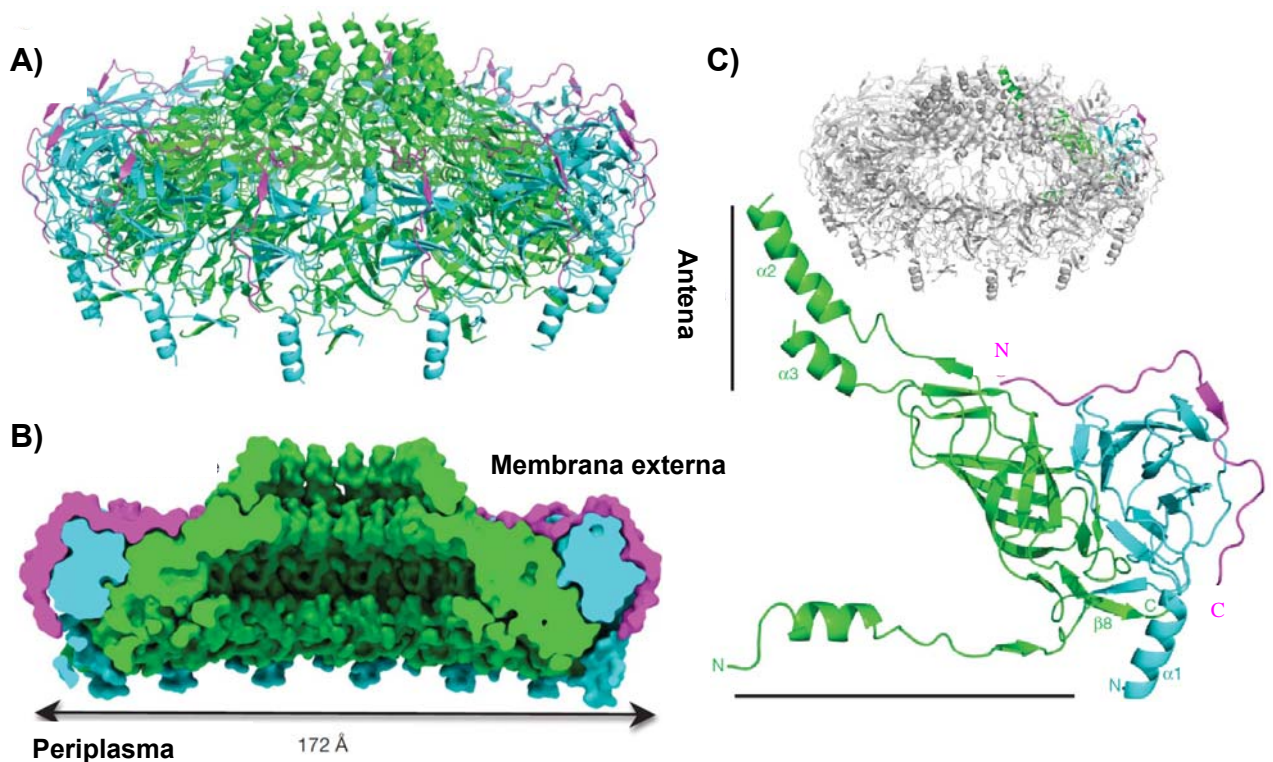


Figura 6. Estrutura do canal do T4SS na membrana externa (Chandran *et al.*, 2009). (A) Representação em fitas e (B) corte do modelo de preenchimento do tetradecâmico completo. (C) Unidade Heterotrimérica. Rosa: VirB7; Azul claro: VirB9 e Verde: VirB10.

1.3.6. O Sistema de Secreção do Tipo IV no gênero *Xanthomonas*

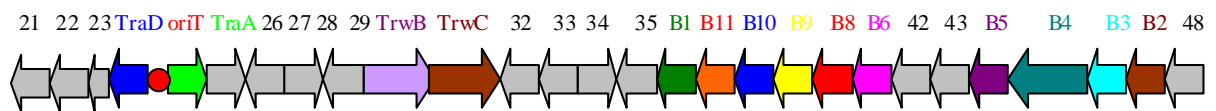
A primeira descrição de Sistemas IV em *Xanthomonas* foi realizada apenas no trabalho de sequenciamento dos primeiros genomas deste gênero (Da Silva *et al.*, 2002). *Xac* apresenta dois T4SSs, um localizado no cromossomo e outro no plasmídeo pXAC64 (Figura 7), que possuem organização diferente e os produtos gênicos correspondentes possuem baixo grau de identidade de sequência. *Xcc* apresenta apenas o equivalente ao T4SS cromossomal de *Xac* nas três linhagens sequenciadas (Da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2008), enquanto *Xcv* apresenta três T4SSs diferentes, os dois encontrados em *Xac* e um terceiro, similar ao Sistema Dot/Icm de *L. pneumophila* (Thieme *et al.*, 2005). Por outro lado, as três cepas sequenciadas de *Xoo* não apresentam nenhum T4SS (Lee *et al.*, 2005; Ochiai *et al.*, 2005; Salzberg *et al.*, 2008).

Dos Sistemas de Secreção do Tipo IV conhecidos em *Xanthomonas*, o papel em virulência foi estudado apenas para o T4SS de *Xcc* 8004. No trabalho original de sequenciamento do genoma desta bactéria, foi realizada uma varredura a partir de uma biblioteca de mutantes de inserção de transposons no genoma de *Xcc*, com o intuito de se identificar genes requeridos para virulência. Um dos mutantes identificados que afetava a capacidade de *Xcc* 8004 de causar doença em repolho (*Brassica oleraceae* cultivar Jingfeng 1) era o gene *virb8*, levando a inferência de que o T4SS contribui para a virulência em *Xanthomonas* (Qian *et al.*, 2005). Contudo, o mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo sobre a diversidade genética de linhagens de *Xcc* por análises de microarranjo, que indicou que os T4SSs são altamente divergentes nas cepas investigadas. Para tentar compreender o papel do T4SS em *Xcc* 8004, removeram geneticamente a maior parte dos genes que codificam proteínas do T4SS, e o mutante apresentou o mesmo fenótipo de

infecção da cepa selvagem em diversas plantas da família Brassicaceae, sugerindo que o Sistema IV não está engajado em virulência em *Xcc* (He *et al.*, 2007).

O T4SS plasmidial de *Xac* provavelmente está envolvido com conjugação do plasmídeo pXAC64. *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* possui um plasmídeo designado pXcB, que apresenta um T4SS equivalente ao encontrado em pXAC64. Foi demonstrado que pXcB pode ser transferido horizontalmente de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* para *Xac in planta*, e este fato somente ocorreu quando o T4SS estava completo (El Yacoubi *et al.*, 2007).

A) Plasmídeo



B) Cromossomo

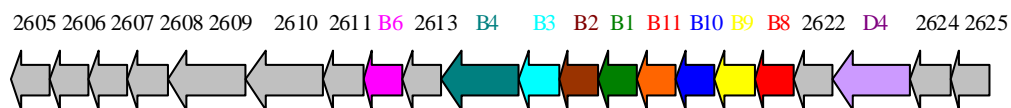


Figura 7. Os *loci vir* que codificam os T4SSs plasmidial (A) e cromossomal (B) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Alegria *et al.*, 2005). Cinza: proteínas hipotéticas conservadas.

1.3.7. O T4SS codificado pelo cromossomo de *Xac*

Na anotação original do genoma de *Xac*, acreditava-se que o T4SS cromossomal apresentava os genes *virB1-11* e *virD4*, com exceção de *virB5* e *virB7* (Da Silva *et al.*, 2002). Em vários T4SSs, os genes *virB5* e *virB7* são pouco conservados e, em alguns casos, são anotados com base somente em sua localização no operon (Frank *et al.*, 2005).

Genes *virB5* são normalmente encontrados entre os *loci* codificando *virB4* e *virB6* e codificam proteínas acídicas (pI ~ 5,0), com grande conteúdo de α -hélices, aproximadamente 220 resíduos na proteína madura e contendo um peptídeo sinal N-terminal para secreção do citoplasma para o periplasma, via Sistema Sec (Yeo *et al.*, 2003).

Entre os genes *virB4* (Xac2614) e *virB6* (Xac2612) no locus *virB* cromossomal de *Xac* se encontra a ORF Xac2613 (Figura 7), cujo produto protéico possui as características citadas acima, como peptídeo sinal N-terminal, aproximadamente 220 resíduos e pI teórico de 5,27 para a proteína madura, além de predição de estrutura secundária com longas α -hélices (dados não mostrados). Provavelmente a proteína hipotética Xac2613 é a equivalente à VirB5 no T4SS cromossomal de *Xac* (Alegria *et al.*, 2005), e que a falta de conservação observada na família VirB5 decorre do fato destas proteínas potencialmente serem adesinas (Backert *et al.*, 2008), reconhecendo proteínas alvo em diferentes hospedeiros, e tendo que evoluir para realizar tal interação específica.

Recentemente, para a identificação de interações proteína-proteína envolvidas na patogenicidade de *Xac*, foram realizados ensaios de duplo-híbrido, enfocando na identificação de interações envolvendo subunidades e proteínas hipotéticas codificadas pelo T4SS cromossomal deste fitopatógeno (Alegria *et al.*, 2005). Foram identificadas diversas interações não caracterizadas previamente, como as envolvendo as proteínas VirD4-Xac2609, Xac2609-Xac2610, Xac2610-VirB11 e Xac2622-VirB9.

Utilizando VirD4 como isca, foram identificadas interações com 12 proteínas de função desconhecida e não caracterizadas previamente, o qual apresentam um domínio C-terminal conservado de aproximadamente 115 resíduos, sendo este

domínio, na maioria dos casos, bastante rico em resíduos de glutamina. Nem a sequência consenso ou qualquer dos domínios de interação à VirD4 em qualquer das proteínas individuais têm similaridade significativa com alguma proteína de estrutura ou função determinadas. Os substratos do T4SS cromossomal de *Xac* não são conhecidos, sendo possível que esses domínios conservados sirvam como sinal para VirD4 direcionar seus alvos para o aparato do tipo IV (Alegria *et al.*, 2005).

Uma das proteínas com o domínio conservado de interação à VirD4 é Xac2609. Assim como diversas outras proteínas de ligação a VirD4, o N-terminal de Xac2609 apresenta trechos com similaridade a domínios conhecidos. No caso de Xac2609, são detectadas regiões com similaridade a domínios de ligação à peptideoglicana e de quitinase. Xac2609 também interagiu em ensaios de duplo-híbrido com Xac2610, que, assim como o primeiro polipeptídeo, é uma proteína de função desconhecida (Alegria *et al.*, 2005). Os genes que codificam Xac2609 e Xac2610 se encontram no locus cromossômico que codifica o T4SS de *Xac*, juntamente com VirD4 (Figura 7). Xac2610 também interagiu nos experimentos de duplo-híbrido com a proteína VirB11 (Alegria *et al.*, 2005) e, mais recentemente, com VirB9 (Docena, 2006).

O fato de haver uma pequena rede de interações entre três proteínas do T4SS (VirD4, VirB9 e VirB11) e duas outras proteínas não caracterizadas (Xac2609 e Xac2610), cujos genes se localizam no locus do Sistema IV cromossomal, pode ter uma significância fisiológica que precisa ser estudada, para uma melhor compreensão dos mecanismos de seleção de substratos e de secreção realizados pelo aparato do tipo IV em *Xanthomonas*.

Na anotação do genoma de *Xac*, não se identificou um correspondente ao gene *virB7* no cromossomo (Da Silva *et al.*, 2002). Na região cromossômica onde se

esperava encontrar o gene *virB7*, entre os genes *virB8* (Xac2621) e *virD4* (Xac2623), encontra-se a região que codifica a proteína hipotética Xac2622 (Figura 7). Este polipeptídeo não apresenta similaridade significativa com nenhuma proteína em bancos de dados, com exceção de proteínas de *Xcc*, *Xcv*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Neisseria flavescens*, cujos genes também se encontram ao lado de *virB8* e possuem função não caracterizada.

Ensaio de duplo-híbrido evidenciaram a interação entre Xac2622-VirB9 (Alegria *et al.*, 2005). Este fato, junto com a localização do gene no locus do T4SS e a presença de um peptídeo sinal e um sinal de ligação a lipídeos na proteína codificada, que a localizaria como uma lipoproteína ancorada na membrana externa, sugerem que Xac2622 é um equivalente à VirB7, apesar de ser maior (137 aminoácidos) que todos os membros desta família (45-60 resíduos). A confirmação e a caracterização da interação Xac2622-VirB9 são de grande valia para mostrar que o T4SS de *Xac* está completo e para uma melhor compreensão do Sistema de Secreção do Tipo IV cromossomal como um todo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto foram a caracterização bioquímica, biofísica, estrutural, funcional e das interações proteína-proteína de componentes do Sistema de Secreção do Tipo IV codificado pelo cromossomo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Clonagem em vetor de expressão bacteriano dos genes que codificam as proteínas do T4SS cromossomal de *Xac*;
- Produção das proteínas heterólogas em *Escherichia coli* e purificação;
- Caracterização espectroscópica das proteínas recombinantes;
- Produção de anticorpos policlonais contra proteínas do T4SS cromossomal de *Xac*, para a análise da funcionalidade de secreção por este sistema;
- Análise das interações envolvendo as proteínas VirB9, VirB11, VirD4, Xac2609, Xac2610 e Xac2622 utilizando ensaios *in vitro*;
- Nocaute de genes que codificam componentes do T4SS para se estudar a função desse Sistema de *Xac in planta*;
- Estudos da estrutura tridimensional de proteínas ou complexos protéicos por ressonância magnética nuclear ou cristalografia e difração de raios-X.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem, expressão e purificação de proteínas

3.1.1. Desenho de oligonucleotídeos e amplificação por PCR de genes que codificam proteínas

Foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação dos seguintes genes (completos ou fragmentos) do T4SS cromossomal de *Xac*: *virB1*, *virB4*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11*, *virD4*, *xac0466*, *xac1165*, *xac2609*, *xac2610*, *xac2613*, *xac2622* e *xac3404* (Tabela 1). Além disso, foram também desenhados oligonucleotídeos para o sequenciamento de porções internas dos genes *virB4* e *virD4*, devido aos produtos gênicos serem muito longos para sequenciamento completo utilizando apenas oligonucleotídeos que anelem em seqüências no vetor de expressão que flanqueiam o gene clonado (2,5 kb e 1,5 kb, respectivamente) (Tabela 2).

Para o desenho dos oligonucleotídeos, foi utilizado o banco de dados anotado do genoma de *Xac* (<http://genoma4.iq.usp.br>). Nas extremidades dos oligonucleotídeos foram inseridas seqüências reconhecidas por enzimas de restrição. Os oligos desenhados apresentam temperatura de hibridização (T_m) no anelamento inicial com o DNA genômico de 50 °C e T_m de 60 °C nos ciclos seguintes, onde ocorre anelamento do iniciador com as seqüências amplificadas. As T_m s foram calculadas utilizando a versão 3.00 do programa Gene Runner (Hastings Software, 1994).

Para o desenho dos iniciadores, foi levado em consideração se os genes sob estudo codificam proteínas com peptídeo sinal ou alças transmembranares, que poderiam dificultar a purificação e caracterização dessas proteínas. Para identificar potenciais regiões transmembrana, foram utilizados os programas DAS (Cserzo *et al.*, 1997), HMMTOP (Tusnady e Simon, 2001), TMHMM (Krogh *et al.*, 2001), TMPred (Hofmann e Stoffel, 1993) e SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998), encontrados no endereço eletrônico do “ExPASy Proteomics tools” (<http://au.expasy.org/tools/>).

Os oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação dos genes a partir de DNA genômico de *Xac*. Uma reação típica de PCR continha 300 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 2 mM MgSO₄, tampão Thermo Pol 1X e 1 U de Deep Vent DNA Polimerase (New England Biolabs). As reações de PCR seguiram as seguintes etapas: o DNA era inicialmente desnaturado por 2 min a 96 °C e então submetido a 5 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 96 °C, 30 segundos de hibridização a 50 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C. Posteriormente, foram realizados 25 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 96 °C, 30 segundos de hibridização a 60 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C, e finalmente por uma etapa de 7 minutos de extensão extra a 72 °C. O equipamento utilizado foi o termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem em vetores de expressão de proteínas.

Oligonucleotídeo (Orientação / Gene / Sítio de restrição)	Seqüência 5' → 3' (Sítios de restrição sublinhados; códon de iniciação/terminação em azul)
5'VirB1 ₁ - <i>Nde</i> I	CGACGCT <u>CATATG</u> TTGCCTGGCATGGAACTG
3'VirB1 ₁₄₁ - <i>Bam</i> HI	CCG <u>GATCC</u> TTAGGAGGCATAGATCTTCTGCAC

3'VirB1 ₂₈₀ - <i>Bam</i> HI	GCGGATCCCTAAAAACGAATGCGCTATCCAC
5'VirB4 ₁ - <i>Nde</i> I	CTCGTCACATATGTTTCAGCCCAGACAGTCCG
3'VirB4 ₈₁₇ - <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	TAGGATCCAAGCTTTATGCATCTTCGACCTCCTTGTC
5'VirB8 ₇₀ - <i>Nde</i> I	GGACTGCCATATGAAGGAGAAAGTGCCGTATCTC
3'VirB8 ₃₄₈ - <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I	TAGGATCCTCGAGTTATCGACCACTTGCTCCATTGAC
5'VirB9 ₃₄ - <i>Eco</i> RI/ <i>Nde</i> I	GCGGAATTCCATATGTATGCACCCGATCGTATCTATC
5'VirB9 ₁₅₄ - <i>Nde</i> I	GCCGTGCCATATGAATGCCAAGATCTTGAAGGATC
5'VirB9 ₁₅₉ - <i>Nde</i> I	GCACGTCCATATGAAGGATCGTCGTTACTATTACG
3'VirB9 ₂₅₅ - <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI	AACTGCAGGATCCTACTTTTGCTTGTTCCCTTCGCAGAC
5'VirB10 ₈₅ - <i>Nde</i> I	GACTAGCCATATGCAAAGCGGGGAGGATTCC
3'VirB10 ₃₈₉ - <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I	TAGGATCCTCGAGTCACTTCGGCAGGACAGC
5'VirB11 ₁ - <i>Nde</i> I	GTCTCCACATATGACGATCGATGACTCCCCG
3'VirB11 ₃₄₆ - <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	TAGGATCCAAGCTTTAGCCGCCGCGCAGG
5'VirD4 ₈₃ - <i>Nde</i> I	AAGACAGCATATGATCGTCAAGCCCAAGGCGC
3'VirD4 ₅₅₇ - <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I	TATAAGCTTCTCGAGTATTACATTCTGATGGTAAGCGTCTTCAC
5'Xac0466 ₄₈₄ - <i>Nde</i> I	TGACTGACATATGAACGATGCATCGCACCCCTGAC
3'Xac0466 ₅₈₉ - <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	AGAATTCTGGATCCTCAGCGACCCGCCATCG
5'Xac1165 ₁ - <i>Nde</i> I	TACTACAGCATATGGGTTCGGCCAGCG
3'Xac1165 ₁₁₂ - <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	CGAATTCGGATCCTCATCCAATACTTCGGCGC
5'Xac2609 ₁ - <i>Nde</i> I	TAGCGTACATATGAGCGATGGACGTGGTTCG
5'Xac2609 ₃₁₁ - <i>Nde</i> I	GTAGGTTCCATATGTCTGATCCGCGCCATCC
3'Xac2609 ₃₀₈ - <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	AGAATTCGGATCCTTAGGGGCTGGAGGCTGC
3'Xac2609 ₄₃₁ - <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	AGAATTCGGATCCTTACATGGACATTGAGCGCG
5'Xac2610 ₁ - <i>Nde</i> I	GCCTGCACATATGTTGACGCGCGAATTAGCAAG
5'Xac2610 ₂₂ - <i>Nde</i> I	CGAGACGCATATGATCACAGCTTGACAGTCTAG
5'Xac2610 ₅₅ - <i>Nde</i> I	CGACCAGCATATGCAAAAGGATTTGAAAATGCCATCTAC
3'Xac2610 ₂₆₇ - <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	AGAATTCGGATCCTTAGTTGGACACCTCCTTCATTTAC
5'Xac2613 ₅₂ - <i>Nco</i> I	ACATGCCATGGGTGCGCAATGGGAAGTTATCGAC
3'Xac2613 ₂₇₅ - <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I	GGAATTCCTCGAGTATTAGTCCTTGTCGATCTCTAATCTTTCCAT

5'Xac2622 ₂₄ -NdeI	CCTGAGACATATGACCAAGCCTGCTCCTGAC
5'Xac2622 ₅₁ -EcoRI/NdeI	CGAATTCCATATGACCTCGTACACGTATCAGGC
3'Xac2622 ₁₃₄ -BamHI	GAGGATCCTTACGACACCGGCACTGGTTG
3'Xac2622 ₁₃₉ -HindIII/XhoI	TTTAAGCTTCTCGAGTTAGAGCTTGGCGCCAGACG
5'Xac3404 ₁ -NdeI	AACGATCCATATGAACGACCCCCGCCAG
3'Xac3404 ₁₃₂ -BamHI	TAGGATCCTTATTGGCCCAGCTGCGGC

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento de genes clonados em vetores de expressão de proteínas.

Oligonucleotídeo (Orientação / Gene)	Seqüência 5' → 3'
5'T7	TAATACGACTCACTATAG
3'EcoRI	CATTAACCTATAAAAATAGGCG
5'VirB4 ₁₅₀	AGAACAGGCTGTGCGGAAAGTTG
5'VirB4 ₃₀₀	CCAGATCCGCGATCTCGATGTC
5'VirB4 ₄₅₀	CAAGTCGGGTACCGGTAAGACG
5'VirD4 _{int}	GACCTATGTGTCGAACGATCCCG

3.1.2. Clonagem de genes em vetores de expressão de proteínas

Isolamento de DNA, análise com enzimas de restrição, eletroforese em gel de agarose e procedimentos de clonagem foram realizados utilizando técnicas estabelecidas (Sambrook e Russel, 2001).

Os produtos de PCR amplificados e os vetores para expressão foram digeridos com enzimas de restrição correspondentes. Os vetores utilizados foram os plasmídeos da série pET (11a e 28a – Novagen; Figura 8) (Rosenberg *et al.*, 1987; Studier e Moffatt, 1986). Os produtos de PCR digeridos foram separados em gel de agarose, eluídos e ligados aos vetores pET digeridos com as mesmas enzimas,

sendo que uma reação típica de ligação continha 100 ng de vetor, inserto:vetor em uma razão molar 3:1 e 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), em um volume final de 10-20 μ L a 16 °C.

1-2 μ L das misturas de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa DH10B. O sistema de transformação foi plaqueado em meio LB ágar contendo o antibiótico adequado para a seleção dos transformantes (200 μ g/mL de ampicilina para pET-11a e 30 μ g/mL de kanamicina para pET-28a). Foi realizada preparação em pequena escala dos plasmídeos nos clones obtidos, seguido da análise do perfil de restrição desses vetores.

Insertos clonados em plasmídeos com padrão compatível de restrição foram submetidos a sequenciamento utilizando o reagente “Big Dye Terminator” e o seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems), operado pela Dra. Luci D. Navarro (laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microorganismos, IQ/USP). A mistura de reação consistia de 200 ng de DNA, 10 pmol de oligonucleotídeo (Tabela 2) e reagente “Big Dye Terminator” em um volume final de 20 μ L. O PCR consistiu de 40 ciclos de desnaturação a 96 °C (10 s), anelamento a 50 °C (5 s) e polimerização a 60 °C (4 min).

Um clone somente foi utilizado para produção de proteínas recombinantes caso 100 % da seqüência codificada fosse confirmada por sequenciamento. Os plasmídeos recombinantes construídos estão listados na Tabela 3.

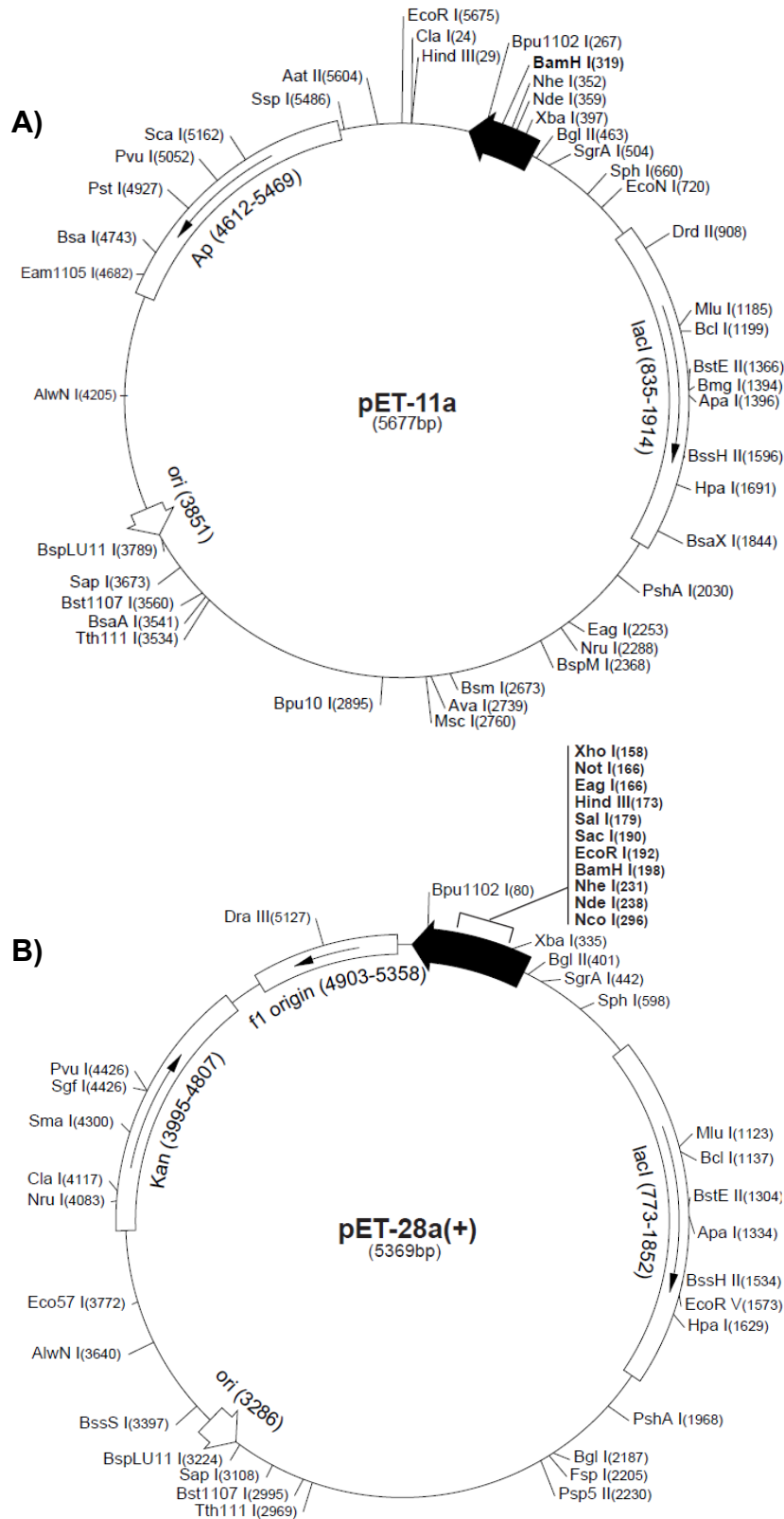


Figura 8. Representação esquemática dos plasmídeos para produção de proteínas pET11a (A) e pET28a (B). Ap e Kan: resistências a Ampicilina e Kanamicina, respectivamente; ori: origem de replicação; lacI: repressor lac. Em preto: região de clonagem / expressão (promotor T7, operador lac, seqüência Shine-Dalgarno, sítio múltiplo de clonagem e terminador T7 da transcrição).

Tabela 3. Plasmídeos construídos para expressão de proteínas de *Xac*.

Plasmídeo	Sítios de restrição utilizados para clonagem	Cepa utilizada para expressão (temperatura de expressão)
pET11a-VirB1 ₁₋₂₈₀	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-VirB1 ₁₋₁₄₁	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-VirB4 _{His-1-817}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (18 °C)
pET28a-VirB8 _{His-70-348}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)Star (37 °C)
pET11a-VirB9 ₃₄₋₂₅₅	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-VirB9 _{His-154-255}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-VirB9 ₁₅₉₋₂₅₅	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-VirB10 _{His-85-389}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)Star (37 °C)
pET28a-VirB11 _{His-1-346}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-VirD4 _{His-83-557}	<i>NdeI/XhoI</i>	BL21(DE3)RP (18 °C)
pET28a-Xac0466 _{His-484-589}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac1165 ₁₋₁₁₂	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac2609 ₁₋₄₃₁	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac2609 ₁₋₃₀₈	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac2609 ₃₁₁₋₄₃₁	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-Xac2610 ₁₋₂₆₇	<i>NcoI/HindIII</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-Xac2610 _{His-1-267}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-Xac2610 _{His-22-267}	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac2610 ₅₅₋₂₆₇	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-Xac2613 ₅₂₋₂₇₅	<i>NcoI/XhoI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET28a-Xac2622 _{His-24-139}	<i>NdeI/XhoI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac2622 ₅₁₋₁₃₄	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)
pET11a-Xac3404 ₁₋₁₃₂	<i>NdeI/BamHI</i>	BL21(DE3)RP (37 °C)

3.1.3. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Os vetores pET contendo os diferentes genes que codificam as proteínas do T4SS foram utilizados separadamente para transformar, pela técnica de choque térmico com cloreto de cálcio, a cepa de *E. coli* BL21(DE3) e células derivadas desta

linhagem (BL21(DE3)RP, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)Star e BL21(DE3)pLysS) (Studier e Moffatt, 1986). Experimentos de pequena escala (4 mL) foram realizados para se avaliar que células de *E. coli* apresentavam maior expressão das proteínas recombinantes em meio 2XYT (1,6 % (p/v) triptona, 1,0 % (p/v) extrato de levedura, 0,5 % (p/v) NaCl) contendo o antibiótico adequado. As induções foram realizadas pela adição de IPTG (Rosenberg *et al.*, 1987) para uma concentração final de 0,5 mM quando à densidade celular a 600 nm (A_{600}) atingia 0,8-1,2 (induições realizadas por 3-4 h a 37 °C e agitação de 200 RPM). O nível de indução foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Em geral, a cepa utilizada para expressão de proteínas era a linhagem BL21(DE3)RP, com exceção das produções de VirB8 e VirB10, que somente expressavam na cepa BL21(DE3)Star (Tabela 3).

Uma vez escolhida a cepa para cada proteína, esta era utilizada para expressões em larga escala, nas mesmas condições da indução em pequena escala (3-4 h a 37 °C, agitação de 200 RPM), porém em um volume maior de cultura (1-2 L de 2XYT com o antibiótico adequado). Para VirD4 e VirB4, as induções eram realizadas a 18 °C por 16 h, para otimizar a solubilidade destas proteínas (Tabela 3).

Expressão de proteínas para marcação isotópica com ^{15}N e ^{13}C , fundamental para experimentos de RMN, será discutido mais adiante (tópico 3.4.1).

3.1.4. Purificação de proteínas heterólogas

As purificações foram realizadas utilizando cromatografia de troca iônica, filtração em gel e de afinidade em coluna contendo níquel, em condições específicas

definidas por meio de testes de solubilidade, estabilidade e do ponto isoelétrico de cada proteína. As purificações foram feitas utilizando o sistema de FPLC Akta (GE Healthcare).

Após a indução das proteínas recombinantes, as células de *E. coli* foram colhidas por centrifugação (15 min; 4000 g) e ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (20 mM de tampão com pH específico para cada proteína; 25 % (p/v) sacarose; podendo apresentar ou não 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol) por litro de indução. As células foram lisadas em um aparelho “French Press” (SLM Instruments) e o extrato resultante centrifugado por 1 h a 37000 g. Analisou-se por SDS-PAGE em que fração se localizava a proteína (sedimento - proteína insolúvel; sobrenadante - proteína solúvel) e caso a proteína estivesse em corpos de inclusão (proteína insolúvel), estes eram ressuspensos em tampão de lise com 8 M uréia. Todos os tampões posteriores na purificação continham uréia nessa concentração quando a proteína era insolúvel.

Como primeira etapa de purificação, tipicamente as proteínas foram aplicadas em uma coluna de troca iônica (Q-sepharose para troca aniônica e SP-sepharose para troca catiônica, GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A (20 mM de tampão específico; 1 mM EDTA; podendo apresentar 14 mM 2-mercaptoetanol). Proteínas não ligadas à resina foram lavadas com 5 volumes de coluna (CV) do tampão A. A eluição era realizada com uma mistura linear de tampão A e tampão B (tampão A com 0,3-1 M NaCl), gerando um gradiente, por exemplo, de 0-0,3 M de NaCl.

Caso a proteína possuísse uma cauda de poli-histidina N-terminal, esta era aplicada a uma coluna de afinidade contendo Ni^{+2} , pré-equilibrada com Tampão C (20 mM Tris-HCl pH 7,0-8,0; 0,2-0,5 M NaCl e 20 mM imidazol). Após a lavagem da

coluna com 15 CVs de tampão C, a eluição era realizada pela aplicação de um gradiente de 20-500 mM imidazol, pela mistura dos tampões C e D (tampão C com 500 mM imidazol). Em alguns casos, a cauda de poli-histidina era removida por proteólise com trombina após a cromatografia de afinidade (tópico 3.1.5).

Como última etapa de purificação, o polipeptídeo era aplicado a uma coluna de filtração em gel (Superdex 75 26/60 [S75] ou Superdex 200 26/60 [S200], GE Healthcare). As frações de interesse eram concentradas até um máximo de 4 mL para aplicação na coluna. Para o equilíbrio da coluna e a cromatografia, era utilizado tampão E: 20 mM de um tampão específico, acrescido de 100 mM NaCl.

Ao final da purificação, as proteínas solúveis foram dialisadas contra 10 mM Tris-HCl pH 7,0-8,0 ou 10 mM acetato de sódio pH 5,0, na presença ou ausência de NaCl. Para as proteínas insolúveis, realizavam-se testes de reenovelamento por meio da remoção gradual de uréia por diálise. Na tentativa de se obter um protocolo otimizado de reenovelamento, diferentes tampões e concentrações salinas foram testados para cada proteína (tipicamente pHs 5, 6, 7, 8 e 9; com 0 ou 150 mM NaCl). Após a diálise, as soluções eram centrifugadas e os sedimentos e sobrenadantes obtidos aplicados em géis de SDS-PAGE para a análise do reenovelamento. A Tabela 4 descreve brevemente as etapas da purificação das diferentes proteínas recombinantes.

Avaliou-se o nível de pureza das proteínas por SDS-PAGE e por espectrometria de massa utilizando a técnica de Dessorção de Matriz Assistida por Laser / Tempo-de-Vôo (Ettan MALDI-ToF, GE Healthcare). A quantificação das proteínas foi feita por espectrofotometria a 280 nm (Pace *et al.*, 1995) ou por um método de Lowry modificado (Hartree, 1972), nesse último caso utilizando albumina sérica bovina (BSA) para a construção da curva de referência.

3.1.5. Remoção da cauda de poli-histidina por trombina

A cauda de poli-histidina N-terminal codificada pelo vetor pET28a facilita a purificação das proteínas heterólogas, e é incorporada quando o gene de interesse é clonado com o sítio de *NdeI*. Porém, para determinados estudos estruturais, como cristalografia e, principalmente, RMN, esta cauda flexível e desenovelada pode dificultar a obtenção de dados. A remoção da cauda é possível porque a proteína codificada possui um sítio para clivagem pela protease trombina entre os resíduos 17 e 18. Porém, 4 resíduos dessa cauda ainda são mantidos nas proteínas após proteólise com trombina, a seqüência GSHM, que se torna o N-terminal do polipeptídeo maduro.

Foi utilizado o kit “Thrombin CleanCleave” (Sigma) para a remoção da cauda N-terminal de VirB9_{His-154-255} e Xac2622_{His-24-139}, que resultou na geração das proteínas VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e Xac2622₂₄₋₁₃₉. Brevemente, 9 volumes de proteína em 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM CaCl₂ foram misturados a 1 volume de trombina-agarose. A mistura foi incubada a temperatura ambiente, sob agitação branda, por 2 h. Em seguida, o sistema foi centrifugado por 5 minutos a 1000 g. O sobrenadante obtido foi submetido a cromatografia de filtração em gel em coluna S75 (GE Healthcare). Essa etapa de purificação foi realizada para a separação das caudas N-terminais, que contém o trecho de poli-histidina, do restante da proteína.

Tabela 4. Etapas da purificação das proteínas recombinantes.

Proteína	Etapas cromatográficas	Tampões utilizados
VirB4 _{His-1-817}	Afinidade Filtração em gel S200	Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 20 mM Imdz, 10 % (v/v) glicerol; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Tp. E: Tp. C, porém sem Imdz; Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) glicerol
VirB8 _{His-70-348}	Afinidade Filtração em gel S75 Reenovelamento	Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imdz, 8 M uréia; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Tp. E: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 14 mM 2-mercaptoetanol, 8 M uréia Tp. Final: 10 mM AcNa pH 5,0
VirB9 ₃₄₋₂₅₅	SP-sepharose Filtração em gel S75 Reenovelamento	Tp. A: 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 1 mM EDTA, 8 M uréia; Tp. B: Tp. A + 500 mM NaCl Tp. E: 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 100 mM NaCl, 8 M uréia Tp. Final: 10 mM AcNa pH 5,0
VirB9 _{His-154-255}	SP-sepharose Afinidade Remoção do His-tag Nt Filtração em gel S75	Tp. A: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA; Tp. B: Tp. A + 400 mM NaCl, porém sem EDTA Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 20mM Imdz; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Etapa opcional (tópico 3.1.5) Tp. E: 20 mM AcNa pH 5,0, 100 mM NaCl; Tp. Final: 10 mM AcNa pH 5,0, 50mM NaCl ou 5mM Tris-Cl pH 7,5
VirB10 _{His-85-389}	Afinidade Reenovelamento	Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imdz, 8 M uréia; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 14 mM 2-mercaptoetanol
VirD4 _{His-83-557}	Afinidade Filtração em gel S200	Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 200 mM NaCl, 20 mM Imdz, 10 % (v/v) glicerol; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Tp. E: Tp. C, porém sem Imdz; Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) glicerol
Xac0466 _{His-484-589}	SP-sepharose Afinidade	Tp. A: 20 mM AcNa pH 5,0, 1 mM EDTA; Tp. B: Tp. A + 1 M NaCl, porém sem EDTA Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM Imdz; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
Xac2609 ₁₋₄₃₁	Q-sepharose Filtração em gel S200	Tp. A: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 14 mM 2-mercaptoetanol; Tp. B: Tp. A + 500 mM NaCl Tp. E: Tp.A + 100 mM NaCl; Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 7,0
Xac2609 ₃₁₁₋₄₃₁	Q-sepharose Filtração em gel S75	Tp. A: 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5, 1 mM EDTA; Tp. B: Tp. A + 300 mM NaCl Tp. E: Tp.A + 100 mM NaCl; Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 7,0
Xac2610 _{His-22-267}	Q-sepharose Afinidade	Tp. A: 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 1 mM EDTA; Tp. B: Tp. A + 500 mM NaCl, porém sem EDTA Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imdz; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 7,0
Xac2610 ₅₅₋₂₆₇	Q-sepharose Filtração em gel S200	Tp. A: 20 mM fosfato de sódio pH 6,5; Tp. B: Tp. A + 1 M NaCl Tp. E: 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 100 mM NaCl; Tp. Final: 10 mM Tris-HCl pH 7,0, 20 mM NaCl
Xac2622 _{His-24-139}	Q-sepharose Afinidade Remoção do His-tag Nt Filtração em gel S75	Tp. A: 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA; Tp. B: Tp. A + 300 mM NaCl, porém sem EDTA Tp. C: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 20 mM Imdz; Tp. D: Tp. C + 500 mM Imdz Etapa opcional (tópico 3.1.5) Tp. E: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl; Tp. Final: 10 mM AcNa pH 5,0, 50 mM NaCl
Xac2622 ₅₁₋₁₃₄	Q-sepharose Filtração em gel S75	Tp. A: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA; Tp. B: Tp. A + 500 mM NaCl Tp. E: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl; Tp. Final: 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl

AcNa: acetato de sódio; Afinidade: cromatografia em coluna contendo Ni⁺²; Imdz: imidazol; Nt: N-terminal; Tp: tampão.

3.2. Caracterização de proteínas

3.2.1. Experimentos de fluorescência

Os principais componentes fluorescentes em proteínas são as cadeias laterais aromáticas de tirosina e triptofano, particularmente o anel indol do segundo. O comprimento de onda de emissão fluorescente da cadeia lateral do triptofano é uma forma muito sensível de se avaliar o ambiente desses grupamentos. Resíduos de triptofano, quando expostos à água, fluorescem com emissão máxima de aproximadamente 350 nm, enquanto que, quando em ambientes apolares, emitem com máximo de aproximadamente 330 nm (Creighton, 1993).

Ensaio de fluorescência foram realizados em um espectrofluorímetro ATF 105 (Aviv). Adicionou-se na cubeta da amostra 1-2 μM de proteína em 1,5 mL de tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,0 ou 10 mM acetato de sódio pH 5,0, com ou sem 5,75-8 M uréia, e o mesmo tampão na cubeta de referência. As amostras foram equilibradas por 3 minutos, excitadas a 280 nm, e a fluorescência foi analisada entre 300-400 nm. Todos os ensaios foram realizados a 25 °C.

Foram feitos experimentos de varredura térmica, onde se variava à temperatura (10-70 °C) e se observava à queda da fluorescência a 338 nm, resultante da exposição dos resíduos de triptofano durante a desnaturação das proteínas.

Experimentos de interação proteína-proteína (X - Y) utilizando fluorescência foram feitos pela adição sucessiva de 0,1 μM de alíquotas da proteína Y em uma amostra contendo 1 μM da proteína X em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,0 ou 10 mM

acetato de sódio pH 5,0. A concentração final da proteína Y na titulação foi 2-2,5 μM . As amostras foram pré-equilibradas por 3 minutos a 25 °C, excitadas a 295 nm e a emissão de fluorescência detectada entre 335-345 nm, com intervalos de 2 nm. Com isso, estávamos monitorando a variação da fluorescência da proteína X causada pela adição da proteína Y, ou a variação de fluorescência da proteína Y após sua interação com a proteína X, em cada etapa da titulação. Não é possível se afirmar com esse experimento de que proteína é o triptofano que sofreu mudança de ambiente químico, ou se as duas proteínas contribuíram para esse fenômeno.

Foram feitas correções para a diluição causada pela adição da proteína Y e para a absorção de cada proteína, esta última correção utilizando a seguinte fórmula:

$$F_{\text{cor}} \cong F_{\text{obs}} \text{ antilog} (OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}} / 2) \quad (1)$$

F_{cor} : Fluorescência corrigida para a absorção. F_{obs} : Fluorescência observada não corrigida. OD_{ex} : absorbância no comprimento de onda de excitação. OD_{em} : absorbância no comprimento de emissão.

A constante de dissociação foi calculada pelo programa SigmaPlot 2000 (Systat Software Inc.), usando um ajuste de regressão não linear das curvas de titulação de fluorescência à equação 2 (Correa e Farah, 2007; Correa *et al.*, 2008):

$$F = (v/V) \left((\alpha - 1) / (2[X])([X] + [Y] + K_d - ((([X] + [Y] + K_d)^2 - 4[X][Y])^{1/2}) + 1) \right) \quad (2)$$

F: fluorescência em um dado ponto da titulação (mudança causada pela adição de Y); v: volume inicial; V: volume em um dado ponto da titulação; [X] e [Y]: concentrações das proteínas X e Y, respectivamente, em um dado ponto da titulação; K_d : constante de dissociação; α : fluorescência máxima / fluorescência inicial.

3.2.2. Experimentos de dicroísmo circular

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica muito útil para se estudar estrutura secundária (UV distante; 190-250 nm) e terciária (UV próximo; 250-320 nm) de proteínas (Ranjbar e Gill, 2009). Proteínas com alto conteúdo de α -hélices possuem bandas negativas em 208 e 222 nm e positiva em 193 nm, proteínas com caráter β possuem banda negativa a 215 nm e positiva a 195 nm, enquanto proteínas desenoveladas possuem elipsidade próxima a 0 em comprimentos de onda maiores que 210 nm e banda negativa próxima a 195 nm (Figura 9) (Greenfield, 2006).

Ensaio de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro J-720 (Jasco, Inc.). As proteínas eram tipicamente utilizadas na concentração de 10 μ M, usando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 mm. Foram realizadas varreduras de 190-260 nm a 25 °C. Os tampões utilizados variaram dependendo da proteína sendo analisada, mas na maioria dos casos se usava 5 mM Tris-HCl pH 7,0 (Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267}, Xac2622_{His-24-139}) ou 5 mM acetato de sódio pH 5,0 (VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅ e VirB10_{His-85-389}). Em geral, os ensaios foram coletados em intervalos de 1 nm usando um tempo de resposta de 2 s, velocidade de 20 nm/min e 8 coletas para cada comprimento de onda. Experimentos de varredura térmica foram feitos com variação de temperatura entre 4-70 °C e monitoramento a 222 nm em uma taxa de 1 °C/min.

A elipsidade molar residual $[\theta]$ (deg x cm² x dmol⁻¹) foi calculada utilizando a seguinte fórmula (Greenfield, 2006):

$$[\theta] = \frac{\text{elipsidade } (\theta; \text{ mdeg})}{\text{caminho da cubeta (mm)} \times \text{concentração da proteína (M)} \times (\text{n}^\circ \text{ aminoácidos} - 1)} \quad (3)$$

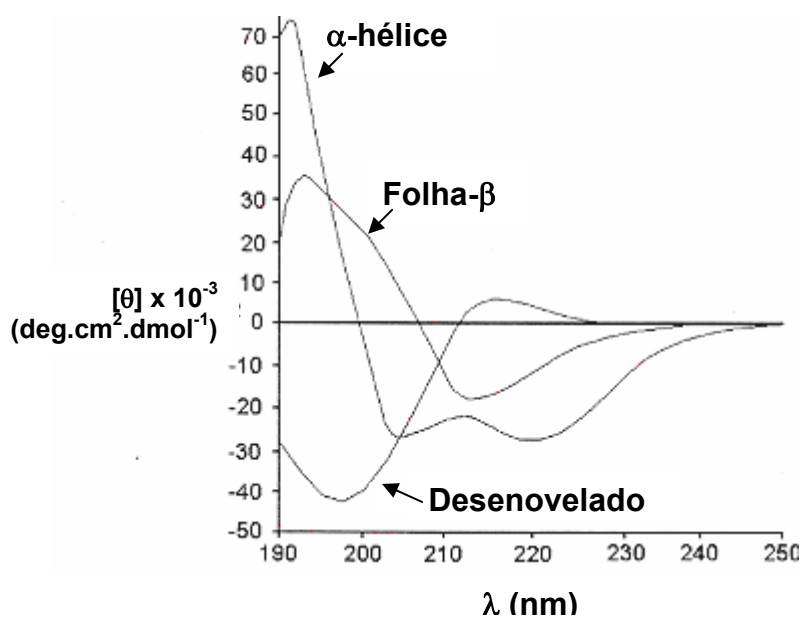


Figura 9. Espectros de dicroísmo circular de proteínas com alto conteúdo de α -hélices, folhas- β ou de um polipeptídeo predominantemente desenovelado.

3.2.3. Ensaio de proteólise limitada

Experimentos de proteólise limitada de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267} e do complexo Xac2609₁₋₄₃₁ - Xac2610_{His-22-267} foram feitos usando as enzimas tripsina, quimotripsina e proteinase K. As diferentes proteases (0,1-1 μ g/mL) foram incubadas com os substratos (240-400 μ g/mL) em 50 mM Tris-HCl pH 7,5, na presença ou ausência de 250 mM Na₂SO₄. Todas as reações foram realizadas a 30 °C. A reação era interrompida em diferentes tempos (0, 2, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 minutos) pela adição de tampão de amostra para SDS-PAGE (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 3,7 % (p/v) SDS, 18,7 % (v/v) glicerol, 140 mM 2-mercaptoetanol e 0,01 % (p/v) azul de bromofenol), seguido de fervura. A análise da degradação das proteínas foi feita por SDS-PAGE.

3.2.4. Espectrometria de massa

As proteínas recombinantes foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-ToF (Dessorção de Matriz Assistida por Laser / Tempo-de-Vôo) em concentração de 10-100 μ M. A matriz utilizada continha 10 mg/mL de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico, 50 % (v/v) acetonitrila e 0,5 % (v/v) ácido trifluoroacético. Prepararam-se 3 misturas proteína/matriz (v/v) 1:1, 1:10 e 1:100, que foram montadas sobre uma placa de vidro umedecida com isopropanol. Foram recolhidas 0,5 μ L destas misturas e aplicadas nos poços adequados.

O equipamento de espectrometria de massa MALDI-Tof (GE Healthcare) e o programa utilizado (Ettan MALDI-ToF Pro Version 2.0) foram configurados com os seguintes parâmetros: coleta para proteína linear, limite de detecção de 1000 m/z, 8 pulsos de laser por segundo, potencial de aceleração de 20 kV, pressão de vácuo inferior a $1,5 \cdot 10^6$ bar, acumulação de 200 espectros por varredura, filtro ABC, sinal de ruído mínimo de 10 e limite mono-isotópico de 10. O equipamento foi operado pela Dra. Izaura N. Toma, (Laboratório de Lesões em Biomoléculas, IQ/USP).

3.2.5. Sequenciamento N-terminal de proteínas

O fragmento proteolítico de Xac2610_{His-22-267} foi submetido a SDS-PAGE e “Western blot”, conforme tópico 3.3.3, porém utilizando membrana de PVDF ao invés de nitrocelulose. O fragmento proteolítico foi visualizado na membrana por coloração com “Rouge Ponceau S” e a banda contendo esta proteína foi cortada. O seqüenciamento automático de aminoácidos N-terminal por degradação de Edman

foi realizado em um seqüenciador modelo PPSQ/23 (Shimadzu) pela Dra. Izaura Y. Hirata do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM.

3.3. Interações proteína-proteína

3.3.1. Ensaio de “Pull down”

“Pull down” é um ensaio para se testar a interação *in vitro* entre proteínas, baseado na ligação específica de apenas um dos polipeptídeos a uma resina de afinidade. Para a análise da interação entre as proteínas Xac2609 e Xac2610_{His-22-267} (contendo uma cauda de poli-histidina) foram realizados ensaios de “Pull down” a temperatura ambiente. As proteínas Xac2610_{His-22-267} e Xac2609 e um lisado de *E. coli* foram dialisados contra tampão de “Pull down” (25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 3 mM 2-mercaptoetanol, 5 mM imidazol [pH 8,4]). Em uma alíquota de 0,35 mL de resina de sepharose quelada com Ni²⁺ (GE Healthcare) em tampão de “Pull down”, foi adicionada a proteína Xac2610_{His-22-267} para uma concentração final de 100 µM. Simultaneamente, foram adicionados 10 µM de Xac2609 ou um lisado derivado de 10 mL de cultura de *E. coli* BL21(DE3) (A₆₀₀ = 0,8) ou ambos. Em experimentos controle, a resina foi misturada com somente Xac2610_{His-22-267} ou com uma mistura de Xac2609 e o lisado bacteriano sem Xac2610_{His-22-267}. As misturas foram lavadas por 3 vezes com 1 mL de tampão de lavagem (25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 3 mM 2-mercaptoetanol, 50 mM imidazol [pH 8,6]). Proteínas ligadas foram removidas com 30 µL de tampão de eluição (25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 3 mM 2-

mercaptoetanol, 500 mM imidazol [pH 8,9]). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 18 %.

3.3.2. Produção de anticorpos policlonais

500 μ L das proteínas VirB₉₃₄₋₂₅₅, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267} e Xac2622₂₄₋₁₃₉ (100-200 μ g) foram misturadas a igual volume de adjuvante de Freund. As amostras eram homogeneizadas e aplicadas em coelhos machos da raça Nova Zelândia Branco (1-2 coelhos por proteína). Foram aplicadas 4 doses em cada coelho (uma dose por semana), sendo que a primeira aplicação utilizava adjuvante completo de Freund e as aplicações subseqüentes adjuvante incompleto. Amostras de sangue foram retiradas dos coelhos uma semana após a última aplicação. O sangue era incubado por 1 hora a 37 °C para que ocorresse coagulação, e o soro era obtido do sangue coagulado por centrifugação a 5000 g por 15 minutos. Os títulos dos anticorpos foram determinados por “Western blot” utilizando diferentes diluições dos soros (1:1000; 1:3000; 1:10000).

3.3.3. “Western Blot” e “Overlay”

Anticorpos produzidos contra os polipeptídeos foram utilizados para experimentos de “Western blot”. As proteínas recombinantes foram transferidas de um gel de SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose em uma cuba de transferência semi-seca (Trans-Blot SD Biorad) por 30 minutos a 15 V, utilizando tampão de transferência 0,58 % (p/v) Trizma base, 0,29 % (p/v) glicina, 0,037 % (p/v)

SDS e 20 % (v/v) etanol. A membrana com as proteínas adsorvidas foi incubada a temperatura ambiente por 2 h em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5 % (p/v) em tampão 0,244 % (p/v) Trizma base, 0,8 % (p/v) NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20 e 0,1 % (v/v) Triton X-100). Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h em solução de bloqueio contendo o anticorpo policlonal produzido em coelhos (em diferentes diluições), lavada 3 vezes com solução de lavagem (solução de bloqueio sem leite em pó desnatado) por 15 minutos e incubada com o conjugado (proteína A-peroxidase em solução de bloqueio, 1:20000, Sigma) por 2 h. Após nova lavagem, a revelação foi feita com o kit comercial “ECL Advance Western Blotting” (GE Healthcare) em uma câmara escura utilizando filme auto-radiográfico e solução reveladora e fixadora Kodak RP X-OMAT.

Em alguns casos, foi utilizado como conjugado um anticorpo anti-IgG de coelho-fosfatase alcalina (1:10000, Sigma). Nesse caso, a revelação ocorria utilizando como substratos 0,3 mg/mL de NBT e 0,15 mg/mL de BCIP em 10 mL de tampão APB (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂).

O ensaio de “overlay”, ou “far Western blot”, é um experimento de “Western blot” modificado. Após o bloqueio da membrana, ocorre uma incubação extra durante a noite com uma proteína (50 µg/mL) que se deseja testar a interação com os polipeptídeos transferidos para a membrana de nitrocelulose. Após lavagem, utiliza-se um anticorpo primário anti-proteína incubada, seguido da adição do conjugado e revelação. Com isso, esse experimento permite avaliar em que local da membrana a proteína incubada ficou retida, indicando que ocorreu interação específica com uma ou mais proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose.

3.3.4. Ligação cruzada com glutaraldeído

Xac2622₂₄₋₁₃₉ foi pré-equilibrada em diferentes concentrações (27-720 μM) em tampão 10 mM acetato de sódio pH 5,0 e 50 mM NaCl por 15 minutos, seguido de sua incubação com 0,01 % (v/v) glutaraldeído a 40 °C. Após 20 minutos, as reações de ligação cruzada (“cross-linking”) foram interrompidas pela adição de tampão de amostra para SDS-PAGE. Os produtos de “cross-linking” foram analisados por Tricina SDS-PAGE 16 % (Schagger, 2006).

3.3.5. Simulações de “docking” proteína-proteína

Simulações computacionais de “docking” estão sendo feitas usando o programa HADDOCK (Dominguez *et al.*, 2003). As estruturas de RMN de Xac2622₂₄₋₁₃₉ estão sendo utilizadas em conjunto com informações experimentais (dados de perturbação do deslocamento químico devido à diluição da proteína e NOEs intermoleculares).

A simulação é feita em três etapas. Inicialmente o programa gera 1000 modelos de partida, em que a orientação de uma molécula com relação à outra é randomizada. Em seguida realiza-se uma dinâmica molecular com anelamento simulado durante a qual as duas moléculas, consideradas como corpos rígidos, podem aproximar-se. A orientação entre elas é otimizada de forma a minimizar um termo de energia relacionado aos dados experimentais. Em uma segunda etapa, 100 modelos de menor energia são submetidos a uma nova etapa de anelamento simulado em que o esqueleto peptídico e as cadeias laterais da região de interface

ganham flexibilidade gradualmente. A terceira etapa corresponde a um refinamento por dinâmica molecular em espaço cartesiano, na presença de solvente explícito e com as cadeias laterais e o esqueleto peptídico flexíveis. Os 100 modelos obtidos após refinamento em água são agrupados em conjuntos com base no desvio padrão das coordenadas em relação à estrutura de menor energia.

