"ESTUDOS DE DUAS ENZIMAS DA BACTÉRIA *XYLELLA FASTIDIOSA*, GUMC E GUMK, ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DA GOMA FASTIDIANA"

CELINA DE PIERI

Tese de doutoramento apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva
Co-Orientadora: Prof[a] Dr[a]. Dulce Helena Ferreira de Souza

Ok.

São Carlos
2006

USP/IFSC/SBI
8-2-001727

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

IFSC - SBI
CLASS. Tese
CUTTER.....
TOMBO. 1728

De Pieri, Celina
Estudos de duas enzimas da bactéria Xylella fastidiosa, GumC e GumK, envolvidas na síntese da goma fastidiana. / Celina De Pieri. – São Carlos, 2006.
143p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva
Co- orientadora: Dulce H. Ferreira de Souza
1. GumC e GumK. 2. *Xylella fastidiosa*.
1. Título

UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - CEP 13566-590
Caixa Postal 369 - CEP 13560-970
São Carlos - SP - BRASIL

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **CELINA DE PIERI**, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 17/04/2006.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Glaucius Oliva (Orientador e Presidente)

Dra. Raquel Kely Bortoleto Bugs (UNESP)

Dr. Nelson Arno Wulff (Fundecitrus)

Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter (IB / USP)

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini (IFSC / USP)

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Dedicatória

Aos meus pais, Geraldo de Pieri (in memorian) e Dirce Franceschi de Pieri, por todo o amor e exemplo de vida. Ao meu irmão, Márcio de Pieri, por estar sempre ao meu lado e ao Alexis Sestini, pelo amor e por me apoiar em tudo.

DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Agradecimentos

- A Deus por todas as experiências e vivências em que tenho oportunidade de me melhorar como pessoa;
- Aos meus professores de graduação da Universidade Estadual de Maringá por terem me ensinado toda a base na área das Ciências Biológicas;
- Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, por todo o seu apoio e por ter me iniciado na carreira científica;
- Ao Dr. Marcio Falci, pelo seu apoio e por ter me dado a oportunidade de conhecer o meu orientador Glaucius Oliva;
- Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva, por todo o seu apoio, compreensão e confiança;
- À Profª Drª Dulce Helena Ferreira de Souza pela sua ajuda, por todo o aprendizado adquirido durante todos estes anos, e pelos laços de amizade concretizados nestes anos;
- Ao Prof. Dr. Miroslaw Cygler do Biothecnology Research Institute, Montreal, Canadá, por ter me recebido em seu laboratório com muito carinho, por todo o seu apoio neste projeto e convivência agradável;
- Ao Prof. Dr. Richard Garrat pela seu auxílio amigo e convivência agradável;
- Ao Prof. Otávio Thiemann, pelo auxílio e colaboração neste projeto e pela convivência agradável;
- Às Profªs Drª.Leila Maria Beltramini, Drª Ana Paula Ullian Araújo, Drª Heloísa Selistre de Araújo e ao Prof. Dr. Antônio José da Costa por todo o apoio, colaboração e convivência agradável;
- Ao Prof. Dr. Adriano Andricopulo e à Drª Renata Krogh Andricopulo por toda a sua ajuda, apoio e amizade;
- Aos secretários do Grupo de Cristalografia de Proteínas, Jaciara Bianco, Francisco Fernando Falvo, Luciana Garcia Lavezzo e Thaís Fernanda Monzane por todo o apoio, auxílio e amizade;
- Às secretárias de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos – USP Wladerez A. Gounella Caiado e Cristiane Gomes

DE BIBLIO

Lazarini, por todo o apoio, auxílio e dedicação com que trata todos os alunos;

- À secretária do Biotechnology Research Institute, Suzie Durocher, pelo auxílio na área administrativa durante minha estada no Instituto;
- Aos técnicos do Grupo de Cristalografia e Biofísica: Bianca, Susana, Andressa, Bel, Beth, Augusto, Geraldo, por todo o apoio técnico;
- Aos técnicos do Laboratório de Cristalografia do Biotechnology Research Institute, Alain e Young por todo apoio, ajuda e convivência agradável;
- Aos amigos Valéria e Marcos de Carvalho pelo apoio e atenção prestados durante toda a minha estadia em São Carlos;
- Às minhas grandes amigas Elisangela e Carla pela amizade e pelos grandes conselhos;
- Aos meus amigos do Grupo de Cristalografia e Biofísica de ontem e de hoje: Alexandre, Andressa, André, Antonio, Alécio, Artur, Beth, Bianca, Carol Guzzi, Claudia Alves, Claudia Munti, Débora, Diet, Dulce, Elisandra, Fernando Alessandro, João Renato, Lívia, Marcelo Eugênio, Marcelo Castilho, Marcos Navarro, Maria, Mirella, Monique, Napoleão, Ney, PH, Rafael, Raquel, Renata, Rodrigo, Teresa, e Wanius, que proporcionaram um convívio inesquecível no ambiente profissional e social;
- Às minhas grandes amigas Elisandra e Susana por toda ajuda, apoio e amizade e carinho conquistados durante estes anos;
- Ao IFSC-USP, pela utilização das estruturas e serviços prestados;
- Ao Laboratório e a todos do Grupo de Cristalografia de Proteínas, professores, alunos e técnicos, por todo o grande suporte técnico, físico e intelectual e pela amizade, que fazem deste grupo um grupo único em todos os sentidos. Lembrarei de vocês todos com saudades.
- À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Dedicatória.....iii
Agradecimentos.....iv
Lista de Figuras.....x
Lista de Tabelas.....xiii
Tabela de Abreviaturas.....xiv
Resumo.....xv
Abstract.....xvi

Capítulo 1 INTRODUÇÃO
1.0) Introdução..... 1
1.1) Clorose Variegada de Citrus..... 2
1.2) A bactéria *Xylella Fastidiosa*..... 5
1.3) Alguns mecanismos propostos para a patogenicidade da bactéria *X. fastidiosa*..... 6
1.4) A estrutura da goma fastidiana é semelhante a da goma xantana..... 9
1.5) As proteínas estudadas: *GumK* e *GumC*..... 17
1.6) Referências Bibliográficas..... 18

Capítulo 2 OBJETIVOS
2.1) Objetivos específicos..... 22
2.2) Referências Bibliográficas..... 24

Capítulo 3 MATERIAIS E MÉTODOS
3.1) Enzima *GUMC*..... 25
3.1.1) Clonagem do gene *gumc* no vetor de expressão pMALc-2x e testes de expressão da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 25
3.1.1.1) Otimização do procedimento de obtenção da proteína recombinante *GUMC*-MBP..... 26
3.1.2) Lise celular..... 27
3.1.3) Purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 27
3.1.4) Caracterização da proteína de Fusão *GumC*-MBP..... 30
3.1.4.1) Experimentos de Dicroísmo Circular (Circular Dicroism – CD)..... 30
3.1.4.1.1) Dicroísmo Circular (CD – Circular Dichroism)..... 30
3.1.4.2) Produção de anticorpos..... 32
3.1.4.2.1) Caracterização da proteína *GumC*-MBP através de Western Blotting. 33
3.1.5) Testes de cristalização da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 34
3.1.6) Estudos de estabilidade da proteína *GumC*-MBP através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz..... 36
3.1.6.1) Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)..... 36

3.1.6.2) Realização de novos testes de cristalização após estudos de estabilidade 39
3.1.7) Obtenção e caracterização da proteína *GumC* (livre da fusão) 40
3.1.7.1) Clivagem da proteína fusão *GumC*-MBP com o Factor-Xa 40
3.1.7.2) Otimização da clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP 40
3.1.8) Purificação da enzima *GumC* após clivagem com o Factor Xa 40
3.1.9) Caracterização da enzima *GumC* 42
3.1.9.1) Sequenciamento N-terminal da enzima *GumC* 42
3.1.9.2) Caracterização da proteína *GumC* através de Western Blotting 42
3.1.9.3) Determinação da Massa molecular da enzima *GumC* 43
3.1.9.4) Caracterização da enzima *GumC* quanto ao seu enovelamento por Dicroísmo Circular 43
3.1.10) Testes de cristalização com a proteína *GumC* 44
3.1.11) Estudos de modelagem da enzima *GumC* 44
3.1.11.1)- Ferramentas utilizadas em Modelagem Molecular 44
3.1.11.2)- Programa 'Threader' 45
3.1.11.3)- Escolha do molde e alinhamento das estruturas 46
3.1.11.4)- Modelagem molecular 46
3.1.11.5)- Avaliação do modelo 47
3.1.12) Minimização da molécula da proteína *GumC* visando aumento de solubilidade/ estabilidade 49
3.1.12.1) Construção do gene *gumc* (sem as extremidades N- e C-terminal originais) no vetor de expressão pMALc-2X e pET29a 49
3.1.12.2) Subclonagem das diversas construções do gene *gumc* no vetor de clonagem pGEM-T 54
3.1.12.3) Transformação em cepas de *E. coli* DH5α dos produtos das ligações... 55
3.1.12.4) Extração dos DNAs Plasmidiais das diferentes construções *gumc-pGEM-T* e ligação destas nos seus respectivos vetores de expressão 55
3.1.12.5) – Sequenciamento de DNA 57
3.1.12.6) Expressão das proteínas de fusão *GumC*-MBP modificadas C5, C8 e C9 no vetor de expressão pMALc-2X 58
3.1.12.7) Lise celular 58
3.1.12.8) Ensaios de purificação das proteínas modificadas *GumC* 59
3.1.12.9) Caracterização da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 através de dicroísmo circular 59
3.1.12.10) Clivagem da proteína *GumC* modificada C5 com Factor Xa 60
3.2) Enzima Glicosiltransferase IV (*GUMK*) 60
3.2.1)- Clonagem do gene gumk no vetor pMALc-2x e transformação em cepa de *E.coli* BL21(DE3) do gene *gumk* 60
3.2.2) Expressão da proteína de fusão *GumK*-MBP 61
3.2.3) Lise celular 61
3.2.4) Purificação da proteína de fusão *GumK*- MBP 62
3.2.4.1) Cromatografia de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow 62
3.2.4.2) Precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com Sulfato de amônio(S.A.) 63
3.2.5) Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP 63

3.2.5.1)Caracterização da proteína *GumK*-MBP através de imunoblotting..... 63
3.2.5.2) Caracterização da proteína de Fusão *GumK*-MBP quanto ao enovelamento..... 64
3.2.6) Testes de cristalização com a proteína de fusão *GumK*-MBP..... 64
3.2.7) Clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP com a enzima Factor Xa..... 65
3.2.8) Purificação de proteína *GumK*..... 65
3.2.9) Testes de cristalização com a proteína *GumK*..... 66
3.3) Referências Bibliográficas..... 67

Capítulo 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES – ENZIMA *GUMC*

4.1) Clonagem do gene *gumc* e expressão da proteína *GumC*..... 69
4.2) Otimização do procedimento de obtenção da proteína recombinante *GumC*-MBP..... 71
4.3) Purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 73
4.3.1) Cromatografias de Filtração a Gel e Troca Aniônica..... 74
4.3.2) Precipitação da proteína de fusão *GumC*-MBP com Sulfato de Amônio... 76
4.3.3) Cromatografia em coluna de Hidroxiapatita..... 76
4.4) Caracterização da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 78
4.4.1) Experimentos de Dicroísmo Circular..... 78
4.4.2) Produção de anticorpos anti-*GumC*-MBP..... 79
4.4.2.1) Caracterização da proteína *GumC*-MBP através de Imunoblotting..... 80
4.5) Testes de cristalização da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 81
4.6) Estudos de estabilidade da proteína *GumC*-MBP através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz..... 85
4.7) Obtenção e caracterização da proteína *GumC* (livre da fusão)..... 92
4.7.1) Testes de clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP com a enzima Factor Xa..... 93
4.7.2) Purificação da enzima *GumC* após clivagem com o Factor Xa..... 94
4.7.2.1) Cromatografia de Hidroxiapatita..... 94
4.7.2.2) Cromatografia de Afinidade (Amilose)..... 96
4.7.2.3) Cromatografia de Filtração a Gel..... 96
4.7.2.4) Cromatografia de hidrofobicidade em resina Phenil sepharose..... 97
4.7.2.5) Cromatografia de Troca Iônica..... 98
4.7.3) Caracterização da enzima *GumC*..... 102
4.7.3.1) Seqüenciamento do N-terminal da proteína *GumC*..... 102
4.7.3.2) Caracterização da enzima *GumC* através de Imunoblotting..... 102
4.7.3.3) Determinação da massa molecular da *GumC*..... 103
4.7.3.4) Caracterização da enzima *GumC* quanto ao seu enovelamento por Dicroísmo Circular..... 104
4.8) Estudos de modelagem da enzima *GumC*..... 106
4.9) Minimização da molécula da proteína visando aumento de solubilidade/ estabilidade..... 112
4.9.1) Testes de expressão e purificação das proteínas *GumC* modificadas - gene *gumc* modificado (Construções C5, C8 e C9)..... 119
4.9.2) Caracterização da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 através

de dicroísmo circular..... 122
4.9.3) Clivagem da proteína *GumC* modificada C5 com Factor Xa..... 123
4.10) Referências Bibliográficas..... 125

Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES DA ENZIMA Glucuronosiltransferase – *GUMK*
5.1) Clonagem, expressão e purificação da proteína de fusão *GumK*-MBP..... 127
5.1.1) Cromatografia de troca iônica..... 129
5.1.2) Precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com Sulfato de amônio (S.A.)..... 129
5.2) Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP..... 131
5.2.1) Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP por imunoblotting..... 131
5.2.2) Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP quanto ao enovelamento..... 132
5.3) Testes de cristalização com a proteína de fusão *GumK*-MBP..... 133
5.4) Testes de clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP com a enzima Factor Xa..... 136
5.5) Purificação da proteína *GumK*..... 138
5.6) Testes de cristalização com a proteína *GumK*..... 139
5.7) Referências Bibliográficas..... 141

Capítulo 6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... 142

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1.1 e 1.2 – Microscopia eletrônica da *Xyllela fastidiosa* infectando o xilema de uma laranjeira (fotos de Marcos A Machado e Francisco Laranjeira, extraídas do site: www.fundecitrus.com.br)..... 3

Figuras 1.3, 1.4 e 1.5 – Fotos de folhas e frutos de plantas infectadas pela *Xylella fastidiosa* (fotos extraídas do site www.fundecitrus.com.br)..... 4

Figuras 1.6 e 1.7 – Fotos de frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido a doença CVC, causada pela bactéria X. Fastidiosa (fotos extraídas do site: www.fundecitrus.com.br)..... 4

Figura 1.8) – Mecanismo proposto de biossíntese da goma fastidiana (modificado segundo Silva *et al*, 2001)..... 13

Figura 1.9 – Esquema mostrando a formação do tetrassacarídeo..... 15

Figura 1.10 – Esquema mostrando a polimerização da goma fastidiana..... 15

Figura 3.1 – Esquema mostrando a escala de tempos e temperaturas utilizadas no PCR. 54

Figura 4.1 - Gel SDS-PAGE a 15% do processo de purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP na coluna amilose..... 70

Figura 4.2 – Gel SDS-PAGE a 15% da expressão da proteína de fusão *GumC*-MBP em diferentes temperaturas..... 71

Figura 4.3 – Gel de SDS-PAGE a 15% do processo de purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP na coluna de amilose, após adição de Triton X-100 no tampão de lise celular..... 73

Figura 4.4 – Gel de SDS PAGE 15% mostrando a cromatografia de filtração a gel Superose 12 da fusão *GumC*-MBP..... 75

Figura 4.5 – Gel SDS-PAGE a 15% do processo de purificação da proteína *GumC*-MBP em cromatografia de troca aniônica DEAE sepharose..... 76

Figura 4.6 – Perfil cromatográfico da coluna de hidroxiapatita, mostrando eluição da proteína de fusão *GumC*-MBP..... 77

Figura 4.7 – Gel SDS PAGE 15% da purificação da fusão *GumC*-MBP em coluna de hidroxiapatita..... 78

Figura 4.8 – Espectro de Dicroísmo Circular da proteína de fusão *GumC*-MBP com varredura de 190 a 250nm..... 79

Figura 4.9 – Membrana de nitrocelulose mostrando a titulação do anticorpo anti-*GumC*-MBP..... 80

Figura 4.10 – Membrana de nitrocelulose mostrando a reação do antígeno *GumC*-MBP com o anticorpo anti-MBP..... 81

Figura 4.11 – Gel SDS- PAGE a 15% mostrando a amostra concentrada contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP utilizada em experimentos de cristalização..... 81

Figura 4.12 – Fotos das condições 7 do Fatorial II (á esquerda) e 23 do Fatorial I (á direita) mostrando o crescimento de cristal e estruturas não amorfas, respectivamente.... 82

Figura 4.13 e 4.14 – Resultados da medida de DLS para a proteína *GumC*-MBP após a eluição da coluna de amilose sem adição de aditivos e com adição do detergente do screen I da Hampton, 1-s-Octyl-β-D-thioglucoside, respectivamente..... 87

Figuras 4.15 e 4.16 – Resultados da medida de EDL para a proteína *GumC*-MBP com o detergente CTAB (Cetyltrimethylalmmonium bromide) do Screen I e com o

detergente Anapoe 58 do Screen II, ambos do Kit de detergentes da Hampton, respectivamente 88

Figura 4.17 e 4.18 - Resultados da medida de EDL para a proteína *GumC*-MBP com adição do detergente Pluronic F-68 do screen II, do kit de detergentes da Hampton e com o detergente Triton X-100, respectivamente 89

Figuras 4.19 e 4.20 – Resultados da medida de EDL para a proteína de fusão *GumC*-MBP após adição do detergente Anapoe $C_{12}E_{10}$ (polyoxyethylene(10)dodecyl ether) do screen II e do detergente thesit do Screen III do kit de detergentes da Hampton, respectivamente 90

Figuras 4.21 – Resultados da medida de EDL para a proteína de fusão *GumC*-MBP após adição do detergente n-Octyl-β-D-thioglucoside do Screen III do Kit de Detergentes da Hampton 91

Figura 4.22 – Gel SDP-PAGE a 15% da clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP com Factor Xa em diferentes proporções Factor Xa: *GumC*-MBP 93

Figura 4.23 - Gel SDS PAGE a 15% da otimização da clivagem com o Factor-Xa 94

Figura 4.24 – Perfil cromatográfico da coluna de hidroxiapatita, durante a purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP 95

Figura 4.25 – Gel SDS-PAGE a 15% da cromatografia em coluna de Hidroxiapatita 96

Figura 4.26 – Perfil cromatográfico da coluna Phenil sepharose, durante purificação da enzima *GumC* 98

Figura 4.27 – Gel SDS-PAGE a 15% mostrando a cromatografia da enzima *GumC* em coluna phenil sepharose HP 98

Figura 4.28 – Gel SDS-PAGE a 15% da cromatografia de troca aniônica Q sepharose da solução proteica após clivagem do Factor Xa 99

Figura 4.29 – Gel SDS-PAGE a 15% mostrando as cromatografias de troca iônica Q e CM sepharose respectivamente em tampão fosfato 100

Figura 4.30 – Perfil cromatográfico da coluna Q sepharose FF mostrando a eluição da enzima *GumC* no void (primeiro pico) 101

Figura 4.31 – Gel SDS PAGE 15% da purificação da enzima *GumC* 102

Figura 4.32 - Western-blotting das reações dos anticorpos anti-*GumC*-MBP e anti-MBP com os antígenos *GumC*-MBP e *GumC* 103

Figura 4.33 – Espectro de dicroísmo Circular (CD) da enzima *GumC* com varredura de 190 a 250 nm 105

Figura 4.34 – Esquema mostrando a predição de estrutura secundária para a enzima *GumC* feita pelo programa PsiPred 108

Figura 4.35– Resultado da predição, feita pelo programa TMHMM, de regiões transmembrânicas para a enzima *GumC* (em vermelho) 114

Figura 4.36 — Esquema das construções para o gene *gumc* mostrando as diferentes regiões que foram retiradas das extremidades 5' e ou 3' (em vermelho observamos as regiões transmembrânicas preditas pelo programa TMHMM) 115

Figura 4.37 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação do gene *gumc* construções C1 a C7 116

Figura 4.38 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação do gene *gumc* construções C8 e C9 116

Figura 4.39 – Gel de agarose mostrando análise de retrição do gene *gumc* (construções de C1 a C7, respectivamente) após digestão das construções *gumc*C1-pGEM a

*gumc*C7-pGEM, respectivamente..... 117
Figura 4.40 – Gel de agarose mostrando análise de restrição do gene *gumc* (construções C8 e C9) após digestão das construções *gumc*C8-pGEM e *gumc*C9-pGEM..... 118
Figura 4.41 – Gel de agarose a 1% do gene *gumc*, construção C5 no vetor de expressão pMALc-2x (*gumc*C5-pMALc-2X)..... 118
Figura 4.42 – Gel de agarose a 1% mostrando o gene *gumc* das construções C8 e C9 no vetor de expressão pMALc-2x (*gumc*-pMALc-2X)..... 119
Figura 4.43- Gel SDS-PAGE a 12,5% da expressão (em células de *E. coli* BL21 (DE3) e purificação da proteína de fusão modificada *GumCC8*-MBP em coluna de amilose..... 120
Figura 4.44- Gel SDS-PAGE a 12,5% da expressão (em células de *E. coli* BL21 (DE3) e purificação da proteína de fusão *GumCC9*-MBP em coluna de amilose..... 120
Figura 4.45- Gel SDS-PAGE a 15% da expressão (em células de *E. coli* (DH5α) e purificação da proteína *GumCC5*-MBP em coluna de amilose..... 121
Figura 4.46 - Espectro de dicroísmo Circular (CD) da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 com varredura de 190 a 250 nm..... 122
Figura 4.47 – Gel SDS PAGE a 10% da clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 com a enzima Factor Xa em diferentes tempos..... 123
Figura 5.1 - Gel SDS-PAGE 10 % da purificação da proteína de fusão *GumK*-MBP em coluna de amilose..... 128
Figura 5.2 – Gel SDS PAGE a 15% da precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com sulfato de amônio..... 130
Figura 5.3 - Gel SDS PAGE a 15% da precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com sulfato de amônio..... 130
Figura 5.4 – Gel de SDS-PAGE a 10% do processo de precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com sulfato de amônio..... 131
Figura 5.5 - Western blotting da reação do anticorpo anti-MBP com o antígeno *GumK*-MBP..... 132
Figura 5.6 - Espectro de Dicroísmo Circular (CD) da proteina de fusão *GumK*-MBP com varredura de 190 a 250 nm..... 133
Figura 5.7 - Gel SDS-PAGE 10 % da proteína de fusão *GumK*-MBP utilizada nos testes de cristalização..... 134
Figura 5.8 - Formação de microcristais da proteina de fusão *GumK*-MBP..... 135
Figura 5.9 - Formação de cristais em forma de "cluster" em agulhas da proteína de fusão *GumK*-MBP..... 136
Figura 5.10 - Gel SDS-PAGE 15 % dos testes de clivagem da fusão *GumK*-MBP com factor-Xa com porcentagens diferentes de SDS..... 137
Figura 5.11 - Gel SDS-PAGE 15 % da clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP..... 138
Figura 5.12 - Gel SDS-PAGE 15 % da cromatografia de troca catiônica Poros 20 HS... 139
Figura 5.13 - Testes de cristalização com a proteína *GumK*..... 140

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Resultado da busca realizada pelo programa GenThreader. As proteínas encontradas foram a 1CUN (α-espectrina de cerebro de galinha, 1YC9 (Vce da bactéria *Vibrio cholerae*), 1S35 (Espectrina eritróide humana) e 1QUU (α-actina humana)..... 109

Tabela 4.2 – Valores de 'Score' 3D obtidos através do programa Verify 3D para os modelos *GumC* Modelos 1 e 2..... 112

Tabela 5.1 – Tabela mostrando as condições em que hove a formação de microcristais ou cristais em forma de agulha da proteína de fusão *GumK*-MBP..... 135

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Arg – Arginina
Anapoe $C_{12}E_{10}$ – polyoxyethylene(10)dodecyl ether
BCIP – 5-bromo-4 cloro-3 indolil fosfato
CAPS – 3-cyclohexylamino-1 butanesulfonic acid
CD – Dicroísmo Circular
CMC – Critical Micellar Concentration
Corante Ponceau - 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenyllazo) phenyllazo]-2:7-naphthalenedisulfonic acid
CVC – Clorose Variegada de Citrus
CTAB – Cetyltrimethylammoniumbromide
dNTP – Desoxirribonucleicos
ddNTP – Desoxirribonucleicos que não apresentam a hidroxila no carbono 3
D.O. – Densidade Ótica
EDL – Espalhamento dinâmico de luz
EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EPS – Exopolissacarídeo
Factor-Xa – protease de plasma bovino que cliva após a Arg na sequência de aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg
Glu – Glutamina
Gly – Glicina
Hi Trap DEAE Sepharose Fast Flow – Coluna de troca aniônica fraca
Hi Trap – CM Sepharose Fast Flow – Coluna de troca catiônica fraca
Hi Trap Q Sepharose Fast Flow – Coluna de troca aniônica forte
IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosida
Ile – Isoleucina
kDa – QuiloDalton
LB – Luria Bertani
Mes – Ácido 2-Morfolinoetanosulfônico monohidratado
MW – " Mass Weight", massa molecular
NTB – Nitroblue de tetrazólio
pb – Pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pI – Ponto isoelétrico
Pluronic F-68 – Block Copolymer Surfactant
PVDF – "Polivinylidene Fluoride"
RMS – Desvio médio quadrático
rpm – Rotações por minuto
SDS- Detergente dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Stop codon – trinca de nucleotídeos terminador
TAE – tampão composto por Tris acetato e EDTA
TBS – "Tris buffered saline"
Thesit – dodecilpoli (ethilenoglicoleter)$_n$ n = 9
Tris – Hidroximetil-aminometano
Triton X-100 - t-octylphenoxyethoxyethanol
Tween-20 - polyoxyethylenesorbitan monolaurate

RESUMO

A bactéria *Xylella fastidiosa* tem sido associada com doenças economicamente importantes como a clorose variegada de citros (CVC) em citros no Brasil e a doença de Pierce em videiras nos Estados Unidos (Hopkins, 1989 e Purcell *et al.*, 1997). A importância econômica da indústria de citricultura no Brasil e o grande prejuízo causado pela CVC em pomares brasileiros têm resultado em um extensivo programa de pesquisa que começou com o sequenciamento do genoma completo da *X. Fastidiosa* (Simpson., *et al* 2000). A bactéria é transmitida por insetos conhecidos como "cigarrinhas" que se alimentam da seiva do xilema. O principal efeito da doença é o surgimento de manchas amarelas nas folhas que progridem para toda a extensão levando-a à necrose. Os frutos de plantas infectadas são pequenos (representando 1/3 do tamanho de um fruto normal), apresentam casca dura e são impróprios para o consumo. Esta bactéria apresenta em seu genoma um Operon contendo 9 genes (B,C,D,E,F,H,J,K,M) responsáveis pela biossíntese do exopolissacarídeo denominado goma fastidiana, que pode estar envolvido na sua patogenicidade. No presente trabalho temos como objetivo estudar as enzimas *GUMC*, que provavelmente está envolvida na etapa de polimerização e/ou secreção do polissacarídeo formado através da membrana da bactéria, e *GUMK*, uma glucuronosiltransferase ou glicosiltransferase IV, que adiciona uma molécula de ácido glicurônico à molécula da manose para a formação do tetrassacarídeo (manose-α-1,3- glucose-β-1,4-glucose-P-P-polyprenol). O gene *gumC* foi clonado no vetor de expressão pMALc-2x, a proteína de fusão *GUMC-MBP* foi expressa com uma massa molecular calculada de 98kDa e foi purificada através de coluna de afinidade. A proteína de fusão foi caracterizada pela reação com o anticorpo anti-MBP por imunoblotting. Através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL), foram realizados estudos de agregação com a proteína de fusão *GUMC-MBP*. Ensaios de cristalização foram realizados e microcristais da proteína de fusão *GUMC-MBP* foram obtidos. Após a clivagem da proteína de fusão com a enzima Factor Xa, a enzima GUMC foi separada através da cromatografia de troca aniônica. A massa molecular da enzima foi determinada através da cromatografia de filtração em gel, superose 12, eluindo na forma monomérica com 53kDa. A proteína *GUMC* foi caracterizada pela reação com o anticorpo anti-*GUMC-MBP* (produzido em camundongos) através da técnica de imonublotting. A enzima também foi caracterizada através da técnica do dicroísmo circular (CD), apresentando um espectro característico de estrutura secundária enovelada, composta predominantemente por α-hélices. Foram realizadas 9 construções para a retirada das regiões transmembrânicas das regiões 5 e 3' do gene *gumC* (1 construção para o vetor de expressão pET29b e 8 para o vetor pMALc-2x). Em uma das construções, a proteína de fusão modificada *GUMC-MBP 5C* foi expressa no vetor de expressão pMALc-2x e foi purificada em coluna de afinidade. A proteína de fusão modificada *GUMC-MBP* foi clivada com a enzima Factor Xa. Estudos de agregação molecular das proteínas de fusão *GUMC-MBP* e *GUMC-MBP modificada C5* e das enzimas *GUMC* e *GUMCC5* modificada poderão ser realizados futuramente. O gene *gumK* foi clonado no vetor pMAc-2x, a proteína de fusão *GUMK-MBP* foi expressa, com uma massa molecular calculada de 86kDa e foi purificada em coluna de afinidade. A proteína de fusão foi caracterizada por imunoblotting e medidas de dicroísmo circular foram realizadas. Após clivagem com o Factor Xa, a enzima *GUMK* foi purificada através da cromatografia de troca catiônica. Ensaios de cristalização foram realizados onde microcristais e cristais em forma de agulha foram obtidos. Futuramente, estudos estruturais e funcionais destas enzimas poderão trazer informações sobre a patogenicidade da *X. fastidiosa*, assim como possibilitar o desenvolvimento de inibidores específicos.

ABSTRACT

The bacterium *Xylella fastidiosa* has been associated with diseases of economically important crop as the citrus variegated chlorosis (CVC) – in citrus in Brazil and the Pierce's disease in grapevines in the United States (Hopkins, 1989 and Purcell *et al.*, 1997). The economic importance of the citrus industry in Brazil and the high level of damage caused by CVC in brazilian orchards have resulted in an extensive research program starting with the sequencing of the entire genome of X. fastidiosa (Simpson *et al.*, 2000). The bacterium is transmitted by specific sharpshooter leafhoppers when the insect feeds on the xylem sap. Typical disease symptoms include conspicuous variegations, with chlorotic areas on the upper side and small necrotic lessions on the lower side of the leaves. The affected fruits are smaller, often no more than one-third of the diameter of healthy fruits, hardened and without commercial value. *X. fastidiosa* has a nine-gene operon (B, C, D, E, F, H, J, K, and M genes) responsible for the biosynthesis of exopolysaccharides, denoted fastidian gum, that may be linked directly to the pathogenecity of the microorganism. In this work our main aim is to study the *GUMC* enzyme, that may be responsible for gum polymerization or secretion through the membrane of *X. fastidiosa* and *GUMK* enzyme, a glucuronosyltransferase or glycosyltransferase IV, that adds a glucuronic acid to tetrasaccharide manose-α-1,3-glucose-β-1,4-glucose-P-P-polyisoprenyl. The *gumC* gene was cloned into the pMAL-c2x expression vector, and *GUMC-MBP* fusion protein was expressed with estimate molecular mass 98kDa, was purified through affinity column and was characterized through the reaction of anti–*MBP* antibody by imunoblotting. Molecular aggregation studies of *GUMC-MBP* fusion protein were measured by Dynamic Light-Scattering (DLS). Crystallization screens were made and microcrystals were obtained. The *GUMC-MBP* fusion protein were cleavaged with Factor Xa and the *GUMC* enzyme were purified through ion exchange chromatography. The *GUMC* molecular mass were determined using size exclusion chromatography, superose12. Anti-*GUMC-MBP* antibodies were already produced in mice and were used to characterize the *GUMC* protein, by imunoblotting technique. In addition, according to circular dichroism spectroscopy, *GUMC* protein prevalent secondary structure is α-helix. Nine constructions for the *gumC* gene, without 5' and 3' transmembrane regions (one for cloning in pET29b and 8 for cloning in pMALc-2x) were carried out. One of the constructions, the modified fusion protein *GUMC-MBP C5*, was expressed into the pMALc-2x expression vector. The modified fusion protein *GUMC-MBP 5C* were purified through affinity resin and cleavaged with the Factor Xa enzyme. In the future, aggregation states of *GUMC-MBP* and *modified GUMC-MBP C5* fusion proteins, and *GUMC* and *modified GUMCC5* enzymes could be measured by DLS and compared. The *gumK* gene, cloned into the pMALc-2x expression vector, expressed a *GUMK-MBP* fusion protein soluble with molecular mass 86kDa. This fusion protein was purified through affinity resin. The *GUMK-MBP* fusion protein was characterized for imunoblotting and CD measurements. The *GUMK-MBP* fusion protein was cleavaged with Factor Xa enzyme and the *GUMK* enzyme was purified through cationic exchange chromatography. Crystallization screens were made and microcrystals and crystals in needle form were obtained. Future enzymes characterization three-dimensional structure will allow further structural and functional studies on the pathogenicity of X. fastidiosa, as well as to development of specific inhibitors.

INTRODUÇÃO

Muitas doenças de plantas de causas desconhecidas são consideradas viroses devido às falhas da associação de bactérias, fungos e nematóides com as doenças. Muitas viroses e agentes que agem como sendo vírus, não são transmitidos através de sementes, o que evita a transmissão direta destes agentes para as próximas gerações. Em contraste, as plantas que se propagam vegetativamente e são infectadas por estes agentes, transmitem as doenças para as futuras gerações. Desde que citros é perene e quase todos os citros se propagam vegetativamente por brotamento, este se torna um hospedeiro ideal para vírus e para agentes que agem como vírus, alguns dos quais têm estado presentes como hospedeiros em citros por mais de 100 anos. O Compêndio de Doenças de Citros descreve 33 tipos de doenças relacionadas a vírus e a agentes que se comportam como vírus e 3 doenças de causas desconhecidas ou incertas (Whiteside and Timmer, 1988).

Fungos, bactérias, vírus e nematóides foram identificados como patógenos de plantas no final do século XIX e começo do século XX. Agentes causais de muitas doenças, que foram consideradas viroses, têm sido identificadas recentemente. Um exemplo disso é a Doença de Pierce, que antes era associada a virose, hoje sabe-se que é transmitida pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Derrick e Timmer, 2000).

Fitopatologistas de plantas têm feito grande progresso na identificação, caracterização, detecção e desenvolvimento de estratégias de controle para muitos patógenos. Tudo isso graças ao desenvolvimento dos métodos em Biologia Molecular. Novas técnicas de cultura e manipulação de microorganismos tais como: microscopia,

centrifugação, eletroforese, caracterização de ácidos nucléicos e proteínas, imunologia e genética têm sido adotadas para a identificação de novos patógenos, caracterização de patógenos conhecidos, estudos da interação patógeno-hospedeiro e controle de doenças (Derrick e Timmer, 2000).

Na década de 80, no Brasil, foi diagnosticada que a bactéria *X. fastidiosa* é o agente causador de uma das doenças que mais atacam a plantação de cítricos, a Clorose Variegade de Citros (CVC), doença popularmente conhecida como 'amarelinho'. A bactéria pode ser detectada em citros infectados através de vários procedimentos e a cepa causadora da CVC pode ser distinguida de outras linhagens da mesma bactéria através de técnicas como a PCR. Diferentes linhagens de *X. fastidiosa* causam doenças em diversos tipos de plantação como videiras, pereiras, pessegueiros e cafezais (Purcell e Hopkins, 1996; Beretta *et al.*,1996; Banks *et al.*, 1999 e Metha e Rosato, 2001).

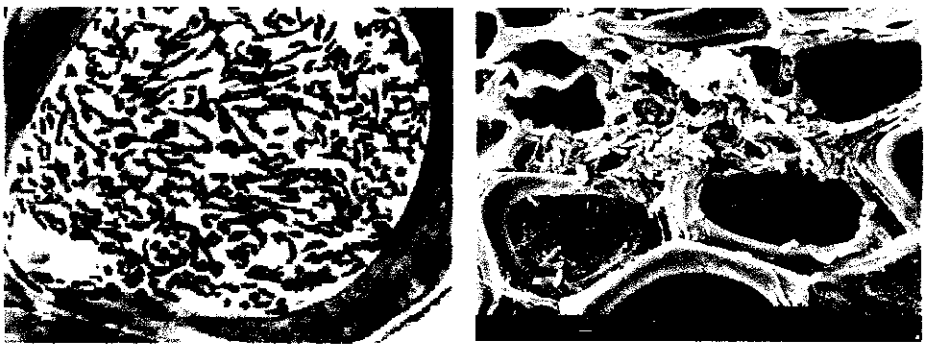
Pesquisas mostram o progresso da CVC no estado de São Paulo, sendo as regiões com incidência mais elevada o norte, noroeste e centro. Estudos epidemiológicos da CVC mostram que em 12 anos, uma única árvore infectada pode espalhar a doença em 90% das árvores em um pomar de 20 hectares (www.fundecitrus.com.br). Estas perspectivas são alarmantes para a economia do país, visto que a exportação de suco de laranja tem parcela significativa no equilíbrio da balança comercial brasileira, representando aproximadamente 1,67% das divisas geradas pelas exportações (www.laranjabrasil.com).

