Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

Aline Regis Faro

**Estudos estruturais e funcionais da Xylellaína,
uma cisteína protease da bactéria *Xylella fastidiosa***

São Carlos - SP

2008

Aline Regis Faro

**Estudos estruturais e funcionais da Xylellaína,
uma cisteína protease da bactéria *Xylella fastidiosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Física do Instituto de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

São Carlos - SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Faro, Aline Regis

Estudos estruturais e funcionais da *Xylellaina*, uma cisteíno protease da bactéria *Xylella* fastidiosa / Aline Regis Faro; orientador Glaucius Oliva.-- São Carlos, 2008.

80p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada – opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. *Xylella* fastidiosa. 2. Cisteíno protease. 3. Pró-enzima.
I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Regis Faro

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada - Opção:
Física Biomolecular.

Aprovada em: 16/07/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Glaucius Oliva

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo De Marco

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo

Instituição: UNICAMP

Assinatura

DEDICATÓRIA

A Isabel Regis Peixoto Faro, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha mãe, Isabel, mesmo sem sua presença esteve em meu pensamento fortalecendo em minhas decisões e me saudando nos momentos de alegria. Ao meu pai, Nelson, e todas suas brincadeiras que me faz muito feliz. A minha querida irmã, Amanda, por tudo o que ela representa de melhor na minha vida.

Agradeço a todos aqueles que cultivam a nobre função de ensinar. Desde os que me orientaram ao concretizar uma pesquisa científica, Prof. Glaucius, Prof. Otávio até aqueles que conseguiram provocar comichões científicas em uma criança, Prof. Beto. Obrigados a todos os Professores que me acompanharam neste percurso.

Agradeço a todos os nossos colaboradores, suas contribuições foram essenciais para a realização desse trabalho. Em especial ao Alvicler e Rodrigo, pela paciência e perseverança durante os experimentos.

Agradeço a meus amigos por proporcionarem um ambiente tão alegre e fértil. Em particular a sala 15; Nathalia, Nayara, A.S.N, L.Bleicher , Bachega e Ribeiro.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP. E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

“-Sinto uma comichão no cérebro – disse Pedrinho. Quero saber coisas.

Quero saber tudo quanto há no mundo...”

“-Outra coisa que não entendo - disse Narizinho, é esse negócio de várias ciências. Se a ciência é o estudo das coisas do mundo, ela devia ser uma só, porque o mundo é um só.”

“...explicou Dona Benta...quando você toma um objeto qualquer, nele encontra matéria para todas as ciências...”

Comichões científicas, Serões de Dona Benta.

Monteiro Lobato

RESUMO

FARO, A. R. **Estudos estruturais e funcionais da Xylellaína, uma cisteína protease da bactéria *Xylella fastidiosa***. 2008. 80p Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa que infecta o xilema das plantas causando muitas vezes a maturação precoce e a diminuição dos frutos. Ela é responsável por importantes perdas na economia, no Brasil é a causadora de doenças de Citrus Variegated Chlorosis (CVC) e a da doença de Pierce nos Estados Unidos. As proteases desempenham funções vitais no ciclo de vida de muitos parasitas, muitas estão envolvidas em processos infecciosos, a Xylellaína é uma cisteína protease que é diferentemente expressa em cepas patogênicas e não patogênicas. A compreensão de seu mecanismo catalítico, através do estudo da sua estrutura e função, pode ajudar no planejamento de inibidores seletivos, potenciais agentes contra as doenças fitopatológicas ocasionadas pela *X. fastidiosa*. Sua estrutura molecular foi elucidada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (USP), estudos estruturais mostraram que a proteína se apresenta na forma de uma pró-proteína, pois está inativa devido a uma pró-região que bloqueia o sítio catalítico. Também foi verificada a presença de um nucleotídeo na estrutura da Xylellaína próximo a pró-região, como hipótese foi considerada a relação entre o nucleotídeo e o mecanismo de ativação da proteína. A influência do nucleotídeo na atividade funcional da enzima foi constatada através da comparação de ensaios enzimáticos entre a enzima nativa e mutantes. As mutações foram planejadas com a intenção de ocasionar a desestabilização do nucleotídeo, por isso foram mudados os resíduos da pró-região que interagem diretamente com o ele. As mutações foram Fenilalanina 45 (F45), Arginina 43 (R43) e F45/R43, todos os resíduos foram mudados para Alaninas (A). Os resultados mostraram que os valores de K_m obtidos para a proteína nativa e suas mutantes apresentaram consideráveis alterações quando comparado entre eles, esse efeito não foi percebido para a eficiência catalítica. Conclui-se que as mutações pouco alteraram a capacidade da enzima converter o substrato em produto, mas houve significantes alterações no reconhecimento do substrato. Esse resultado corrobora com a hipótese de que a existência do nucleotídeo está relacionada com o mecanismo de ativação da proteína.

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*. Cisteína protease. Pró-enzima.

ABSTRACT

FARO, A. R. **Structural and functional studies about Xylellain, the cysteine protease from bacterium *Xylella fastidiosa***. 2008. 80p Dissertation (Master) – Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2008.