Experimentos de “docking” estão sendo realizados em colaboração com o Dr. Roberto Kopke Salinas, jovem pesquisador do Instituto de Química/USP e pós-doutorando do Departamento de Química e Bioquímica, Florida State University.

3.4. Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

3.4.1. Marcação isotópica de proteínas com ^{15}N e ^{13}C

Estudos de RMN heteronuclear 2D e 3D de proteínas necessitam que estas sejam marcadas com isótopos de determinados átomos (^{15}N e/ou ^{13}C). Para que isso ocorra, é necessário induzir os polipeptídeos em meio mínimo, tendo fontes únicas de nitrogênio ($^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ ou $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) e de carbono (^{12}C -glicose ou ^{13}C -glicose). A expressão de proteínas com marcação isotópica para RMN segue os mesmos passos da produção de proteínas em meio rico (tópico 3.1.3), porém com algumas diferenças, discutidas a seguir.

Os plasmídeos pET28a-VirB9_{His-154-255}, pET11a-Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, pET28a-Xac2622_{His-24-139} e pET11a-Xac2622₅₁₋₁₃₄ foram utilizados para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)RP por choque térmico, que foram usadas para os experimentos de produção de proteínas. As induções em larga escala (1 L) foram

realizadas pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,5 mM quando à densidade celular a 600 nm (A_{600}) atingia 0,8-1,2 (4-6 h de indução a 37°C e agitação de 200 RPM). Foi utilizado o meio mínimo M9, com a seguinte composição final: 50 mM Na_2HSO_4 , 20 mM KH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 2 mM MgSO_4 , 10-20 mM (^{12}C ou ^{13}C)-Glicose, 0,1 mM CaCl_2 , 10-20 mM $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ ou $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e antibióticos adequados. A purificação das proteínas marcadas era realizada da mesma forma que o isolamento dos polipeptídeos não marcados (tópico 3.1.4).

3.4.2. Preparação de amostra e coleta de dados de RMN

Realizaram-se experimentos de RMN em amostras marcadas com ^{15}N ou $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. Todos os estudos de RMN das proteínas Xac2622₂₄₋₁₃₉, VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e os complexos Xac2622₂₄₋₁₃₉-VirB9₃₄₋₂₅₅ e Xac2622₂₄₋₁₃₉-VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foram feitos em tampão 10 mM acetato de sódio deuterado pH 5,0, 50 mM NaCl, 7 % (v/v) D_2O , 0,05 % (p/v) NaN_3 e 1 mM TSP a 40 °C, a menos que especificado em contrário. A análise de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ era realizada a 25 °C em tampão 10 mM fosfato de sódio pH 6,5, 7 % (v/v) D_2O , 0,05 % (p/v) NaN_3 , 1 mM TSP \pm 580 mM NaCl.

Os experimentos de RMN foram adquiridos na Central Analítica do IQ/USP, em um espectrômetro Bruker DRX operando a 500 MHz, equipado com uma sonda TXI de 5mm, três canais para $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ e gradiente de campo na direção do eixo z; no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em um aparelho Varian INOVA 600AS operando a 600 MHz, equipado com sonda criogênica de 5 mm, três canais para $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ e gradiente de campo na direção do eixo z e no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (UFRJ), em um espectrômetro Bruker Avance III

operando a 800MHz, com sonda de 5 mm, três canais para $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ e gradiente de campo nos eixos x, y e z.

A coleta de dados de RMN e a sua análise contaram com a supervisão do Dr. Roberto Kopke Salinas, jovem pesquisador do Instituto de Química/USP e pós-doutorando do Departamento de Química e Bioquímica, Florida State University.

3.4.3. Assinalamento de frequências de ressonância

Assinalamento de ressonâncias em RMN significa a identificação específica das frequências de cada núcleo de ^1H , ^{15}N e ^{13}C da proteína, e é a primeira etapa para se determinar a estrutura de uma proteína em solução. Tipicamente, diversos experimentos tridimensionais são coletados, e a denominação destes experimentos descreve as transferências de magnetização via acoplamento escalar que ocorrem, e quais sinais são detectados. Por exemplo, experimentos HNCA e HN(CO)CA identificam as ressonâncias de $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ e $^{13}\text{C}\alpha$, sem que ocorra a detecção da carbonila em HN(CO)CA (Figura 10).

Teoricamente, somente a coleta do HNCA já possibilitaria o assinalamento de todos os $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ e $^{13}\text{C}\alpha$ de uma proteína, pois a frequência de $^{13}\text{C}\alpha$ vista por um resíduo como sendo $i-1$ seria identificada como a frequência i de outro aminoácido, e assim sucessivamente, possibilitando sua conexão sequencial e identificação específica. Contudo, diversos resíduos possuem frequências de $^{13}\text{C}\alpha$ muito semelhantes, fazendo-se necessária a coleta de vários outros experimentos para o completo assinalamento das ressonâncias desses e de todos os outros núcleos da proteína. Os experimentos usados para assinalamento são descritos em detalhes na

literatura especializada sobre RMN de proteínas (Cavanagh *et al.*, 2006; Rule e Hitchens, 2006; Sattler *et al.*, 1999).

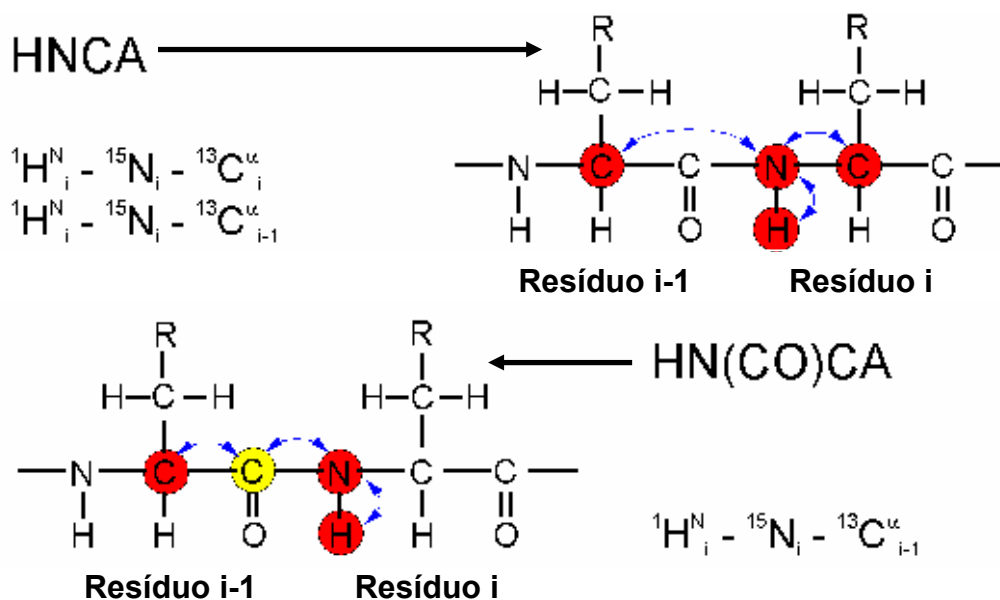


Figura 10. Experimentos HNCA e HN(CO)CA. No primeiro, ocorre a transferência de magnetização sucessiva de $^1\text{H}^{\text{N}}$ para $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ e $^{13}\text{C}_\alpha$ do aminoácido i e i-1, e posterior retorno para detecção em $^1\text{H}^{\text{N}}$. No segundo, a transferência segue de $^1\text{H}^{\text{N}}$ para $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ e $^{13}\text{C}_\alpha$, passando pelo $^{13}\text{C}_\text{CO}$, e retorno para detecção em $^1\text{H}^{\text{N}}$. A passagem pelo $^{13}\text{C}_\text{CO}$ faz com que ocorra a detecção do $^{13}\text{C}_\alpha$ apenas do aminoácido i-1 em HN(CO)CA.

Assinalamento dos deslocamentos químicos da cadeia principal de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ foi realizado utilizando os experimentos 2D ^{15}N -HSQC e 3D HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB e CBCA(CO)NH, enquanto o assinalamento das ressonâncias da cadeia lateral foi determinado usando 2D ^{13}C -HSQC, ^1H - ^1H -TOCSY, ^1H - ^1H -NOESY e 3D HNHA, HBHA(CBCACO)NH, ^{15}N -TOCSY-HSQC, H(CCO)NH-TOCSY, (H)CC(CO)NH-TOCSY, ^{15}N -NOESY-HSQC, HCCH-TOCSY e ^{13}C -NOESY-HSQC (o último experimento nas regiões alifática e aromática). O HCCH-TOCSY e os 2 espectros ^{13}C -NOESY-HSQC foram coletados em >99% (v/v) D₂O. O assinalamento das ressonâncias da cadeia principal de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ em complexo com ^{14}N -VirB9Ct₁₅₄₋₂₅₅ foi obtido utilizando 2D

^{15}N -HSQC e 3D HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HNCACB, CBCA(CO)NH, HBHA(CBCACO)NH e ^{15}N -NOESY-HSQC. Em geral, os experimentos de tripla ressonância foram adquiridos com 96 pontos complexos na dimensão de ^{15}N , 128 pontos complexos na dimensão de ^{13}C e 1024 pontos na dimensão de ^1H . O tempo de mistura para os NOESY era de 100 ms.

Os espectros de RMN foram processados utilizando os programas NMRPipe/NMRDraw (Delaglio *et al.*, 1995), com multiplicação dos FIDs por função de janela cossenoidal (“sine-bell”) e preenchimento com zeros (“zero filling”) dobrando o número de pontos. O assinalamento foi realizado utilizando o programa CCPN Analysis (Vranken *et al.*, 2005). A análise da estrutura secundária baseada em deslocamentos químicos de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha e em complexo com ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foi feita com os programas TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) e CSI (Wishart e Sykes, 1994), utilizando as ressonâncias assinaladas dos núcleos $^1\text{H}_\alpha$, $^1\text{H}^\text{N}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, ^{13}CO e $^{15}\text{N}^\text{H}$. As frequências assinaladas de ^1H , ^{15}N e ^{13}C de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram depositadas no Banco de Dados de Ressonância Magnética Biológica (BMRB) com código de acesso 16351.

3.4.4. Determinação estrutural em solução por RMN

Restrições de ângulos diedrais φ e ψ de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram obtidas da análise de TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, ^{13}CO e $^{15}\text{N}^\text{H}$. Restrições de distância do tipo NOE (“Nuclear Overhauser Effect”) foram coletadas manualmente de espectros ^{15}N -NOESY-HSQC e ^{13}C -

NOESY-HSQC (regiões alifática e aromática) usando CCPN Analysis (Vranken *et al.*, 2005).

Cálculos estruturais iniciais foram realizados por CYANA 2.1 (Herrmann *et al.*, 2002), utilizando protocolo de anelamento simulado com dinâmica molecular torcional em 10000 passos com 7 ciclos. As tolerâncias de deslocamento químico para assinalamento automático de NOEs por CYANA foram ajustadas para $\pm 0,025$ ppm na dimensão direta de ^1H , $\pm 0,030$ ppm na dimensão indireta de ^1H e ± 0.25 ppm para heteronúcleos. 300 modelos foram calculados e os 50 com menor função alvo de minimização (“target function”) foram selecionados para posterior refinamento.

Os 50 modelos gerados por CYANA foram refinados em solvente explícito usando HADDOCK (Dominguez *et al.*, 2003), e 20 modelos foram selecionados utilizando um critério de energia de HADDOCK. A qualidade das estruturas foi analisada usando PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996) e PSVS (Bhattacharya *et al.*, 2007) e as figuras geradas por MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) e PYMOL (DeLano Scientific LLC). Os 20 modelos finais de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram depositados no “Protein Data Bank” (PDB) com código de acesso 2KK3.

3.4.5. Estudos de relaxação de ^{15}N

O fenômeno de relaxação em RMN se refere ao retorno da magnetização dos spins nucleares ao equilíbrio após excitação e está relacionado com o movimento rotacional de pedaços específicos ou de toda a molécula em solução. Os parâmetros de relaxação habitualmente medidos para proteínas envolvem os tempos de

relaxação ^{15}N -T1 e ^{15}N -T2 e o NOE heteronuclear envolvendo núcleos de ^1H e ^{15}N (Bruschweiler, 2003; Nodet e Abergel, 2007).

T1, ou tempo de relaxação spin-rede, descreve o retorno da magnetização longitudinal (paralela ao campo magnético externo no eixo z) ao estado de equilíbrio, e ocorre exclusivamente devido aos campos magnéticos locais flutuantes produzidos na sua vizinhança ou rede. Para proteínas, T1 é diretamente proporcional a τ_c , ou tempo de correlação rotacional, que é uma medida do tempo médio requerido para uma molécula girar 1 radiano (Rule e Hitchens, 2006). Ou seja, quanto maior o T1 de um spin nuclear, mais tempo leva para o trecho da proteína contendo esse núcleo tombar em solução.

T2, ou tempo de relaxação spin-spin, refere-se ao retorno da magnetização transversal (planos x e y) ao equilíbrio após spins nucleares excitados trocarem energia entre si. O decaimento de T2 é mais rápido do que o de T1, o que faz com que T2 governe a velocidade de queda do sinal detectado em RMN. Diferente de T1, T2 é inversamente proporcional a τ_c , o que o torna o fator limitante para a utilização de RMN para o estudo de proteínas grandes ou de complexos macromoleculares, que possuem τ_c longo e, portanto, T2 curto (Rule e Hitchens, 2006; Tzakos *et al.*, 2006).

$\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE heteronuclear é observado pela saturação do sinal de ^1H , que transfere magnetização via NOE e ocasiona alteração da intensidade do sinal de ^{15}N . Este experimento gera informações a respeito do movimento de vetores ^1H - ^{15}N individuais, e aqueles que sofrem movimentos mais rápidos (escala de tempo de sub-nanosegundos) que o tombamento global de uma proteína enovelada mostram uma diminuição da intensidade de $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE em relação à média observada para o restante da molécula. Portanto, regiões rígidas de proteínas possuem valores

positivos de $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE heteronuclear, enquanto trechos desenvolvidos apresentam valores negativos (Cavanagh *et al.*, 2006; Rule e Hitchens, 2006).

Dados de relaxação ^{15}N -T1, ^{15}N -T2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE Heteronuclear foram coletados a 40 °C em um equipamento Varian 600 MHz. Esses dados foram obtidos para ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha (100 μM e 800 μM) e em complexo (400 μM) com ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅. Os tempos de espera de evolução usados nos experimentos de ^{15}N -T1 eram 50 (x2), 250, 450, 650, 850, 1050, 1250, 1450 e 1650 ms; e nos ensaios de ^{15}N -T2 eram 10 (x2), 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190 e 210 ms. As curvas das intensidades dos picos cruzados em função dos intervalos de tempo (t) foram ajustadas a uma equação de decaimento exponencial:

$$I(t) = I_0 \exp(-Rt) \quad (4)$$

Onde $I(t)$ é a intensidade do pico cruzado no intervalo t. I_0 é a intensidade do pico no $t = 0$, R é a taxa de relaxação R1 ($1/T1$) ou R2 ($1/T2$). O ajuste das curvas e a estimativa dos parâmetros foram calculados usando um algoritmo de mínimos quadrados não linear implementado no programa GNUPLOT (www.gnuplot.info). As estimativas de erro das intensidades dos picos foram retiradas da diferença do nível do ruído nos espectros. As estimativas de erros das taxas de relaxação foram obtidas dos desvios padrões calculados por GNUPLOT.

O tempo de saturação de ^1H em experimentos $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE Heteronuclear era de 3 s, e a razão entre as intensidades de cada pico em espectros coletados com e sem saturação de ^1H determina o valor de $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE.

3.4.6. Coleta de acoplamentos dipolares residuais (RDCs)

Acoplamentos dipolares derivam da interação entre spins nucleares através do espaço, e produzem desdobramento dos sinais em espectros de RMN. Contudo, estes acoplamentos são anulados quando a molécula tomba isotropicamente em solução, porque assumem com igual probabilidade todas as orientações possíveis em relação ao campo magnético externo. Como em RMN de proteínas as moléculas tombam rapidamente em solução, os acoplamentos dipolares não costumam ser observados. Contudo, ao se estabelecer um pequeno grau de alinhamento das moléculas em solução, podem ser observados pequenos desdobramentos resultantes destas interações, denominadas acoplamentos dipolares residuais ou RDCs. Acoplamentos dipolares contêm informações estruturais valiosas, pois são diretamente relacionados à orientação dos vetores nucleares em relação ao campo magnético externo (Bax e Grishaev, 2005; Bouvignies *et al.*, 2007). Bacteriófagos filamentosos, géis de poliacrilamida, ácidos nucleicos e bicelas lipídicas podem ser usados para causar o leve alinhamento necessário para a coleta dos RDCs (Bax, 2003).

^1H - ^{15}N RDCs foram determinados de experimentos 2D ^{15}N -HSQC modulados por $^1\text{J}_{\text{HN}}$ (Tjandra *et al.*, 1996) em uma amostra de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha ou na presença de ^{14}N -VirB9Ct₁₅₄₋₂₅₅ em um meio cristalino líquido consistindo de 5% C12E5 / n-hexanol ($r = 0.96$) (Ruckert e Otting, 2000). A separação no sinal de $^2\text{H}_2\text{O}$ da amostra alinhada era de aproximadamente 20 Hz e os experimentos foram medidos em um espectrômetro Bruker 500 MHz a 30 °C. Os intervalos de defasagem (“dephasing delay”) utilizados foram 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 26, 30, 34, 38 e 42 ms. Os valores dos acoplamentos dipolares residuais foram

obtidos da diferença entre os $^1J_{HN}$ das amostras em meio isotrópico e anisotrópico. A análise dos RDCs foi realizada usando PALES (Zweckstetter e Bax, 2000) e MODULE (Dosset *et al.*, 2001). O Fator de qualidade ou Fator-Q, utilizado para se avaliar a concordância entre as estruturas e os valores de RDCs experimentalmente obtidos, é definido como (Bax, 2003; Cornilescu *et al.*, 1998):

$$Q = \text{RMS}(\text{RDC}^{\text{calc}} - \text{RDC}^{\text{obs}}) / \text{RMS}(\text{RDC}^{\text{obs}}) \quad (5)$$

Onde RDC^{obs} e RDC^{calc} são os RDCs observados experimentalmente e calculados a partir do tensor de alinhamento predito da forma da proteína sendo analisada, respectivamente. RMS se refere à raiz quadrada da média dos valores.

3.4.7. Estudo de interações proteína-proteína por RMN

As proteínas ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ ou ^{14}N -VirB9₃₄₋₂₅₅ foram tituladas em uma solução contendo 100 μM de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ e espectros ^{15}N -HSQC foram adquiridos após a adição de cada alíquota das diferentes construções de VirB9. O excesso molar final de VirB9 / Xac2622₂₄₋₁₃₉ foi 1,5. Para o estudo do processo de oligomerização de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉, foram coletados ^{15}N -HSQC após cada diluição sucessiva desta proteína (850 - 7 μM). Diferenças de deslocamento químico dos picos cruzados devido a interação, os valores de deslocamento químico composto ($\Delta\delta_{\text{comp}}$), foram calculadas de acordo com a equação 6 (Mulder *et al.*, 1999):

$$\Delta\delta_{\text{comp}} = [(\Delta\delta\text{H}^{\text{N}})^2 + (0,15 \times \Delta\delta\text{N}^{\text{H}})^2]^{1/2} \quad (6)$$

$\Delta\delta\text{H}^{\text{N}}$ e $\Delta\delta\text{N}^{\text{H}}$ (em ppm) são as variações de deslocamento químico dos prótons e nitrogênios amídicos, respectivamente.

3.5. Cristalografia e difração de raios-X

3.5.1. Ensaio de cristalização

Triagens de condições de cristalização foram feitas utilizando-se reagentes comerciais. Foram usados os reagentes Crystal Screen 1 e 2, Index 1 e 2, SaltRx 1 e 2, PEG/Ion Screen 1 e 2, Crystal Screen Lite, MembFac, Quik Screen, Low Ionic Strength (Hampton Research) e Clear Strategy 1 e 2 (Molecular Dimensions Ltd). A técnica de difusão de vapor em gota sentada (“sitting drop”) (Kundrot, 2004) foi utilizada, adicionando-se no reservatório 300 μ L de solução e na gota uma mistura de 1 μ L de proteína (3-30 mg/mL, dependendo da proteína) e 1 μ L da solução do reservatório. As placas de cristalização eram mantidas a 18 °C, e a busca de cristais foi feita utilizando uma lupa com luz polarizada (Leica S6E).

Testes de cristalização foram realizados com as proteínas VirB4_{His-1-817}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB9_{His-154-255}, VirB9₁₅₄₋₂₅₅, VirD4_{His-83-557}, Xac0466_{His-484-589}, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267} (intacta e produto proteolítico), Xac2610₅₅₋₂₆₇, Xac2622_{His-24-139}, Xac2622₂₄₋₁₃₉, Xac2622₅₁₋₁₃₄ e os complexos Xac2609₁₋₄₃₁ - Xac2610_{His-22-267} e VirB9₁₅₄₋₂₅₅ - Xac2622₂₄₋₁₃₉.

3.5.2. Coleta e processamento de dados cristalográficos

Soluções do reservatório suplementadas com 20-25 % (v/v) de glicerol eram utilizadas como crio-protetores para os cristais de VirB9_{His-154-255}, Xac2610₅₅₋₂₆₇ e Xac2622₅₁₋₁₃₄, enquanto cristais de VirD4_{His-83-557} não necessitavam de crio-protetor.

Cristais individuais foram submetidos à difração de raios-X nas linhas de luz síncrotron D03B-MX1 e W01B-MX2 do LNLS e em um ângulo rotatório Rigaku MicroMax-007HF do IQ-USP, acoplados a detectores CCD MAR 165, MAR Mosaic 225 (MAR Research) e detector de placa de imagem dual R-AXIS IV++, respectivamente. Os cristais eram mantidos a uma temperatura de 100 K por um fluxo de N₂ gasoso durante a coleta.

A coleta de dados de Xac2622₅₁₋₁₃₄ foi realizada da seguinte forma na linha W01B-MX2: 360 imagens com 1° de oscilação / imagem, distância do cristal ao detector de 80 mm e comprimento de onda de raios-X de 0,9537 Å. Por sua vez, a coleta de dados de Xac2610₅₅₋₂₆₇ foi feita da seguinte maneira no ângulo rotatório Rigaku MicroMax-007HF: 180 imagens com 1° de oscilação / imagem, distância do cristal ao detector de 150 mm e comprimento de onda de raios-X de 1,5419 Å.

Dados de difração de Xac2622₅₁₋₁₃₄ e Xac2610₅₅₋₂₆₇ foram indexados, integrados e escalonados usando HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) e d*TREK (Pflugrath, 1999), respectivamente. O coeficiente de Matthews (Å³.Da⁻¹) e o conteúdo de solvente (%) foram determinados pelo programa "Cell Content Analysis", presente no pacote CC4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

3.5.3. Resolução das fases cristalográficas

As ondas eletromagnéticas detectadas em um experimento de difração de raios-X possuem fase, que é uma das informações mais importantes para se identificar a distribuição dos elétrons no material espalhador de raios-X, que são as moléculas que se repetem para formar o cristal. Entretanto, as fases não podem ser

determinadas diretamente durante um experimento de difração. Estimativas iniciais das fases para cristais de proteínas podem ser obtidas de uma variedade de formas: por substituição molecular, que utiliza estimativas iniciais das fases a partir de um modelo protéico homólogo (tipicamente > 25 % de identidade); substituição isomórfica, que necessita de cristais isomorfos contendo átomos pesados; e dispersão anômala, que utiliza átomos que possuam espalhamento anômalo, tipicamente selênio, que pode ser incorporado diretamente em proteínas, substituindo o enxofre em resíduos de metionina (Taylor, 2003).

A estimativa inicial das fases cristalográficas de Xac2622₅₁₋₁₃₄ foi obtida pelo programa Phaser (Mccoy *et al.*, 2007) por substituição molecular, utilizando como modelo de busca o mesmo fragmento (resíduos 51-134) da proteína Xac2622₂₄₋₁₃₉, resolvida por RMN (tópico 3.4.4).

3.5.4. Refinamento de dados cristalográficos

O modelo de Xac2622₅₁₋₁₃₄ está sendo refinado iterativamente usando o programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004), baseado em mapas de densidade $2Fo - Fc$ e $Fo - Fc$. Ajuste manual do modelo está sendo intercalado com rodadas de refinamento por REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Vagin *et al.*, 2004), com 5% das reflexões randomicamente excluídas para o cálculo do R_{free} e com Fatores-B anisotrópicos individuais para cada átomo. Moléculas de H₂O foram adicionadas por Coot e checadas manualmente baseando-se na intensidade dos picos, forma da densidade eletrônica e capacidade de formação de pontes de hidrogênio com resíduos da proteína ou outras moléculas de H₂O. Os programas utilizados para

refinamento fazem parte do pacote CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

Durante o refinamento, a geometria, qualidade estrutural e compatibilidade do modelo com os dados experimentais estão sendo monitoradas por Coot, REFMAC5, PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), MolProbity (Chen *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2007) e RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003). As figuras foram produzidas pelos programas Coot, MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) e PYMOL (DeLano Scientific LLC).

3.6. Nocaute do gene *xac2622*

Os experimentos com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram realizados em colaboração com o doutorando Maxuel de Oliveira Andrade, que gerou a cepa mutante $\Delta xac2622$.

3.6.1. Construção do plasmídeo pNPTS- $\Delta xac2622$

Para a obtenção do plasmídeo para nocaute do gene *xac2622* de *Xac*, foram amplificados por PCR 2 fragmentos de 1 kb que flanqueiam este gene, usando os pares de oligonucleotídeos 5'Nt/3'Nt, para a região a montante ("upstream"), e 5'Ct/3'Ct, para a região a jusante ("downstream") (Tabela 5). Os fragmentos amplificados foram digeridos com a enzima *Nco*I, cujo sítio se encontra nos oligos 3'Nt e 5'Ct. Os DNAs digeridos foram então ligados por 12 horas a 16 °C, utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). A ligação gerou um fragmento de aproximadamente 2 kb, que codifica no seu centro uma ORF com apenas 8 códons (GTG AAT ATC CAT GGC GCC AAG CTC). O DNA de 2 kb foi amplificado por PCR

com os oligos 5'Nt e 3'Ct, e posteriormente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, cujos sítios encontram-se nos oligos utilizados para amplificação. Por fim, esse fragmento foi clonado no sítio de *Bam*HI do vetor suicida pNPTS138 (M. R. K. Alley, não publicado), produzindo o plasmídeo pNPTS- Δ *xac*2622. Com isso, foi construído um plasmídeo que possui as regiões que flanqueiam o gene *xac*2622; contudo, sem possuir o gene em si.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para construção do plasmídeo pNPTS- Δ *xac*2622.

Oligonucleotídeo (Orientação / Sítio de restrição)	Seqüência 5' → 3' (Sítios de restrição sublinhados)
5'Nt- <i>Bam</i> HI	TTCTGGATCCGCTGCAACCAGTGCGGACG
3'Nt- <i>Nco</i> I	TACATCCATGGATATTCACCTCTGACTTCTCCAACCTCATG
5'Ct- <i>Nco</i> I	GTCGTCCATGGCGCCAAGCTCTAAGGGCTGC
3'Ct- <i>Bam</i> HI	CATTTGGATCCGGCCATCCCAGGCATCG

3.6.2. Produção de mutantes não polares do gene *xac*2622 em *Xac*

O plasmídeo pNPTS codifica a enzima levansucrase (gene *sacB*), que produz um metabólito tóxico quando as células são crescidas em meio contendo sacarose, além de codificar resistência ao antibiótico kanamicina (Kan^r). O vetor pNPTS- Δ *xac*2622 foi confirmado por sequenciamento, e usado para eletroporar células de *Xac*. Para a seleção do primeiro evento de recombinação, os transformantes foram plaqueados em meio 2XYT com 100 μ g/mL de kanamicina. Em seguida, as colônias resistentes a kanamicina foram crescidas em meio 2XYT suplementado com 200 μ g/ml de ampicilina e na ausência de kanamicina, para estimular o segundo evento de recombinação (*Xac* é naturalmente resistente a ampicilina). As células foram diluídas para 10⁴ e 10⁵ em meio 2XYT, e 200 μ L das diluições foram plaqueadas em meio 2XYT contendo 5% (p/v) sacarose e 200 μ g/mL de ampicilina. Após três dias, as colônias que apareceram nas placas foram repicadas em meio 2XYT

suplementado de 5% (p/v) sacarose e 200 µg/mL de ampicilina e em 2XYT contendo 5% (p/v) sacarose, 200 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de kanamicina. Somente as colônias de *Xac* que cresceram em ampicilina e sacarose, mas não em kanamicina (recombinação com perda de *sacB* e Kan^r), foram selecionadas. A confirmação da deleção de *xac2622* foi realizada por PCR, utilizando os oligos 5'Nt e 3'Ct. Clones que amplificavam um fragmento de 2 kb, ao invés do fragmento de 2,4 kb esperado para a linhagem selvagem, foram considerados nocauteados para o gene *xac2622*. Essa cepa foi denominada $\Delta xac2622$.

3.6.3. Ensaio para verificar a virulência no hospedeiro

A virulência *in planta* foi avaliada pela injeção das cepas selvagem e $\Delta xac2622$ de *Xac* em folhas de laranja pêra. Células de *Xac* foram crescidas em meio 2XYT com 100 µg/mL de ampicilina por 20 horas a 30 °C. As densidades celulares a 600 nm (A_{600}) das culturas foram ajustadas para 0,1, e as suspensões de células foram inoculadas com o auxílio de uma agulha na superfície abaxial de folhas jovens de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), em uma área de aproximadamente 2,5 cm². As plantas foram mantidas com temperatura controlada de 28 °C. As folhas foram analisadas periodicamente ao longo de 15 dias após as inoculações, para a observação dos diferentes estágios do desenvolvimento do cancro cítrico no hospedeiro.

3.6.4. Curvas de crescimento *in planta*

Os ensaios de virulência em laranja pêra foram realizados em plantas mantidas 28 °C. Para o monitoramento do crescimento bacteriano no hospedeiro, as cepas de *Xac* foram crescidas e inoculadas como descrito no tópico 3.6.3. As inoculações foram realizadas em triplicata para as cepas selvagem e $\Delta xac2622$ de *Xac*. Discos com área de 10 mm² foram removidos das folhas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação, e macerados em 0,85 % (p/v) NaCl. Diferentes diluições dos macerados foram realizadas em solução 0,85 % (p/v) NaCl e plaqueadas em meio LBON (1 % (p/v) triptona, 0,5 % (p/v) extrato de levedura) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 30 °C e após dois dias o número de colônias foi determinado em triplicata. A média das triplicatas foi utilizada para se obter os pontos da curva de crescimento ao longo do tempo na infecção do hospedeiro.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão, purificação e caracterização de proteínas

4.1.1. Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

A maioria das proteínas de interesse deste trabalho apresentam regiões transmembrana ou peptídeos sinal por serem proteínas de um grande aparato multiprotéico que atravessa as membranas bacterianas interna e externa e possivelmente a membrana plasmática do hospedeiro eucariótico (Christie *et al.*, 2005). Para facilitar a purificação e caracterização dessas proteínas, decidimos amplificar os genes sem as porções preditas por codificarem regiões transmembrana ou sinais de secreção próximas às extremidades das proteínas.

Os genes ou fragmentos gênicos que codificam proteínas do T4SS cromossomal de *Xac* foram clonados em vetores de expressão da série pET (Tabela 3). Estes plasmídios codificam proteínas completas, polipeptídeos sem regiões transmembrana e peptídeos sinal ou apenas domínios isolados dessas proteínas. Os vetores obtidos com os genes de *Xac* foram utilizados para se avaliar que cepas de *E. coli* possibilitavam maior expressão de proteínas recombinantes para VirB1₁₋₂₈₀, VirB1₁₋₁₄₁, VirB4_{His-1-817}, VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB9_{His-154-255}, VirB9₁₅₉₋₂₅₅, VirB10_{His-85-389}, VirB11_{His-1-348} e VirD4_{His-83-557}, que fazem parte do aparato central de secreção do T4SS. Além disso, também foram produzidas as proteínas hipotéticas Xac0466_{His-484-589}, Xac1165₁₋₁₁₂, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₁₋₃₀₈, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610₁₋₂₆₇, Xac2610_{His-1-267}, Xac2610_{His-22-267}, Xac2610₅₅₋₂₆₇, Xac2613₅₂₋₂₇₅, Xac2622_{His-24-139}, Xac2622₅₁₋₁₃₄ e Xac3404₁₋₁₃₂. Estes polipeptídeos são potenciais

substratos que interagem com VirD4 (Xac0466, Xac1165, Xac2609 e Xac3404) ou com VirB9 e VirB11 (Xac2610), e possíveis equivalentes às proteínas VirB5 e VirB7 (Xac2613 e Xac2622, respectivamente), não descritas para o T4SS codificado pelo cromossomo de *Xac* (Alegria *et al.*, 2005). As características e regiões codificadas para cada uma dessas proteínas são descritas na Tabela 6.

A Figura 11 apresenta um exemplo dessa análise de expressão para Xac2610_{His-22-267}. Resultados muito parecidos foram obtidos para as outras proteínas, onde BL21(DE3), BL21(DE3)RP e BL21(DE3)RIL mostraram maior produção de proteínas do que BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)Star. VirB8_{His-70-348} e VirB10_{His-85-389} são exceções, pois expressam apenas na linhagem BL21(DE3)Star (Figura 12 e Tabela 3).

Experimentos de expressão em larga escala, seguidos de lise das células por “French Press” e centrifugação, mostraram que as proteínas VirB4_{His-1-817}, VirB9_{His-154-255}, VirD4_{His-83-557}, Xac0466_{His-484-589}, Xac1165₁₋₁₁₂, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₁₋₃₀₈, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267}, Xac2610₅₅₋₂₆₇, Xac2622_{His-24-139}, Xac2622₅₁₋₁₃₄ e Xac3404₁₋₁₃₂ são solúveis, enquanto VirB1₁₋₂₈₀, VirB1₁₋₁₄₁, VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB10_{His-85-389}, VirB11_{His-1-348}, Xac2610₁₋₂₆₇, Xac2610_{His-1-267} e Xac2613₅₂₋₂₇₅ são predominantemente insolúveis (Figura 13, Tabela 6 e dados não mostrados). VirB9₁₅₉₋₂₅₅ ainda não teve sua solubilidade testada. Xac2610₁₋₂₆₇ e Xac2610_{His-1-267} são insolúveis, enquanto Xac2610_{His-22-267} se encontra na fração solúvel (dados não mostrados), indicando que a região N-terminal hidrofóbica de Xac2610 (Figura 14) favorece a formação de agregados protéicos.

Tabela 6. Proteínas do T4SS de *Xac* sob estudo.

Proteína	Características da proteína heteróloga (resíduos codificados)	PM (kDa)/pI	Expressão	Solubilidade	Purificação
VirB1 ₁₋₂₈₀	B1 completa (1-280)	29,6/9,2	X	Insolúvel	
VirB1 ₁₋₁₄₁	Domínio Nt de B1 (1-141)	15,4/9,1	X	Insolúvel	
VirB4 _{His-1-817}	B4 completa (1-817), His Nt	93,2/6,2	X	Solúvel	X
VirB8 _{His-70-348}	B8 sem 1 TMH Nt (70-348), His Nt	32,1/9,5	X	Insolúvel	X
VirB9 ₃₄₋₂₅₅	B9 sem 1 PS Nt (34-255)	25,8/9,2	X	Insolúvel	X
VirB9 _{His-154-255}	Domínio Ct de B9 (154-255), His Nt	14,3/9,6	X	Solúvel	X
VirB9 ₁₅₄₋₂₅₅	Domínio Ct de B9 (154-255)	12,4/9,5	N/A	Solúvel	X
VirB9 ₁₅₉₋₂₅₅	Domínio Ct de B9 (159-255)	11,6/9,4	X	N/T	
VirB10 _{His-85-389}	B10 sem 1 TMH Nt (85-389), His Nt	34,4/6,0	X	Insolúvel	X
VirB11 _{His-1-346}	B11 completa (1-346), His Nt	40,9/6,5	X	Insolúvel	
VirD4 _{His-83-557}	D4 sem 2 TMH Nt (83-557), His Nt	55,5/9,1	X	Solúvel	X
Xac0466 _{His-484-589}	Domínio Ct 0466 (484-589), His Nt	13,6/7,2	X	Solúvel	X
Xac1165 ₁₋₁₁₂	1165 completa (1-112)	11,9/6,5	X	Solúvel	
Xac2609 ₁₋₄₃₁	2609 completa (1-431)	47,1/6,3	X	Solúvel	X
Xac2609 ₁₋₃₀₈	Domínio Nt de 2609 (1-308)	33,6/6,8	X	Solúvel	
Xac2609 ₃₁₁₋₄₃₁	Domínio Ct de 2609 (311-431)	13,4/5,3	X	Solúvel	X
Xac2610 ₁₋₂₆₇	2610 completa (1-267)	28,8/4,8	X	Insolúvel	
Xac2610 _{His-1-267}	2610 completa (1-267), His Nt	31,0/5,4	X	Insolúvel	
Xac2610 _{His-22-267}	2610 sem 1 PS (22-267), His Nt	28,9/5,3	X	Solúvel	X
Xac2610 ₅₅₋₂₆₇	Domínio Ct de 2610 (55-267)	23,3/4,7	X	Solúvel	X
Xac2613 ₅₂₋₂₇₅	2613 sem 1 PS Nt (52-275)	24,8/5,3	X	Insolúvel	
Xac2622 _{His-24-139}	2622 sem 1 PS (24-139), His Nt	14,7/6,7	X	Solúvel	X
Xac2622 ₂₄₋₁₃₉	2622 sem 1 PS (24-139)	12,9/5,8	N/A	Solúvel	X
Xac2622 ₅₁₋₁₃₄	Domínio Ct de 2622 (51-134)	9,0/4,4	X	Solúvel	X
Xac3404 ₁₋₁₃₂	3404 completa (1-132)	14,4/6,4	X	Solúvel	

Nt: N-terminal; Ct: C-terminal; TMH: α -hélice transmembrana; PS: peptídeo sinal; His: cauda de poli-histidina; X: objetivo atingido. VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram geradas pela remoção do His-tag de VirB9_{His-154-255} e Xac2622_{His-24-139}, respectivamente. N/A: não se aplica. N/T: não testada.

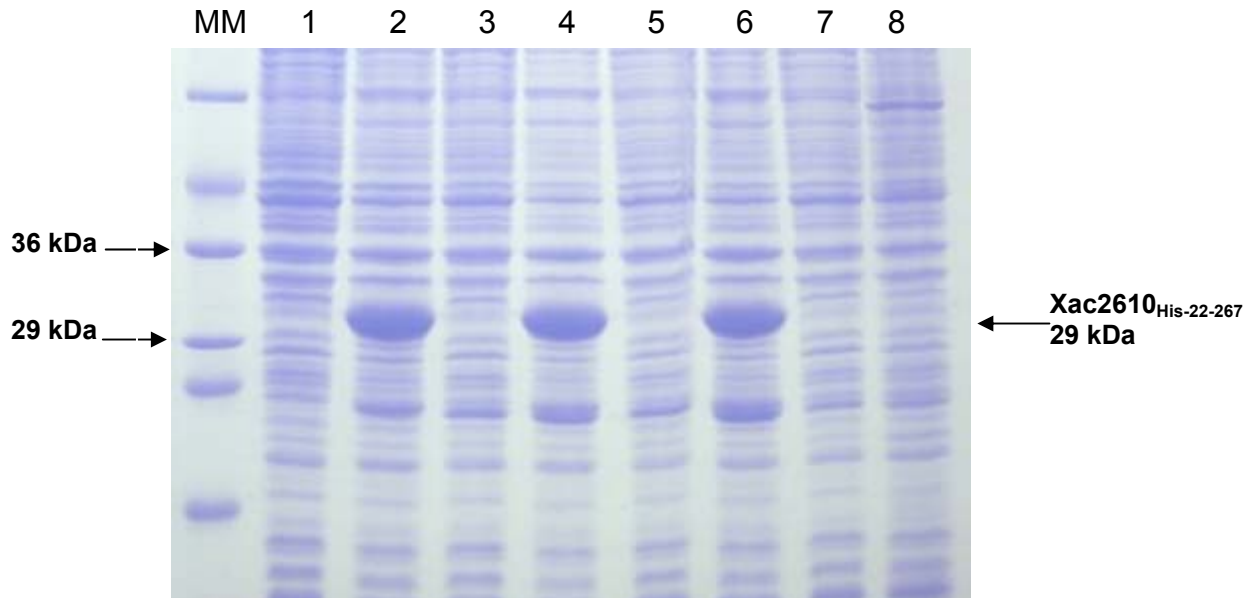


Figura 11. Exemplo de experimento de indução ($Xac2610_{His-22-267}$) com diferentes células de *E. coli*, analisado por SDS-PAGE 18 %. (1) BL21(DE3) não induzida (contendo o plasmídeo que codifica a proteína $Xac2610_{His-22-267}$, porém antes da adição de 0,5 mM de IPTG); (2) BL21(DE3) induzida (após a adição de 0,5 mM de IPTG); (3) BL21(DE3)RP não induzida; (4) BL21(DE3)RP induzida; (5) BL21(DE3)RIL não induzida; (6) BL21(DE3)RIL induzida; (7) BL21(DE3)Star não induzida; (8) BL21(DE3)Star induzida. (MM) Marcador de massa molecular “Low Molecular Weight Range” (Sigma M 3913).

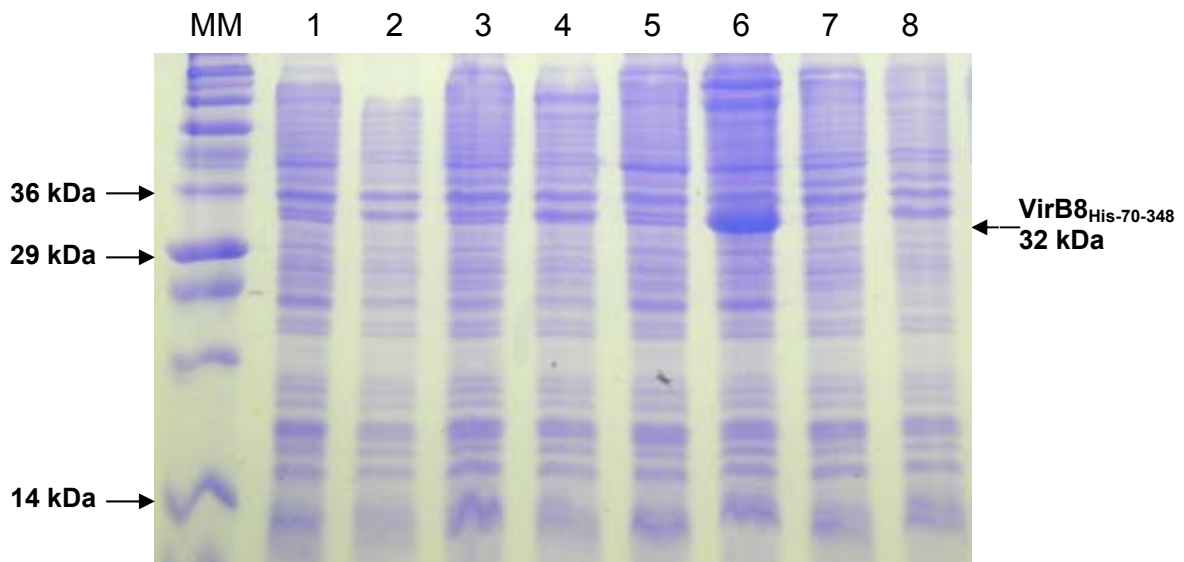


Figura 12. Exemplo de experimento de indução de $VirB8_{His-70-348}$ com diferentes células de *E. coli*, analisado por SDS-PAGE 18%. (1) BL21(DE3)RP não induzida (contendo o plasmídeo que codifica a proteína $VirB8_{His-70-348}$, porém antes da adição de IPTG); (2) BL21(DE3)RP induzida (após a adição de 0,5 mM de IPTG); (3) BL21(DE3)RIL não induzida; (4) BL21(DE3)RIL induzida; (5) BL21(DE3)Star não induzida; (6) BL21(DE3)Star induzida; (7) BL21(DE3) não induzida; (8) BL21(DE3) induzida. Notar que somente ocorreu indução na cepa BL21(DE3)Star (poço 6). (MM) Marcador de massa molecular (Sigma S 8445).

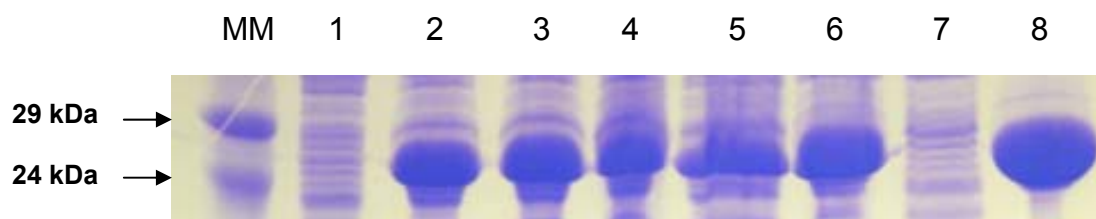


Figura 13. Exemplo de indução (larga escala) e teste de solubilidade da proteína VirB9₃₄₋₂₅₅ (25,8 kDa), em gel de SDS-PAGE 18%. (1) BL21(DE3)RP não induzida (contendo o plasmídeo que codifica a proteína VirB9₃₄₋₂₅₅, antes da adição de IPTG); (2-5) BL21(DE3)RP induzida (após a adição de 0,5 mM de IPTG); (6): Após lise das bactérias, porém antes da centrifugação; (7): Sobrenadante da centrifugação; (8): Sedimento da centrifugação. VirB9₃₄₋₂₅₅ é uma proteína insolúvel. (MM) Marcador de massa molecular.

MLTRELARAVAGVIYLICVVSITACSPSNA

Figura 14. Seqüência da região N-terminal de Xac2610₁₋₂₆₇ (primeiros 30 resíduos), que é uma proteína insolúvel. A seqüência sublinhada pode representar um peptídeo sinal N-terminal. A construção Xac2610_{His-22-267} possui uma cauda de poli-histidina codificada pelo vetor pET28a (sítio de *NdeI*), seguido da isoleucina 22 marcada em vermelho, o que torna a proteína solúvel.

VirB9_{His-154-255}, Xac2622_{His-24-139}, Xac2622₅₁₋₁₃₄ e Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ foram produzidas com ¹⁵N para experimentos de RMN 2D, e as duas primeiras proteínas também foram induzidas com marcação dupla ¹⁵N/¹³C para experimentos de RMN 3D. Nesses experimentos, as proteínas foram expressas nas mesmas cepas que a indução não marcada, mas utilizando-se meio mínimo com ¹⁵NH₄Cl e ¹²C-glicose ou ¹³C-glicose como únicas fontes de nitrogênio e carbono.

4.1.2. Purificação de proteínas heterólogas

As proteínas hipotéticas Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267}, Xac2610₅₅₋₂₆₇, Xac2622_{His-24-139}, Xac2622₅₁₋₁₃₄ e Xac0466_{His-484-589} foram purificadas até a homogeneidade por pelo menos 2 passos cromatográficos (Tabela 4). Os polipeptídeos Xac2622_{His-24-139}, Xac2622₅₁₋₁₃₄ e Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ produzidos com ¹⁵N

também foram purificados, assim como a primeira proteína marcada com $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. As Figuras 15-20 apresentam os níveis de pureza das proteínas quando analisados por SDS-PAGE e por espectrometria de massa MALDI-ToF. Além disso, foram removidos os 17 aminoácidos N-terminais de Xac2622_{His-24-139} por proteólise com trombina (Figuras 19 e 20). Esse trecho da proteína corresponde a maior parte da cauda de poli-histidina N-terminal desenovelada, e sua remoção facilita estudos de RMN.

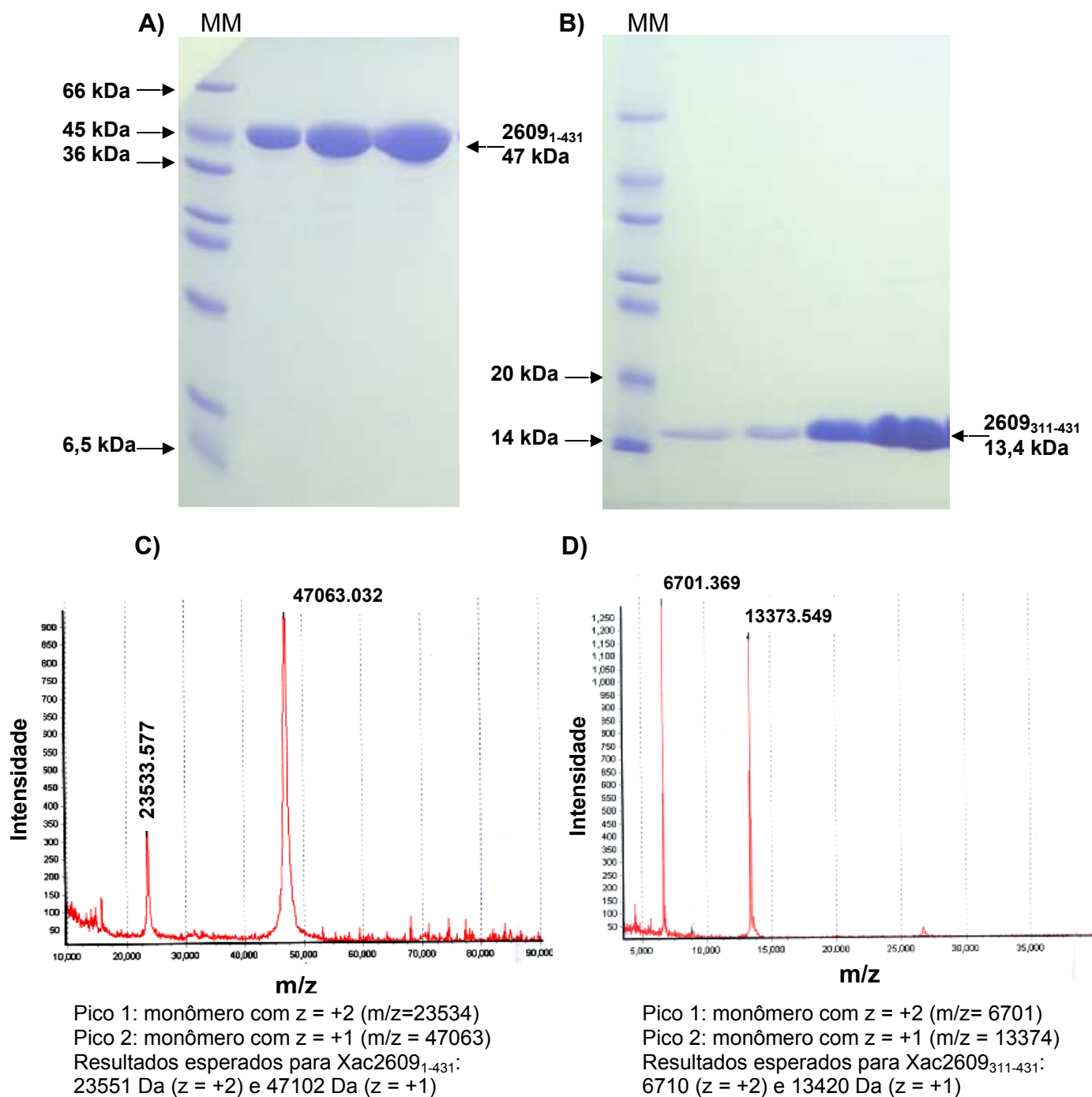


Figura 15. SDS-PAGE 18 % (A, B) e espectrometria de massa MALDI-ToF (C, D) mostrando o grau de pureza das proteínas Xac2609₁₋₄₃₁ (A, C) e ¹⁴N-Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ (B, D). ¹⁵N-Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ também foi purificada até a homogeneidade. MM: Marcador de massa molecular (Sigma M 3913).

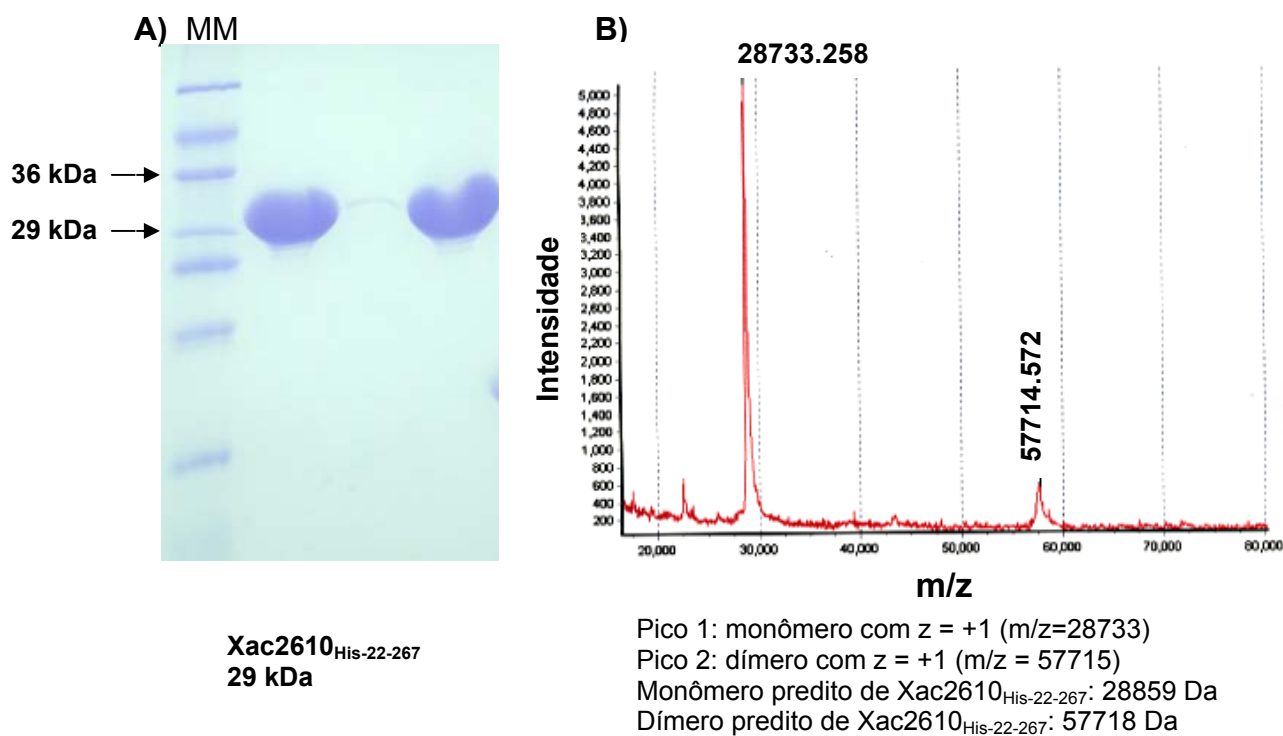


Figura 16. Purificação de Xac2610_{His-22-267}, analisada por SDS-PAGE (A) e espectrometria de massa MALDI-ToF (B). MM: Marcador de massa molecular (Sigma M 3913).

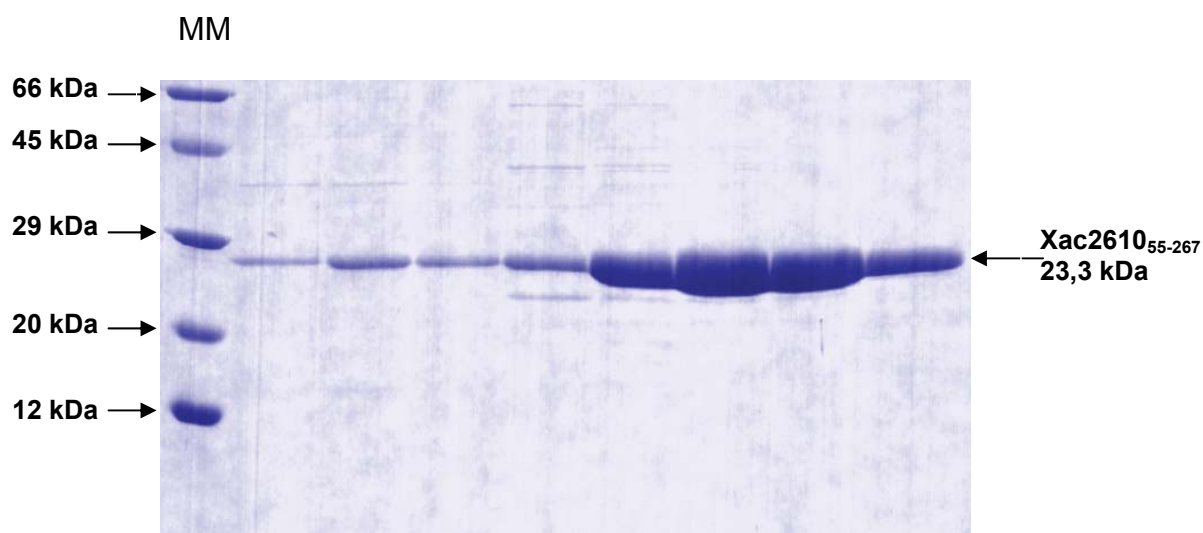


Figura 17. Purificação de Xac2610₅₅₋₂₆₇ analisada por SDS-PAGE 18 %. MM: Marcador de massa molecular.