1.1) - Clorose Variegada de Citros (CVC)

A Clorose Variegada de Citros (CVC) ou 'amarelinho' foi primeiramente relatada em 1987 nos estados de São Paulo e Minas Gerais, como uma doença que afeta todas as

variedades de laranja doce (Chang *et al.*, 1993). A doença se espalhou rapidamente através da técnica de enxerto com ramos contaminados e também através dos insetos vetores e tornou-se largamente distribuida em todas as regiões produtoras de laranja do país. A CVC é uma das maiores preocupações dos produtores de citros, junto com a morte súbita dos citros (MSC), cancro cítrico e greening (fundecitrus.com.br).

Restrita ao xilema da planta, a bactéria *X. fastidiosa* provoca o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a copa da planta. A produção do pomar cai rapidamente, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente. A perda de peso do fruto pode chegar a 75%. As figuras 1.1 e 1.2 mostram vasos do xilema obstruídos pela *X. fastidiosa*.



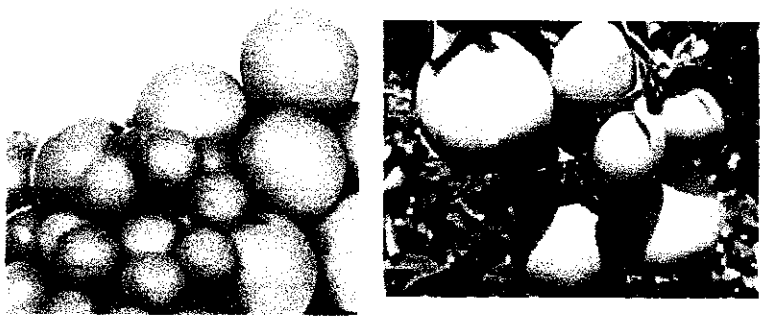
Figuras 1.1 e 1.2 – Microscopia eletrônica da *Xyllela fastidiosa* infectando o xilema de uma laranjeira (fotos de Marcos A Machado e Francisco Laranjeira, extraídas do site: www.fundecitrus.com.br).

Os primeiros sintomas da clorose aparecem nas folhas maduras da copa. Em folhas novas, mesmo de plantas severamente afetadas, não há manifestação da doença. Os primeiros sintomas são vistos nas folhas, passam posteriormente para os frutos e acabam se manifestando em toda a planta. Surgem pequenas manchas amareladas, espalhadas na parte lisa (parte superior) da folhas e que correspondem a lesões de cor palha na parte inferior. Estas manchas evoluem para lesões cor palha dos dois lados da

folha (figuras 1.3 e 1.4). Com o progresso da CVC, ocorre a desfolha (figura 1.5) dos ramos mais altos da planta, locais mais atacados pelos insetos vetores (De Negri, 1990; Malavolta *et al.*, 1990).

Figuras 1.3, 1.4 e 1.5 – Fotos de folhas e frutos de plantas infectadas pela *Xylella fastidiosa* (fotos extraídas do site www.fundecitrus.com.br).

Inicialmente, observam-se poucos ramos com frutos pequenos. Em estágio avançado, toda a planta produz frutos miúdos (figuras 1.6 e 1.7). Quanto mais nova a planta infectada, mais rapidamente será totalmente infectada. Com o avanço da doença, os frutos amadurecem mais cedo, produzindo menor quantidade de suco por fruto. Os frutos ficam endurecidos e imprestáveis para o comércio, podendo danificar as máquinas processadoras de suco (De Negri, 1990; Malavolta *et al.*, 1990; Rosseti *et al.*, 1990).



Figuras 1.6 e 1.7 – Fotos de frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à doença CVC, causada pela bactéria *X. fastidiosa* (fotos extraídas do site: www.fundecitrus.com.br).

1.2) - A bactéria *Xylella fastidiosa*

O termo 'bactéria limitada ao xilema' foi usado para descrever patógenos de plantas procarióticos difíceis de serem isolados por procedimentos normais em padrões de bacteriologia e que vivem restritos no xilema das plantas (Purcell e Hopkins, 1996). Estes organismos 'fastidiosos' requerem meios complexos para crescimento, ocorrem somente no xilema de plantas infectadas, são transmitidos por insetos sugadores que se alimentam da seiva do xilema das plantas e causam doenças de difícil controle. As células da bactéria *X. fastidiosa* são não flagelares, não esporuladas, medem de 0,3 – 0,5μm de diâmetro e 1 - 5μm de comprimento. A bactéria fastidiosa é Gram-negativa e cresce entre 20 - 25°C em pH 6,7 – 7,0 (www.laranjabrasil.com.br).

Doze espécies de "cigarrinhas" ou insetos vetores são capazes de transmitir a bactéria *Xylella fastidiosa* e, portanto, são responsáveis pela disseminação da CVC em todas as regiões citrícolas do país. Ao se alimentarem no xilema de árvores contaminadas, as cigarrinhas adquirem a bactéria e passam a transmití-la para outras plantas sadias.

Atualmente, os principais meios de controle da CVC incluem o plantio de mudas sadias, extermínio das plantas infectadas e controle químico dos insetos vetores.

O mecanismo pelo qual a bactéria *X. fastidiosa* causa a doença CVC ainda não é totalmente conhecido, mas quando comparada a outras bactérias patogênicas, observa-se a presença de muitos genes relacionados à patogenicidade (Simpson *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000 e Van Sluys, 2003). Entre os fatores relacionados à patogenicidade podemos enumerar o processo de degradação da parede celular através de enzimas hidrolíticas,

captação e metabolismo de ferro, fator de regulação da patogenicidade, interação célula-célula, respostas anti-oxidantes e síntese de toxinas (Agrios, 1988 e Lambais *et al.*, 2000).

1.3) - Alguns mecanismos propostos para a patogenicidade da bactéria *X. fastidiosa*

- **Degradação da parede celular da planta:**

A maioria das bactérias patógenas é capaz de produzir uma variedade de enzimas, como as celulases, xilanases, pectinases e proteases, que degradam a parede celular das plantas e podem ser importantes fatores de patogenicidade. Genes que codificam um precursor poligalacturonase, quatro celulases e várias proteases, assim como uma completa maquinaria necessária para secretar enzimas que degradam as paredes celulares de plantas, foram identificados na bactéria X. fastidiosa (Lambais *et al.*, 2000 e Simpson *et al.*, 2000).

- **Homeostase de ferro:**

A homeostase de ferro é um processo importante na regulação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade de bactérias (Wiggerich e Puhler, 2000). Genes que codificam receptores para diversos sideróforos e proteínas envolvidas no transporte sideróforo-ferro através da membrana foram identificados na *X. fastidiosa*, sugerindo assim, que estes podem ser importantes para a sobrevivência da bactéria no xilema (Lambais *et al.*, 2000 e Simpson *et al.*, 2000).

- **Síntese de toxinas:**

Foram identificados, em *X. fastidiosa*, genes que codificam para diversas toxinas, entre eles, genes da família RTX. RTX são toxinas que formam poros e que interagem com a membrana do plasma do hospedeiro causando a liberação de componentes celulares. Em vários patógenos bacterianos de animais, toxinas que formam poros estão associadas com indução de apoptose em células do hospedeiro (Lally *et al.*, 1999). Não se sabe se a *X. fastidiosa* induz apoptose em células cítricas, mas pode ser um mecanismo usado por ela para evitar defesas do organismo hospedeiro (Lambais *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000).

- **Respostas anti-oxidantes:**

Durante a infecção da planta pela *X. fastidiosa*, a planta dá início a um processo de defesa por meio da degradação parcial da parede celular, induzindo a produção de espécies de oxigênios reativos, como superóxidos e peróxidos de hidrogênio. A explosão oxidativa induzida pela infecção pode inibir o crescimento bacteriano e o desenvolvimento da doença. Diversos genes envolvidos na desintoxicação, que codificam para catalases, superóxido dismutases, glutationa peroxidases e glutationa S-transferases sugerem que a *X. fastidiosa* pode, pelo menos em parte, responder a problemas oxidativos e contra-atacar ao primeiro sinal de resposta da planta devido à infecção causada pelo elemento patogênico (Simpson, 2000 e Cussiol *et al.*, 2003 e Wojtaszek, 1997).

- **Regulação da patogenicidade:**

O longo período necessário para a observação dos sintomas provocados pela CVC na planta contaminada, sugere que a síntese dos fatores patogênicos seja regulada por um número mínimo de sensores, equivalentes aos encontrados em um grande número de bactérias Gram-negativas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aureofasciens*, *Escherichia coli*, and *Rhizobium leguminosarum* (Cubo *et al.*, 1992; Fucqua e Winans, 1994; Fucqua *et al.*, 1996 e Pierson *et al.*, 1998).

- **Interação célula-célula:**

O contato célula-célula é um processo essencial no estabelecimento da interação patógeno-planta e desenvolvimento da doença. Durante o processo de infecção e desenvolvimento da CVC, a bactéria *X. fastidiosa* interage com seu inseto vetor e as células da planta hospedeira, assim como com outras células de *X. fastidiosa* em microcolônias. Como mediadores do contato célula-célula estão o polissacarídeo extracelular (EPS), adesinas fimbriais e afimbriais, assim como proteínas como aglutininas (Lambais *et al.*, 2000).

EPS podem ser fatores importantes controlando a patogenicidade da *X. fastidiosa*. Em diversas bactérias, o EPS está associado com virulência, promovendo adesão à superfície do hospedeiro (Chatterjee e Vidaver, 1985). Em geral, mutantes para a síntese de EPS mostram reduzida virulência. EPS também pode estar envolvido no reconhecimento, determinando a natureza da associação planta-bactéria. Diversos genes

envolvidos na síntese e secreção de EPS foram identificados na *X. fastidiosa*, baseado nas similaridades seqüenciais para os genes de síntese e secreção de EPS da bactéria *Xanthomonas campestris pv campestris* (Dharmapuri e Sonti, 1999; Becker *et al.*, 1998).

A *X. fastidiosa* foi a primeira bactéria fitopatogênica a ter seu genoma seqüenciado, por diversos laboratórios de pesquisa do Estado de São Paulo com a ajuda financeira da FAPESP e da Fundecitrus, com o objetivo principal de busca por novos mecanismos de acabar com a CVC dos laranjais (Simpson *et al.*, 2000).

Através da análise do genoma, por técnicas de bioinformática, os genes da *X. fastidiosa* podem ser estudados e correlacionados a genes de outras bactérias. A análise seqüencial do genoma revelou a existência de 22 genes que codificam para a síntese de proteínas regulatórias e enzimas envolvidas na síntese de um exopolissacarídeo (EPS) (chamado de goma fastidiana) similar a goma xantana, produzida pela *Xanthomonas campestris* (Silva *et al*,.2001). Esta é a bactéria causadora do apodrecimento de crucíferas, como repolho, rabanete e nabo (Williams, 1980) e produz um polissacarídeo extracelular chamado goma xantana, que, devido a suas propriedades reológicas tais como alta viscosidade e pseudo-plasticidade e estabilidade em condições extremas, é muito utilizado em indústrias de alimentos e agricultura como emulsificante, espessante e estabilizante (Baird, 1983; García-Ochoa *et al.*, 2000).

1.4) – A estrutura da goma fastidiana é semelhante a da goma xantana

A estrutura da goma xantana, que tem sido bastante estudada (Melton *et al.*, 1976; Jansson *et al.*, 1975), consiste de um polissacarídeo β-1,4-D-glicose com uma cadeia lateral com um trissacarídeo composto de uma manose, uma molécula de ácido glicurônico e uma segunda manose. Os resíduos de manose são acetilados e piruvilados

em sítios específicos, mas em diferentes graus (Stankowski *et al.*, 1993; Cadmus *et al.*, 1976; Jansson *et al.*, 1975). Estudos mostraram que a subunidade de pentassacarídeo é primeiro sintetizada, ligada a uma molécula de lipídeo carreador (difosfato prenol), de maneira seqüencial a partir de precursores D-glicose, D-manose, ácido glicurônico, acetil coenzima A e fosfoenolpiruvato (Ielpi *et al.*, 1983; 1981; 1981; Harding *et al.*, 1987). As unidades de pentassacarídeos são subseqüentemente polimerizadas à um polissacarídeo de alto peso molecular e transportadas para fora da célula. Portanto, a biossíntese de goma xantana é um processo complexo e preciso, controlado por múltiplas enzimas (Sutherland, 1977). Dois grupos de genes estão envolvidos na biossíntese de goma xantana: os genes xpsIII, xpsIV e xpsVI, responsáveis pela síntese da glicose, ácido glicorônico e manose, respectivamente (Köplin *et al.*, 1992; Hötte *et al.*, 1990; Harding *et al.*, 1987) e os genes gum ou xpsI, que codificam as enzimas envolvidas na polimerização do pentassacarídeo ligado ao poliprenol e secreção do polímero para o meio extracelular (Katzen *et al.*, 1998). Os genes gum são agrupados em um operon (operon Gum) constituído por um conjunto de 16 kb contendo 12 genes designados *gum b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l e m*. O gene *gum d* codifica a enzima Glicosiltransferase I, responsável pela transferência da glicose-1-fosfato ao fosfato poliprenol para formar o monossacarídeo-lipídeo; *gum m* codifica a enzima Glicosiltransferase II que catalisa a adição da segunda glicose para formar o dissacarídeo-lipídeo; *gum h* codifica a enzima Glicosiltransferase III que catalisa a adição da primeira manose formando o trissacarídeo-lipídeo; *gum k* codifica a enzima Glicosiltransferase IV ou glicuronosiltransferase que catalisa a adição do ácido glicorônico para formar o tetrassacarídeo-lipídeo; *gum i* que codifica a enzima Glicosiltransferase V que catalisa a adição da segunda molécula de manose para formar o

pentassacarídeo-lipídeo; *gum f* codifica a enzima acetiltransferase que catalisa a acetilação da manose interna; *gum g* que codifica a enzima acetiltransferase II que catalisa a acetilação da manose externa; *gum l* que codifica a enzima piruvato cetal transferase que catalisa a piruvilação da manose externa; *gum b, c e e* estão envolvidos na polimerização e secreção do polissacarídeo através da membrana da bactéria; *gum j* possivelmente esteja envolvido em um estágio paralelo de polimerização e secreção do polissacarídeo.

A tese de patogenicidade da goma xantana foi reforçada quando estudos demonstraram que a deleção do gene *gum d* ou alterações nos últimos estágios da biossíntese da goma xantana reduziram a virulência em brócoli e diminuíram a agressividade da bactéria pela planta (Katzen *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1997).

Portanto, é possível que a exemplo do que ocorre com a *Xanthomonas*, o Operon Gum de *X. fastidiosa* esteja diretamente envolvido na patogenicidade causando a Clorose variegada de citros (CVC). A análise seqüencial do Operon Gum da *X. fastidiosa*, uma região de aproximadamente 12 Kb de DNA do cosmídeo 7A2 do Projeto Genoma da *X. fastidiosa*, revelou a presença de um operon homólogo ao Operon Gum da *Xanthomonas campestris* (Silva *et al.*, 2001). O Operon Gum da *X. fastidiosa* apresenta 9 genes *b, c, d, e, f, h, j, k e m*, que codificam para as enzimas *GumB*, *GumC*, *GumD*, *GumE*, *GumF*, *GumH*, *GumJ*, *GumK* e *GumM*, respectivamente. Os genes *gum i, g e l*, que codificam as enzimas Glicosiltransferase V, acetiltransferase II e Piruvato cetal transferase, respectivamente, no genoma da *X. Campestris*, estão ausentes no genoma da *X. fastidiosa*. Todos os genes relatados para a síntese de moléculas precursoras, necessárias como substratos para a atividade das enzimas que codificam para o operon gum, foram

encontrados no genoma da *X.fastidiosa*. O exopolissacarídeo produzido através de reações catalisadas pelas enzimas do Operon Gum tem sido chamado de goma fastidiana. Na figura 1.8 estão esquematizadas todas as etapas do mecanismo de produção da goma fastidiana proposto por Silva e colaboradores (*Silva et al.*, 2001).

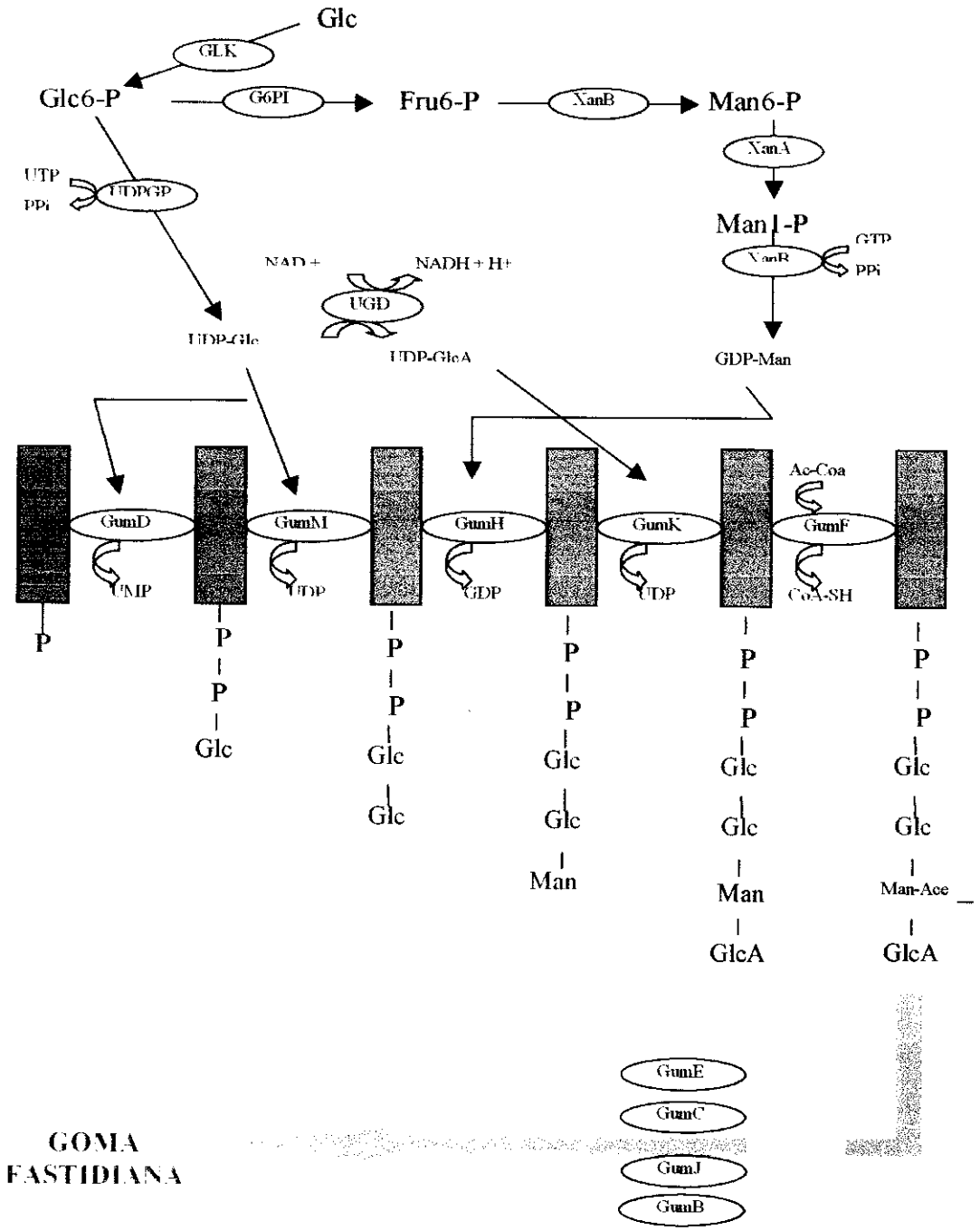


Figura 1.8) – Mecanismo proposto de biossíntese da goma fastidiana (modificado segundo Silva *et al.* 2001). As enzimas estão mostradas em ovais amarelos: glicosiltransferases I, II, III e IV (GumD, M, H e K respectivamente); acetiltransferase I (GumF), as proteínas GumE, C, J e B relatadas como prováveis enzimas envolvidas no processo de polimerização e transporte. As setas para as reações sequenciais que adicionam açúcares ao poliprenol (lipídio carreador esquematizado em retângulo azul) não são mostradas. Glc, D-glicose; GlcA, D-ácido glicurônico; Man, D-manose; Ac, ester acetil; PPi, pirofosfato.

A estrutura da goma fastidiana deve ser composta por repetições de β-1,4-D-glicose e uma cadeia lateral formada por um dissacarídeo, uma molécula de manose acetilada e outra de ácido glicurônico. A figura 1.8 mostra a enzima *GumD*, uma enzima glicosiltransferase I, responsável pela adição da glicose-1-fosfato ao fosfato poliprenol, formando o monossacarídeo-lipídeo (P-Glc). A enzima *GumM*, glicosiltransferase II, adiciona a segunda glicose, formando um dissacarídeo-lipídeo (P-Glc-Glc). Após a formação do dissacarídeo, a cadeia lateral começa a ser formada com a adição de uma manose pela manosiltransferase I, a *GumH* (P-Glc-Glc_Man). A próxima etapa é a adição de uma molécula de ácido glucorônico à manose, catalisada pela *GumK* (P-Glc-Glc_Man_GlcAc). A enzima *GumF*, acetiltransferase, catalisa a acetilação da manose. A figura 1.9 mostra a formação do tetrassacarídeo.

As enzimas *GumB*, *GumE*, *GumC* e *GumJ*, possivelmente, estão envolvidas na polimerização e exportação do polissacarídeo pela membrana da bactéria. A figura 1.10 mostra a polimerização da goma fastidiana:

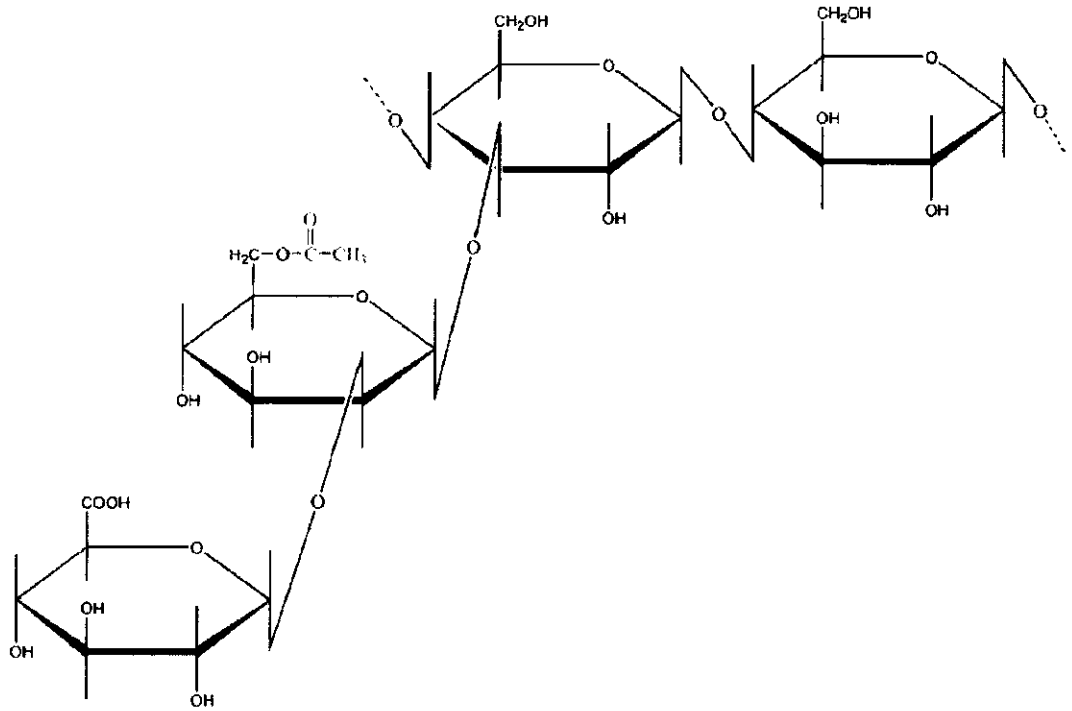


Figura 1.9 – Esquema mostrando a formação do tetrassacarídeo.

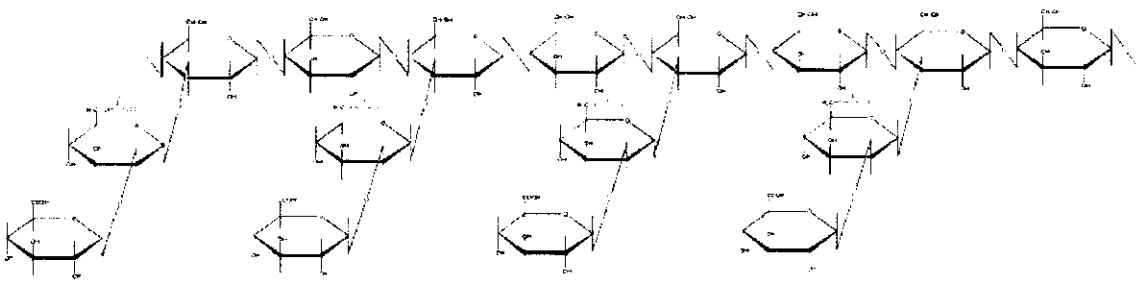


Figura 1.10 – Esquema mostrando a polimerização da goma fastidiana.

Estudos recentes (Scarpari *et al.*, 2003 e Osiro *et al.*, 2004) mostraram que a *X. fastidiosa* produz a goma fastidiana e outros estudos mostraram que o xilema das plantas infectadas está bloqueado, o que impede o fluxo normal de água (Hopkins, 1981).

Portanto, o estudo da via metabólica da goma fastidiana pode ser uma ferramenta interessante para o controle da doença CVC. O estudo estrutural das enzimas envolvidas nesta via e a busca de inibidores com propriedades tais que impeçam ou diminuam a produção da goma fastidiana são objetos de estudo de um projeto no qual a presente tese está inserida. Estudos cristalográficos destas enzimas poderão produzir informações estruturais fundamentais para o conhecimento total da via biossintética, assim como para o desenvolvimento de inibidores específicos.

É importante ressaltar que embora a goma xantana (produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*) tenha sido bastante estudada, não existem estudos bioquímicos e estruturais com as enzimas envolvidas em sua síntese. Assim, o presente trabalho é pioneiro e, devido a alta identidade seqüencial entre as enzimas, todo conhecimento obtido para as enzimas da *X. fastidiosa* poderá ser estendido às enzimas da *X. campestris* e às outras cepas de *X. fastidiosa*, responsáveis por doenças em cafezais, videiras, pessegueiros.

O estudo com as enzimas envolvidas na biosíntese da goma fastidiana, produzida pela *X. fastidiosa*, foi iniciado em nosso laboratório em Março de 2000. Várias pessoas estão envolvidas no desenvolvimento do projeto, que participa da Rede de Biologia Molecular Estrutural – Fapesp. No presente trabalho foram estudadas duas proteínas da via de produção da goma fastidiana, as enzimas *GumK*, uma glucuronosiltransferase, e a *GumC* envolvida nos processos de polimerização do polissacarídeo ou na sua exportação através da membrana da bactéria. Os genes que codificam a síntese das duas proteínas foram clonados em vetores de clonagem e as proteínas foram expressas na forma solúvel.

As proteínas foram purificadas e caracterizadas através de técnicas de eletroforese, immunobloting, dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz.

1.5) - As proteínas estudadas: *GumK* e *GumC*

GumC- Uma proteína de função ainda não totalmente conhecida, mas estudos em *Xanthomonas* têm sugerido sua participação nos processos de polimerização do polissacarídeo ou no de sua exportação através da membrana da bactéria (Katzen *et al.*, 1998). No entanto, apesar da sua função não estar estabelecida, sua atividade e importância para o surgimento da doença, no caso causada pela bactéria *Xanthomonas*, foi constatada através de estudos de mutação gênica. Mutações no gene *gum c* levaram á diminuição da produção da goma xantana e à diminuição da virulência da bactéria (Katzen *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1997). A análise da seqüência da proteína, realizada através de ferramentas de bioinformática, mostra que a proteína apresenta duas regiões transmembrânicas envolvendo as regiões N- e C- terminal da molécula. Esta análise mostra também que a proteína é constituída de um elevado número de resíduos hidrofóbicos e de massa molecular estimada de 53 kDa.

GumK- É uma glicoronosiltransferase, que cataliza a adição de um ácido glicorônico na molécula da manose para a formação do tetrassacarídeo. Estudos teóricos realizados para a proteína *GumK* não encontram regiões transmembrânicas na composição de sua molécula, embora estudos recentes (Barreras *et al*, 2004) mostrarem, através de análises para determinar a sublocalização celular, que a proteína *GumK* de *X. campestris* está predominantemente localizada na fração da membrana da bactéria.

1.6) - Referências Bibliográficas

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3o edição. Editora Academic Press, Inc. San Diego, Califórnia, EUA 1988.

BAIRD, J.K.; SANDFORD, P.A. and COTTRELL, L.W. Industrial aplication of some new microbial polysaccharides. **Bio/Technology**, v.1 p.778-783, 1983.

BANKS, D.; ALBIBI, R.; CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; JARRET, R.L. and SMITH, B.J.Specific Detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's Disease Strains. **Curr. Microb.**, v.39, p.85-88, 1999.

BARRERAS, M.; ABDIAN, P.L.; IELPI, I. Functional characterizaton of GumK, a membrane-associates β-glucuronosyltransferase from *Xanthomonas campestris* required for xanthan polysaccharide synthesis. **Glycobiol**. v. 14, p. 233-241, 2004.

BECKER, A., KATZEN,F., PUHLER, A. and IELPI, I. Xanthum gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 50, p. 145–152, 1998.

BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R. and CHAGAS, C.M. First report of **Xylella fastidiosa** in coffee. **Plant Dis.**v.80, p.821-821, 1996.

CADMUS, M.C.; ROGOVIN, S.P.; BURTON, K.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A. and JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Can J. Microbiol**. v.22, p.942-948, 1976.

CHANG, C.J.;GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, I. and BOVE, J.M. Culture and serological detection of *Xylella fastidiosa*, the xylem-limited bacterium associated with citrus variegated chlorosis disease. **Curr. Microbiol.** v. 27, p. 137-142, 1993.

CHATEERJEE, A.K. and VIDAVER, A.K. Genetics of phathogenicity factors: application to phytopathogenic bacteria. In D.S. Ingram and P.H. Williams , **Advances in plant pathology**, Academic Press, Inc., Ltd., London, Inglaterra, vol.4, 1985.

CHOU, F.; CHOU, H.; LIN, Y.; YANG, B.; LIN, N.; WENG, S. and TSENG, Y. The *Xanthomonas campestris gumD* Gene Required for Synthesis of Xanthan Gum Is Involved in Normal Pigmentation and Virulence in Causing Black Rot **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** v.233, p.265-269, 1997.

CUBO, M.T., ECONOMOU, A., MURPHY, G., JOHNSTON, A.W.B., and DOWNIE, J.A. Molecular characterisation and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCR* that can influence nodulation of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. **J Bacteriol**. v.174, p. 4026–4035, 1992.

CUSSIOL, J.R., ALVES, S.V., OLIVEIRA, M.A. and NETTO, L.E. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. **J Biol Chem**. v. 28,p. 1570-1578, 2003.

DE NEGRI, J.D. Clorose variegada de citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais. **Com. Tec**. No. 82, Ext. Rural, CATI, Campinas 1990.

DERRICK, K.S. and TIMMER, L.W. Citrus Blight and other diseases of recalcitrant etiology. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 38, p. 181-205, 2000.

DHARMAPURI, S. and SONTI, R.V. A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. **FEMS Microbiol Lett**. v. 179, p. 53–59, 1999.

FUCQUA, C., WINANS, S.C. and GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annu Rev Microbiol.** v. 50, p. 727–751, 1996.

FUCQUA, C. and WINANS, S.C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **J Bacteriol.** v.176, p. 2796–2806, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A. and GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotech. Advances** v. 18, p. 549-579, 2000.

HARDING, N.E.; CLEARY, J.M.; CABANAS, D.K.; ROSEN, I.G. and KANG, K.S. Genetic and Physical Analyses of a Cluster of Genes Essential for Xanthan Gum Biosynthesis in *Xanthomonas campestris* **J. Bacteriol.** v. 169, p. 2854-2861, 1987.

HENDSON, M., PURCELL, A.H., CHEN, D., SMART, C., GUILHABERT, M. and KIRKPATRICK, B. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of Xylella fastidiosa. **Applied and Enviromental Microbiology,** v. 67, p.895-903, 2001.

HOPKINS, D. L. Phytopathology, v. 71, p. 415-418, 1981.

HOTTE, B.; RATH-ARNOLD, I.; PUHLER, A. and SIMON, R. Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by Xanthomonas campestris pv. campestris. **J Bacteriol**. v.172(5), p.2804-2807, 1990.

IELPI, L,; COUSO, R, and DANKERT, M. Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid. **Biochem Biophys Res Commun**. v.102(4), p.1400-1408, 1981.

IELPI, L.; COUSO, R. and DANKERT, M Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. **FEBS Lett.**v.130(2), p.253-256, 1981.

IELPI, L.; COUSO, R. and DANKERT, M. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. **Biochem. Int.** v.6, p.323-333, 1983.

JANSSON, P.E,; KENNE, L.and LINDBERG, B. Structure of extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris **Carbohydr Res**. v.45, p.275-282, 1975.

KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; IELMINI, V.; BECKER, A.; PUHLER, A. and IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. Campestris *gum* Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence **J. bacteriol.** v. 180, p.1607-1617, 1998.

KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G. and PUHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes Are Involved in UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis **J. Bacteriol.** v.174, p. 191-199, 1992.

LAMBAIS. M.R., GOLDMAN, M.H.S., CAMARGO, L.E. and GOLDMAN, G.H. A Genomic approach to the understanding of Xylella fastidiosa pathogenicity. **J. Bacteriol., v. 3, p. 459-462,** 2000.

LALLY. E.T., HILL, R.B., KIEBA, I.R. and KOROSTOFF, J. The interaction between RTX toxins and target cells. **Trends Microbiol.** V. 9, p. 356–361, 1999.

MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; MEDINA, C.L.; SOUZA, R.P.; RIBEIRO, R.V.; SILVA, J.A.B. and STUCHI, E. **Anais do I Simpósio Genoma Funcional da *Xylella fastidiosa*-Serra Negra**, 2001.

MALAVOLTA, E. Nova anomalia dos citros: estudos preliminaries . **Laranja Cordeirópolis**, v.11, no.1, p. 15-18, 1990.

MELTON, L.D.; MINDT, L.; REES, D.A. and SANDERSON, G.R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris: evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydr Res**. v.46(2), p.245-257, 1976.

MEHTA, A. and ROSATO, Y.B. Phylogenetic relationships of Xylella fastidiosa strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.** v.51, p.311-318, 2001.

NORMAN-SETTERBLAD, C., VIDAL, S. and PALVA, E.T. Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. **Mol Plant–Microbe Interact.** v. 4, p. 430–438, 2000.

OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.;OTOBONI, A.M.; LEMOS, E.G.;DE SOUZA, A.A.; COLETTA, F.H.D. E MACHADO, M.A. A kinetic model for Xylella fastidiosa adhesion, biofilm formation and virulence. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 15, p. 313-318, 2004.

PIERSON, L.S., WOOD, D.W. and PIERSON, E.A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. **Annu Rev Phytopathol.** v. 36, p. 207–225, 1998 .

PURCEL. A.H. and HOPKINS. D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 34, p. 131-151, 1996.

ROSSETI, V.M. GARNIER, J.M., BOVÉ, M.J.H., BERETTA, A.R.R, TEIXEIRA, J.A., QUAGGIO and DAGOBERTO DE NEGRI, J. **C.R. Acad. Sci.,** v. 310, p. 345-349, 1990.

SCARPARI, F. R.; LAMBAIS. M. .R.; SILVA. D. S.; CARRARO. D.M.; CARRER. H. Expression of putative pathogenicity-related genes in Xylella fastidiosa grown at low and high cell density conditions in vitro. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 222, p. 83-92, 2003

SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A. and ARRUDA, P. Fastidian gum: the *xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity **FEMS Microbiol. Lett.** v. 203, p.165-171, 2001.

SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa. The Xylella fastidiosa Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature**. v.406(6792), p.151-157, 2000.

SUTHERLAND, I.W. Bacterial exopolysaccharides – their nature and production. Surface carbohydrates of the prokariotic cell. **Academic Press**, Inc., New York, 1977.