Xylella fastidiosa is a Gram-negative bacterium which infects the plant xylem system causing in many cases precocious maturation and diminution of fruits. It is responsible for economically important plant diseases, such as the Citrus Variegated Chlorosis (CVC). Proteases might be involved in the infection process by disrupting plant tissue. Xylellain is a cysteine protease which is differently expressed in strain pathogen and non-pathogen of *X. fastidiosa*. The 3D structure of xylellain was solved by our group and structural studies show that this protein has a proenzyme form and a ribonucleotide close to the amine terminal region. Our hypothesis is that protein-nucleotide interactions are related to xylellain's activation mechanism. To evaluate the influence of the nucleotide in the functional activity of enzyme, point mutations in aminoacids which interact directly with this ribonucleotide were carried out. The point mutations are phenylalanine 45 (F45) and arginine 43 (R43), individually mutated for alanine (A) residues. One way to quantify the changes caused by the alteration of a nucleotide is the direct comparison between the kinetic enzyme assays of native and mutant proteins. Greater variations between the values of K_m than in the values of catalytic efficiency were observed. This suggests that the speed of production varied by enzyme-substrate. However the mutations caused little change on the ability of the protease to catalyze the reaction. This result is in agreement with the hypothesis that the nucleotide provides the structural support for the hinge formation on the N-terminal domain, thus directing the inhibitory peptide inside the active site of the enzyme. Therefore, the nucleotide may be exerting regulatory functions *in vivo*, possibly in the folding or activation of the protein and performance of catalytic function.

Keywords: *Xylella fastidiosa*. Cysteine protease. Proenzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	(A) Sintomas dos frutos de uma planta infectada por CVC (B) Inseto vetor, <i>Molomea</i> . (C) Detalhe de <i>X. fastidiosa</i> aderidas às paredes do vaso xilema de citrus (modificado de http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/)...	18
Figura 1.2	Representação em cartoon das estruturas de cisteíno proteases. (a) Papaina (9PAP), (b) Cruzaina (2AIM), e (c) Propcathepsina B (3PBH). Em evidência o domínio L em azul e o domínio R em vermelho.....	21
Figura 1.3	Estrutura molecular da Xylellaína possui dois domínios R e L. As hélices-alfa e as folhas betas estão numeradas iniciando dos resíduos do N-terminal para o C-terminal. O nucleotídeo Uridina di fosfato está em destaque.....	24
Figura 2.1	Esquema da via catalítica da Xylellaína, através deste esquema pretende-se resumir os pontos relevantes para o entendimento do seu mecanismo. As possibilidades A e B representam a ausência de informação sobre o que ocorre com o nucleotídeo após a ativação.....	25
Figura 2.2	Esquema de estudos, resultados e experimentos realizados para o estudo estrutural e funcional da Xylellaína.....	27
Figura 3.1	Construção plasmidial do vetor pET28a (retirado de http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf).....	29
Figura 3.2	Placa utilizada para os experimentos de fluorescência. Os poços em destaque azul são aqueles que a solução se arranjava de maneira a não apresentar interferência nas medidas, é possível visualizar um pequeno ponto branco no poço isso garante a disposição côncava da solução e a correta reflexão da luz. Dados incoerentes foram frequentemente obtidos em poços que a solução não apresentava o formato côncavo (poços em destaque em vermelhos).....	38
Figura 4.1	Probabilidade em função do número de moléculas pelo coeficiente de Matthews (V_M). Comparação entre dados obtidos com todas as proteínas do PDB (Protein Data Bank - www.pdb.com) com os dados fornecidos para a Xylellaína. Cálculo realizado pelo programa Matthews Probability Calculator (33) (modificado http://www.ruppweb.org/Mattprob).....	39
Figura 4.2	Representação em cartoons de algumas disposições de duas cadeias da Xylellaína. Em destaque o arranjo que apresenta maior superfície de contato entre as cadeias, esferas no centro da estruturas representam a Cisteína catalítica.....	40
Figura 4.3	Representação de cartoons da estrutura cristalina tetramérica da Xylellaína e da célula unitária em verde.....	41