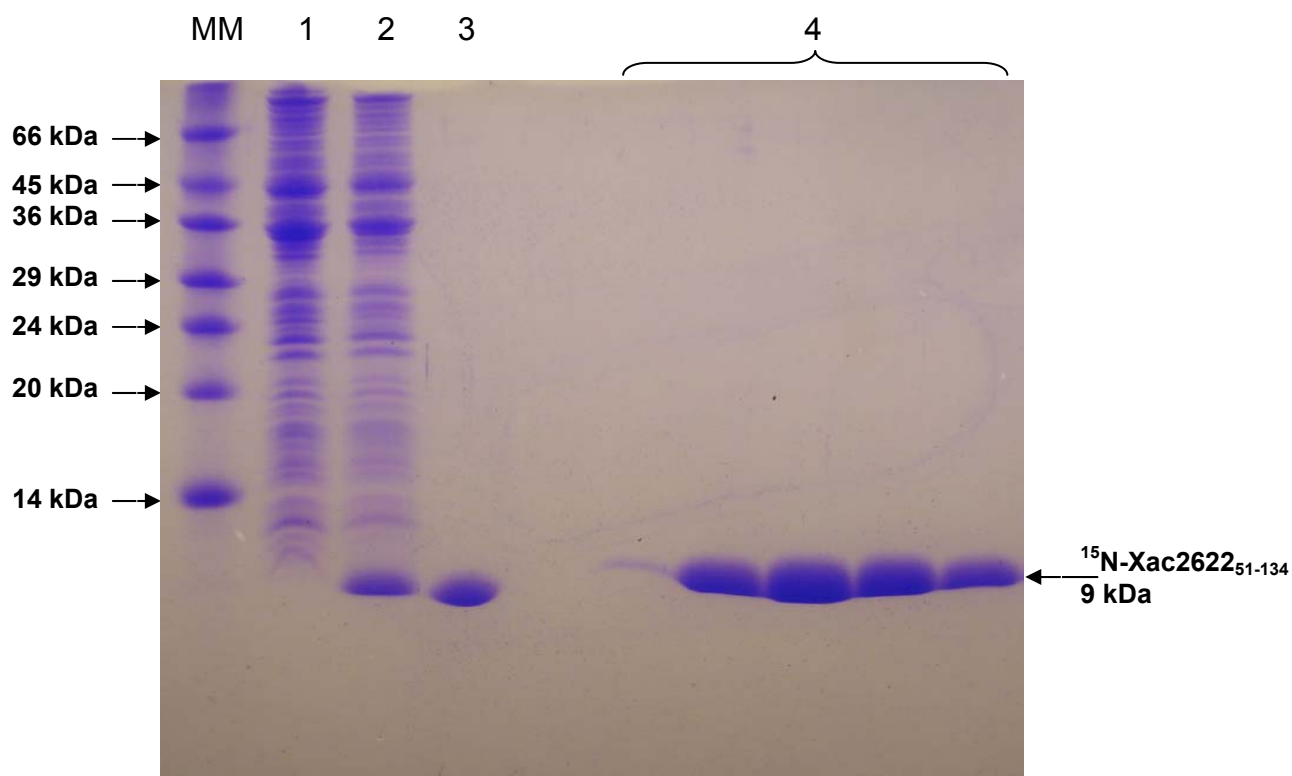


Figura 18. Gel de Tricina SDS-PAGE 16 % para análise da purificação de ^{15}N -Xac2622₅₁₋₁₃₄. (1) Amostra não induzida (antes da adição de IPTG); (2) amostra induzida (após a adição de IPTG); (3) após cromatografia de troca iônica em resina Q-sepharose; (4) frações da filtração em gel em coluna S75. A purificação de ^{14}N -Xac2622₅₁₋₁₃₄ seguia as mesmas etapas cromatográficas. MM: Marcador de massa molecular.

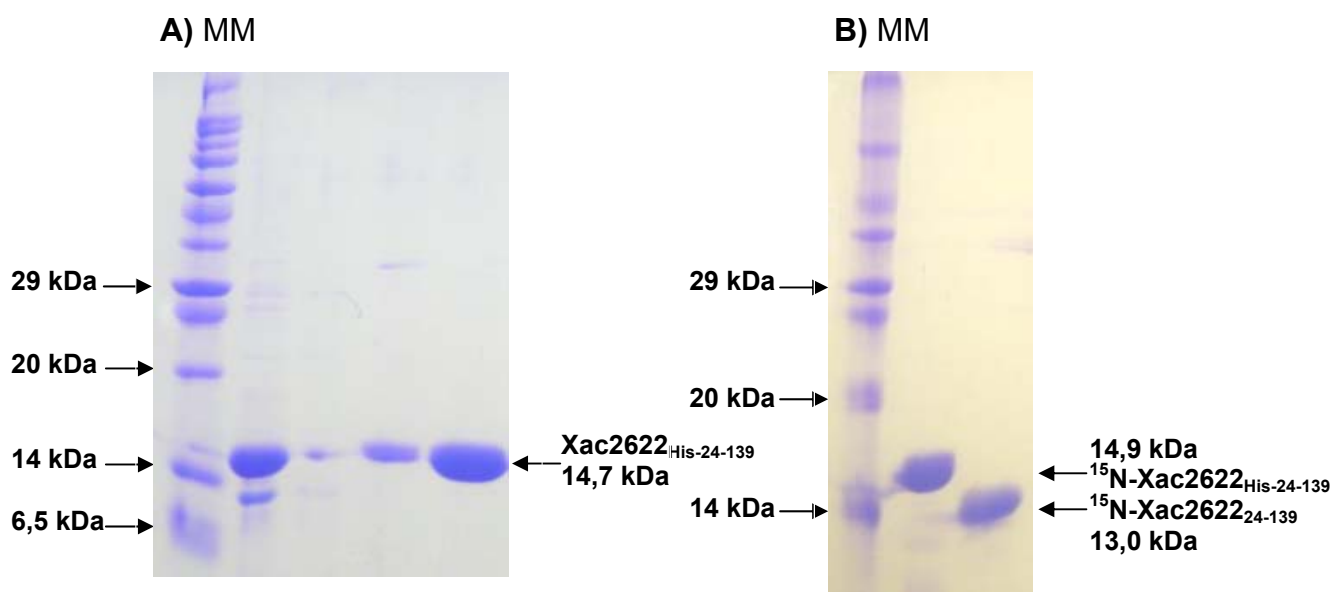


Figura 19. SDS-PAGE 18 % da purificação de (A) ^{14}N -Xac2622_{His-24-139}, (B) ^{15}N -Xac2622_{His-24-139} e ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ (^{15}N -Xac2622_{His-24-139} após a remoção da cauda de poli-histidina N-terminal por proteólise com trombina). $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622_{His-24-139} e $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ também foram purificadas. MM: Marcador de massa.

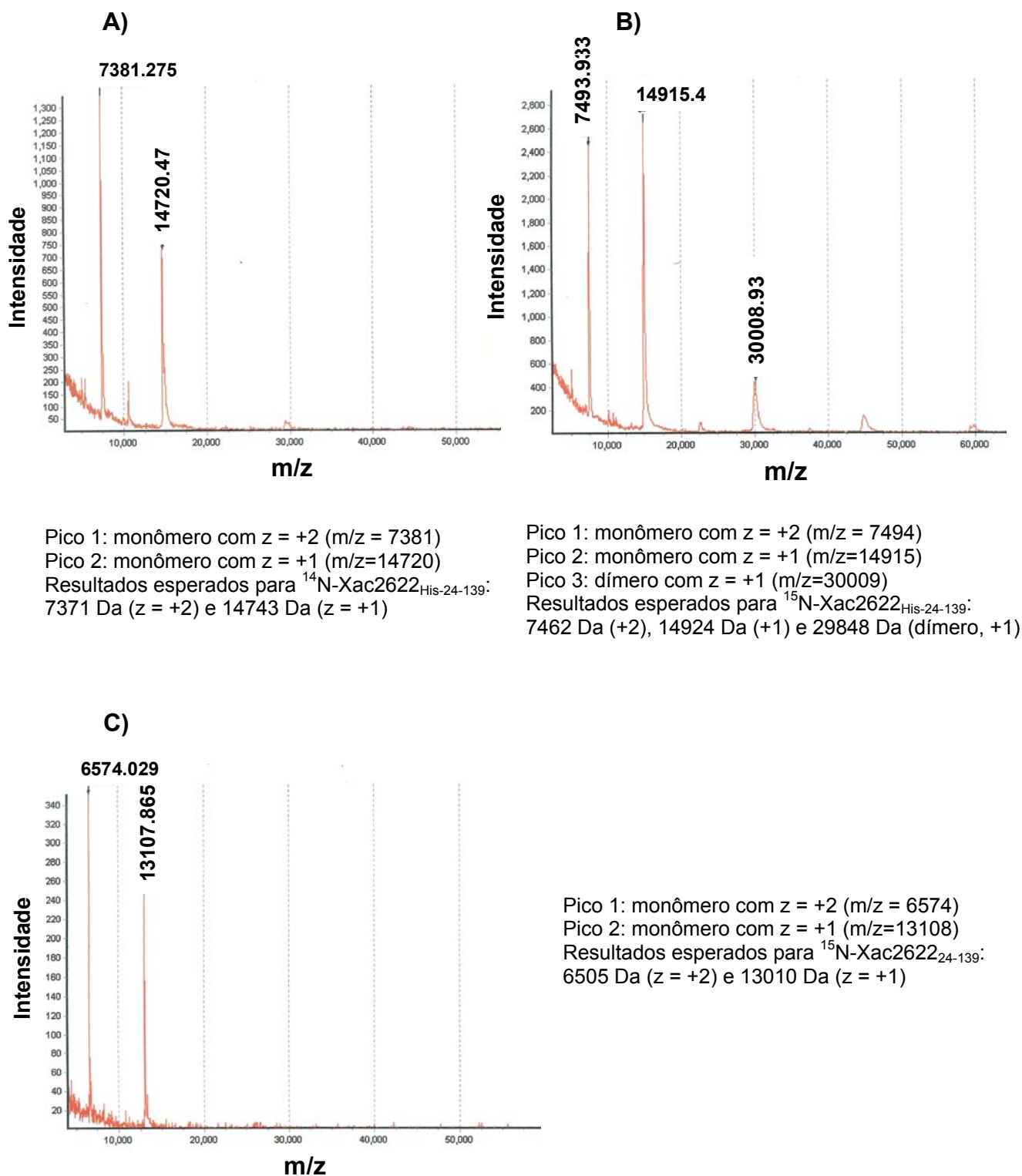


Figura 20. Espectrometria de massa de (A) $^{14}\text{N-Xac2622}_{\text{His-24-139}}$, (B) $^{15}\text{N-Xac2622}_{\text{His-24-139}}$ e (C) $^{15}\text{N-Xac2622}_{24-139}$. A diferença de massa entre $^{14}\text{N-Xac2622}_{\text{His-24-139}}$ e $^{15}\text{N-Xac2622}_{\text{His-24-139}}$ é devido à incorporação de 181 ^{15}N ao invés de ^{14}N ; e entre $^{15}\text{N-Xac2622}_{\text{His-24-139}}$ e $^{15}\text{N-Xac2622}_{24-139}$ ocorre devido à remoção de parte da cauda de poli-histidina N-terminal (1914 Da).

Foram também purificadas as proteínas VirB4_{His-1-817}, VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB9_{His-154-255}, VirB10_{His-85-389} e VirD4_{His-83-557}. As purificações foram analisadas por SDS-PAGE e espectrometria de massa MALDI-ToF (Figuras 21-25). A proteína VirB9_{His-154-255} foi produzida sem (¹⁴N) e com (¹⁵N e ¹⁵N/¹³C) marcação isotópica para estudos de RMN, e posteriormente purificada com e sem sua cauda de poli-histidina N-terminal (Figura 21). As análises das purificações indicam alta pureza (> 95 %) para as proteínas VirB4_{His-1-817}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB9_{His-154-255} e VirD4_{His-83-557}. A proteína VirB10_{His-85-389} apresenta boa pureza, enquanto VirB8_{His-70-348} apresenta-se apenas parcialmente purificada, necessitando novos passos para a otimização da purificação (Figura 24).

Dentre as proteínas Vir purificadas, apenas VirB4_{His-1-817}, VirB9_{His-154-255} e VirD4_{His-83-557} são solúveis. O reenovelamento de VirB8_{His-70-348} ocorre preferencialmente em pHs distantes do seu ponto isoelétrico (9,5), como em pHs 5,0 e 6,0 (dados não mostrados). Reenovelamento com bom rendimento de VirB9₃₄₋₂₅₅ somente ocorre em pHs iguais ou inferiores a 5,0, em baixa força iônica (Figura 26). VirB10_{His-85-389} reenovela em diversos tampões e concentrações salinas (dados não mostrados).

A análise por espectrometria de massa MALDI-ToF das proteínas purificadas sugere a formação de oligômeros em alguns casos (Xac2610_{His-22-267}, Xac2622_{His-24-139}, VirB8_{His-70-348} e VirB10_{His-85-389}). Isso pode ser um artefato dessa técnica, ou pode representar uma real formação de dímeros e complexos de mais alta massa para essas proteínas. Coincidentemente, estudos *in vitro* indicaram que Xac2610_{His-22-267} forma um dímero em solução (filtração em gel; dados não mostrados), enquanto Xac2622 sofre um processo de oligomerização (tópico 4.2.3). Dados da literatura

demonstraram que VirB8 e VirB10 de outros T4SSs auto-interagem (Chandran *et al.*, 2009; Das e Xie, 2000; Terradot *et al.*, 2005).

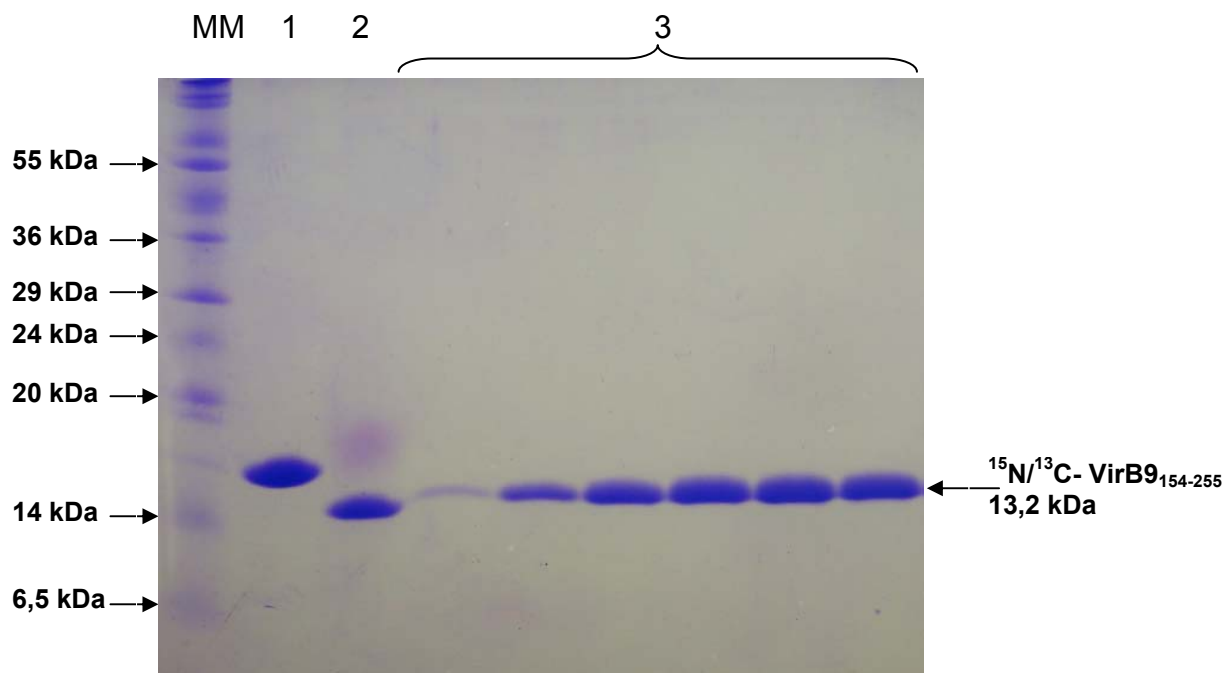


Figura 21. Gel de Tricina SDS-PAGE 16 % para análise das purificações de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirB9_{His-154-255} (15,2 kDa) e $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (13,2 kDa). (1) Antes da clivagem da cauda de poli-histidina N-terminal de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirB9_{His-154-255}; (2) após remoção da cauda (geração da proteína $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirB9₁₅₄₋₂₅₅); (3) frações da filtração em gel em coluna S75 de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirB9₁₅₄₋₂₅₅. As proteínas ^{15}N -VirB9_{His-154-255}, ^{15}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅, ^{14}N -VirB9_{His-154-255} e ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ também foram purificadas até a homogeneidade. MM: Marcador de massa molecular (Sigma S 8445).

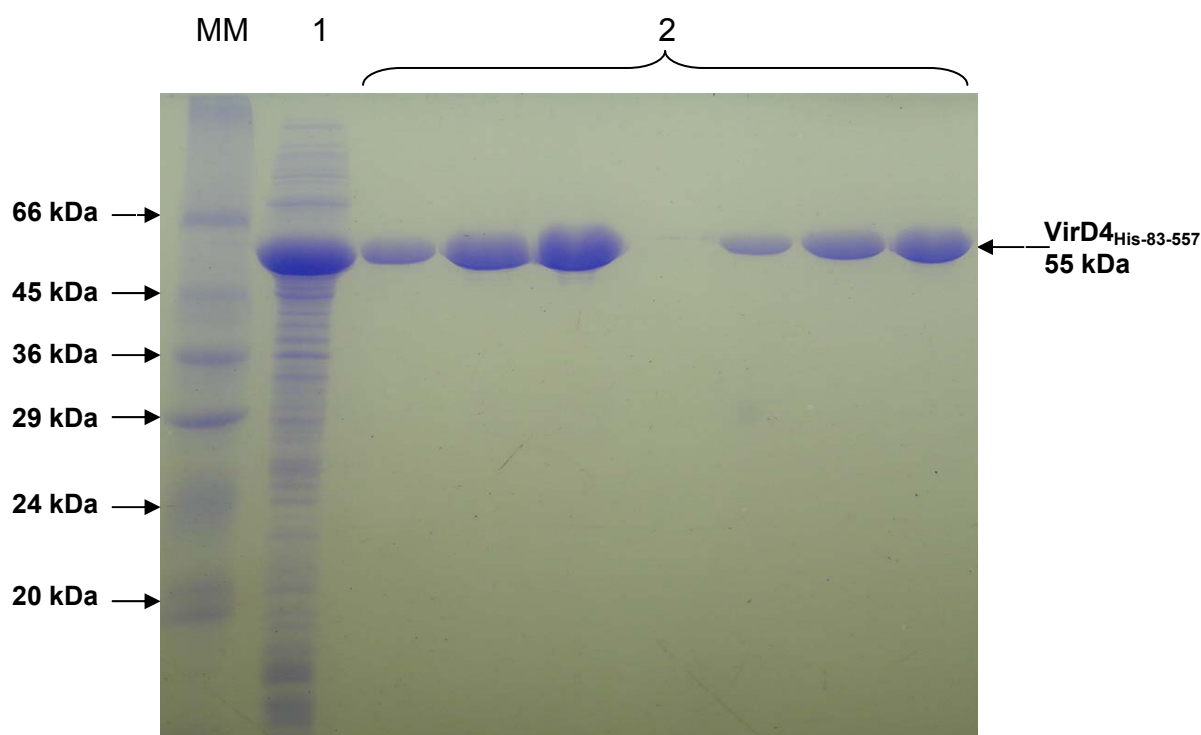


Figura 22. SDS-PAGE 12 % de VirD4_{His-83-557}. (1) Sobrenadante pré-purificação; (2) frações da filtração em gel em coluna S200. MM: Marcador de massa molecular (Sigma M 3913).

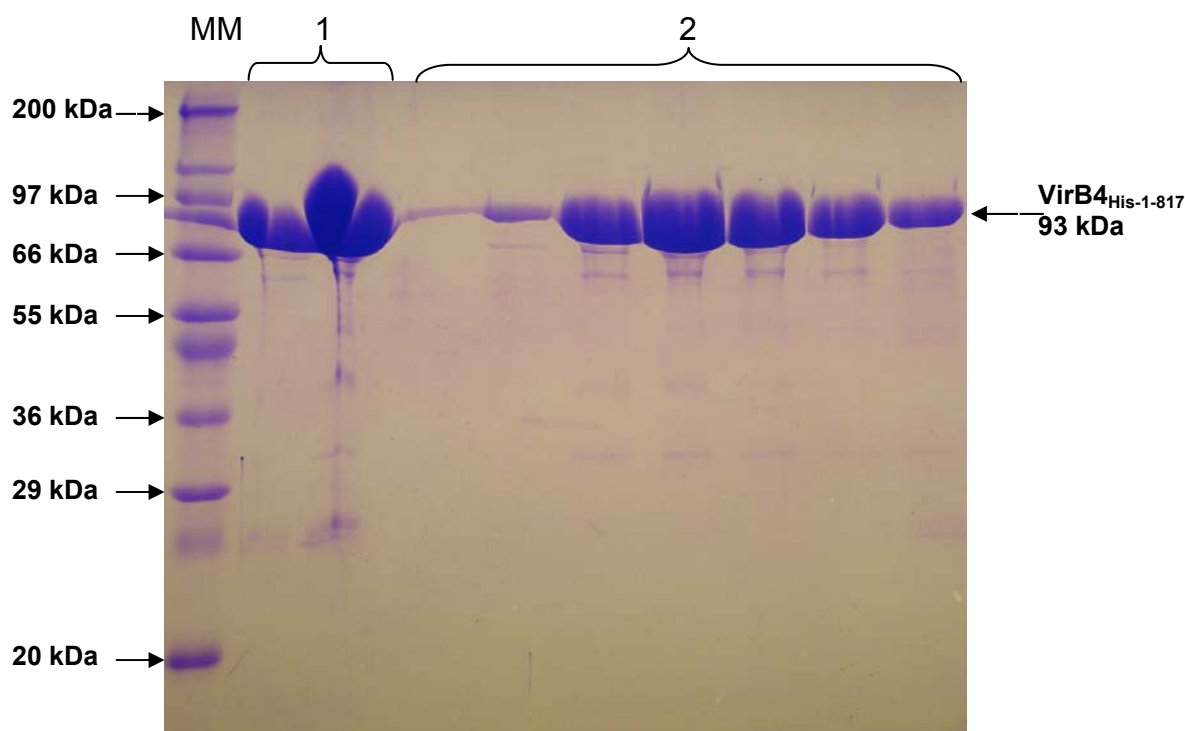


Figura 23. SDS-PAGE 12 % da purificação de $\text{VirB4}_{\text{His-1-817}}$. (1) Após cromatografia de afinidade; (2) frações da filtração em gel em coluna S200. MM: Marcador de massa molecular (Sigma S 8445).

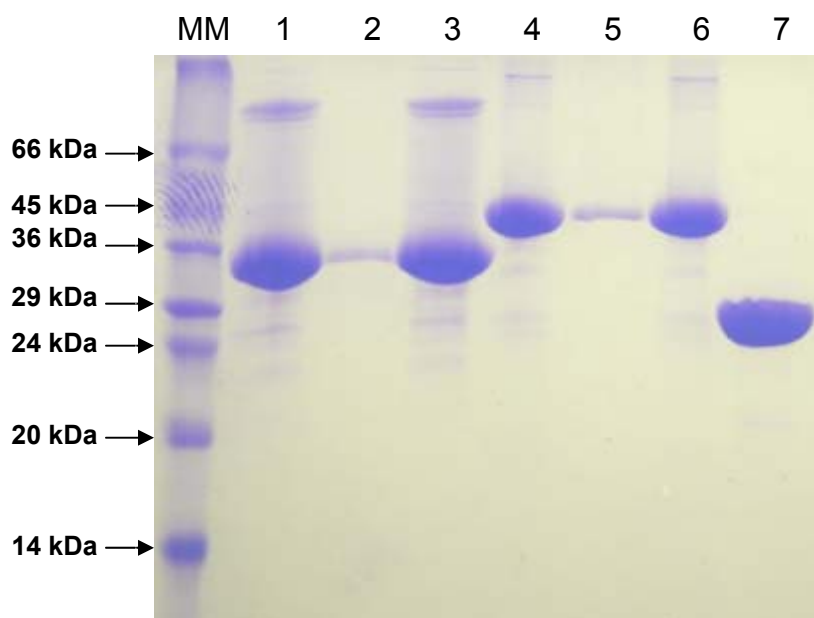


Figura 24. Purificações de $\text{VirB8}_{\text{His-70-348}}$, VirB9_{34-255} e $\text{VirB10}_{\text{His-85-389}}$ analisadas por SDS-PAGE 18 %. Poços 1-3: $\text{VirB8}_{\text{His-70-348}}$ (32 kDa); poços 4-6: $\text{VirB10}_{\text{His-85-389}}$ (34 kDa) e poço 7: VirB9_{34-255} (26 kDa). MM: Marcador de massa molecular (Sigma M 3913).

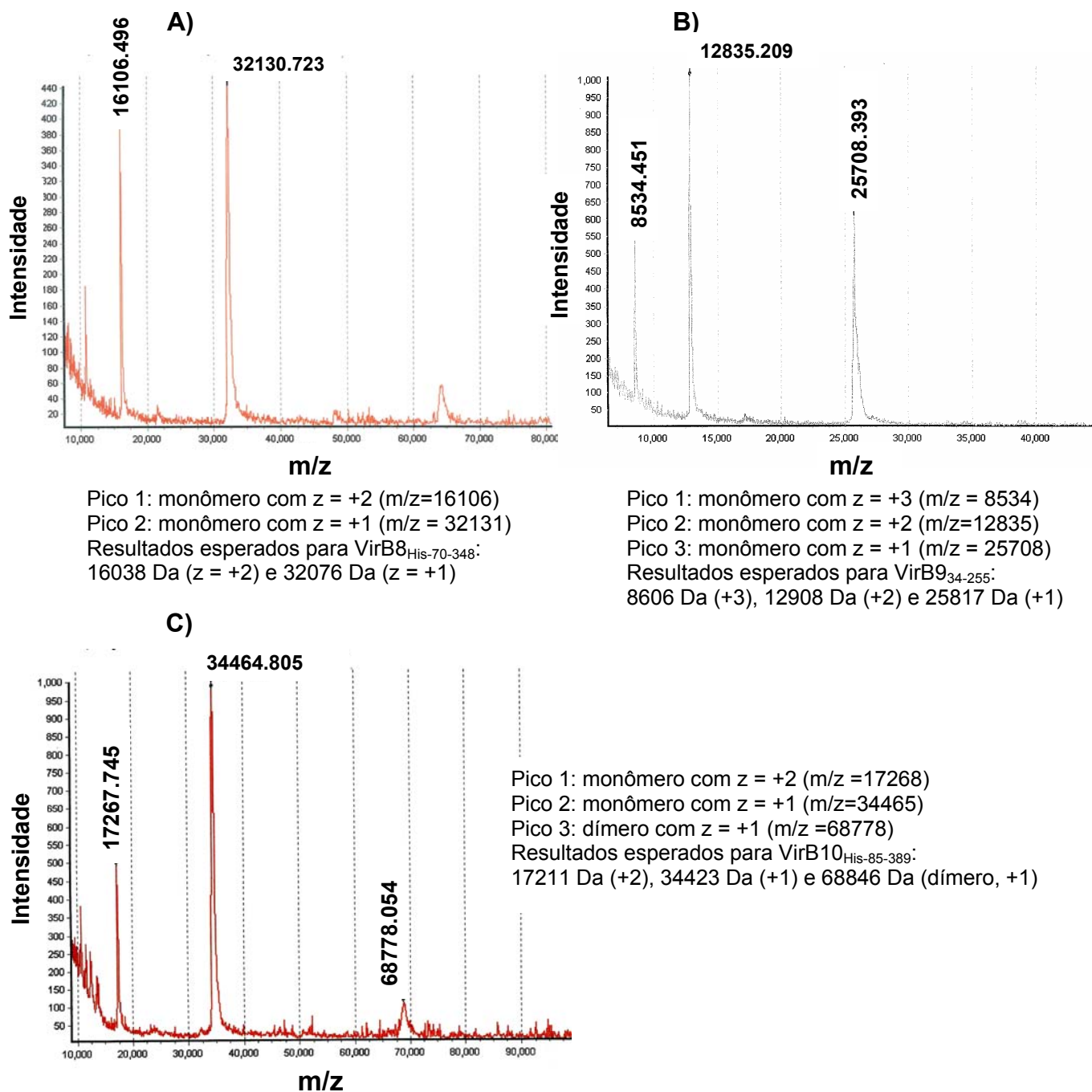


Figura 25. Espectrometria de massa das proteínas: (A) VirB8_{His-70-348}, (B) VirB9₃₄₋₂₅₅ e (C) VirB10_{His-85-389}.

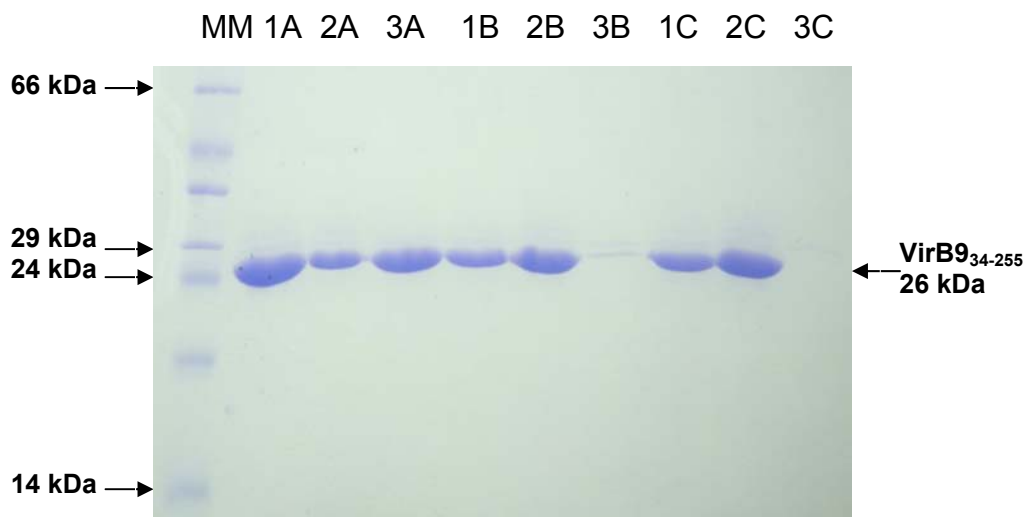


Figura 26. Exemplo de reenovelamento de proteína produzida em corpos de inclusão (VirB9₃₄₋₂₅₅). Poços 1: pré-centrifugação; poços 2: sedimento; poços 3: sobrenadante. Poços A: diálise de VirB9₃₄₋₂₅₅ (solubilizada em 8 M uréia) contra 10 mM acetato de sódio pH 5,0; poços B: diálise contra 10 mM fosfato de sódio pH 6,0; poços C: diálise contra 10 mM Tris-HCl pH 7,0. Notar que ocorreu reenovelamento, com rendimento razoável, somente em pH 5,0 (poço 3A). Diálises em pHs 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0, ou em qualquer pH na presença de sal, não possibilitam o reenovelamento de VirB9₃₄₋₂₅₅. O reenovelamento dessa proteína foi otimizado, permitindo um alto rendimento (toda a proteína solúvel), por diálise em pH 5,0 com remoção lenta e gradual de uréia (4 M; 2 M; 1 M; 0,5 M e finalmente 0 M de uréia). MM: Marcador de massa molecular (Sigma M 3913).

4.1.3. Produção de anticorpos policlonais

Anticorpos contra as proteínas VirB9₃₄₋₂₅₅, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267} e Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram produzidos em coelhos. Os soros obtidos foram usados em ensaios de “Western blot” para se avaliar se os anticorpos reconhecem especificamente as proteínas de *Xac*. Diferentes diluições do soro foram utilizadas para se determinar o melhor título para uso (Figura 27). Nesses experimentos, utilizavam-se amostras de indução em pequena escala, não purificadas, para se avaliar a especificidade dos anticorpos gerados. Os soros possuem alta especificidade e podem ser usados com títulos de até 1:10000 (Figura 27).

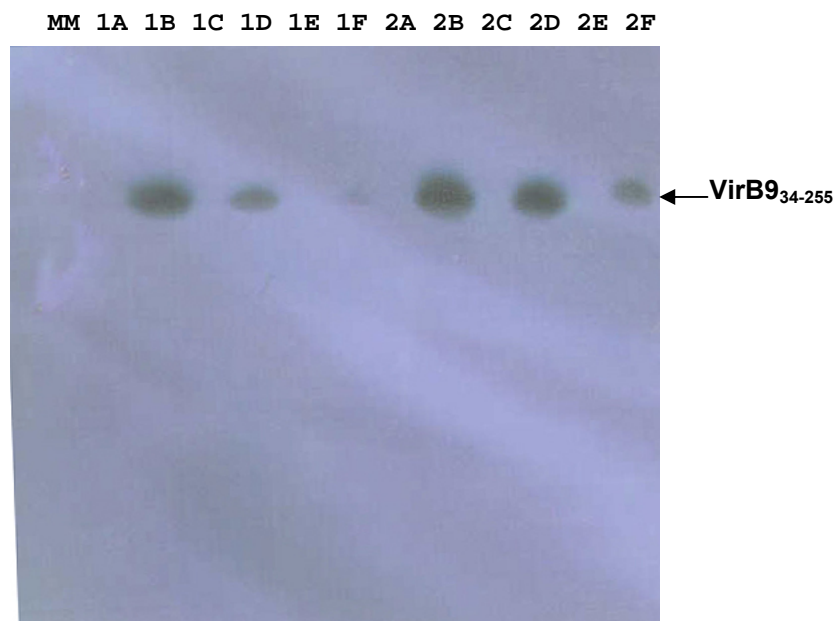


Figura 27. Exemplo de ensaio de “Western blot” para avaliação da especificidade e do título para uso dos anticorpos produzidos em coelho (anti-VirB9₃₄₋₂₅₅). Amostras de indução em pequena escala de VirB9₃₄₋₂₅₅ antes da adição de IPTG (poços A, C e E) e após a adição de 0,5 mM IPTG (B, D e F). Diluições do soro utilizadas: 1:1000 (A e B), 1:3000 (C e D) e 1:10000 (E e F). 1 e 2 se referem a soros oriundos de dois coelhos diferentes. Os soros possuem alta especificidade (nenhuma outra proteína identificada no extrato de *E. coli*) e podem ser usados com títulos de até 1:10000 (2F). MM: Marcador de massa molecular.

4.1.4. Caracterização espectroscópica das proteínas recombinantes

4.1.4.1. Fluorescência intrínseca do triptofano de proteínas

As proteínas VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB10_{His-85-389}, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267}, Xac2622_{His-24-139} e Xac2622₅₁₋₁₃₄ tiveram suas emissões de fluorescência analisadas após excitação a 280 nm na ausência e presença do agente desnaturante uréia (Figura 28 e Tabela 7). Esses dados mostram que a maioria dos resíduos de triptofano nas proteínas está enterrada na ausência e exposta na presença de uréia, possivelmente significando que esses polipeptídeos se apresentam enovelados na ausência do agente desnaturante, apesar de algumas

dessas proteínas terem sido produzidas em corpos de inclusão e renovadas *in vitro* (VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅ e VirB10_{His-85-389}). Xac2622_{His-24-139} possui 2 triptofanos (resíduos 34 e 71), enquanto Xac2622₅₁₋₁₃₄ apresenta apenas o triptofano 71; contudo, as fluorescências de ambas as proteínas são bastante semelhantes, tanto na presença como na ausência de uréia (Figura 28H e Tabela 7). Isso sugere que o triptofano 71 domina a emissão de fluorescência detectada para Xac2622_{His-24-139}, com contribuição pequena do triptofano 34.

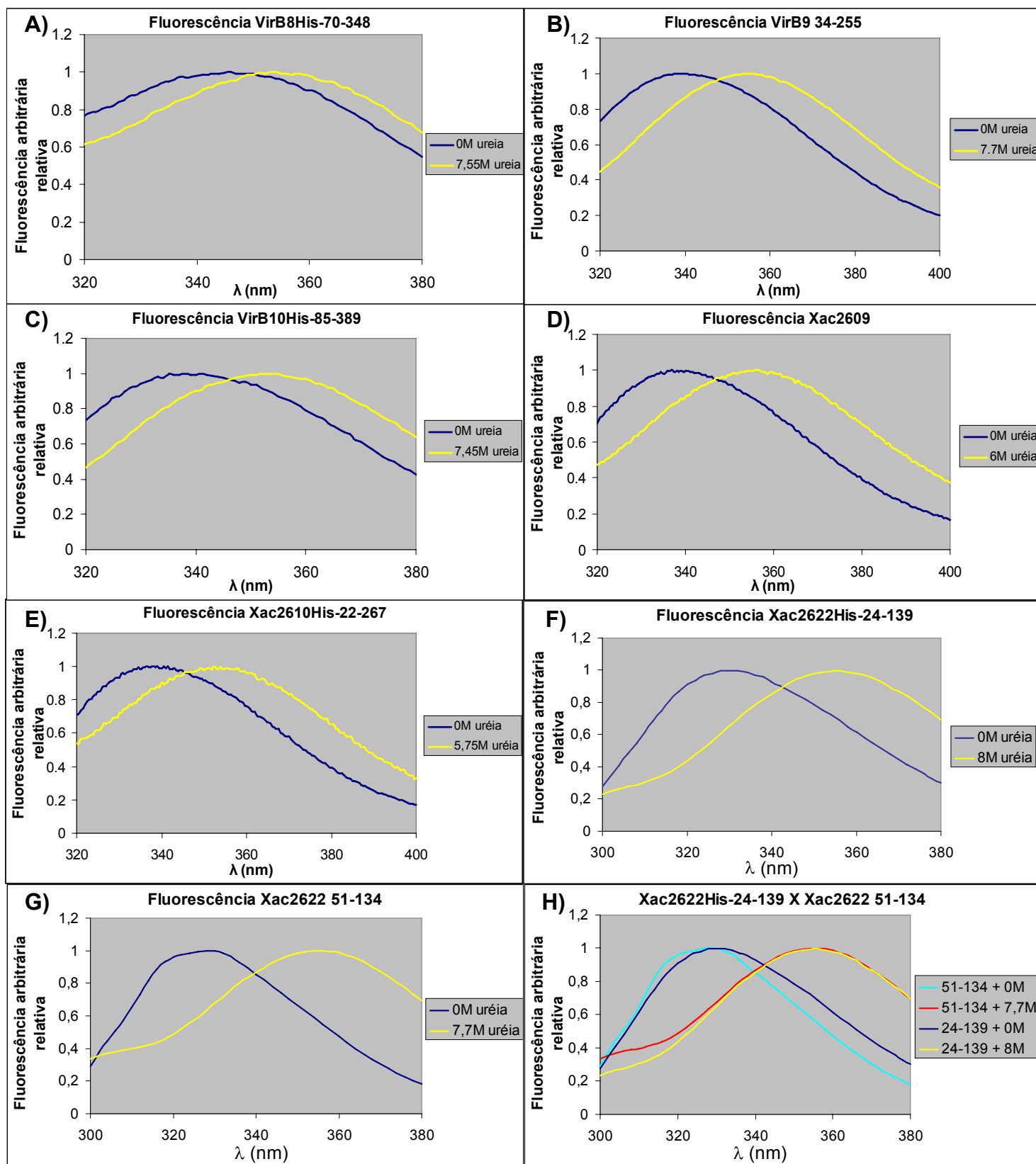


Figura 28. Ensaios de fluorescência de (A) VirB8_{His-70-348}; (B) VirB9₃₄₋₂₅₅; (C) VirB10_{His-85-389}; (D) Xac2609₁₋₄₃₁; (E) Xac2610_{His-22-267}; (F) Xac2622_{His-24-139} e (G) Xac2622₅₁₋₁₃₄, na ausência (azul) e presença (amarelo) de uréia (concentrações indicadas). Em (H), sobreposição das fluorescências de Xac2622_{His-24-139} e Xac2622₅₁₋₁₃₄ (azul claro: Xac2622₅₁₋₁₃₄ e 0 M uréia; vermelho: Xac2622₅₁₋₁₃₄ e 7,7 M

(continuação Figura 28) uréia; azul escuro: Xac2622_{His-24-139} e 0 M uréia; amarelo: Xac2622_{His-24-139} e 8 M uréia). As fluorescências arbitrárias foram divididas pelos valores máximos de cada espectro.

Tabela 7. Número de triptofanos e máximo de emissão na ausência e presença do agente desnaturante uréia.

Proteína	Nº de resíduos de triptofano	Máximo de emissão sem uréia (nm)	Máximo de emissão com uréia (nm)
VirB8 _{His-70-348}	1	346	354
VirB9 ₃₄₋₂₅₅	3	339	355
VirB10 _{His-85-389}	2	341	354
Xac2609 ₁₋₄₃₁	2	337	356
Xac2610 _{His-22-267}	1	339	352
Xac2622 _{His-24-139}	2	328	356
Xac2622 ₅₁₋₁₃₄	1	328	356

4.1.4.2. Experimentos de dicroísmo circular

Foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD) para algumas das proteínas purificadas (VirB8_{His-70-348}, VirB9₃₄₋₂₅₅, VirB10_{His-85-389}, Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267} e Xac2622_{His-24-139}; Figura 29). Inspeção visual qualitativa dos espectros mostra que Xac2609₁₋₄₃₁ apresenta um perfil com forte característica de α -hélice, VirB9₃₄₋₂₅₅ tem uma predominância de folhas- β e Xac2610_{His-22-267} tem um perfil combinado de folha- β e proteína desenovelada. Xac2622_{His-24-139} aparenta ser uma proteína com predominância de trechos enovelados, porém possui parte de sua estrutura desenovelada.

Espectros de CD de VirB8_{His-70-348} e VirB10_{His-85-389} mostram que essas proteínas não têm um enovelamento caracterizado como predominantemente em α -hélice ou folha- β . O enovelamento estável destas proteínas pode não apresentar

estruturas secundárias padrão ou elas podem se enovelar após a interação com um ligante específico para realizar sua função (Fink, 2005). Porém, outra possibilidade é que essas proteínas recombinantes não estejam com seu dobramento nativo. O mais provável é que o processo de reenovelamento não obteve o êxito esperado, porque as estruturas de homólogos de ambas possuem alto conteúdo de α -hélice e folha- β (Bailey *et al.*, 2006; Terradot *et al.*, 2005). Isso contradiz os dados de fluorescência; entretanto, é possível que o deslocamento para o azul da emissão de fluorescência de VirB8_{His-70-348} e VirB10_{His-85-389} sem uréia decorra do fato destas proteínas estarem agregadas, e não enoveladas e com seus dobramentos nativos. Por esse motivo, tentativas de caracterização estrutural não foram realizadas para VirB8_{His-70-348} e VirB10_{His-85-389}.

O espectro de dicroísmo circular de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ indica que esta proteína é predominantemente desenovelada nas condições-padrão utilizadas para esses ensaios iniciais de CD (5 mM Tris-HCl pH 7,0, sem sal). Experimentos posteriores de CD, RMN e proteólise limitada mostraram que este domínio sofre enovelamento dependente de pH e concentração salina (tópico 4.3.3).

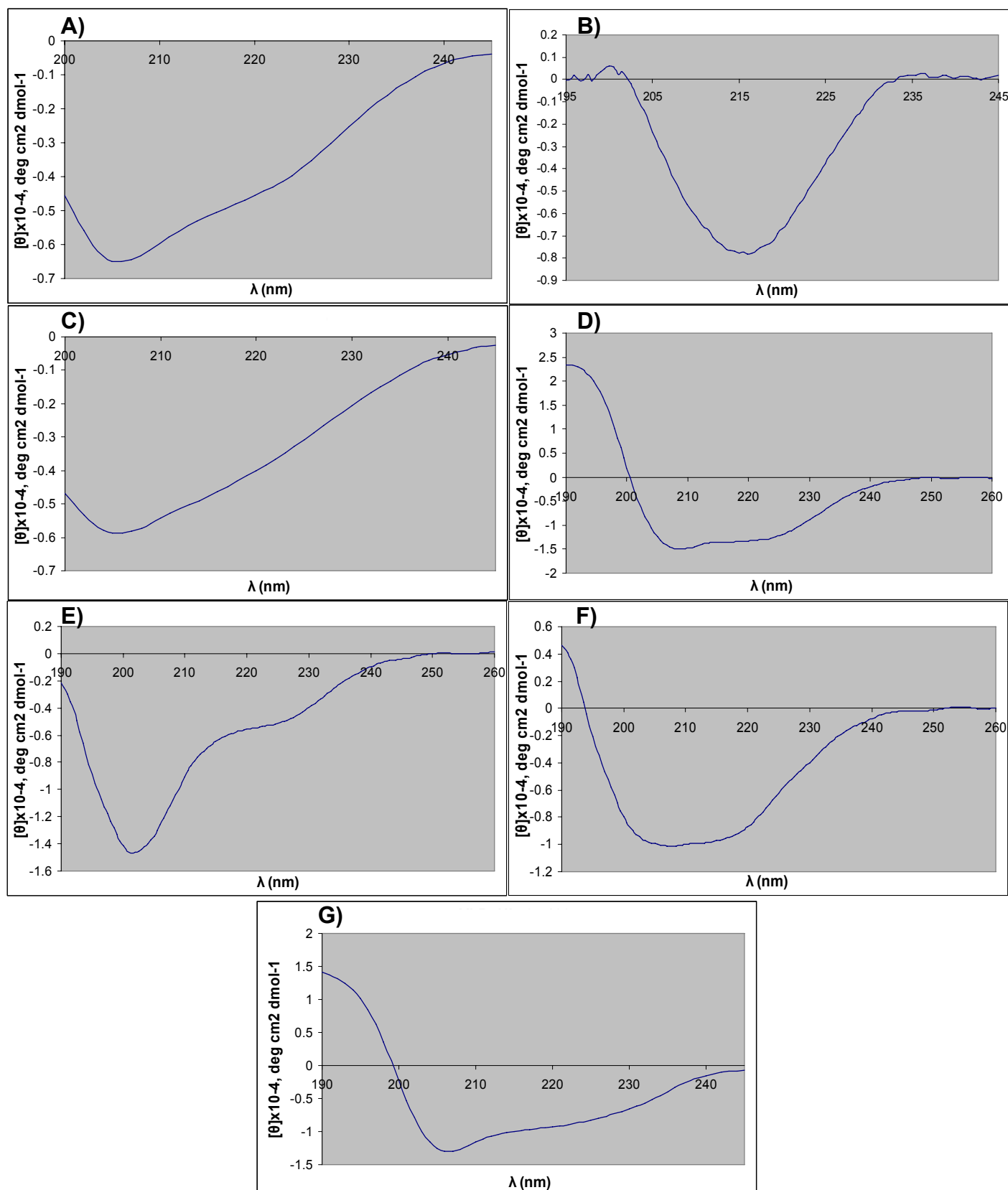


Figura 29. A) Espectros de dicroísmo circular (elipsidade molar residual $[\theta] \times 10^{-4}$ em função do comprimento de onda $[\lambda]$) das proteínas (A) VirB8_{His-70-348}; (B) VirB9₃₄₋₂₅₅; (C) VirB10_{His-85-389}; (D) Xac2609₁₋₄₃₁; (E) Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, (F) Xac2610_{His-22-267} e (G) Xac2622_{His-24-139}.

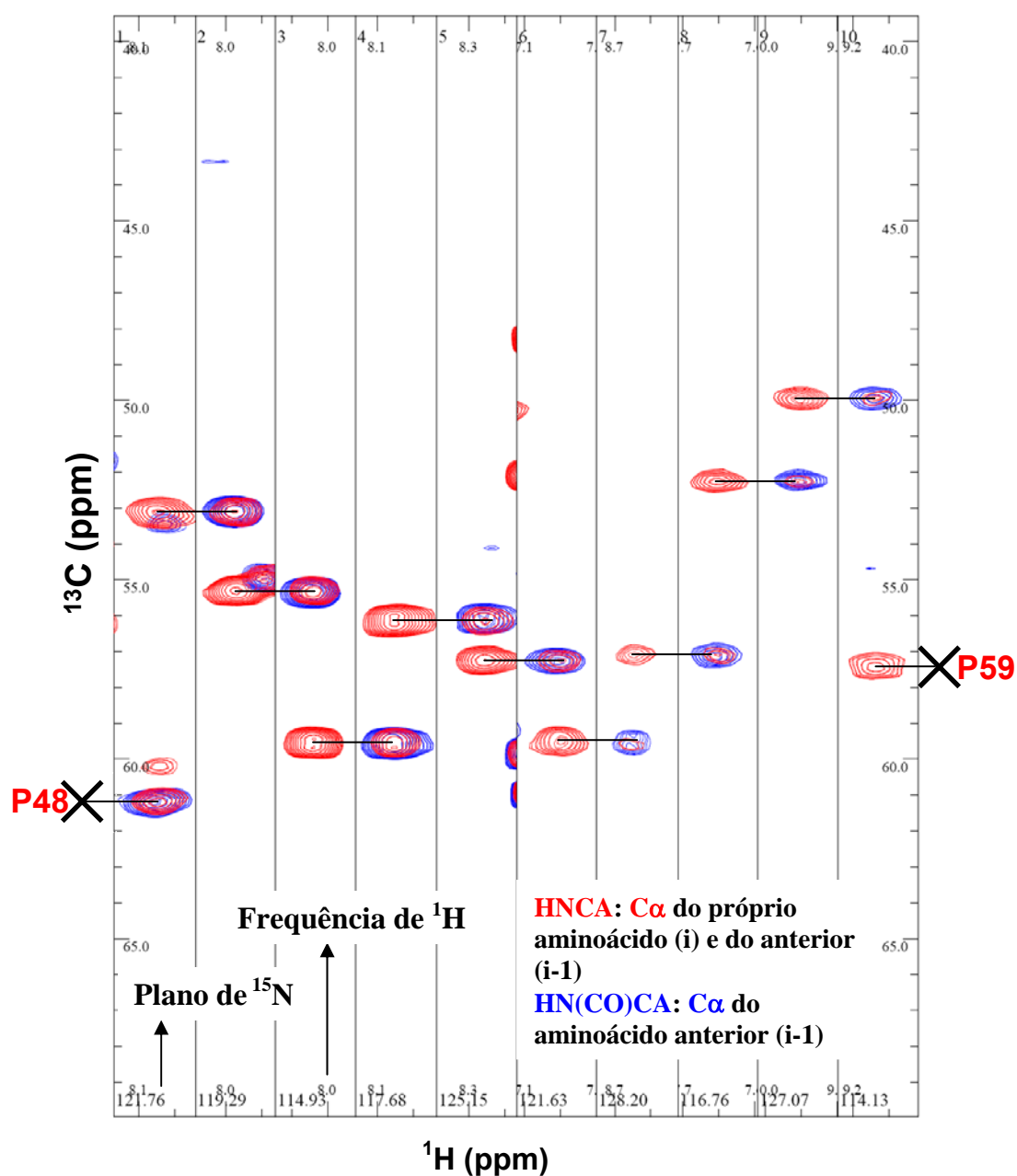
4.2. Estudos estruturais e funcionais das proteínas Xac2622 e VirB9

4.2.1. Assinalamento das ressonâncias de Xac2622₂₄₋₁₃₉

Para o assinalamento das correlações de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉, foram coletados diversos experimentos de RMN 3D (Figuras 30 e 31). A análise dos ensaios coletados possibilitou o assinalamento praticamente completo das ressonâncias da proteína, correspondendo a 98,4 % das ressonâncias de cadeia principal e 97,9 % das frequências da cadeia lateral (Tabela 8). Os núcleos não assinalados são listados na legenda da Tabela 8. A Figura 32 apresenta o ^{15}N -HSQC de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉, com a indicação dos ^1H - ^{15}N assinalados.

O deslocamento químico de diversos núcleos de uma cadeia polipeptídica são excelentes preditores da estrutura secundária da proteína (Wishart *et al.*, 1991). Foram utilizados os programas TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) e CSI (Wishart e Sykes, 1994) para se analisar o padrão de estrutura secundária de Xac2622₂₄₋₁₃₉, utilizando os deslocamentos químicos dos núcleos assinalados (Figura 33). O resultado indica que Xac2622₂₄₋₁₃₉ possui um longo trecho formado por α -hélices e folhas- β e um N-terminal desestruturado, por ser um longo trecho sem estrutura secundária predita. Alguns deslocamentos químicos atípicos foram identificados para alguns núcleos desta proteína (Tabela 9), utilizando o programa AVS (Moseley *et al.*, 2004).

O assinalamento de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ foi depositado no BMRB com código de acesso 16351.



L49 Y50 T51 S52 Y53 T54 Y55 Q56 A57 T58

Figura 30. Superposição dos espectros de HNCA (vermelho) e HN(CO)CA (azul) de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉. Esses experimentos são tridimensionais, com $^1\text{H}^{\text{N}}$ e ^{13}C representados nos eixos X e Y, e uma terceira dimensão representada por diferentes planos, cada uma com uma frequência de $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ (exemplo: L49 está no plano de 121,76 ppm, correspondendo à frequência do $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ da sua cadeia principal). Essas tiras mostram conexões de $^{13}\text{C}\alpha$ no trecho de L49-T58. Duas prolinas flanqueiam o trecho (prolinas 48 e 59), impossibilitando a continuação do assinalamento, por não possuírem $^1\text{H}^{\text{N}}$ na cadeia principal.

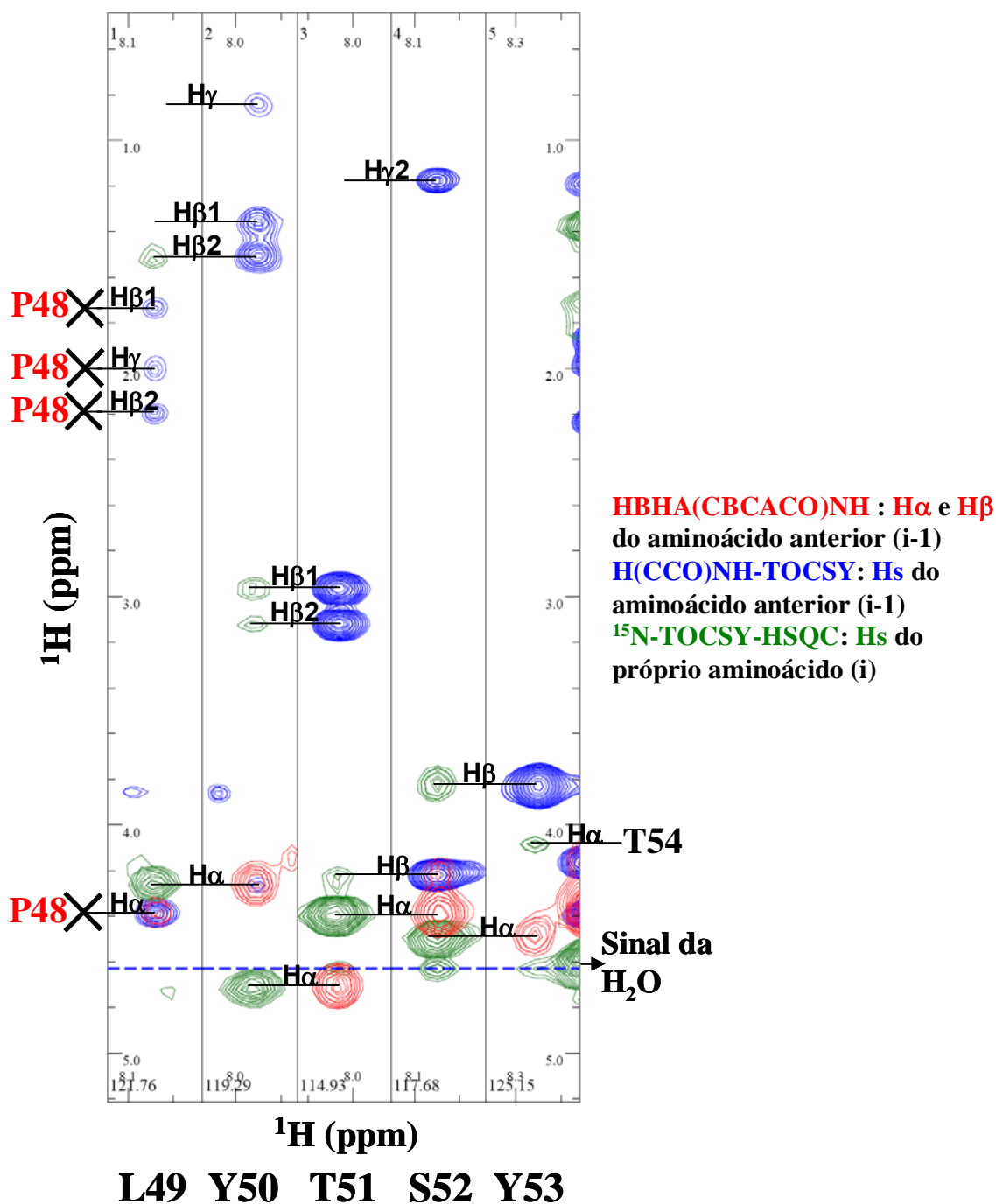


Figura 31. Superposição dos espectros HBHA(CBCACO)NH (vermelho), ^{15}N -TOCSY-HSQC (verde) e H(CCO)NH-TOCSY (azul) de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉. Esses experimentos são tridimensionais, com $^1\text{H}^{\text{N}}$ ligado a $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ da cadeia principal no eixo X; ^1H da cadeia lateral no eixo Y e uma terceira dimensão representada por diferentes planos, cada um com uma frequência de ^{15}N (as correlações de um dado aminoácido estarão no plano com a frequência do $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ da sua cadeia principal). Essas tiras mostram conexões de ^1H no trecho de L49-Y53. Notar que H(CCO)NH-TOCSY apresenta uma boa sensibilidade, enquanto ^{15}N -TOCSY-HSQC é menos sensível (ausência de picos em ^{15}N -TOCSY-HSQC detectados por H(CCO)NH-TOCSY).