STANKOWSKI, J.D.; MUELLER, B.E. and ZELLER, S.G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydr Res**. v.17, p.241:321-61993, 1993.

VAN SLUYS, M.A., DE OLIVEIRA, M.C., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., MIYAKI, C.Y. et al. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of Xylella fastidiosa. **J. Bacteriol.** v. 3, p. 1018-1026, 2003.

WEINRAUCH, Y. and ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annu Rev Microbiol.** v.53, p. 155–187, 1999.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; JAIN, S.; BHAT, T.N.; THANKI, N.; RAVICHANDRAN, V. GILLILAND, G.L.; BLUHM, W.; WEISSIG, H.; GREER, D.S.; BOURNE, P. E. e BERMAN, H.M. **Nucleic Acids Res**. v. 30, p. 245-248, 2002.

WHITESIDE, J.O., GARSEY, S.M. and TIMMER, L.W. **Compendium of Citrus Diseases. St. Paul: APS Press.** 1998.

WILLIAMS, P.H. Black rot: continuing threat to world crucifers. **Plant. Dis.** v.64, p.736-774, 1980.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem J.** v. 322 , p. 681–692, 1997.

OBJETIVOS

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, que tem como objetivo principal contribuir para o conhecimento da via biossíntética da goma fastidiana produzida pela bactéria *X. fastidiosa*, no mecanismo de patogenicidade, e desenvolver bases para o controle da doença. Estudos cristalográficos destas enzimas poderão produzir informações estruturais fundamentais para o conhecimento total da via biossintética, assim como para o desenvolvimento de inibidores específicos e são objetivos de trabalhos futuros.

1.1) - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Assim, no presente trabalho, nos propomos a estudar duas enzimas desta via, uma glucuronosiltransferase (*GumK*), enzima que catalisa a adição de ácido glucorônico para formar o tetrassacarídeo-lipídeo e a *GumC*, enzima envolvida na polimerização ou na secreção da goma.

O estudo da enzima *GumC* é de particular interesse visto que estudos com *X. campestris* mostraram que ocorre uma diminuição na virulência da bactéria quando

alterações nos últimos estágios da biossíntese da goma xantana (através de mutações gênicas) são realizados (Katzen et al., 1998; Chou et al., 1997).

Os objetivos do presente trabalho incluem estudos de clonagem dos genes *gumc* e *gumk*, expressão, purificação das proteínas *GumC* e *GumK*, a caracterização das mesmas através das técnicas de Dicroísmo Circular, Espalhamento Dinâmico de Luz, cromatografia de filtração a gel para determinação da massa molecular, seqüenciamento da região N- terminal, produção de anticorpos e a realização de ensaios de cristalização.

1.2) - Referências Bibliográficas

CHOU, F.; CHOU, H.; LIN, Y.; YANG, B.; LIN, N.; WENG, S. and TSENG, Y. The *Xanthomonas campestris gumD* Gene Required for Synthesis of Xanthan Gum Is Involved in Normal Pigmentation and Virulence in Causing Black Rot **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** v.233, p.265-269, 1997.

KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; IELMINI, V.; BECKER, A.; PUHLER, A. and IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. Campestris *gum* Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence **J. bacteriol.** v. 180, p.1607-1617, 1998.

MATERIAIS, MÉTODOS E TÉCNICAS

Neste capítulo serão relatados os materiais e métodos utilizados para a clonagem dos genes, expressão, purificação e caracterização das enzimas envolvidas nesta tese.

Para melhor compreensão, descreveremos as metodologias utilizadas para as duas enzimas, *GumC* e *GumK*, separaradamente.

3.1)- Enzima *GumC*

3.1.1) – Clonagem do gene *gumc* no vetor de expressão pMALc-2x e testes de expressão da proteína de fusão GumC-MBP

O gene *gumc*, originário do cosmídeo 07A02, foi clonado no vetor de expressão pMal-c2x (colaboração com o Prof. Paulo Arruda – UNICAMP). Os primers utilizados para clonagem foram: 5' – GTAGAATTCACTATGGATTATCC – 3' E 3' – TACTCTAGACTCAATACAACTGCC – 5'. A partir desta construção, foram obtidas colônias transformantes em células de *E. coli* DH5α.

O pré-inóculo da colônia transformante consistiu de 5 mL de meio LB líquido juntamente com 50 ug/mL de ampicilina e 1 colônia transformante em células de *E. coli* DH5α. O crescimento ocorreu a 37°C sob agitação a 250 rpm por 12 horas. Deste pré-inóculo, 1 mL foi adicionado a 100 ml de meio LB, 50 ug/mL de ampicilina e 1 mL de glicose 20% e foram incubadas nas mesmas condições que foram usadas para o pré-inóculo. Foram realizados 3 inóculos iguais a este.

Quando a cultura de células de *E. coli* DH5α atingiu a densidade óptica de 0,8 em 600 nm, um dos inóculos foi induzido a 37°C por 4hs e os outros dois foram resfriados em gelo e após foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG), na concentração final 0.6 mM, por 20hs variando a temperatura de indução (25 e 30°C).

Realizamos outros experimentos onde a indução foi feita a 20°C, por 20hs, e a concentração de IPTG foi variada (0,01; 0,1; 0,3 e 0,6mM). As células foram separadas do meio por centrifugação a 4000 g durante 30 minutos a 4°C e ressuspendidas em 25 mL de tampão de lise ou tampão de coluna (20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica, 1mM EDTA) e congeladas a -20°C.

Foram utilizadas outras células de *E. coli* para a transformação: cepas de BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysS.

3.1.1.1) – Otimização do procedimento de obtenção da proteína recombinante *GumC*-MBP

O pré-inóculo consistiu de 5 mL de meio LB líquido juntamente com 100 ug/mL de ampicilina, 50ug/mL de cloranfenicol e 1 colônia transformante em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. O crescimento ocorreu a 37°C sob agitação a 250 rpm por 12 horas.

Deste pré-inóculo, 5 mL foram adicionados a 500 mL de meio LB, 50 ug/mL de ampicilina e foram incubadas nas mesmas condições que foram usadas para o pré-inóculo.

Quando a cultura atingiu a densidade óptica de 1,2 em 600 nm, a cultura foi resfriada em gelo e após foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG), na concentração final 0,6mM, e a expressão da proteina de fusão *GumC*-MBP ocorreu a 20°C por 20hs. As células foram separadas do meio por centrifugação a 4000 g durante 30 minutos a 4°C e ressuspendidas em 25 mL de tampão de lise ou tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4 contendo 1% de Triton X-100).

3.1.2) – Lise celular

A lise celular foi realizada através da adição de 1% (massa/volume) de lisozima ficando o extrato bruto em gelo por 20 minutos. Após este intervalo 2 métodos de lise celular foram utilizados:

- lise através da técnica de congelamento e descongelamento (5 vezes) seguida de sonicação (5 vezes de 1 minuto – intervalo de 40 segundos);
- lise através da técnica de sonicação (6 vezes de 1 minuto – intervalo de 60 segundos).

Após a sonicação, o lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9000g a 4°C.

3.1.3) – Purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP

O sobrenadante do lisado é filtrado em papel de filtro e diluído 3 vezes com tampão de coluna. A amostra foi aplicada na coluna de amilose (7,5 mL de resina),

previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de coluna (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) acrescido de 0,33% de Triton X-100. O fluxo utilizado foi de 0,6 mL/minuto. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 30 volumes de tampão de coluna.

Em seguida a proteína de fusão *GumC*-MBP foi eluída com 4 volumes de tampão de coluna (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) acrescido de 10 mM de maltose e 0,33% Triton X-100.

A purificação foi acompanhada por gel SDS-PAGE a 15%. As frações contendo a proteina de fusão foram reunidas e outras cromatografias foram testadas, com o objetivo de obter a *GumC*-MBP pura:

- **Cromatografia de filtração a gel Superose 12 (25mL de resina):** as frações eluídas da coluna de amilose foram reunidas e concentradas em centriprep 30. 200µL da amostra a uma concentração de 1mg/mL (determinada pelo método de Bradford -Bradford, 1976) foi aplicada na coluna, segundo o protocolo:

  Tampão utilizado: 20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4 acrescido de 0,33% de Tween 20;

  Fluxo: 0,5mL/minuto;

  Coletor: 1mL/fr;

  Passar 2 volumes de coluna.

- **Cromatografia de troca iônica: DEAE sepharose Hi Trap (aniônica):** A amostra eluída da coluna superose 12 foi concentrada até 1mg/mL e aplicada seguindo o protocolo:

  Fluxo: 0,7mL/minuto;

Coletor: 0,7mL/minuto;

Lavagem: 10 volumes de coluna do tampão Tris/HCl 20mM – pH7,4, 1mM Azida sódica e 1mM de EDTA acrescido de 0,33% de Tween 20 (tampão A) ;

Gradiente de 0 a 100% de tampão B (Tampão A + 1M NaCl);

Comprimento do gradiente: 20 volumes de coluna.

- **Precipitação da proteína de fusão *GumC*-MBP com Sulfato de amônio (S.A.)**

Frações eluídas da coluna de amilose foram reunidas para precipitação com S.A. seguindo o protocolo:

Adicionamos lentamente o correspondente a 10% de S.A. à amostra contendo a proteína de fusão e deixamos agitando por 20 minutos a 4°C. A amostra foi centrifugada a 15000g por 15 minutos. O pellet foi separado e ressuspendido com o mesmo volume anterior de tampão de amilose. Adicionamos ao sobrenadante lentamente o correspondente a 20% de S.A. e deixamos agitando novamente por 20 minutos a 4°C. Novamente centrifugamos por 15 minutos a 15000g. Repetimos este procedimento para as concentrações de 30, 40, 50 e 60% de S.A. Este experimento foi analisado através de gel SDS-PAGE.

- **Cromatografia da proteína *GumC*-MBP em Hidroxiapatita**

Após eluição da proteína de fusão *GumC*-MBP da coluna de amilose, as frações foram reunidas e a amostra dialisada contra tampão de fosfato 25mM pH 7,45 + 0,5% Tween-20 e foi aplicada em coluna de hidroxiapatita (5mL de resina) seguindo o protocolo:

Fluxo: 1mL/min

USP-EESC SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Lavar a coluna: 50 mL de tampão A (tampão fosfato 25mM, pH 7,45 + 0,5% Tween-20)

Gradiente: 0 a 100% de tampão B (tampão fosfato 0,5M + 0,5% Tween-20).

Comprimento do gradiente: 100 mL

3.1.4) – Caracterização da proteína de Fusão *GumC*-MBP

3.1.4.1)- Experimentos de Dicroísmo Circular (Circular Dicroism – CD)

3.1.4.1.1) - Dicroísmo Circular (CD – Circular Dichroism)

O Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica apropriada para estimar a percentagem dos componentes da estrutura secundária das proteínas (hélice-α, folhas β, voltas β e seqüências aleatórias).

A espectrometria de CD baseia-se no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais ou assimétricos (Nakanish *et al.*, 1994). No caso das proteínas, estes grupos assimétricos envolvem principalmente as ligações peptídicas, as cadeias laterais dos aminoácidos, e grupos prostéticos. Essa luz circularmente polarizada consiste de dois feixes de onda plana, linearmente polarizados, ortogonais entre si e fora de fase por 90°. A onda linearmente polarizada pode ser decomposta em duas componentes individuais circularmente polarizadas: uma à esquerda e a outra à direita. Quando a luz incide em um composto assimétrico, esta é absorvida e cada um dos componentes interage de forma distinta em relação a absortividade específica dos diferentes compostos. Dessa maneira pode-se então definir o CD como a propriedade que consiste na interação distinta para a luz circularmente polarizada a direita e para a luz circularmente polarizada a esquerda emitida com igual intensidade, e o sinal de CD

como sendo a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e a direita.

O espectro de CD é dividido em duas regiões: na região do UV próximo e na região do UV distante. Na região de UV próximo que compreende o intervalo para o comprimento de onda entre 250 a 300 nm, verifica-se a contribuição dos aminoácidos aromáticos e também das pontes dissulfeto. Já na região de UV distante que compreende o intervalo de 190 a 250 nm é dominada pela transição das cadeias peptídicas da proteína e esta região que nos permite estimar a composição da estrutura secundária e acompanhar as possíveis mudanças na estrutura que possam ocorrer durante o experimento. O espectro de CD pode ser considerado como sendo do tipo hélice α quando apresenta um espectro contendo duas bandas negativas em 208 e 222 nm e uma banda positiva em 192 nm. Já o espectro característico de folhas β apresenta uma banda negativa em 216 nm e uma banda positiva em 195 nm (Sreerama *et al.*, 1993).

Estimativa da estrutura secundária de proteínas

O espectro de CD é a contribuição linear de todas as frações de estrutura secundária que constituem uma dada proteína. Sendo assim, pela análise e desconvolução de um espectro de CD é possível estimar a composição de estruturas secundárias. Para isso é necessário empregar um programa para desconvolução espectral. Por outro lado, através do espectro de CD também é possível agrupar as proteínas em cinco classes distintas: toda-α, toda-β, α+β (regiões separadas), α/β (regiões interconectadas) e randômica (altamente desordenada), utilizando-se um

método matemático chamado análise de "cluster" (Venyaminov et al,. 1994, [illegible] lamar ColoState EDU/~sreeram/CDPro/).

No presente trabalho, foi usado o programa *Self Consistent* (SELCON-3) (Seerama et al, 2000), usando um grupo de proteínas de referência selecionado pelo programa "cluster", dentro do banco de 43 proteínas disponíveis no mesmo. Por esse método, o espectro da proteína a ser analisado é incluído em uma matriz com dados espectrais de CD e é selecionado inicialmente a estrutura de uma proteína de referência ao acaso. A equação da matriz que relaciona o espectro de CD à estrutura secundária, F=XC, é resolvida pelo algoritmo de decomposição de valor singular (SVD) utilizado pelo SELCON 3. A solução inicial é substituída por outra e o processo é repetido até que a auto-consistência seja alcançada (Sreerama *et al.*, 2000).

O estudo do enovelamento da proteína de fusão em solução foi realizado em colaboração com a Profª Leila Maria Beltramini, do Laboratório de Biofísica da USP de São Carlos. As medidas de CD procederam em um espectropolarímetro Jasco J715. A solução contendo a proteína *GumC*-MBP, a uma concentração de 0,26mg/mL, foram adicionadas em cubetas de quartzo, do tipo circular, de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 250 nm, à temperatura ambiente, 22°C com, em média 10 varreduras.

3.1.4.2) - Produção de Anticorpos

A produção de anticorpos anti-*GumC*-MBP foi realizada com a fusão *GumC*-MBP parcialmente pura (eluída da coluna de amilose). Este experimento foi feito de

acordo com a literatura (Sambrook and Russell., 2001). Três camundongos foram utilizados na produção do anticorpo. A primeira inoculação (primeira dose) foi realizada utilizando 50μL (100μg) do antígeno e 50μL de adjuvante. Após 40 dias, fizemos a segunda inoculação, injetando 100μL (15μg) da proteína *GumC*-MBP sem a presença de adjuvante. Decorridos 10 dias da segunda inoculação, sangramos o animal. O sangue total foi coagulado em banho-maria a 37°C e após centrifugado por 30 minutos, 10.000 rpm a 4°C. O soro (sobrenadante do centrifugado) contendo anticorpos contra a proteína de interesse foi incubado com um lisado de cultura de células da cepa de *E. coli* BL21 para diminuir as reações cruzadas causadas pela contaminação com proteínas da bactéria *E. coli*. A titulação do anticorpo foi feita nas seguintes concentrações de anti-*GumC*-MBP em solução TBS 1:1000, 1: 5000, 1: 10.000, 1 : 15.000, 1:20.000, 1:30.000, 1:40.000, 1:50.000, 1: 60.000 e 1 : 70.000.

As amostras das diluições foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 15%, e a transferência em membrana de nitrocelulose foi realizada por 5hs. As tiras de nitrocelulose contendo *GumC*-MBP foram incubadas com anticorpo anti-*GumC*-MBP (nas suas diversas diluições) a fim de verificar a titulação do anticorpo.

3.1.4.2.1) – Caracterização da proteína *GumC*-MBP através de Western Blotting

A amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP foi aplicada em gel SDS-PAGE a 15%. Este gel foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi corada com Ponceau 0.5% e as bandas das proteínas foram marcadas na membrana. A membrana foi deixada em contato com uma solução de leite em pó

dissolvido em TBS por 12 horas para o bloqueio de sítios inespecíficos. A membrana foi lavada em TBS para retirada do leite e incubada com o primeiro anticorpo (anticorpo monoclonal anti-*GumC*-MBP) por 2 horas. Novamente a membrana foi lavada com TBS e colocada em contato com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) marcado com fosfatase alcalina por mais 2 horas. A membrana foi lavada com TBS novamente. A membrana então foi revelada com uma solução contendo NTB (nitroblue de tetrazólio) e BCIP (5-Bromocloroindolil-fosfato) por 10 minutos. A membrana foi lavada com água para interromper a reação.

3.1.5) – Testes de cristalização da proteína de fusão *GumC*-MBP

Os experimentos de cristalização foram realizados com a proteína de fusão *GumC*-MBP a 5,4mg/mL em tampão de amilose com 0,33% de Triton X-100. Foi utilizada a técnica de difusão de vapor com gotas penduradas (Ducruix and Giegé, 1992; Blundell and Johnson, 1976) com a gota constituída de 5µl da solução de proteína (a 5,4mg/mL) e 5µl da solução do poço. Foram feitos, inicialmente, a 18^{0}C, experimentos com os 2 Fatoriais Crystal Screen da Hampton.

Experimentos de otimização da cristalização da proteína de fusão *GumC*-MBP foram realizados com a proteína de fusão *GumC*-MBP, nas concentrações de 5,9mg/mL e 6,5 mg/mL, em tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) com 0,33% de Triton X-100. Também foi utilizada a técnica de difusão de vapor com gotas penduradas a 18°C (Blundell, 1976), utilizando 500µL de cada solução de cristalização no poço, e em cada lamínula 4µL de proteína e 4 µL de solução do poço. Foram realizados testes de cristalização para as condições 23 (0,2M Cloreto de

Magnésio hexahidratado, 0,1M Hepes-Na pH7,5 e 30% v/v de Polietilenoglicol (PEG) 400) do Fatorial Crystal Screen I e 7 (10% v/v de Polietilenoglicol 1000 e 10% de Polietilenoglicol 8000) do Fatorial Crystal Screen II, de forma a fazer uma varredura ao redor destas condições. Neste experimento variamos as concentrações de sal e polietilenoglicol para a condição 23 do Fatorial I e as concentrações de polietilenoglicol 1000 e 8000 para a condição 7 do Fatorial 2. Fatoriais I e II (Hampton), MembFac, Fatorial PEG.

Também foram realizados experimentos de cristalização com a proteína de fusão *GumC*-MBP utilizando a técnica de difusão de vapor com gotas sentadas a 4 e 18°C (Blundell, 1976). Cada poço continha 60μL de solução de cristalização e as gotas eram constituídas de 0,6μL de proteína (nas concentrações de 5,7mg/mL e 5,5 mg/mL) em tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) com 0,33% de Triton X-100 e 0,6μL de solução do poço. Estes experimentos foram realizados pelo robô Hydra. Foram realizados testes com os Fatoriais I e II (Hampton), Fatorial PEG-ÍON e INDEX (soluções feitas em laboratório). A 4°C também foram realizados experimentos de cristalização com o Fatorial MembFac com a proteína de fusão na concentração de 5,8mg/mL.

Foram realizadas varreduras nas condições do Fatorial MembFac, condição 1 (0,1M cloreto de sódio, 0,1M Acetato de sódio trihidratado, pH4,6 e 12% MPD - e condição 2 (0,1M Acetato de zinco, 0,1M de acetato de sódio, pH4,6 e 12% de PEG 4000). Foram feitos 'screening' destas condições onde concentrações de sais e de PEGs foram variadas. Estes experimentos de cristalização foram realizados a temperatura de 4 e 18°C.

3.1.6) - Estudos de estabilidade da proteína *GumC*-MBP através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz

3.1.6.1) - Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)

O espalhamento de luz por moléculas é um processo interessante na investigação da massa molecular e da homogeneidade das macromoléculas. As técnicas de espalhamento de luz, além de outras utilizações, como estudo de ligantes, associação e dissociação de oligômeros, são usadas para estudar proteínas próximas do ponto de supersaturação e na presença de agentes precipitantes para estabelecer condições de cristalização (Zulauf *et al*, 1992).

Definição: Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL), também conhecido como espectroscopia de correlação de fóton ou espectroscopia de espalhamento de luz quasi-elástica, é a técnica para medir o coeficiente de difusão translacional de uma macromolécula através do movimento aleatório (Browniano) que as moléculas sofrem na solução (Ferré-D'Amaré *et al*, 1997).

O espalhamento da luz monocromática, ocasionado pelo movimento das partículas, mostrará flutuação de intensidades que corresponde às partículas em movimento. O conhecimento destas distintas intensidades, permite obter informações a respeito do movimento das partículas, ou seja, do coeficiente de difusão e dimensões das macromoléculas (Santos et al, 1996). Este conhecimento é adquirido via função de correlação.

A técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz permite determinar a função de correlação dos fótons. Considerando um equipamento típico de espalhamento de luz, os

fótons são detectados por um simples dispositivo contador. A função de autocorrelação de um sinal para a intensidade de luz espalhada é usada para descrever a correlação entre a intensidade medida no tempo t=0 e a mesma algum tempo depois. A análise do decaimento da função de autocorrelação do sinal de luz espalhada pode dar informação quantitativa sobre o comportamento das partículas em solução.

Cada população monodispersa de partículas produz uma única função de autocorrelação, ou seja, uma única curva de decaimento exponencial. Misturas de mais de uma população de partículas produzem uma soma de exponenciais. Algorítmos como NNLS e CONTIN podem ser usados para extrair distribuições de tamanho de amostras complexas (www.protein-solutions.com).

Nos experimentos de espalhamento dinâmico de luz, o raio (R) da partícula é inferido a partir do coeficiente de difusão (D) e pela equação de Stokes Einstein:

$$D=kT/f = kT/6\pi\eta R$$

onde k é a constante de Boltzman, T é a temperatura, η é a viscosidade e $6\pi\eta R$ descreve o "atrito" para uma esfera compacta no meio viscoso. Na prática, as macromoléculas em solução não são esféricas e o raio calculado da forma acima, a partir do coeficiente de difusão das partículas, oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula hidratada/solvatada designada pela terminologia "raio hidrodinâmico". O raio hidrodinâmico (R_h) inclui o efeito decorrente da forma e da hidratação das partículas (Santos et al, 1996).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

A massa molecular aparente é derivada de uma curva padrão de massas moleculares versus valores medidos de D_T de um conjunto de proteínas globulares conhecidas (Ferré-D'Amaré *et al*, 1997).

Após a eluição da amostra da coluna de amilose (em tampão de amilose: 20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4), utilizamos a amostra contendo a proteína de fusão Gum-CMBP, a uma concentração de 0,2mg/mL, para fazer 'screenings' dos aditivos abaixo relacionados:

- NaCl -0,4M;
- Glicerol – 20%
- OTG (n-Octyl-β-D-thioglucopyranoside) - 5mM (C.M.C.= 9mM);
- Glicose - 0,5M;
- Arginina - 1M;
- NDSB-201 (Non-detergents sulfobetaines) -0,1M;
- Na_2SO_4 0,1M;
- $(NH_4)SO_2$ - 0,1M;
- $CaCl_2$ - 0,1M
- $MgSO_4$ – 0,1M;
- $MgCl_2$ – 0,1M;
- Urea - 0,5M;
- Sucrose – 0,25M;
- EDTA - -10mM;
- Tween-20 – 50uM (CMC 0,0072%);
- NaBr – 0,1M;

- Imidazol - 0,1M;
- Triton X-100 – 0,015% (CMC= 0,015%);
- N-Octyl-β-D-thioglucopyranoside 9mM (CMC = 9mM);

Também foi realizado 'screening' com os Kits Detergent Screen 1, 2 e 3 da Hampton.

Todas as amostras foram centrifugadas a 15000g por 15 minutos e após, analisadas por medidas de EDL (Espalhamento Dinâmico de Luz) para analisar o agregamento da proteína de fusão *GumC*-MBP. As medidas de EDL foram realizadas no equipamento "ProteinSolutions DynaPro".

3.1.6.2) Realização de novos testes de cristalização após estudos de estabilidade

Foram realizados experimentos de cristalização com a proteína de fusão *GumC*-MBP nas concentrações de 5,7mg/mL e 5,5 mg/mL em tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) com 0,015% de Triton X-100.

Os experimentos de cristalização foram realizados pelo robô Hydra utilizando a técnica de difusão de vapor com gotas sentadas cuja metodologia está descrita no ítem 3.1.5. Foram realizados testes com os Fatoriais I e II (Hampton), Fatorial PEG-ÍON e INDEX (soluções feitas em laboratório) a 4 e 18°C.

3.1.7) - Obtenção e caracterização da proteína *GumC* (livre da fusão)

3.1.7.1) - Clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP com o Factor-Xa

Após purificação em coluna de amilose a amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP foi submetida aos experimentos de clivagem com Factor-Xa.

Estimamos a concentração da fusão *GumC*-MBP em aproximadamente 1 mg/mL. O experimento foi realizado segundo o manual do vetor pMAL que sugere que se use a relação 1:100 em massa (1 Factor-Xa : 100 da proteína de fusão).

Fizemos também experimentos de clivagem a 18°C, usando a relação 1:200 e 1:400 em massa (1 Factor Xa:200 da fusão) e (1 Factor Xa:400 da fusão), respectivamente, onde alíquotas com 12 e 20hs de clivagem foram retiradas e analizadas em gel SDP PAGE.

3.1.7.2) – Otimização da clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP

Frações eluídas da coluna de amilose contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP foram reunidas e concentradas em Centripep 50 até concentração de 1 mg/mL para clivagem com a enzima Factor Xa (1:100, w/v) por 15hs a 4°C.

3.1.8) – Purificação da enzima *GumC* após clivagem com o Factor Xa

Após a clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP, tentamos separar a *GumC* da MBP através de várias cromatografias.

- **Cromatografia de troca iônica utilizando a resina de Hidroxiapatita (1mL):**

Aplicamos 900μL do produto da clivagem seguindo o protocolo:

Fluxo: 1mL/minuto;

Coletor: 0,7mL/minuto;

Lavagem: 10 volumes de coluna do tampão Fosfato 20mM pH7,2 (tampão A);

Gradiente: 0 a 100% do tampão B: 0,5M Fosfato pH7,2;

Comprimento do gradiente: 20 volumes de coluna.

- **Cromatografia de filtração a gel Superose-12:**

Foi utilizado o mesmo protocolo para purificação da fusão *GumC*-MBP.

- **Cromatografia de afinidade (amilose):**

Após a passagem da amostra clivada em outros sistemas cromatográficos como troca iônica e filtração a gel, a amostra foi reaplicada na coluna de amilose, com o objetivo de separar a enzima *GumC* da MBP.

- **Cromatografia em Phenil sepharose:**

Após a clivagem com o Factor Xa a amostra foi dialisada contra tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) + 0,5M de Sulfato de Amônio (S.A.) + 1% Tween-20 + 5% glicerol e foi aplicada em coluna Phenil sepharose High Performance (1mL de resina) seguindo o protocolo:

Fluxo: variando de 0,3 a 1mL/minuto;

Lavar a coluna: 20mL de tampão A (tampão de amilose + 0,5M de Sulfato de Amônio + 1% Tween-20 + 5% glicerol);

Gradiente reverso de 0,5M S.A.

- **Cromatografia de troca iônica (Q-sepharose e SP sepharose):** Aplicamos 1mL do produto de clivagem em cada coluna de troca iônica. Realizamos a cromatografia com 4 tampões A diferentes: Mês/NaOH 50mM pH6.0; Tris/HCl

20mM pH7.4; Fosfato 50mM pH 7,3 e Tris/HCl 20mM, pH7,4, 1mM EDTA, 1mMNaN_3, 1% Tween-20 e 15% glicerol. O protocolo seguido foi:

Fluxo:1mL/min;

Coletor: 0,7mL/min;

Lavagem: 25 volumes do tampão A;

Gradiente: 0 a 100% do tampão B (tampão A + 1M NaCl);

Comprimento do gradiente: 50 volumes de coluna.

3.1.9) – Caracterização da enzima *GumC*

3.1.9.1) – Sequenciamento N-terminal

Para sequenciamento do N-terminal a amostra contendo a proteína *GumC* (10 – 20 μg) foi aplicada em gel SDS-PAGE a 15% e eletrotransferida para uma membrana PVDF por 4 hs a 150V. A membrana foi corada com Ponceau e a banda correspondente a enzima *GumC* foi seqüenciada em colaboração com a prof. Dra. Heloísa S. Selistre de Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

3.1.9.2) – Caracterização da proteína *GumC* através de Western Blotting

A amostra contendo a proteína *GumC* foi aplicada em gel SDS-PAGE a 15%. Este gel foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi corada com Ponceau 0.5% e as bandas das proteínas foram marcadas na membrana. A membrana permaneceu em contato com uma solução de leite em pó dissolvido em TBS por 12 horas para o bloqueio de sítios inespecíficos. A membrana foi lavada em TBS para retirada do leite e incubada com o primeiro anticorpo (anticorpo monoclonal anti-

GumC-MBP) por 2 horas. A membrana com TBS foi lavada e colocada em contato com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) marcado com fosfatase alcalina por mais 2 horas. A membrana foi lavada com TBS novamente. A membrana então foi revelada com uma solução contendo NTB (nitroblue de tetrazólio) e BCIP (5-Bromocloroindolil-fosfato) por 10 minutos. A membrana foi lavada com água para interromper a reação.

3.1.9.3) – Determinação da Massa molecular da enzima *GumC*

O peso molecular da enzima *GumC* foi estimado por filtração a gel. A amostra contendo a enzima *GumC* foi aplicada em coluna Superose 12 analítica (Amersham Bioscience) em tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) contendo 0,5% Tween-20 e 5% glicerol. A coluna Superose 12 foi calibrada no mesmo tampão com os padrões (Sigma): BSA (forma monomérica de 66kDa e forma dimérica de 132kDa) e ovoalbumina (45 kDa).

3.1.9.4) - Caracterização da enzima *GumC* quanto ao seu enovelamento por Dicroísmo Circular

A solução contendo a enzima *GumC* na concentração de 0.25 mg/mL, no tampão Tris/HCl 20mM pH7,4, NaCl 200mM, 0,5% de Tween-20 e 5% de glicerol, foi adicionada em cubetas de quartzo, do tipo circular, de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 196 a 250 nm, à temperatura ambiente, 22°C com, em média 10 varreduras. Utilizamos o programa SELCOM para a deconvolução do espectro de CD em estruturas secundárias.

3.1.10) - Testes de cristalização com a proteína *GumC*

Foram feitos testes de cristalização com a proteína *GumC* à 4,5mg/mL em tampão de amilose com 0,33% de Triton X-100, a 18°C. Foram realizados testes com o Fatorial I Crystal Screen (Hampton). Para este experimento utilizamos 500μL de cada solução de cristalização no poço, e a gota foi formada por 3μL de proteína e 3 μL de solução do poço.

3.1.11) - Estudos de modelagem da enzima *GumC*

3.1.11.1)- Ferramentas utilizadas em Modelagem Molecular

A Cristalografia tem sido a técnica mais utilizada para a determinação de estruturas tridimensionais de proteínas, seguida pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A técnica da Cristalografia tem como fator limitante a obtenção de cristais de proteínas, que são arranjos ordenados e periódicos de átomos nas três dimensões. Para crescer cristais, as moléculas da proteína devem ser levadas à supersaturação, estado termodinamicamente instável, que pode resultar numa fase amorfa ou cristalina, quando retorna ao equilíbrio (McPherson, 1982). Um precipitado amorfo corresponde a um mínimo de energia local frequentemente ocorre quando a agregação se dá muito rapidamente. A estratégia usada para induzir a cristalização de macromoléculas é conduzir o sistema lentamente para um estado de solubilidade mínima e, deste modo, atingir o grau desejado de supersaturação. A supersaturação pode ser atingida pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de parâmetros tais como força iônica, pH, tipo de íon, temperatura e concentração de solvente orgânico, que podem ser usados para diminuir a solubilidade da proteína, de forma que a solução pode tornar-se saturada ou supersaturada (Ducruix, 1992).

Devido ao processo empírico na obtenção de cristais e a quantidade de variáveis nem sempre controláveis, o processo de obtenção de cristais se torna limitado. Assim, a Modelagem Molecular representa um ganho de tempo na obtenção de estruturas tridimensionais, já que independe de técnicas experimentais como difração de raios X e RMN.

A técnica de modelagem por homologia prediz estruturas de proteínas levando em conta a semelhança seqüencial de aminoácidos em relação a uma outra proteína de estrutura tridimensional conhecida. O princípio do método baseia-se no fato de que haverá pouca alteração na estrutura tridimensional de uma proteína quando sua seqüência primária é levemente alterada (Sali, Blundell, 1993). Esta técnica tem como limitação a existência de uma proteína homóloga de estrutura conhecida à proteína de estudo.

Novas metodologias têm sido desenvolvidas utilizando a modelagem molecular em casos onde a proteína em estudo não apresenta elevado grau de identidade com a proteína de estrutura tridimensional conhecida.

3.1.11.2)- Programa 'Threader'

Métodos de 'Threading' foram desenvolvidos para reconhecer pares de proteínas que não apresentam similaridades entre as seqüências, porém apresentam 'fold' de estruturas secundárias similares (Jones, 1999). A base desta metodologia está na observação de que duas proteínas podem apresentar enovelamentos semelhantes sem terem elevado grau de identidade seqüencial (McGuffin e Jones, 1992).

Threader 3.3 é um programa que faz a predição da estrutura secundária de proteínas por meio de comparações de enovelamentos corretos e conhecidos, depositados em um banco de dados de estruturas dos mais diversos motivos (Jones, 2002). Se não existirem semelhanças entre o enovelamento da proteína em estudo e das proteínas com estruturas conhecidas na biblioteca, a busca não terá sucesso.

Quatro etapas estão envolvidas no processo de modelagem por threading: seleção da estrutura molde feita pela predição da estrutura secundária da molécula em estudo e comparação em bancos de dados de estruturas, alinhamento da proteína molde e da proteína em estudo, construção do modelo e avaliação ou validação do modelo obtido.

3.1.11.3)- Escolha do molde e alinhamento das estruturas

As estruturas moldes são selecionadas através da comparação das estruturas secundárias da proteína de estudo e das proteínas de estruturas conhecidas que estão depositadas nos bancos de dados. Programas fazem buscas nos mais diversos bancos seqüenciais e protéicos disponíveis na rede como por exemplo o PDB (Protein Data Bank) (Westbrook *et al.*, 2002).

No presente trabalho utilizou-se o programa GenThreader (http://globin.bio.warwick.ac.uk/pred) para gerar o alinhamento entre a proteína estudada e a proteína molde.

3.1.11.4)- Modelagem molecular

O método de modelagem original e, ainda o mais amplamente usado, é o de corpo rígido. Esse método permite a construção do modelo a partir de corpos rígidos que

incluem regiões centrais, conexões e cadeias laterais, todos obtidos de estruturas relacionadas (Taylor, 1994 e Barton, 1998). Outra metodologia empregada é a modelagem por ajuste de segmentos, que atribui posições aproximadas para os átomos conservados nos moldes para calcular as coordenadas de outros átomos (Jones *et al.*, 1986 e Urger *et al.*, 1989). Uma terceira metodologia utilizada é a modelagem por satisfação de restrições espaciais, que usa técnicas de otimização para satisfazer as restrições espaciais obtidas do alinhamento da seqüência alvo com os moldes de estruturas conhecidas. Uma abordagem automatizada para a modelagem molecular comparativa, baseada em restrições espaciais, foi implementado pelo programa Modeller (Sali e Blundell, 1993), que calcula modelos de proteínas impondo restrições espaciais obtidas de estruturas moldes.

A modelagem comparativa realizada pelo programa Modeller inicia-se com o alinhamento entre as moléculas alvo e molde e, juntamente com as informações contidas no arquivo das coordenadas tridimensionais (arquivo pdb), calcula modelos de proteínas impondo restrições espaciais para a seqüência alvo. O arquivo de saída contém os modelos tridimensionais, contendo todos os átomos da cadeia principal e das cadeias laterais com exceção do átomos de hidrogênio.