Figura 4.4	(A) Em cartoons o arranjo dimérico enfatizando através de esferas a interface de contato entre as cadeias. (B) Destaque em amarelo e vermelho as pró-regiões de cada pró-enzima, as esferas representam a cisteína catalítica.....	42
Figura 4.5	Gel Nativo – Xylellaína Nativa: (a) Sem adição de DTT (b) Com adição de DTT.....	43
Figura 4.6	Cromatografia de exclusão molecular pelo tamanho da proteína (superdex 200) – Absorção em 280nm da Xylellaína Nativa (4 oC) X volume de eluição em ml. Sem adição de DTT (em azul), com adição de DTT (em vermelho).....	44
Figura 4.7	(A) Função de distribuição da distância da Xylellaína para dímero (dados experimental e modelo) e para o tetrâmero (modelo). (B) Esferas representando o envelope protéico obtido através dos dados de SAXS e em cartoon o dímero da estrutura cristalográfica.....	45
Figura 4.8	Intensidade relativa em unidade arbitraria versus massa molecular sobre a carga do peptídeo.....	47
Figura 4.9	Seqüência de resíduos da Xylellaína – destaque em vermelho a região em que a proteína é clivada.....	48
Figura 4.10	Gradiente da liberdade vibracional da estrutura protéica. Quanto mais vermelho menor o grau de liberdade, azul maior o grau de liberdade. Os dados de fator de temperatura foram ponderados pelo maior valor obtido.....	49
Figura 4.11	Superfície protéica (verde), sítio catalítico (amarelo) e pró-região (vermelho). Em destaque os resíduos Ser e Lys onde local em que a pró-região é clivada.....	50
Figura 4.12	Em stick nucleotídeo Uridina di-fosfato (UDP) ligado de forma não covalente a Xylellaína. Em vermelho a pró-região ocluindo o sítio catalítico em amarelo.....	51
Figura 4.13	Principais interações de sustentação do nucleotídeo Uridina di-fosfato (UDP).....	52
Figura 4.14	Representação esquemática das interações entre proteína (verde) - nucleotídeo (azul) e nucleotídeo e pró-região (vermelho).....	53
Figura 4.15	Mutações realizadas na estrutura de Xylellaína nativa (em destaque). As mutações foram realizadas nos resíduos R23, F25 e R23F25, todos foram mutados para A.....	53
Figura 4.16	(A) Análise de expressão da Xylellaína nativa e das mutantes – PX pelet da nativa (N), RF, R e F mutantes; SX sobrenadante da nativa (N), RF, R e F mutante. (B) Purificação da mutante R, eluição com 50, 100 e 250 mM de Imidazol.....	54
Figura 4.17	Esquema representativo da reação de hidrólise do substrato ZFRMCA. Em verde a enzima (E), azul o cofator (UDP), laranja o substrato (ZFRMCA) e em amarelo o produto (ZFR e MCA).....	55

Figura 4.18	Curvas da intensidade do produto (MCA) pelo tempo para diferentes concentrações de substrato [ZFRMCA].....	57
Figura 4.19	Ajuste linear da intensidade fluorescente para cada concentração de [MCA] livre.....	57
Figura 4.20	Curva Michalis-Menten da hidrólise do substrato fluorescente ZFRMCA.....	59
Figura 4.21	Curvas evidenciam que sempre é necessário quantizar a enzima ativa de uma amostra. Em preto, curva obtida no primeiro dia de experimento, em vermelho a mesma amostra de proteína, mas após um dia de espera. Dados obtidos com o fluorímetro de cubeta.....	60
Figura 4.22	Curva de resposta de concentração para um inibidor de enzima, ela apresenta três regiões descrita por Murphy (2004). Figura adaptada (35).....	61
Figura 4.23	Taxa de MCA por concentração de inibidor E64. Curva usada para obter a concentração de enzima ativa em uma amostra de proteína (enzima nativa).....	61
Figura 4.24	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do elemento 31P. O pico do meio é referente ao tampão fosfato.....	63
Figura 4.25	Espectro de ressonância magnética nuclear onde os picos do P provenientes da UDP são fortemente mascarados pelo tampão padrão que cotem fosfato.....	64
Figura 4.26	(A) Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do elemento 31P, indicando que o ribonucleotídeo está ligado à Xylellaína. (B) Representação em 3D da UDP.....	65
Figura 5.1	A interação entre R23 e D21 provoca uma curva na pró-região que possui grande importância para direcioná-la para o sítio catalítico. Interação II-tag entre o nucleotídeo e o resíduo F25.....	66
Figura 5.2	A interação entre R23 e D21 provoca uma curva na pró-região que possui grande importância para direcioná-la para o sítio catalítico. Interação II-tag entre o nucleotídeo e o resíduo F25.....	67
Figura 5.3	A interação entre R23 e D21 provoca uma curva na pró-região que possui grande importância para direcioná-la para o sítio catalítico. Interação II-tag entre o nucleotídeo e o resíduo F25.....	68
Figura 7.1	Sobreposição das estruturas cristalográficas das proteínas Xylellaína (azul), Cruzaína (vermelho) e Falcipaina (amarelo), mostrando a similaridade estrutural (23).....	73