Tabela 8. Estatísticas do assinalamento das frequências de ressonância de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉.

Núcleos	Assinalados/Total ⁽¹⁾	%
Cadeia Principal	559/568	98,4
$\text{H}^{\text{N}(2)}$	107/107	100
$\text{N}^{\text{H}(2)}$	107/107	100
$\text{CO}^{(3,4)}$	108/116	93,1
$\text{C}\alpha^{(3)}$	116/116	100
$\text{H}\alpha^{(5)}$	121/122	99,2
Cadeia Lateral	691/706	97,9
^1H Alifáticos ⁽⁶⁾	373/381	97,9
^{13}C Alifáticos ⁽⁷⁾	243/245	99,2
^{15}N	14/14	100
^1H - ^{13}C Aromáticos ⁽⁸⁾	61/66	92,4
Total	1250/1274	98,1

¹Os 4 primeiros aminoácidos N-terminais (GSHM) codificados originalmente pela cauda de poli-histidina foram removidos da análise, assim como os núcleos tipicamente não assinalados, como os ^1H - ^{15}N e ^1H -O de troca rápida (presentes nos grupos amino das cadeias laterais de lisinas, argininas e histidinas e hidroxilas de serinas, treoninas e tirosinas), as carboxilas de aspartatos e glutamatos, ^{15}N de prolinas e ^{13}C aromáticos não protonados. ²120 resíduos – 9 prolinas – 4 resíduos N-terminais (GSHM) = 107. ³120 resíduos – 4 resíduos N-terminais = 116. ⁴Não assinalados: A43CO, P44CO, T45CO, E46CO, I47CO, T88CO, L89CO e G91CO. ⁵Foram considerados 2 $\text{H}\alpha$ para cada glicina. 120 resíduos – 4 resíduos N-terminais + 6 glicinas = 122. Não assinalado: P44 $\text{H}\alpha$. ⁶Não assinalados: K25 $\text{H}\delta 1$, K25 $\text{H}\delta 2$, P44 $\text{H}\beta 1$, P44 $\text{H}\beta 2$, P44 $\text{H}\gamma 1$, P44 $\text{H}\gamma 2$, I47 $\text{H}\beta$ e T88 $\text{H}\beta$. ⁷Não assinalados: K25 $\text{C}\delta$ e T88 $\text{C}\beta$. ⁸Não assinalados: F40 $\text{C}\epsilon$, F40 $\text{C}\zeta$, F40 $\text{H}\zeta$, W71 $\text{C}\epsilon 3$ e W71 $\text{H}\epsilon 3$.

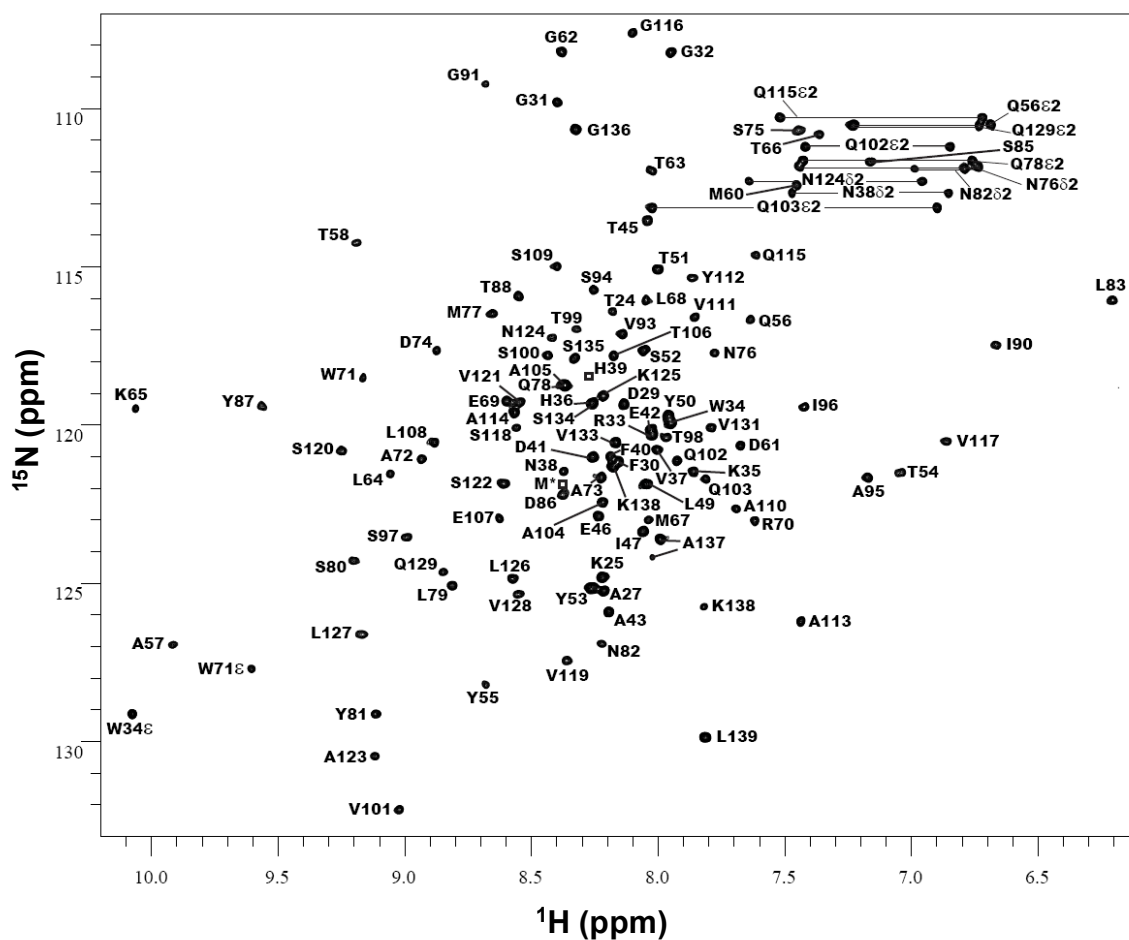


Figura 32. ^{15}N -HSQC de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 7 μM , com resíduos assinalados indicados. Neste experimento, cada pico contém informações da frequência de $^1\text{H}^{\text{N}}$ e $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ de um resíduo específico, com exceção das prolínas, que não apresentam correlações nesse espectro por não possuírem $^1\text{H}^{\text{N}}$. Os picos equivalentes à histidina 39 (H39) e a metionina codificada pelo resquício da cauda de poli-histidina N-terminal (M*) estão abaixo do nível de detecção nesta figura, e suas localizações estão representadas por retângulos. Ressonâncias das amins das cadeias laterais de asparaginas, glutaminas e triptofanos também estão assinaladas. Experimento realizado em espectrômetro Varian operando a 600 MHz equipado com sonda criogênica.

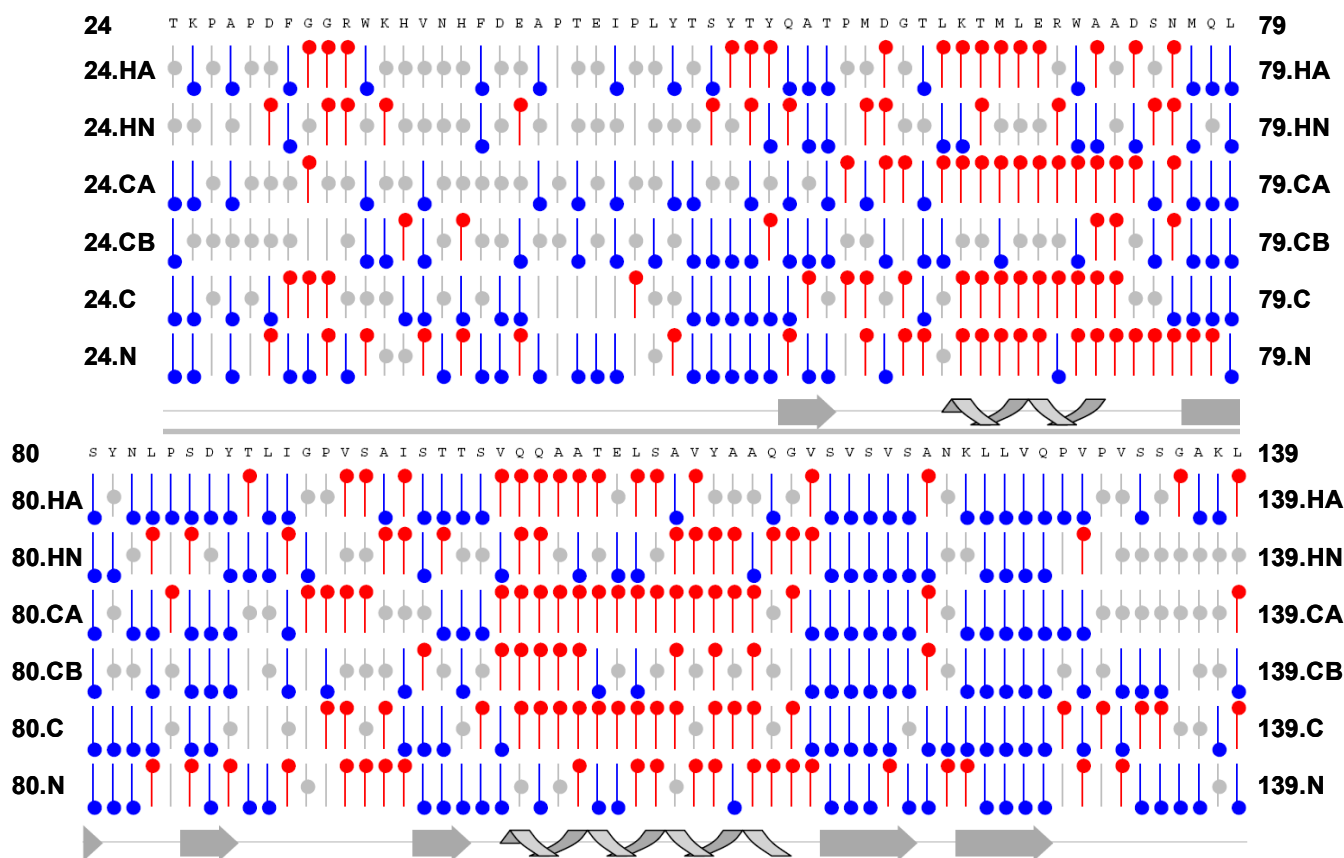


Figura 33. Predição dos elementos de estrutura secundária de Xac2622₂₄₋₁₃₉, utilizando deslocamentos químicos analisados pelo programa CSI (Wishart e Sykes, 1994). Foram usadas as frequências de ¹H_α, ¹H^N, ¹³C_α, ¹³C_β, ¹³CO e ¹⁵N^H. Círculos vermelhos: núcleos com deslocamentos químicos compatíveis com α-hélices; círculos azuis: compatíveis com fitas-β; círculos cinzas: deslocamentos químicos não compatíveis com o esperado para elementos de estrutura secundária. Frequências não assinaladas ou inexistentes para determinados resíduos (como ¹³C_β para glicinas ou ¹H^N para prolinas) são representadas por linhas cinzas verticais. Abaixo, em cinza, está representada a estrutura secundária predita por esse programa.

Tabela 9. Núcleos com deslocamentos químicos atípicos.

Núcleo	Frequência de Xac2622 ₂₄₋₁₃₉	Frequência esperada
Y55Hβ ¹	0,743 ± 0,006	2,91 ± 0,37
K65Hγ ²	0,260 ± 0,007	1,38 ± 0,27
K65Hγ ³	0,260 ± 0,007	1,37 ± 0,29
K65Hδ ²	0,676 ± 0,005	1,61 ± 0,25
M67Hγ ³	0,717 ± 0,006	2,44 ± 0,36
R70Hε	9,782 ± 0,002	7,32 ± 0,52

¹Frequência de Y55Hβ³: 2,354 ± 0,008. ²Frequência de K65Hδ³: 0,947 ± 0,008. ³Frequência de M67Hγ³: 2,342 ± 0,004.

4.2.2. Determinação da estrutura em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉

Foram adquiridos espectros 3D ¹³C-NOESY-HSQC (regiões alifática e aromática) e ¹⁵N-NOESY-HSQC para a obtenção de NOEs, que fornecem restrições de distância entre átomos. Um total de 2176 restrições foram utilizadas para o cálculo da estrutura de Xac2622₂₄₋₁₃₉, incluindo 2056 NOEs automaticamente assinalados pelo programa CYANA (Herrmann *et al.*, 2002) e 120 restrições de ângulos diedrais ψ e ϕ originados da análise de deslocamento químico realizada pelo programa TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) (Tabela 10). O cálculo estrutural foi realizado por CYANA e posteriormente foi feito refinamento em solvente explícito utilizando o programa HADDOCK (Dominguez *et al.*, 2003). Os 20 modelos gerados convergiram com RMSD de 0,47 Å para a cadeia principal e 0,94 Å para todos os átomos pesados, considerando o trecho envolvendo os resíduos 52-133 (Figura 34 e Tabela 10).

Xac2622₂₄₋₁₃₉ possui um longo segmento N-terminal desenovelado (resíduos 24-51), um domínio globular enovelado (resíduos 52-133) e um curto trecho C-terminal desenovelado (resíduos 134-139). O N-terminal e o extremo C-terminal são desenovelados porque apresentam apenas NOEs intraresiduais e alguns poucos NOEs seqüenciais e de média distância (e portanto, não possuem estrutura secundária), e não apresentam NOEs de longa distância (sem estrutura terciária) (Figuras 35 e 36). Além disso, dados de relaxação também sugerem que esses trechos são desenovelados (tópico 4.2.5).

Análise pelo programa PROCHECK-NMR das estruturas em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉ mostra que o domínio enovelado possui duas α -hélices (resíduos 64-74 e 101-113) empacotadas entre duas folhas- β , uma delas com 3 fitas- β

(aminoácidos 78-81, 117-122 e 125-130) e a outra com duas fitas- β curtas (resíduos 55-56 e 97-98) (dados não mostrados). Além disso, o domínio apresenta uma hélice 3_{10} (aminoácidos 92-95), compatível com o fato de este trecho apresentar NOEs $NN(i,i+2)$; $\alpha N(i,i+2)$; $\alpha N(i,i+3)$; $\alpha\beta(i,i+3)$ e não possuir NOEs $\alpha N(i,i+4)$ (Wagner *et al.*, 1986) (Figura 35). Os elementos de estrutura secundária determinados a partir da análise das estruturas em solução apresentam boa correlação com os elementos previamente preditos pelas análises de deslocamentos químicos, com exceção de uma fita- β extra identificada pelo programa CSI (resíduos 85-87; comparar Figuras 33 e 35).

Os modelos em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉ apresentam geometria, convergência, número de restrições e compatibilidade com os dados experimentais excelentes (Tabela 10 e Figura 37). Essas estruturas são compatíveis com dados independentemente obtidos de acoplamentos dipolares residuais (RDCs) $^1D_{NH}$ de resíduos localizados em elementos de estrutura secundária coletados para ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉, apresentando Fator-Q médio de $0,271 \pm 0,019$ (Bax, 2003; Cornilescu *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2005) (Tabela 10).

Alguns deslocamentos químicos assinalados são atípicos (Tabela 9). As análises das localizações dos núcleos nas estruturas em solução sugerem explicações para estes fenômenos. Vários núcleos com frequências atípicas apresentam menores deslocamentos químicos por estarem no cone de blindagem de anéis aromáticos (Macomber, 1998), se localizando entre 3,0-3,25 Å acima do plano de cadeias laterais aromáticas de outros resíduos (Y55H β 2 e M67H γ 2 acima do anel indol do W71; K65H γ 2, K65H γ 3 e K65H δ 2 acima do anel fenólico da Y81). Já o próton H ϵ da arginina 70 potencialmente é desblindado por realizar ponte de hidrogênio com a carboxila da cadeia lateral do aspartato 61.

Os modelos estruturais em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram depositados no PDB com código de acesso 2KK3. Comparações da estrutura de Xac2622 com estruturas de proteínas depositadas no PDB serão abordadas na discussão.

Tabela 10. Dados estatísticos das 20 estruturas em solução depositadas de Xac2622₂₄₋₁₃₉.

Restrições de distância não ambíguas (NOEs)	2056
Intra-residuais (i = j)	438
Sequenciais (i – j = 1)	573
Média distância (1 < i – j < 5)	382
Longa distância (i – j ≥ 5)	663
Restrições de ângulos diedrais	120
φ / ψ	60 / 60
Número total de restrições experimentais	2176
Valor do “Target Function” de CYANA (Å ²)	0,73 ± 0,10
Violações de restrições	
NOEs violados / estrutura (> 0,3 Ångström)	0,05 ± 0,22
NOEs violados / estrutura (> 0,5 Ångström)	0 ± 0
RMSD de restrições de distância experimentais (Å)	0,013 ± 0,001
Violações de ângulos diedrais / estrutura (> 5°)	0,4 ± 0,58
RMSD de restrições diedrais experimentais (°)	0,64 ± 0,11
RMSD da geometria ideal	
Comprimento de ligação (Å)	0,0032 ± 0,0001
Ângulos de ligação (°)	0,398 ± 0,008
Ângulos impróprios (°)	0,357 ± 0,014
RMSD das estruturas depositadas (Å, resíduos 52-133)	
Átomos da cadeia principal	0,47 ± 0,10
Todos os átomos pesados	0,94 ± 0,09
Estatísticas do “Diagrama de Ramachandran” (%)	
Regiões mais favorecidas	84,9
Regiões adicionalmente permitidas	14,9
Regiões generosamente permitidas	0,0
Regiões não permitidas ¹	0,2
Número de RDCs (¹ D _{NH}) ²	35
Fator-Q médio	0,271 ± 0,019

¹Resíduos K25 e A123 em uma estrutura e A27 em duas estruturas (todos em diferentes conformêros). K25 e A27 fazem parte do N-terminal desenovelado.

²RDCs não foram utilizados para o cálculo da estrutura.

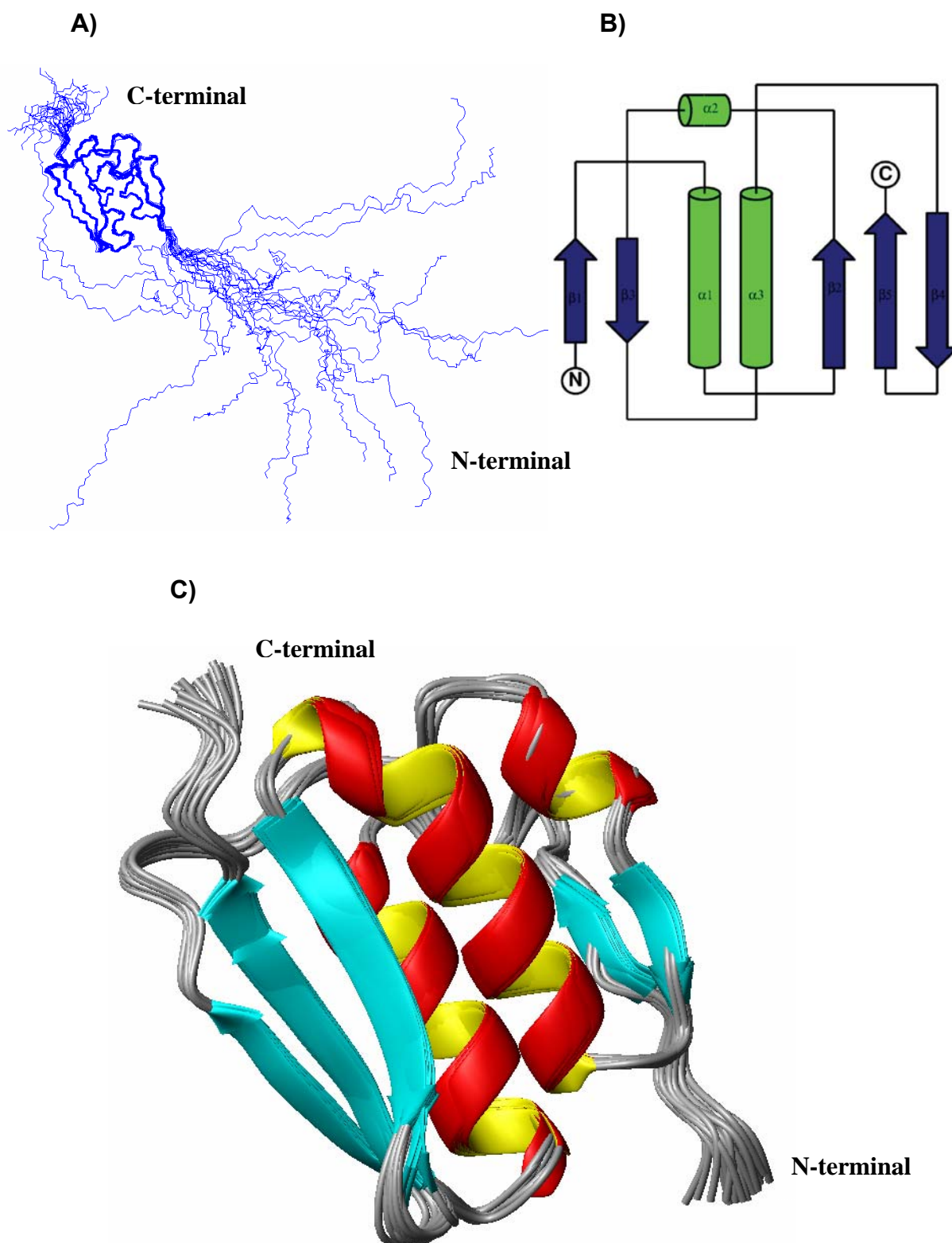


Figura 34. Sobreposição das 20 estruturas em solução com menor energia de Xac2622₂₄₋₁₃₉. (A) Traçado da cadeia principal de Xac2622₂₄₋₁₃₉. (B) Topologia e (C) representação em fitas do domínio enovelado (resíduos 51-134). Os N- e C-terminais estão indicados.

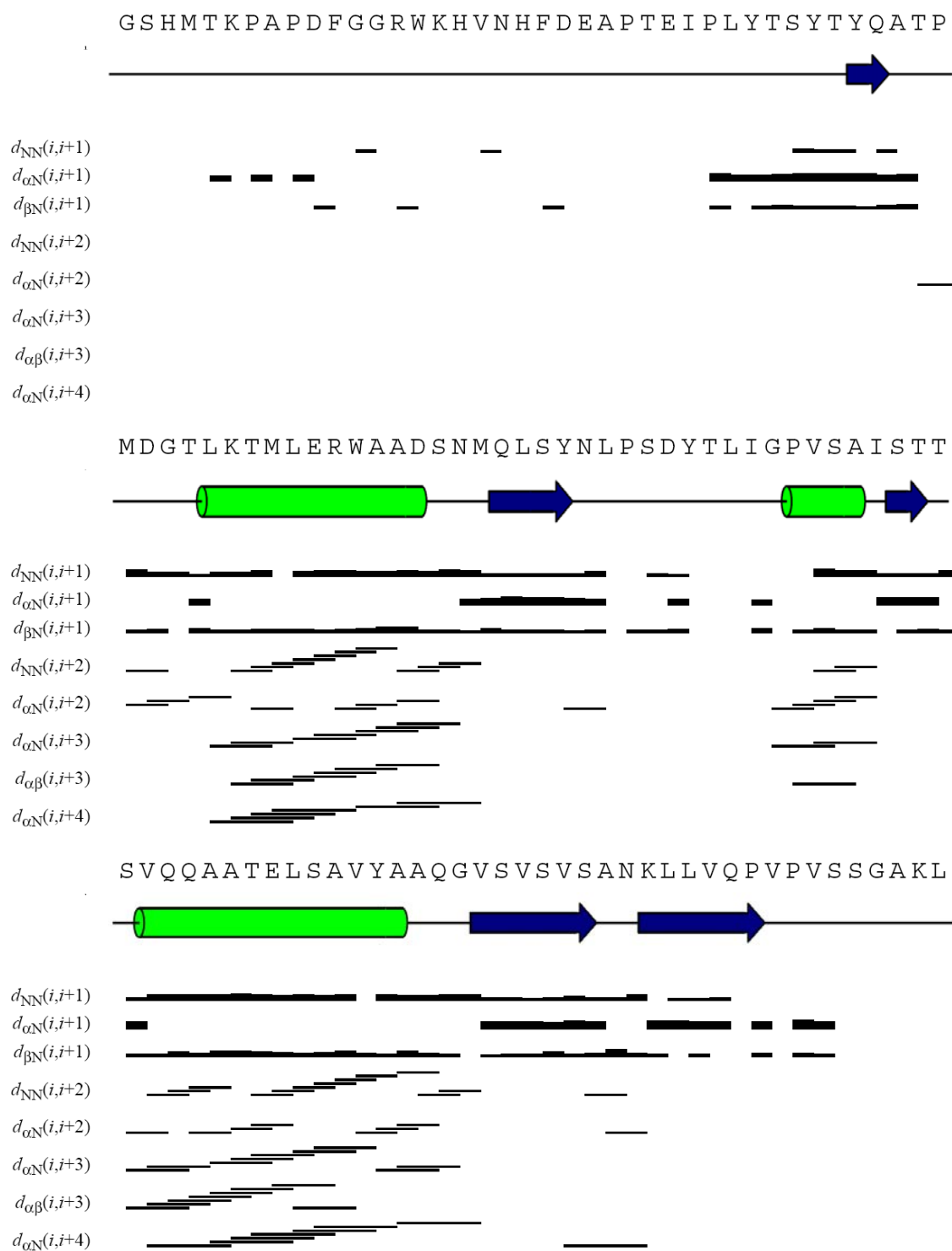


Figura 35. Noes sequenciais [$NN(i,i+1)$; $\alpha N(i,i+1)$; $\beta N(i,i+1)$] e de média distância [$NN(i,i+2)$; $\alpha N(i,i+2)$; $\alpha N(i,i+3)$; $\alpha\beta(i,i+3)$; $\alpha N(i,i+4)$] assinalados de Xac2622₂₄₋₁₃₉. Como um exemplo, $\alpha N(i,i+2)$ significa NOE entre o $^1H_{\alpha}$ do aminoácido i e do $^1H^N$ do $i+2$. A largura das linhas indica a intensidade do NOE, que por sua vez reflete relativamente a distância entre os átomos. Fitas- β possuem NOEs $\alpha N(i,i+1)$ bastante intensos, enquanto α -hélices possuem vários NOEs de média distância. A estrutura secundária baseada na estrutura em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉ está representada por fitas- β (azul) e α -hélices (verde).

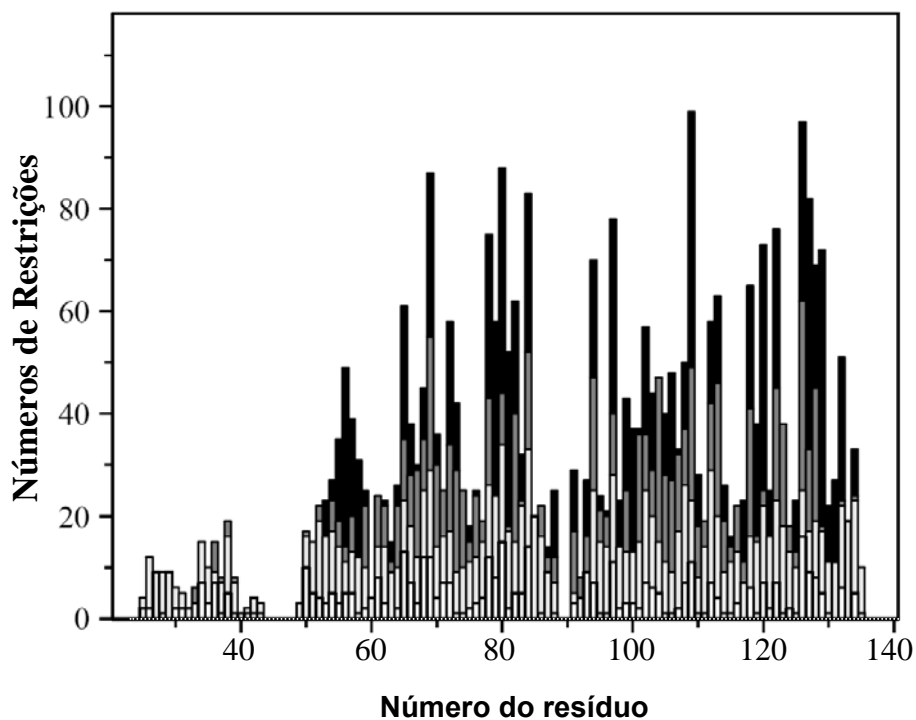
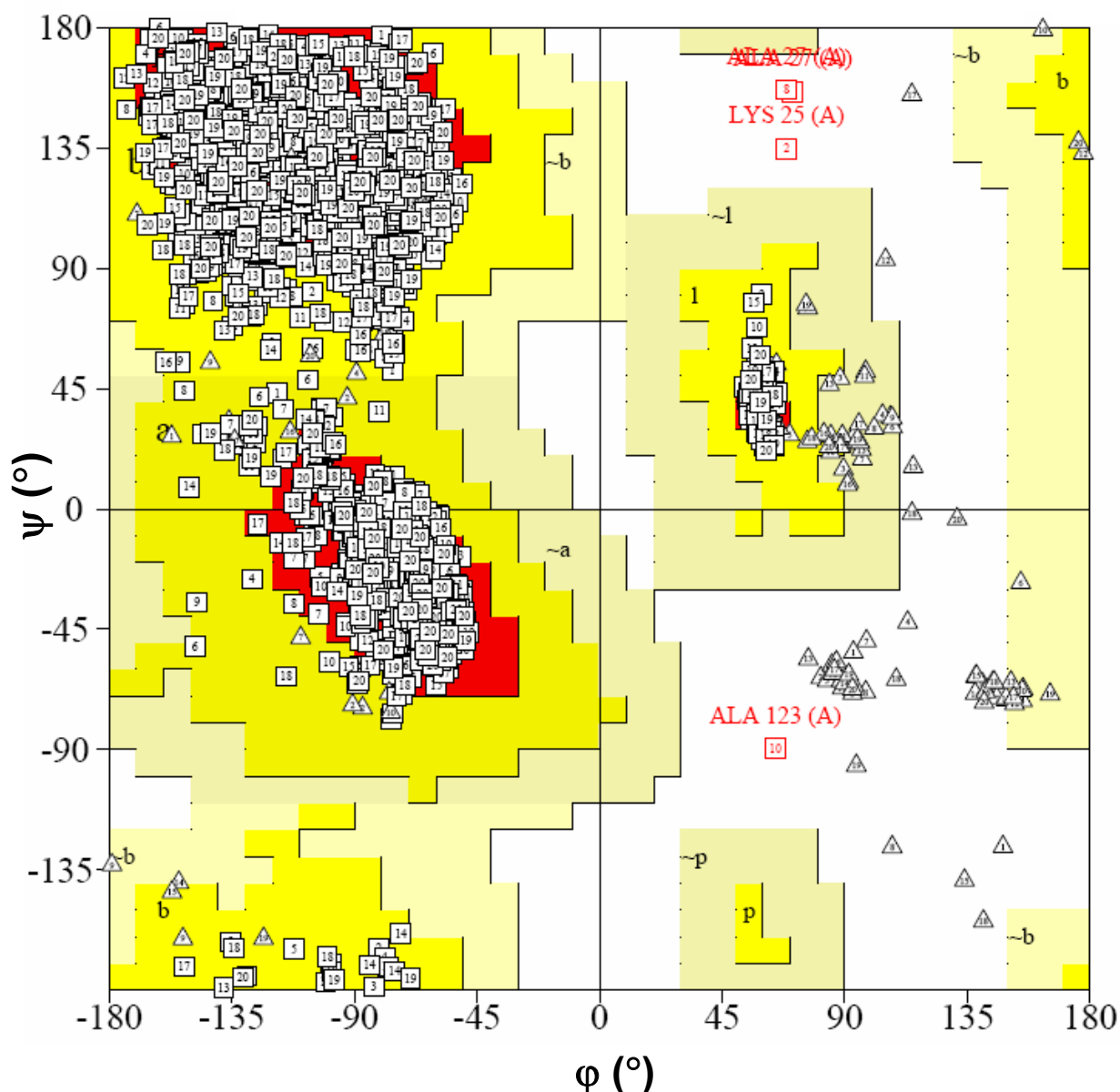


Figura 36. Número de restrições de distância do tipo NOE em função da sequência de Xac2622₂₄₋₁₃₉. Branco: NOEs intraresiduais. Cinza claro: NOEs seqüenciais. Cinza escuro: NOEs de média distância. Preto: NOEs de longa distância. As regiões que apresentam mais NOEs correspondem aos elementos de estrutura secundária (α -hélices e fitas- β).



Estadísticas do “Diagrama de Ramachandran”	Número	(%)
Regiões mais favorecidas (vermelho)	1749	84,9
Regiões adicionalmente permitidas (amarelo)	307	14,9
Regiões generosamente permitidas (bege)	0	0,0
Regiões não permitidas (branco)	4	0,2
Total de resíduos, excluindo glicinas e prolinas	2060	100
Resíduos terminais (excluindo glicinas e prolinas)	20	
Resíduos de glicina (representados como triângulos)	140	
Resíduos de prolina	180	
Total de resíduos	2400	

Figura 37. “Diagrama de Ramachandran” das 20 estruturas em solução depositadas de Xac2622₂₄₋₁₃₉, produzido pelo programa PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996). Quadrados vermelhos: resíduos com combinação de ângulos ϕ e ψ em regiões não permitidas (resíduos K25 e A123 em uma estrutura e A27 em duas estruturas. K25 e A27 fazem parte do N-terminal desenovelado).

4.2.3. A oligomerização de Xac2622

Uma observação recorrente durante o assinalamento de Xac2622₂₄₋₁₃₉ era de que as posições de vários picos mudavam em diferentes experimentos. Outra observação era de que os picos eram muito alargados e os espectros tinham baixa resolução para uma proteína de aproximadamente 13 kDa. Para tentar solucionar o problema da baixa resolução, os experimentos foram realizados em geral a 40 °C durante o processo de estudo dessa proteína por RMN. Maior temperatura aumenta o tombamento da molécula, aumentando o tempo de relaxação T2 e conseqüentemente possibilitando linhas mais estreitas (Rule e Hitchens, 2006).

Uma possível explicação para essas observações é que Xac2622₂₄₋₁₃₉ auto-interage com constante de dissociação na escala das concentrações utilizadas nos experimentos de RMN (10^{-5} - 10^{-3} M). Isso explicaria as mudanças de posição dos picos (pequenas diferenças de concentração foram utilizadas em diferentes experimentos) e a baixa resolução (proteínas maiores, como oligômeros, possuem tempo de relaxação T2 mais curto, pois tombam mais lentamente em solução).

Para investigar essa intrigante hipótese, realizamos experimentos de ¹⁵N-HSQC com diferentes concentrações de ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉ (Figura 38). Estes experimentos mostraram que ao se variar a concentração da proteína, várias correlações específicas sofrem uma marcante modificação do seu deslocamento químico (Figura 39). O mapeamento dos resíduos cujos sinais de ¹H-¹⁵N mais alteram seu deslocamento químico na estrutura de Xac2622₂₄₋₁₃₉ mostra que a possível auto-interação envolve duas regiões, um trecho contínuo do N-terminal desenovelado (resíduos 42-49) e uma face do domínio globular (aminoácidos 63-65,

111-119 e principalmente o maior “loop” da proteína, composto pelos resíduos 85-93) (Figura 40).

A análise dos deslocamentos químicos compostos em função da seqüência de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ apresentada na Figura 39 foi realizada usando dados coletados para amostras com concentrações entre 7 μM e 100 μM , porque diversas correlações não são detectadas em concentrações maiores da proteína, e esses sinais são exatamente aqueles que fazem parte das duas interfaces de auto-interação deste polipeptídeo. Estes fatos claramente apontam troca conformacional devido ao processo de auto-interação de Xac2622₂₄₋₁₃₉, tanto que o sinal do ^1H - ^{15}N da leucina 89 nunca foi observado em experimentos ^{15}N -HSQC (seu assinalamento foi realizado utilizando espectros ^{15}N -NOESY-HSQC).

Para compreender se essa auto-interação de Xac2622₂₄₋₁₃₉ envolve a formação de um dímero ou outra entidade com mais subunidades, foram realizados experimentos de ligação cruzada com glutaraldeído (Figura 41). O resultado obtido mostra que Xac2622₂₄₋₁₃₉ sofre um processo de oligomerização, podendo formar um complexo de alta massa com várias subunidades. O número de subunidades claramente depende da concentração da proteína. O controle negativo utilizado (reação na presença de glutaraldeído e SDS, poço 2) sugere que essa interação é dependente de algum tipo de conformação nativa, provavelmente o enovelamento do domínio globular. Experimentos preliminares de ultracentrifugação analítica, realizados em colaboração com o Dr. Avram Slovic, demonstraram que Xac2622₂₄₋₁₃₉ sofre um processo de oligomerização com várias subunidades (dados não mostrados).

O programa CYANA não assinalou alguns dos NOEs coletados em espectros NOESY. A análise destes NOEs não assinalados em relação a estrutura de

Xac2622₂₄₋₁₃₉ indicou que alguns deles são incompatíveis com a estrutura do monômero desta proteína, pois envolvem os 2 trechos implicados em oligomerização, parte do N-terminal desenovelado e uma região do domínio globular. Uma possível explicação para esses NOEs é que eles seriam intermoleculares (entre prótons presentes em duas moléculas diferentes de Xac2622₂₄₋₁₃₉) e não intramoleculares (entre prótons na mesma cadeia polipeptídica; Figura 42).

Para se estudar a possibilidade de um oligômero do tipo cabeça-cauda (C-terminal enovelado se liga ao N-terminal desenovelado) estão sendo realizados experimentos de “docking” entre estas duas regiões utilizando o programa HADDOCK, com os possíveis NOEs intermoleculares e os dados de deslocamento químico composto como restrições para os cálculos. Até o presente momento, obtivemos resultados que sugerem que o complexo cabeça-cauda é viável, pois as estruturas preliminares não possuem nenhum NOE entre prótons que estejam a mais de 7 Å de distância (um exemplo de um modelo obtido está representado na Figura 43). Contudo, o fato de haver NOEs entre prótons com mais de 6 Å de distância demonstra que as estruturas do “docking” ainda não representam a interface nativa, pois NOEs são tipicamente detectados entre prótons com até 6 Å de distância.

O domínio enovelado de Xac2622 (aminoácidos 51-134) foi produzido marcado com ¹⁵N e purificado para a futura realização de ensaios de titulação com um peptídeo sintético correspondendo aos resíduos 38-52 de Xac2622, seguido de monitoramento por ¹⁵N-HSQC. Estes experimentos poderão confirmar se a hipótese do complexo do tipo cabeça-cauda é verdadeira.

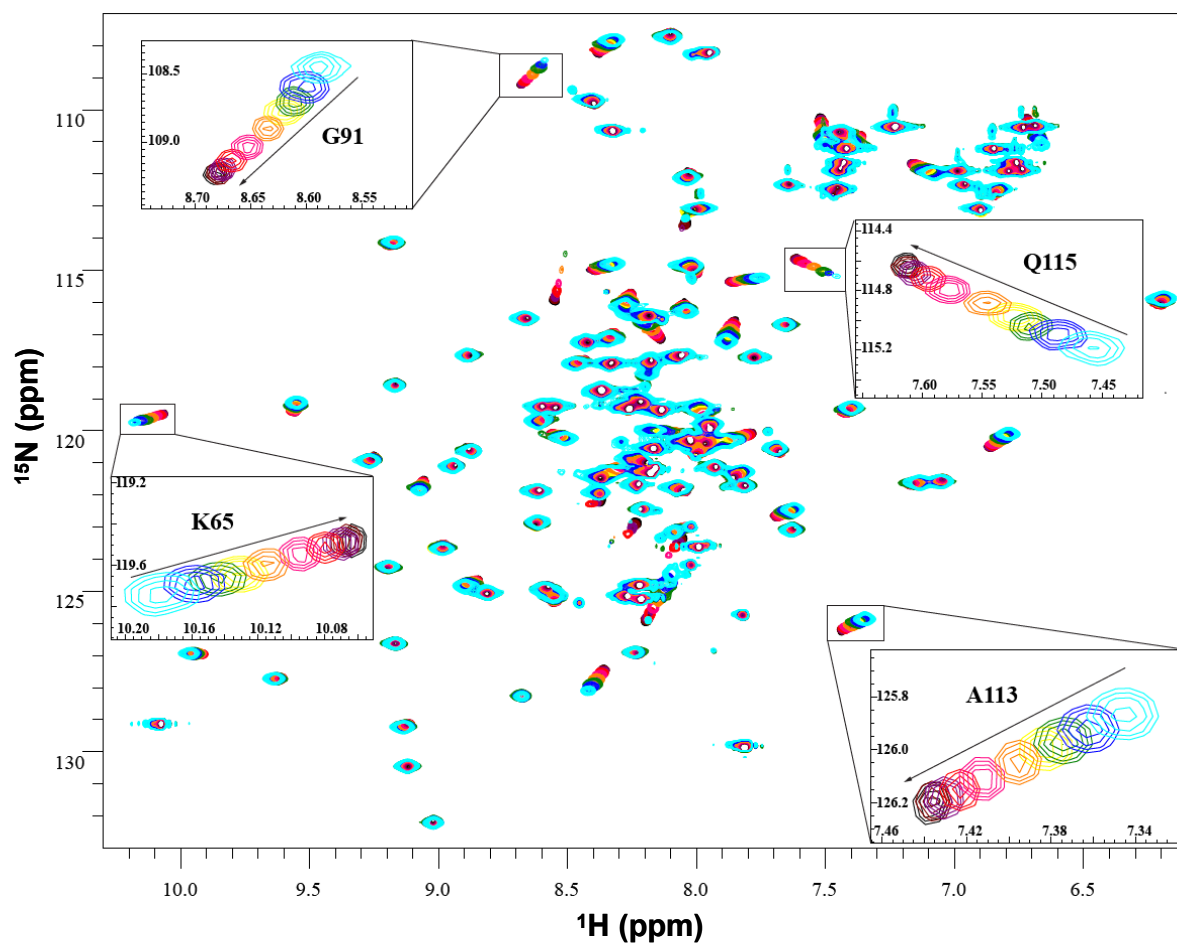


Figura 38. Espectros ^{15}N -HSQC com ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ em diferentes concentrações. Azul claro: 850 μM ; azul escuro: 600 μM ; verde: 400 μM ; amarelo: 300 μM ; laranja: 200 μM ; rosa: 100 μM ; vermelho: 50 μM ; roxo: 25 μM ; marrom: 13 μM e preto: 7 μM . Alguns resíduos cujos deslocamentos químicos dos núcleos ^1H - ^{15}N sofrem grandes mudanças estão ressaltados. As setas representam diminuição da concentração de Xac2622₂₄₋₁₃₉. Experimentos realizados em espectrômetro Varian operando a 600 MHz e equipado com sonda criogênica.

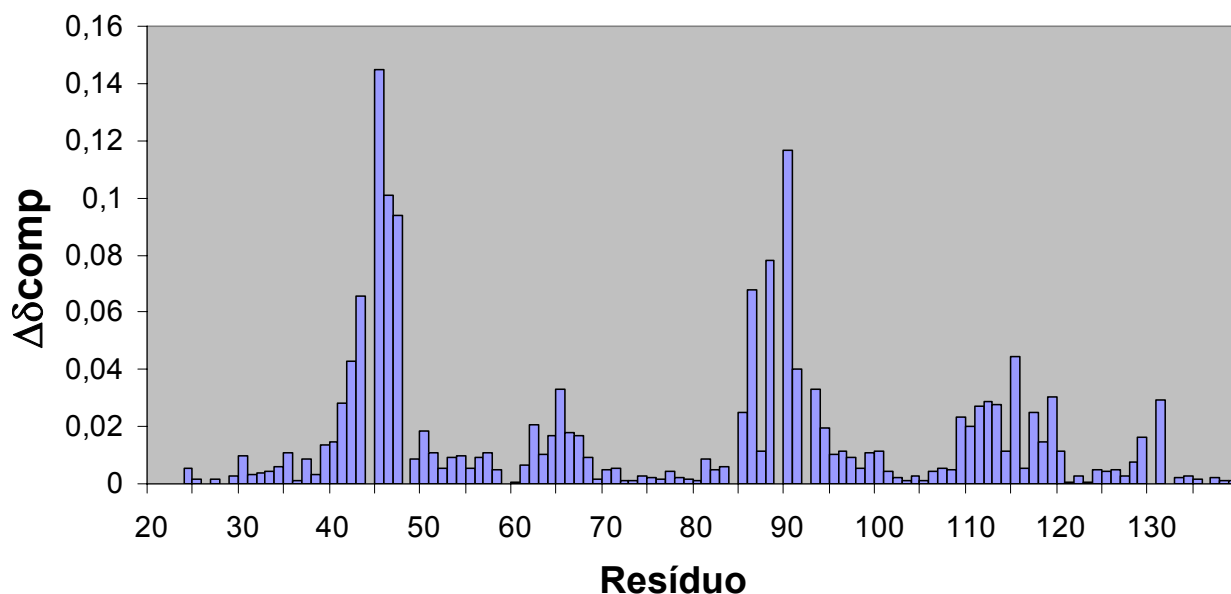


Figura 39. Variação de deslocamento químico composto ($\Delta\delta_{\text{comp}} = [(\Delta\delta^{\text{H}^{\text{N}}})^2 + (0,15 \times \Delta\delta^{\text{N}^{\text{H}}})^2]^{1/2}$) dos ^1H - ^{15}N da cadeia principal em função da seqüência de Xac2622₂₄₋₁₃₉, diluída de 100 μM para 7 μM e analisada por ^{15}N -HSQC.

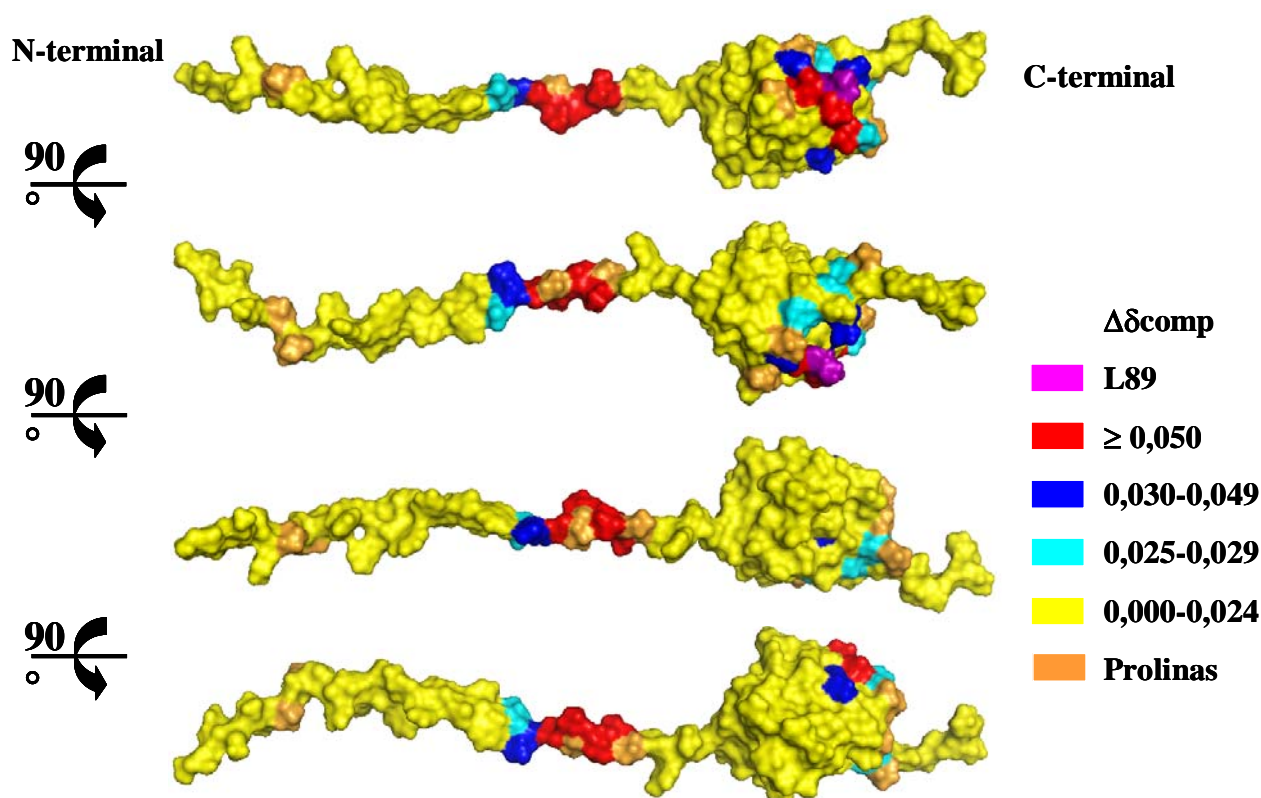


Figura 40. Modelos de superfície de Xac2622₂₄₋₁₃₉, rodados sucessivamente 90°, para mostrar os resíduos envolvidos com oligomerização. As cores (à direita) representam o deslocamento químico composto ($\Delta\delta_{\text{comp}}$) da diluição de 100 μM para 7 μM em experimentos ^{15}N -HSQC. O sinal do ^1H - ^{15}N da leucina 89 (L89, em rosa) nunca foi observado nesses experimentos. Prolinas (laranja) não são detectadas em experimentos ^{15}N -HSQC. Um trecho do N-terminal desenovelado e uma região contínua do domínio enovelado participam da oligomerização.

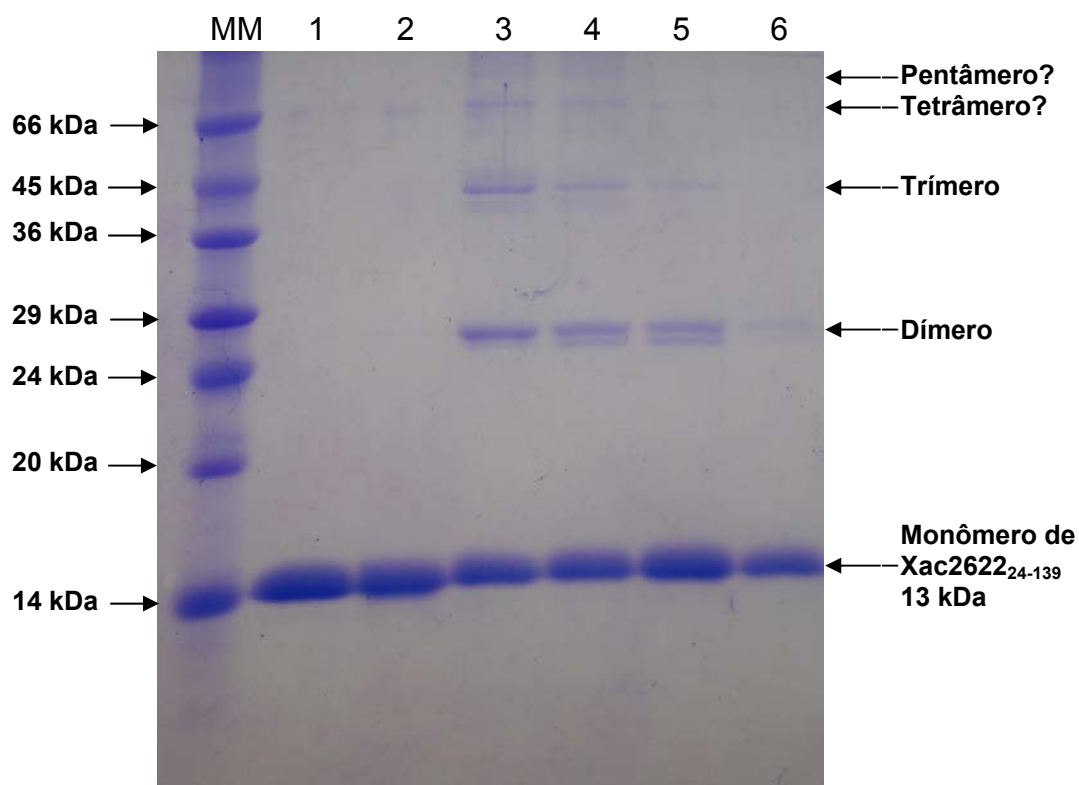


Figura 41. Ligação cruzada com glutaraldeído de Xac2622₂₄₋₁₃₉. (1) Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 720 μ M, não incubada com glutaraldeído; (2) Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 720 μ M, incubada com 0,01 % (v/v) glutaraldeído e 1 % (p/v) SDS por 20 minutos (controle negativo); (3) Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 720 μ M, incubada com 0,01 % (v/v) glutaraldeído; (4) Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 240 μ M, incubada com 0,01 % (v/v) glutaraldeído; (5) Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 80 μ M, incubada com 0,01 % (v/v) glutaraldeído; (6) Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 27 μ M, incubada com 0,01 % (v/v) glutaraldeído. Apesar das reações terem sido realizadas com diferentes concentrações de proteína, as mesmas quantidades de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram aplicadas no gel de Tricina SDS-PAGE 16 %. Massa predita de um dímero de Xac2622₂₄₋₁₃₉: 26 kDa; trímero: 39 kDa; tetrâmero: 52 kDa e pentâmero: 65 kDa. MM: Marcador de massa molecular.