3.1.11.5)- Avaliação do modelo

A etapa final consiste na avaliação dos modelos gerados. Neste trabalho foram utilizados dois programas de validação, o Procheck e o Verify, que serão descritos brevemente:

- **Procheck:** avalia a geometria global da estrutura ou cada resíduo individualmente, utilizando os seguintes parâmetros esterioquímicos: ângulos torsionais ϕ, ψ e ω, planaridade das ligações peptídicas, o comprimento das ligações e os ângulos de ligações dos átomos da cadeia principal, a geometria da ligação de hidrogênio e os ângulos diedros das cadeias laterais. Cada um dos parâmetros é comparado com o valor médio e o desvio observado em estruturas experimentais.
- **Verify 3D:** A partir de informações de estruturas já conhecidas gera-se uma matriz 20 X 18, conhecida como perfil 3D, que corresponde aos 20 tipos de aminoácidos contra 18 diferentes classes de ambientes químicos definidos segundo a estrutura secundária, exposição ao solvente e contatos com átomos polares. Esse cálculo é feito de acordo com o ambiente de cada resíduo da seqüência, isto é, a probabilidade de se encontrar cada um dos 20 aminoácidos em cada uma das classes de ambientes.

Foi utilizado o programa GenThreader (Jones, 1999) para a busca por proteínas que apresentam estruturas secundárias homólogas a estrutura secundária predita para a *GumC*. Este programa gerou alinhamentos das seqüências baseado nas estruturas secundárias das proteínas e estes alinhamentos foram utilizados na construção dos modelos. Para a construção dos modelos foram utilizadas, independentemente, as 2 proteínas que apresentaram os melhores alinhamentos apresentados pelo programa GenThreader.

Utilizamos o programa Modeller 6.0a (Sali *et al.*, 1993) para a construção dos modelos 1 e 2 (utilizando como moldes as duas proteínas com estrutura cristalográficas

independentes). Foram gerados 50 modelos e estes modelos foram avaliados pelos programas Procheck e Verify 3D.

3.1.12)- Minimização da molécula da proteína *GumC* visando aumento de solubilidade/ estabilidade

3.1.12.1) - Construção do gene *gumc* (sem as extremidades N- e C-terminal originais) no vetor de expressão pMALc-2X e pET29a

- **<u>Construção do gene *gumc* no vetor de expressão pET29a</u>**

Oligonucleotídeos para construção do gene *gumc* (sem as extremidades N- e C-terminal originais) no vetor de expressão pET29b

- **construção 1**

<u>"Primer" CpET Oligo 5'</u>: inicia no 166ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Sequência (5'-3'): GAATTCCATATGCAAAAGTTTCGTGCCACTGCCACG

Sítio NdeI

<u>"Primer" OPC4 Oligo 3':</u> termina no 1251ª nucleotídeo do gene *gumc*

Sequência 5'- 3': ATAAGAATGCGGCCGCATCCACTACCGTCACATTGTTAC

Sítio NotI

- **<u>Construção do gene *gumc* no vetor de expressão pMALc-2x</u>**

Oligonucleotídeos originais utilizados para construção do gene *gumc* no vetor de expressão pMALc-2X

- **construção original**

"Primer" CpMAL Oligo 5': inicia no 1ª nucleotídeo do gene *gumc*

Seqüência (5'-3'): GTAGAATTCACTATGGATTATCC

Sítio EcoRI

"Primer" CpMAL Oligo 3': termina no 1410ª nucleotídeo, último nucleotídeo do gene *gumc*

Seqüência (5'-3'): TACTCTAGACTCAATACAACTGCC

Sítio XbaI Códon de terminação

Oligonucleotídeos para construção do gene *gumc* (sem as extremidades N- e C-terminal originais) no vetor de expressão pMALc-2x

- **construção 2**

"Primer" CpMAL5'mod2: Oligo 5': inicia no 166ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Seqüência (5'-3'): CGGAATTCCAAAAGTTTCGTGCCACTGCCACG

Sítio *EcoRI*

OPC2 Primer 3': termina no 1251ª nucleotídeo do gene *gumc*

Sequência 5'-3': TGCTCTAGAATTATCCACTACCGTCACATTGTTAC-3'

Sítio *XbaI* Códon de terminação

- **construção 3**

"Primer" CpMAL5'mod2: Oligo 5': inicia no 166ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Seqüência (5'-3'): CGGAATTCCAAAAGTTTCGTGCCACTGCCACG

Sítio *EcoRI*

OPC3 Primer 3': termina no 1281ª nucleotídeo do gene *gumc*

5'-TGCTCTAGAATTCGAAATTGGGCGGCTCGGAA-3'

Sítio *XbaI* Códon de terminação

- **construção 4**

Primer OPC1 Primer 5': inicia no 178ª nucleotídeo do gene *gumc*

Sequência (5'-3'): CCGGAATTCGCCACTGCCACGTTACAGATT-3'

Sítio EcoRI

OPC2 Primer 3': termina no 1251ª nucleotídeo do gene *gumc*

Sequência 5'-3': TGCTCTAGAATTATCCACTACCGTCACATTGTTAC-3'

Sítio *XbaI* Códon de terminação

- **construção 5**

Primer OPC1 Primer 5': inicia no 178ª nucleotídeo do gene *gumc*

Sequência (5'-3'): CCGGAATTCGCCACTGCCACGTTACAGATT-3'

Sítio EcoRI

OPC3 Primer 3': termina no 1281ª nucleotídeo do gene *gumc*

5'-TGCTCTAGAATTCGAAATTGGGCGGCTCGGAA-3'

Sítio *XbaI* Códon de terminação

- **construção 6**

"Primer" CpMALmod.5': Oligo 5': inicia no 124ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Seqüência (5'-3'): CGGAATTCGGCGCAACTTCGCTAGCCCTTGG

Sítio *EcoRI*

OPC2 Primer 3': termina no 1251ª nucleotídeo do gene *gumc*

Sequência 5'-3': TGCTCTAGAATTATCCACTACCGTCACATTGTTAC-3'

Sítio *XbaI* Códon de terminação

- **construção 7**

"Primer" CpMALmod.5': Oligo 5': inicia no 124ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Seqüência (5'-3'): CGGAATTCGGCGCAACTTCGCTAGCCCTTGG

Sítio *EcoRI*

OPC3 Primer 3': termina no 1281ª nucleotídeo do gene *gumc*

5'-TGCTCTAGAATTCGAAATTGGGCGGCTCGGAA-3'

Sítio *XbaI* Códon de terminação

Oligonucleotídeos para construção do gene *gumc* (sem a extremidade N- terminal original) no vetor de expressão pMALc-2x

- **construção 8**

"Primer" CpMAL5'mod2: Oligo 5': inicia no 166ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Seqüência (5'-3'): CGGAATTCCAAAAGTTTCGTGCCACTGCCACG

Sítio *EcoRI*

"Primer" CpMAL Oligo 3': termina no 1410ª nucleotídeo, último nucleotídeo do gene *gumc*

Seqüência (5'-3'): TACTCTAGACTCAATACAACTGCC

Sítio *XbaI* Códon de terminação

- **construção 9**

"Primer" CpMALmod.5': Oligo 5': inicia no 124ª nucleotídeo do gene *gumc*:

Seqüência (5'-3'): CGGAATTCGGCGCAACTTCGCTAGCCCTTGG

Sítio *EcoRI*

"Primer" CpMAL Oligo 3': termina no 1410ª nucleotídeo, último nucleotídeo do gene *gumc*

Seqüência (5'-3'): TACTCTAGACTCAATACAACTGCC

Sítio *XbaI* Códon de terminação

Através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) conseguimos obter cópias do gene *gumc* já com sítios de digestão para subclonagem das construções desenhadas. A PCR foi realizada seguindo o protocolo do "kit" Invitrogen:

- 2 µL do DNA plasmidial *gumc*;
- 1µL dNTP (mistura de bases de nucleotídeos) 10mM;
- 1,5 µL de $MgCl_2$ 50mM;
- 5 µL de tampão do PCR 10X;
- 0.2 µL da enzima Taq polimerase 5U/uL ;
- 1 µL de cada oligonucleotídeo;
- Completar até 50 µL com H_2O Milli-Q.

Esta mistura de reagentes, totalizando 50 µL, foi colocada no termociclador obedecendo o seguinte programa:

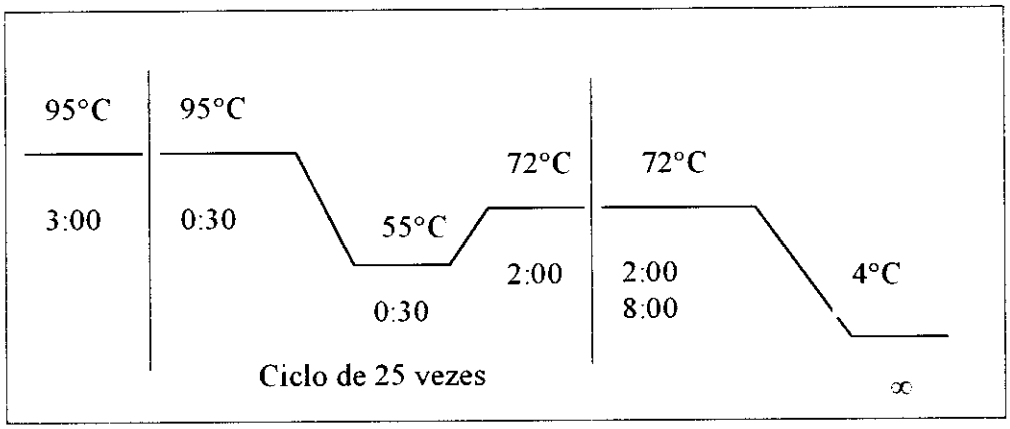


Figura 3.1 – Esquema mostrando a escala de tempos e temperaturas utilizadas no PCR.

Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% marcada com brometo de etídio (0,5 μg/mL) em tampão TAE 05X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA pH8,0).

Em seguida foi feito gel preparativo com o produto final da PCR e purificação deste com o kit Concert™ Rapid Gel Extraction System.

3.1.12.2) – Subclonagem das diversas construções do gene *gumc* no vetor de clonagem pGEM-T

A partir das diferentes construções do gene *gumc* amplificadas por PCR e purificadas, fizemos a ligação destas com o vetor de clonagem pGEM-T (PROMEGA), seguindo o protocolo abaixo:

- 5 μL tampão 2X concentrado (PROMEGA);
- 1 μL do vetor pGEM;
- 2 μL do DNA *gumc* (produto de PCR purificado);
- 1 μL H_2O milliQ;

- 1 μL da enzima T4 DNA ligase (PROMEGA);

Esta reação ocorreu a 4°C, por 20hs.

3.1.12.3) – Transformação em cepas de *E. coli* DH5α dos produtos das ligações

Após a ligação das diferentes construções do gene *gumc* no vetor de clonagem, fizemos a transformação, seguindo o protocolo de Hanahan (1983), em células competentes DH5α onde 5 μL da ligação foi adicionado em 50 μL de bactérias DH5α competentes previamente descongeladas. Deixamos em repouso por 30 minutos em gelo. O choque térmico foi realizado adicionando a cultura a 42°C durante 2 minutos. Deixamos as bactérias no gelo por mais 3 minutos e adicionamos 270 μL de meio de cultura SOC (2% bactotriptona, 0.5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$ e 20 mM de glicose, pH 6.8) previamente aquecido e incubamos a 37°C por 60 minutos.

A mistura (200 μL) foi plaqueada em meio LB contendo o antibiótico específico para cada vetor. Incubamos durante a noite a 37°C. Após crescimento das colônias recombinantes, colônias foram escolhidas. Fizemos pré inóculos com 5 mL de meio LB, 50 ug/mL de ampicilina contendo as colônias e estes foram crescidos a 37°C, 250 rpm, por 12 horas.

3.1.12.4) - Extração dos DNAs Plasmidiais das diferentes construções *gumc*-pGEM-T e ligação destas nos seus respectivos vetores de expressão

Extraímos o DNA plasmidial da cultura das colônias transformantes usando o Kit Concert (Invitrogen). A análise desta extração foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0.8%.

A digestão dos DNAs plasmidiais das diferentes construções *gumc*-pGEM foi realizada utilizando as endonucleases *NheI* e *NotI* para o gene *gumc* (construção para subclonagem no vetor pET29b) e *EcoRI* e *XbaI* para o gene *gumc* (construções para subclonagem no vetor pMALc-2X), seguindo o protocolo do "kit" da Invitrogen:

- 25 μL de DNA gum-vetor de clonagem;
- 1 μL de cada enzima de restrição;
- 3 μL de tampão 10X (Gibco).

Utilizando o mesmo protocolo, os vetores pET29b e pMALc-2x foram digeridos (com as mesmas endonucleases utilizadas na digestão das construções descritas acima).

As reações de digestão ocorreram a 37°C por 3 hs. Os insertos e vetores digeridos foram purificados em gel de agarose preparativo.

Após a digestão dos DNAs plasmidiais e dos vetores, corremos um gel de agarose preparativo seguido de nova purificação utilizando o kit Concert™.

A partir dos DNAs e dos vetores digeridos e purificados, fizemos a ligação do DNA com seu vetor, seguindo o protocolo:

Para a construção *gumc*-pET29b:

- 1 μL do tampão T_4 DNA ligase 5X;
- 1 μL da enzima T_4 DNA ligase;
- 6 μL do vetor pET29b digerido e purificado;
- 1 μL do gene *gumc* (construção 1) digerido e purificado;

- 1 μL de H_2O.

Para as diferentes construções *gumc*-pMALc-2x:

- 1 μL do tampão T_4 DNA ligase 5X;
- 1 μL da enzima T_4 DNA ligase;
- 2 μL do vetor pMALc-2X digerido e purificado;
- 1 μL do gene *gumc* (construções de 2 a 9) digerido e purificado;
- 5 μL de H_2O.

Estas reações ocorreram a 4°C por 20hs.

Para a transformação em DH5α, utilizamos o protocolo: 100 μL de DH5α competentes, 5 μL da ligação *gumc*-vetor, deixamos 2 minutos a 42°C, depois deixamos em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida adicionamos 270 μL de meio LB e deixamos em estufa a 37°C por 1h. Após plaqueamos todo o volume em meio sólido LB/ágar.

Nova transformação foi realizada utilizando agora a cepa de *E. coli BL21 (DE3) pLysS* e *E. coli BL21 (DE3)*. O protocolo de transformação utilizado foi o de Hanahan (1983) relatado acima.

3.1.12.5) – Sequenciamento de DNA

Os genes das construções *gumc* (C5, C8 e C9) clonado no vetor de expressão pMAL-c2x foram sequenciados pelo método de Sanger utilizando o equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela especialista de laboratório Susana Andréa Sculaccio. Para o sequenciamento das construções *gumc* (C5, C8 e C9)) foram utilizados os primers do vetor pMAlc-2x ("primer" 5'(malE primer) e "primer" 3' (reverse)) e os primers OPC1 Primer 5' e OPC3 Primer 3' para a construção C5, os primers CpMAL5'mod2 e

CpMAL Oligo 3'para a construção C8 e os primers CpMALmod.5'e CpMAL Oligo 3'para a construção C9. As sequências obtidas, foram verificadas e alinhadas utilizando o programa Blast.

3.1.12.6) – Expressão das proteínas de fusão *GumC*-MBP modificadas C5, C8 e C9 no vetor de expressão pMALc-2X

O pré-inóculo consistiu de 5 mL de meio LB líquido juntamente com 50 ug/mL de ampicilina e 1 colônia transformante em células de *E. coli* BL21 (DE3). O crescimento ocorreu a 37°C sob agitação a 250 rpm por 12 horas. Deste pré-inóculo, 5 mL foram adicionados a 1000 ml de meio 2XYT, 100 ug/mL de ampicilina e 0,2% de glicose e foi incubado nas mesmas condições que foram usadas para o pré-inóculo.

Quando a cultura atingiu a densidade óptica de 1,2 em 600 nm, a cultura foi resfriada em gelo e após foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG), na concentração final 0,6mM, e a expressão da proteína de fusão *GumC*-MBP ocorreu a 20°C por 20hs. As células foram separadas do meio por centrifugação a 4000 g durante 30 minutos a 4°C e ressuspendidas em 50 mL de tampão de lise ou tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) contendo 1% de Triton X-100, os inibidores de proteases Pepstatin, Leupeptin e PMSF e o redutor β-mercaptoetanol).

3.1.12.7) – Lise celular

Após a ressuspensão das células no seu respectivo tampão, estas foram deixadas em gelo por 30 minutos para uma maior solubilização em Triton X-100. A lise celular foi realizada através da técnica de sonicação. O extrato foi sonicado por 30" com 60" de

intervalo por um total de 6 minutos. Após a sonicação, o lisado foi centrifugado por 50 minutos a 9000g a 4°C.

3.1.12.8) – Ensaios de purificação das proteínas modificadas *GumC*-MBP

O sobrenadante do lisado é filtrado em papel de filtro e diluído 3 vezes com tampão de coluna. A amostra foi aplicada na coluna de amilose (1,0 mL de resina), previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de coluna (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) acrescido de 0,015% de Triton X-100. O fluxo utilizado foi de 0,6 mL/minuto. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 30 volumes de tampão de coluna.

Em seguida a proteína de fusão *GumC*-MBP foi eluída com 4 volumes de tampão de coluna (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) acrescido de 10 mM de maltose e 0,015% de Triton X-100.

3.1.12.9) - Caracterização da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 através de dicroísmo circular

O estudo do enovelamento da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada 5C em solução foi realizado em colaboração com a Profª Leila Maria Beltramini, do Laboratório de Biofísica da USP de São Carlos. As medidas de CD procederam em um espectropolarímetro Jasco J715 e foram realizadas pela especialista de laboratório Andressa Patrícia Alves Pinto. A solução contendo a proteína *GumC*-MBP em tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4), a uma concentração de 0,2mg/mL, foram adicionadas em cubetas de quartzo, do tipo circular,

de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 250 nm, à temperatura ambiente, 22°C com, em média 10 varreduras.

3.1.12.10) - Clivagem da proteína *GumC* modificada C5 com Factor Xa

Após eluição da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 da coluna de amilose, as frações foram reunidas, concentradas até 1mg/mL para experimentos de clivagem com a enzima Factor Xa. Utilizamos a proporção 1:100 (Factor Xa : *GumC*C5-MBP) e a clivagem ocorreu a 4°C. Alíquotas do processo de clivagem foram analisadas em 3, 6 e 15hs de clivagem.

3.2)- Enzima Glicosiltransferase IV (*GumK*)

3.2.1)- Clonagem do gene gumk no vetor pMALc-2x e transformação em cepa de *E.coli* BL21(DE3) do gene *gumk*

O gene *gumc*, originário do cosmídeo 07A02, foi clonado no vetor de expressão pMal-c2x (colaboração com o Prof. Paulo Arruda – UNICAMP). Para a transformação, 5 µL do DNA do gene *gumk* no plasmídeo de expressão pMALc-2x foi adicionado em 50 µL de bactéria competente *E. coli BL21 (DE3)* previamente descongelada. O choque térmico foi realizado a 42°C durante 2 minutos. As bactérias foram deixadas em gelo por mais 3 minutos e foi adicionado 250 µL de meio de cultura SOC (2 % bactotriptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$ e 20 mM de glicose, pH 6,8), previamente aquecido, e em seguida, as células foram incubadas a 37°C por 60 minutos.

A mistura foi então centrifugada, retiramos 150 μL do sobrenadante e o pellet foi ressuspendido nos 150 μL restantes. Estes 150 μL foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB/ágar e o antibiótico específico para o vetor (ampicilina). A placa foi incubada durante a noite a 37°C.

Após este período de incubação, algumas colônias transformantes que cresceram foram escolhidas para expressão.

3.2.2)- Expressão da proteína de fusão *GumK*-MBP

O pré-inóculo consistiu de 5 mL de meio 2XYT líquido juntamente com 30 ug/mL de ampicilina e 1 colônia transformante em células de *E. coli* BL21 (DE3). O crescimento ocorreu a 37°C sob agitação a 250 rpm por 12 horas. Deste pré-inóculo, 5 mL foi adicionado a 1L de meio 2XYT, 30 ug/mL de ampicilina e solução de glicose para concentração final de 0,2%.

O crescimento ocorreu a 37°C sob agitação a 250 rpm por 4 h. Quando atingida a densidade ótica (DO) de 1,2 a 600 nm, a cultura foi resfriada em gelo e em seguida foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG) na concentração final 1 mM, e a expressão da enzima *GumK*-MBP ocorreu a 22°C por 20 h. As células foram separadas do meio por centrifugação a 6000 g durante 30 minutos a 4°C, e ressuspendidas em 50 mL de tampão para coluna de amilose (Tris/HCL 20 mM, NaCl 200 mM, NaN_3 1mM, pH 7,4) e congelada a -20°C.

3.2.3)- Lise celular

A lise celular foi realizada através da adição de 1% (massa/volume) de lisozima, ficando o extrato bruto em gelo por 15 minutos. Após este intervalo, $MgCl_2$ foi

adicionado na concentração final de 10 mM e DNAse. O extrato bruto foi deixado em gelo por 30 minutos. Após este intervalo, o extrato foi sonicado 8 vezes (30 s cada vez, com intervalos de 1 minuto). Após a sonicação, o lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9000 g a 4°C.

3.2.4)- Purificação da proteína de fusão *GumK*- MBP

A amostra foi aplicada na coluna de amilose (5 mL de resina), previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de coluna de Amilose(Tris/HCL 20 mM, NaCl 200 mM, NaN_3 1mM, pH 7,4). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/minuto. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 20 volumes de tampão de coluna. Em seguida, a proteína de fusão *GumK*-MBP foi eluída com 4 volumes de tampão de coluna acrescidos de 10 mM de maltose.

A purificação foi acompanhada por gel SDS-PAGE a 15 %. As frações similares foram reunidas para novo passo de purificação.

3.2.4.1) - Cromatografia de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow

As frações eluídas na coluna de amilose contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP, foram reunidas, dialisadas contra um tampão de fosfato de sódio 25mM, pH 8,5 para serem aplicadas em 75 mL da resina previamente equilibrada no mesmo tampão, seguimos o seguinte programa no sistema ÄKTA Explorer:

Fluxo: 1 mL/min

Lavar coluna: até 150 mL (2 volumes de coluna) de tampão A (fosfato de sódio)

Gradiente: 0 a 100 % de tampão B (tampão A + 1 M de NaCl)

Comprimento do gradiente: 450 mL (6 volumes de coluna)

Lavar coluna: 50 mL de tampão B

Lavar coluna: 50 mL de tampão A

Coletor: 5 mL de fração

3.2.4.2- Precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com Sulfato de amônio (S.A.)

Frações eluídas da coluna de amilose foram reunidas para precipitação com S.A. seguindo o protocolo:

Adicionamos lentamente o correspondente a 10% de S.A. à amostra contendo a proteína de fusão e deixamos agitando por 20 minutos a 4°C. Centrifugamos a 15000g por 15 minutos. Separamos o pellet e ressuspendeu-o com o mesmo volume anterior de tampão de amilose. Adicionamos ao sobrenadante lentamente o correspondente a 15% de S.A. e deixamos agitando novamente por 20 minutos a 4°C. Novamente centrifugamos por 15 minutos a 15000g. Repetimos este procedimento para as concentrações de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60% de S.A. Este experimento foi analisado através de gel SDS-PAGE.

3.2.5.) - Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP

3.2.5.1) - Caracterização da proteína *GumK*-MBP através de imunoblotting.

Aplicamos a amostra de *GumK*-MBP em gel SDS-PAGE 15 % e esta foi eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose por 5 h. A membrana foi corada com Ponceau 0,5 % em 0,1 % de ácido acético e as bandas de interesse foram marcadas

por pequenas perfurações nas laterais. Depois, a membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (leite desnatado em TBS 1X) por 20 h. Passado este período de incubação, a membrana foi lavada com TBS 1X e incubada com o anticorpo anti-MBP por 2 h, seguido de nova lavagem e incubação com o anticorpo anti-IgG de camundongo por mais 2 h. Esta membrana foi então revelada com os reagentes BCIP/NBT (BioRad).

3.2.5.2) - Caracterização da proteína de Fusão *GumK*-MBP quanto ao enovelamento

O estudo do enovelamento da proteína de fusão *GumK*-MBP em solução foi realizado em colaboração com a Profª Leila Maria Beltramini, do Laboratório de Biofísica da USP de São Carlos. As medidas de CD procederam em um espectropolarímetro Jasco J715. A solução contendo a proteína *GumC*-MBP, a uma concentração de 0,15mg/mL, foram adicionadas em cubetas de quartzo, do tipo circular, de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 250 nm, à temperatura ambiente, 22°C com, em média 10 varreduras.

3.2.6) - Testes de cristalização com a proteína de fusão *GUMK*-MBP

Os experimentos de cristalização foram realizados com a proteína de fusão *GumK*-MBP na concentração de 5,0 mg/mL. Utilizamos a técnica de difusão de vapor com gotas penduradas a 18°C (Blundell, 1976), com os fatoriais I e II da Hampton™. Em cada poço utilizamos 500 μL de solução de cristalização e para a gota foram 3 μL de proteína + 3 μL da solução do poço correspondente.

Também foram realizados experimentos de cristalização com a proteína de fusão *GumK*-MBP na concentração de 8,0 mg/mL. Utilizamos a técnica de difusão de vapor

com gotas penduradas a 18°C, com os Fatoriais I e II, Fatorial MembFac da Hampton™, Fatorial PEG 6000 e fatorial 'The PEGs' da Nextal. Em cada poço utilizamos 500 μL de solução de cristalização e para a gota foram 3 μL de proteína + 3 μL da solução do poço correspondente.

3.2.7) - Clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP com a enzima Factor Xa

Após a eluição da proteína de fusão da coluna de amilose, a amostra foi submetida a testes de clivagem com factor-Xa.

A concentração de *GumK*-MBP foi estimada em aproximadamente 1 mg/mL. O experimento foi realizado segundo o manual do vetor pMAL que sugere a relação 1:100 em massa (1 fator Xa:100 da proteína de fusão). Testes com SDS (dodecil sulfato de sódio) nas concentrações de 0,001 %, 0,003 % e 0,005 % foram avaliados no processo de clivagem. O processo de clivagem foi realizado a 18°C.

3.2.8)- Purificação de proteína *GumK*

Após a clivagem da proteína *GumK* que estava em fusão com a MBP, a amostra foi aplicada em coluna de troca catiônica POROS 20 HS® (0,46 X 10 cm) no aparelho de HPLC ÄKTA. A eluição ocorreu com 30 mL de tampão 20 mM HEPES pH 6,0 com um gradiente linear de NaCl, de 0 a 1,0 M, num fluxo de 0,5 mL/min.

3.2.9)- Testes de cristalização com a proteína *GumK*

Os experimentos de cristalização foram realizados com a proteína *GumK* livre da fusão com a 'Maltose Binding Protein' na concentração de 4,0 mg/mL em tampão Hepes 20mM, NaCl 300mM, pH 6,0 .

O método utilizado foi o de difusão de vapor com gotas penduradas a 18°C. Em cada poço utilizamos 500 μL de solução de cristalização e para a gota foram utilizados 3 μL de proteína e 3 μL da solução do poço correspondente. Para este experimento foram testados o fatorial MembFac (Hampton), o fatorial 'The Pegs' (Nextal) e os fatoriais I e II Crystal Screen (Hampton).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

3.3)- Referências Bibliográficas

BARTON, G. J. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., v. 54, p. 1139-1146, 1998.

BLUNDELL, T.L. and JOHNSON, L.N. **Protein Crystallography. Academic Press,** New York, 1976.

DUCRUIX, A. and GIEGÉ, R. Crystallization of Nucleic Acids and proteins-The practical approach series, **Oxford University Press**, New York, USA, 1992.

Ferré-D'Amaré & Burley, S. K. Dynamic Light Scattering in Evaluating Crystallizability of Macromolecules. **Methods in Enzymology**, 276, 157-166, 1997.

JONES, D.T.; TAYLOR, W.R. e THORNTON, J.M. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. **J. M. Biochem.** v. 33, p. 3038-3049, 1994.

JONES, T.A. e THIRUP, S. Using known substructures in protein model building and crystallography. **J.EMBO** v. 5, p. 819-822, 1986.

JONES, D.T. J. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Mol. Biol.** v. 292, p. 195-202, 1999.

McPHERSON, A. Preparation and analysis of Protein Crystals New York. , 1982.

McGUFFIN, L.J e JONES, D.T. Targeting novel folds for structural genomics. **Proteins** v. 1, p. 44-52, 2002.

NAKANISH, K.; BEROVA, N.; and WOODY, R.W. Ciucular Dichroism – Principles and Applications. Nova Yorque, **V.CH Publishers, Inc** 1994.

SALI, A. and BLUNDELL, T.L. **J. Mol. Biol.** v. 234, p. 779-815, 1993.

SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual** 3 ed. New York v. 3, 2000.

SANTOS, N.C. e CASTANHO, M.A. Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. **Biophys J.** 71(3):1641-50, 1996.

SREERAMA. N. and WOODY. R.W. Estimation Of Protein Secundary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN. SELCON. and CDSSTR Methods with na Expanded Reference Set **Anal. Biochem.** v. 287. p. 252-260. 2000.

TAYLOR, W.R. e FLORES, T.P. **Protein Sci.** v. 3, p. 1858-1870, 1994.

URGER, R.; HAREL, D.; WHERLAND, S. e SUSSMAN, J.L. **Proteins** v. 5, p. 355-373, 1989.

ZULAUF, M. e D'ARCY, A. Light Scattering of proteins as a criterion for crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v.122, p.102-106, 1992.

YAO, B. Dynamic Light Scattering Technology and Application to Protein Crystallization. **Protein Corporation**, 2004.

ENZIMA *GUMC*

Neste capítulo descreveremos os resultados e discussões dos estudos realizados para obtenção e caracterização da enzima *GumC*.

4.1) Clonagem do gene *gumc* e expressão da proteína *GumC*

O gene *gumc*, originário do cosmídeo 07A02, foi clonado no vetor de expressão pMal-c2x (colaboração com o Prof. Paulo Arruda – UNICAMP). A expressão neste vetor faz com que se obtenha uma proteína em fusão com a MBP (Maltose Binding Protein), o que facilitaria a expressão na forma solúvel e também a purificação em coluna de afinidade (amilose).

Este vetor foi inicialmente escolhido para a clonagem dos genes gum por apresentar algumas características, que poderiam melhorar e facilitar os processos de expressão e purificação das proteínas, como por exemplo:

- utilização do forte promotor indutível tac e o sinal de inicialização translacional *malE* para dar um alto nível de expressão do gene clonado;
- expressão da proteína de interesse em fusão com a maltose-binding-protein (MBP) que facilita a purificação através de afinidade da MBP por resina de amilose.
- o vetor pMAL também inclui a seqüência que codifica os 4 aminoácidos que constituem o sítio de reconhecimento da protease Fator-Xa. A presença deste sítio

permite que a proteína de interesse seja separada da MBP após a purificação da proteína de fusão. O Fator-Xa cliva após a Arginina na seqüência Ile-Glu-Gly-Arg.

Em estudos anteriores (De Pieri, 2002 e De Pieri *et al.*, 2004) observamos dificuldades em expressar a proteína de fusão *GumC*-MBP solúvel e em grande quantidade.

A proteína de fusão *GumC*-MBP foi expressa em células de *E. coli* DH5α, majoritariamente na forma insolúvel embora uma pequena parte permanecesse solúvel (figura 4.1). A análise de expressão proteica realizada através de SDS-PAGE 15% revelou a expressão da proteína de fusão *GumC*-MBP com um peso molecular aproximado de 96kDa, conforme o esperado, já que a MBP tem 43 kDa e a *GumC* tem um peso molecular previsto de 53kDa.

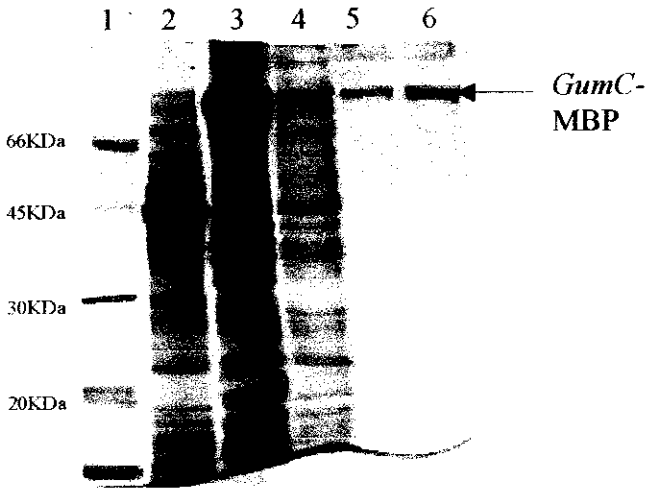


Figura 4.1 - Gel SDS-PAGE a 15% do processo de purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP na coluna amilose. Coluna 01: padrão de massa molecular. Coluna 02: cultura de células antes da indução. Coluna 03: cultura de células após indução e após lise celular (pellet). Coluna 04: cultura de células após indução e após lise celular (sobrenadante). Colunas 05 e 06: frações eluídas da coluna de amilose contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP.

4.2) – Otimização do procedimento de obtenção da proteína recombinante *GumC*-MBP

Tentamos melhorar a solubilidade da proteína de fusão *GumC*-MBP variando a concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução. Observamos um aumento na solubilidade quando a temperatura de indução foi abaixada para 20°C (figura 4.2). Quanto á variação de IPTG, não foi observado mudança na solubilidade da proteína expressa.

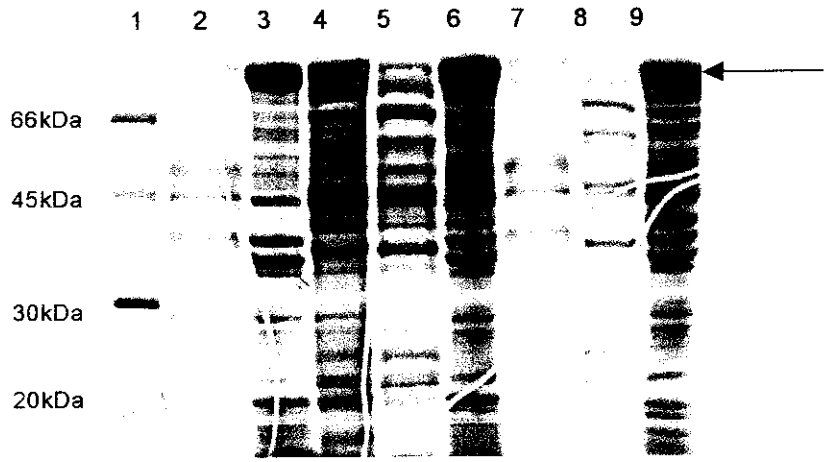


Figura 4.2 – Gel SDS-PAGE a 15% da expressão da proteína de fusão *GumC*-MBP em diferentes temperaturas. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2 e 7: cultura de células antes da indução. Colunas 3 e 4: cultura de células após indução a temperatura de 20°C, pellet e sobrenadante respectivamente. Colunas 5 e 6: cultura de células após indução a temperatura de 30°C, sobrenadante e pellet respectivamente. Colunas 8 e 9: cultura de células após indução a temperatura de 37°C, sobrenadante e pellet respectivamente.

Devido a proteína de fusão *GumC*-MBP apresentar-se pouco solúvel quando expressa em culturas de *E. coli* DH5α, outras cepas de *E.coli* foram usadas para expressão da proteína: BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysS. Foi observada uma melhora na expressão da proteína de fusão quando células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foram usadas, no entanto, uma grande parte da proteína *GumC*-MBP permanecia insolúvel.

Devido a baixa solubilidade e conhecimento prévio da alta hidrofobicidade da *GumC* (a análise da sequência da *GumC*, através de banco de dados, revelou a presença de 48% de resíduos hidrofóbicos), adicionamos ao tampão de ressuspenssão do pellet (tampão de amilose), 0.5% de detergente Triton X-100. Observamos um aumento da solubilidade da proteína recombinante e portanto o detergente foi incorporado em todas as etapas de purificação da *GumC*-MBP.

Algumas pecularidades foram observadas em relação ao experimento de lise celular. Observou-se, por exemplo, que o melhor momento para adição do detergente é no momento da lise celular. Se este for adicionado juntamente com o tampão de lise para estocar o pellet a -20°C, ocorre a precipitação da proteína de fusão. Outra questão observada foi a precipitação da proteína de fusão *GumC*-MBP, quando a lise das células foi feita através da técnica do congelamento/descongelamento seguido da técnica da sonicação.

Levando em consideração todas essas variáveis, tentamos otimizar o processo de expressão da proteína e lise celular. A proteína de fusão *GumC*-MBP foi expressa em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com 0,6mM de IPTG a 20°C por 20hs. Após a centrifugação, as células foram ressuspendidas em tampão de amilose (20 mM de Tris/HCl, 200mM NaCl, 1mM Azida sódica pH 7,4) acrescido de 1% de Triton X-100 (aumentamos a porcentagem de detergente para garantir a solubilidade da proteína de fusão na lise celular, que é um momento crítico). A partir da adição de detergente, adicionamos lisozima e o extrato bruto permaneceu em repouso no gelo por 15 minutos. Então adicionamos 10mM $MgCl_2$ e 1μL de DNAse e deixamos novamente o extrato bruto em repouso por mais 30 minutos (este processo foi acrescentado, por observar uma

melhora no processo de lise celular). Após este intervalo, o extrato celular foi lisado através da técnica da sonicação.