LISTA DE SIGLAS

CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LB	Meio de cultura Lb
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAD	Single Anomalous Dispersion
USP	Universidade de São Paulo
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{\AA}$	Ângstrom (10^{-10}m)
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_{cat}/K_m	Eficiência Catalítica
kDa	Kilodalton (10^3 g/mol)
L	Litro
M	Molar (mol/l)
V_{max}	Velocidade máxima da reação
pH	Potencial Hidrogeniônico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Semestres em que foram realizados os objetivos proposto para o projeto de trabalho. I-Expressão do gene e purificação das Xylellaína mutantes. II-Teste de solubilidade da Xylellaína mutante. III-RMN com as proteínas mutantes. IV-Ensaio cinéticos comparativos entre a Xylellaína nativa e as mutantes. V- Espectrometria de massa.....	24
Tabela 4.1	Número de moléculas na unidade assimétrica (N), probabilidade em função do número de moléculas Prob(N), coeficiente de Matthews (V_M) e porcentagem de solvente (V_S). Cálculo realizado pelo programa Matthews Probability Calculator (33) (modificado http://www.ruppweb.org/Mattprob/).....	40
Tabela 4.2	Massa Molecular/Carga dos peptídeos clivados durante o experimento, regiões da proteína que possuem massa molecular aproximada aos dados obtidos.....	48
Tabela 4.3	Valores de velocidades iniciais por tempo obtidos em quadruplicata para a Xylellaína Nativa com DTT versus a concentração de substrato.....	58
Tabela 4.4	Comparação entre os valores obtidos para K_m (μM) e k_{cat}/K_m ($1/\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$) da Xylellaína nativa e das mutantes.....	62

SUMÁRIO

<i>Capítulo 1: Introdução.....</i>	17
1.1 <i>Xylella fastidiosa.....</i>	17
1.2 Protease.....	19
1.3 Cisteino Protease.....	20
1.3.1 Estrutura tridimensional de cisteíno proteases pertencentes ao clã C1.....	21
1.4 Xylellaína.....	22
1.5 Estrutura molecular da Xylellaína.....	23
 <i>Capítulo 2: Objetivos.....</i>	25
	24
<i>Capítulo 3: Metodologia e Descrição Experimental.....</i>	28
3.1 Transformação da Bactéria Escherichia coli.....	28
3.2 Expressão do Gene da Xylellaína.....	30
3.3 Purificação da proteína: Cromatografia de afinidade em coluna com Níquel imobilizado.....	31
3.4 Purificação da proteína: Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Desalting.....	32
3.5 Purificação da proteína: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200.....	32
3.6 Ressonância Magnética Nuclear.....	33
3.7 Espectrometria de Massa.....	34
3.8 Cinética enzimática	36

<i>Capítulo 4: Resultados.....</i>	39
4.1 Estado de Oligomerização.....	39
4.2 Pró-Região.....	46
4.3 Nucleotídeo.....	50
4.4 Cinética Enzimática.....	55
4.5 Ressonâncias Magnéticas Nuclear.....	63
 <i>Capítulo 5: Discussão.....</i>	 66
 <i>Capítulo 6: Conclusão.....</i>	 71
 <i>Capítulo 7: Perspectivas.....</i>	 73
 <i>Referências.....</i>	 75

Capítulo 1: Introdução

1.1 *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa, não flagelada responsável por infectar o xilema de plantas (1,2). A fitobactéria foi identificada ser a causadora de diversas doenças, seus sintomas mais freqüentes são a maturação precoce e a diminuição dos frutos (Figura 1.1 A), o que gera grandes perdas econômicas. Ela já foi identificada em citros (clorose variegada dos citros – “citrus variegated chlorosis” – CVC), videira (doença de Pierce – “Pierce’s disease”), ameixeira (escaldadura da folha da ameixeira – “Plum leaf scald”), pessegueiro (redução do porte do pessegueiro – “phony peach disease”), alfafa (nanismo da alfafa – “alfafa dwarf”), catharantos (definhamento da vinca – “periwinkle wilt”), pereira (requeima da folha de pereira – “pear leaf scorch”), elmo (requeima da folha de elmo – “elm leaf scorch”), plátano (requeima da folha de plátano – “sycamore leaf scorch”), carvalho (requeima da folha do carvalho – “oak leaf scorch”), amoreira (requeima da folha de amoreira – “mulberry leaf scorch”) e cafeeiro (requeima das folhas do cafeeiro – “coffee leaf scald”) (3,4). A maior incidência de doenças causadas pela *Xylella fastidiosa* ocorre no Brasil com a CVC e nos Estados Unidos com a doença de Pierce.

No Brasil a CVC é considerada a doença mais devastadora dos citros e foi primeiramente relatada em 1987, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (4). Esta doença gera grandes prejuízos, principalmente no estado de São Paulo que é o maior exportador de suco de laranja do mundo, sendo responsável por aproximadamente 90% da produção nacional e 30% da mundial. No Brasil, a CVC causa perdas anuais de aproximadamente 100 milhões de dólares para a indústria cítrica (5).

O mecanismo de infecção da bactéria se dá através da transmissão pelos insetos vetores (família Cicadellidae), eles se alimentam da seiva contaminada e passam a disseminar a bactéria durante sua alimentação em plantas saudáveis (Figura 1.1 B) (6). Diversas hipóteses sobre o mecanismo de patogenicidade da *X.fastidiosa* foram propostas por Hopkins em 1987 (1) como sendo a causa do stress hídrico que prejudica a planta. As duas principais hipóteses são, a oclusão dos vasos xilemáticos por agregados de bactérias e a produção de tiloses e gomas. Mas somente a partir do primeiro sequenciamento genômico da *X.fastidiosa* (clone 9a5c) em 2000 (8), e de outras linhagens que vieram a ser sequenciadas mais tarde (9,10), foi possível desenvolver hipóteses elaboradas com base nas enzimas sintetizadas por diferentes espécies (10).