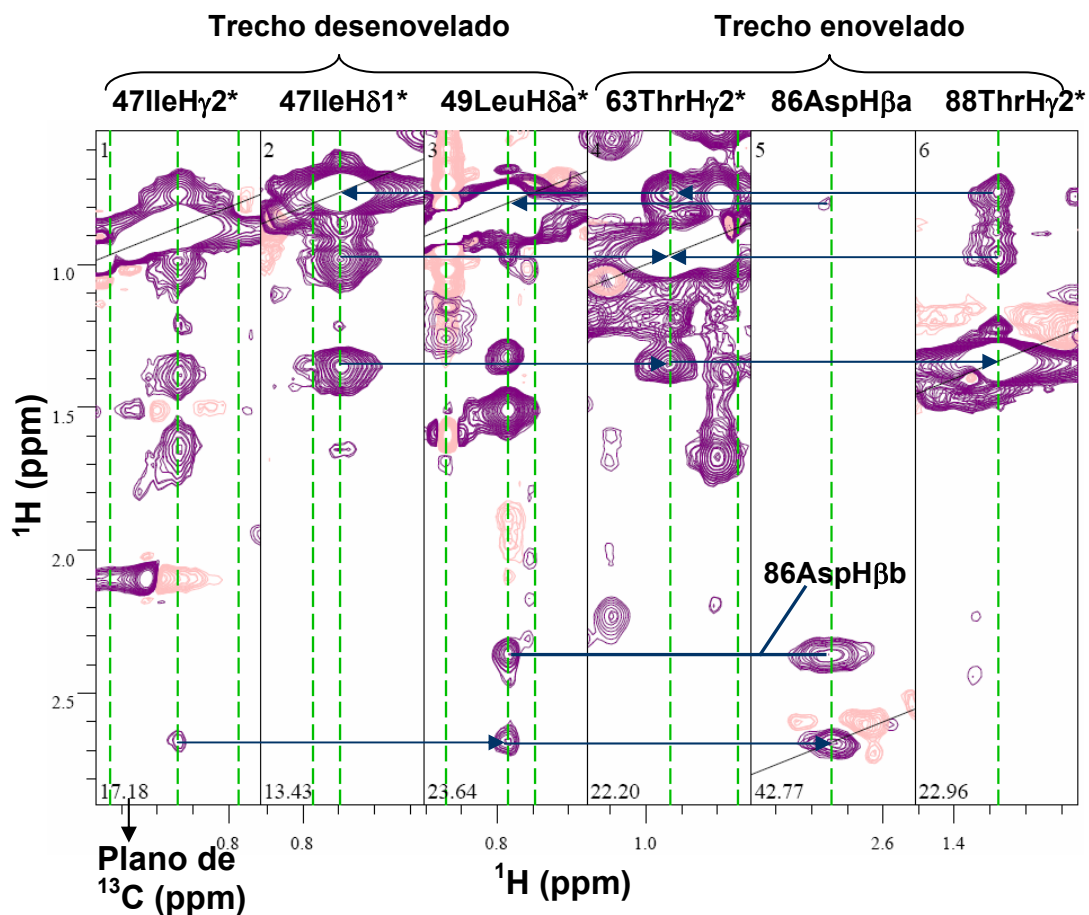


Figura 42. ^{13}C -NOESY-HSQC de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 400 μM . A análise deste experimento tridimensional possibilita a identificação de NOEs envolvendo prótons (eixo X de ^1H) ligados a carbonos (terceira dimensão representada por diferentes planos de ^{13}C) com outros prótons (eixo Y de ^1H). As tiras mostram alguns NOEs ^1H - ^1H (setas) entre as duas regiões que participam da oligomerização (trecho do N-terminal desenovelado e uma região contínua do domínio enovelado). Os NOEs apresentados possivelmente são intermoleculares.



Figura 43. Uma das soluções do “docking” envolvendo o domínio enovelado de Xac2622 (laranja, resíduos 51-134) e seu N-terminal desenovelado (azul; resíduos 24-50). Em verde, distâncias entre prótons envolvidos em possíveis NOEs intermoleculares. (B) é a interface de interação ampliada de (A). O N-terminal de Xac2622₂₄₋₅₀ está indicado.

4.2.4. Estudos da interação Xac2622-VirB9

A interação entre Xac2622 e VirB9 foi demonstrada por duplo-híbrido (Alegria *et al.*, 2005). Para a comprovação desta interação, foram realizados ensaios de fluorescência envolvendo Xac2622_{His-24-139} e VirB9₃₄₋₂₅₅. Estes experimentos mostraram interação específica e com alta afinidade entre as proteínas (K_d de aproximadamente 4×10^{-8} M) (Figura 44).

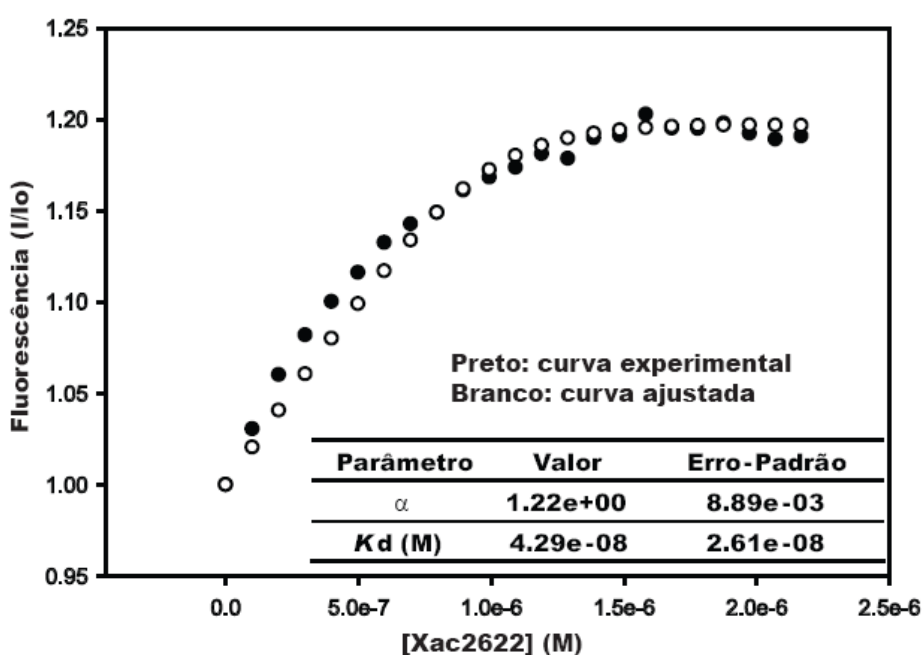


Figura 44. Interação Xac2622_{His-24-139}-VirB9₃₄₋₂₅₅ estudada por fluorescência. Eixo das abscissas: concentração de Xac2622_{His-24-139} adicionada. Eixo das ordenadas: aumento da fluorescência arbitrária devido à interação (I/I₀: Intensidade / Intensidade inicial). Pontos pretos: dados experimentais para a interação. Pontos brancos: curva teórica que melhor se aproxima dos dados obtidos, apresentando uma constante de dissociação (K_d) de aproximadamente 4×10^{-8} M. Observar o platô no eixo Y (parâmetro α : fluorescência máxima / fluorescência inicial), devido à saturação concentração-dependente da interação Xac2622_{His-24-139}-VirB9₃₄₋₂₅₅. Xac2622_{His-24-139} possui 2 triptofanos (W34 e W71), enquanto VirB9₃₄₋₂₅₅ apresenta 1 (W177).

Para se identificar qual a região de interação a VirB9 em Xac2622, foram adquiridos espectros ^{15}N -HSQC de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ na presença de excesso de ^{14}N -VirB9₃₄₋₂₅₅. Estes ensaios mostraram o desaparecimento de praticamente todos os picos observáveis, restando apenas alguns sinais bem intensos (Figura 45). O

desaparecimento das correlações deve-se a alargamento (o que diminui a intensidade), sugerindo a formação de um complexo de alta massa, devido à interação de Xac2622₂₄₋₁₃₉ com um potencial oligômero ou agregado de VirB9₃₄₋₂₅₅. Os picos que sobraram fazem parte de trechos flexíveis da cadeia de Xac2622₂₄₋₁₃₉, que parecem mover-se independentemente do restante do complexo. Esses trechos flexíveis são exatamente os extremos N- (resíduos M*-T24-K25) e C-terminais da molécula (aminoácidos S134-S135-G136-A137-K138-L139) (Figura 45).

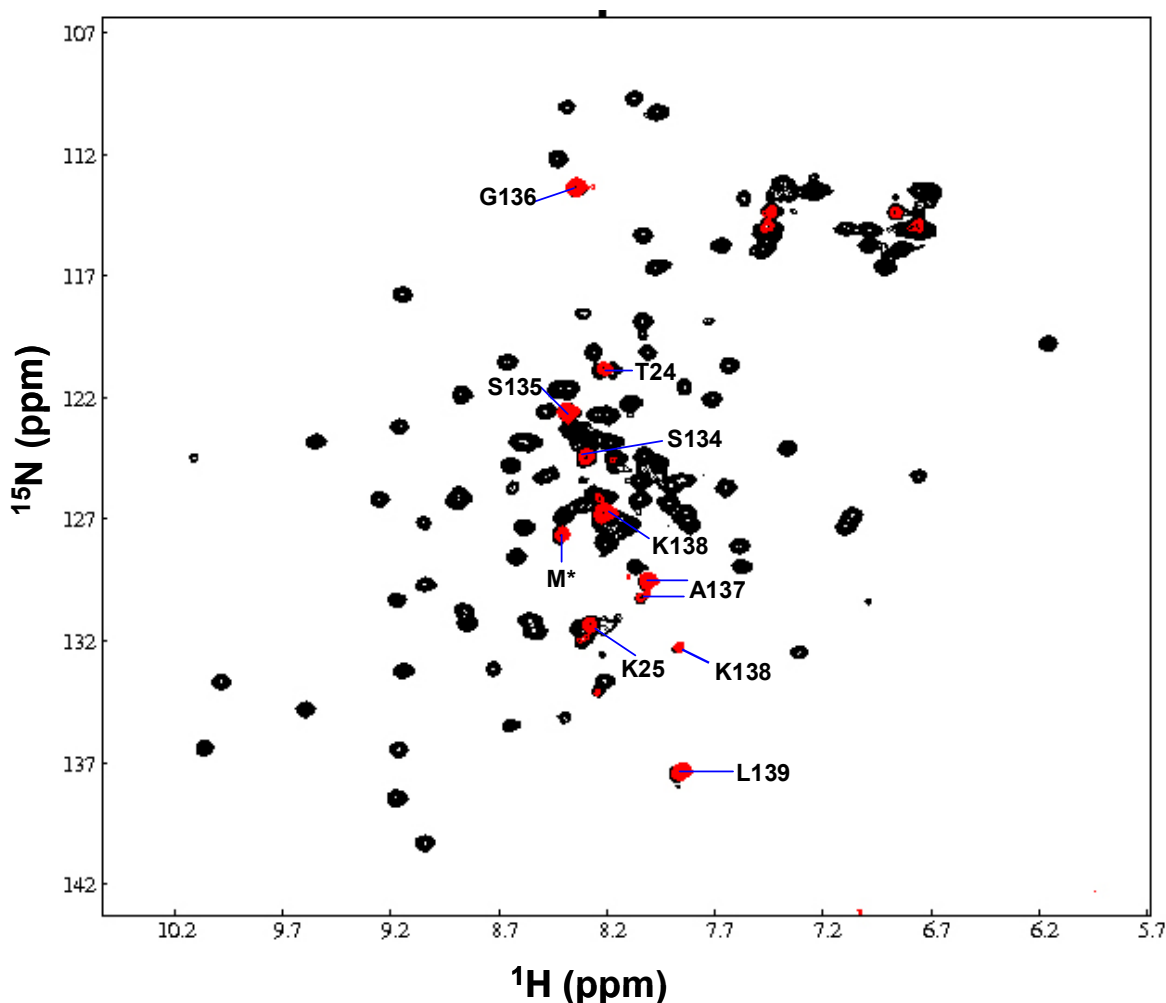


Figura 45. ^{15}N -HSQC a 25 °C de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ na ausência (preto) e presença de ^{14}N -VirB9₃₄₋₂₅₅ (vermelho). M*: sinal do ^1H - ^{15}N da metionina codificada pela extensão N-terminal que resta após clivagem da cauda de poli-histidina de Xac2622₂₄₋₁₃₉ (resíduo anterior a treonina 24 nesta construção). Note que somente sinais correspondendo aos extremos N- e C-terminais de Xac2622₂₄₋₁₃₉ são detectados após a adição de VirB9₃₄₋₂₅₅. 2 picos são detectados para os resíduos alanina 137 (A137) e lisina 138 (K138), enquanto os aminoácidos GSH, também da extensão N-terminal da cauda de poli-histidina e anteriores a M*, não são detectados em experimentos ^{15}N -HSQC de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉.

O desaparecimento da maior parte dos picos no complexo ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉- ^{14}N -VirB9₃₄₋₂₅₅ impossibilita o estudo detalhado desta interação. Para contornar essas dificuldades, foram desenhados iniciadores para a clonagem de um fragmento de DNA que codifica o domínio C-terminal de VirB9 (aminoácidos 154-255). Este trecho foi escolhido porque Xac2622 pode ser um equivalente a VirB7 no T4SS de Xac (Alegria *et al.*, 2005), e o C-terminal de VirB9 foi mostrado interagir com VirB7 pelas proteínas correspondentes no plasmídeo pKM101 (resíduos 177-271 de TraO, equivalente à região 159-255 de VirB9 de Xac) (Bayliss *et al.*, 2007) e em *A. tumefaciens* (resíduos 187-293, equivalente a 177-255 de Xac) (Ward *et al.*, 2002). Além disso, VirB9 de Xac reconhece Xac2622 via sua metade C-terminal (a partir do aminoácido 130) (Alegria *et al.*, 2005). O fato de VirB9 de Xac interagir a partir do resíduo 130 com Xac2622 por duplo-híbrido não significa que é fundamental que a proteína comece neste resíduo, e sim que os trechos anteriores não são necessários para a interação.

Uma solução contendo ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ foi titulada com a proteína ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e espectros ^{15}N -HSQC foram adquiridos após a adição de cada alíquota da segunda proteína. Com o aumento da concentração de ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅, gradualmente várias correlações ^1H - ^{15}N correspondendo a resíduos do N-terminal de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ desapareciam (aminoácidos 27-41), surgindo novos picos em outras regiões (Figura 46 e dados não mostrados).

Para se compreender a que resíduos equivaliam estes novos picos, o assinalamento da cadeia principal de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Xac2622₂₄₋₁₃₉ em complexo com ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foi realizado (Figura 46). O mapeamento dos resíduos cujos sinais de ^1H - ^{15}N mais alteram seu deslocamento químico na estrutura de Xac2622₂₄₋₁₃₉ mostra

que esta proteína reconhece VirB9 via uma região contínua do seu N-terminal desenovelado, correspondendo aos aminoácidos 27-41 (Figura 47).

O padrão da estrutura secundária de Xac2622₂₄₋₁₃₉ em complexo com VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foi analisado pelo programa CSI, utilizando os deslocamentos químicos dos núcleos assinalados (Figura 48). O resultado obtido mostra que a estrutura secundária do domínio enovelado é essencialmente a mesma com Xac2622 sozinha e em complexo com VirB9₁₅₄₋₂₅₅. Todos os elementos de estrutura secundária de Xac2622₂₄₋₁₃₉ foram identificados, com exceção de uma fita- β curta (resíduos 55-56) e da hélice 3₁₀ (aminoácidos 92-95). Contudo, estes 2 motivos provavelmente estão presentes mesmo no complexo, devido ao fato de que nenhuma frequência correspondendo a núcleos presentes no domínio enovelado de Xac2622₂₄₋₁₃₉ teve alteração significativa na interação com VirB9₁₅₄₋₂₅₅.

Foram realizados ensaios para a coleta de acoplamentos dipolares residuais $^1D_{NH}$ de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉- ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅. Os valores de RDCs do complexo são essencialmente os mesmos obtidos para ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha, com exceção do trecho implicado na interação com VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (Figura 49). Os RDCs $^1D_{NH}$ de resíduos localizados em elementos de estrutura secundária coletados no complexo ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉- ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ são compatíveis com as estruturas em solução de Xac2622₂₄₋₁₃₉, apresentando Fator-Q médio de $0,295 \pm 0,018$.

Uma interessante observação é a de que VirB9₁₅₄₋₂₅₅ não afeta a oligomerização de Xac2622₂₄₋₁₃₉, pois correlações que sofrem mudança de deslocamento químico decorrente da alteração da concentração de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ continuam sofrendo esta variação mesmo na presença de ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (Figura 50). Ou seja, o N-terminal desenovelado de Xac2622 é capaz de interagir simultaneamente com VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e com o domínio globular de Xac2622.

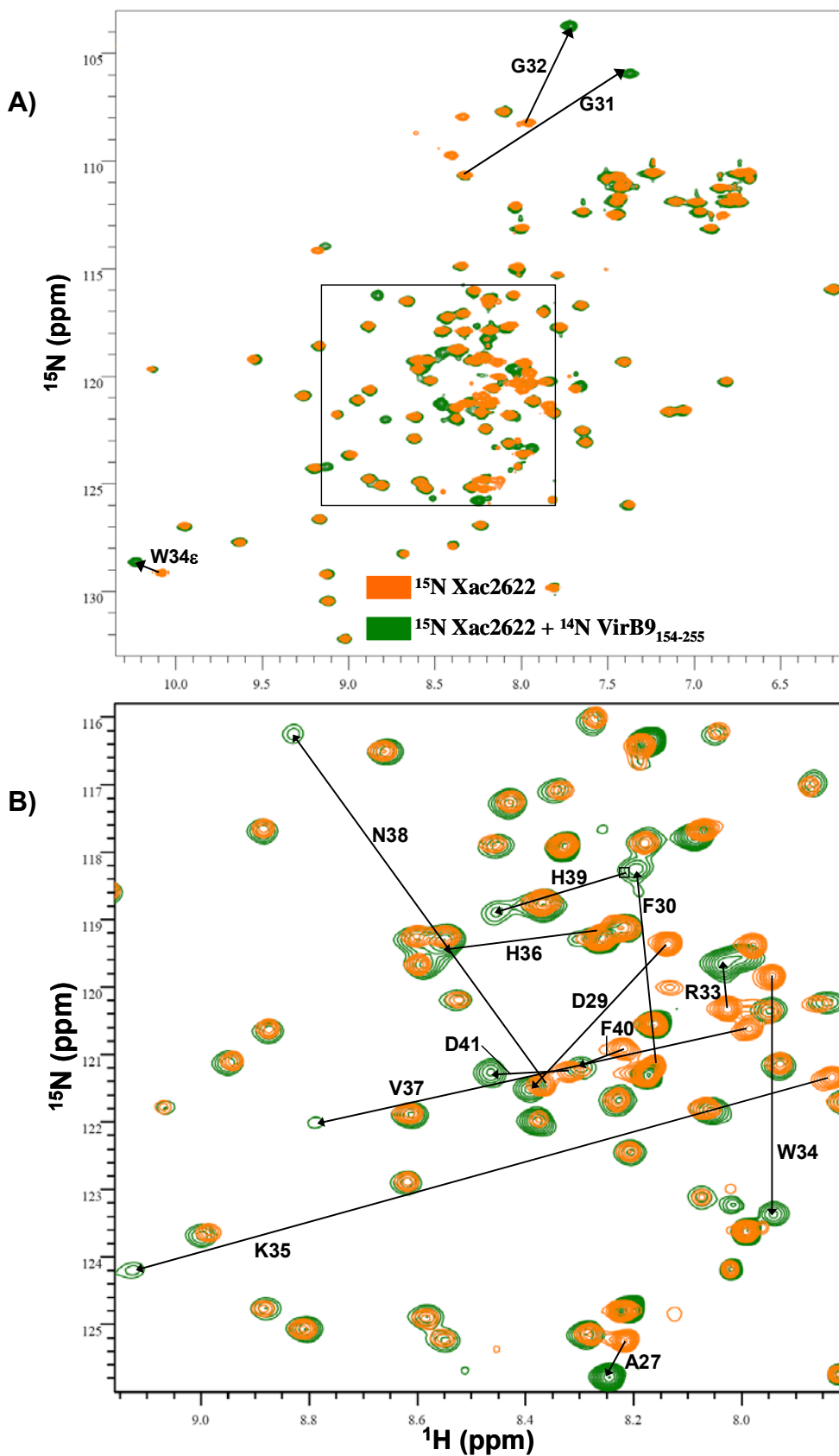


Figura 46. ^{15}N -HSQC de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha (laranja) e em complexo com ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (verde). (A) Janela espectral completa. (B) Ampliação da região central indicada por um retângulo em (A). Setas indicam mudanças nas posições de picos decorrentes da interação de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ com ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅.

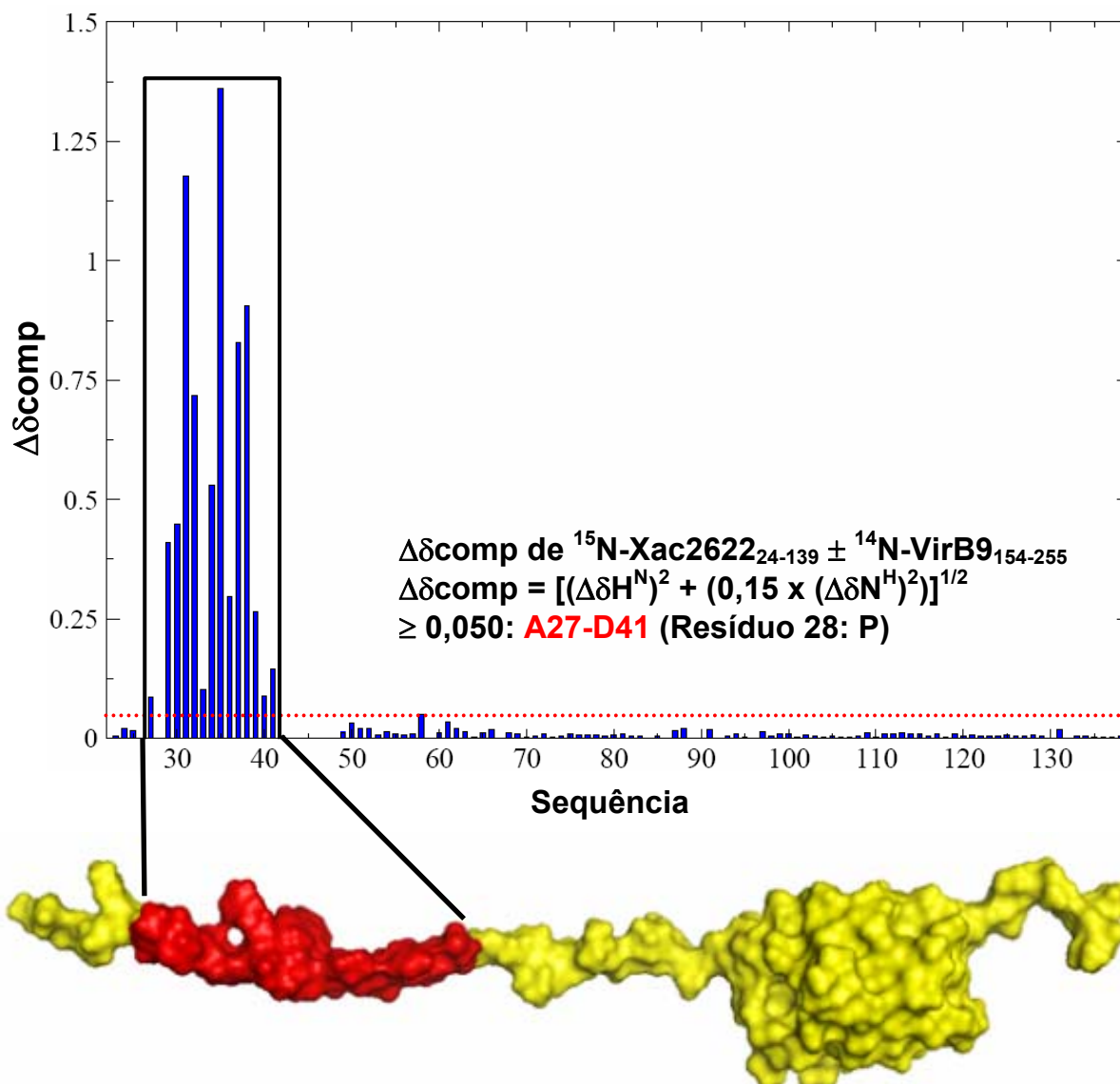


Figura 47. Mapeamento na estrutura de Xac2622₂₄₋₁₃₉ da sua interface de interação com VirB9₁₅₄₋₂₅₅, derivado de experimentos ¹⁵N-HSQC. Está representado o deslocamento químico composto ($\Delta\delta_{comp}$) em função da sequência de Xac2622₂₄₋₁₃₉. Esta proteína reconhece VirB9₁₅₄₋₂₅₅ via uma região contínua do N-terminal desenovelado (aminoácidos 27-41).

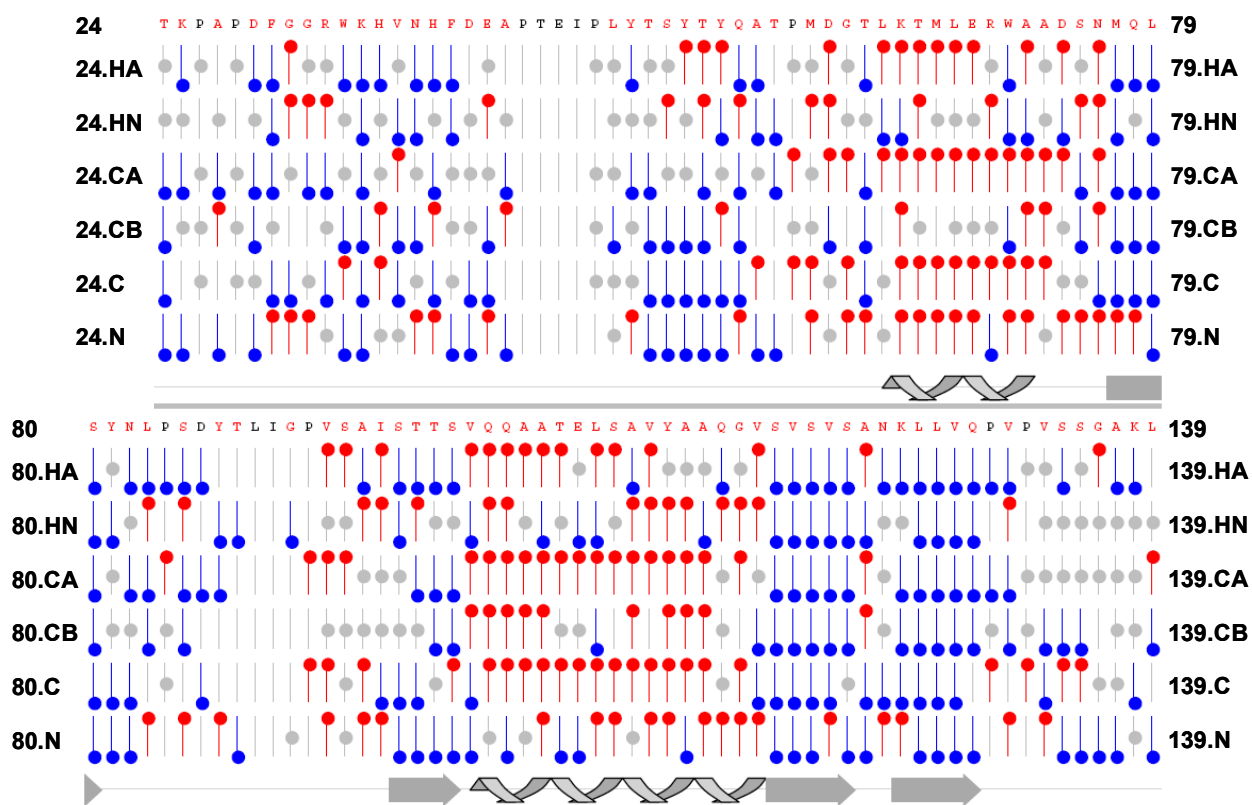


Figura 48. Predição dos elementos de estrutura secundária de Xac2622₂₄₋₁₃₉ em complexo com VirB9₁₅₄₋₂₅₅, utilizando deslocamentos químicos analisados pelo programa CSI (Wishart e Sykes, 1994). Foram usadas as freqüências de $^1\text{H}\alpha$, $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, ^{13}CO e $^{15}\text{N}^{\text{H}}$. Círculos vermelhos: núcleos com deslocamentos químicos compatíveis com α -hélices; círculos azuis: compatíveis com fitas- β ; círculos cinzas: deslocamentos químicos não compatíveis com o esperado para elementos de estrutura secundária. Freqüências não assinaladas ou inexistentes para determinados resíduos (como $^{13}\text{C}\beta$ para glicinas ou $^1\text{H}^{\text{N}}$ para prolinas) são representadas por linhas cinzas verticais. Abaixo, em cinza, está representada a estrutura secundária predita por esse programa.

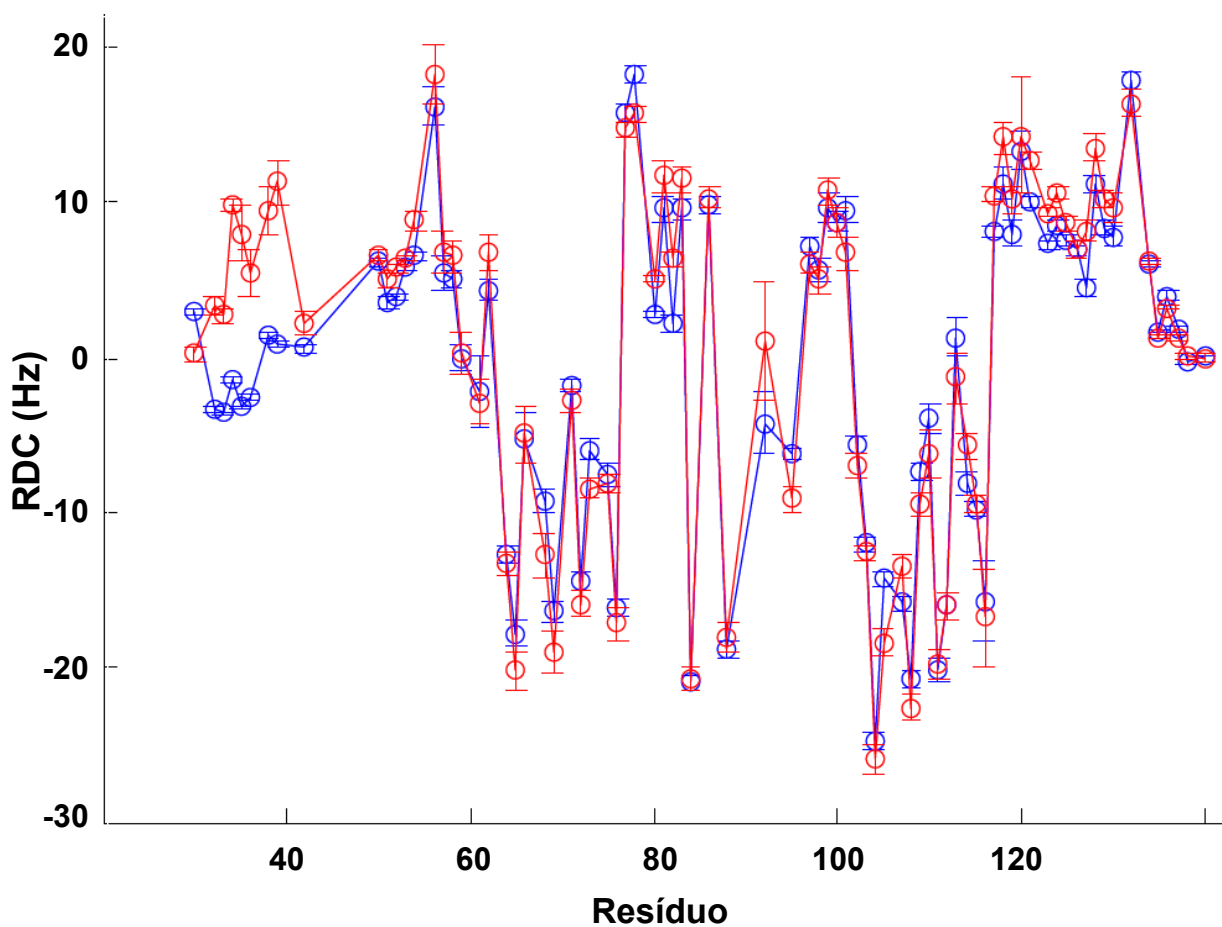


Figura 49. Acoplamentos dipolares residuais $^1D_{NH}$ em função da seqüência de Xac2622₂₄₋₁₃₉. Azul: ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha; vermelho: ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ em complexo com VirB9₁₅₄₋₂₅₅. A região N-terminal com grandes diferenças nos valores de RDCs equivale ao sítio de interação a VirB9₁₅₄₋₂₅₅ em Xac2622₂₄₋₁₃₉.

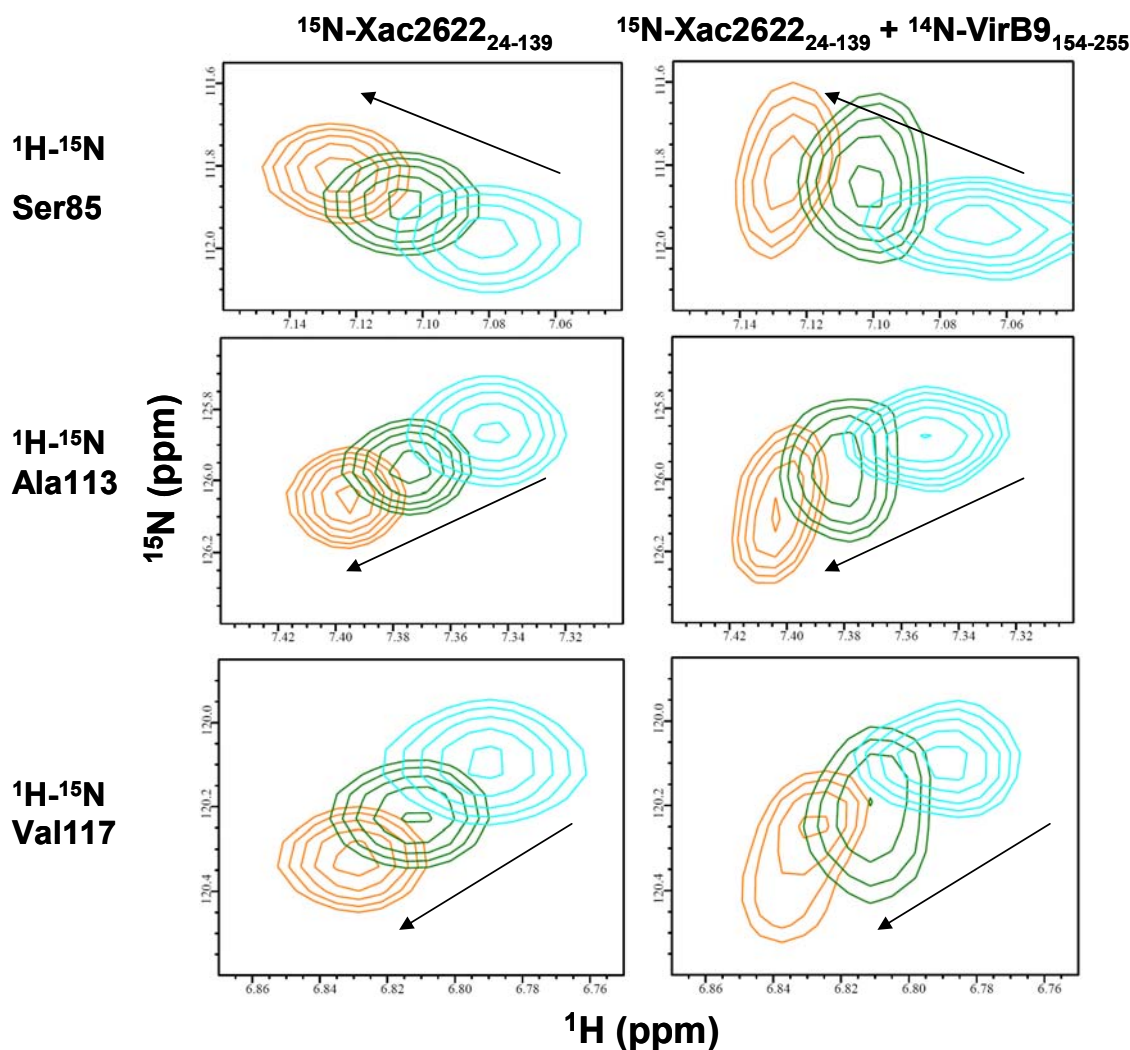


Figura 50. A interação de Xac2622₂₄₋₁₃₉ com VirB9₁₅₄₋₂₅₅ não afeta sua oligomerização. As mudanças de deslocamento químico típicas da diluição de ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉ (a esquerda) ocorrem mesmo na presença de ¹⁴N-VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (a direita), como representado aqui para correlações selecionadas. Azul claro: 800 μM de Xac2622₂₄₋₁₃₉ ou 800 μM do complexo Xac2622₂₄₋₁₃₉-VirB9₁₅₄₋₂₅₅; verde: 400 μM; laranja: 200 μM. Setas indicam diluição das proteínas.

4.2.5. Medidas de relaxação de Xac2622₂₄₋₁₃₉

Dados de relaxação ¹⁵N-T1, ¹⁵N-T2 e {¹H}-¹⁵N NOE Heteronuclear (NOEHet) foram coletados para ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉ (800 μM e 100 μM) e ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉-¹⁴N-VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (complexo a 400 μM) (Figura 51). A análise de NOEHet de ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha mostra que esta proteína possui uma região enovelada central

(valores próximos a 1) e uma longa região N-terminal e uma curta porção C-terminal não estruturadas (valores negativos ou próximos a 0). Isso confirma as predições de elementos de estrutura secundária baseadas em deslocamentos químicos e as informações da quantidade de NOEs ^1H - ^1H presentes ao longo da seqüência de Xac2622₂₄₋₁₃₉ (Figuras 33 e 36). Dados de ^{15}N -T2 a 800 μM também corroboram essas observações. Porém, o fato de parte do N-terminal não estruturado possuir NOEHet próximo a zero pode implicar alguma rigidez, e talvez conformações preferenciais ou tendência a enovelamento.

Outras observações importantes são as de que ^{15}N -T1 é mais longo e ^{15}N -T2 mais curto para o domínio enovelado de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ em maior concentração (800 μM) do que em menor concentração (100 μM). Isso sinaliza diminuição do tombamento molecular e, conseqüentemente, aumento da massa em função da concentração da proteína, corroborando a observação de que Xac2622₂₄₋₁₃₉ oligomeriza com o aumento da sua concentração.

Notar que não foram obtidos dados de relaxação para algumas regiões diretamente implicadas com oligomerização (exemplos: aminoácidos 43-48, 86, 89 e 90), e que os resíduos que flanqueiam estas regiões possuem tendências de queda de ^{15}N -T2 e aumento de ^{15}N -T1. Estes fatos implicam troca conformacional das regiões de oligomerização, o que impossibilitou a coleta de medidas de relaxação confiáveis para esses trechos.

O sítio de interação a VirB9₁₅₄₋₂₅₅ em Xac2622₂₄₋₁₃₉ (resíduos 27-41) possui valores de NOEHet elevados (próximos a 1) e ^{15}N -T2 reduzido quando em complexo com seu parceiro de interação, em comparação com os valores detectados para Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha. Essas observações indicam maior rigidez (HetNOE) e

tombamento mais lento ($^{15}\text{N-T2}$), decorrentes da formação de um complexo de maior massa envolvendo a região 27-41 de Xac2622₂₄₋₁₃₉ e VirB9₁₅₄₋₂₅₅.

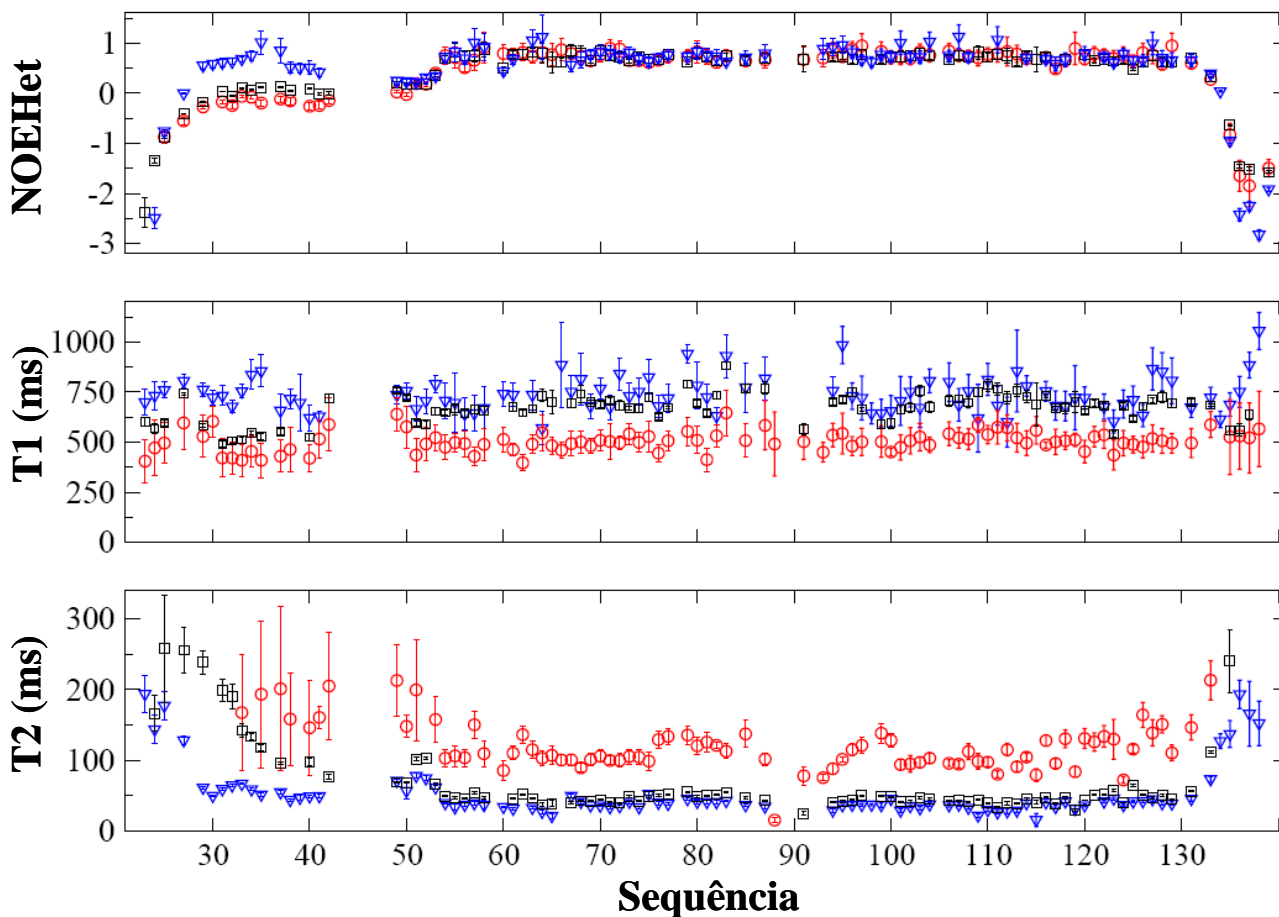


Figura 51. Dados de relaxação $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE heteronuclear (NOEHet), $^{15}\text{N-T1}$ e $^{15}\text{N-T2}$ para $^{15}\text{N-Xac2622}_{24-139}$ a 800 μM (quadrados pretos), $^{15}\text{N-Xac2622}_{24-139}$ a 100 μM (círculos vermelhos) e $^{15}\text{N-Xac2622}_{24-139}$ no complexo com $^{14}\text{N-VirB9}_{154-255}$ a 400 μM (triângulos azuis).

4.2.6. Estrutura cristalográfica de Xac2622₅₁₋₁₃₄

A proteína Xac2622₅₁₋₁₃₄ (aproximadamente 14 mg/mL) foi submetida a ensaios de cristalização. O surgimento de cristais foi observado após poucos dias em diversas condições contendo diferentes precipitantes, particularmente sais. A condição 5 do kit comercial Crystal Screen 2 (2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 5 % (v/v) isopropanol; Hampton Research) foi escolhida para posterior refinamento, pois gerava cristais

maiores e em menor quantidade por gota. Estes refinamentos possibilitaram o surgimento de placas com até 1 mm em sua maior dimensão (Figura 52). Os melhores cristais foram obtidos com a solução 1,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 4% (v/v) isopropanol.

Cristais de Xac2622₅₁₋₁₃₄ foram submetidos à difração de raios-X na linha W01B-MX2 do LNLS, e difrataram até uma resolução de 1,04 Å, pertencendo ao grupo espacial ortorrômbico C222₁ (Tabela 11), com coeficiente de Matthews de 1,78 Å³.Da⁻¹ e conteúdo de solvente de 31,12 %.

A estimativa inicial das fases cristalográficas de Xac2622₅₁₋₁₃₄ foi obtida por substituição molecular, utilizando como modelo de busca o mesmo fragmento (resíduos 51-134) da proteína Xac2622₂₄₋₁₃₉, resolvida por RMN (tópico 4.2.2). O refinamento está sendo realizado com os programas Coot (Emsley e Cowtan, 2004) e REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Vagin *et al.*, 2004), e ainda não foi finalizado (Figura 53). Apesar disso, o modelo já apresenta excelente geometria e concordância com os dados experimentais (Tabela 12 e Figura 54). A estrutura preliminar possui uma molécula de proteína, 1 isopropanol e 117 moléculas de água por unidade assimétrica, com R_{factor} de 0,121 e R_{free} de 0,147.

O modelo cristalográfico de Xac2622₅₁₋₁₃₄ é amplamente compatível com os dados de acoplamentos dipolares residuais $^1\text{D}_{\text{NH}}$ de resíduos localizados em elementos de estrutura secundária coletados de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ sozinha, apresentando Fator-Q de 0,181 (Tabela 12). Interessantemente, a estrutura resolvida por cristalografia e difração de raios-X possui maior concordância com os dados de RDCs do que os modelos obtidos por RMN em solução (Fator-Q de 0,271 ± 0,019; Tabela 10).

O modelo cristalográfico refinado possui todos os resíduos de Xac2622₅₁₋₁₃₄. Entretanto, os aminoácidos 51 e 134, que fazem parte das extremidades N- e C-terminais da proteína, não apresentam densidade clara para todos os seus átomos, apontando que estes resíduos equivalem ao limite do domínio enovelado. Além disso, o “loop” dos resíduos 122-125, que conecta as duas últimas fitas-β da proteína, também não apresenta densidade clara para todos os átomos.

Comparação dos modelos resolvidos em solução e por cristalografia e difração de raios-X mostra que as estruturas são extremamente semelhantes, com pequenas diferenças observadas para “loops” e principalmente para as extremidades N- e C-terminais (Figura 55). O RMSD para os átomos da cadeia principal no trecho incluindo os resíduos 52-131 é de 1,09 Å.

Similaridades topológica e estrutural do domínio enovelado de Xac2622 com proteínas de estrutura conhecida serão abordadas na discussão.



Figura 52. Cristais de Xac2622₅₁₋₁₃₄.

Tabela 11. Estatísticas da coleta de dados cristalográficos de Xac2622₅₁₋₁₃₄.

Coleta de dados	
Grupo espacial	C222 ₁
Eixos <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> da célula unitária (Å)	27,76; 55,81; 83,10
Resolução (Å)	30,00 – 1,04 (1,08 – 1,04) ^a
Reflexões observadas	367270
Reflexões únicas	30386
R_{merge}^b	0,068 (0,293) ^a
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	34,8 (5,1) ^a
Completeza (%)	96,3 (79,0) ^a
Redundância	12,1 (8,9) ^a
Ângulo de oscilação (°)	1
Número de imagens	360
Comprimento de onda (Å)	0,9537

^aNúmeros entre parênteses representam dados para a camada de maior resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)}$.

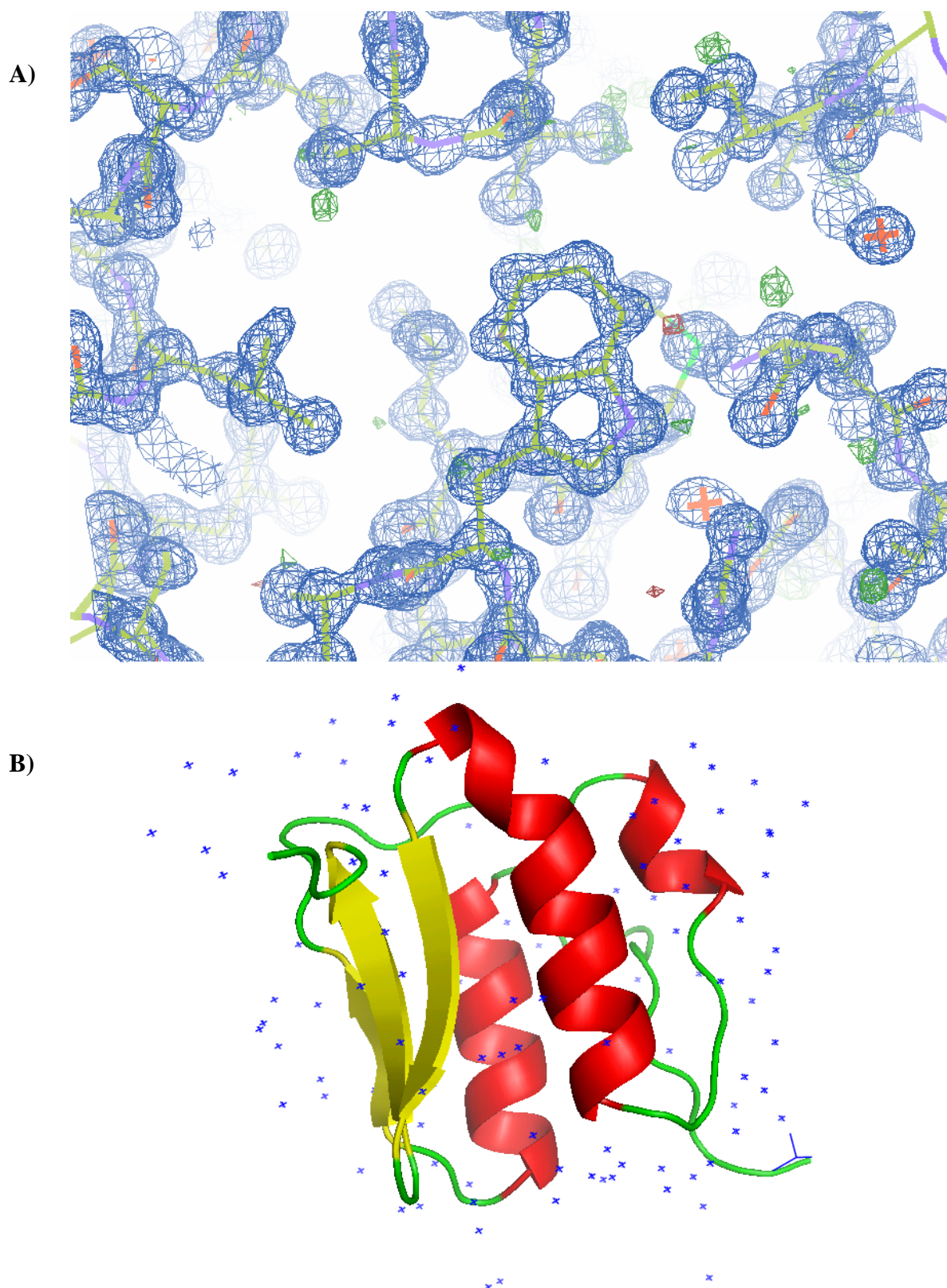


Figura 53. Estrutura cristalográfica de Xac2622₅₁₋₁₃₄. (A) Mapas de densidade eletrônica $2Fo - Fc$ ($1,5 \sigma$, azul) e $Fo - Fc$ ($3,0 \sigma$: verde e $-3,0 \sigma$: vermelho) de trecho selecionado da proteína, com o modelo da proteína ajustado aos mapas de densidade. (B) Modelo em fitas da estrutura cristalográfica preliminar de Xac2622₅₁₋₁₃₄. Moléculas de água e uma molécula do co-solvente isopropanol estão representadas em azul.

Tabela 12. Refinamento cristalográfico e qualidade da estrutura cristalográfica de Xac2622₅₁₋₁₃₄.

Estatísticas do refinamento	
Moléculas de proteína / UA	1
Resíduos / UA	84
Total de átomos diferentes de hidrogênios	784
Átomos da proteína	663
Moléculas de água	117
Átomos de isopropanol	4
R_{factor}^a	0,121
R_{free}^a	0,147
“Figure of merit” (REFMAC5)	0,934
Fator-B médio (Å ²)	10,78
RMSD da geometria ideal	
Comprimentos de ligação (Å)	0,0254
Ângulos de ligação (°)	2,333
Estatísticas do “Diagrama de Ramachandran” (%)	
Regiões mais favorecidas	96,3
Regiões adicionalmente permitidas	3,7
Regiões generosamente permitidas	0,0
Regiões não permitidas	0,0
Número de RDCs (¹ D _{NH})	35
Fator-Q médio	0,181

^a $R_{\text{factor}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$. R_{free} é calculado da mesma forma que R_{factor} , porém utilizando 5 % dos dados escolhidos randomicamente e não incluídos no refinamento. UA: unidade assimétrica.

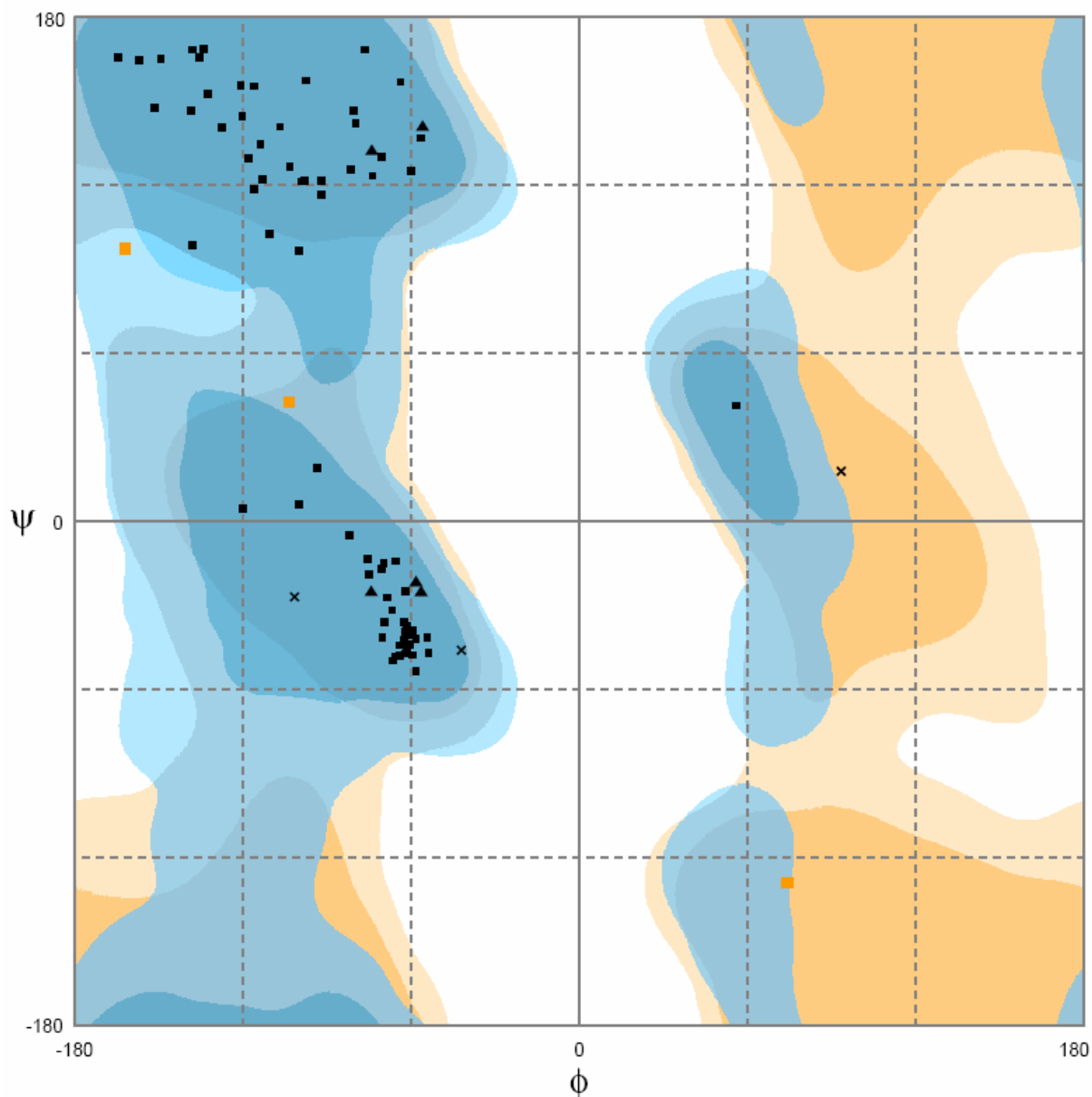


Figura 54. “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de Xac2622₅₁₋₁₃₄, produzido pelo programa RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003). Símbolos pretos: resíduos com combinação de ângulos ϕ e ψ em regiões mais favorecidas (96,3 %); quadrados laranjas: ϕ e ψ em regiões adicionalmente permitidas (3,7 %). Nenhum resíduo possui ângulos ϕ e ψ em regiões generosamente permitidas ou regiões não permitidas.