4.3 – Purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP

Após a lise celular, o sobrenadante do lisado é filtrado em papel de filtro e diluído 3 vezes com tampão de amilose, com o objetivo de diminuir a concentração de detergente para 0,33% (grandes quantidades de detergente podem diminuir a afinidade da proteína MBP pela resina de amilose). O sobrenadante diluído é então aplicado em coluna de amilose. Em seguida, a resina é lavada com tampão de amilose acrescido de 0,33% de detergente Triton X-100 e a proteína de fusão *GumC*-MBP é eluída com tampão de coluna acrescido de 10mM de maltose. O experimento de purificação da proteína de fusão em coluna de amilose, partindo-se de 500mL de meio de cultura, na presença de 0.33% do detergente Triton X-100 ao tampão de lise celular, está ilustrado na figura 4.3.

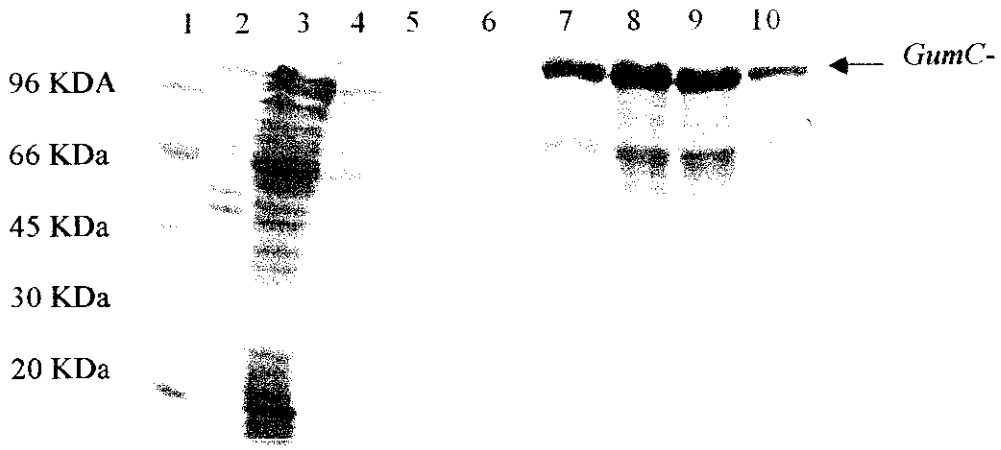


Figura 4.3 – Gel de SDS-PAGE a 15% do processo de purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP na coluna de amilose, após adição de Triton X-100 no tampão de lise celular. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas 2 e 3: cultura de células após indução e lise celular (pellet e sobrenadante, respectivamente). Coluna 4: fração eluída na lavagem da coluna de amilose. Colunas 5 a 10: frações eluídas da coluna de amilose durante eluição da maltose.

Um fato importante a ser observado é que a proteína MBP da própria bactéria *E. coli* (massa molecular de aproximadamente 42 kDa), compete com a proteína de fusão pelos sítios de ligação da resina de amilose, diminuindo a eficiência desta etapa de purificação da proteína de fusão, além de outras proteínas da bactéria também se ligarem à resina.

Segundo o manual do fabricante da resina (New England Biolabs), alterações na composição do tampão de lavagem da coluna, como um gradiente da concentração de sal e alterações da adição de maltose no tampão de eluição, como um gradiente da concentração de maltose de 1 a 10 mM podem evitar a ligação de proteínas inespecíficas a resina. Todas essas alterações foram realizadas de acordo com as sugestões recomendadas, entretanto não trouxeram modificação no padrão de purificação.

Amostras contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP, eluídas da resina de amilose, não estavam puras e portanto subseqüentes cromatografias foram realizadas. Também foi constatado que o processo de expressão da proteína *GumC*-MBP deve ser precedido pela transformação do plasmídeo em *E.coli*, pois esse procedimento leva a um maior rendimento de proteína expressa com conseqüente melhoramento na purificação da proteína em coluna de amilose.

4.3.1) – Cromatografias de Filtração a Gel e Troca Aniônica

Após a purificação na coluna de afinidade, a solução protéica foi concentrada até aproximadamente 1mg/mL e aplicada (200μL) em coluna de filtração em gel superose 12. Não houve melhora no grau de pureza da proteína de fusão, como pode ser observado no gel de SDS-PAGE, na figura 4.4.

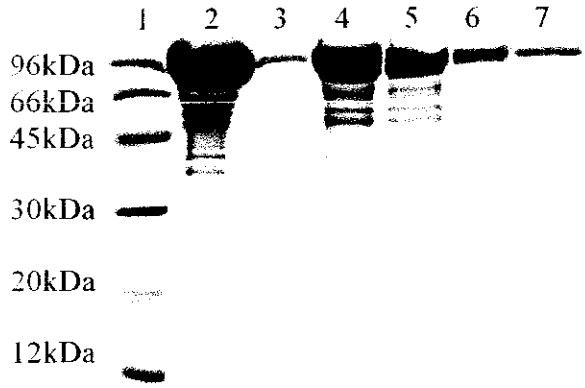


Figura 4.4 – Gel de SDS PAGE 15% mostrando a cromatografia de filtração a gel Superose 12 da fusão *GumC*-MBP. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: pré-coluna da Superose 12. Colunas de 3 a 7: frações eluídas da coluna de filtração a gel.

As frações contendo a proteína *GumC*-MBP eluídas da coluna de filtração a gel foram reunidas e dialisadas contra tampão Tris/HCl 20mM pH7,2, 1mM EDTA, 1mM de Azida sódica, 0,5% de Tween-20 (houve troca no uso de detergente devido ao Triton X-100 absorver muito na região do UV, dificultando a visualização dos picos de proteínas). A amostra contendo a proteína de fusão foi aplicada em coluna de troca aniônica DEAE sepharose. O cromatograma mostrou 2 picos característicos de proteínas, sendo o primeiro eluído com tampão (procedimento chamado de 'lavagem' da coluna) e o segundo eluído no gradiente salino (perfil cromatográfico não mostrado). O resultado desta etapa de purificação é mostrado na figura 4.5 onde se observa que a proteína de fusão *GumC*-MBP e as proteínas contaminantes são eluídas juntas nos dois picos (da lavagem da coluna e do gradiente), dando o indício de agregação molecular.

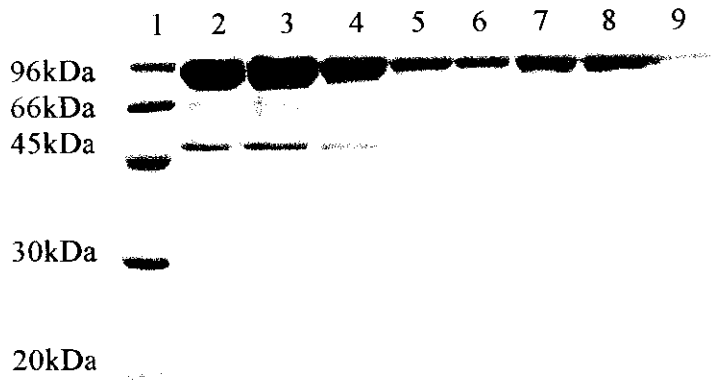


Figura 4.5 – Gel SDS-PAGE a 15% do processo de purificação da proteína *GumC*-MBP em cromatografia de troca aniônica DEAE sepharose. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: pré coluna DEAE sepharose. Colunas de 3 a 4: frações eluídas no primeiro pico. Colunas de 5 a 9: frações eluídas no segundo pico.

Novas tentativas de purificação da proteína de fusão após cromatografia em coluna de afinidade foram realizadas.

4.3.2) – Precipitação da proteína de fusão *GumC*-MBP com Sulfato de Amônio

Com amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP a 1mg/mL testes de precipitação com S.A. foram realizados conforme descrito no item 3.1.3 Foi realizada precipitação com 10, 20, 30, 40, 50 e 60% de S.A.. As frações foram analisadas por gel SDS-PAGE (sobrenadante e precipitado) após centrifugação de cada adição de SA. No entanto, não foi possível obter a proteína *GumC*-MBP livre dos contaminantes (dados não mostrados).

4.3.3) – Cromatografia em coluna de Hidroxiapatita

A resina de hidroxiapatita ($Ca_5(PO_4)_3(OH)_2$) é usada na separação cromatográfica de biomoléculas, apresentando uma característica interessante de possibilitar a ligação de proteínas carregadas positiva e negativamente. A eluição é

realizada adicionando-se sal com íons catiônicos ou aniônicos, dependendo da natureza da proteína estudada.

A proteína de fusão *GumC*-MBP foi aplicada em coluna de hidroxiapatita após diálise contra tampão fosfato 25mM, pH 7,45 + 0,5% Tween-20, conforme descrito no item 3.1.3. Três picos característicos de proteína (figura 4.6) foram observados no cromatograma, o primeiro eluído na lavagem da coluna e os outros dois picos no gradiente com 0,5M de fosfato pH7,45 + 0,5% Tween-20.

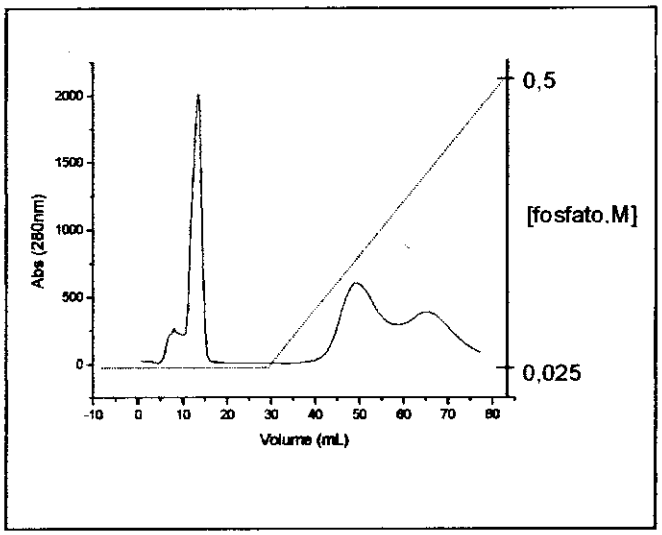


Figura 4.6 – Perfil cromatográfico da coluna de hidroxiapatita, mostrando eluição da proteína de fusão *GumC*-MBP.

Observa-se, através de gel de SDS-PAGE (figura 4.7) a presença da proteína de fusão *GumC*-MBP nos 3 picos (no void e também na porção ligante) e aparentemente com os mesmos contaminantes.

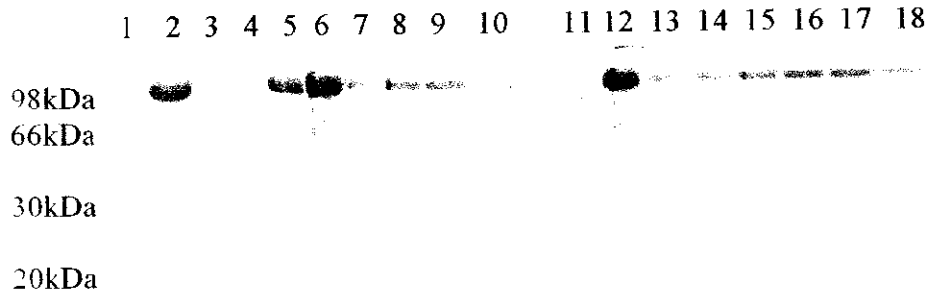


Figura 4.7 – Gel SDS PAGE 15% da purificação da fusão *GumC*-MBP em coluna de hidroxiapatita. Colunas 1 e 11: padrão de massa molecular. Colunas 2 e 12: pré-coluna hidroxiapatita. Colunas 3 a 6: 1° pico do cromatograma. Colunas 7 a 10: 2° pico do cromatograma. Colunas 13 a 18: 3° pico do cromatograma.

Diferentes cromatografias para a purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP foram testadas sem sucesso. Além disso, a instabilidade da proteína *GumC*-MBP dificulta a utilização de métodos cromatográficos prolongados. Para evitar a degradação da proteína de fusão, somente a cromatografia de afinidade em resina de amilose foi utilizada para a purificação O rendimento final da proteína de fusão *GumC*-MBP é de 6,5 mg/L de meio de cultura.

4.4 – Caracterização da proteína de fusão *GumC*-MBP

4.4.1 – Experimentos de Dicroísmo Circular

A proteína de fusão *GumC*-MBP foi caracterizada através de espectroscopia de Dicroísmo Circular, apresentando um espectro com 2 mínimos locais de 207,5 e 223nm e um valor máximo de 199nm revelando um perfil característico de proteína enovelada, com predominância de estruturas de α-hélices (figura 4.8).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

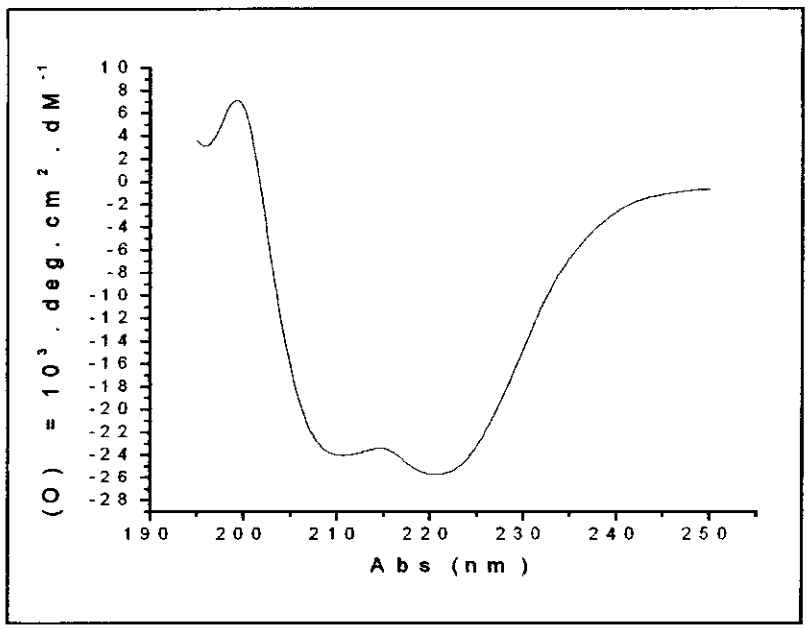


Figura 4.8 – Espectro de Dicroísmo Circular da proteína de fusão *GumC*-MBP com varredura de 190 a 250nm.

4.4.2) – Produção de anticorpos anti-*GumC*-MBP

Foi realizada a produção de anticorpos anti-*GumC*-MBP inoculando a proteína de fusão *GumC*-MBP (antígeno), parcialmente purificada em coluna de amilose, em 3 camundongos (item 3.1.4.2). Após o sangramento dos animais e obtenção do soro, foi realizada a titulação diluindo-se este soro nas seguintes concentrações: 1:1000, 1: 5000, 1: 10.000, 1 : 15.000, 1:20.000, 1:30.000, 1:40.000, 1:50.000, 1: 60.000 e 1 : 70.000.

O resultado da titulação do anticorpo anti-*GumC*-MBP complexado com o antígeno *GumC*-MBP, mostrou que é possível usar titulações até 1:30.000 do soro (figura 4.9).

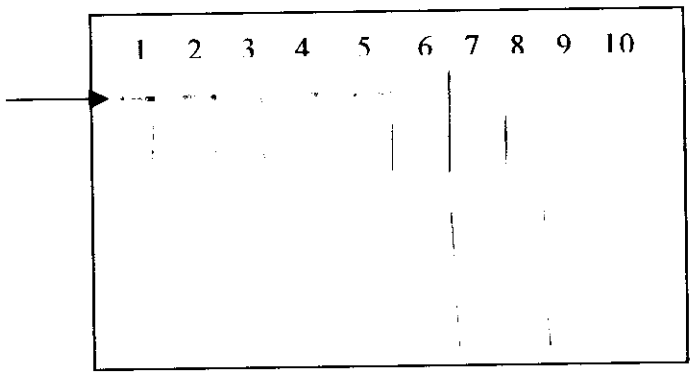


Figura 4.9 – Membrana de nitrocelulose mostrando a titulação do anticorpo anti-*GumC*-MBP. Colunas de 1 a 9 anticorpo anti-*GumC*-MBP complexado com a proteína *GumC*-MBP para diferentes diluições do anticorpo: 1: 1000, 1: 5000, 1 : 10.000, 1 : 15.000, 1 : 20.000, 1: 30.000, 1: 40.000, 1 : 50.000 1 : 60.000 e 1 : 70.000, respectivamente.

4.4.2.1 - Caracterização da proteína *GumC*-MBP através de Imunoblotting

A caracterização da proteína *GumC*-MBP foi feita através de Imunoblotting (conforme descrito no item 3.1.4.2.1), onde após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo anti-MBP durante 2hs e em seguida incubada por mais duas horas com o anticorpo anti-IgG de camundongo. Após essa incubação a membrana foi revelada com solução de NBT/BCIP.

A figura 4.10 mostra a reação do antígeno (*GumC*-MBP) com o anticorpo (anti-MBP).

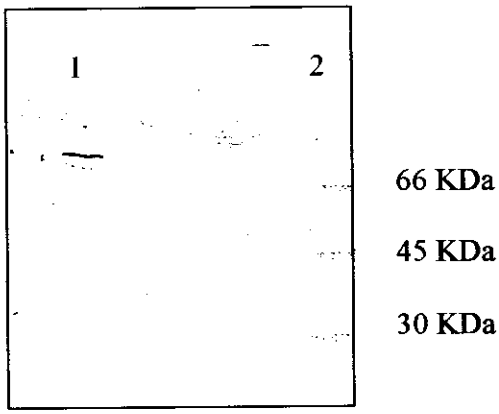


Figura 4.10 – Membrana de nitrocelulose mostrando a reação do antígeno *GumC*-MBP com o anticorpo anti-MBP. Coluna 1: reação *GumC*-MBP-Anti-MBP. Coluna 2: Padrão de massa molecular.

4.5) - Testes de cristalização da proteína de fusão *GumC*-MBP

Embora a amostra de proteína não tivesse alto grau de pureza (figura 4.11) experimentos de cristalização com a proteína de fusão foram realizados, para futuros estudos cristalográficos.

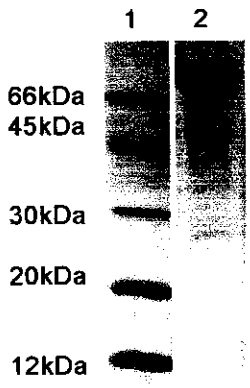


Figura 4.11 – Gel SDS- PAGE a 15% mostrando a amostra concentrada contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP utilizada em experimentos de cristalização. Coluna 1: padrão de peso molecular. Coluna 2: amostra concentrada contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP utilizada em experimentos de cristalização.

A cristalização da proteína MBP já foi descrita (Liu *et al*,2001), e a estrutura desta proteína (PDB 1HSJ) poderá ajudar na resolução da estrutura da proteína de fusão

GumC-MBP, através do método de Substituição molecular (Giacovazzo et al, 1992). Esta seria uma solução para determinação das fases devido a proteína *GumC* não ter nenhuma proteína homóloga com estrutura tridimensional resolvida.

O método de cristalização utilizado no presente trabalho foi o de difusão de vapor com gotas penduradas (Ducruix and Giegé, 1992; Blundell and Johnson, 1976) com a gota constituída de 5µl da solução de proteína (a 5,4mg/mL em tampão de amilose com 0,33% de Triton X-100) e 5µl da solução do poço. Foram feitos, inicialmente, a 18^0C, experimentos com os 2 Fatoriais Crystal Screen da Hampton, totalizando 100 condições diferentes de cristalização. Após 10 dias, foi observado crescimento de cristais não amorfos (tipo "mosquito") na condição 23 do Fatorial I (0,2M Cloreto de Magnésio hexahidratado, 0,1M Hepes-Na pH7,5 e 30% v/v de Polietilenoglicol (PEG) 400) e um cristal pequeno na condição 7 do Fatorial II (10% v/v de Polietilenoglicol 1000 e 10% de Polietilenoglicol 8000), mostrados na figura 4.12. A observação dos experimentos de cristalização mostrou que ocorreu a formação de precipitado em algumas gotas e diversas outras permanecem límpidas, indicando que a proteína não estava desnaturada.

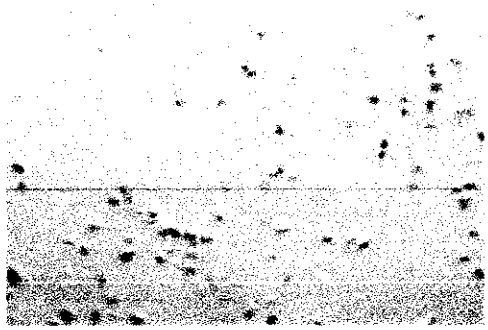


Figura 4.12 – Fotos das condições 7 do Fatorial II (á esquerda) e 23 do Fatorial I (á direita) mostrando o crescimento de cristal e estruturas não amorfas, respectivamente.

Devido ao crescimento de microcristais na condição 23 do Fatorial I e condição 7 do Fatorial II, novos testes de cristalização foram realizados, visando fazer uma varredura ao redor destas condições. Neste experimento variamos a concentração de sal e polietilenoglicol para a condição 23 do Fatorial I, e polietilenoglicol 1000 e 8000 para a condição 7 do Fatorial 2. Experimentos foram realizados com diferentes concentrações da proteína de fusão *GumC*-MBP, a 5,9 e 6,5mg/mL. As gotas resultantes desta varredura não mostraram crescimento de cristais da proteína.

Também foi utilizado o método de cristalização por difusão de vapor com gotas sentadas e estes experimentos foram realizados pelo robô Hydra. Os experimentos de cristalização foram realizados com a proteína de fusão *GumC*-MBP no tampão de amilose acrescido de 0,33% de detergente Triton X-100, nas concentrações de 5,7mg/mL e 5,5 mg/mL. Foram realizados testes com os Fatoriais Crystal Screen I e II (Hampton), Fatorial PEG-ÍON (Hampton) e INDEX (soluções feitas em laboratório) a 4 e 18°C. Foram realizados também testes de cristalização a 4°C com o Fatorial MembFac, um Kit de cristalização para proteínas de membrana, da Hampton. A proteína de fusão encontrava-se na concentração de 5,8mg/mL. No total, foram 1000 experimentos de cristalização realizados com a proteína de fusão *GumC*-MBP.

Houve aparecimento de microcristais nas seguintes condições do Fatorial MembFac:1 (0,1M cloreto de sódio, 0,1M Acetato de sódio trihidratado, pH4,6 e 12% MPD) e 2 (0,1M Acetato de zinco, 0,1M de acetato de sódio, pH4,6 e 12% de PEG 4000). Tentativas de otimização dos microcristais em torno destes fatoriais foram realizadas (variando-se as concentrações dos sais e dos agentes precipitantes), no entanto, não houve melhora no tamanho e morfologia dos microcristais.

Observou-se que a formação de cristais da proteína de fusão *GumC*-MBP é dependente do bom comportamento da mesma em solução. Nas poucas condições em que houve crescimento de microcristais, as amostras da proteína *GumC*-MBP, apresentaram bons resultados em análise com Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL). Porém a otimização dos microcristais obtidos tem sido dificultada provavelmente devido a instabilidade da proteína de fusão *GumC*-MBP, presença de detergente e agregação das moléculas protéicas.

Mikol *et al* (1990) tem sugerido que o crescimento do cristal é favorecido se a proteína conserva o seu estado nativo acima da sua solubilidade limite e que nenhuma interação ou agregação ocorra antes que a solução protéica atinja seu ponto de supersaturação. Outros autores (D'Arcy, 1994; Ferré-D'Amare & Burley, 1997; Habel *et al*, 2001) têm mostrado que a presença de agregados na solução protéica pode inibir a nucleação e crescimento de cristais. Com base neste conhecimento, pesquisadores vêm desenvolvendo métodos de detecção e prevenção de agregados de proteínas (Bondos *et al*, 2003; Jancarik *et al*, 2004).

Desta forma, o acompanhamento da purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP através de medidas de EDL tem mostrado ser essencial. Por este motivo, realizamos um estudo de análise da solubilidade da proteína através do uso de aditivos e detergentes utilizando a técnica de EDL com o objetivo de diminuir a agregação das moléculas da proteína *GumC*-MBP.

4.6) – Estudos de estabilidade da proteína *GumC*-MBP através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz

As técnicas de espalhamento de luz, além de outras utilizações, como estudo de ligantes, associação e dissociação de oligômeros, são usadas para estudar proteínas próximas do ponto de supersaturação e na presença de agentes precipitantes para estabelecer condições de cristalização (Zulauf *et al.*, 1992). Por outro lado, a técnica de EDL também tem sido utilizada para estudar proteínas em baixas concentrações e na ausência de agentes precipitantes para estabelecer a correlação entre o comportamento da proteína e sua possível cristalização (Jancarik *et al.*, 2004).

Durante o experimento de EDL são gerados tabelas contendo os valores de D_T, R_h, M_r e índice de polidispersidade (expresso como desvio padrão de R_h em unidades de nanômetros) para medidas sucessivas da mesma amostra a cada poucos segundos. Devido ao volume irradiado da amostra ser muito pequeno, agregados não são necessariamente detectados a cada medida. Assim, coleta-se um número mínimo de 50 medidas de uma amostra (Ferré-D'Amaré *et al*, 1997).

A heterogeneidade da amostra pode ser obtida através de manipulações matemáticas da função de autocorrelação. Um simples caminho de representar a heterogeneidade é pelo fator de polidispersidade que deveria ser menor (< 30% do valor de R_H) para uma proteína homogênea.

Uma maneira mais usual de estimar a polidispersidade é através da análise de histogramas mostrando a variação de D_T durante repetidas medidas da mesma amostra. Amostras altamente monodispersas mostram pouca ou nenhuma variação em D_T (e R_H e M_r aparente) durante as repetições das medidas.

Se uma medida de EDL de uma dada proteína apresenta-se monomodal e monodispersa (< 15%), existe uma estimativa de 70% de chance desta cristalizar-se. Ao contrário, se as medidas de EDL para uma proteína apresentam-se polidispersas (>30%) ou a amostra contém agregados, a estimativa de cristalização é de apenas 8% (Yao, 2004 e Scott, 2003). Esta estimativa é observada num experimento de D'Arcy (D'Arcy, 1994) onde proteínas que apresentaram-se monodispersas tiveram sucesso na cristalização (77% das proteínas cristalizaram em 44 casos. Para amostras que apresentaram-se altamente polidispersas observou-se dificuldade na cristalização (apenas 8% de 12 casos).

Nesta etapa analisamos o comportamento da proteína de fusão *GumC*-MBP em solução através da técnica de EDL (Espalhamento Dinâmico de Luz).

A análise das frações eluídas da coluna contendo Tween-20 mostrou a presença de muitos agregados, tornando-se impossível fazer medidas de EDL (técnica descrita no ítem 1.6). Resolvemos fazer um estudo da estabilidade da proteína de fusão *GumC*-MBP na presença de aditivos (Cacace *et al.*,1997; Vuillard *et al.*, 1998; Mikol, 2003), capazes de prevenir a agregação de proteínas. Para este estudo a proteína de fusão *GumC*-MBP foi eluída da coluna de amilose sem adição de detergente.

Após a eluição, utilizou-se a amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP na concentração de 0.2mg/mL para fazer 'screening' dos aditivos relacionados no ítem 3.1.6. Também foi realizado 'screening' com o Kit Detergent Screen I, II e III da Hampton. Todos os detergentes utilizados foram testados nas suas respectivas concentrações de CMC (Critical Micellar Concentration, definida como a concentração

mínima de detergente necessária para a formação de micelas). Todas as amostras foram centrifugadas a 15000g por 15 minutos antes de serem analisadas por medidas de EDL.

Para a análise das medidas de EDL é importante lembrar que a proteína de fusão *GumC*-MBP apresenta uma massa molecular calculada de 96kDa.

Neste experimento foram testados 90 aditivos. Abaixo, seguem os resultados das medidas de EDL para os melhores aditivos:

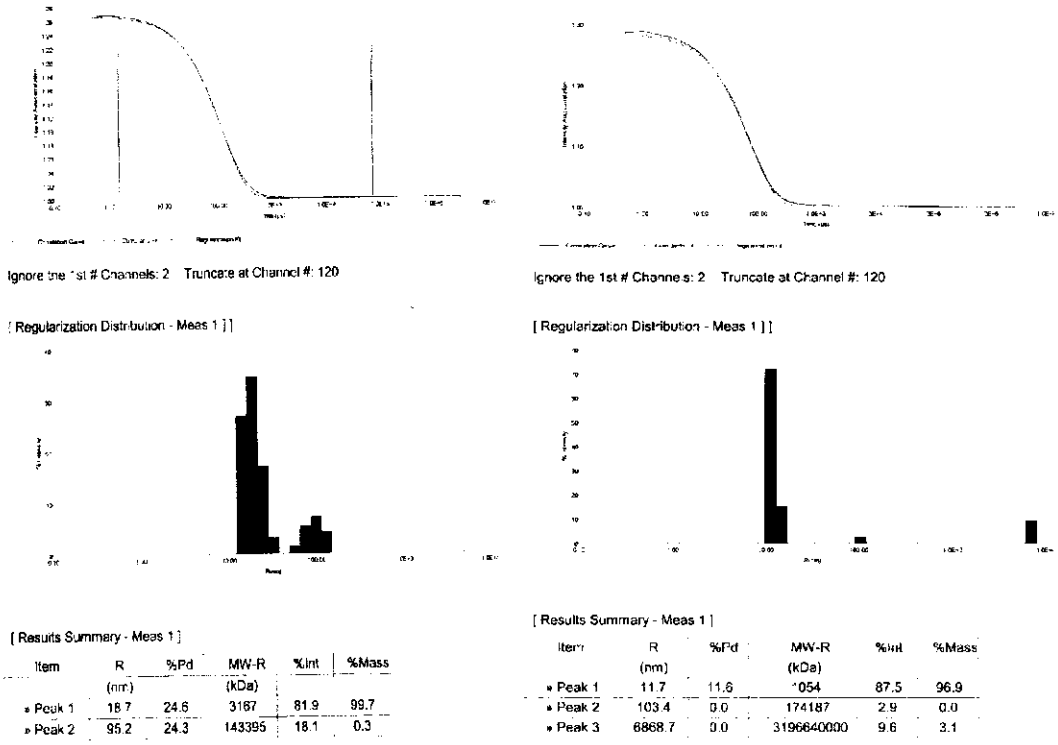
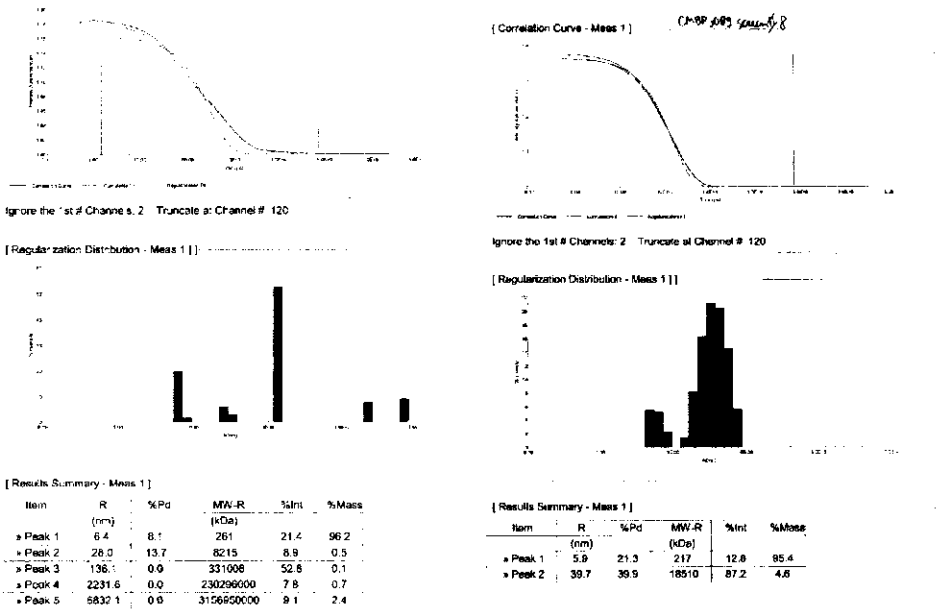


Figura 4.13 e 4.14 – Resultados da medida de DLS para a proteína *GumC*-MBP após a eluição da coluna de amilose sem adição de aditivos (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,3) e com adição do detergente do screen I da Hampton, 1-s-Octyl-β-D-thioglucoside (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,4) respectivamente.

Observamos através de medidas de EDL, que a amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP sem utilização de aditivos (figura 4.13), encontra-se agregada, pois o raio hidrodinâmico é superior a 18nm (presença de agregados superiores a 3000

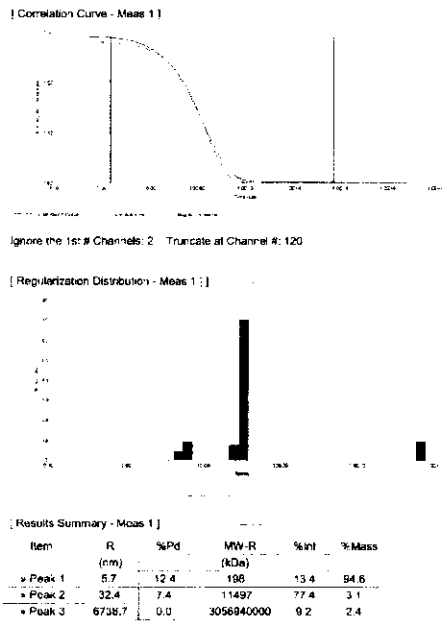
kDa), apresentando 99,7% da massa total presente na amostra. Esse valor em porcentagem da massa molecular representa a porcentagem total de moléculas que estão espalhando a luz e que estão presentes na amostra. Isso mostra que 99,7% das moléculas que estão espalhando têm um raio hidrodinâmico de 18nm.

A adição do detergente do screen I do kit da Hampton, 1-s-Octyl-β-D-thioglucoside, também apresentou agregados com raio hidrodinâmico de 11,7nm (figura 4.14).



Figuras 4.15 e 4.16 – Resultados da medida de EDL para a proteína *GumC*-MBP com o detergente CTAB (Cetyltrimethylalmmonium bromide) do Screen I (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,3) e com o detergente Anapoe 58 do Screen II (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,4), ambos do Kit de detergentes da Hampton, respectivamente.

Analisando as figuras 4.15 e 4.16, notamos que a adição dos detergentes CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide, detergente iônico) e Anapoe 58 (detergente não iônico) ocasionou a diminuição do raio hidrodinâmico para 8,1 e 5,9, respectivamente, quando comparamos com o raio hidrodinâmico da amostra sem aditivos.



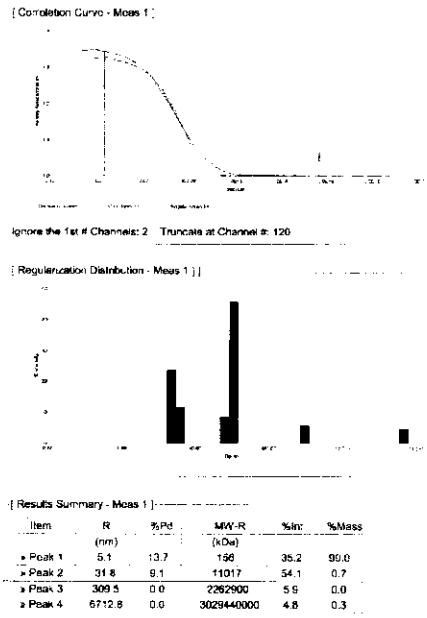
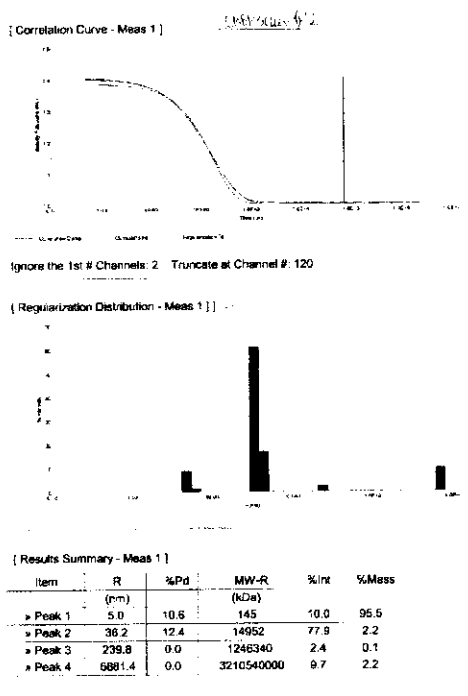
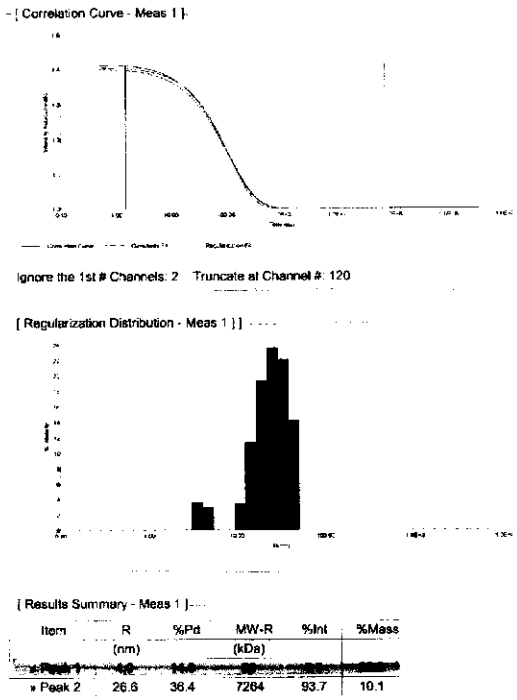


Figura 4.17 e 4.18 - Resultados da medida de EDL para a proteína *GumC*-MBP com adição do detergente Pluronic F-68 do screen II, do kit de detergentes da Hampton (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,3) e com o detergente Triton X-100 (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,4), respectivamente.