Micrografias de tecidos vasculares de várias plantas colonizadas por *X. fastidiosa* mostram que as plantas oferecem resistência à proliferação da bactéria através de poros nas membranas do xilema. A principal forma de a bactéria romper essa defesa é a produção de enzimas que degradam esses poros (Figura 1.1 C) (7,10,11). Enzimas utilizadas para esta função, como as celulases, xilanases, pectinases e proteases, foram identificadas neste patógeno (8). Enzimas proteolíticas também são importantes na liberação de carboidratos, necessários para o crescimento bacteriano na parte interna dos vasos xilemáticos (10).

Figura 1.1: (A) Sintomas dos frutos de uma planta infectada por CVC (B) Inseto vetor, Molomea. (C) Detalhe de *X. fastidiosa* aderidas às paredes do vaso xilema de citrus (modificado de <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>) (12).

Ainda não é conhecida uma forma eficiente de se combater a bactéria, os métodos de controle se restringem ao extermínio do inseto vetor e ao isolamento das plantas infectadas. É importante a realização de estudos que gerem alguma perspectiva de controle desta praga, por essa razão é interessante pensar na produção de compostos planejados que ajam especificamente em importantes vias metabólicas da bactéria bloqueando-as e assim dificultando sua proliferação dentro do xilema.

1.2 Proteases

As proteases estão envolvidas em todas as funções e disfunções biológicas. Elas regulam numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, através do controle da síntese e degradação de proteínas, já que catalisam a hidrólise de aminoácidos específicos dentro de polipeptídios (13). O controle preciso do processo proteolítico é essencial para o funcionamento das células e dos organismos como um todo (14). As proteases são enzimas ubíquas, sendo encontradas em uma grande variedade de fontes, como plantas, animais e microorganismos. O envolvimento das proteases no ciclo de vida de organismos causadores de doenças as tornou um potencial alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra doenças fatais, como o câncer e a AIDS.

Estas enzimas são grosseiramente subdivididas em dois grupos maiores, chamados exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases clivam o esqueleto peptídico próximo às terminações C-terminal (carboxipeptidases) ou N-terminal (aminopeptidases) do substrato, já as endopeptidases clivam peptídeos distantes das áreas terminais do substrato. Considerando os sítios ativos, o mecanismo de ação e a estrutura tridimensional da proteína, elas são divididas em subgrupos: Serino proteases, Metallo proteases e Aspartil proteases, Threonina protease e Cisteíno proteases (15).

As cisteíno proteases são enzimas proteolíticas que possuem os resíduos de Cisteína e Histidina em seu sítio catalítico (16).

1.3 Cisteíno Proteases

As enzimas proteolíticas que dependem dos resíduos Cisteína e Histidina em sua atividade catalítica são conhecidas como cisteíno proteases. Elas possuem sete origens evolucionárias diferentes (clans) (15), cada uma com diferentes estruturas e propriedades (17). Os clans são classificados em CA, CD, CE, CF, CH, PA e PB, o maior deles é o CA que possui mais da metade das famílias. As proteases estão agrupadas dentro de CA em aproximadamente 30 famílias. Cada família contém proteínas com seqüências similares de aminoácidos e seqüências conservadas evolutivamente, que refletem aos membros das famílias estruturas 3D similares (17). A família Papaína (C1) é a que possui o maior número de estruturas cristalográficas resolvidas. A Xylellaína, proteína estudada neste trabalho, pertence à família Papaína.

Cisteíno proteases representam a maioria das componentes das proteínas lisossomais e atuam em importantes processos de degradação de proteína intracelulares (16). O interesse nas cisteíno proteases como alvos terapêuticos vem da importância que elas possuem no ciclo de vida ou patogenicidade de muitos parasitas. Em alguns microorganismos, as cisteíno proteases têm funções de imuno-invasão, ativação enzimática, virulência e invasão tecidual e celular, entre outras (17).

1.3.1 Estrutura tridimensional cisteíno proteases pertencentes ao clã C1

As enzimas da família Papaína possuem dois domínios, denominados de domínio esquerdo “*L*” (Left) e direito “*R*” (Right). Sua arquitetura é um complexo alfa-beta, pois o domínio *L* é formado predominantemente por hélices-alfa e loops e o *R* é formado por fitas beta (Figura 1.2). O sítio catalítico está localizado na reentrância entre os dois domínios (18). A maioria da cisteíno protease da família Papaína quando maturada estão na forma monomérica (20), com exceção a cathepsina C (22). Elas tem um tamanho molecular que varia entre 20 a 35 kDa (18).

Figura 1.2: Representação em cartoon das estruturas de cisteíno proteases. (a) Papaína (9PAP), (b) Cruzaina (2AIM), e (c) Propcathepsina B (3PBH). Em evidência o domínio L em azul e o domínio R em vermelho.