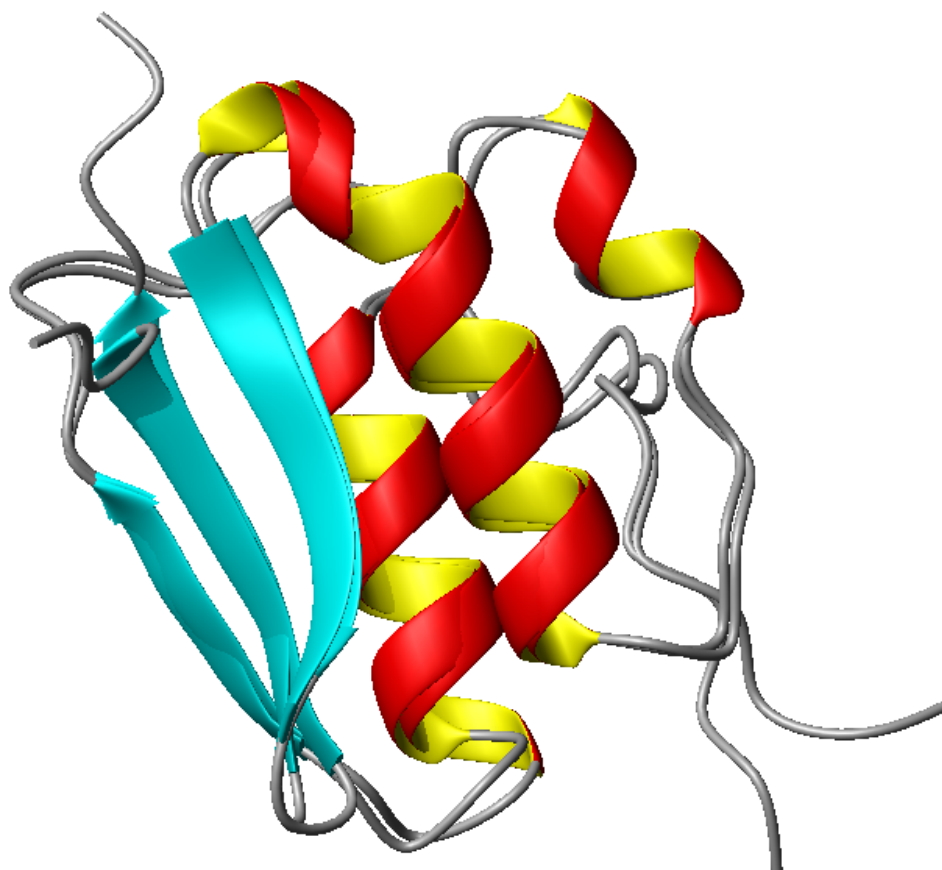


Figura 55. Sobreposição dos modelos estruturais do domínio enovelado de Xac2622 (resíduos 51-134), resolvidos por cristalografia e difração de raios-X e por RMN em solução (estrutura depositada de menor energia). Os 2 modelos apresentam RMSD para os átomos da cadeia principal (resíduos 52-131) de 1,09 Å.

4.2.7. Nocaute do gene *xac2622* e experimentos *in planta*

Nocaute de *xac2622* em *Xac* foi obtido por recombinação homóloga de uma construção contendo as regiões que flanqueiam o gene de interesse; contudo, sem possuir as seqüências que codificam a proteína Xac2622. A virulência desta linhagem foi comparada com a apresentada pela cepa selvagem de *Xac* por meio de inoculações em folhas de laranja pêra (Figura 56A). O resultado obtido sugere que *xac2622* não é essencial para virulência de *Xac* na infecção de laranja pêra, pois os fenótipos de infecção (encharcamento, hiperplasia e necrose) são indistinguíveis quando comparados à linhagem selvagem. Curvas de crescimento das cepas selvagem e $\Delta xac2622$ em folhas de laranja pêra mostraram, com exceção do último

tempo coletado (10 dias), que ambas as linhagens são capazes de crescer com a mesma eficiência *in planta* (Figura 56B).

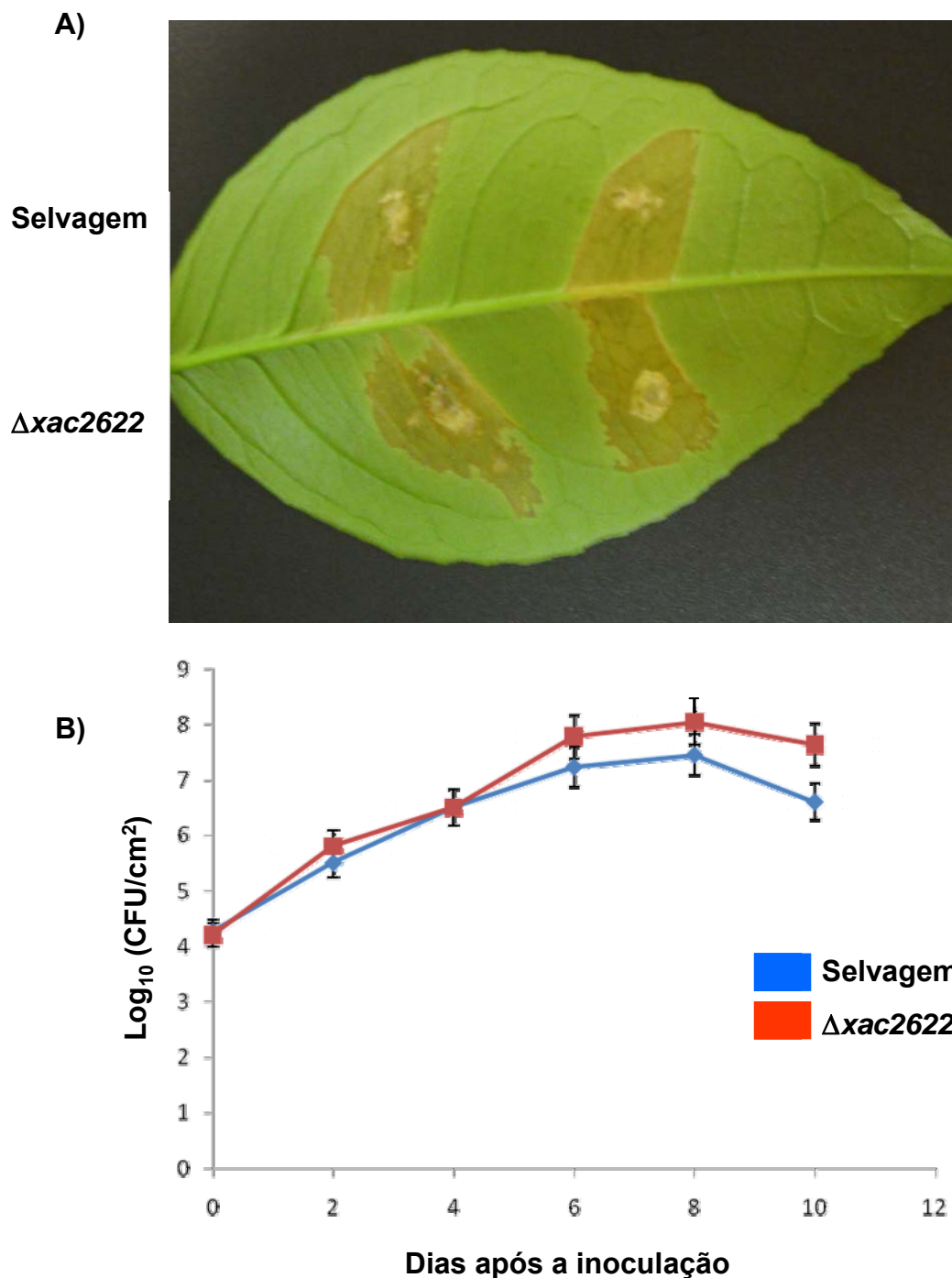


Figura 56. Nocaute do gene *xac2622* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e comparação do seu fenótipo de infecção com a cepa selvagem. (A) Infecções causadas em uma folha de laranja pêra pelas linhagens selvagem (duas injeções acima) e $\Delta xac2622$ (duas injeções abaixo), após 10 dias de inoculação. (B) Curvas de crescimento das cepas selvagem e $\Delta xac2622$ de *Xac* em folhas de laranja pêra. CFU: unidades formadoras de colônia.

4.2.8. Estudo de RMN de VirB9₁₅₄₋₂₅₅

VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foi produzida marcada com ¹⁵N, para se avaliar a possibilidade de caracterização estrutural desta proteína por RMN. Espectros ¹⁵N-HSQC mostram que ¹⁵N-VirB9₁₅₄₋₂₅₅ apresenta correlações extremamente largas e sobrepostas (Figura 57A; vermelho), não compatíveis para um domínio pequeno (106 resíduos) e enovelado. Porém, após a adição de ¹⁴N-Xac2622₂₄₋₁₃₉, o espectro resultante passa a ter linhas estreitas e bem resolvidas, demonstrando que VirB9₁₅₄₋₂₅₅ sofre uma marcante mudança conformacional induzida por Xac2622₂₄₋₁₃₉ (Figura 57A em verde e Figura 57B).

Com isso, VirB9₁₅₄₋₂₅₅ passa a ser um excelente alvo para caracterização estrutural por RMN. Entretanto, isso somente será verdade em complexo com Xac2622, que sofre um processo de oligomerização que provavelmente dificultará o assinalamento e a determinação da estrutura em solução de VirB9₁₅₄₋₂₅₅. Como a primeira proteína reconhece a segunda apenas por um trecho contínuo e desenovelado da sua cadeia polipeptídica (resíduos 27-41), seria mais simples se utilizar apenas o fragmento de interação para tentar mimetizar o efeito causado em VirB9₁₅₄₋₂₅₅ por Xac2622.

Por isso, a proteína ¹⁵N/¹³C-VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foi produzida e purificada, e serão realizados experimentos de RMN 2D e 3D na presença de um peptídeo sintético correspondendo aos resíduos 24-46 de Xac2622. Isso possibilitará a resolução da estrutura em solução de VirB9₁₅₄₋₂₅₅ em complexo com o N-terminal de Xac2622.

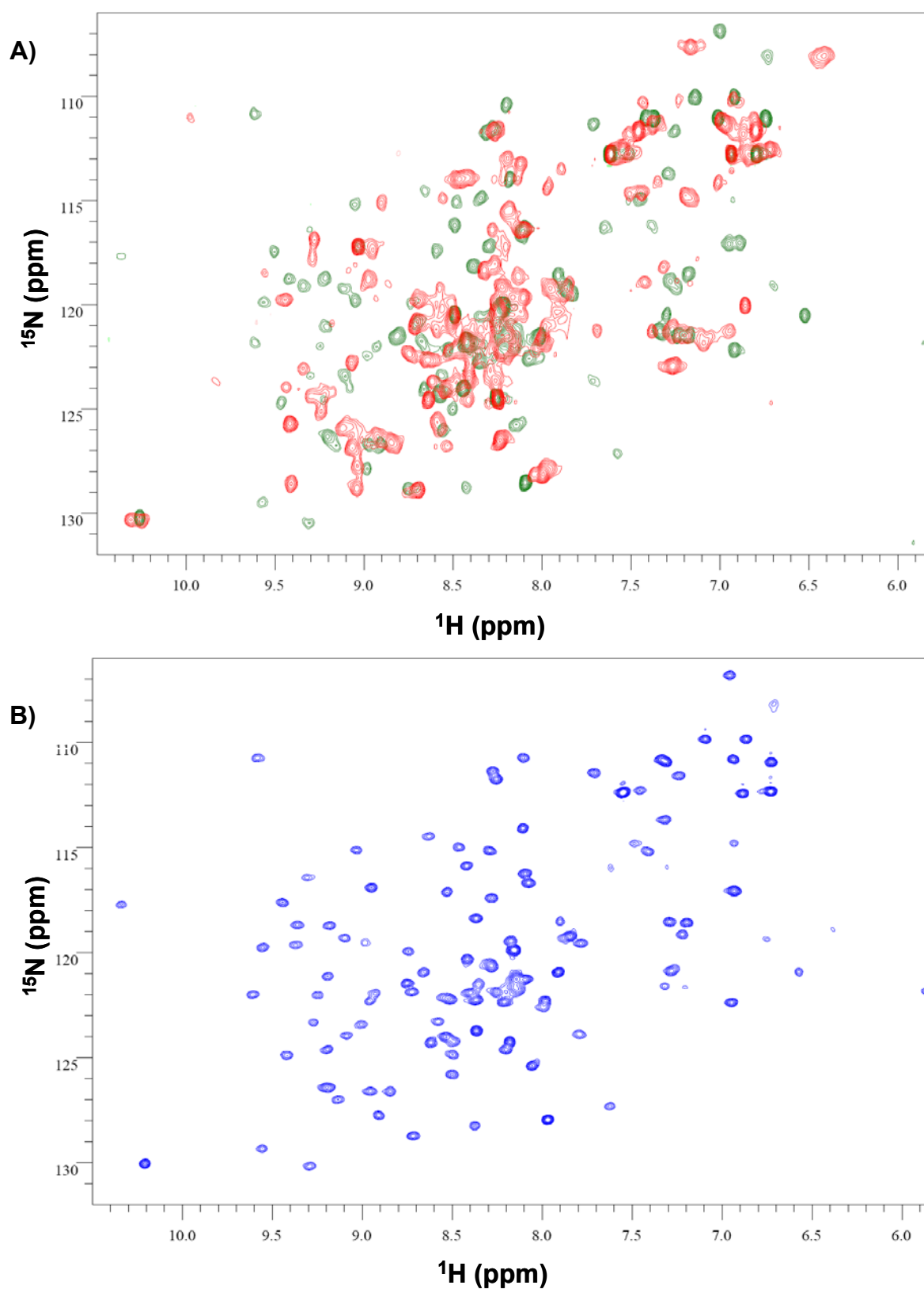


Figura 57. VirB9₁₅₄₋₂₅₅ sofre marcante mudança conformacional na presença de Xac2622₂₄₋₁₃₉. (A) ^{15}N -HSQC de ^{15}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ sozinha (vermelho) e na presença de ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ (verde) a 30 °C. (B) ^{15}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ em complexo com ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ a 40 °C.

4.2.9. Cristalização de VirB9₁₅₄₋₂₅₅

Testes de cristalização foram realizados com as proteínas VirB9_{His-154-255} e VirB9₁₅₄₋₂₅₅. Diversas condições de cristalização foram obtidas após aproximadamente 15 dias para as duas construções, particularmente com o precipitante Polietileno Glicol 3350 (PEG3350). A maioria das condições leva ao surgimento de aglomerados de agulhas finas, não úteis para difração. Os melhores cristais foram obtidos para VirB9_{His-154-255} a partir do refinamento da condição 84 do kit Index 2 (0,2 M MgCl₂; 0,1 M Hepes pH 7,5; 25 % (p/v) PEG3350; Hampton Research). Porém, mesmo os melhores cristais obtidos até o momento são placas bidimensionais finas (Figura 58), que difrataram até uma resolução máxima de 4 Å e de forma anisotrópica (dados não mostrados). Não foi possível se determinar o grupo espacial e as características da célula unitária desses cristais. Novos refinamentos serão necessários para a obtenção de cristais com melhor qualidade, que possibilitem a determinação estrutural em alta resolução de VirB9₁₅₄₋₂₅₅.

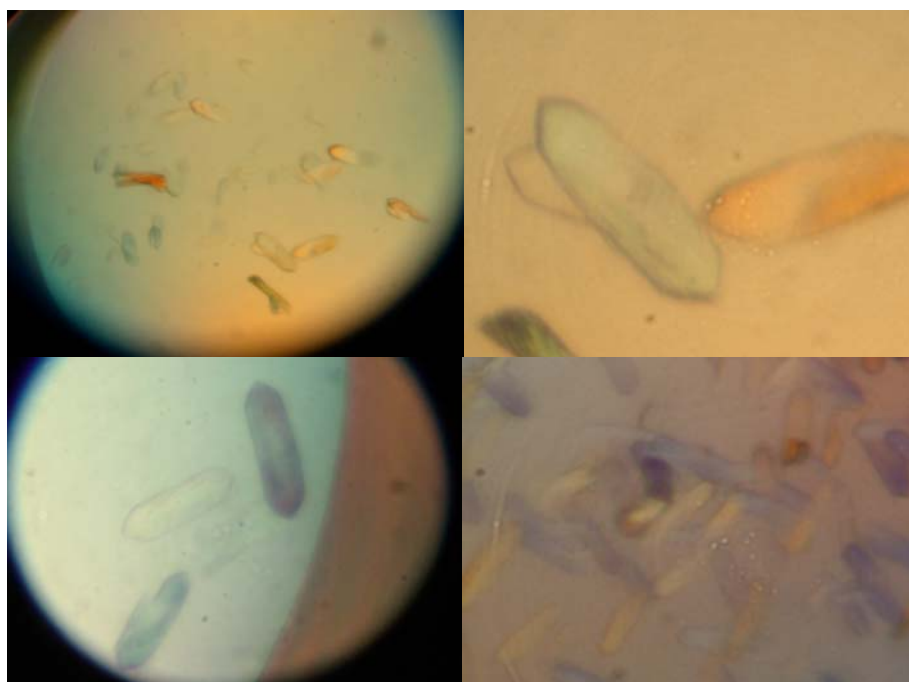


Figura 58. Cristais de VirB9_{His-154-255}.

4.3. Caracterização e interações das proteínas Xac2609, Xac2610 e VirD4

4.3.1. Análise da interação entre as proteínas Xac2609-Xac2610

As proteínas Xac2609 e Xac2610 são potenciais substratos do T4SS de *Xac* e foram demonstradas interagirem por duplo-híbrido (Alegria, 2004). O mesmo estudo demonstrou que Xac2609 e Xac2610 interagem com VirD4 e VirB11, respectivamente. A Figura 59 apresenta o gel de SDS-PAGE da avaliação da interação de Xac2609₁₋₄₃₁ e Xac2610_{His-22-267} utilizando a técnica de “pulldown”. Estes ensaios mostraram que Xac2609₁₋₄₃₁ e proteínas do extrato de *E. coli* não são capazes de se ligar à resina de sepharose-Ni²⁺ na ausência de Xac2610_{His-22-267} (poço 1), e que esta última não interage com as proteínas do extrato de *E. coli* (poço 5). Este extrato também não interfere com a ligação de Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267}, sugerindo ser uma interação específica (poço 3). Logo, esses ensaios demonstraram a interação entre as proteínas Xac2609 e Xac2610, confirmando os resultados anteriores de duplo-híbrido (Alegria *et al.*, 2005).

Ensaio de fluorescência foram utilizados para se determinar a afinidade da interação Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267} (Figura 60). O resultado deste experimento mostrou que a interação apresenta afinidade muito alta, em escala de nano a picomolar ($K_d < 10^{-9}$ M). Porém, não é possível se obter uma constante de dissociação por fluorescência do complexo Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267} com precisão, pois o erro ($2,5 \times 10^{-9}$ M) é maior que o K_d observado ($3,6 \times 10^{-10}$ M). Isso ocorre devido ao limite de sensibilidade da técnica, que necessita concentrações protéicas na faixa de 10^{-6} M, e por isso não permite se determinar com precisão constantes de afinidade muito menores que as concentrações de uso.

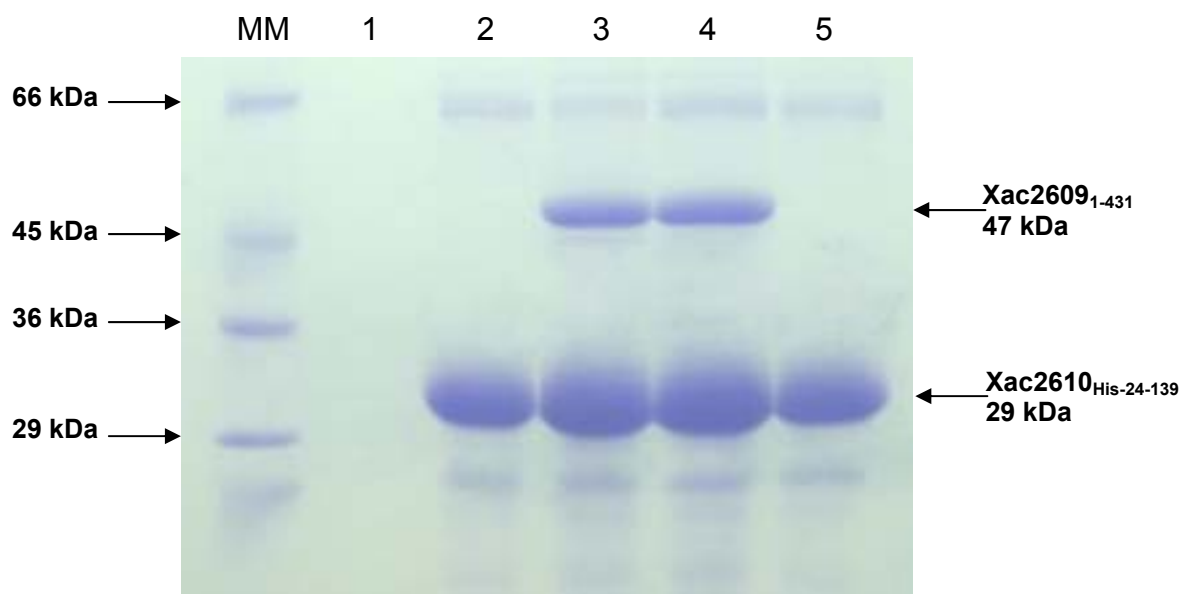


Figura 59. Ensaio de “pull-down” para a interação Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267}. SDS-PAGE 18 % de amostras ligadas à resina contendo Ni²⁺ na presença de 50 mM de imidazol e eluídas com 500 mM de imidazol. As seguintes amostras foram adicionadas à resina na presença de 5 mM de imidazol: 1) 10 μM de 2609₁₋₄₃₁ e a fração solúvel do lisado de 10 mL de cultura ($A_{600} = 0,8$) de *E. coli* BL21(DE3); 2) 100 μM de 2610_{His-22-267}; 3) 100 μM de 2610_{His-22-267}, 10 μM de 2609₁₋₄₃₁ e o lisado de *E. coli*; 4) 100 μM de 2610_{His-22-267} e 10 μM de 2609₁₋₄₃₁; 5) 100 μM de 2610_{His-22-267} e o lisado de *E. coli*. MM: Marcador de massa molecular (Sigma M 3913).

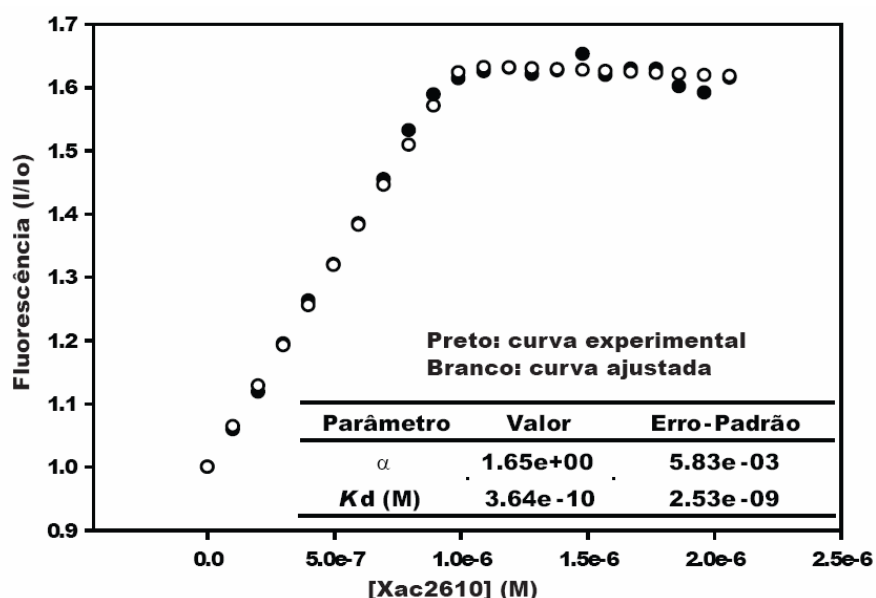


Figura 60. Interação Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267} por fluorescência. Eixo das abscissas: concentração de Xac2610_{His-22-267} adicionada. Eixo das ordenadas: aumento da fluorescência arbitrária devido à interação (I/I₀: Intensidade / Intensidade inicial). Pontos pretos: dados experimentais para a interação. Pontos brancos: curva teórica que melhor se aproxima dos dados obtidos, apresentando uma constante de dissociação (K_d) de aproximadamente 4×10^{-10} M. Observar o platô no eixo Y (parâmetro α : fluorescência máxima / fluorescência inicial), devido à saturação concentração-dependente da interação Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267}.

Proteólise limitada permite a clivagem de regiões da cadeia polipeptídica que são expostas ou mal enovelados, ao mesmo tempo preservando domínios ou fragmentos bem enovelados e não expostos (Fontana *et al.*, 2004). Estudos de proteólise limitada indicam estabilização de fragmentos proteolíticos específicos quando Xac2609₁₋₄₃₁ e Xac2610_{His-22-267} estão juntas. Foram utilizadas as enzimas tripsina, quimotripsina e proteinase K. Observamos evidência de proteção da degradação usando as duas primeiras proteases (Figura 61).

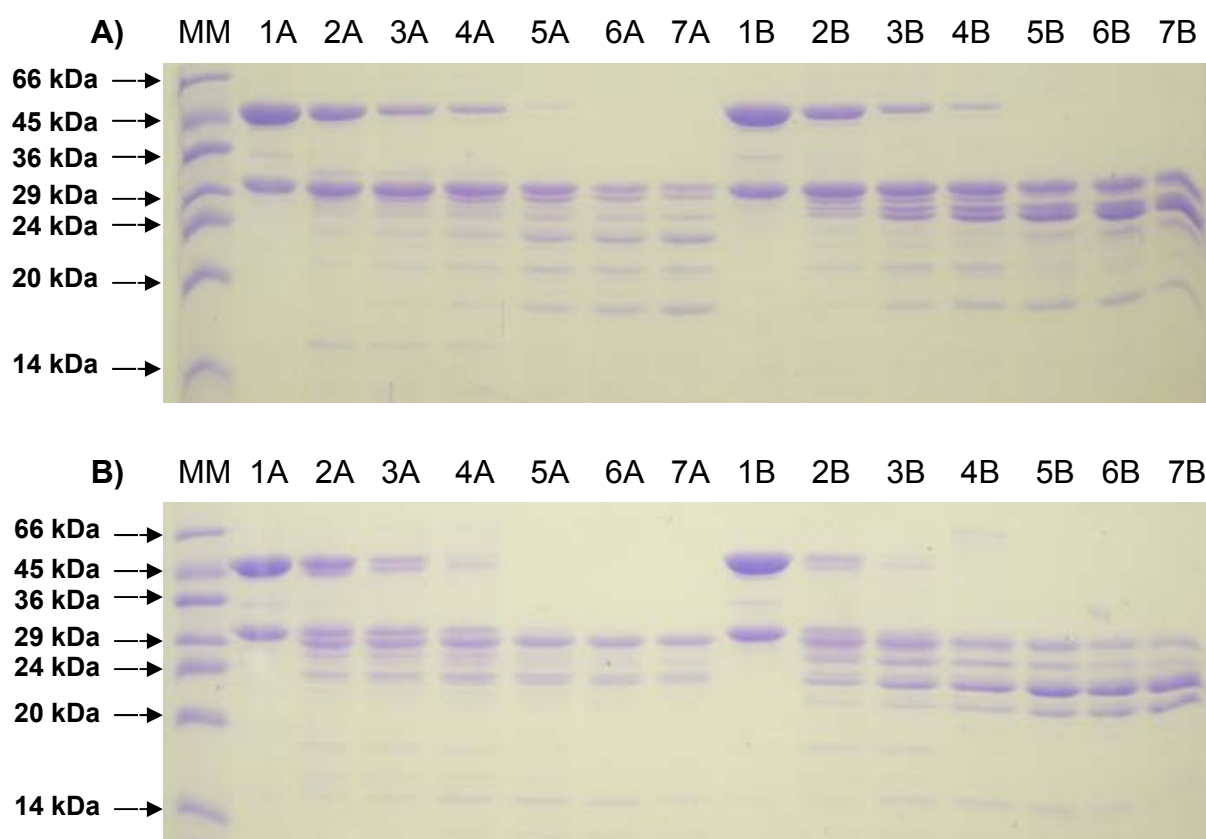


Figura 61. SDS-PAGE 18 % das amostras de Xac2609₁₋₄₃₁ e Xac2610_{His-22-267} que sofreram proteólise limitada. Gel (A), proteólise com a enzima quimotripsina e gel (B), digestão com tripsina. MM: Marcador de massa molecular; 1-7: digestão por 0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 minutos, respectivamente. Poços 1A-7A: digestões separadas de Xac2609₁₋₄₃₁ e Xac2610_{His-22-267}, que foram misturadas somente no momento da aplicação no gel. Poços 1B-7B: digestão de uma mistura equimolar de Xac2609₁₋₄₃₁ e Xac2610_{His-22-267}. Observar o aparecimento ou a maior estabilidade de fragmentos proteolíticas específicos quando as duas proteínas de Xac são digeridas juntas (poços B), particularmente em períodos mais longos de reação. A banda de aproximadamente 47 kDa nos poços 1 corresponde a Xac2609₁₋₄₃₁ e a banda de aproximadamente 29 kDa corresponde a Xac2610_{His-22-267}.

Também foram feitos experimentos de desnaturação térmica monitorados por dicroísmo circular, mostrando que Xac2609₁₋₄₃₁ apresenta-se praticamente desenovelada a 50 °C, enquanto Xac2610_{His-22-267} começa a desnaturar a partir desta temperatura (Figura 62A). Portanto, mudanças de sinal até 50 °C em experimentos de desnaturação (20-70 °C) destas proteínas ocorrem principalmente devido à perda de estrutura secundária de Xac2609₁₋₄₃₁. No complexo Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267}, diferente do que ocorre com os polipeptídeos isolados, a primeira proteína não sofre desnaturação completa até 50 °C (diferença entre as curvas rosa e azul escuro na Figura 62B). Em relação a renaturação (70-20 °C), Xac2609₁₋₄₃₁ sozinha é capaz de readquirir praticamente toda sua estrutura secundária, enquanto Xac2610_{His-22-267} não reenovela de forma eficiente (Figura 62A). Contudo, ocorre reenovelamento completo destas proteínas no complexo (Figura 62B). Logo, a presença de Xac2609₁₋₄₃₁ favorece o reenovelamento de Xac2610_{His-22-267}, ou então evita a sua desnaturação. Portanto, ambas as proteínas se tornam muito mais estáveis em complexo e o reenovelamento ocorre de forma mais eficiente quando elas estão juntas, em relação a quando estão separadas. Ensaio de desnaturação térmica monitorados por fluorescência resultaram em essencialmente as mesmas conclusões (dados não mostrados).

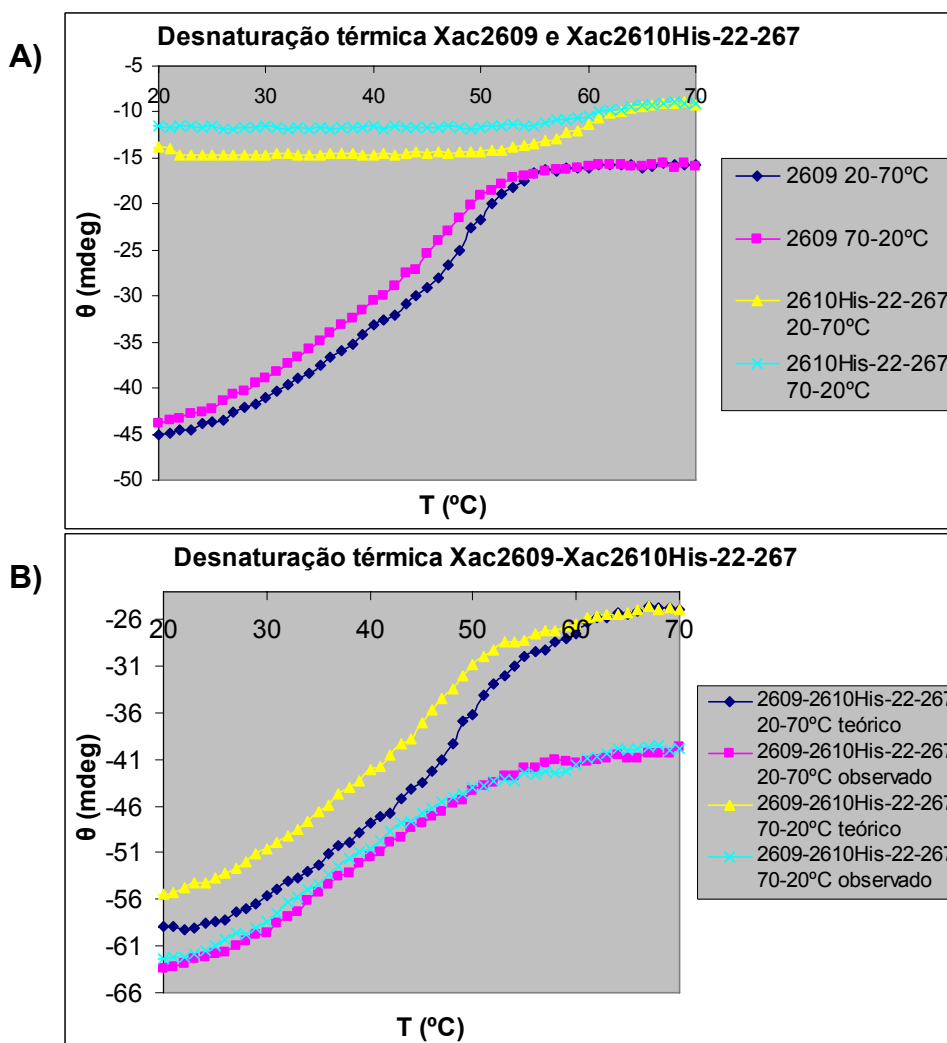


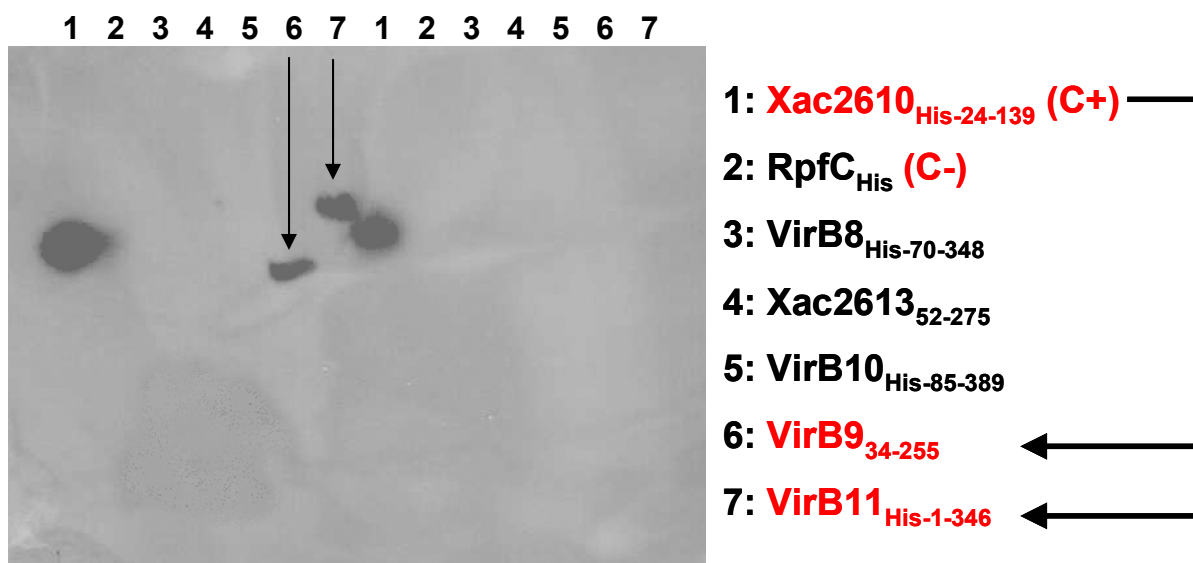
Figura 62. Desnaturações térmicas de Xac2609₁₋₄₃₁, Xac2610_{His-22-267} (A) e do complexo das duas proteínas (B), analisadas por dicroísmo circular a 222 nm. Foram feitos ensaios de desenovelamento (20-70 °C), seguidos de experimentos de reenovelamento (70-20 °C). (A) Desnaturação térmica das proteínas isoladas. Xac2609₁₋₄₃₁ é capaz de se reenovar e recuperar praticamente toda estrutura secundária nativa. Xac2610_{His-22-267} não é capaz de se reenovar completamente. Apesar de estarem na mesma concentração (10 μ M), a diferença de sinal das proteínas é devido a maior elipsidade molar residual a 222 nm e o maior número de resíduos de Xac2609₁₋₄₃₁. (B) Desnaturação térmica do complexo Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267} determinada experimentalmente (observado) e soma dos resultados dos experimentos realizados com as proteínas isoladas (teórico).

4.3.2. Interações de Xac2609 e Xac2610 com outros componentes do T4SS

Foram realizados experimentos de “overlay” para se identificar interações proteína-proteína entre componentes do T4SS de *Xac* utilizando proteínas purificadas ou não purificadas (proteínas insolúveis são obtidas relativamente puras a partir dos corpos de inclusão, como nos casos de VirB11_{His-1-346} e Xac2613₅₂₋₂₇₅; dados não mostrados). Um fragmento da proteína RpfC_{His} (cedida gentilmente pela doutoranda Cristiane R. Guzzo) foi utilizado como controle negativo (Xac1878, proteína envolvida com a via de “Quorum-sensing”; esta construção possui uma cauda de poli-histidina N-terminal). As proteínas incubadas e que são reconhecidas pelo anticorpo primário também foram transferidas para as membranas, servindo de controle positivo (Figura 63).

Foram realizados experimentos incubando a membrana de nitrocelulose com Xac2610_{His-22-267} (Figura 63A), VirB9₃₄₋₂₅₅ (Figura 63B) e Xac2609₁₋₄₃₁ (dados não mostrados). Foram confirmadas interações proteína-proteína previamente detectadas usando outras técnicas (como a interação Xac2609₁₋₄₃₁-Xac2610_{His-22-267}, tópico 4.3.1), interações detectadas usando a técnica de duplo-híbrido (Xac2609₁₋₄₃₁-VirD4_{His-83-557}, Xac2610_{His-22-267}-VirB11_{His-1-346} (Alegria *et al.*, 2005) e Xac2610_{His-22-267}-VirB9₃₄₋₂₅₅ (Docena, 2006)) e uma interação não descrita para o T4SS de *Xac* (interação VirB9₃₄₋₂₅₅-VirB11_{His-1-346}), porém conhecida por estudos de duplo-híbrido para outros T4SS (Malek *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2002).

A) Incubação com 2610 Sem incubação com 2610



B) Incubação com VirB9 Sem incubação com VirB9

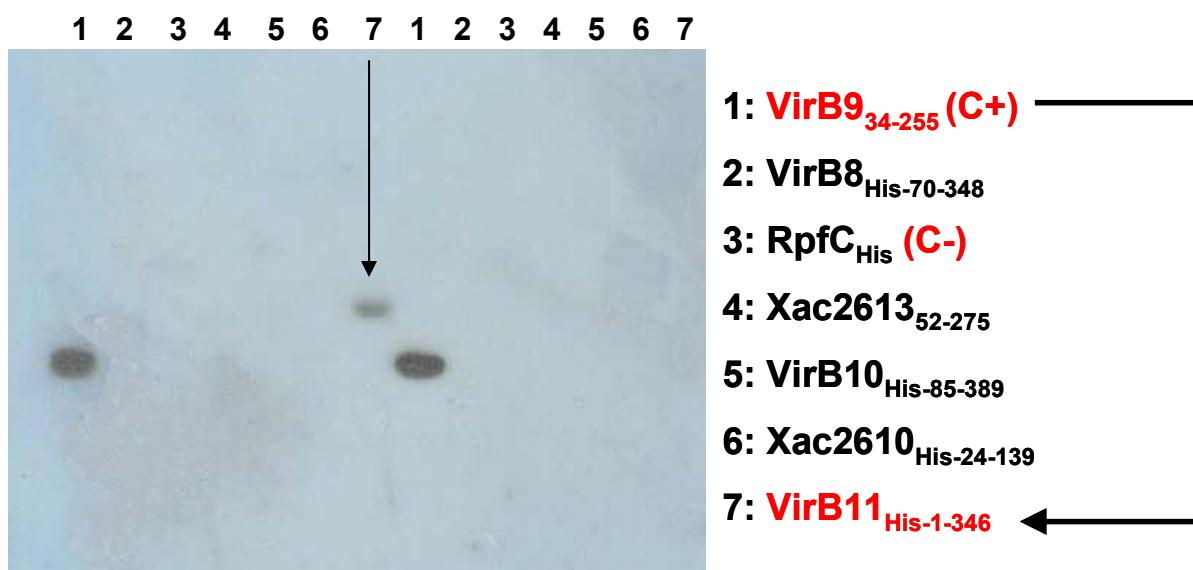


Figura 63. Exemplos de ensaios de “overlay” para a análise de interações proteína-proteína envolvendo componentes do T4SS cromossomal de *Xac*. (A) SDS-PAGE foi realizado com as proteínas indicadas de 1-7. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, somente a metade esquerda da membrana foi incubada com Xac2610_{His-22-267}. Em seguida, a membrana foi incubada sucessivamente com anticorpo anti-Xac2610_{His-22-267} e com conjugado-peroxidase, e finalmente revelada. Observar que ocorreu detecção de Xac2610_{His-22-267} nos 2 lados da membrana (controle positivo), e também de VirB9₃₄₋₂₅₅ e VirB11_{His-1-346}, porém somente quando houve a incubação com Xac2610_{His-22-267} (interações específicas, indicadas pelas setas). (B) Mesmo experimento que o anterior, porém com incubação de metade da membrana com VirB9₃₄₋₂₅₅ e detecção com anticorpo anti-VirB9₃₄₋₂₅₅. Note a interação VirB9₃₄₋₂₅₅-VirB11_{His-1-346}.

4.3.3. O domínio Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ é majoritariamente desenovelado e enovela com variações das condições do meio

Como indicado no tópico 4.1.4.2, Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ apresenta um perfil predominantemente desenovelado por CD em pH 7,0 e com baixa força iônica. Para a compreensão se este domínio C-terminal de Xac2609, e provavelmente de interação a VirD4, é desenovelado em solução em qualquer condição, foram realizados estudos de CD, RMN e proteólise limitada, variando-se as condições do meio.

A análise por CD mostra que Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ sofre mudança conformacional dependente de pH e concentração salina (Figura 64). A alteração do padrão de estrutura secundária induzida pela variação de pH é pequena, porém a observada pela alteração da força iônica é relativamente grande. Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ apresenta-se mais estruturada em pH e força iônica maiores. Esta proteína também sofre enovelamento na presença de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), um potente indutor de estrutura secundária, particularmente α -hélice (Main e Jackson, 1999; Roccatano *et al.*, 2002; Xu e Keiderling, 2005).

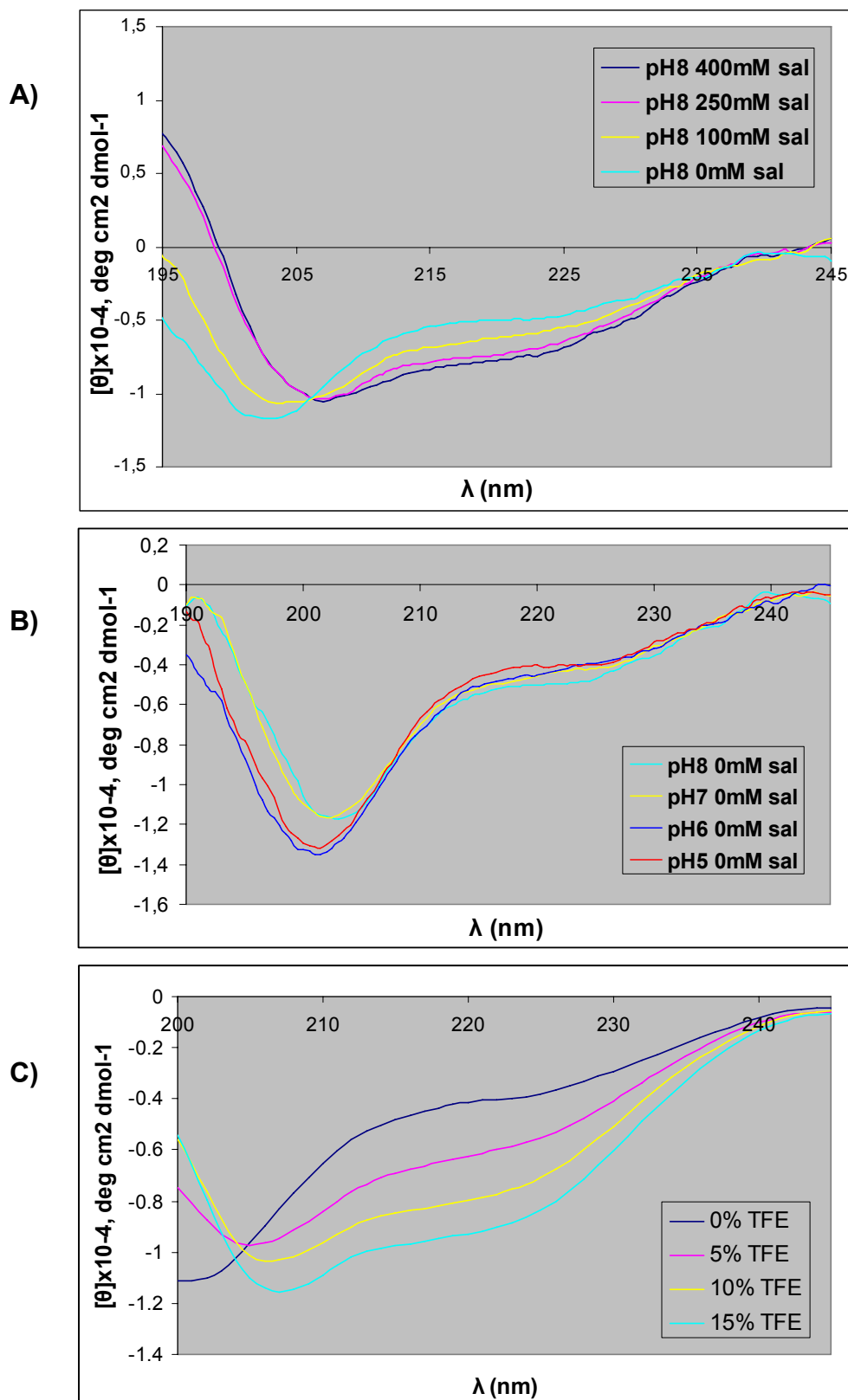


Figura 64. Mudança do padrão de estrutura secundária de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ dependente das condições do meio. Em (A), variou-se a concentração de sal (Na₂SO₄), em (B), o pH e em (C), a concentração de TFE (pH 7,0, sem sal).

^{15}N -Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ foi produzida e purificada para estudos de RMN (tópicos 4.1.1 e 4.1.2). Foram coletados espectros ^{15}N -HSQC na ausência e presença de 580 mM de NaCl, para se avaliar a influência da força iônica sobre o enovelamento. Esses ensaios mostraram, assim como nos experimentos de CD, que Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ é majoritariamente desenovelada sem sal (pobre dispersão das frequências nas dimensões de ^1H e ^{15}N) e sofre enovelamento dependente da força iônica do meio (aumento da dispersão das correlações no eixo de ^1H , que é um indício de enovelamento da proteína (Rehm *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 1997); Figura 65).

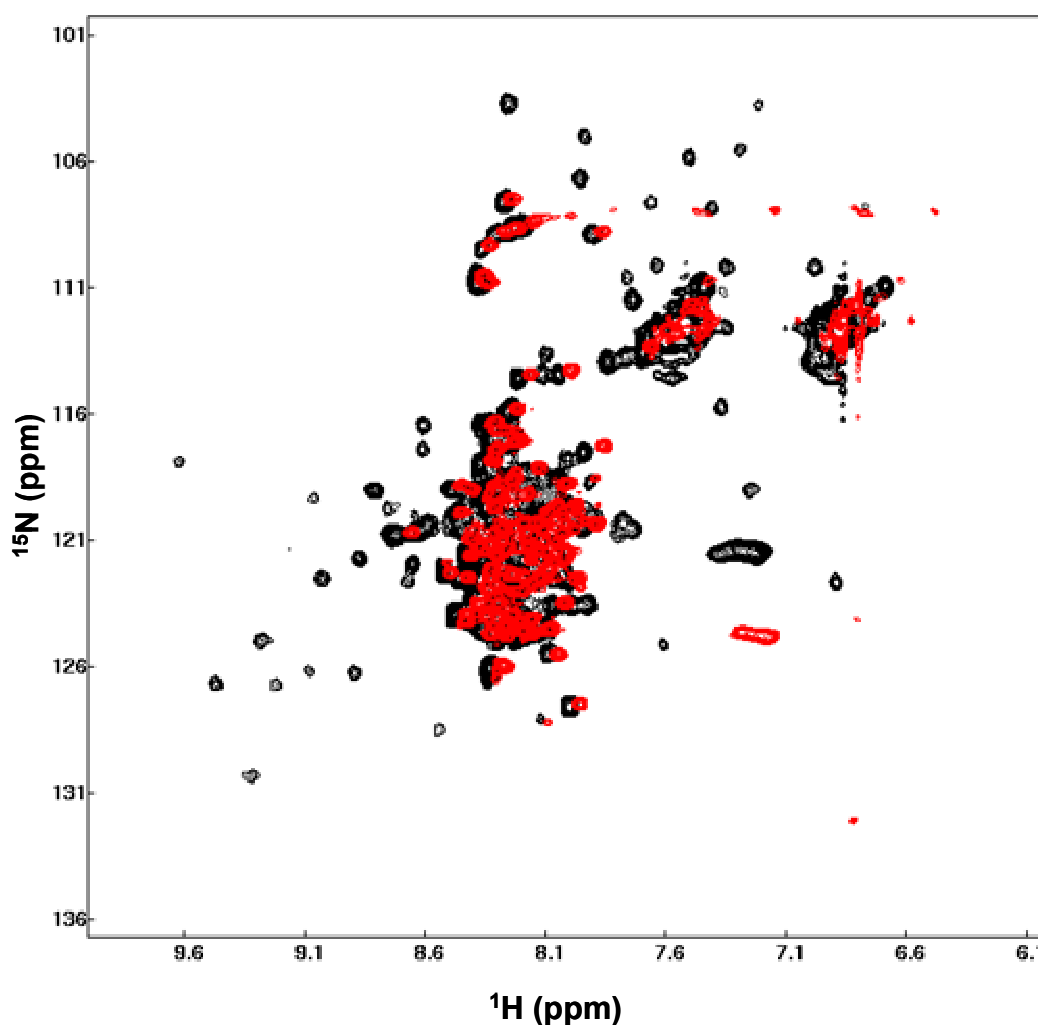


Figura 65. Espectros ^{15}N -HSQC de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ na ausência (vermelho) e presença (preto) de 580 mM de NaCl.

Foram realizados ensaios de proteólise limitada com Xac2609₃₁₁₋₄₃₁, utilizando as proteases tripsina, α -quimotripsina e proteinase K, na ausência e presença de sal (250 mM Na₂SO₄, força iônica [μ] = 0,75). Proteases possuem diferentes atividades em função da força iônica, e no caso da α -quimotripsina, esta enzima possui atividade aumentada quanto maior a concentração dos sais NaCl ($\mu \leq 1$) e Na₂SO₄ (Castaneda-Agullo *et al.*, 1961). Os resultados observados apontam que Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ é mais resistente à clivagem realizada por α -quimotripsina na presença de sal, mesmo que a clivagem ocorra em uma condição em que esta enzima possui maior atividade (Figura 66).

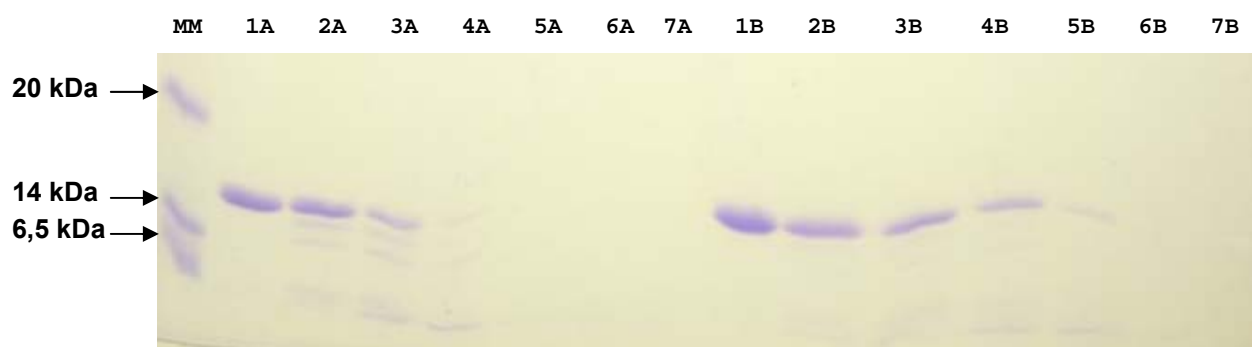


Figura 66. Análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 18%) da proteólise limitada com α -quimotripsina de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ (13,4 kDa). MM: Marcador de massa molecular; 1-7: digestões por 0, 2, 5, 10, 20, 40 e 80 minutos, respectivamente. Poços 1A-7A: sem sal; 1B-7B: com 250 mM de Na₂SO₄.

4.3.4. Estudos cristalográficos de Xac2610

Testes de cristalização da proteína Xac2610_{His-22-267} foram realizados, não ocorrendo o surgimento de cristais protéicos. Porém, observou-se por SDS-PAGE que Xac2610_{His-22-267} sofria degradação recorrente em poucos dias, após a maioria das purificações desta proteína. Com o intuito de se detectar um fragmento ou

domínio estável de Xac2610_{His-22-267}, este polipeptídeo foi incubado a temperatura ambiente, e alíquotas foram removidas em intervalos regulares. Após aproximadamente 15 dias, observou-se por SDS-PAGE o surgimento de um fragmento único e estável (dados não mostrados).

O fragmento estável de Xac2610 foi submetido a testes de cristalização, ocorrendo o surgimento de aglomerados em forma de agulhas finas na condição 12 do kit Crystal Screen 2 (0,1 M CdCl₂, 0,1 M acetato de sódio pH 4,6 e 30 % (p/v) PEG400; Hampton Research) (Figura 67). Esses cristais não são adequados para difração, porém servem de ponto de partida para novos refinamentos. Tentativas de se obter esse fragmento estável foram realizadas com diferentes purificações de Xac2610_{His-22-267}, porém devido a não homogeneidade e pequena quantidade obtida, decidimos identificar e clonar o fragmento cristalizável de Xac2610.

Espectrometria de massa MALDI-ToF foi utilizada para caracterização da massa e sequenciamento N-terminal por degradação de Edman para identificação do início do fragmento estável. Espectrometria de massa MALDI-ToF indicou que esse fragmento apresenta massa de 23174 Da (Figura 68), enquanto degradação de Edman mostrou que se inicia no resíduo K56 de Xac2610_{His-22-267} (o sequenciamento identificou com precisão um trecho de 10 resíduos consecutivos de Xac2610, 56 KDLKMPSTAN 65; dados não mostrados). A combinação das duas informações sugere que o fragmento estável equivale aos aminoácidos 55-267 (massa predita de 23163 Da) ou 56-267 de Xac2610_{His-22-267} (massa predita de 23035 Da).



Figura 67. Cristais do produto proteolítico de Xac2610_{His-22-267}.