A figura 4.17 mostra a medida de EDL da amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP com a adição do surfactante não iônico Pluronic F-68. Observamos que o raio hidrodinâmico também diminui (5,7nm, 198kDa e 12,4% de polidispersidade) quando comparado com a amostra sem aditivos.

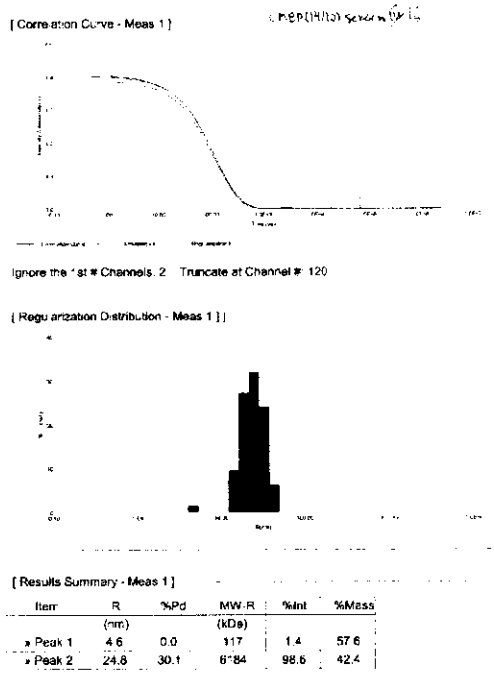
Com a adição do detergente não iônico Triton X-100 observa-se uma diminuição de moléculas agregadas e o aparecimento de moléculas de massa molecular de aproximadamente 156 kDa (raio hidrodinâmico de 5,1nm), representando 99% da massa total de moléculas espalhadas e 13,7% de polidispersidade (figura 4.18).





Figuras 4.19 e 4.20 – Resultados da medida de EDL para a proteína de fusão *GumC*-MBP após adição do detergente Anapoe $C_{12}E_{10}$ (polyoxyethylene(10)dodecyl ether) do screen II (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,4) e do detergente thesit do Screen III do kit de detergentes da Hampton (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,5), respectivamente.

Analisando as figuras 4.19 e 4.20 também observamos uma diminuição da agregação das moléculas com a adição do detergente não iônico Anapoe $C_{12}E_{10}$, também chamado polietileno(10)dodeciléter e do detergente não iônico thesit. A medida de EDL com a adição do detergente não iônico Anapoe $C_{12}E_{10}$ apresentou um raio hidrodinâmico de 5,0nm, com aparecimento de moléculas com massa molecular aparente de 145kDa com 10,6% de polidispersidade. Já com a adição do detergente thesil, a medida de EDL apresentou moléculas com massa aparente de 88kDa (raio hidrodinâmico de 4nm), representando 89,9% da massa molecular total presente na amostra apresentando e 14% de polidispersidade.



Figuras 4.21 – Resultados da medida de EDL para a proteína de fusão *GumC*-MBP após adição do detergente n-Octyl-β-D-thioglucoside do Screen III do Kit de Detergentes da Hampton (fator de correlação com intensidade de aproximadamente 1,4).

Com a adição do detergente não iônico n-Octyl-β-D-thioglucoside na amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP, podemos observar em medidas de EDL um raio hidrodinâmico de 4,6nm, apresentando moléculas com uma massa molecular aparente de 117kDa, representando 89,9% da massa molecular total presente na amostra (figura 4.21).

A partir destes resultados, observou-se que a adição do detergente Triton X-100 diminui sensivelmente a agregação molecular assim como os detergentes Anapoe $C_{12}E_{10}$, o thesit e n-Octyl-β-D-thioglucoside do kit de detergentes da Hampton. As medidas de EDL são visualizadas nas figuras 4.18, 4.19 e 4.20 e 4.21, respectivamente.

Os quatro detergentes citados acima, que forneceram os melhores resultados nos estudos de EDL, têm em comum o fato de serem detergentes não iônicos.

Tendo em vista que os resultados obtidos com os 4 detergentes, são semelhantes, o detergente Triton X-100 foi escolhido entre os demais para ser utilizado nas etapas de purificação devido este detergente já ser usado desde o início, na ressuspensão do "pellet".

Novos testes de cristalização da proteína de fusão *GumC*-MBP

Após os estudos de EDL frente aos 90 aditivos, novas etapas de purificação da proteína *GumC*-MBP foram feitas, com adição de 0.015% (1xCMC) de TritonX100, com o objetivo de realizar novos testes de cristalização com a proteína. Os experimentos de cristalização foram realizados com a proteína de fusão *GumC*-MBP nas concentrações de 5,7mg/mL e 5,5 mg/mL.

Os experimentos de cristalização foram realizados pelo robô Hydra utilizando a técnica de difusão de vapor com gotas sentadas. Foram realizados testes com os Fatoriais I e II (Hampton), Fatorial PEG-ÍON e INDEX (soluções feitas em laboratório) a 4 e 18°C, totalizando 488 experimentos. Estes experimentos foram analisados através de microscópio por 40 dias e durante este período não foi observado aparecimento de cristais.

4.7) – Obtenção e caracterização da proteína *GumC* (livre da fusão)

A proteína de fusão *GumC*-MBP foi utilizada em experimentos de clivagem com a enzima Factor Xa, para a separação da proteína *GumC* (livre da fusão), que foi purificada e caracterizada.

4.7.1) - Testes de clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP com a enzima Factor Xa

Os testes de clivagem da proteína *GumC*-MBP com o Factor Xa, foram realizados variando-se a proporção do Factor Xa : *GumC*-MBP em 1:100, 1:200 e 1:400, por 12 e 20 hs de clivagem a 18°C. Análise em SDS-PAGE mostraram que as proporções 1:100 e 1:200, considerando o mesmo tempo de clivagem, resultaram na mesma quantidade de proteína clivada, enquanto que a proporção 1:400 resulta em uma maior quantidade de proteína não clivada (figura 4.22). As proteínas *GumC* e MBP têm massa molecular teórica de 53 kDa e 43 kDa, respectivamente.

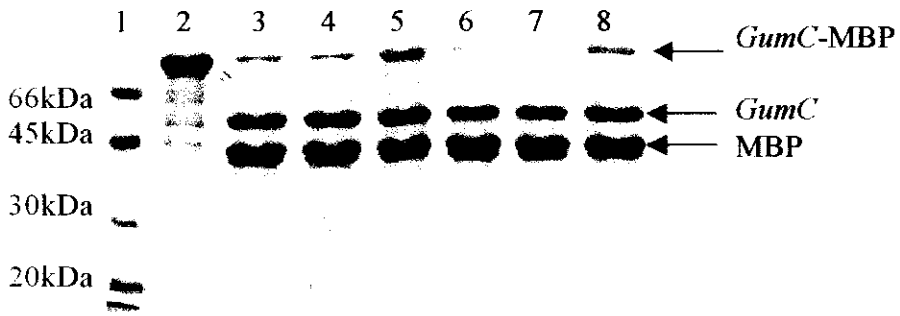


Figura 4.22 – Gel SDP-PAGE a 15% da clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP com Factor Xa em diferentes proporções Factor Xa: *GumC*-MBP. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: Proteína *GumC*-MBP antes da clivagem. Colunas 3, 4 e 5: clivagem da fusão *GumC*-MBP nas proporções 1:100, 1:200 e 1:400 respectivamente (12hs de clivagem a 18°C). Colunas 6, 7 e 8: clivagem da fusão *GumC*-MBP nas proporções 1:100, 1:200 e 1:400 respectivamente (20hs de clivagem a 18°C).

Devido a instabilidade da enzima *GumC* novos testes de clivagem foram realizados a 4°C e 18°C por 15 hs. Observamos que a clivagem realizada a 4°C, apesar de não ter clivado toda a fusão, mostrou uma menor quantidade do produto de clivagem inespecífica (banda abaixo da MBP) em relação a clivagem realizada a 15°C (figura 4.23).

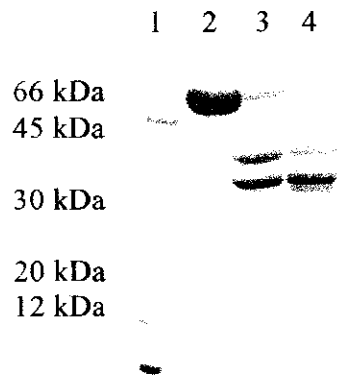


Figura 4.23 - Gel SDS PAGE a 15% da otimização da clivagem com o Factor-Xa. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: amostra contendo a Proteína *GumC*-MBP antes de clivagem. Colunas 3 e 4: proteína *GumC*-MBP após 18hs de clivagem a 4°C e 18°C, respectivamente.

Após estabelecido o tempo e temperatura de clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP com o Factor Xa a etapa de purificação da enzima *GumC* foi iniciada.

4.7.2) –Purificação da enzima *GumC* após clivagem com o Factor Xa

Diversas cromatografias foram realizadas com o objetivo de purificar a enzima *GumC* após a clivagem com o Factor Xa.

4.7.2.1) – Cromatografia de Hidroxiapatita

Tentamos purificar a enzima *GumC* usando a coluna de hidroxiapatita. A amostra, que se encontrava em tampão da coluna de amilose, foi dialisada contra tampão Fosfato 20mM pH7,2 e 0,5% de Tween-20 e aplicada (1mL da amostra a 1mg/mL). Após a diálise, uma fração da proteína *GumC* estava precipitada (coluna 2, figura 4.25). A fração solúvel foi aplicada na coluna. Dois picos a 280nm foram observados no cromatograma: um pico durante a lavagem da coluna e outro no gradiente de tampão fosfato (0,5M de Fosfato) (figura 4.24).

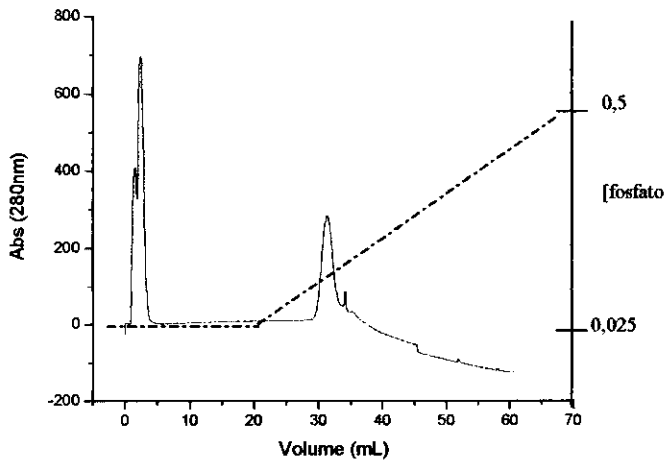


Figura 4.24 – Perfil cromatográfico da coluna de hidroxiapatita, durante a purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP.

A análise em SDS-PAGE (figura 4.25) das frações eluídas na coluna mostra que a proteína MBP foi eluída nos dois picos. A utilização do detergente Tween-20 no tampão de purificação poderia interferir na ligação da proteína MBP aos íons de Ca^{+2} da resina, visto que geralmente detergentes podem diminuir ou até evitar a ligação de proteínas às resinas. No entanto, nenhuma nota com relação à utilização de detergentes foi encontrada no manual da resina de hidroxiapatita (Instruction Manual CHT Ceramic Hydroxyapatie - Bio-Rad). Portanto, a utilização de uma resina alternativa para troca iônica, no caso a hidroxiapatita, também não levou á separação da proteína *GumC* clivada da proteína MBP.

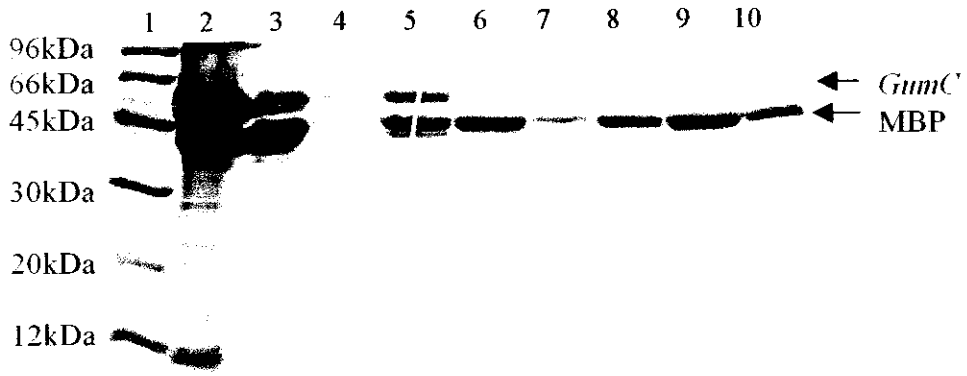


Figura 4.25 – Gel SDS-PAGE a 15% da cromatografia em coluna de Hidroxiapatita. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: amostra contendo precipitado de proteínas após diálise e concentração. Coluna 3: pré-coluna de hidroxiapatita. Colunas de 4 a 7: frações eluídas na lavagem da coluna (primeiro pico). Colunas de 8 a 10: frações eluídas no gradiente de fosfato (segundo pico).

4.7.2.2) – Cromatografia de Afinidade (Amilose)

Tentou-se aplicar a amostra, após a clivagem com o Factor Xa e após diálise para retirada da maltose (a maltose usada para eluição da fusão na coluna de afinidade), novamente na coluna de afinidade, com o intuito de observar a ligação da MBP na coluna, porém isso não aconteceu. Provavelmente a diálise não foi suficiente para retirada total da maltose que, presente na solução, liga-se fortemente á resina de amilose. Assim, a MBP e a *GumC* não se ligaram a resina e foram recuperadas na mesma fração. Esse resultado não é surpreendente, uma vez que a diálise para retirada da amilose tem sido descrita como uma etapa difícil, no manual da resina de amilose (www.neb.com).

4.7.2.3) – Cromatografia de Filtração a Gel

Realizou-se também uma cromatografia de filtração a gel (superose 12), mas também não houve separação da proteína *GumC* (resultados não mostrados). Apesar da coluna analítica apresentar alta eficiência em separações de moléculas, o peso molecular

da MBP* (peso molecular estimado em 43kDa) e da enzima *GumC* (peso molecular estimado em 53kDa) são muito próximos e a técnica não consegue separar.

4.7.2.4) –Cromatografia de hidrofobicidade em resina Phenil sepharose

Após a clivagem da fusão *GumC*-MBP, a amostra foi dialisada contra tampão de amilose + 0,5M de S.A. + 1% Tween-20 + 5% glicerol e aplicada em coluna phenil sepharose conforme descrito no item 3.1.8.

Observamos 2 picos no cromatograma, um no void e outro no gradiente reverso de sal (19% de tampão B). A análise dos picos em gel SDS-PAGE mostrou que o primeiro pico corresponde a proteína MBP (Maltose Binding Protein – 42 kDa) e uma banda de proteína a 13 kDa e o outro pico, a uma proteína que não aparece no gel (figuras 4.26 e 4.27). A proteína *GumC* não foi visualizada, podendo estar degradada (banda de 13 kDa no primeiro pico) ou esta ligou-se a resina de coluna irrreversivelmente. Para tentar removê-la da enzima lavamos esta com tampão de amilose + 1% Tween-20 + 5% glicerol + 20% etilenoglicol. Observou-se um pico nesta lavagem, mas analisado em gel SDS-PAGE nada foi visualizado (figura 4.26). Lavamos então com 40% de etilenoglicol e nada foi observado. A coluna também foi lavada com um gradiente de 0 a 100% de tampão de amilose + 1% Tween-20 + 20% glicerol + 10% acetonitrila, porém nada foi observado.

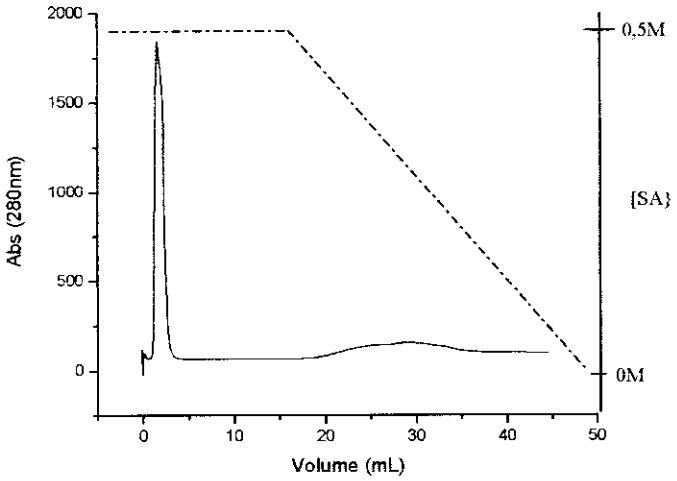


Figura 4.26 – Perfil cromatográfico da coluna Phenil sepharose, durante purificação da enzima *GumC*.

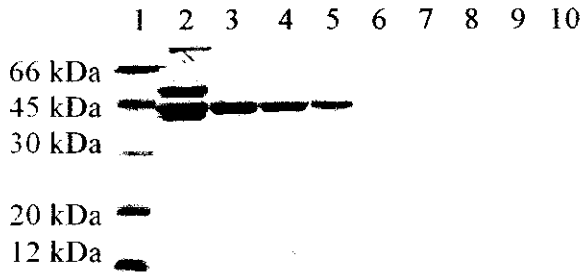


Figura 4.27 – Gel SDS-PAGE a 15% mostrando a cromatografia da enzima *GumC* em coluna phenil sepharose HP. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: pré-coluna phenil sepharose. Colunas 3 a 5: frações eluídas antes do gradiente; Colunas 6 a 10: frações eluídas no gradiente.

4.7.2.5) – Cromatografia de Troca Iônica

Diferentes tentativas visando a purificação da enzima *GumC* (pI calculado 8,9), em cromatografia de troca iônica foram realizadas. Após 15hs de clivagem com o Factor Xa, a solução protéica foi dividida e dialisada contra 3 tampões diferentes: Mes/NaOH pH6,0, Tris/HCl pH7,4 e Fosfato pH7,3 (todos com 0,5% de Tween-20). Na diálise contra o tampão Mes/NaOH pH6,0 houve precipitação total da proteína *GumC*. As

soluções protéicas dialisadas em tampões Tris e fosfato foram utilizadas para cromatografias de troca iônica, embora uma parte da proteína *GumC* tenha precipitado. A proteína encontrava-se na concentração de aproximadamente 1mg/mL e 1mL da amostra foi usado em cada experimento.

As colunas testadas foram a Q sepharose (troca aniônica) e a CM sepharose (troca catiônica). Quando se utilizou a coluna Q sepharose com a proteína em tampão Tris/HCl pH7,4, observou-se uma aparente separação da enzima *GumC*, que saiu na lavagem da coluna, da MBP, que eluiu com 12% de sal. Porém, a banda correspondente a proteína de fusão e uma outra banda logo abaixo da MBP continuam como contaminantes (figura 4.28).

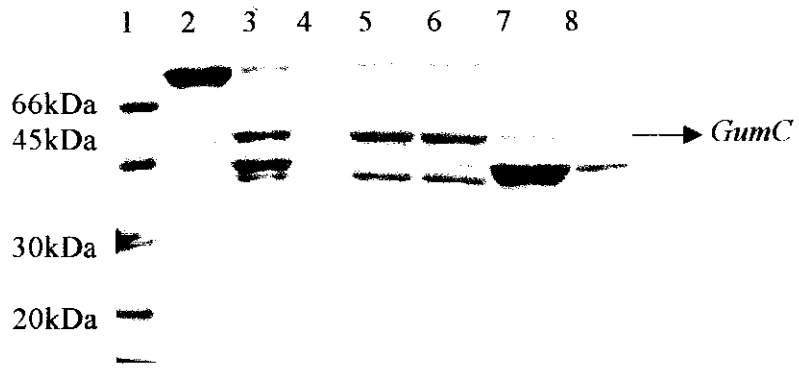


Figura 4.28 – Gel SDS-PAGE a 15% da cromatografia de troca aniônica Q sepharose da solução proteica após clivagem do Factor Xa. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: proteína de fusão *GumC*-MBP antes da clivagem. Coluna 3: pré coluna Q sepharose (contendo amostra clivada). Colunas 4 a 6: frações eluídas durante a lavagem da coluna. Colunas 7 e 8: frações eluídas no gradiente de sal.

Em pH 7,4, era esperado que as moléculas da enzima *GumC*, pI 8,9, estivessem protonadas e com a somatória final de cargas positivas, assim, a enzima *GumC* deveria se ligar à resina catiônica (CM sepharose). Já a proteína MBP, pI 5,4, estaria com um acúmulo de cargas negativas e sairia na lavagem da coluna. A cromatografia usando a

coluna CM sepharose, porém, não apresentou nenhuma separação (dados não mostrados), ou seja, a enzima *GumC* e contaminantes, inclusive a proteína MBP, saíram na lavagem da resina.

No experimento usando a proteína em tampão Fosfato pH 7,3 nas colunas Q sepharose e CM sepharose não foi observada separação da proteína *GumC* da MBP (figura 4.29).

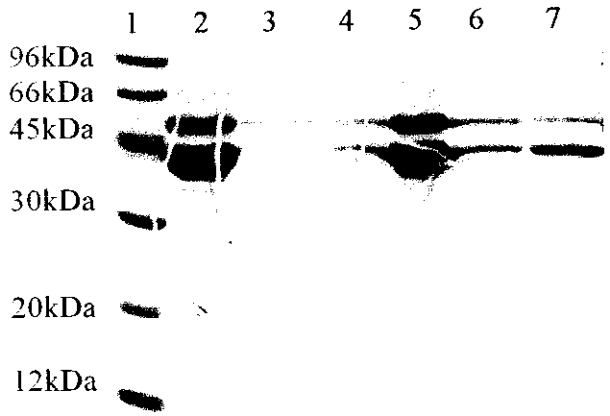


Figura 4.29 – Gel SDS-PAGE a 15% mostrando as cromatografias de troca iônica Q e CM sepharose respectivamente em tampão fosfato. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: pré-coluna Q sepharose. Colunas 3 e 4: frações eluídas da coluna. Coluna 5: pré-coluna CM sepharose. Colunas 6 e 7: frações eluídas da coluna.

Analisando as precipitações ocorridas nas diálises realizadas contra 3 diferentes tampões, podemos fazer algumas considerações. A utilização do tampão Mes/NaOH pH 6,0 provavelmente ocasionou a precipitação da proteína MBP, devido ao seu pI teórico, 5,4, estar próximo do pH do tampão utilizado. No entanto, ocorreu precipitação das respectivas proteínas durante as diálises contra os tampões Tris/HCl pH7,2 e Fosfato pH7,3, onde, aparentemente, o pH tamponante estaria longe dos pIs das mesmas. Uma explicação para a precipitação indiscriminada da enzima *GumC* seria a ausência de sal

nos respectivos tampões que estaria causando a desestabilização da mesma em solução. Em adição, acredita-se que estava havendo agregação das proteínas presentes na amostra após clivagem com o Factor Xa, o que pode ter ocasionado a precipitação de ambas as proteínas no tampão Tris/HCl, pH7,2 e a não ligação da enzima *GumC* na resina de troca catiônica CM sepharose.

Outra tentativa de purificação, utilizando a coluna de troca aniônica Q-sepharose FF, foi realizada. Após a clivagem adicionamos 15% glicerol + 1% Tween-20 para evitar a precipitação da enzima *GumC* durante a diálise contra tampão de amilose sem sal (Tris/HCl 20mM, pH7,4, 1mM EDTA, 1mM NaN_3). Ainda assim ocorreu precipitação em parte do produto de clivagem. O restante da amostra que permaneceu solúvel foi aplicado em coluna Q-sepharose FF segundo programa descrito no item 3.1.8. A enzima *GumC* saiu no void da coluna enquanto a proteína MBP eluiu com 12% de NaCl. A figura 4.30 mostra o perfil cromatográfico da coluna Q-sepharose e a análise em gel SDS (figura 4.31) mostra a purificação da enzima *GumC*.

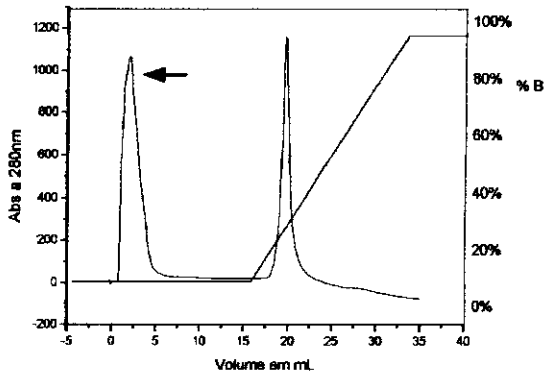


Figura 4.30 – Perfil cromatográfico da coluna Q sepharose FF mostrando a eluição da enzima *GumC* no void (primeiro pico).

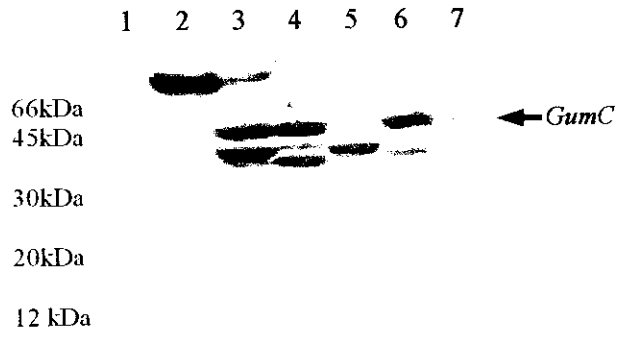


Figura 4.31 – Gel SDS PAGE 15% da purificação da enzima *GumC*. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: proteína de fusão *GumC*-MBP antes da clivagem com Factor Xa. Coluna 3: produto da clivagem antes da diálise contra tampão sem sal. Coluna 4: pré-coluna Q-sepharose e ou sobrenadante após diálise contra tampão sem sal. Coluna 5: proteína MBP eluída com 12% de NaCl. Coluna 6: precipitado após diálise contra tampão sem sal. Coluna 7: proteína *GumC* eluída na lavagem da coluna Q-sepharose.

4.7.3) – Caracterização da enzima *GumC*

4.7.3.1) – Seqüenciamento do N-terminal da proteína *GumC*

O resultado do seqüenciamento indicou a seqüência de 5 aminoácidos (**MDYPN**) correspondente ao N-terminal da proteína *GumC*, comprovando que a proteína expressa corresponde á proteína de interesse, a *GumC* de *X. fastidiosa* .

4.7.3.2) – Caracterização da enzima *GumC* através de Imunoblotting

Amostras contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP, antes a após a clivagem, foram analisadas, através de imunoblotting, em reações contra o anticorpo anti-*GumC*-MBP produzido em camundongos (ítem 3.1.9.2) e contra o anticorpo anti-MBP. A figura 4.32 mostra o gel de poliacrilamida das frações analisadas: *GumC*-MBP antes e depois da clivagem com Factor Xa (A) e a membrana de nitrocelulose na qual foi realizado o immunobloting (B). As colunas 1 e 2 da figura 4.32 (B) mostram a reação das amostras com o anticorpo anti-*GumC*-MBP, sendo bastante visível a reação da

banda de aproximadamente 50 kDa correspondente a *GumC*. As colunas 3 e 4 da figura 4.32 (B) mostram a reação das amostras com o anticorpo anti-MBP.

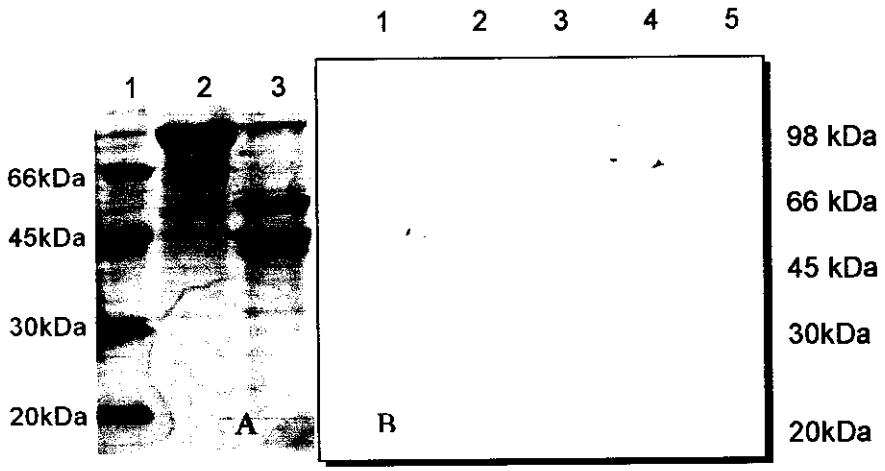


Figura 4.32 - Western-blotting das reações dos anticorpos anti-*GumC*-MBP e anti-MBP com os antígenos *GumC*-MBP e *GumC*. Colunas 1 e 2: reação do anticorpo anti-*GumC*-MBP com amostra depois e antes da clivagem com Factor Xa, respectivamente. Colunas 3 e 4: reação com anticorpo anti-MBP com amostra após e antes da clivagem, respectivamente. Coluna 5: padrão de massa molecular. A figura à esquerda, representa um gel SDS PAGE a 15% mostrando a proteína de fusão antes e após a clivagem com o Factor Xa (colunas 2 e 3, respectivamente).

4.7.3.3) – Determinação da massa molecular da *GumC*

A análise teórica da massa molecular da enzima *GumC* através do programa ExPASy revelou um monômero de aproximadamente 53kDa. A amostra de proteína *GumC*, após clivagem da proteína de fusão, analisada em gel SDS-PAGE a 15% (figura 4.23) mostra a presença de uma banda de expressão com massa molecular aparente de 53kDa.

Para se determinar o valor da massa molecular da enzima *GumC* e, possivelmente, confirmar o valor citado acima, uma pequena quantidade da enzima foi aplicada em coluna analítica de filtração a gel, superose 12.

Utilizamos 2 padrões de massa molecular: BSA, albumina de soro bovina (66kDa, na forma monomérica e 132kDa na dimérica) e Ovoalbumina (45kDa), os quais foram aplicados em outra preparação respeitando as mesmas condições estabelecidas para a aplicação da proteína *GumC*. A BSA na forma monomérica e dimérica é eluída com 11,6ml e com 10,9ml de tampão, respectivamente, enquanto a ovalbumina elui com 13,1ml. A *GumC* foi eluída com 12,1ml de tampão o que corresponde a proteína de massa molecular entre 45 e 66 kDa, portanto, na forma monomérica.

4.7.3.4) - Caracterização da enzima *GumC* quanto ao seu enovelamento por Dicroísmo Circular

Devido a falta de um ensaio enzimático para a enzima *GumC*, necessário para verificação da sua atividade e consequente caracterização quanto ao seu enovelamento, utilizou-se outra técnica para obtenção de informações referentes a estrutura secundária da proteína, chamada dicroísmo circular.

A técnica de dicroísmo circular (Circular Dichroism – CD) foi utilizada nos estudos de enovelamento da proteína *GumC* devido a sua sensibilidade em distinguir a presença e a porção de elementos de estrutura secundária de proteínas. O espectro de CD mostrou 2 mínimos locais de 208,6 e 222 nm e um valor máximo de 198 nm, característico de proteína com regiões de α-hélices (figura 4.33).

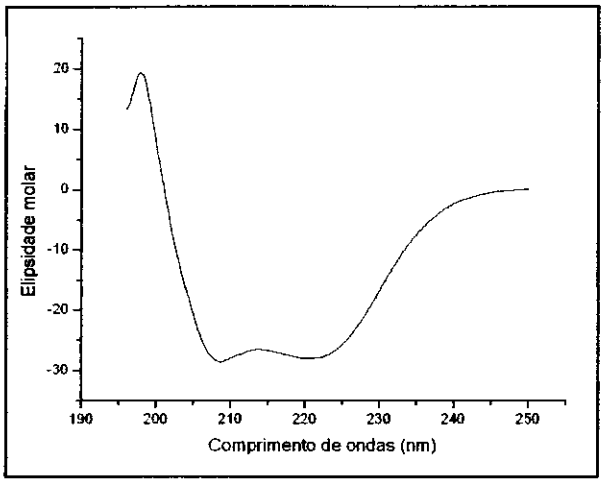


Figura 4.33 – Espectro de dicroísmo Circular (CD) da enzima *GumC* com varredura de 190 a 250 nm (coordenada y: $[\theta] = 10^3 . deg . cm^2 . dM^{-1}$).

Esse resultado foi então utilizado para o cálculo de desconvolução da curva média, para curvas equivalentes às proporções relativas a cada um dos elementos de estrutura secundária presentes. Para este cálculo foi utilizado o programa *SelfConsistent* (SELCON-3) e o resultado da desconvolução mostrou os seguintes resultados: 34% de α-hélices, 14% folhas β (antiparalelas e paralelas), 16% de "turns" e 36% de estruturas não ordenadas, apresentando um RMS (Root Mean Square) de 1%.

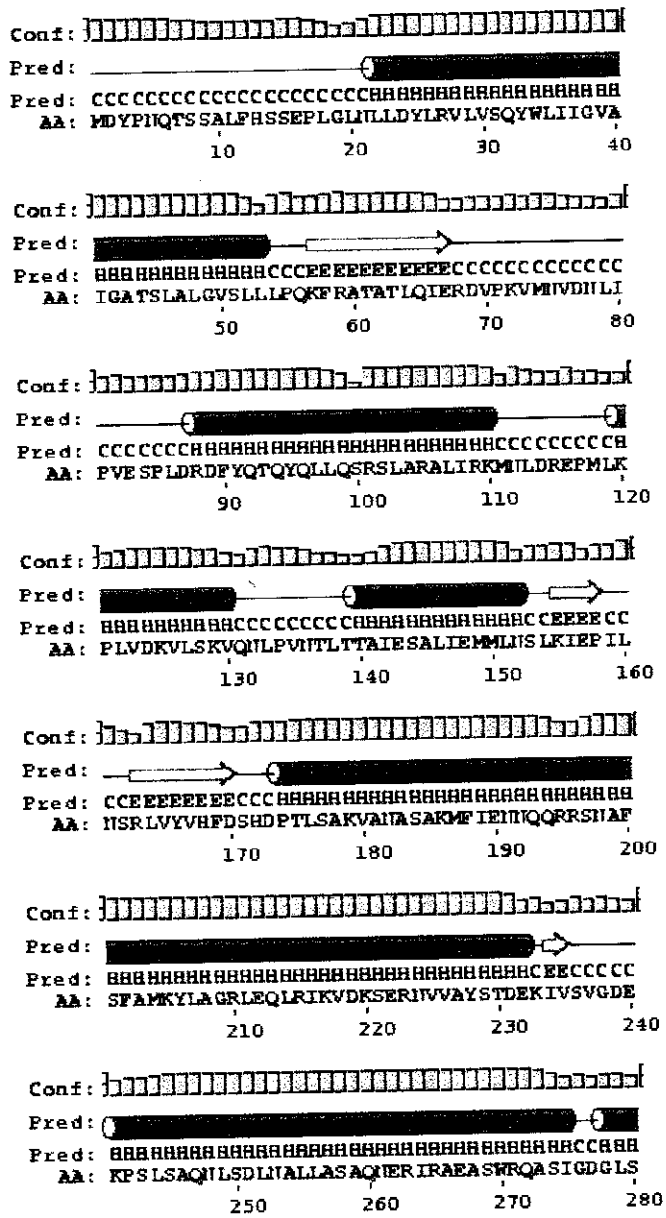
Testes de cristalização com a enzima *GumC*

Devido a instabilidade da enzima *GumC* e consequente dificuldade na obtenção da mesma pura, foram realizados testes de cristalização somente com o Fatorial I Crystal Screen (Hampton), estando a proteína *GumC* à 4,5mg/mL em tampão de amilose com 0,33% de Triton X-100, a 18°C. Estes testes iniciais de cristalização não apresentaram crescimento de cristais.

4.8) – Estudos de modelagem da enzima *GumC*

O objetivo desse estudo foi construir um modelo tridimensional para a proteína *GumC*, devido a falta de informações estruturais de proteínas semelhantes. A modelagem por homologia não foi possível, pois não existem estruturas conhecidas de proteínas homólogas á *GumC*. Portanto, o método de 'Threading' foi utilizado para o estudo teórico da estrutura da proteína *GumC*.