A regulação da atividade proteolítica está diretamente envolvida nos diversos mecanismos celulares. Esse controle é finamente ajustado por processos celulares que abrangem desde a regulação expressão gênica, secreção, maturação e degradação da enzima (18). A enzima deve ser ativada quando sua ação é requerida e inativada em situação oposta, geralmente respondendo a estímulos específicos. No interior das células, as cisteíno proteases devem estar em uma forma inativa, caso contrário poderiam atuar em moléculas inespecíficas. Este fator é agravado quando se trata de cisteíno protease de células procarióticas, por não possuírem membrana interna capaz de separar organelas e enzimas. A inativação das cisteíno

proteases da família C1A (Papain) é regulada pela existência de uma pró-região de aproximadamente 100 a 60 resíduos, que encobre o sulco entre os dois domínios onde está localizado o sítio catalítico da proteína (16). Estruturas moleculares de cisteíno proteases já obtidas permitem entender o mecanismo de inativação e ativação dessa família protéica. Os aspectos estruturais mais relevantes para o estudo desse mecanismo será discutido no *Capítulo: Discussão*, onde se poderá comparar com os resultados obtidos para a Xylellaína.

1.4 Xylellaína

A análise proteômica da *X. fastidiosa* visa dar continuidade ao um trabalho que começou com o seqüenciamento completo do genoma desta bactéria (*X. fastidiosa* 9a5c), publicado na revista Nature em 2000 (8). Esse trabalho identificou os possíveis genes de patogenicidade, tornando-os potenciais alvos para o combate planejado da doença. Nesse seqüenciamento foi revelado a presença de um gene que codifica uma proteína que possui aproximadamente 31 kDa e, analisado em bancos de dados, mostra similaridade com cisteíno proteases. A identificação, expressão, purificação e caracterização do gene que expressa a cisteíno protease da bactéria *X. fastidiosa* foi realizado integralmente no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva (Departamento de Genética e Evolução – UFSCar), essa protease foi denominada de “Xylellaína” (23).

Os ensaios de cristalização foram realizados em nossos laboratórios (CBME/IFSC), com os alunos de doutorado Ney Ribeiro Leite e de iniciação científica Maria Amélia Oliva. Foram realizadas diversas coletas, tanto no nosso difratômetro com anodo rotatório e placa de imagens, quanto utilizando radiação síncrotron no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas) (24). A aplicação de técnicas de substituição isomorfa de átomos pesados, não apresentou sucesso para resolver o problema das fases. Em 2006 a estrutura

molecular da Xylellaína foi obtida pelo aluno Ney Ribeiro Leite por meio da técnica de espalhamento anômalo com um único comprimento de onda SAD (Single Anomalous Dispersion) (24). Ele usou cristais de proteína modificada, onde os resíduos Metionina foram substituídos por Selênio-Metionina. A dispersão anômala é uma das técnicas mais usadas para resolver o problema das fases de estruturas com baixa identidade sequencial. A fase é determinada por uma diferença no fator de estrutura ocasionada pela introdução de átomos pesados, nesse caso o selênio (32). Os dados de difração de raios-X foram coletados no Laboratório Nacional de Brookhaven (Brookhaven National Laboratory, NY – EUA).

1.5 Estrutura Molecular da Xylellaína

A Xylellaína é a sétima proteína da bactéria *X. fastidiosa* com estrutura resolvida (15), sendo a única cisteína protease (Figura 1.3). A Xylellaína apresenta a maioria das características que descrevem as cisteína protease citadas anteriormente. Ela possui os dois domínios, direito (R - right) e esquerdo (L - left), onde o domínio R tem em sua maioria folhas beta e o domínio L tem hélices-alfa como estrutura secundária (Figura 1.3). O sítio catalítico se encontra na reentrância entre os dois domínios. A estrutura molecular da proteína foi obtida com resolução de 1,65 Å, R_{factor} 17,3 e R_{free} 21,0. A estrutura cristalina possui 4 monômeros na unidade assimétrica (889 aminoácidos), 4 ribonucleotídeos e 1416 moléculas de água (24).

A combinação dos 20 aminoácidos confere as enzimas sua reatividade química, sua estrutura e sua função (21). Porém em algumas enzimas são encontrados grupos químicos que não necessariamente aminoácidos, sua presença está associada a funcionalidades enzimática, eles são denominados cofatores. Muitas vezes os cofatores não estão ligados de forma covalente a estrutura protéica, mas são mantidos por interações fracas, como interações de

hidrogênio. A presença do nucleotídeo Uridina di-Fosfato (UDP) ligado de forma não covalente foi um acontecimento inesperado e surpreendente. Sabe-se que em diversas proteínas nucleotídeos agem como cofatores, porém a presença de um ribonucleotídeo como cofator na estrutura protéica de uma cisteína protease nunca havia sido reportado anteriormente. Entender se sua presença é meramente um acontecimento fortuito ou se o nucleotídeo possui funcionalidade na estrutura protéica foi um dos principais objetivos dessa pesquisa e será discutido a seguir.