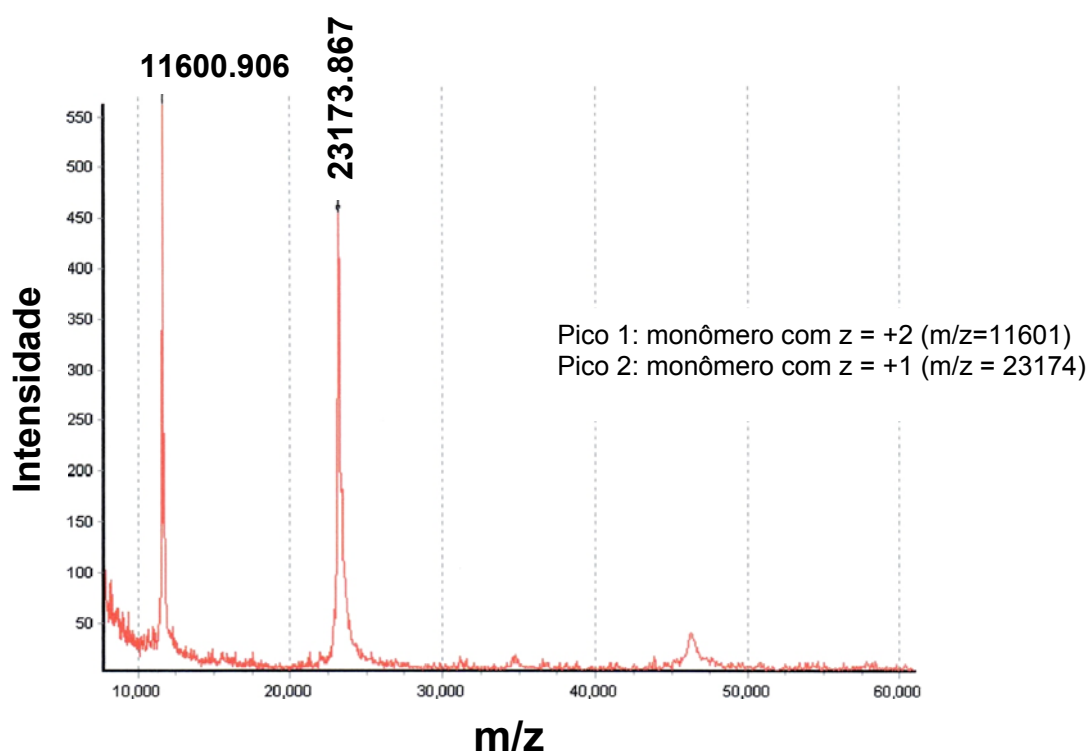


Figura 68. Espectrometria de massa MALDI-ToF do produto proteolítico de Xac2622_{His-22-267}.

O fragmento gênico que codifica os resíduos 55-267 de Xac2610 foi clonado no vetor pET11a (Tabela 3) e expresso em *E. coli*, e a proteína produzida Xac2610₅₅₋₂₆₇ foi purificada (tópico 4.1.2) e submetida a ensaios de cristalização. Cristais foram observados em diversas condições contendo o precipitante PEG3350 e pH ácido, e aqueles que apresentavam maiores dimensões foram obtidos na condição 66 do kit Index 2 (0,1 M Bis-Tris-HCl pH 5,5, 0,2 M (NH₄)₂SO₄ e 25 % (p/v) PEG3350; Hampton Research) (Figura 69). Estes cristais foram submetidos à difração de raios-X no âncodo rotatório Rigaku MicroMax-007HF do IQ/USP, e difrataram até uma resolução de 2,0 Å (Figura 70 e Tabela13), pertencendo ao grupo espacial monoclinico C2, com coeficiente de Matthews de 2,8 Å³.Da⁻¹, conteúdo de solvente de 56,17 % e uma molécula de proteína por unidade assimétrica.

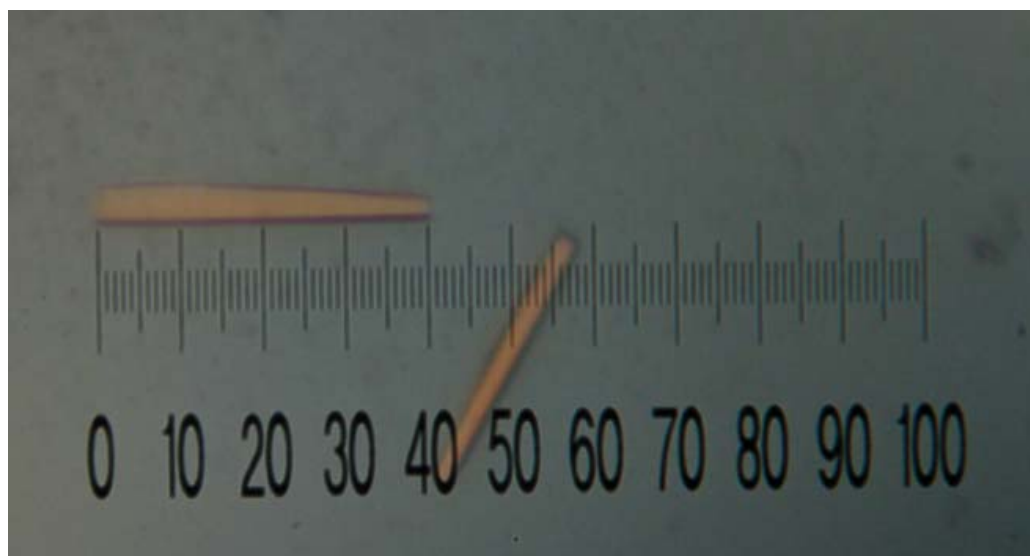


Figura 69. Cristais de Xac2610₅₅₋₂₆₇. Uma unidade na régua mostrada equivale a aproximadamente 8 µm; portanto, o maior cristal apresentado possui dimensão de aproximadamente 320 µm em seu maior eixo.

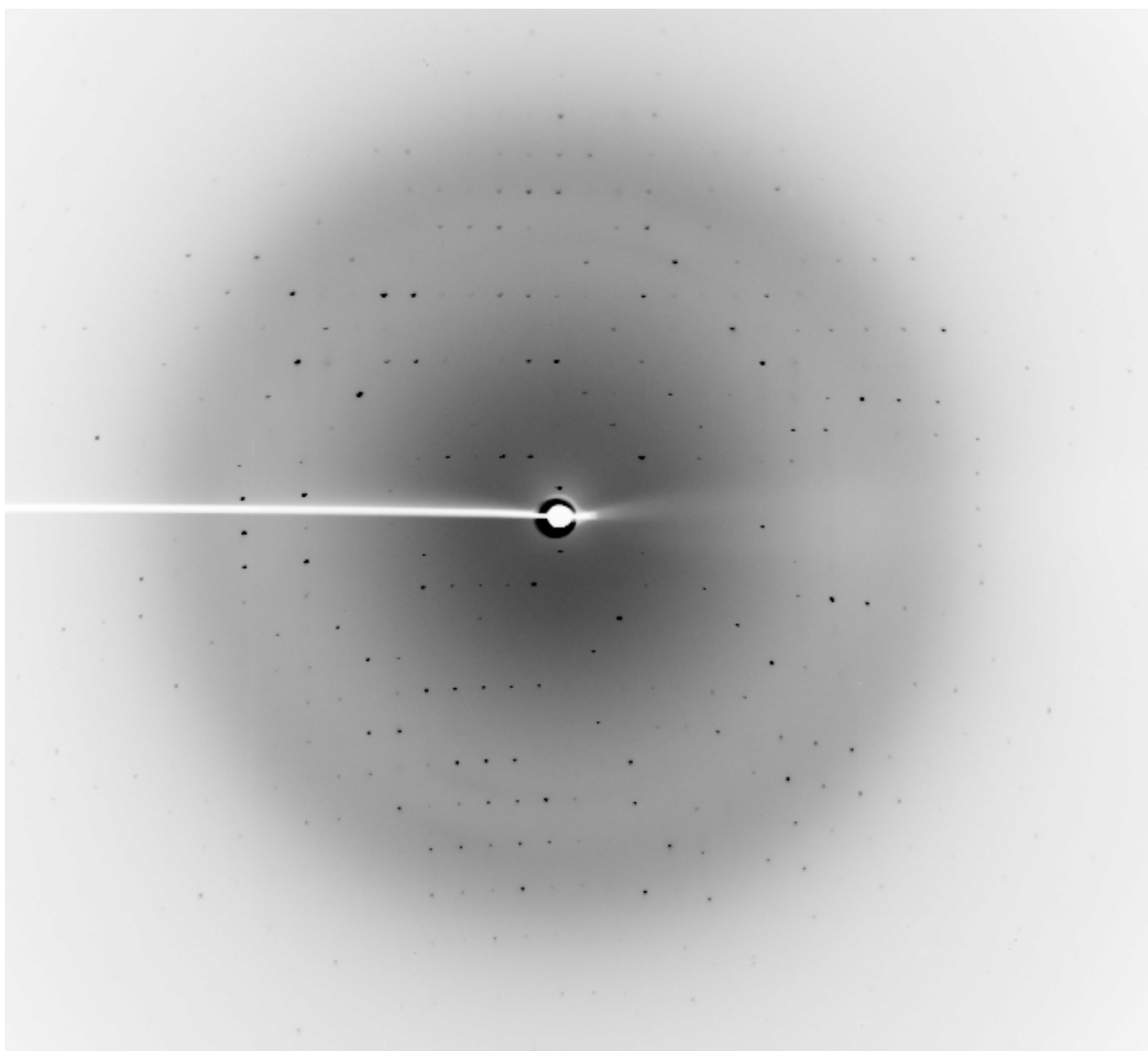


Figura 70. Uma imagem da difração de um cristal de $Xac2610_{55-267}$.

Tabela 13. Coleta de dados cristalográficos de Xac2610₅₅₋₂₆₇.

Coleta de dados	
Grupo espacial	C2
Eixos <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> da célula unitária (Å)	160,46; 37,70; 43,25
Ângulo β (°)	92,61
Resolução (Å)	38,78 – 2,00 (2,07 – 2,00) ^a
Reflexões observadas	63263
Reflexões únicas	16929
R_{merge}^b	0,065 (0,497) ^a
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8,8 (2,1) ^a
Completeza (%)	95,1 (89,9) ^a
Redundância	3,7 (3,7) ^a
Ângulo de oscilação (°)	1
Número de imagens	180
Comprimento de onda (Å)	1,5419

^aNúmeros entre parênteses representam dados para a camada de maior resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)}$.

4.3.5. Cristalização de VirD4_{His-83-557}

A proteína VirD4_{His-83-557} foi submetida a ensaios de cristalização. O surgimento de cristais foi observado após 15 dias na condição 35 do kit comercial Crystal Screen 2 (0,1 M HEPES pH 7,5 e 70 % (v/v) MPD; Hampton Research). Refinamento desta observação inicial possibilitou o surgimento de cristais em forma de agulha e de placas hexagonais (Figura 71). Entretanto, até o presente momento os cristais obtidos são extremamente diminutos e difrataram até uma resolução máxima de 15 Å (dados não mostrados). Novos refinamentos serão necessários

para a obtenção de cristais maiores que possibilitem determinar a estrutura em alta resolução desta importante proteína.

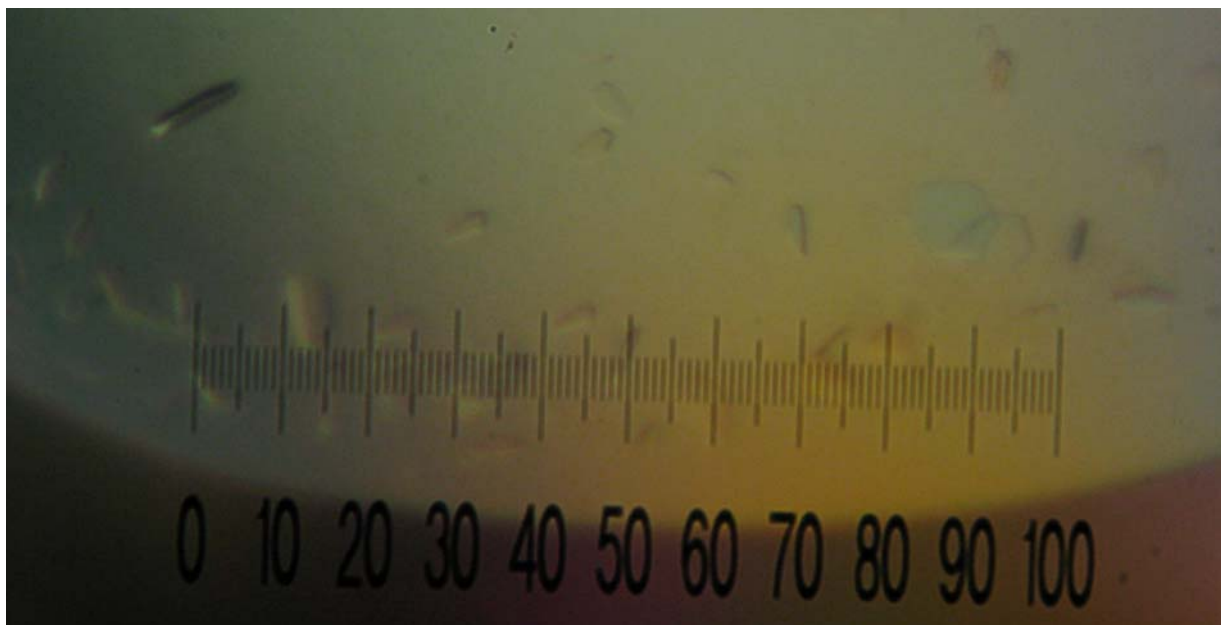


Figura 71. Cristais de VirD4_{His-83-557}. Uma unidade na régua mostrada equivale a aproximadamente 8 μm . Notar placas hexagonais à direita.

5. DISCUSSÃO

5.1. Xac2622 corresponde a VirB7 do T4SS de *Xanthomonas*

Uma das questões centrais deste trabalho é se a proteína hipotética Xac2622 corresponde a VirB7 do T4SS codificado pelo cromossomo de *Xac*, visto que esta bactéria não possui nenhum polipeptídeo com similaridade de seqüência significativa com VirB7 (Da Silva *et al.*, 2002). Já era sabido que o gene *xac2622* se localiza no locus onde se esperaria encontrar *virb7*, além de Xac2622 interagir com o parceiro padrão de VirB7, a proteína VirB9 (Alegria *et al.*, 2005). Os dados estruturais e de interações proteína-proteína argumentam fortemente em favor da hipótese de que Xac2622 realiza a função de VirB7.

Xac2622 possui a seguinte organização no seu extremo N-terminal: peptídeo sinal (resíduos 1-18), seguido de um sinal de ligação a lipídeos (19-22) e da região de interação com VirB9 (27-41) (Figura 72). Esses elementos são exatamente os que definem uma proteína VirB7: aparentemente a função central deste peptídeo é localizar corretamente o complexo composto por VirB7-VirB9-VirB10 na membrana externa bacteriana (Fronzes *et al.*, 2009a; Fronzes *et al.*, 2009b). Para realizar esta função, VirB7 apenas necessita, ao longo dos seus tipicamente 50 resíduos pouco conservados, dos sinais para sua localização na membrana externa e de um trecho de interação a VirB9. Logo, Xac2622 possui todos os elementos de uma VirB7 completa, porém é maior (139 resíduos) e com algumas regiões extras, em especial um domínio enovelado. O equivalente a VirB7 de *H. pylori*, denominado HP0532, também é uma lipoproteína sem similaridade de seqüência com VirB7, sendo significativamente maior (280 resíduos) do que uma VirB7 típica (Akopyants *et al.*, 1998; Alvarez-Martinez e Christie, 2009).

É importante ressaltar que, assim como em outros complexos VirB7-VirB9, onde a última proteína utiliza o domínio C-terminal para esta interação (aproximadamente 100 resíduos) (Bayliss *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2002), VirB9 de *Xac* reconhece Xac2622 via seu domínio C-terminal (resíduos 154-255; últimos 102 aminoácidos).

Portanto, Xac2622 possui todos os elementos necessários para realizar a função de VirB7, interagindo com a mesma região que esta proteína reconheceria em VirB9. Porém, como não existe qualquer similaridade de seqüência entre Xac2622 e VirB7, confirmação clara de que ambas são homólogas (possuem ancestral comum) e não que Xac2622 é simplesmente um correspondente ou equivalente funcional a VirB7, somente virá com a determinação da estrutura do complexo Xac2622-VirB9. Para atingir este objetivo, serão realizados experimentos de RMN envolvendo $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e um peptídeo sintético obtido comercialmente equivalendo a Xac2622₂₄₋₄₆.

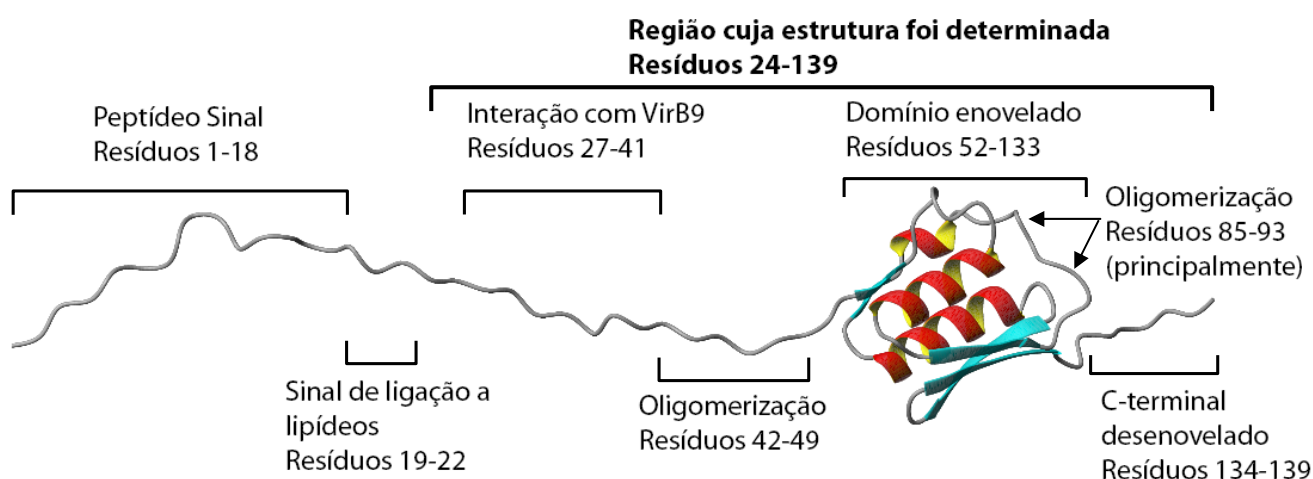


Figura 72. Organização da proteína Xac2622. Uma VirB7 típica possui somente os 3 primeiros elementos do N-terminal de Xac2622.

5.2. A oligomerização de Xac2622

Além das regiões que definem VirB7, Xac2622 possui trechos implicados em oligomerização, que são a região posterior ao local de interação a VirB9 (aminoácidos 42-49) e uma das faces do domínio globular (principalmente o “loop” dos resíduos 85-93; Figura 72). A oligomerização da VirB7 de *Xanthomonas* não é a primeira descrição de interação homotrópica para esta proteína, pois foi demonstrado previamente que VirB7 de *A. tumefaciens* dimeriza (Sagulenko *et al.*, 2001b; Spudich *et al.*, 1996).

Xac2622₂₄₋₁₃₉ forma um dímero ou um oligômero de mais alta massa com baixa afinidade (K_d na escala de centenas de μM), pois o que se observa é que os picos lentamente mudam de posição no espectro ao se variar a concentração (na faixa de aproximadamente 7-800 μM nesses estudos; Figura 38). Pequenas mudanças desse tipo implicam uma interação em troca química rápida, características de interações de baixa afinidade (Rule e Hitchens, 2006).

A oligomerização de Xac2622 provavelmente envolve a interação direta entre o N-terminal desenovelado e o domínio globular, devido a detecção de NOEs intermoleculares entre estas regiões. A hipótese do complexo cabeça-cauda poderá ser confirmada por ensaios ^{15}N -HSQC envolvendo ^{15}N -Xac2622₅₁₋₁₃₄ (domínio globular) e ^{14}N -Xac2622₃₈₋₅₂ (engloba os resíduos da região de oligomerização).

Quanto ao número de moléculas envolvidas com a oligomerização, os dados obtidos de ligação cruzada com glutaraldeído e ultracentrifugação analítica apontam que ocorre a formação de um complexo com várias subunidades. Além disso, como VirB7 faz parte de um complexo tetradecamérico (Chandran *et al.*, 2009), é natural se imaginar que Xac2622 possa formar anéis com 14 subunidades. Entretanto, não

podemos descartar a possibilidade que Xac2622 forme apenas dímeros. Estão sendo realizados novos experimentos de “docking”, utilizando duas moléculas completas de Xac2622₂₄₋₁₃₉, e os resultados obtidos, além de mostrarem a natureza da interface de oligomerização, poderão evidenciar se é possível obter um complexo dimérico, ou se necessariamente ocorrerá a formação de um oligômero com maior número de subunidades.

O fato do equivalente a VirB7 de *Xac* oligomerizar com baixa afinidade não implica que essa interação não possa ocorrer *in vivo*. Em primeiro lugar, proteínas da família VirB7 são ancoradas a membrana externa (Fernandez *et al.*, 1996a), o que faz com que se difundam em um espaço 2D, ao invés de 3D. Em segundo, foi mostrado que o T4SS se localiza em um dos pólos de determinadas bactérias, e não ao longo de toda membrana (Judd *et al.*, 2005a; b), fato que possivelmente pode acontecer para o T4SS de *Xac*. E por último, o complexo tetradecamérico na membrana externa aproximaria monômeros de Xac2622 ligados a diferentes monômeros de VirB9. Todas essas características podem gerar aumento na concentração local de Xac2622 e permitir que sua interação homotrópica ocorra *in vivo*, mesmo que esta seja uma ligação de baixa afinidade. Além disso, existem exemplos de interações homotrópicas de baixa afinidade que parecem ser importantes para a função biológica da molécula, como no caso da quimiocina humana SDF-1 α , que dimeriza com K_d de 5 mM (Baryshnikova e Sykes, 2006).

Vale ressaltar que o espectro de ¹⁵N-HSQC de Xac2622₂₄₋₁₃₉ apresenta picos mais estreitos em menores concentrações (Figura 38), pois nessas condições o estado oligomérico médio é menor, o que leva a um aumento de T2. Alguns sinais equivalentes a resíduos da interface de oligomerização somente foram observados em baixas concentrações, e experimentos com 100 μ M e 200 μ M da proteína foram

fundamentais para o assinalamento de Xac2622₂₄₋₁₃₉ (tópico 4.2.1). Inclusive, das 24 frequências não assinaladas, 16 pertencem a aminoácidos que fazem parte da interface de oligomerização (Tabela 8), demonstrando a dificuldade técnica enfrentada para o assinalamento devido ao processo de oligomerização desta proteína.

Foram realizadas tentativas de análise dos dados de relaxação de ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉ utilizando o formalismo “livre de modelo” (“model-free”) de Lipari-Szabo (Clore *et al.*, 1990; Lipari e Szabo, 1982). Contudo, o fato de Xac2622₂₄₋₁₃₉ oligomerizar, e não se conhecer o número de subunidades e a estrutura dos oligômeros formados, impossibilitou a obtenção de resultados confiáveis.

5.3. A interação Xac2622-VirB9

A interação entre Xac2622₂₄₋₁₃₉ e VirB9₁₅₄₋₂₅₅ foi estudada por fluorescência, que sugere uma ligação de alta afinidade (Figura 44). O resíduo que sofre alteração de fluorescência na formação do complexo Xac2622₂₄₋₁₃₉-VirB9₃₄₋₂₅₅ provavelmente é o triptofano 34 da primeira proteína, pois este aminoácido se localiza na interface de interação, e os picos correspondendo aos ¹H-¹⁵N das suas cadeias principal (W34) e lateral (W34 ϵ) mudam de posição (Figura 46).

Diversos picos de ¹⁵N-Xac2622₂₄₋₁₃₉ no espectro ¹⁵N-HSQC desaparecem na presença de ¹⁴N-VirB9₁₅₄₋₂₅₅, enquanto outras correlações surgem em locais diferentes (Figura 46). Mudanças desse tipo implicam uma interação em troca química lenta, característica de interações de alta afinidade (Rule e Hitchens, 2006), fato que é compatível com os dados de fluorescência.

O domínio enovelado de Xac2622 possui a mesma estrutura sozinha ou em complexo com VirB9₁₅₄₋₂₅₅, pois nenhuma frequência correspondendo a núcleos presentes no domínio enovelado de Xac2622₂₄₋₁₃₉ teve alteração significativa na interação com VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (Figuras 47, 48 e dados não mostrados). Além disso, os $^1D_{NH}$ RDCs da região globular de ^{15}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ possuem essencialmente os mesmos valores na presença e ausência de ^{14}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (Figura 49).

Contudo, o trecho de Xac2622₂₄₋₁₃₉ que reconhece VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (resíduos 27-41) apresenta grandes diferenças nos valores de ^{15}N -T1, ^{15}N -T2, $\{^1H\}$ - ^{15}N NOE Heteronuclear e RDCs $^1D_{NH}$ com e sem VirB9₁₅₄₋₂₅₅ (Figuras 49 e 51). Em particular, ocorre aumento dos valores de NOEHet, diminuição de ^{15}N -T2 e alteração do padrão dos RDCs $^1D_{NH}$ no complexo com VirB9₁₅₄₋₂₅₅. Essas observações implicam aumento de rigidez, formação de um complexo de alta massa e provavelmente enovelamento específico dessa região quando ocorre a interação. A conformação tridimensional deste complexo será resolvida pela determinação estrutural em solução de $^{15}N/^{13}C$ -VirB9₁₅₄₋₂₅₅- $^{14}N/^{12}C$ -Xac2622₂₄₋₄₆.

O N-terminal desenovelado de Xac2622₂₄₋₁₃₉ é capaz de se ligar a VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e ao domínio enovelado Xac2622₅₁₋₁₃₄ simultaneamente (Figura 50). Isso acontece porque as duas interfaces de interação no N-terminal desenovelado não se sobrepõem (resíduos 27-41 para interação com VirB9₁₅₄₋₂₅₅ e aminoácidos 42-49 para oligomerização). Notar que, no resultado de “docking”, a região implicada na interação com VirB9 (anterior a região de oligomerização) se apresenta livre e disponível para interagir com esta proteína (Figura 43).

Observação atenta do ^{15}N -HSQC de ^{15}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ sugere que esta proteína possui ao menos duas conformações na ausência de ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉, como representado pelos 2 sinais para o 1H - ^{15}N da cadeia lateral do único triptofano

(resíduo 177) presente em sua cadeia (2 sinais onde se esperaria 1, com frequência de aproximadamente 130 ppm para ^{15}N e 10,3 ppm para ^1H ; Figura 57A, em vermelho). Porém, na presença de ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉, apenas se detecta uma correlação para o ^1H - ^{15}N da cadeia lateral do triptofano 177 (Figura 57A, em verde).

Além disso, comparação das correlações em espectros ^{15}N -HSQC de ^{15}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ com e sem ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉ mostram dispersão limitada de deslocamento químico na dimensão de ^1H , grandes variações nas intensidades dos picos e alargamento das linhas na ausência de ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉. Essas características são encontradas em proteínas parcialmente estruturadas e flexíveis, que exibem heterogeneidade conformacional e comportamento dinâmico complexo, típicos do estado de glóbulo fundido (“molten globule”) (Kim *et al.*, 1999; Kingston *et al.*, 2008). Porém, são necessários novos experimentos para comprovar que VirB9₁₅₄₋₂₅₅ sozinha é de fato um “molten globule” em solução.

Após a adição de ^{14}N -Xac2622₂₄₋₁₃₉, ^{15}N -VirB9₁₅₄₋₂₅₅ sofre uma marcante mudança conformacional (alteração da posição dos picos) e é menos flexível (estreitamento das linhas), provavelmente adquirindo sua conformação estável e funcional nessas condições (Figura 57A e B). Estas observações salientam a relação estrutural e possivelmente funcional entre Xac2622 e VirB9: sozinhas, a primeira é desenovelada, enquanto a segunda possivelmente é um molten-globule; entretanto, quando juntas, ambas se tornam rígidas e enoveladas.

5.4. Similaridade estrutural do domínio enovelado de Xac2622

O programa Dali (Holm e Sander, 1996) foi utilizado para se avaliar se existem estruturas semelhantes ao domínio enovelado de Xac2622 depositadas no

principal banco de dados de estrutura de proteínas, o PDB (“Protein Data Bank”). Devido a Xac2622 não apresentar similaridade de seqüência com proteínas de estrutura conhecida ou de qualquer polipeptídeo estudado, esse domínio poderia ter um novo enovelamento, diferente de qualquer proteína depositada em bancos de dados. Surpreendentemente, a região globular de Xac2622 é similar estrutural e topologicamente a diversas proteínas de estrutura recentemente caracterizada (Tabela 14 e Figura 73).

Tabela 14. Estruturas depositadas no PDB semelhantes ao domínio enovelado de Xac2622.

PDB	Descrição	RX - Z-score / RMSD (Å)	RMN - Z-score / RMSD (Å)
2A02	PupA - RTBD	7,1 / 2,6	6,7 / 2,5
1ZZV	FecA - RTBD	6,4 / 3,0	6,4 / 2,5
1WRU	gp44 - Fagos	6,1 / 3,3	5,8 / 3,2
3GR5	EscC - T3SS	6,1 / 2,9	6,0 / 2,8
2IAH	FpvA - RTBD	5,9 / 2,6	5,9 / 2,6
3EZJ	GspD - T2SS	5,1 / 2,8	4,6 / 3,0
2P5Z	VgrG - T6SS	3,1 / 2,6	3,2 / 2,8

RX: análise feita com a estrutura preliminar de Xac2622₅₁₋₁₃₄ não depositada e resolvida por cristalografia e difração de raios-X. RMN: análise realizada com o modelo de RMN depositado de menor energia do domínio enovelado de Xac2622 (resíduos 51-134). RTBD: Receptores TonB-dependentes; T2SS: Sistema de Secreção do Tipo II; T3SS: Sistema de Secreção do Tipo III; T6SS: Sistema de Secreção do Tipo VI.

Em especial, Xac2622₅₁₋₁₃₄ é semelhante aos domínios de sinalização de receptores TonB-dependentes (Ferguson *et al.*, 2007; Garcia-Herrero e Vogel, 2005). Receptores TonB-dependentes (RTBDs) se localizam na membrana externa de bactérias gram-negativas, estando envolvidos na internalização de metais (como complexos ferro-sideróforo) e outros ligantes (como vitamina B12) do meio extracelular para o meio intracelular (Braun e Endriss, 2007). Como não é possível manter um gradiente de prótons na membrana externa ou ATP no periplasma, esses

receptores realizam transporte ativo de seus ligantes de uma forma dependente de TonB, uma proteína associada à membrana interna. Esta proteína sofre mudanças conformacionais dependente das proteínas ExbB e ExbD, para energizar os receptores de membrana externa e causar transporte ativo de seus ligantes. ExbB e ExbD utilizam o gradiente eletroquímico na membrana interna para energizar TonB (Postle e Larsen, 2007).

O domínio com similaridade estrutural a Xac2622 equivale ao N-terminal de alguns receptores TonB-dependentes, como o receptor FecA de *E. coli*, envolvido com captação de citrato férrico (Chakraborty *et al.*, 2007), e outros sistemas equivalentes de captação de ferro (Koebnik, 2005). Na ausência do ligante, o domínio de sinalização interage com o “TonB-box”, a região dos RTBDs que reconhece TonB. Essa ligação envolve complementação de fitas- β , que significa que o “TonB-box” (uma fita- β) forma pontes de hidrogênio com um segmento com característica β do domínio de sinalização, formando uma folha- β estendida com mais uma fita (Brillet *et al.*, 2007; Remaut e Waksman, 2006).

Na presença do ligante, a ligação entre o domínio de sinalização e o “TonB-box” é desfeita, e o primeiro interage com um fator anti-sigma (FecR no sistema Fec) localizado na membrana interna, enquanto o segundo reconhece TonB. O fator anti-sigma seqüestra um fator sigma ECF (“ExtraCytoplasmic Function”; FecI no sistema Fec), mas após a interação do domínio de sinalização com o anti-sigma, o fator sigma é liberado, o que leva a alteração da transcrição de genes relacionados com a captação e o metabolismo do ligante (Brooks e Buchanan, 2008).

Existe um exemplo de um receptor TonB-dependente que não transporta ligantes e está envolvido com virulência. O sistema PrhARI do fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* liga-se a uma porção da parede celular da planta e sinaliza a

presença do hospedeiro, levando a indução do Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) (Brito *et al.*, 2002).

Outros domínios similares a Xac2622₅₁₋₁₃₄ foram identificados nas proteínas GspD do T2SS (Korotkov *et al.*, 2009), EscC do T3SS (Spreter *et al.*, 2009), VgrG do T6SS (Leiman *et al.*, 2009) e gp27/gp44 de determinados bacteriófagos (Kanamaru *et al.*, 2002; Kondou *et al.*, 2005) (Figura 73). GspD é a secretina que constitui o poro na membrana externa do T2SS, se organizando como um oligômero com 12 subunidades (Chami *et al.*, 2005; Nouwen *et al.*, 1999). Por sua vez, EscC é a secretina que monta o canal de secreção na membrana externa do T3SS, originando um oligômero com 12-14 subunidades (Burghout *et al.*, 2004; Spreter *et al.*, 2009).

Já a família de proteínas VgrG pode fazer parte do canal de secreção do T6SS, porque seu N-terminal forma uma estrutura semelhante a uma agulha, que poderia ser usada para o transporte de macromoléculas e inserção em membranas (Leiman *et al.*, 2009; Pukatzki *et al.*, 2007; Pukatzki *et al.*, 2009). Além disso, descrições recentes têm mostrado que VgrG é secretada, e extensões C-terminais em algumas proteínas desta família atuam como efetores nas células do hospedeiro (Ma *et al.*, 2009; Suarez *et al.*, 2010). Por sua vez, as proteínas gp27 e gp44, codificadas pelos bacteriófagos T4 e Mu, respectivamente, são homotrímeros no centro da placa da base de bacteriófagos de cauda longa (Rossmann *et al.*, 2004). O trímero de gp27/gp44 forma um canal, que presumivelmente serve para a transferência do DNA viral para o hospedeiro, e ao menos no caso de gp27 do fago T4, este canal está concetado a uma proteína trimérica semelhante a uma agulha, usada para perfurar a membrana externa de bactérias Gram-negativas (Kanamaru *et al.*, 2002; Kondou *et al.*, 2005).

O Sistema de Biogênese do Pilus do Tipo IV (T4PBS) também apresenta uma secretina dodecamérica, PilQ (Collins *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2003). Devido ao fato do T4PBS ser ancestralmente relacionado ao T2SS (Peabody *et al.*, 2003), prediz-se que PilQ possua o mesmo domínio descrito acima para GspD (Korotkov *et al.*, 2009), apesar da estrutura tridimensional da secretina do T4PBS não ter sido elucidada. Como a maquinaria de extrusão de fagos filamentosos possui uma secretina tetradecamérica (pIV) (Linderoth *et al.*, 1996; Opalka *et al.*, 2003), é também possível que pIV apresente o domínio ubiquamente distribuído entre sistemas complexos engajados em transporte através da membrana externa. Além disso, não descartamos a hipótese de que a maquinaria de montagem do flagelo, que é evolutivamente conectada ao T3SS (Journet *et al.*, 2005), também possua o mesmo domínio observado em EscC.

As proteínas do T2SS (GspD), T3SS (EscC), T4SS (Xac2622) e T4PBS (PilQ) possuem diversas características em comum. Todos estes polipeptídeos fazem parte de Sistemas envolvidos com secreção de macromoléculas e, além disso, se associam a membrana externa bacteriana. Os domínios similares à região globular de Xac2622 são os N-terminais iniciais das suas respectivas cadeias polipeptídicas, provavelmente representando a entrada periplasmática dos canais oligoméricos (12-14 subunidades), que formam grandes poros na membrana externa. Como Xac2622 é equivalente a VirB7, que faz parte do canal da membrana externa com simetria tetradecamérica do T4SS (Chandran *et al.*, 2009; Fronzes *et al.*, 2009b), provavelmente também forma estruturas com 14 subunidades associadas a VirB9 e VirB10.

Os receptores TonB-dependentes (FecA, PupA e outros), as proteínas VgrG (T6SS) e gp27/gp44 (fagos) são exceções a essas características comuns.

Receptores TonB-dependentes se localizam na membrana externa e os domínios de sinalização representam os seus N-terminais periplasmáticos. Porém, RTBDs são monoméricos, e, apesar de serem barris- β de membrana, não possuem um grande canal interno e não estão envolvidas com secreção de macromoléculas. As diferenças observadas derivam da função dessas proteínas: RTBDs estão envolvidos com transporte de pequenos complexos sideróforos-ligantes (Chakraborty *et al.*, 2007), não necessitando, portanto, formar oligômeros com grandes canais. Os polipeptídeos gp27/gp44 e VgrG podem ser vistos como exceções em alguns desses pontos (formam trímeros e o domínio similar a Xac2622 não é N-terminal, entre outras características) (Kanamaru *et al.*, 2002; Leiman *et al.*, 2009). Contudo, várias informações importantes não são conhecidas para os Sistemas da qual essas proteínas fazem parte, particularmente o T6SS (Filloux *et al.*, 2008; Pukatzki *et al.*, 2009).

As funções primordiais desses domínios presentes em diversas proteínas aparentam ser o de realizar interações proteína-proteína e oligomerizar para montar canais. Como exemplos de interações, os domínios de sinalização de RTBD interagem com o “TonB-box” e com fatores anti-sigma, cuja consequência final é a alteração da expressão gênica (Brillet *et al.*, 2007; Brooks e Buchanan, 2008). Além disso, foi proposto que, da mesma forma que o domínio de sinalização de RTBD, GspD poderia se engajar em interações proteína-proteína por complementação de fitas- β com polipeptídeos do T2SS e/ou substratos (Korotkov *et al.*, 2009). Os domínios comuns das secretinas do T2SS, T3SS e T4PBS, além de gp27/gp44 presente em fagos, oligomerizam para formar grandes canais. Existe a possibilidade de Xac2622 do T4SS e VgrG do T6SS também formarem oligômeros associados a canais em seus respectivos Sistemas de Secreção.

A presença desse domínio em Xac2622 pode significar que VirB7 tem uma função extra no T4SS de *Xanthomonas*: além de possuir os elementos habituais, ou seja, um peptídeo sinal, um sinal de ligação a lipídeo e um peptídeo curto de interação a VirB9, Xac2622 apresenta um domínio enovelado no C-terminal. Por analogia com a função desempenhada pelas outras proteínas que apresentam região similar, este domínio globular pode estar envolvido em interações proteína-proteína ou até sinalização celular, pelo reconhecimento de um fator anti-sigma ou outra proteína, possivelmente relacionada à virulência.

Foram realizados ensaios de duplo-híbrido com a proteína Xac2622 completa, e a única interação encontrada foi com VirB9 (Alegria *et al.*, 2005). A ligação de alta afinidade a VirB9 pode ter evitado a detecção de outras interações de menor afinidade nesses experimentos. Logo, seria de grande interesse repetir esses ensaios utilizando como isca apenas o domínio globular de Xac2622, removendo a porção de interação com VirB9. Para isso, o fragmento gênico que codifica a proteína Xac2622₅₁₋₁₃₉ foi clonado no vetor para duplo-híbrido pOBD (Hudson *et al.*, 1997; Uetz *et al.*, 2000), em fusão com o gene que codifica o domínio de ligação a DNA de Gal4 (dados não mostrados). Contudo, os experimentos de duplo-híbrido ainda não foram realizados. Esses ensaios poderão levar a descoberta de outros parceiros de interação de Xac2622, não identificados previamente.

Uma hipótese para o fenômeno de oligomerização de Xac2622 seria a de que isso ocorre para esconder a interface de interação com um ligante específico na ausência deste parceiro, tanto essa auto-interação de Xac2622 sendo fisiologicamente verdadeira e relevante, como também podendo ser um artefato das altas concentrações utilizadas em RMN (dezenas a centenas de micromolar). Portanto, uma possível superfície de interação de Xac2622 com outras proteínas

seria a face do domínio globular envolvida com oligomerização. Outro possível local para ligação a polipeptídeos poderia ser a região β em Xac2622 equivalente a folha- β presente nos domínios de sinalização de RTBD envolvida com complementação de fitas- β .

Outra possibilidade para a função do domínio globular de Xac2622 e sua oligomerização poderia ser o de auxiliar na montagem e estabilidade do complexo tetradecamérico, em conjunto com VirB9 e VirB10, na membrana externa do T4SS de *Xanthomonas*.

Claramente, podem existir conexões evolutivas envolvendo esses domínios estruturalmente similares encontrados apenas em complexos bacterianos associados à membrana externa Gram-negativa e envolvidos com secreção de moléculas. Também podem derivar deste trabalho implicações evolutivas que conectem os vários Sistemas bacterianos aqui descritos.

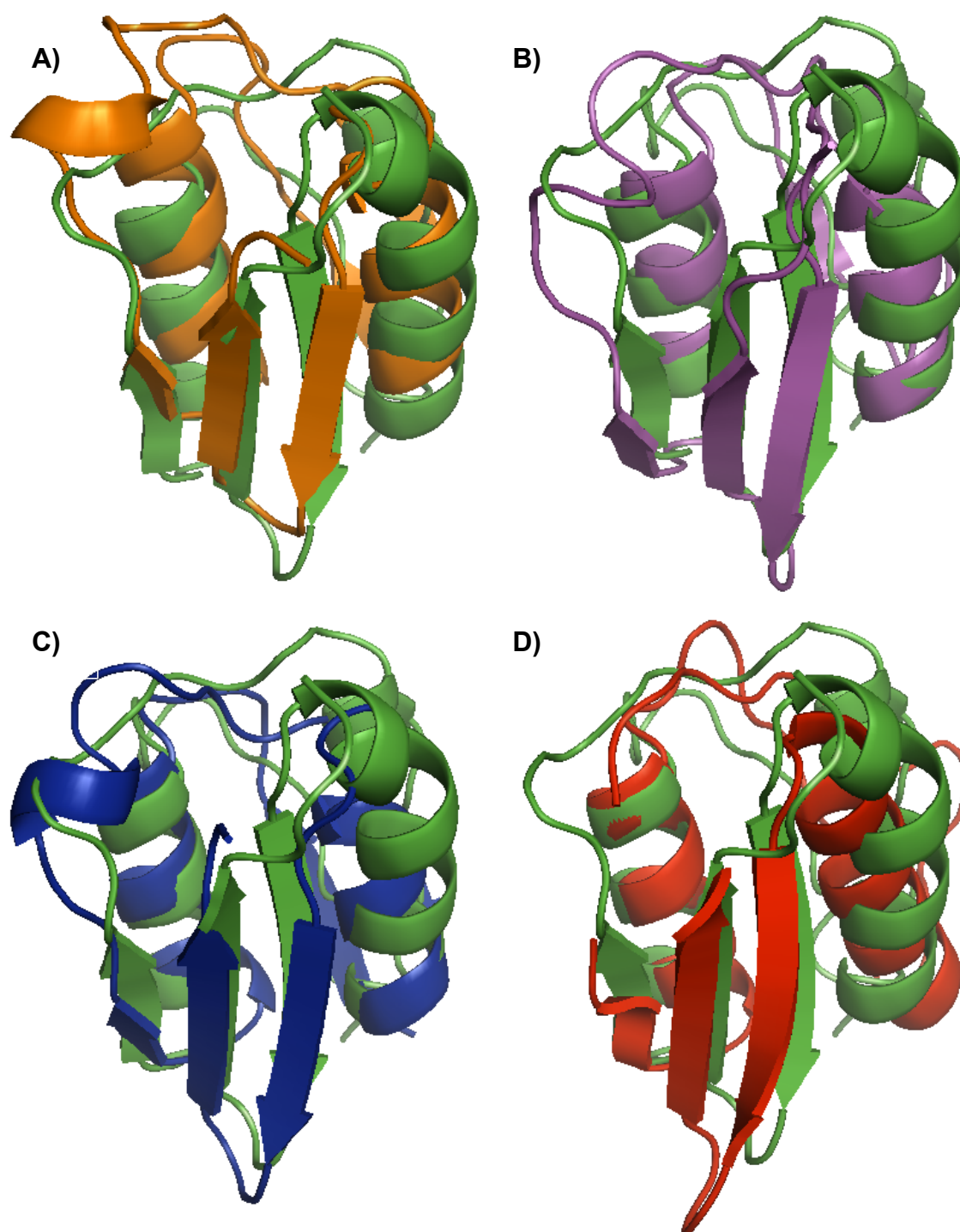


Figura 73. Sobreposição estrutural do modelo em solução de menor energia de Xac2622 (verde, resíduos 51-134, PDB: 2KK3) com: (A) PupA (laranja, resíduos 3-76, PDB: 2A02); (B) FecA (roxo, resíduos 1-76, PDB: 1ZZV); (C) FpvA (azul escuro, resíduos 45-118, PDB: 2IAH); (D) GspD (vermelho, resíduos 3-79, PDB: 3EZJ). Continuação na próxima página.

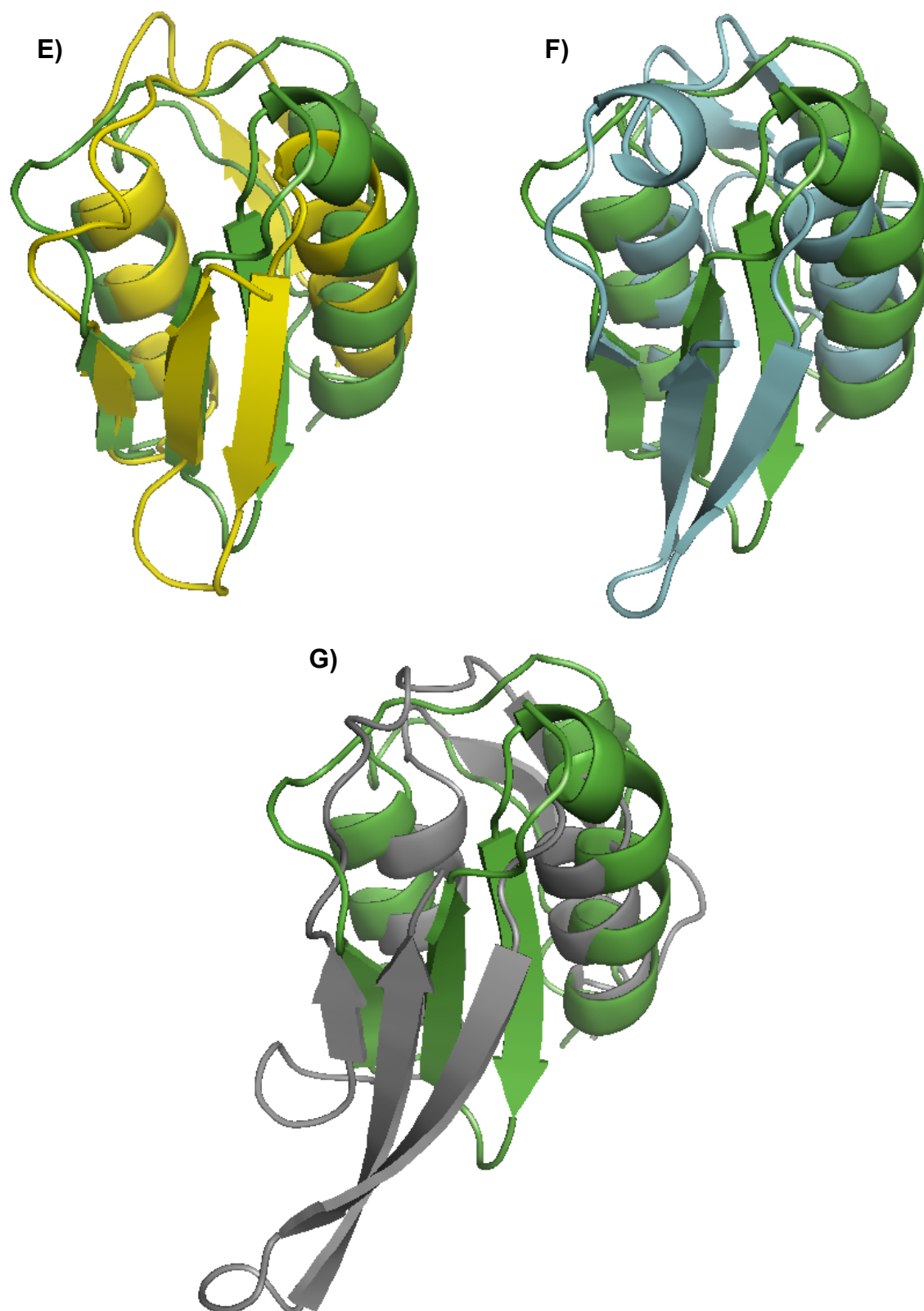


Figura 73. (continuação) Sobreposição estrutural do modelo em solução de menor energia de Xac2622 (verde, resíduos 51-134, PDB: 2KK3) com: (E) EscC (amarelo, resíduos 31-103, PDB: 3GR5); (F) gp44 (azul claro, resíduos 97-176, PDB: 1WRU) e (G) VgrG (cinza, resíduos 118-201, PDB: 2P5Z).

5.5. Caracterização das proteínas hipotéticas Xac2609 e Xac2610

Diversas interações foram estudadas ao longo deste trabalho. A Figura 74 apresenta um resumo das interações detectadas, utilizando diferentes técnicas.

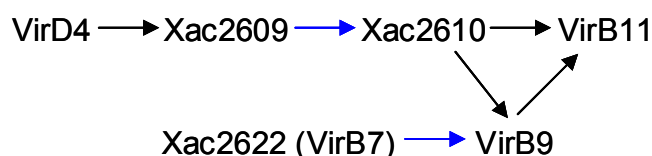


Figura 74. Resumo das interações observadas para proteínas relacionadas ao T4SS codificado pelo cromossomo de *Xac*, utilizando diferentes técnicas. Preto: interações detectadas apenas por “overlay”; Azul: interações caracterizadas por diversas técnicas.

Xac2610 realiza interações com diversas proteínas relacionadas ao T4SS, incluindo prováveis substratos (Xac2609) e proteínas do aparato central de secreção (VirB9 e VirB11). Em relação a interação envolvendo VirB9₃₄₋₂₅₅ e VirB11_{His-1-346}, esta só havia sido detectada antes para outros T4SS por duplo-híbrido (Malek *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2002). Portanto, esta é a primeira descrição da ligação VirB9-VirB11 por uma abordagem não genética.

As proteínas hipotéticas Xac2609 e Xac2610 se ligam com afinidade extremamente alta, inclusive impondo dificuldades técnicas para a caracterização da constante de dissociação desta interação (tópico 4.3.1). Esses polipeptídeos se tornam muito mais estáveis em complexo e renovelam de forma cooperativa, como exemplificado pelos experimentos de dicroísmo circular (Figura 62). A sensibilidade da estrutura secundária de Xac2609₁₋₄₃₁ a variações de temperatura pode refletir o fato desta proteína ser um provável substrato do T4SS, necessitando ser desenovelada para a transferência através do canal de secreção, e sofrer renovelamento no meio extracelular para realizar sua função. Neste contexto,

Xac2610 pode servir como chaperona de Xac2609 e outros substratos do T4SS, auxiliando no desenovelamento e/ou reenovelamento destas moléculas. Experimentos de proteólise limitada mostraram que ocorre um certo grau de proteção contra proteólise quando Xac2609₁₋₄₃₁ e Xac2610_{His-22-267} estão em complexo (Figura 61). Em particular, restam 2 fragmentos proteolíticos mais estáveis nas digestões com tripsina e quimotripsina, que podem representar os domínios de interação entre essas proteínas.

Portanto, Xac2609 e Xac2610 devem atuar em conjunto, em um contexto biológico que ainda necessita ser caracterizado. O fato de Xac2609 ter domínios preditos de ligação e clivagem de carboidratos sugere a possível função extracelular desta proteína. Estudos preliminares de “Western blot” mostraram que Xac2610 é expressa em *Xac* quando a bactéria é crescida no meio XVM2 (dados não mostrados), um meio de cultura conhecido por induzir fatores de virulência em *Xanthomonas* (Wengelnik e Bonas, 1996). Esta observação é importante, porque pela primeira vez se detectou a produção *in vivo* de um componente relacionado ao T4SS em *Xanthomonas*.

Os primeiros 54 aminoácidos de Xac2610_{His-22-267} aparentam ter pouca estabilidade, como evidenciado pelo experimento de proteólise que levou a identificação do fragmento cristalizável Xac2610₅₅₋₂₆₇. Análises de seqüência utilizando programas preditores de desordem sugerem que Xac2610 possui um N-terminal desenovelado, seguido de uma região central enovelada, que engloba a maior parte da proteína (Figura 75).

Os cristais obtidos de Xac2610₅₅₋₂₆₇ e a subsequente resolução de sua estrutura poderão evidenciar o papel desta proteína. Porém, devido a este polipeptídeo não possuir nenhum homólogo com estrutura tridimensional conhecida,

será necessário se determinar experimentalmente as estimativas iniciais das fases para a resolução de sua estrutura cristalográfica. Xac2610₅₅₋₂₆₇ será produzida marcada com selênio-metionina para a realização de experimentos de dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda (MAD) (Taylor, 2003; Walsh *et al.*, 1999), o que poderá permitir a resolução estrutural em alta resolução deste interessante polipeptídeo.

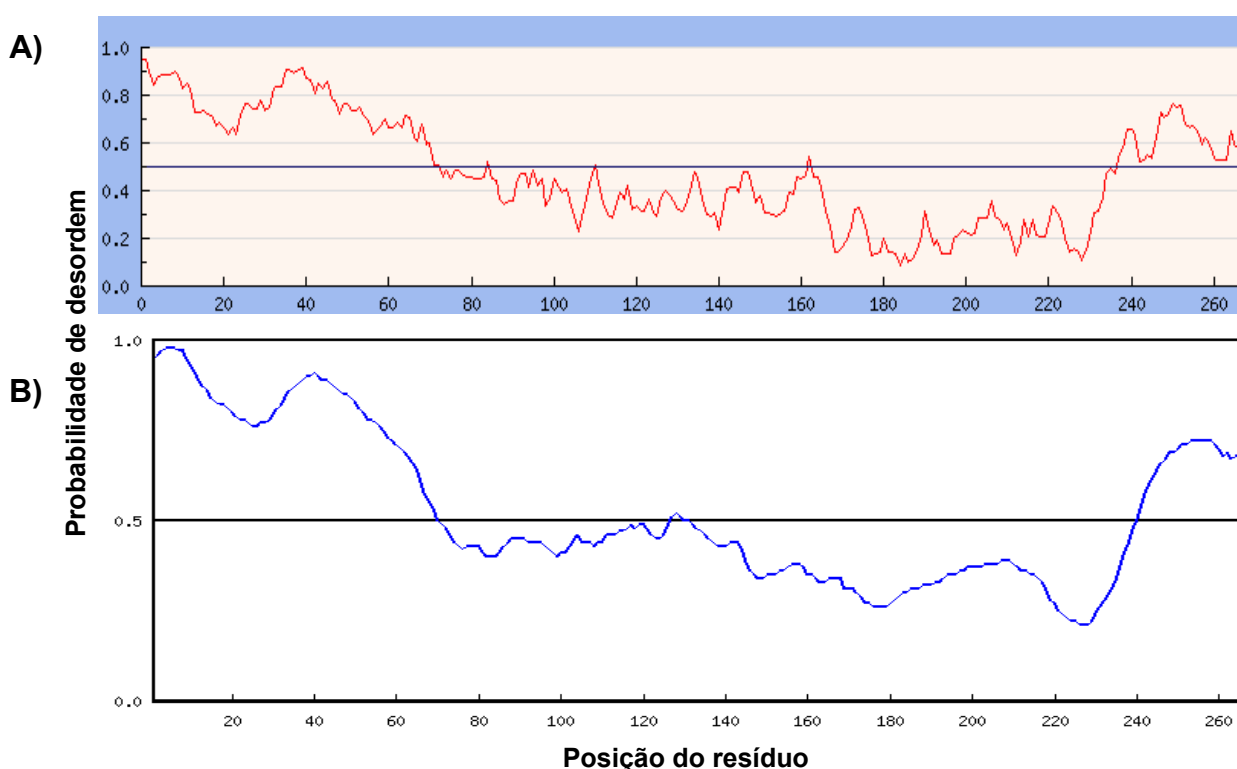


Figura 75. Análise de desordem da seqüência de Xac2610_{His-22-267}. (A) Programa IUPRED (Dosztanyi *et al.*, 2005) e (B) RONN (Yang *et al.*, 2005). O N- e o extremo C-terminal são desenovelados por estas análises (tendência ou probabilidade de desordem acima de 0,5). O C-terminal possivelmente desenovelado inclui o trecho 250 PKKK 253, um potencial sinal de localização nuclear (NLS) eucariótico, que levaria essa proteína a atuar no núcleo da planta caso Xac2610 seja um substrato secretado pelo T4SS (Alegria *et al.*, 2005).

5.6. O domínio C-terminal de Xac2609, responsável pela interação à VirD4, é intrinsecamente desenhado

O domínio C-terminal do potencial substrato Xac2609 é amplamente desenhado (tópicos 4.1.4.2 e 4.3.3), o que nos leva a classificá-lo como fazendo parte do grupo de proteínas intrinsecamente desestruturadas. Essa família de polipeptídeos desempenha diversas funções, como regulação da transcrição, ligação a ácidos nucleicos, transporte, sinalização, e, particularmente, interações proteína-proteína (Dunker *et al.*, 2008; Fink, 2005).