A predição de estrutura secundária é baseada no estudo de bancos de dados protéicos de estruturas primárias e secundárias conhecidas. O programa de predição de estruturas secundárias PsiPred fez uma predição para a enzima *GumC* de 61,88% de α-hélices, 8,99% de folhas β e 29,12% de estruturas não ordenadas (figura 4.34). Esta predição difere dos valores encontrados em medida experimental (Dicroísmo Circular) descrita acima, onde o resultado da desconvolução do espectro de CD revelou uma proteína com a seguinte composição: 34% de α-hélices, 14% de folhas β e 52% de estruturas não ordenadas. Programas que fazem predição de estruturas secundárias têm como limitação a utilização das sequências primárias e estruturas secundárias conhecidas e depositadas em bancos de dados. Deste modo, para proteínas que têm uma sequência primária e consequente estrutura secundária que diferem das depositadas em bancos de dados, a predição de estrutura secundária pode não condizer com a estrutura secundária real, visto que o programa acaba não achando moldes adequados para serem usados na predição.


Conf:
Pred:
Pred: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA: MDYPNQTSSALPASSEPLGLNLLDYLRVLVSQYWLIIGVA
10 20 30 40
Conf:
Pred:
Pred: HHHHHHHHHHHHCCCEEEEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCC
AA: IGATSLALGVSLLLPQKFRATATLQIERDVPKVMNVDNLI
50 60 70 80
Conf:
Pred:
Pred: CCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCH
AA: PVESPLDRDFYQTQYQLLQSRSLARALIRKMNLDREPMLK
90 100 110 120
Conf:
Pred:
Pred: HHHHHHHHHHCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCEEEECC
AA: PLVDKVLSKVQNLPVNTLTTAIESALIEMMLNSLKIEPIL
130 140 150 160
Conf:
Pred:
Pred: CCEEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA: NSRLVYVHFDSHDPTLSAKVANASAKMFIENTQQRRSNAF
170 180 190 200
Conf:
Pred:
Pred: HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCEECCCCC
AA: SFAMKYLAGRLEQLRIKVDKSERNVVAYSTDEKIVSVGDE
210 220 230 240
Conf:
Pred:
Pred: HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHHH
AA: KPSLSAQNLSDLNALLASAQNERIRAEASWRQASIGDGLS
250 260 270 280

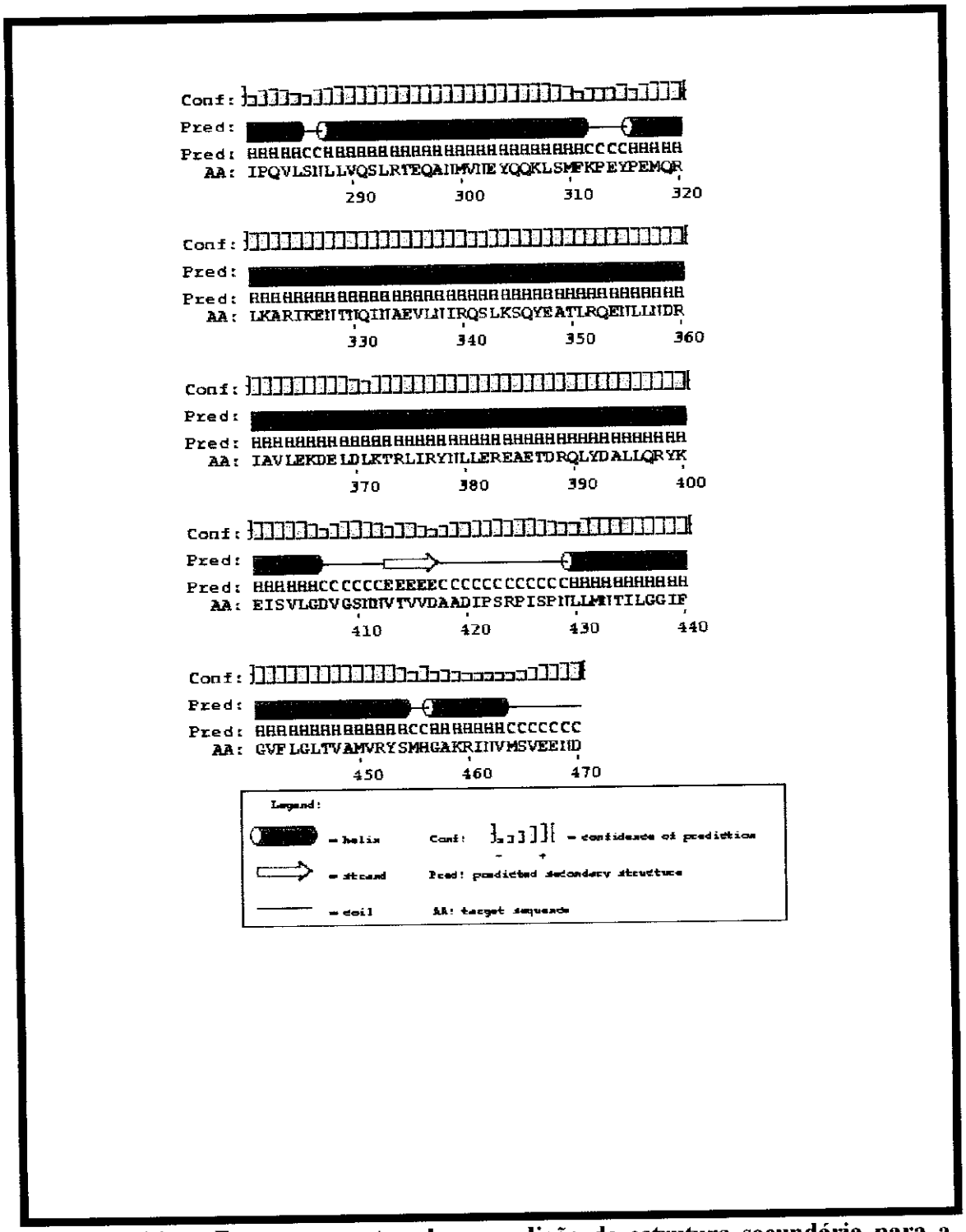


Figura 4.34 – Esquema mostrando a predição de estrutura secundária para a enzima *GumC* feita pelo programa PsiPred.

A busca por proteínas, cujas estruturas secundárias sejam s a estrutura secundária predita para a *GumC* foi feita com o programa GenThreader (Jones, 1999). O arquivo gerado pelo programa mostrou níveis de confiança significativos estatisticamente para a *GumC* quando comparada com quatro estruturas depositadas nos bancos de dados. Das quatro estruturas, três se referem a moléculas de proteínas estruturais: 1CUN (α-espectrina de cérebro de galinha, 1S35 (Espectrina eritróide humana) e 1QUU (α-actina humana) e a outra, 1YC9 (proteína de membrana relacionada com transporte de íons - Vce da bactéria *Vibrio cholerae*).

Conf	E-val	Alen	Dlen	Tlen	PDB_ID
CERT	4e-04	199	213	470	1cunA0
CERT	7e-04	308	418	470	1yc9A0
CERT	7e-04	193	211	470	1s35A0
CERT	8e-04	207	248	470	1quuA0

Tabela 4.1 – Resultado da busca realizada pelo programa GenThreader. As proteínas encontradas foram a 1CUN (α-espectrina de cerebro de galinha, 1YC9 (Vce da bactéria *Vibrio cholerae*), 1S35 (Espectrina eritróide humana) e 1QUU (α-actina humana).

A primeira coluna da tabela 4.1, *Conf*, informa a estatística da confiabilidade do alinhamento entre as estruturas secundárias da proteína a ser estudada e a proteína com estrutura conhecida. A segunda coluna mostra o valor *E-value* do alinhamento que depende do número de aminoácidos estruturalmente alinhados, da energia de formação

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

dos pares durante o alinhamento e da energia de solvatação. A terceira coluna, *Alen*, informa o número total de resíduos das proteínas alvo-molde alinhados. A quarta e quinta coluna, *Dlen* e *Tlen*, indicam os números totais de resíduos da proteína molde (proteína com estrutura conhecida) e da proteína alvo (proteína a ser estudada), respectivamente. A sexta coluna, *COD PDB*, indica o código PDB da proteína com estrutura resolvida usada como molde.

O programa gerou alinhamentos das seqüências baseado nas estruturas secundárias das proteínas e estes alinhamentos foram utilizados na construção dos modelos.

Para a construção dos modelos foram utilizadas, independentemente, as proteínas que apresentaram os melhores alinhamentos pelo programa GenThreader:

- 1CUN – código PDB da proteína α-espectrina de cérebro de galinha. Esta proteína é um componente vital do citoesqueleto, conferindo flexibilidade nas células, é responsável pela estruturação celular e organização intracelular (Grum *et al., 1999)*;
- 1YC9 – código PDB de uma proteína de membrana, chamada neste trabalho de VceC, do patógeno bacteriano *Vibrio cholerae*. Esta proteína parece ser um canal de membrana e estar relacionada com transporte de íons (Federici *et al.*, 2005).

As coordenadas atômicas das duas estruturas cristalográficas, que foram depositadas no banco de dados PDB com uma resolução maior de 2,0 A, foram utilizadas individualmente como molde na construção dos dois modelos para a *GumC*.

O programa MODELLER 6.0a (Sali *et al.*, 1993), utilizado para a construção dos modelos, gerou 50 modelos para cada um dos alinhamentos e um trabalho de validação foi efetuado para que os modelos de melhor qualidade fossem escolhidos. Os modelos gerados a partir dos alinhamentos obtidos pelo programa GenThreader foram avaliados pelos programas Procheck e Verify 3D. Para facilitar a compreensão adotamos os nomes *GumC* Modelo 1 (modelo a partir da proteína espectrina) e *GumC* Modelo 2 (modelo a partir da proteína VceC). O programa Procheck apresentou um bom resultado na avaliação estereoquímica dos moldes realizados, com no máximo 4 resíduos apresentando problemas estereoquímicos (1%).

Através do programa Verify 3D são analisadas as compatibilidades do modelo com a seqüência de aminoácidos, utilizando o perfil 3D. Cada resíduo no modelo tridimensional é caracterizado pelo seu ambiente químico (são utilizados 18, baseados na estrutura secundária, contatos polares e acessibilidade do resíduo). Pode ser caracterizada a preferência estatística do ambiente para cada um dos 20 aminoácidos. O "score" do perfil 3D para a compatibilidade do modelo com a seqüência de aminoácidos é a soma dos "scores" 3D para todos os resíduos da proteína. Além disso, o programa calcula o valor estatisticamente esperado para uma seqüência de aminoácidos do mesmo comprimento. A estrutura é considerada aceitável se o valor de "score" (S) obtido for maior que 45% do valor estatisticamente esperado. Os valores dos perfis 3D para os modelos da *GumC* a partir de cada uma das moléculas moldes são mostrados na tabela 4.2.

Modelos	"Score" obtido	"Score" calculado	45% Score Calculado
GumC Modelo 1	34,12	90,017	40,50
GumC Modelo 2	25,74	141,17	63,52

Tabela 4.2 – Valores de 'Score' 3D obtidos através do programa Verify 3D para os modelos *GumC* Modelos 1 e 2.

Os valores dos 'scores' obtidos para os modelos *GumC* Modelos 1 e 2 foram inferiores aos valores que correspondem a 45% dos 'scores' estatisticamente esperados. Estes números baixos dos 'scores' mostram que existem regiões nas quais os aminoácidos apresentam uma conformação desfavorável. Esses resultados mostraram que os modelos construídos não devem ser confiáveis, e o motivo para isso deve ser, provavelmente, a falta de motivos de estruturas secundárias depositadas nos bancos de dados que sejam semelhantes aos motivos da *GumC*. Esses resultados, na verdade, corroboram os dados experimentais obtidos de estrutura secundária para a *GumC*, que foi diferente do calculado pelo programa GOR4. Assim, a proteína *GumC* parece apresentar, pelo menos em parte, uma estrutura inédita.

4.9) - Minimização da molécula da proteína visando aumento de solubilidade/ estabilidade

Mesmo tendo realizado diversos experimentos de solubilização da proteína de fusão *GumC*-MBP, ainda não se encontrou um método eficiente para diminuir a agregação da proteína em estudo. Desta maneira, paralelamente aos experimentos realizados com a proteína *GumC* nativa, resolveu-se fazer novas construções do gene *gumc*, retirando as extremidades 5' e 3', que foram previstas através de programas de bioinformática, como possíveis codificadoras de regiões transmembrânicas.

Alguns estudos têm mostrado que para facilitar os processos de purificação, ensaios bioquímicos e/ou ensaios de cristalografia de proteínas, tem-se optado pela retirada de regiões transmembrânicas como "loops" e resíduos que formam α-hélices transmembrânicas (Popot e Saraste, 1995; Barret *et al.*, 2004).

Na maioria dos métodos de predição de regiões transmembrânicas, um gráfico de hidrofobicidade de toda a sequência é construído mostrando a hidrofobicidade local de cada resíduo protéico. Para se fazer um gráfico de hidrofobicidade, cada aminoácido deve receber inicialmente uma escala de hidrofobicidade, que varia de programa para programa. Os diferentes programas que fazem predições de regiões transmembrânicas usam diferentes tamanhos de peptídeos nas análises, e em geral, utilizam uma sequência de 17 - 25 aminoácidos (Claros e von Heijne, 1994).

Utilizamos o CBS (Centre for Biological Sequence Analysis) Prediction Servers (www.cbs.dtu.dk) para fazer a predição de regiões transmembrânicas da enzima *GumC*. Segundo o programa TMHMM, a enzima *GumC* teria uma região transmembrânica no N-terminal começando no aminoácido 32 até o aminoácido 54 e outra região transmembrânica no C-terminal começando no aminoácido 429 e terminando no aminoácido 451. Outros programas de predição de regiões transmembrânicas como o HMMTOP, fizeram predições semelhantes, com exceção do programa MEMSAT 2, onde a predição da região transmembrânica do N- Terminal começaria no aminoácido 30 e terminaria no aminoácido 42.

O resultado da predição feita pelo programa TMHMM é visualizado na figura 4.35.

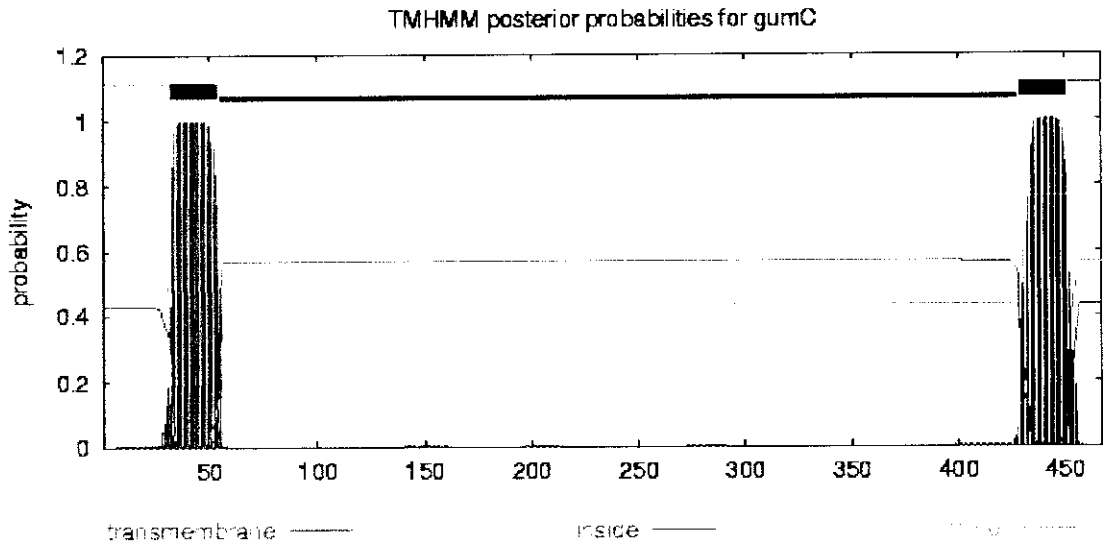


Figura 4.35– Resultado da predição, feita pelo programa TMHMM, de regiões transmembrânicas para a enzima *GumC* (em vermelho).

Foram desenhadas 9 construções do gene *gumc* para serem clonadas nos vetores de expressão pMALc-2x e pET29a. Com base na análise, feita pelo programa TMHMM, das possíveis regiões transmembrânicas da proteína *GumC*, os primers foram desenhados de forma a diminuir a região 5′ em 165 e 177 pares de bases e de forma a diminuir 126 e 162 pares de base da região 3′. Em algumas construções houve modificação de somente uma região (5′) sendo mantida a outra região (3′). Para 3 construções, adotamos a predição do programa MEMSAT 2, e retiramos 123 pares de bases da região 5'.

Com estas diferentes construções visamos estudar o comportamento de expressão e solubilidade da proteína *GumC* na presença de uma das regiões transmembrânicas N- ou C- terminal e na ausência das duas regiões preditas como regiões transmembrânicas.

Para melhor compreensão, as construções foram denominadas de C1 a C9 e estas estão visualizadas no esquema abaixo:

Gene *gumc* nativo: 1410 pb – enzima *GumC*: 470 aas

1410 pb

Gene *gumc* C1, construção para clonagem no vetor pET29a - Construção C1 retirada de 165 pb (55 aas) da extremidade 5' e 162 pb (54 aas) da extremidade 3'

Gene *gumc* C2, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C2: retirada de 165 pb (55 aas) da extremidade 5' e 162 pb (54 aas) da extremidade 3'.

Gene *gumc* C3, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C3: retirada de 165 pb (55 aas) da extremidade 5' e 126 pb (42 aas) da extremidade 3'.

Gene *gumc* C4, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C4: retirada de 177 pb (59 aas) da extremidade 5' e 162 pb (54 aas) da extremidade 3'.

Gene *gumc* C5, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C5: retirada de 177 pb (59 aas) da extremidade 5' e 126 pb (42 aas) da extremidade 3'.

Gene *gumc* C6, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C6: retirada de 123 pb (41 aas) da extremidade 5' e 162 pb (54 aas) da extremidade 3'.

Gene *gumc* C7, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C7: retirada de 123 pb (41 aas) da extremidade 5' e 126 pb (42 aas) da extremidade 3'.

Gene *gumc* C8, construção para clonagem no vetor pMALc-2x – Construção C8: retirada de 165 pb (55 aas) da extremidade 5'

Gene *gumc* C9, construção vetor pMALc-2x – Construção C9: retirada de 123 pb (41 aas) da extremidade 5'

Figura 4.36 —Esquema das construções para o gene *gumc* mostrando as diferentes regiões que foram retiradas das extremidades 5' e ou 3' (em vermelho observamos as regiões transmembrânicas preditas pelo programa TMHMM).

A amplificação dos novos 9 genes (genes C1 a C9) foi feita através de PCR utilizando os primers específicos para cada construção conforme descrito no ítem 2.2.11. Ocorreu amplificação em todas as construções (C1 a C9). As figuras 4.37 e 4.38 mostram as construções amplificadas.

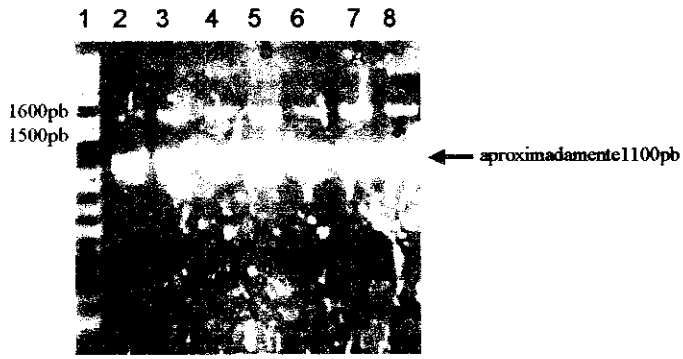


Figura 4.37 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação do gene *gumc* construções C1 a C7. Coluna 1: padrão de massa molecular 1kb. Colunas de 2: a 8: gene *gumc* (construções C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7, respectivamente (oligonucleotideo 5' e 3' modificados) para clonagem no vetor pMALc-2x.

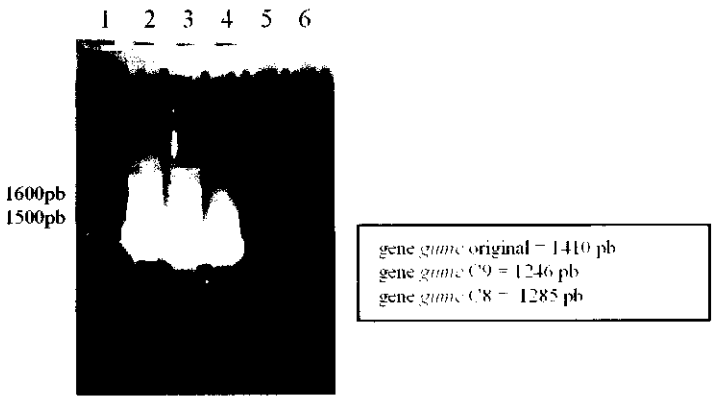


Figura 4.38 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação do gene *gumc* construções C8 e C9. Coluna 1: padrão de massa molecular 1kb. Coluna 2: gene *gumc* original (oligonucleotídeos 5' e 3' originais). Coluna 3: gene *gumc*9 (oligonucleotideo 5' modificado C9 e 3' original) para clonagem no vetor pMALc-2x. Coluna 4: gene *gumc*8 (oligonucleotideo 5' modificado C8 e 3' original) para clonagem no vetor pMAL-c2x.

Os produtos de PCR das diferentes construções foram utilizados para ligação ao vetor de clonagem pGEM-T easy (item 3.1.12). Os produtos das ligações (*gumc*1-9-pGEM-T) foram usados para transformação em células de *E. coli* DH5α. As colônias obtidas foram utilizadas para crescimento de cultura para posterior extração do DNA plasmidial, que foi digerido com enzimas de restrição de acordo com o vetor a ser usado na clonagem, pET29a (enzimas NdeI e NotI) ou pMalc-2x (enzimas *EcoRI* e *XbaI*). O processo de clivagem foi analisado por gel de agarose mostrando que somente as colônias que continham os clones para as construções C5 (retirada de 177 pb da extremidade 5' e 126 pb da extremidade 3'), C8 (retirada de 165 pb da extremidade 5') e C9 (retirada de 123 pb da extremidade 5') eram transformantes (figuras 4.39 e 4.40). Essas três construções foram planejadas para clonagem no vetor pMalc2-X.

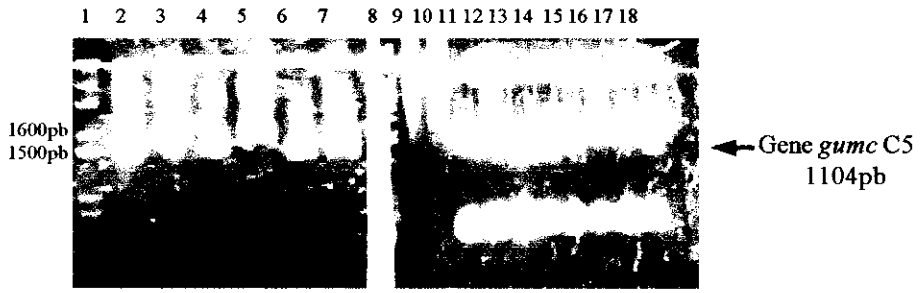


Figura 4.39 – Gel de agarose mostrando análise de retrição do gene *gumc* (construções de C1 a C7, respectivamente) após digestão das construções *gumc*C1-pGEM a *gumc*C7-pGEM, respectivamente. Colunas 1 e 8: padrão de DNA 1kb. Colunas 2, 4, 6, 11, 13, 15 e 17: colônias transformantes das construções *gumcs*-pGEM-T (C1, C2, C3, C4, C6, C7 e C5, respectivamente) antes da digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Colunas 3, 5, 7, 12, 14, 16 e 18: colônias transformantes das construções *gumc*-pGEM-T (C1, C2, C3, C4, C6, C7 e C5, respectivamente) após a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Colunas 9 e 10: vetor pMALc-2x antes e após a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*, respectivamente.

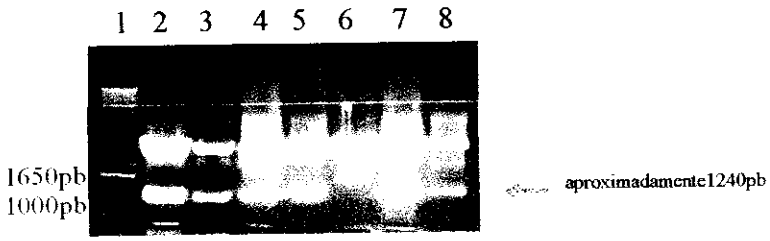


Figura 4.40 – Gel de agarose mostrando análise de restrição do gene *gumc* (construções C8 e C9) após digestão das construções *gumc*C8-pGEM e *gumc*C9-pGEM. Coluna 1: padrão de DNA. Colunas 2 a 4: colônias recombinantes da construção *gumc*8-pGEM-T mostrando o gene *gumc*8, após digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Colunas de 5 a 8: colônias recombinantes da construção *gumc*9-pGEM-T mostrando o gene *gumc*9, após digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*.

Após a digestão enzimática dos clones obtidos das construções C5, C8 e C9, os genes *gumc* modificados foram ligados ao vetor pMALc-2x previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*. Os produtos da ligação foram transformados em células de *E.coli DH5α* para propagação do plasmídeo. A análise de restrição dos plasmídeos *gumc*5-pMalc2X, *gumc*8-pMalc2X e *gumc*9-pMalc2X está representada nas figuras 4.41 e 4.42.

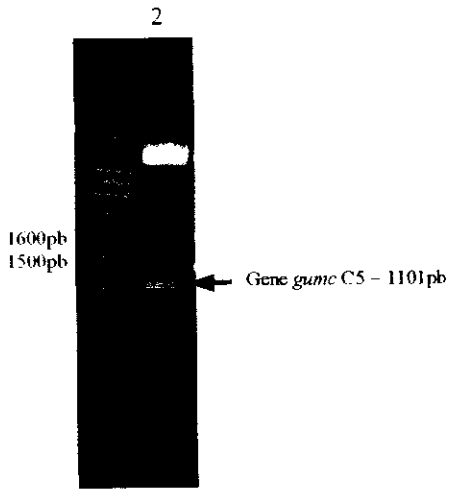


Figura 4.41 – Gel de agarose a 1% do gene *gumc*, construção C5 no vetor de expressão pMALc-2x (*gumc*C5-pMALc-2X). Coluna 1: padrão de massa molecular 1kb. Coluna 2: gene *gumc* extraído de uma colônia transformante da conctrução *gumc*C5-pMALc-2X.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

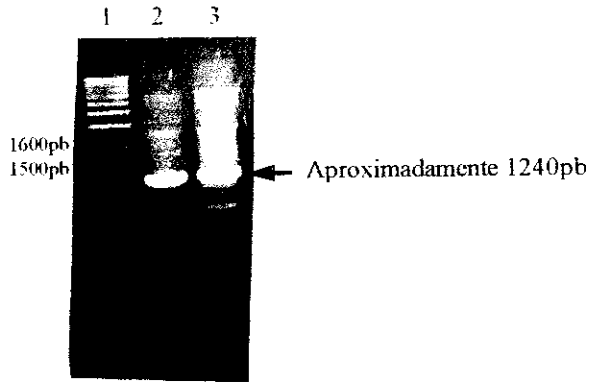


Figura 4.42 – Gel de agarose a 1% mostrando o gene *gumc* das construções C8 e C9 no vetor de expressão pMALc-2x (*gumc*-pMALc-2X). Coluna 1: padrão de massa molecular 1kb. Coluna 2: gene *gumc* extraído de uma colônia transformante da construção *gumc*C8-pMALc-2X. Coluna 3: gene *gumc* de uma colônia transformante da construção *gumc*C9-pMALc-2X.

Os genes *gumc* C5, C8 e C9, clonados no vetor de clonagem pMalc-2x foram seqüenciados, usando seus primers respectivos e os primers do próprio vetor pMALc-2x, pelo método Sanger. As seqüências obtidas foram alinhadas juntamente com a seqüência do gene *gumc* completo (banco de dados) utilizando o programa SeqMan (DNAStar). Assim, foi confirmado as clonagems dos genes *gumc* C5, C8 e C9 no vetor pMALc-2x.

4.9.1) - Testes de expressão e purificação das proteínas *GumC* modificadas - gene *gumc* modificado (Construções C5, C8 e C9)

Após a ligação vetor-gene foi feita sua transformação em cepa de *E. coli DH5α* e após, *BL21 (DE3)*.

Para as colônias transformantes das construções C8 e C9 foram realizados testes de expressão a 20 e 37°C com indução por 16 e 4hs respectivamente, utilizando 1mM de IPTG, porém não foi observada expressão. Assim mesmo, as culturas foram lisadas e o sobrenadante do lisado foi aplicado em coluna de amilose para checar a existência de

baixa expressão. Com as aplicações das amostras na coluna de amilose e eluição com 10mM de maltose não foi observada a eluição das proteínas de fusões modificadas nas construções *GumC*C8-MBP e *GumC*C9-MBP. As figuras 4.43 e 4.44 mostram os experimentos de expressão e purificação das proteínas *GumC*C8-MBP e *GumC*C9-MBP, respectivamente:

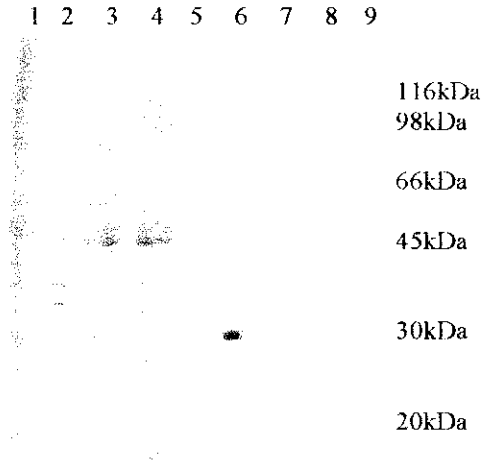


Figura 4.43- Gel SDS-PAGE a 12,5% da expressão (em células de *E. coli* BL21 (DE3) e purificação da proteína de fusão modificada *GumC*C8-MBP em coluna de amilose. Coluna 1: cultura de células antes da indução. Colunas 2 e 3: pellet e sobrenadante do lisado de células para obtenção da proteína *GumC*C8-MBP. Coluna 4: void da coluna de afinidade. Colunas 5 e 6: padrões de massa molecular de médio e alto peso molecular. Colunas 7 a 9: frações eluídas da coluna de amilose.

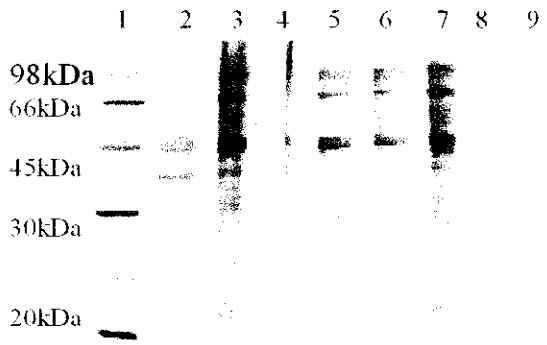


Figura 4.44- Gel SDS-PAGE a 12,5% da expressão (em células de *E. coli* BL21 (DE3) e purificação da proteína de fusão *GumC*C9-MBP em coluna de amilose. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: cultura de células antes da indução. Colunas 3 e 4: células após indução (pellet). Coluna 5 e 6: celulas após indução (sobrenadante) Coluna 7: void da coluna de afinidade. Colunas 8 e 9: frações eluídas da coluna de amilose.

A proteína *GumC*C5-MBP, modificada da construção C5, foi expressa em células de *E. coli DH5α* com crescimento a 37°C até D.O. 1,2 e induzida com 0,3mM de IPTG a 20°C por 16 hs. A cultura foi então centrifugada e ressuspendida em tampão de amilose com 1% de Triton X-100 e inibidores de proteólise.

Após lise celular e nova centrifugação (descritas nos ítens 3.1.12.6 e 3.1.12.7), o sobrenadante foi diluído e aplicado em 1mL de resina de amilose pré-equilibrada. A resina foi lavada com tampão de amilose para saída das proteínas que não se ligaram à coluna e a proteína *GumC*C5-MBP eluída com 10mM de maltose. A figura 4.45 mostra a expressão e purificação da proteína de fusão *GumC*C5-MBP em coluna de afinidade.

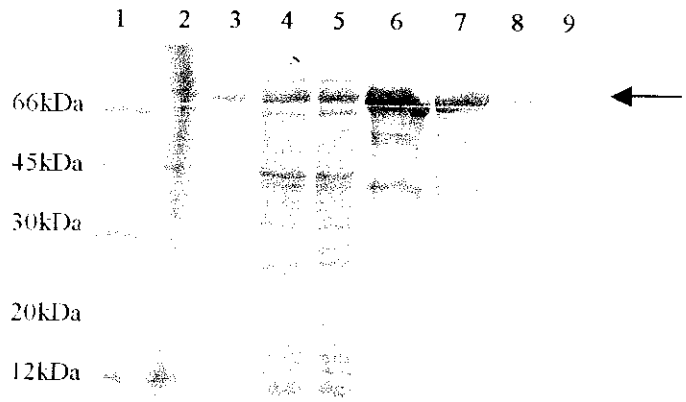


Figura 4.45- Gel SDS-PAGE a 15% da expressão (em células de *E. coli* (DH5α) e purificação da proteína *GumC*C5-MBP em coluna de amilose. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: cultura de células antes da indução. Colunas 3 e 4: pellet e sobrenadante do lisado de células contendo a proteína *GumC*C5-MBP. Coluna 5: void da coluna de afinidade. Colunas 6 a 9: frações eluídas com maltose da coluna de amilose.

Análise da figura 4.44 mostra muitas proteínas contaminantes que se ligam à resina de amilose, inclusive a proteína MBP da própria bactéria *E. coli*. Resolvemos utilizar as células de *E. coli BL21 (DE3)* para a expressão da proteína de fusão *GumC*C5-MBP e observar se diminua a ligação dos contaminantes à resina, porém não

observamos mudanças na expressão e purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5.

4.9.2) – Caracterização da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 através de dicroísmo circular

Após a purificação da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 em coluna de afinidade, uma amostra contendo a proteína a 0,2mg/mL foi usada para caracterização através de espectroscopia de Dicroísmo Circular. A proteína *GumC*-MBP modificada C5 revelou um perfil característico de proteína enovelada, com predominância de estruturas de α-hélices (figura 4.46).

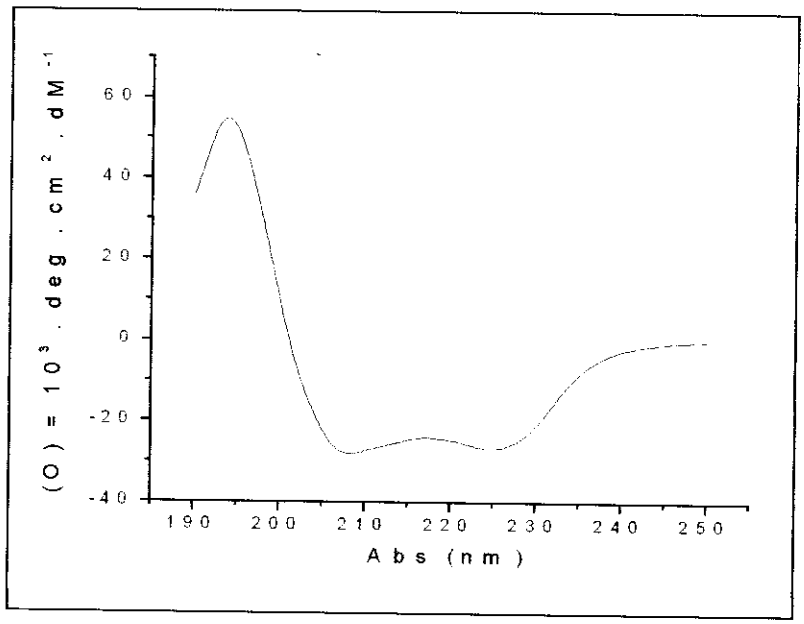


Figura 4.46 - Espectro de dicroísmo Circular (CD) da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 com varredura de 190 a 250 nm.

4.9.3) – Clivagem da proteína *GumC* modificada C5 com Factor Xa

Para analisarmos o comportamento da proteína *GumC* modificada C5 livre da fusão, iniciamos a clivagem da proteina *GumC*-MBP modificada C5 com a enzima Factor Xa. Um teste de clivagem da proteina de fusão *GumC*-MBP modificada C5 com o Factor Xa foi realizado. Utilizamos a proporção 1:100 (Factor Xa : *GumC*C5-MBP) e a clivagem ocorreu a 4°C. Alíquotas do processo de clivagem foram analisadas em 3, 6 e 15hs de clivagem. A figura 4.47 mostra a clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP em tempos diferentes.