Figura 1.3: Estrutura molecular da Xylellaína possui dois domínios R e L. As hélices-alfa e as folhas betas estão numeradas iniciando dos resíduos do N-terminal para o C-terminal. O nucleotídeo Uridina di fosfato está em destaque.

Capítulo 2: Objetivos

A obtenção da estrutura molecular da Xylellaína foi o início de um extenso trabalho em compreender diversos aspectos que envolvem a ação dessa protease. Na análise panorâmica de questões a serem respondidas sobre a Xylellaína percebe-se que existem importantes focos para serem compreendidos (Figura 2.1). Entender qual a via metabólica que a proteína está inserida e sobre qual substrato ela está atuando é importante, pois proporciona uma visão geral da performance da protease. Outro foco é a compreensão do mecanismo de regulação e quais são os fatores que o influenciam, através dessa informação pode-se entender como se dá o seu equilíbrio, e até mesmo interferir de forma planejada no ciclo metabólico. O sítio catalítico e o mecanismo de catalise também são importantes objetos de estudo, uma vez que seu entendimento auxilia no futuro planejamento de inibidores contra as doenças ocasionadas pela *X. fastidiosa*.

Figura 2.1: Esquema da via catalítica da Xylellaína, através deste esquema pretende-se resumir os pontos relevantes para o entendimento do seu mecanismo. As possibilidades A e B representam a ausência de informação sobre o que ocorre com o nucleotídeo após a ativação.

A pesquisa realizada durante o mestrado está focada principalmente na relação entre a estrutura molecular e o mecanismo de inibição/ativação da pró-enzima (Figura 2.2). Existe um conjunto de parâmetros que se relaciona com esse mecanismo. O estado de oligomerização pode ser um desses parâmetros uma vez que a estrutura cristalográfica prediz um arranjo em que o sítio catalítico da proteína está ocluído não só pela pró-região, mas também pela disposição dos monômeros. Para verificar a veracidade dessa hipótese é importante entender qual é o estado de oligomerização da proteína em solução. Algumas técnicas biofísicas são frequentemente utilizadas para solucionar este tipo de questão, neste trabalho foi utilizada algumas delas, como cromatografia de exclusão e gel de eletroforese. Recentemente se optou também pelo uso de SAXS (Small Angle X-ray Scattering).

Outro parâmetro que está diretamente relacionado com o mecanismo de inibição da proteína é a existência da pró-região. Sua caracterização é fundamental para compreensão do estado inibido da protease. Qual é o tamanho da pró-região? O que ocorre com a pró-região após a ativação, ela é clivada ou possui o movimento de uma "porta" que quando aberta torna o sítio acessível? Supondo que a pró-região seja clivada, ela é clivada próxima ao nucleotídeo? Essas são as perguntas que o trabalho objetiva responder e o experimento que visa esclarecê-las é a espectrometria de massa.

O principal objetivo deste trabalho é esclarecer se o nucleotídeo encontrado na estrutura molecular da Xylellaína possui ou não funcionalidade. A estratégia utilizada para abordar essa questão foi à comparação entre proteína nativa e proteínas mutantes. Nas proteínas mutantes a região de sustentação do nucleotídeo provindas da pró-região foi desestabilizada através de mutações pontuais. Os efeitos causados por essa desestabilização podem fornecer informação sobre nucleotídeo, a comparação entre proteína nativa e as mutantes foi realizada através de ensaios cinéticos.

Por último, sabendo que as mutações afetaram o nucleotídeo, é preciso entender se a desestabilização do bolsão de sustentação do nucleotídeo foi suficiente ou não, para fazê-lo desprender da proteína. Esse experimento foi realizado através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Figura 2.2: Esquema de estudos, resultados e experimentos realizados para o estudo estrutural e funcional da Xylellaia.

O período em que os experimentos foram realizados pode ser visualizado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Semestres em que foram realizados os objetivos proposto para o projeto de trabalho. **I**-Expressão do gene e purificação das Xylellaia mutantes. **II**-Teste de solubilidade da Xylellaia mutante. **III**-RMN com as proteínas mutantes. **IV**-Ensaio cinéticos comparativos entre a Xylellaia nativa e as mutantes. **V**-Espectrometria de massa. **VI**-SAXS.

	1º/06	2º/06	1º/07	2º/07	1º/08
I	•	•	•	•	•
II		•	•		•
III		•	•	•	•
IV			•	•	
V					•
VI					•

Capítulo 3: Metodologia e Descrição Experimental

Os experimentos realizados foram sugeridos conforme a necessidade de se responder perguntas específicas sobre a estrutura e principalmente sobre o funcionamento da Xylellaína. A acurácia e precisão dos resultados também foram fatores determinantes no uso de mais de uma técnica. Será feita uma pequena explanação sobre a escolha dos experimentos e sua descrição experimental.