Para uma caracterização mais completa e comprovação de que todos os membros da família de domínios de ligação a VirD4 são intrinsecamente desordenados, foram clonados em vetores de expressão fragmentos gênicos que codificam domínios C-terminais ou proteínas inteiras que possuem as características dessa família (Xac0466_{His-484-589}, Xac1165₁₋₁₁₂ e Xac3404₁₋₁₃₂; Tabelas 3 e 6). Estas proteínas foram expressas de forma solúvel, o que permitirá a realização de experimentos (CD, RMN e proteólise limitada) para se estudar o grau de enovelamento em solução dos polipeptídeos recombinantes. Provavelmente estes outros domínios também são desenhados, porque apresentam perfis de desordem baseados em predições de bioinformática similares a Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ (Figura 76). Essas proteínas parecem ter os extremos N- e C-terminais desestruturados, podendo possuir uma região central com 35-40 resíduos com tendência a ser enovelada. Os resultados deste trabalho apontam que o domínio C-terminal de Xac2609, e potencialmente todos os domínios C-terminais conservados de interação a VirD4 de *Xanthomonas*, pertencem a crescente família de proteínas

intrinsecamente desestruturadas, podendo se enovelar apenas na presença de ligantes específicos.

Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ é parcialmente desenovelada, estável e não agregativa em solução, mesmo em altas concentrações (3 mM; dados não mostrados), possuindo uma forte tendência a se enovelar em condições específicas do meio. (variações de força iônica, pH e TFE; tópico 4.3.3). Portanto, assim como o observado para Xac2609₁₋₄₃₁, a estrutura secundária do seu domínio C-terminal é mais marginalmente estável do que o esperado para um polipeptídeo. Conforme discutido no tópico anterior, uma possível explicação para isso seria a de que Xac2609 é um substrato que precisa ser desenovelado para secreção via T4SS e reenovelado no meio extracelular, necessitando, portanto, de uma estabilidade extremamente marginal.

O fato de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁ enovelar com diferentes tratamentos também sugere que esta proteína somente possa adquirir sua conformação final a menos que esteja presente um parceiro de interação específico. Este parceiro poderia ser VirD4, e pretendemos realizar experimentos, particularmente de RMN, para avaliar se VirD4_{His-83-557} é capaz de induzir enovelamento de Xac2609₃₁₁₋₄₃₁. Por outro lado, o fato dos substratos potencialmente serem transportados desenovelados pelo *pilus* de secreção de Sistemas IV (Alvarez-Martinez e Christie, 2009; Wang *et al.*, 2009) poderia significar que VirD4 induz o desenovelamento de Xac2609, e não o seu enovelamento. Além disso, como foi demonstrado que VirD4 é uma ATPase cuja atividade é modulada pela ligação a outras moléculas (Tato *et al.*, 2007; Tato *et al.*, 2005), seria interessante avaliar se Xac2609 estimula esta atividade ATPásica e se o enovelamento e/ou desenovelamento da última proteína somente ocorrem na presença de VirD4 e nucleotídeos específicos.

Serão realizados ensaios de secreção com sobrenadantes de cultura de diferentes linhagens de *Xac*, seguidos de detecção por “Western blot” com anticorpos anti-Xac2609, com o intuito de avaliar se este polipeptídeo é secretado no meio (linhagem selvagem de *Xac*), e se a secreção é interrompida pela ausência do T4SS (cepa $\Delta xac2622$). Isso poderá confirmar que o T4SS cromossomal de *Xac* é funcional na secreção de substratos. Também pretendemos realizar experimentos para testar a hipótese de que a presença de um dos domínios predominantemente desestruturados é suficiente para a secreção, mostrando definitivamente que esse é o sinal reconhecido para seleção de substratos do T4SS em *Xanthomonas*.

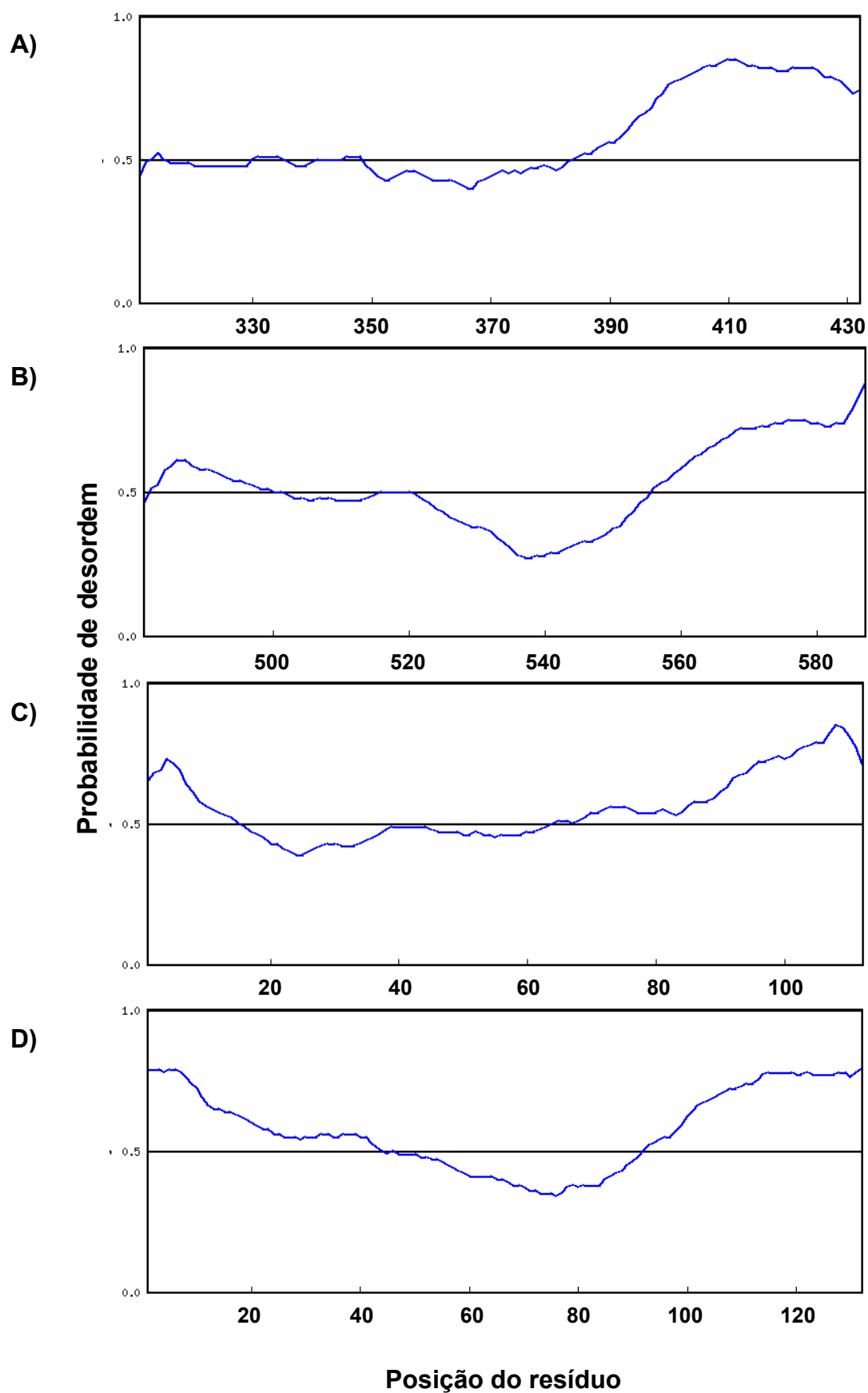


Figura 76. Análise de desordem (programa RONN (Yang *et al.*, 2005)) dos domínios de ligação a VirD4 de (A) Xac2609 (resíduos 311-431), (B) Xac0466 (resíduos 484-589), (C) Xac1165 (resíduos 1-112) e (D) Xac3404 (resíduos 1-132).

5.7. Especulações sobre a função do T4SS codificado pelo cromossomo de *Xac*

Na anotação original do genoma de *Xac*, acreditava-se que o T4SS cromossomal estivesse incompleto, devido às ausências de genes com similaridade de seqüência para *virb5* e *virb7* (Brunings e Gabriel, 2003; Da Silva *et al.*, 2002). Este trabalho demonstrou que a proteína hipotética Xac2622 é o equivalente a VirB7 desse T4SS. Com isso, somente falta identificar o equivalente para a proteína VirB5. Especulamos previamente que esta proteína seria Xac2613 (Alegria *et al.*, 2005). Portanto, seria de grande relevância a caracterização deste polipeptídeo para confirmar que o T4SS cromossomal de *Xac* está completo. Contudo, Xac2613₅₂₋₂₇₅ foi produzida como uma proteína recombinante insolúvel neste trabalho. Novas tentativas serão realizadas para obtê-la solúvel, o que poderá permitir sua caracterização estrutural e funcional.

O nocaute do gene *xac2622* aparenta não ter afetado a virulência de *Xac*. Isso pode significar que o T4SS não é essencial para a capacidade de causar doença deste fitopatógeno. Porém, foi demonstrado que *virb7* não é essencial para a virulência de *Brucella abortus*, apesar dos genes *virb3-virb6* e *virb8-virb11* serem fundamentais (Den Hartigh *et al.*, 2008). Não descartamos a possibilidade de que este fenômeno possa também ser verdadeiro para *Xac*.

Existem outras explicações para a detectada falta de importância do T4SS de *Xac* nos experimentos *in planta*. Uma possibilidade é que o T4SS não é essencial para *Xac* infectar a planta utilizada, laranja pêra (*Citrus sinensis*), podendo ser importante para a infecção de outros hospedeiros cítricos deste fitopatógeno. Como um exemplo, o polissacarídeo extracelular xantana é dispensável para crescimento

bacteriano e formação dos sintomas da doença em *Citrus sinensis* (Dunger *et al.*, 2007), mas contribui para virulência bacteriana em *Citrus limon* (Rigano *et al.*, 2007), sugerindo que a importância de fatores de virulência possa depender do hospedeiro e das condições ambientais (Buttner e Bonas, 2009). Vale ressaltar que no estudo aqui apresentado as cepas de *Xac* selvagem e $\Delta xac2622$ foram inoculadas em alta densidade celular ($A_{600} = 0,1$) e diretamente no mesófilo foliar. Não podemos descartar outras possibilidades, como as de que o T4SS possa ser importante para as etapas iniciais da infecção (baixa densidade celular) e/ou para a penetração dos tecidos vegetais, como também para a sobrevivência epifítica da bactéria, ou mesmo para alguma função não diretamente relacionada à virulência.

Apesar da não confirmação do seu papel em virulência, o T4SS codificado pelo cromossomo de *Xac* é bastante conservado nas bactérias do gênero *Xanthomonas* que o possuem. Como exemplos, a proteína VirB4 de *Xac* possui 96 % de identidade, 98 % de similaridade e 0 % de lacunas (“gaps”) para a mesma proteína de *Xcc* B100 (100 % de cobertura ao longo de 817 resíduos); *Xac*2622, 100 % de identidade e 0 % de “gaps” para o seu ortólogo em *Xcv* 85-10 (100 % de cobertura ao longo de 139 resíduos); e *Xac*2609, 96 % de identidade, 98 % de similaridade e 0 % de “gaps” para o seu ortólogo em *Xcc* B100 (100 % de cobertura ao longo de 431 resíduos). Portanto, o T4SS provavelmente possui alguma função ainda não vislumbrada para o importante gênero de fitopatógenos *Xanthomonas*.

6. REFERÊNCIAS

Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A. e Berg, D. E. (1998) Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, **28**, 37-53.

Alegria, M. C. (2004) Identificação de interações proteína-proteína envolvendo os produtos dos Loci *hrp*, *vir* e *rpf* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, XXX p.

Alegria, M. C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., Da Silva, A. C. e Farah, C. S. (2004) New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *J Bacteriol*, **186**, 6186-97.

Alegria, M. C., Souza, D. P., Andrade, M. O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., Da Silva, A. C. e Farah, C. S. (2005) Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*, **187**, 2315-25.

Alvarez-Martinez, C. E. e Christie, P. J. (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, **73**, 775-808.

Aly, K. A. e Baron, C. (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, **153**, 3766-75.

Aly, K. A., Krall, L., Lottspeich, F. e Baron, C. (2008) The type IV secretion system component VirB5 binds to the trans-zeatin biosynthetic enzyme Tzs and enables its translocation to the cell surface of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, **190**, 1595-604.

Amaral, A. M. (2004) O que torna o cancro cítrico uma doença? *Laranja*, **25**, 375-87.

Amor, J. C., Swails, J., Zhu, X. J., Roy, C. R., Nagai, H., Ingmundson, A., Cheng, X. D. e Kahn, R. A. (2005) The structure of RalF, an ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor from *Legionella pneumophila*, reveals the presence of a cap over the active site. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 1392-400.

Arechaga, I., Pena, A., Zunzunegui, S., Del Carmen Fernandez-Alonso, M., Rivas, G. e De La Cruz, F. (2008) ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system. *J Bacteriol*, **190**, 5472-9.

Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J. e Radman, M. (2008) Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science*, **319**, 1533-6.

Backert, S., Fronzes, R. e Waksman, G. (2008) VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol*, **16**, 409-13.

- Backert, S. e Meyer, T. F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 207-17.
- Backert, S. e Selbach, M. (2008) Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol*, **10**, 1573-81.
- Bailey, S., Ward, D., Middleton, R., Grossmann, J. G. e Zambryski, P. C. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2582-7.
- Baron, C. (2005) From bioremediation to biowarfare: on the impact and mechanism of type IV secretion systems. *FEMS Microbiol Lett*, **253**, 163-70.
- Baron, C. (2006) VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol*, **84**, 890-9.
- Baryshnikova, O. K. e Sykes, B. D. (2006) Backbone dynamics of SDF-1alpha determined by NMR: interpretation in the presence of monomer-dimer equilibrium. *Protein Sci*, **15**, 2568-78.
- Bax, A. (2003) Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci*, **12**, 1-16.
- Bax, A. e Grishaev, A. (2005) Weak alignment NMR: a hawk-eyed view of biomolecular structure. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 563-70.
- Bayliss, R., Harris, R., Coutte, L., Monier, A., Fronzes, R., Christie, P. J., Driscoll, P. C. e Waksman, G. (2007) NMR structure of a complex between the VirB9/VirB7 interaction domains of the pKM101 type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1673-8.
- Belasque, J. J., Bassanezi, R. B., Spósito, M. B., Ribeiro, L. M., De Jesus, W. C. e Amorim, L. (2005) Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. *Fitopatol Bras*, **30**, 387-93.
- Belasque, J. J. e De Jesus, W. C. J. (2006) Concentração de inóculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Laranja*, **27**, 263-72.
- Berger, B. R. e Christie, P. J. (1993) The *Agrobacterium tumefaciens* *virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J Bacteriol*, **175**, 1723-34.
- Berger, B. R. e Christie, P. J. (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol*, **176**, 3646-60.
- Bernstein, H. D. (2007) Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends Microbiol*, **15**, 441-7.
- Bhattacharya, A., Tejero, R. e Montelione, G. T. (2007) Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins*, **66**, 778-95.

- Bouvignies, G., Markwick, P. R. e Blackledge, M. (2007) Simultaneous definition of high resolution protein structure and backbone conformational dynamics using NMR residual dipolar couplings. *ChemPhysChem*, **8**, 1901-9.
- Bove, J. M. e Ayres, A. J. (2007) Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life*, **59**, 346-54.
- Braun, V. e Endriss, F. (2007) Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals*, **20**, 219-31.
- Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F. e Cobessi, D. (2007) A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Structure*, **15**, 1383-91.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C. e Genin, S. (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 109-19.
- Brooks, B. E. e Buchanan, S. K. (2008) Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1930-45.
- Brunings, A. M. e Gabriel, D. W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol*, **4**, 141-57.
- Bruschweiler, R. (2003) New approaches to the dynamic interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 175-83.
- Bruser, T. (2007) The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**, 35-45.
- Burghout, P., Van Boxtel, R., Van Gelder, P., Ringler, P., Muller, S. A., Tommassen, J. e Koster, M. (2004) Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, **186**, 4645-54.
- Burstein, D., Zusman, T., Degtyar, E., Viner, R., Segal, G. e Pupko, T. (2009) Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog*, **5**, e1000508.
- Buttner, D. e Bonas, U. (2009) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, [Epub ahead of print].
- Buttner, D. e He, S. Y. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol*, **150**, 1656-64.
- Cabezón, E. e De La Cruz, F. (2006) TrwB: an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol*, **157**, 299-305.
- Cao, T. B. e Saier, M. H., Jr. (2001) Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology*, **147**, 3201-14.

- Cascales, E. (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep*, **9**, 735-41.
- Cascales, E. e Christie, P. J. (2004a) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17228-33.
- Cascales, E. e Christie, P. J. (2004b) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science*, **304**, 1170-3.
- Castaneda-Agullo, M., Del Castillo, L. M., Whitaker, J. R. e Tappel, A. L. (1961) Effect of ionic strength on the kinetics of trypsin and alpha chymotrypsin. *J Gen Physiol*, **44**, 1103-20.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., Skelton, N. J. e Rance, M. (2006) Protein NMR spectroscopy: principles and practice. San Diego: Academic Press.
- Celli, J. (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol*, **157**, 93-8.
- Chakraborty, R., Storey, E. e Van Der Helm, D. (2007) Molecular mechanism of ferrisiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biometals*, **20**, 263-74.
- Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Remigy, H. W., Muller, S. A., Valerio, M., Engel, A., Pugsley, A. P. e Bayan, N. (2005) Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. *J Biol Chem*, **280**, 37732-41.
- Chan, J. W. e Goodwin, P. H. (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Adv*, **17**, 489-508.
- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J. e Waksman, G. (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*, **462**, 1011-5.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. e Lindow, S. (2008) Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol*, **46**, 243-71.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. e Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 12-21.
- Christie, P. J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 219-34.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. e Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 451-85.
- Christie, P. J. e Cascales, E. (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Mol Membr Biol*, **22**, 51-61.

Cianciotto, N. P. (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol*, **13**, 581-8.

Clore, G. M., Szabo, A., Bax, A., Kay, L. E., Driscoll, P. C. e Gronenborn, A. M. (1990) Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J Am Chem Soc*, **112**, 4989-91.

Collaborative Computational Project Number 4. (1994) The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 760-3.

Collins, R. F., Davidsen, L., Derrick, J. P., Ford, R. C. e Tonjum, T. (2001) Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. *J Bacteriol*, **183**, 3825-32.

Collins, R. F., Ford, R. C., Kitmitto, A., Olsen, R. O., Tonjum, T. e Derrick, J. P. (2003) Three-dimensional structure of the *Neisseria meningitidis* secretin PilQ determined from negative-stain transmission electron microscopy. *J Bacteriol*, **185**, 2611-7.

Cornelis, G. R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 811-25.

Cornilescu, G., Delaglio, F. e Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR*, **13**, 289-302.

Cornilescu, G., Marquardt, J. L., Ottiger, M. e Bax, A. (1998) Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 6836-6837.

Correa, F. e Farah, C. S. (2007) Different effects of trifluoroethanol and glycerol on the stability of tropomyosin helices and the head-to-tail complex. *Biophys J*, **92**, 2463-75.

Correa, F., Salinas, R. K., Bonvin, A. M. e Farah, C. S. (2008) Deciphering the role of the electrostatic interactions in the alpha-tropomyosin head-to-tail complex. *Proteins*, **73**, 902-17.

Creighton, T. E. (1993) *Proteins – Structures and Molecular Properties*. Nova York: W. H. Freeman and Company.

Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., Von Heijne, G. e Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*, **10**, 673-6.

Da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., Do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A., Silva, C., De Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I.,

Trindade Dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C. e Kitajima, J. P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **417**, 459-63.

Dang, T. A. e Christie, P. J. (1997) The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol*, **179**, 453-62.

Das, A. e Xie, Y. H. (1998) Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol Microbiol*, **27**, 405-14.

Das, A. e Xie, Y. H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol*, **182**, 758-63.

Das, A. K. (2003) Citrus canker – A review. *J. Appl. Hort.*, **5**, 52-60.

Dautin, N. e Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol*, **61**, 89-112.

Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J. S. e Richardson, D. C. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, **35**, W375-83.

De Jong, M. F., Sun, Y. H., Den Hartigh, A. B., Van Dijl, J. M. e Tsolis, R. M. (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol*, **70**, 1378-96.

Dehio, C. (2008) Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol*, **10**, 1591-8.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. e Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*, **6**, 277-93.

Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 149-61.

Den Hartigh, A. B., Rolan, H. G., De Jong, M. F. e Tsolis, R. M. (2008) VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J Bacteriol*, **190**, 4427-36.

Docena, C. (2006) Identificação de interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 177 p.

Dominguez, C., Boelens, R. e Bonvin, A. M. (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc*, **125**, 1731-7.

- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-Lamontagne, A. L., Clarke, B. R., Whitfield, C. e Naismith, J. H. (2006) Wza the translocon for E. coli capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature*, **444**, 226-9.
- Dosset, P., Hus, J. C., Marion, D. e Blackledge, M. (2001) A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR*, **20**, 223-31.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. e Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, **21**, 3433-4.
- Draper, O., Middleton, R., Doucleff, M. e Zambryski, P. C. (2006) Topology of the VirB4 C terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 type IV secretion system. *J Biol Chem*, **281**, 37628-35.
- Dunger, G., Relling, V. M., Tondo, M. L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E. G. e Ottado, J. (2007) Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch Microbiol*, **188**, 127-35.
- Dunker, A. K., Silman, I., Uversky, V. N. e Sussman, J. L. (2008) Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 756-64.
- Dym, O., Albeck, S., Unger, T., Jacobovitch, J., Branzburg, A., Michael, Y., Frenkiel-Krispin, D., Wolf, S. G. e Elbaum, M. (2008) Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11170-5.
- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V. e Pugsley, A. P. (2006) Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol*, **62**, 308-19.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E. M., Lurz, R., Kado, C. I. e Lanka, E. (1999) Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem*, **274**, 22548-55.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R. e Lanka, E. (2000) Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic Dyad-like mechanism of leader peptidases. *J Bacteriol*, **182**, 6751-61.
- El Yacoubi, B., Brunings, A. M., Yuan, Q., Shankar, S. e Gabriel, D. W. (2007) *In planta* horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 1612-21.
- Emsley, P. e Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 2126-32.
- Ferguson, A. D., Amezcua, C. A., Halabi, N. M., Chelliah, Y., Rosen, M. K., Ranganathan, R. e Deisenhofer, J. (2007) Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 513-8.

- Fernandez, D., Dang, T. A., Spudich, G. M., Zhou, X. R., Berger, B. R. e Christie, P. J. (1996a) The *Agrobacterium tumefaciens virB7* gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol*, **178**, 3156-67.
- Fernandez, D., Spudich, G. M., Zhou, X. R. e Christie, P. J. (1996b) The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J Bacteriol*, **178**, 3168-76.
- Filloux, A., Hachani, A. e Bleves, S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, **154**, 1570-83.
- Fink, A. L. (2005) Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 35-41.
- Fontana, A., De Laureto, P. P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P. e Zamboni, M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol*, **51**, 299-321.
- Franco, I. S., Shuman, H. A. e Charpentier, X. (2009) The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol*, **11**, 1435-43.
- Frank, A. C., Alsmark, C. M., Tholleson, M. e Andersson, S. G. (2005) Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Mol Biol Evol*, **22**, 1325-36.
- Fronzes, R., Christie, P. J. e Waksman, G. (2009a) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 703-14.
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V. e Waksman, G. (2009b) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, **323**, 266-8.
- Fullner, K. J., Stephens, K. M. e Nester, E. W. (1994) An essential virulence protein of *Agrobacterium tumefaciens*, VirB4, requires an intact mononucleotide binding domain to function in transfer of T-DNA. *Mol Gen Genet*, **245**, 704-15.
- Garcia-Herrero, A. e Vogel, H. J. (2005) Nuclear magnetic resonance solution structure of the periplasmic signalling domain of the TonB-dependent outer membrane transporter FecA from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **58**, 1226-37.
- Gelvin, S. B. (2000) *Agrobacterium* and Plant Genes Involved in T-DNA Transfer and Integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **51**, 223-56.
- Gold, V. A., Duong, F. e Collinson, I. (2007) Structure and function of the bacterial Sec translocon. *Mol Membr Biol*, **24**, 387-94.
- Gomis-Ruth, F. X., De La Cruz, F. e Coll, M. (2002a) Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Res Microbiol*, **153**, 199-204.
- Gomis-Ruth, F. X., Moncalian, G., De La Cruz, F. e Coll, M. (2002b) Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem*, **277**, 7556-66.

Gomis-Ruth, F. X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., De La Cruz, F. e Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature*, **409**, 637-41.

Gottig, N., Garavaglia, B. S., Garofalo, C. G., Orellano, E. G. e Ottado, J. (2009) A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One*, **4**, e4358.

Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M. e Dangl, J. L. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **60**, 425-49.

Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, **1**, 2876-90.

Gurlebeck, D., Thieme, F. e Bonas, U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol*, **163**, 233-55.

Hamilton, H. L., Dominguez, N. M., Schwartz, K. J., Hackett, K. T. e Dillard, J. P. (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol*, **55**, 1704-21.

Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C. e Baron, C. (2000) VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, **182**, 4505-11.

Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*, **48**, 422-7.

Hatakeyama, M. e Higashi, H. (2005) *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci*, **96**, 835-43.

He, Y. Q., Zhang, L., Jiang, B. L., Zhang, Z. C., Xu, R. Q., Tang, D. J., Qin, J., Jiang, W., Zhang, X., Liao, J., Cao, J. R., Zhang, S. S., Wei, M. L., Liang, X. X., Lu, G. T., Feng, J. X., Chen, B., Cheng, J. e Tang, J. L. (2007) Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol*, **8**, R218.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. e Ala'aldean, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 692-744.

Herrmann, T., Guntert, P. e Wuthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J Mol Biol*, **319**, 209-27.

- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. e Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, **14**, 378-9.
- Hofmann, K. e Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyley*, **374**, 166.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S. e Haas, R. (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol*, **41**, 379-91.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G. V., Haas, R. e Fischer, W. (2006) A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol*, **59**, 1624-37.
- Holland, I. B., Schmitt, L. e Young, J. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol Membr Biol*, **22**, 29-39.
- Holm, L. e Sander, C. (1996) Mapping the protein universe. *Science*, **273**, 595-603.
- Hoppner, C., Carle, A., Sivanesan, D., Hoepfner, S. e Baron, C. (2005) The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology*, **151**, 3469-82.
- Hudson, J. R., Jr., Dawson, E. P., Rushing, K. L., Jackson, C. H., Lockshon, D., Conover, D., Lanciault, C., Harris, J. R., Simmons, S. J., Rothstein, R. e Fields, S. (1997) The complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form. *Genome Res*, **7**, 1169-73.
- Hwang, H. H. e Gelvin, S. B. (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell*, **16**, 3148-67.
- Jakubowski, S. J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V. e Christie, P. J. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol*, **187**, 3486-95.
- Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G. e Christie, P. J. (2009) *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol*, **71**, 779-94.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E. e Christie, P. J. (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol*, **341**, 961-77.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V. e Christie, P. J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J Bacteriol*, **185**, 2867-78.
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G. e Sandkvist, M. (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett*, **255**, 175-86.

- Jones, A. L., Shirasu, K. e Kado, C. I. (1994) The product of the virB4 gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J Bacteriol*, **176**, 5255-61.
- Journet, L., Hughes, K. T. e Cornelis, G. R. (2005) Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. *Mol Membr Biol*, **22**, 41-50.
- Judd, P. K., Kumar, R. B. e Das, A. (2005a) Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11498-503.
- Judd, P. K., Kumar, R. B. e Das, A. (2005b) The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Mol Microbiol*, **55**, 115-24.
- Judd, P. K., Mahli, D. e Das, A. (2005c) Molecular characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirB6. *Microbiology*, **151**, 3483-92.
- Juhas, M., Crook, D. W. e Hood, D. W. (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol*, **10**, 2377-86.
- Kanamaru, S., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. e Rossmann, M. G. (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature*, **415**, 553-7.
- Kay, S. e Bonas, U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 37-43.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. e Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, **318**, 648-51.
- Kim, S., Bracken, C. e Baum, J. (1999) Characterization of millisecond time-scale dynamics in the molten globule state of alpha-lactalbumin by NMR. *J Mol Biol*, **294**, 551-60.
- Kingston, R. L., Gay, L. S., Baase, W. S. e Matthews, B. W. (2008) Structure of the nucleocapsid-binding domain from the mumps virus polymerase; an example of protein folding induced by crystallization. *J Mol Biol*, **379**, 719-31.
- Koebnik, R. (2005) TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol*, **13**, 343-7.
- Kondou, Y., Kitazawa, D., Takeda, S., Tsuchiya, Y., Yamashita, E., Mizuguchi, M., Kawano, K. e Tsukihara, T. (2005) Structure of the central hub of bacteriophage Mu baseplate determined by X-ray crystallography of gp44. *J Mol Biol*, **352**, 976-85.
- Koradi, R., Billeter, M. e Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*, **14**, 51-5, 29-32.
- Korotkov, K. V., Pardon, E., Steyaert, J. e Hol, W. G. (2009) Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure*, **17**, 255-65.

- Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., De La Cruz, F. e Lanka, E. (2000) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol*, **182**, 2761-70.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. e Sonnhammer, E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, **305**, 567-80.
- Kumar, R. B. e Das, A. (2001) Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J Bacteriol*, **183**, 3636-41.
- Kundrot, C. E. (2004) Which strategy for a protein crystallization project? *Cell Mol Life Sci*, **61**, 525-36.
- Kutter, S., Buhrdorf, R., Haas, J., Schneider-Brachert, W., Haas, R. e Fischer, W. (2008) Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol*, **190**, 2161-71.
- Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A. e Citovsky, V. (2006) A case of promiscuity: *Agrobacterium's* endless hunt for new partners. *Trends Genet*, **22**, 29-37.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lai, E. M., Chesnokova, O., Banta, L. M. e Kado, C. I. (2000) Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, **182**, 3705-16.
- Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. e Thornton, J. M. (1993) Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J Appl Crystallogr*, **26**, 283-91.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., Macarthur, M. W., Kaptein, R. e Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, **8**, 477-86.
- Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., Park, I. C., Yoon, U. H., Hahn, J. H., Koo, B. S., Lee, G. B., Kim, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Kim, J. H., Jung, C. H., Koh, N. H., Seo, J. S. e Go, S. J. (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res*, **33**, 577-86.
- Lee, S. W., Han, S. W., Sririyanum, M., Park, C. J., Seo, Y. S. e Ronald, P. C. (2009) A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*, **326**, 850-3.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., Burley, S. K., Almo, S. C. e Mekalanos, J. J. (2009) Type VI secretion apparatus and phage

tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 4154-9.

Li, J., Wolf, S. G., Elbaum, M. e Tzfira, T. (2005) Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol*, **13**, 295-8.

Lindeberg, M. e Collmer, A. (2009) Gene Ontology for type III effectors: capturing processes at the host-pathogen interface. *Trends Microbiol*, **17**, 304-11.

Linderoth, N. A., Model, P. e Russel, M. (1996) Essential role of a sodium dodecyl sulfate-resistant protein IV multimer in assembly-export of filamentous phage. *J Bacteriol*, **178**, 1962-70.

Lipari, G. e Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J Am Chem Soc*, **104**, 4546-59.

Llosa, M., Roy, C. e Dehio, C. (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol*, **73**, 141-51.

Llosa, M., Zupan, J., Baron, C. e Zambryski, P. (2000) The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J Bacteriol*, **182**, 3437-45.

Locali-Fabris, E. C., Freitas-Astua, J., Souza, A. A., Takita, M. A., Astua-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Rodrigues, V., Targon, M. L. e Machado, M. A. (2006) Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. *J Gen Virol*, **87**, 2721-9.

Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, De Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. e Richardson, D. C. (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins*, **50**, 437-50.

Ma, A. T., Mcauley, S., Pukatzki, S. e Mekalanos, J. J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe*, **5**, 234-43.

Machon, C., Rivas, S., Albert, A., Goni, F. M. e De La Cruz, F. (2002) TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J Bacteriol*, **184**, 1661-8.

Macomber, R. S. (1998) A complete introduction to modern NMR spectroscopy. Nova York: John Wiley & Sons.

Main, E. R. e Jackson, S. E. (1999) Does trifluoroethanol affect folding pathways and can it be used as a probe of structure in transition states? *Nat Struct Biol*, **6**, 831-5.

Malek, J. A., Wierzbowski, J. M., Tao, W., Bosak, S. A., Saranga, D. J., Doucette-Stamm, L., Smith, D. R., Mcewan, P. J. e Mckernan, K. J. (2004) Protein interaction mapping on a functional shotgun sequence of *Rickettsia sibirica*. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1059-64.

- Mazar, J. e Cotter, P. A. (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol*, **15**, 508-15.
- Mccoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. e Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, **40**, 658-674.
- Mccullen, C. A. e Binns, A. N. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 101-27.
- Middleton, R., Sjolander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J. e Zambryski, P. (2005) Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1685-90.
- Moraes, T. F., Spreter, T. e Strynadka, N. C. (2008) Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 258-66.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M. R., Guerri, J. e Pena, L. (2008) Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol*, **9**, 251-68.
- Moseley, H. N., Sahota, G. e Montelione, G. T. (2004) Assignment validation software suite for the evaluation and presentation of protein resonance assignment data. *J Biomol NMR*, **28**, 341-55.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordonez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. e Mekalanos, J. J. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, **312**, 1526-30.
- Mulder, F. A., Schipper, D., Bott, R. e Boelens, R. (1999) Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline Bacillus subtilisins. *J Mol Biol*, **292**, 111-23.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. e Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **53**, 240-55.
- Nagai, H., Cambronne, E. D., Kagan, J. C., Amor, J. C., Kahn, R. A. e Roy, C. R. (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/lcm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 826-831.
- Neves, M. F., Lopes, F. F., Rossi, R. M. e Melo, P. A. (2004) Metodologias de análise de cadeias agroindustriais: aplicação para citros. *Rev Bras Frutic Jaboticabal*, **26**, 468-473.
- Nodet, G. e Abergel, D. (2007) An overview of recent developments in the interpretation and prediction of fast internal protein dynamics. *Eur Biophys J*, **36**, 985-93.

Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A. e Pugsley, A. P. (1999) Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8173-7.

Ochiai, H., Inoue, V., Takeya, M., Sasaki, A. e Kaku, H. (2005) Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, **39**, 275-287.

Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M. N., Russel, M. e Darst, S. A. (2003) Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*, **325**, 461-70.

Otwinowski, Z. e Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A*, **276**, 307-326.

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. e Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4**, 2411-23.

Paschos, A., Patey, G., Sivanesan, D., Gao, C., Bayliss, R., Waksman, G., O'callaghan, D. e Baron, C. (2006) Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7252-7.

Pascon, R. C., Kitajima, J. P., Breton, M. C., Assumpcao, L., Greggio, C., Zanca, A. S., Okura, V. K., Alegria, M. C., Camargo, M. E., Silva, G. G., Cardozo, J. C., Vallim, M. A., Franco, S. F., Silva, V. H., Jordao, H., Jr., Oliveira, F., Giachetto, P. F., Ferrari, F., Aguilar-Vildoso, C. I., Franchiscini, F. J., Silva, J. M., Arruda, P., Ferro, J. A., Reinach, F. e Da Silva, A. C. (2006) The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLV-C). *Virus Genes*, **32**, 289-98.

Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P. e Saier, M. H., Jr. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, **149**, 3051-72.

Pell, L. G., Kanelis, V., Donaldson, L. W., Howell, P. L. e Davidson, A. R. (2009) The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 4160-5.

Pflugrath, J. W. (1999) The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1718-25.

Planet, P. J., Kachlany, S. C., Desalle, R. e Figurski, D. H. (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2503-8.

Postle, K. e Larsen, R. A. (2007) TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals*, **20**, 453-65.

- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D. e Mekalanos, J. J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 15508-13.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. e Mekalanos, J. J. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1528-33.
- Pukatzki, S., Mcauley, S. B. e Miyata, S. T. (2009) The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 11-7.
- Pulliaainen, A. T. e Dehio, C. (2009) *Bartonella henselae*: subversion of vascular endothelial cell functions by translocated bacterial effector proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 507-10.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., Lu, L. F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D. J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B. L., Zeng, S., Gu, W. Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G. P., Tang, J. L. e He, C. (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res*, **15**, 757-67.
- Rabel, C., Grahn, A. M., Lurz, R. e Lanka, E. (2003) The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J Bacteriol*, **185**, 1045-58.
- Rambow-Larsen, A. A., Petersen, E. M., Gourley, C. R. e Splitter, G. A. (2009) *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol*, **17**, 371-7.
- Ranjbar, B. e Gill, P. (2009) Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des*, **74**, 101-20.
- Rashkova, S., Spudich, G. M. e Christie, P. J. (1997) Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. *J Bacteriol*, **179**, 583-91.
- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R., Blua, M. J., Mizell, R. F., 3rd e Andersen, P. C. (2004) The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol*, **49**, 243-70.
- Rehm, T., Huber, R. e Holak, T. A. (2002) Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure*, **10**, 1613-8.
- Remaut, H. e Waksman, G. (2006) Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem Sci*, **31**, 436-44.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P. S., Questa, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A. e Marano, M. R. (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 1222-30.

- Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M. e Mark, A. E. (2002) Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12179-84.
- Romer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. e Lahaye, T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, **318**, 645-8.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. e Studier, F. W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**, 125-35.
- Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. e Leiman, P. G. (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 171-80.
- Ruckert, M. e Otting, G. (2000) Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments. *J Am Chem Soc*, **122**, 7793-7.
- Rule, G. S. e Hitchens, T. K. (2006) Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. Focus on Structural Biology. Dordrecht, Holanda: Springer.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J. e Christie, P. J. (2001a) Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol*, **183**, 5813-25.
- Sagulenko, V., Sagulenko, E., Jakubowski, S., Spudich, E. e Christie, P. J. (2001b) VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. *J Bacteriol*, **183**, 3642-51.
- Salzberg, S. L., Sommer, D. D., Schatz, M. C., Phillippy, A. M., Rabinowicz, P. D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A. L., Kelley, D., Madupu, R., Puiu, D., Radune, D., Shumway, M., Trapnell, C., Aparna, G., Jha, G., Pandey, A., Patil, P. B., Ishihara, H., Meyer, D. F., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R., Dow, J. M., Ryan, R. P., Hirata, H., Tsuyumu, S., Won Lee, S., Seo, Y. S., Sriariyanum, M., Ronald, P. C., Sonti, R. V., Van Sluys, M. A., Leach, J. E., White, F. F. e Bogdanove, A. J. (2008) Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics*, **9**, 204.
- Sambrook, J. e Russel, D. W. (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattler, M., Schleucher, J. e Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **34**, 93-158.
- Savvides, S. N., Yeo, H. J., Beck, M. R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R. e Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J*, **22**, 1969-80.
- Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*, **1**, 16-22.

- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C. e Baron, C. (1999a) Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, **181**, 7485-92.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N. e Baron, C. (1999b) TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 5563-71.
- Schroder, G. e Dehio, C. (2005) Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol*, **13**, 336-42.
- Schroder, G. e Lanka, E. (2005) The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*, **54**, 1-25.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T. A., Schmid, M. C., Schroder, G., Vergunst, A. C., Carena, I. e Dehio, C. (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 856-61.
- Shamaei-Tousi, A., Cahill, R. e Frankel, G. (2004) Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. *J Bacteriol*, **186**, 4796-801.
- Shin, S. e Roy, C. R. (2008) Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, **10**, 1209-20.
- Shirasu, K. e Kado, C. I. (1993) Membrane location of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett*, **111**, 287-94.
- Shrivastava, R. e Miller, J. F. (2009) Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 88-93.
- Shrivastava, S. e Mande, S. S. (2008) Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. *PLoS One*, **3**, e2955.
- Simon, K., Xu, J., Kim, C. e Skrynnikov, N. R. (2005) Estimating the accuracy of protein structures using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR*, **33**, 83-93.
- Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C., Finlay, B. B., Baker, D., Miller, S. I. e Strynadka, N. C. (2009) A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 468-76.
- Spudich, G. M., Fernandez, D., Zhou, X. R. e Christie, P. J. (1996) Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7512-7.
- Stachel, S. E., Nester, E. W. e Zambryski, P. C. (1986) A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 379-383.

- Studier, F. W. e Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-30.
- Suarez, G., Sierra, J. C., Erova, T. E., Sha, J., Horneman, A. J. e Chopra, A. K. (2010) A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol*, **192**, 155-68.
- Tato, I., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., De La Cruz, F. e Cabezon, E. (2007) The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by protein TrwA: implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors. *J Biol Chem*, **282**, 25569-76.
- Tato, I., Zunzunegui, S., De La Cruz, F. e Cabezon, E. (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8156-61.
- Taylor, G. (2003) The phase problem. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 1881-90.
- Terradot, L., Bayliss, R., Oomen, C., Leonard, G. A., Baron, C. e Waksman, G. (2005) Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4596-601.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., Mchardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D. e Kaiser, O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, **187**, 7254-66.
- Thorstenson, Y. R. e Zambryski, P. C. (1994) The essential virulence protein VirB8 localizes to the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, **176**, 1711-7.
- Tjandra, N., Grzesiek, S. e Bax, A. (1996) Magnetic field dependence of nitrogen-proton J splittings in N-15-enriched human ubiquitin resulting from relaxation interference and residual dipolar coupling. *J Am Chem Soc*, **118**, 6264-72.
- Tokuda, H. e Matsuyama, S. (2004) Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1693**, 5-13.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. e Setubal, J. C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*, **9 Suppl 1**, S2.
- Tusnady, G. E. e Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**, 849-50.
- Tzakos, A. G., Grace, C. R., Lukavsky, P. J. e Riek, R. (2006) NMR techniques for very large proteins and RNAs in solution. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **35**, 319-42.
- Tzfira, T. e Citovsky, V. (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol*, **12**, 121-9.

Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. e Citovsky, V. (2004) *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet*, **20**, 375-83.

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. e Rothberg, J. M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-7.

Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., Mcnicholas, S., Long, F. e Murshudov, G. N. (2004) REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 2184-95.

Vergunst, A. C., Van Lier, M. C., Den Dulk-Ras, A., Stuve, T. A., Ouwehand, A. e Hooykaas, P. J. (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 832-7.

Von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. e Dimroth, P. (2009) Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu Rev Biochem*, **78**, 649-72.

Vorholter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Ruckert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. e Puhler, A. (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol*, **134**, 33-45.

Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J. e Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins*, **59**, 687-96.

Wagner, G., Neuhaus, D., Worgotter, E., Vasak, M., Kagi, J. H. e Wuthrich, K. (1986) Nuclear magnetic resonance identification of "half-turn" and 3(10)-helix secondary structure in rabbit liver metallothionein-2. *J Mol Biol*, **187**, 131-5.

Walsh, M. A., Evans, G., Sanishvili, R., Dementieva, I. e Joachimiak, A. (1999) MAD data collection - current trends. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1726-32.

Wang, Y. A., Yu, X., Silverman, P. M., Harris, R. L. e Egelman, E. H. (2009) The structure of F-pili. *J Mol Biol*, **385**, 22-9.

Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R. e Zambryski, P. C. (2002) Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11493-500.

Wengelnik, K. e Bonas, U. (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, **178**, 3462-9.

- White, F. F., Potnis, N., Jones, J. B. e Koebnik, R. (2009) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol*, **10**, 749-66.
- Wishart, D. S. e Sykes, B. D. (1994) The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J Biomol NMR*, **4**, 171-80.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. e Richards, F. M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol*, **222**, 311-33.
- Xu, Q. e Keiderling, T. A. (2005) Trifluoroethanol-induced unfolding of concanavalin A: equilibrium and time-resolved optical spectroscopic studies. *Biochemistry*, **44**, 7976-87.
- Yang, Z. R., Thomson, R., Mcneil, P. e Esnouf, R. M. (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics*, **21**, 3369-76.
- Yao, J., Dyson, H. J. e Wright, P. E. (1997) Chemical shift dispersion and secondary structure prediction in unfolded and partly folded proteins. *FEBS Lett*, **419**, 285-9.
- Yeo, H. J., Savvides, S. N., Herr, A. B., Lanka, E. e Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell*, **6**, 1461-72.
- Yeo, H. J., Yuan, Q., Beck, M. R., Baron, C. e Waksman, G. (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15947-52.
- Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K. A., Hoppner, C., Krall, L., Domke, N. e Baron, C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem*, **280**, 26349-59.
- Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckstuhl, C., Zarfel, G. E. e Koraimann, G. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology*, **151**, 3455-67.
- Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D. e Zambryski, P. (2007) VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, **189**, 6551-63.
- Zweckstetter, M. e Bax, A. (2000) Prediction of sterically induced alignment in a dilute liquid crystalline phase: Aid to protein structure determination by NMR. *J Am Chem Soc*, **122**, 3791-2.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Diorge Paulo de Souza

Local e data de nascimento: Brasília / DF, 02/03/1980.

EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo / SP, 2004-presente.
Doutorando em Bioquímica, sob orientação do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah.

Universidade de Brasília (UnB), Brasília / DF, 2003.
Bacharel em Ciências Biológicas.

Centro de ensino Setor Oeste, Brasília / DF, 1997.
Ensino médio.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Participação no curso: “NMR in Structural Biology - from cloning to NMRPipe applications”. Campinas - Brasil, 1-3/07/2009.

Participação no curso: “Intermolecular Interactions by NMR”. Rio de Janeiro - Brasil, 1-2/05/2009.

Participação no curso: “EMBO course - X-ray Crystal Structure Determination of Macromolecules”. Saint Aubin - França, 14-20/09/2008.

Participação no curso: “Protein Assignment Strategies using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Estrategias de Asignación de Proteínas en Solución Mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear”. Rosário - Argentina, 26/11-5/12/2007.

Participação no curso: “RMN Aplicada a Determinação Estrutural”. Rio de Janeiro - Brasil, 07-09/02/2007.

Participação no curso: “Teoria Básica de RMN”. Rio de Janeiro - Brasil, 01-06/02/2007.

Participação no curso: “Introdução a Ressonância Magnética (Multi) Nuclear”. Rio de Janeiro - Brasil, 29-31/01/2007.

Participação no curso: “RMN de Biomoléculas e Modelagem Molecular”. São Paulo - Brasil, 11-15/09/2006.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CNPq, 05/2004 – 04/2009.

Bolsista de DTI-7H, CNPq, 07/2003 – 03/2004.

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq, 07/2000 – 06/2002.

PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Segundo melhor trabalho de doutorado em RMN, X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética (2008). Associação de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear (AUREMN).

Prêmio melhor poster ("SBBq award"), XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e XI Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (2008). Título do trabalho: "Solution Structure of VirB7 from *Xanthomonas citri* Type IV Secretion System and its Interactions with VirB9".

Primeiro lugar na prova de admissão da pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química/USP, 1º/2004.

Melhor trabalho de Biochemistry; Molecular and Cellular Biology, Genetics no VIII International Congress of Paracoccidioidomycoses (2002). Título do trabalho: "Partial transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *P. brasiliensis*", Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Melhor trabalho de iniciação científica, na área de Biologia Molecular, no VIII Congresso de Iniciação Científica da UnB (2002). Título do trabalho: "Clonagem e expressão de anticorpos humanizados anti-CD18 em células de mamíferos", Universidade de Brasília, UnB.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos Completos

SOUZA DP, Silva SS, Baptista AJ, Nicola AM, Kyaw CM, Silva-Pereira I. *Paracoccidioides brasiliensis* translation and protein fate machineries revealed by functional genome analysis. *Genet Mol Res.* (2005); 4(2):273-289.

Alegria MC, SOUZA DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol.* (2005); 187(7):2315-2325.

Albuquerque P, Baptista AJ, Derengowsky Lda S, Procopio L, Nicola AM, Arraes FB, SOUZA DP, Kyaw CM, Silva-Pereira I. *Paracoccidioides brasiliensis* RNA biogenesis apparatus revealed by functional genome analysis. *Genet Mol Res.* (2005); 4(2):251-272.

Felipe MS & Pb Genome Network, incluindo SOUZA DP. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* (2005); 280(26):24706-24714.

Reis VC, Torres FA, Pocas-Fonseca MJ, De-Souza MT, SOUZA DP, Almeida JR, Marinho-Silva C, Parachin NS, Dantas Ada S, Mello-de-Sousa TM, Moraes LM. Cell cycle, DNA replication, repair, and recombination in the dimorphic human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res.* (2005); 4(2):232-250.

Felipe MS & Pb Genome Network, incluindo SOUZA DP. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. (2003); 20(3):263-271.

Resumos em Congressos

SOUZA DP, Salinas RK, Farah CS. Structural studies of Type IV Secretion System proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (2009); I Encontro de Pós-graduação do IQ/USP, São Paulo-Brasil.

Tavares JR, Daghasanli KRP, Cuccovia IM, SOUZA DP, Farah CS, Gueiros-Filho FJ. Interaction of the *B. subtilis* division protein YpsB with membranes. (2009); XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia-Brasil.

SOUZA DP, Salinas RK, Farah CS. A hypothetical protein coded by the Type IV Secretion System of a bacterial phytopathogen combines a VirB7 motif with a signaling domain. (2009); Keystone Symposia Conference: Frontiers of NMR in Biology, Santa Fe-Estados Unidos da América.

SOUZA DP, Farah CS, Salinas RK. A hypothetical protein coded by the Type IV Secretion System of a bacterial phytopathogen combines a VirB7 motif with a signaling domain. (2009); XIX Reunião Anual de Usuários do LNLS (RAU), Campinas-Brasil.

SOUZA DP, Salinas RK, Farah CS. Structural studies of Type IV Secretion System proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (2008); EMBO course - X-ray Crystal Structure Determination of Macromolecules, Saint Aubin-França.

SOUZA DP, Farah CS, Salinas RK. Estrutura em solução e interações da proteína VirB7 codificada pelo Sistema de Secreção do tipo IV de *Xanthomonas citri*. (2008); X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética. Associação de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear (AUREMN), Niterói-Brasil.

SOUZA DP, Farah CS, Salinas RK. Solution structure of VirB7 from *Xanthomonas citri* Type IV Secretion System and its interactions with VirB9. (2008); XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia-Brasil.

SOUZA DP, Salinas RK, Farah CS. Characterization of the VirB7-VirB9 interaction and initial NMR assignment of VirB7 from *Xanthomonas* Type IV Secretion System. (2007); 800 MHz NMR Facility Inauguration Symposia, Rio de Janeiro-Brasil.

SOUZA DP, Salinas RK, Farah CS. Characterization of the VirB7-VirB9 interaction and initial NMR structure determination of VirB7 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* chromosomal Type IV Secretion System. (2007); XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Salvador-Brasil.

SOUZA DP, Andrade MO, Farah CS. Characterization of the interaction between two hypothetical proteins related to the chromosomal Type 4 Secretion System of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (2006); XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia-Brasil.

Caldas CA, SOUZA DP, Rodrigues MT, Maranhão AQ, Moro AM, Brígido MM. Design approach regarding humanization and functionalization of an anti-CD18 monoclonal antibody. (2005); European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Harrogate-UK.

- SOUZA DP, Caldas CA, Coelho V, Maranhão AQ, Brígido MM. FACS Analysis of anti-CD18 humanized FvFc antibodies. (2004); XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia (SBI), Ouro Preto-Brasil.
- Costa PLN, Fonseca AS, SOUZA DP, Caldas CA, Coelho V, Moro AM, Kalil J, Maranhão AQ, Brígido MM. Humanization and binding activity of humanized/murine hybrid anti-CD3 scFvs. (2004); XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu-Brasil.
- Albuquerque P, Nicola AM, SOUZA DP, Pb Genome Network. Análise dos genes relacionados à transcrição, processamento do transcrito, tradução, modificação, e endereçamento de proteínas no transcriptoma do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. (2004); XXIV Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Gramado-Brasil.
- Nicola AM, Pb Genome Network, including SOUZA DP. Análise dos genes relacionados a proteínas de choque térmico no transcriptoma do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. (2004); XXIV Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Gramado-Brasil.
- Torres FAG, Moraes LMP, Poças-Fonseca MJ, De-Souza, MT, SOUZA DP, Pb Genome Network. Replicação, Reparo, Recombinação e ciclo celular no fungo *Paracoccidioides brasiliensis* - Análise do Transcriptoma. (2004); XXIV Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Gramado-Brasil.
- Arraes FB, Pb Genome Network, including SOUZA DP. Metabolic Analysis of the Transcriptome from the Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. (2004); XXIV Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Gramado-Brasil.
- Costa PLN, Fonseca AS, SOUZA DP, Caldas CA, Coelho V, Moro AM, Maranhão AQ, Brígido MM. Humanization and binding activity of humanized murine hybrid anti-CD3 scFvs. (2003); XIX IUBMB World Congress, Montreal – Canadá. *Molecular and Cellular Proteomics*. 9(2):760.
- SOUZA DP, Oliveira GC, Costa CS, Poças-Fonseca MJ, Maranhão AQ, Brígido MM. Construction of a completely humanized IgG1/K antibody anti-CD18 and its expression in mammalian cells. (2003); XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu-Brasil, XXXII: 109.
- Mello-de-Sousa T, Oliveira-Pereira L, SOUZA DP, Costa CS, Maranhão AQ, Brígido MM, Poças-Fonseca MJ. Production of anti-Z-DNA antibody in different mammal cell types. (2003); XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu-Brasil, XXXII: 16.
- Felipe MSS, SOUZA DP, Pb Genome Network. Initial transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. (2003); XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu-Brasil, XXXII: 262.
- SOUZA DP, Oliveira GC, Costa CS, Poças-Fonseca MJ, Maranhão AQ, Brígido MM. Expression of fully humanized antibody fragments in chinese hamster ovary cells. (2003); IV Reunião do Instituto de Investigação em Imunologia (iii), São Roque-Brasil, IV: 52-53.
- Costa PLN, SOUZA DP, Maranhão AQ, Brígido MM. Comparison of hemi-humanized scFv versions of an anti-CD3 antibody. (2003); IV Reunião do Instituto de Investigação em Imunologia (iii), São Roque-Brasil, IV: 34-35.

- Andrade RV, SOUZA DP, Pb Genome Network. Partial transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. (2002); VIII International Congress of Paracoccidioidomycoses, Pirenópolis-Brasil. Annual Review of Biomedical Science, Special Issue, 2002. VIII: 60.
- SOUZA DP, Pb Genome Network. Identification of retrotransposons elements in the partial transcriptome of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. (2002); VIII International Congress of Paracoccidioidomycoses, Pirenópolis-Brasil. Annual Review of Biomedical Science, Special Issue, 2002. VIII: 63.
- Ruggiero LA, SOUZA DP, Maranhão AQ, Brígido MM. Expression of an anti-Z-DNA antibody as FvFc and hmAb in chinese hamster ovary cells (CHO). (2002); XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia e V Simpósio Internacional em Alergia e Imunologia Clínica, Salvador-Brasil. XXVII: 102.
- Ruggiero LA, SOUZA DP, Kalil J, Coelho V, Moro AM, Maranhão AQ, Brígido MM. Expression of humanized anti-CD18 antibody fragments in chinese hamster ovary cells (CHO-K1). (2002); XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia e V Simpósio Internacional em Alergia e Imunologia Clínica, Salvador-Brasil. XXVII: 162.
- SOUZA DP, Brígido MM, Maranhão AQ. Clonagem e expressão de anticorpos humanizados anti-CD18 em células de mamíferos. (2002); VIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília (UnB), Brasília-Brasil. CD-ROM do VIII Congresso de Iniciação Científica da UnB.
- SOUZA DP, Andrade EV, Maranhão AQ, Brígido MM. Cloning and expression of humanized anti-CD18 FvFc antibodies in *Pichia pastoris*. (2001); XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia, Campos do Jordão-Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34:267.
- Caldas CA, Fonseca AS, Coelho V, Maranhão AQ, SOUZA DP, Moro AM, Brígido MM. Humanization of two single-chain Fv that recognizes human T lymphocytes and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. (2001); XXX Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu-Brasil. XXX: 97.
- SOUZA DP, Brígido MM, Maranhão AQ. Clonagem e expressão de anticorpos FvFc anti-CD18 em *Pichia pastoris*. (2001); VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília (UnB), Brasília-Brasil. VII: 51.
- Lobo TT, Lacava ZGM, Freitas MLL, Garcia VAP, SOUZA DP, Azevedo RB, Moraes PC, DaSilva MF, Busque N. Magnetic fluid induced chromosome alterations on macrophages of hyperimmune mice. (2000); International Conference on Magnetism – ICM2000, Recife-Brasil. 139-140.
- Lacava ZGM, Garcia VAP, Freitas MLL, Lacava LM, Lobo TT, Lion MB, SOUZA DP, Silva LP, Azevedo RB, DaSilva MF, Moraes PC, Busque N. (1999); Biological effects of magnetic anticancer-drug precursors. (1999); IV Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. Genetics and Molecular Biology, 22:52.