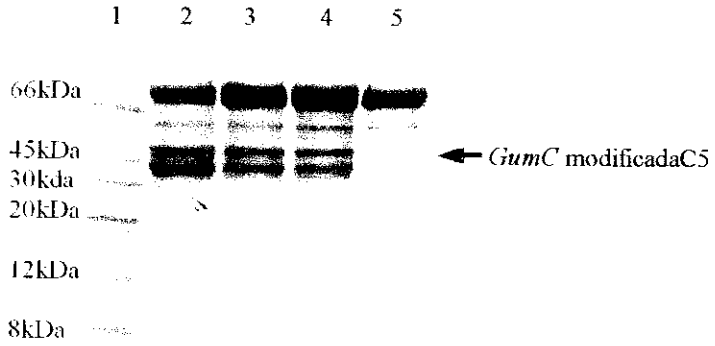


Figura 4.47 – Gel SDS PAGE a 10% da clivagem da proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 com a enzima Factor Xa em diferentes tempos. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas de 2 a 4: amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 após 15, 6 e 3hs de clivagem, respectivamente. Coluna 5: amostra contendo a proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 antes da clivagem.

Embora uma quantidade expressiva da proteína de fusão permaneça sem clivar, verificamos que a clivagem leva á formação da proteina *GumC* modificada C5 e da MBP. Experimentos de separação dessas proteinas em cromatografia devem ser realizados para obtenção da proteina *GumC* modificada C5 na forma pura. A amostra pura da proteina poderá ser utilizada em experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz, de forma a propiciar um estudo comparativo de estabilidade/solubilidade entre as

proteínas *GumC* e *GumC* modificada C5 (sem as regiões transmembrânicas). Análise comparativa semelhante poderá ser realizada entre as proteínas *GumC*-MBP e *GumC*MBP modificada C5.

4.10) – Referências Bibliográficas

BLUNDELL, T.L. and JOHNSON, L.N.- **Protein Crystallography -Academic Press Inc**., London, 1976.

BONDOS, S.E. and BICKNELL, A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. **Analytical Biochemistry, v.** 316 p. 223-231, 2003.

CACACE, M.G. LANDAU, E.M. and RAMSDEN, J.J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. **Quarterly Reviews of Biophysics,** v. 30, p. 241-277, 1997.

D'ARCY, A. Crystallizing Proteins – a Rational Approach **Acta Crystallographica**, D50, 469-471, 1994.

DE PIERI, C. Expressão, purificação e caracterização das enzimas GumD e GumC envolvidas na biossíntese do exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física de São Carlos – USP 2002.

DE PIERI, C.; BELTRAMINI, L.M.; SELISTRE, A. H. S.; VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; OLIVA, G. and SOUZA, D.H.F. Overexpression, purification, and biochemical characterization of GumC, an enzyme involved in the biosynthesis of exopolysaccharide by Xylella fastidiosa. **Protein Expr. Purif**. v. 34, p. 223-228, 2004.

DUCRUIX, A. and GIEGÉ, R. Crystallization of Nucleic Acids and proteins-**The practical approach series**, Oxford University Press, New York, USA, 1992.

FEDERICI, L.; DU, D.; WALAS, F.; MATSUMURA, H.; RECIO, J.F.; MCKEEGAN, K. S.; WALMSLEYL, M. I.B.; LUISI, B.F and WALMSLEY, A.R. The crystal Structure of the Outer Membrane Protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1,8A resolution. **The Journal of Biol. Chem**. v. 280, p. 15307-15314, 2005

FERRÉ-D'AMARÉ and BURLEY, S. K. Dynamic Light Scattering in Evaluating Crystallizability of Macromolecules. **Methods in Enzymology**, v. 276, p.157-166, 1997.

GIACOVAZZO,C., MONACO,H.L., VITERBO,D., SCORDARI,F., GILLI,G., ZANOTTI,G., CATTI,M.- **Fundamentals of crystallography- Oxford University Press Inc**.-New York, 1992.

GRUM, V.L.; LY, D. L.; MACDONALD, R.I. and MONDRAGON, A. Structures of two repeats os spectrin suggest models of flexibility. **Cell**, v. 98, p. 523-535, 1999.

HABEL, J. E.; OHREN, J. E.; and BORGSTAHL, E.O. Dynamic Light Scattering Analysis of Full-length Human RP14/32 dimer: purification, crystallization and self-association. **Acta Crystallographica, D57**, p. 254-259, 2001.

LIU, Y.; MANNA, A.; LI, R.; MARTIN, W.E.; MURPHY, R.C.; CHEUNG, A.L. and ZHANG, G. Crystal structure of the SarR protein from *Staphylococcus aureus*. **PNAS,** v.12, p. 6877-6882, 2001

MIKOL, V.; HIRSCH, E. and GIEGÉ, R. Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering. **Journal Molecular Biology**, v.213, p. 187-95, 1990.

SALI, A. and BLUNDELL, T.L. **J. Mol. Biol**. v. 234, p. 779-815, 1993.

VUILLARD, L.; RABILLOUD, T. and GOLDBERG, M.E. Interations of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate *in vitro* protein renaturation. **Eur. J. Biochem.,** v. 256, p. 128-135, 1998.

ZULAUF, M. e D'ARCY, A. Light Scattering of proteins as a criterion for crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 122, p. 102-106, 1992.

YAO, B. Dynamic Light Scattering Technology and Application to Protein Crystallization. **Protein Corporation**, 2004.

ENZIMA GLICOSILTRANSFERASE IV - *GUMK*

Neste capítulo descreveremos os resultados e discussões dos estudos de expressão, purificação e caracterização da enzima glicoronosiltransferase, *GumK*.

O gene *gumk* foi inserido no polylinker do vetor pMAL de forma a fazer fusão com o gene malE (colaboração com o Prof. Paulo Arruda – UNICAMP), que codifica a proteína que liga maltose (MBP), resultando na expressão de uma proteína de fusão MBP. Esta fusão facilita a purificação da proteína em coluna de afinidade com resina de amilose.

5.1) – Clonagem, expressão e purificação da proteína de fusão *GumK*-MBP

O gene *gumk*, originário do cosmídeo 07A02, foi clonado no vetor de expressão pMal-c2x (colaboração com o Prof. Paulo Arruda – UNICAMP). Após a transformação em células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, uma colônia transformante contendo o gene que codifica para a proteína de fusão *GumK*-MBP foi utilizada para expressar a proteína de fusão. A proteína de fusão *GumK*-MBP foi expressa a 20°C com adição de IPTG na concentração final de 0,3mM, apresentando uma massa molecular estimada de 86kDa em células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, majoritariamente na forma solúvel, estando uma parte como corpo de inclusão (figura 5.1).

Como observado na expressão da proteína de fusão GumC-MBP, também verificamos que a utilização de células de *E. coli* recém transformadas contendo o gene que codifica para a proteína de fusão *GumK*-MBP, aumentavam o rendimento da proteína de fusão e diminuiam a ligação inespecífica de proteínas na coluna de afinidade.

Foi estabelecido um protocolo de purificação para a proteína de fusão *GumK*-MBP, onde o sobrenadante do lisado foi aplicado em uma coluna de afinidade com resina de amilose, lavado com o tampão para coluna de amilose e em seguida foi eluído no mesmo tampão de coluna acrescido de 10 mM de maltose (Figura 5.1).

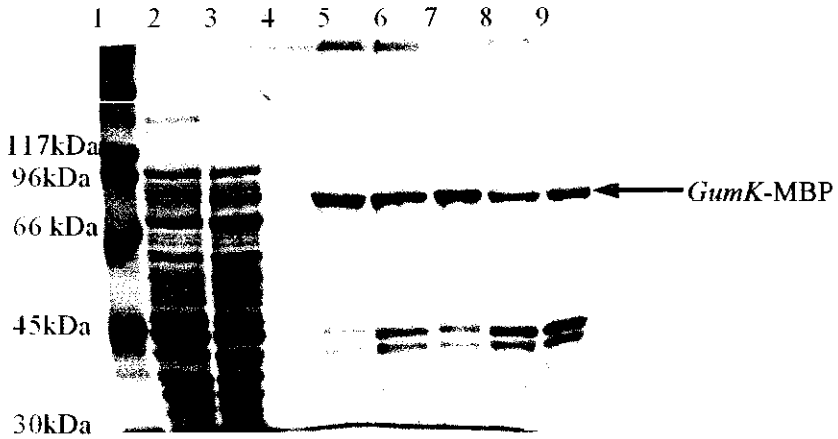


Figura 5.1 - Gel SDS-PAGE 10 % da purificação da proteína de fusão *GumK*-MBP em coluna de amilose. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: cultura de células BL21(DE3)plysS. Coluna 3: cultura de células após indução e lise celular (indução total). Colunas 5 a 9: frações eluídas com maltose da coluna de amilose.

Na figura 5.1 observamos que as frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP eluídas com maltose apresentam contaminantes. Optamos por introduzir outras

etapas de purificação: cromatografia de troca iônica e a precipitação com sulfato de amônio (S.A.).

5.1.1) – Cromatografia de troca iônica

Optamos por aplicar as frações que representam a saída da coluna de amilose em uma coluna de troca aniônica. As frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP, foram reunidas numa única fração, que foi então dialisada contra tampão da fosfato de sódio pH 8,5 e aplicada numa coluna DEAE – Sepharose.

A proteína de fusão *GumK*-MBP, apresentando um pI estimado de 6,23, eluiu no início do gradiente de NaCl, mas ainda apresentou alguns contaminantes (dados não mostrados).

5.1.2) - Precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com Sulfato de amônio (S.A.)

As frações eluídas da coluna de afinidade foram reunidas e submetidas à precipitação com sulfato de amônio (S.A.). A concentração de SA utilizada foi de 10% a 60%. Observa-se pelo gel de SDS-PAGE (figura 5.2 e 5.3) que a partir de 30% de SA a proteína *GumK*-MBP começa a sofrer precipitação, juntamente com outras moléculas de contaminantes. Com 40% de SA o contaminante de massa molecular aproximada de 43kDa está totalmente no precipitado e uma quantidade de amostra de *GumK*-MBP permanece na fração solúvel. A 45% de SA a proteína *GumK*-MBP apresenta-se no precipitado, embora uma pequena parte da proteína ainda permaneça no sobrenadante.

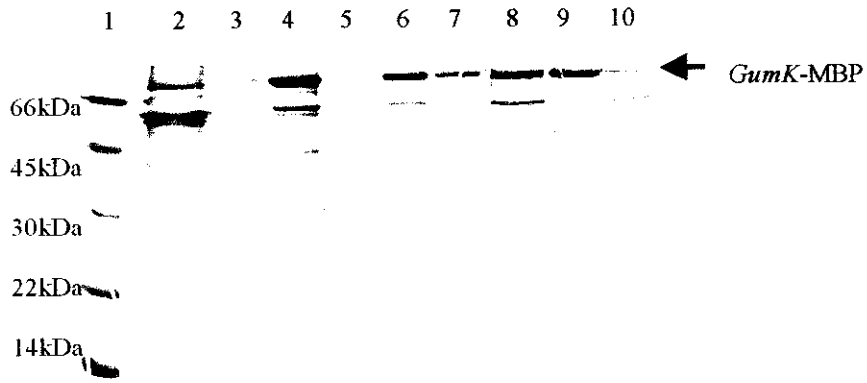


Figura 5.2 – Gel SDS PAGE a 15% da precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com sulfato de amônio. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: Fração contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP antes da precipitação com S.A. Colunas 3 e 4: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 10% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente. Colunas 5 e 6: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 20% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente. Colunas 7 e 8: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 30% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente. Colunas 9 e 10: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 40% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente.

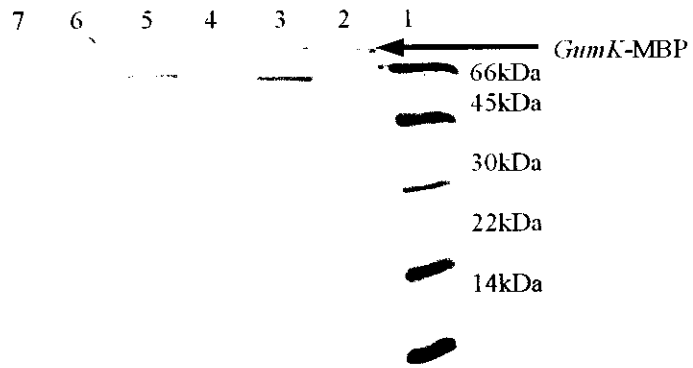


Figura 5.3. Gel SDS PAGE a 15% da precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com sulfato de amônio.. Coluna 1: Padrão de massa molecular. Colunas 2 e 3: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 45% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente.. Colunas 4 e 5: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 50% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente. Colunas 6 e 7: Frações contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP com precipitação a 60% de SA, pellet e sobrenadante, respectivamente.

Assim, o protocolo de purificação da proteína de fusão *GumK*-MBP ficou estabelecido em três etapas. Primeiramente o sobrenadante do lisado é aplicado em coluna de amilose, as frações eluídas contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP, são

reunidas e submetidas a precipitação com 40% de S.A para separação do contaminante de 43kDa (que permanece no precipitado). O sobrenadante obtido com 40% de SA contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP é submetido a uma nova precipitação agora com 45% de S.A. e a proteína de fusão é obtida no precipitado (figura 5.4).

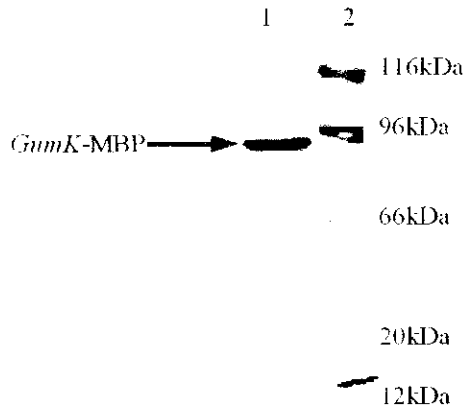


Figura 5.4 – Gel de SDS-PAGE a 10% do processo de precipitação da proteína de fusão *GumK*-MBP com sulfato de amônio. Coluna 1: padrão de alto peso molecular. Coluna 2: amostra de *GumK*-MBP precipitadas com 45 % de sulfato de amônio.

5.2) – Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP

A proteína de fusão *GumK*-MBP foi caracterizada através da reação com anticorpo anti-MBP e através da Técnica de Dicroísmo Circular.

5.2.1) Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP por imunoblotting

A caracterização da proteína *GumK*-MBP foi feita através da reação da proteína *GumK*-MBP com o anticorpo anti-MBP, conforme foi descrito no ítem 3.2.5.1. A amostra contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP, após eluição da coluna de amilose, foi eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose que posteriormente foi incubada com o anticorpo anti-MBP durante 1h e em seguida incubada por mais 1h com

o anticorpo anti-IgG de camundongo. Após essa incubação a membrana foi revelada com solução de NBT/BCIP. A figura 5.5 mostra a reação do antígeno *GumK*-MBP com o anticorpo anti-MBP.

Figura 5.5 - Western blotting da reação do anticorpo anti-MBP com o do antígeno *GumK*-MBP. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: reação positiva do anticorpo anti-MBP com a proteína de fusão *GumK*-MBP.

5.2.2) Caracterização da proteína de fusão *GumK*-MBP quanto ao enovelamento

A proteína de fusão *GumK*-MBP, após precipitação com sulfato de amônio, foi ressuspendida e dialisada em tampão de amilose e foi caracterizada através de espectroscopia de Dicroísmo Circular, revelando um perfil característico de proteína enovelada, com predominância de estruturas de α-hélices. O espectro mostrou 2 mínimos locais de 208.5 e 226 nm e um valor máximo de 195 nm, (figura 5.6).

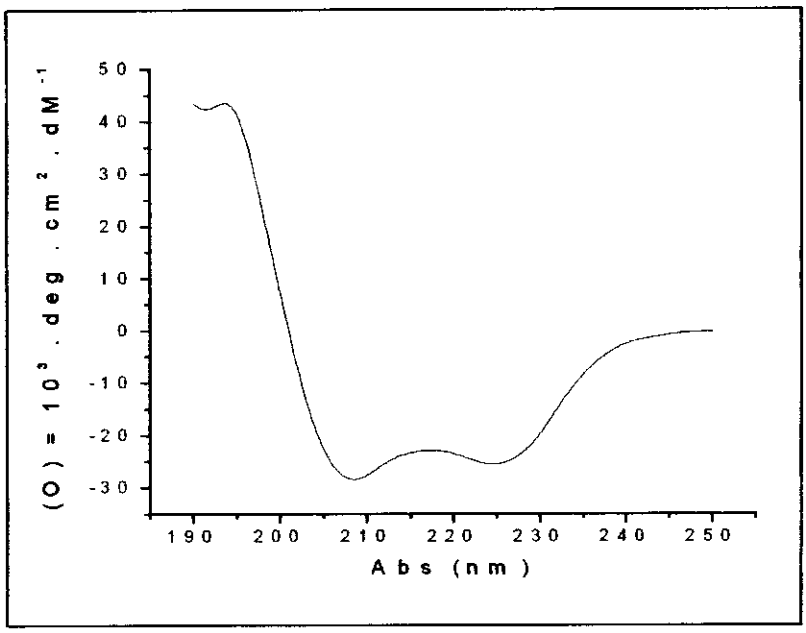


Figura 5.6 - Espectro de dicroísmo Circular (CD) da proteína de fusão *GumK*-MBP com varredura de 190 a 250 nm.

5.3) - Testes de cristalização com a proteína de fusão *GumK*-MBP

Como a proteína de fusão *GumK*-MBP apresentou-se com um grau de pureza estimado de 97% após precipitação com sulfato de amônio (figura 5.7), ensaios de cristalização foram iniciados. Para os testes de cristalização, o precipitado contendo a proteína de fusão *GumK*-MBP foi ressuspendido em tampão Tris/HCl 20mM, pH 7,4.

Figura 5.7 - Gel SDS-PAGE 10 % da proteína de fusão *GumK*-MBP utilizada nos testes de cristalização. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: proteína de fusão *GumK*-MBP pura utilizada para os testes de cristalização.

Como já mencionado nos testes de cristalização da proteína de fusão GumC-MBP, o fato da "Maltose Binding Protein" ter sua estrutura cristalina determinada (Liu *et al*,2001) poderá auxiliar na determinação tridimensional da proteína *GumK* em fusão com a MBP, já que para a enzima *GumK* também não tem nenhuma proteína homóloga com estrutura cristalográfica conhecida para ajudar na resolução da sua estrutura cristalográfica.

Foram feitos experimentos com os fatoriais Crystal Screen I e II (Hampton), fatorial PEG (Hampton), fatorial MembFac (Hampton) e fatorial 'The PEGs' (Nextal), estando a proteína de fusão a uma concentração de 8 mg/mL.

As condições de cristalização que apresentaram os melhores resultados, mostrando a formação de microcristais (Figura 5.8) e de cristais em forma de "cluster" em agulhas (Figura 5.9) foram as seguintes:

CONDIÇÃO	COMPOSIÇÃO
A6 do Fatorial PEG6000	0,1 M Bicine, pH 9,0 5 % w/v Polyethylene Glycol 6000 (Figura 26 A)
37 do Fatorial MembFac	0,1 M HEPES-Na, pH 7,5 0,6 M Magnesium Sulfate Hydrate Hydrate 4 % v/v Polyethylene Glycol 400 (Figura 26 B)

Tabela 5.1 – Tabela mostrando as condições em que hove a formação de microcristais ou cristais em forma de agulha da proteínade fusão *GumK*-MBP.

Figura 5.8 - Formação de microcristais da proteína de fusão *GumK*-MBP.

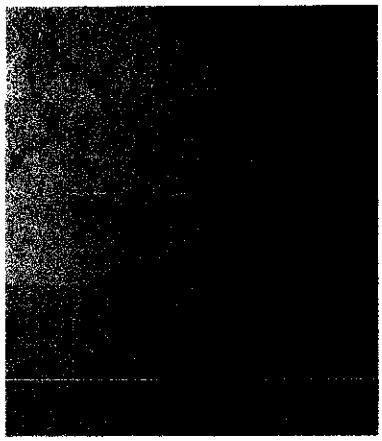


Figura 5.9 - Formação de cristais em forma de "cluster" em agulhas da proteína de fusão *GumK*-MBP.

Tentativas de otimização dos microcristais em torno destes fatoriais foram realizadas, variando-se as concentrações do sal e do PEG, para o fatorial 37 do MembFac e do PEG para o fatorial A6 do Fatorial PEG 6000. No entanto, não houve melhora no tamanho e morfologia dos microcristais.

5.4) – Testes de clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP com a enzima Factor Xa

Após a purificação da proteína *GumK*, ainda em fusão com a MBP, testes foram realizados para a clivagem com factor-Xa na tentativa de obtermos a proteína pura (sem fusão). A proteína de fusão *GumK*-MBP foi concentrada até 1 mg/mL e os testes foram realizados (durante 24h), porém não foi observada nenhuma clivagem da proteína de fusão. Seguimos a recomendação do manual do vetor pMALc-2x, para clivagem da proteína de fusão, onde é sugerido a utilização do detergente para facilitar a ação da enzima proteolítica, uma vez que o uso de detergentes em processos de clivagem podem

auxiliar tornando mais exposto o sítio de clivagem Factor Xa. Utilizamos diferentes concentrações do detergente SDS, 0,01, 0,03 e 0,06% (Figura 5.10).

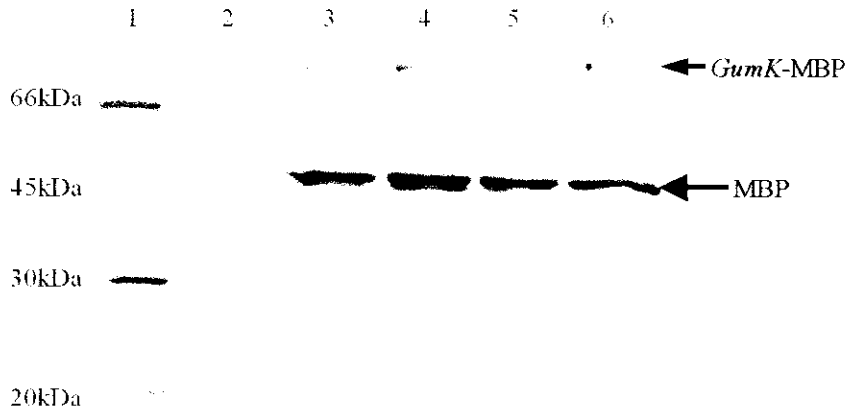


Figura 5.10 - Gel SDS-PAGE 15 % dos testes de clivagem da fusão *GumK*-MBP com factor-Xa com porcentagens diferentes de SDS. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: *GumK*-MBP eluída da coluna de amilose. Coluna 3: *GumK*-MBP com factor Xa, sem SDS. Coluna 4: *GumK*-MBP + factor Xa + 0,001 % SDS. Coluna 5: *GumK*-MBP + factor Xa + 0,003 % SDS. Coluna 6: *GumK*-MBP + factor Xa + 0,005 % SDS.

Como pode ser observado na Figura 5.10, o processo de clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP foi incompleto, mesmo por um longo período de reação, 24h, e mostrou uma melhora muito pequena com a adição de SDS e além disso, observamos o aparecimento de outras bandas, um indicativo que a proteína de fusão sofreu degradação durante o processo de clivagem.

Resolvemos então trocar o tampão de amilose (Tris/HCl 20mM, pH7,4 com 200mM de NaCl) pelo tampão Hepes pH6,0, também sugerido pelo manual do pMALc-2x. Com a troca de tampão observamos uma melhora siginificativa no processo de clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP. Assim podemos diminuir o tempo de

clivagem gasto anteriormente para 15hs a 18°C evitando a clivagem inespecífica e degradação da proteína *GumK* (figura 5.11).

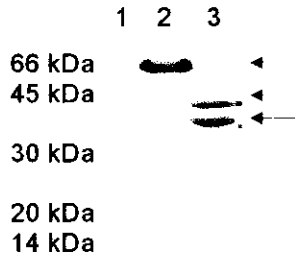


Figura 5.11 - Gel SDS-PAGE 15 % da clivagem da proteína de fusão *GumK*-MBP. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: amostra de *GumK*-MBP mantida a 18°C por 72 h sem factor Xa. Coluna 3: amostra contendo a proteina de fusão *GumK*-MBP clivada com factor Xa após 72h a 18°C (→ *GumK*-MBP 86 KDa (fração não clivada), → *GumK* 44 KDa (fração clivada), → MBP 42 KDa).

Com o protocolo de clivagem estabelecido, iniciamos o processo de purificação da *GumK* livre da fusão.

5.5)- Purificação da proteína *GumK*

A amostra contendo a proteína *GumK* após a clivagem, foi aplicada em uma coluna de troca catiônica POROS 20 HS® para a obtenção da proteína nativa.

Utilizou-se o tampão 20 mM HEPES pH 6,0, pois desta forma, neste pH, a proteína *GumK* que tem ponto isoelétrico teórico de 6,98 fica na sua forma protonada e liga-se à resina, sendo eluída no gradiente salino com aproximadamente 300mM de NaCl. A proteína MBP que tem ponto isoelétrico 5,22 é eliminada logo nas primeiras frações da purificação, antes do gradiente salino. A fração não clivada *GumK*-MBP possui ponto isoelétrico 6,14, isto é, liga-se fracamente à coluna e elui logo no começo

do gradiente salino (cromatograma não mostrado). A figura 5.12 mostra o gel de SDS-PAGE das frações descritas acima, eluídas da coluna POROS 20 HS.

As frações contendo a proteína *GumK* foram reunidas, e esta nova fração foi concentrada a 4,0 mg/mL para os testes de cristalização.

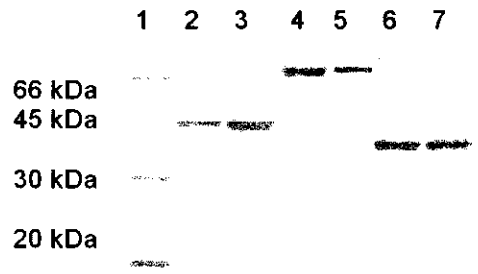


Figura 5.12 - Gel SDS-PAGE 15 % da cromatografia de troca catiônica Poros 20 HS. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas 2 e 3: proteína *GumK* eluída com 30% de NaCl. Colunas 4 e 5: proteína de fusão *GumK*-MBP (fração não clivada) eluída no início do gradiente salino, Colunas 6 e 7: proteína MBP eluída na lavagem da coluna com tampão sem sal.

5.6) - Testes de cristalização com a proteína *GumK*

Os testes de cristalização da proteína *GumK* foram realizados com a proteína a 4mg/mL em tampão Hepes pH 6,0 com aproximadamente 30% de NaCl (fração eluída da coluna de troca catiônica). Para os ensaios de cristalização foram utilizados o fatorial da MembFac (Hampton), os fatoriais 'The PEGs' (Nextal) e os fatoriais Crystal Screen I e II (Hampton).

Observamos a formação de 'cluster' de agulhas (Figura 5.13A) na condição 14 do Nextal, 'The PEGs': 0,1 M HEPES pH 7,5, 30 % v/v PEG 300. Na condição 5 do fatorial Hampton MembFac: 0,1 M acetato de sódio triidratado pH 4,6, 12 % w/v PEG 4000, observou-se a formação de microcristais (Figura 5.13B). Colocou-se um dos

microcristais no raio-X para verificar se tratava de cristais de proteína e não de sal e apesar de difratar a baixa resolução, podemos confirmar que era um cristal de proteína.

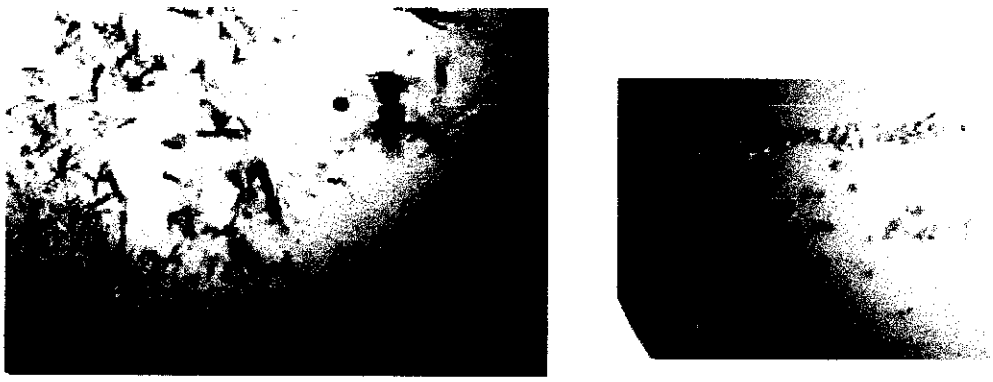


Figura 5.13 - 1 Testes de cristalização com a proteína GumK. Em A: "cluster" de agulhas (condição 14 do Nextal "The Pegs"). **Em B**: microcristais (condição 5 do fatorial MembFac da Hampton).

Estes resultados mostram que estamos no caminho certo para a cristalização da proteína *GumK*, mas as condições precisam ser ajustadas para tentarmos crescer cristais mais ordenados que difratem a mais alta resolução.

5.7) – Referências Bibliográficas

LIU, Y.; MANNA, A.; LI, R.; MARTIN, W.E.; MURPHY, R.C.; CHEUNG, A.L. and ZHANG, G. Crystal structure of the SarR protein from *Staphylococcus aureus.* **PNAS,** v.12,p. 6877-6882, 2001

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A seqüência gênica da bactéria *Xylella fastidiosa* foi determinada em meados de 2000 em um projeto inédito para o Brasil, pois se configurou no primeiro Projeto Genoma Brasileiro. A cepa de *X. fastidiosa* estudada se instala no xilema de citros impedindo que água e sais minerais sejam transportados o que leva a planta a desenvolver a doença clorose variegada de citros (CVC) também popularmente conhecida como amarelinho. A análise do genoma da *X. fastidiosa* mostrou a presença de um operon, denominado "Operon gum", constituído por nove genes (*gume*, *gumj*, *gumc*, *gumb*, *gumm*, *gumd*, *gumf*, *gumk* e *gumh*). Esses genes codificam a síntese de nove enzimas envolvidas na síntese de um polissacarídeo extracelular denominado goma fastidiana. Operon semelhante ao operon gum de *X. fastidiosa* é encontrado na bactéria *Xanthomonas campestris*, onde foi constatado que mutações em alguns genes gum levaram á diminuição da produção do exopolissacarídeo (goma xantana) e também á diminuição da virulência da bactéria. Assim, a via biossintética do exopolissacarídeo tem sido descrita como um dos fatores de virulência de *Xanthomonas campestris*.

No presente trabalho, foram estudadas duas proteínas envolvidas na biossíntese da goma fastidiana e codificadas pelos genes *gumc* e *gumk*. A proteína *GumK* é a enzima

responsável pela transferência de uma molécula de ácido glucorônico ao lipídeo carreador, enquanto que a proteína *GumC* não tem ainda sua função totalmente esclarecida, mas está envolvida provavelmente na polimerização ou na exportação da goma através da membrana da bactéria. A enzima *GumC* deve apresentar um papel fundamental na produção da goma, uma vez que em Xanthomonas, mutações no gene *gumc* homólogo ao da *Xylella fastidiosa*, levaram à diminuição de sua produção e da virulência da bactéria.

Previsões teóricas, realizadas com ferramentas de bioinformática, mostraram que as regiões N- e C- terminais da enzima *GumC* são regiões transmembrânicas. Assim, nós realizamos estudos com o gene 'inteiro' e também com o gene modificado nas regiões 5' e 3'com o objetivo de melhorar a estabilidade da proteína recombinante.

O gene *gumc* foi clonado no vetor pMalc2-X, o que permitiu a expressão da proteína em fusão com a maltose binding protein (MBP). Diversas etapas cromatográficas foram realizadas com o objetivo de levar a proteína ao mais alto grau de pureza possível. A proteína pura foi utilizada em experimentos de cristalização tendo sido obtidos micros cristais da proteína, entre os 1000 testes de cristalização. A otimização desses micros cristais ainda está em andamento para futuros estudos cristalográficos. A proteína de fusão *GumC*-MBP foi caracterizada por técnicas como 'immunobloting', dicroísmo circular (CD) e espalhamento dinâmico de luz (EDL). A proteína de fusão *GumC*-MBP, quando clivada com a enzima Factor Xa, libera a proteína *GumC*, que foi isolada e caracterizada quanto ao seu peso molecular, por cromatografia de filtração a gel, quanto ao seu enovelamento através da técnica de CD, à

sua região N-terminal através de seqüenciamento e reação com o anticorpo anti-*GumC*-MBP (immunobloting).

A minimização da estrutura da proteína *GumC* foi realizada desenhando-se 6 primers diferentes, que resultaram em nove construções. Os vetores escolhidos para essas construções foram o pMal-c2X e o pET29b. Foram obtidos clones para as construções C5 (retirada de 177 pb da extremidade 5' e 126 pb da extremidade 3'), C8 (retirada de 165 pb da extremidade 5') e C9 (retirada de 123 pb da extremidade 5'), planejadas para clonagem no vetor pMalc2-X. Os três clones foram utilizados para experimentos de expressão das proteínas, tendo sido, até o momento, a proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 expressa na forma solúvel em *E.coli*. A proteína de fusão *GumC*-MBP modificada C5 foi purificada e caracterizada quanto ao enovelamento de estruturas secundárias através da técnica de dicroísmo circular. E utilizada em testes de clivagem com a enzima Factor Xa para obtenção da proteína *GumC* modificada.

Devido à total falta de informações estruturais sobre a proteína *GumC* ou homólogas, a construção de um modelo tridimensional poderia ser muito informativo. Portanto, fizemos este estudo utilizando técnicas de Threading, que permitem o estudo de modelagem molecular partindo da importância da semelhança estrutural e não a semelhança seqüencial para a modelagem molecular. A busca por moléculas candidatas a moldes, estruturalmente homólogas à enzima *GumC*, foi feita com os programas GenThreader e THREADER 3.3 utilizando-se bancos de dados. Quatro estruturas foram consideradas de boa homologia estrutural e duas delas, a proteína α-espectrina de cérebro de galinha, responsável pela estruturação celular e organização intracelular e a Vce, uma proteína de membrana que parece estar relacionada com transporte de íons,

foram utilizadas para construir os modelos 3D da *GumC*. O programa Procheck apresentou um bom resultado na avaliação estereoquímica dos modelos obtidos. Já o programa Verify 3D, apresentou 'scores' de energia baixos, com muitas regiões apresentando problemas quanto ao ambiente químico no qual os aminoácidos estão contidos.

Os programas utilizados neste trabalho fazem buscas de elementos de estrutura secundária depositados em banco de dados de estruturas determinadas. O fato dos modelos gerados apresentarem energias de 'score' abaixo do limite aceitável, baseado em cálculos estatísticos, indica que a proteína *GumC* pode apresentar um enovelamento que ainda não é conhecido. Esses resultados mostraram que os modelos construídos não devem ser confiáveis, e o motivo para isso deve ser, provavelmente, a falta de motivos de estruturas secundárias depositadas nos bancos de dados que sejam semelhantes aos motivos da *GumC*. Assim, a proteína *GumC* parece apresentar, pelo menos em parte, uma estrutura inédita.

O gene *gumk* foi clonado no vetor de expressão pMALc-2x, permitindo a expressão da proteína *GumK* em fusão com a proteína MBP. A proteína de fusão *GumK*-MBP foi purificada e caracterizada quanto a reação com o anticorpo anti-MBP e quanto ao enovelamento. Com a proteína de fusão pura foram realizados ensaios de cristalização onde obtivemos micros cristais. A proteína de fusão *GumK*-MBP foi clivada e a enzima *GumK* foi isolada. Foram realizados experimentos de cristalização com a proteína *GumK* pura e também obtivemos micros cristais.

A partir destes experimentos realizados com a enzima *GumC* espera-se dar continuidade a caracterização da proteína *GumC*-MBP modificada C5 e também a

realização de estudos comparativos de estabilidade entre a proteína modificada C5 e a proteína GumC 'nativa'.

Para a proteína *GumK* espera-se caracterizá-la e estabelecer um ensaio enzimático. Espera-se também a otimização dos micros cristais tanto da proteína de fusão *GumK*-MBP quanto da enzima *GumK* para futuros estudos cristalográficos.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem de forma significativa para o conhecimento das enzimas da via sintética da goma fastidiana, um exopolissacarídeo produzido pela bactéria *X. fastidiosa*, e provavelmente um dos fatores patogênicos. Estudos com as enzimas homólogas, de *Xanthomonas*, estão começando a surgir na literatura o que mostra o interesse no conhecimento bioquímico e estrutural dessas enzimas, podendo esta ser uma interessante ferramenta para entender melhor o mecanismo de virulência como também para o desenvolvimento de novas metodologias para contenção das doenças causadas por essas bactérias.