Os protocolos de clonagem, expressão e purificação da proteína Xylellaína foram estabelecidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva (Departamento de Genética e Evolução – UFSCar)(23). A proteína foi inicialmente cedida para os ensaios de cristalização em nossos laboratórios (CBME/IFSC), mas por praticidade a produção da Xylellaína também passou a ser realizada em nossos laboratórios, pela aluna de iniciação científica Maria Amélia Oliva e aluno de doutorado, Ney Ribeiro Leite (24). Algumas mudanças no protocolo original foram feitas buscando um melhor rendimento de produção da proteína. Atualmente este protocolo está bem estabelecido e apresenta um rendimento de 500 µl de proteína nativa, a uma concentração de 5mg/ml, para cada litro de cultura de bactéria. Os protocolos estão descritos a seguir.

3.1 Transformação da Bactéria *Escherichia coli*

Transformação heteróloga consiste na inserção de um determinado gene de interesse, nesse caso o gene que expressa a Xylellaína, no maquinário genético de outro organismo, bactéria *Escherichia coli* (25). Para cada transformação, foi empregado um eppendorf contendo 50 µl de células competentes, onde foi adicionado 1,0 µl do plasmídeo recombinante

pET28xylCP. Na construção plasmidial o gene que expressa a cisteína protease Xylellaína foi clonada no vetor de expressão pET28a (Novagem - Figura 3.1).

Figura 3.1: Construção plasmidial do vetor pET28a (retirado de <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf>)

A incorporação plasmidial pelas células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) foi induzida pela aplicação de um choque térmico (25). O choque térmico consiste na incubação da mistura por 30 minutos no gelo, em seguida a mudança para um sistema a 42 °C por 90 segundos e por último a incubação no gelo por 5 minutos. Para a reprodução das bactérias transformadas, acrescentou-se aos eppendorfs 250 µl de meio LB (1% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5). A cultura de bactérias foi incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 30 minutos, condição ótima para a reprodução. Aliquotas de 100 µl da cultura foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido

e o antibiótico de seleção canamicina em uma concentração de 30 mg/ml. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas.

3.2 Expressão do Gene da Xylellaína

Para a expressão do gene da Xylellaína foram pré-inoculados, com uma colônia de bactéria obtidas após a transformação, 5 ml de meio LB com canamicina (30 mg/ml). Os tubos de ensaios foram colocados a 37 °C, sob agitação de 250 rpm por cerca de 16 horas, até a colônia atingir a condição ideal para inocular uma quantidade maior de meio de cultura. Com o pré-inoculo realizado inoculou-se 500 mL de meio de cultura LB, contendo canamicina (30 mg/mL) em um erlenmayer de 1L, sob agitação de 250 rpm. A cultura foi incubada a 37 °C até atingir a densidade ótica entre 0,5 a 0,6 quando medidas no comprimento de onda de 600 nm. Na sequência a expressão da proteína na cultura de bactérias foi induzida com 0,1 mM de IPTG (isopropylthio D galactosideo) e mantida por 20 horas, 30 °C e 250 rpm. Após o período de indução as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 6000 rpm, na temperatura de 4 °C (rotor Sorvall-GS 3), durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise celular, contendo 10 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 50 mM de Na₂HPO₄, a pH 8,0. Após esse procedimento é possível congelar o homogeneizado (bactéria ressuspensionada em tampão de lise) à -20 °C.

As sequências das proteínas mutantes foram construídas pela aluna de doutorado Andreia Gionotti, pertencente ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva (DGE – UFSCar). Na construção dos plasmídeos mutantes foram usadas técnicas de biologia molecular. Depois de finalizados os plasmídeos foram trazidos para o laboratório (IFSC – USP), onde foram feitos novos testes de expressão e purificação. Foram necessárias algumas modificações do protocolo com relação ao usado na proteína nativa. Seguindo integralmente o

protocolo inicial a proteína permanecia em sua maioria no pelet (ver Resultados 4.2). Para aumentar o rendimento de proteína solúvel a temperatura foi reduzida de 30 para 20 °C, o que retarda o metabolismo celular, possibilitando um enovelamento mais lento e correto da proteína. Outra providência foi diminuir a concentração de IPTG que ocasiona a redução da taxa de síntese da proteína.

3.3 Purificação da proteína: Cromatografia de afinidade em coluna com Níquel imobilizado

O procedimento para a obtenção da proteína pura se inicia com a lise celular da bactéria. Para facilitar o rompimento da membrana externa foi adicionado lisozima (10mg/litro de cultura) ao extrato e este foi incubado durante 30 minutos no gelo. As bactérias foram lisadas com pulsos de ultra-som até a mudança de cor da solução. O extrato de proteínas foi separado através de centrifugação a 15.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Para selecionar a Xylellaína das outras proteínas do extrato, o sobrenadante foi aplicado na resina de Níquel previamente equilibrada com 5 volumes de coluna do tampão de lise celular. Na sequência de resíduos do gene da Xylellaína foi adicionada uma cauda de Histidina (6xHis, N-terminal) para que ao passar na coluna de Níquel a proteína ficasse retida, devido à alta afinidade entre as cargas positivas do Níquel e os resíduos de Histidina. Para retirar a proteína da coluna foram feitas eluições com imidazol que possui maior afinidade ao Níquel, comparado com a Histidina. Nas três eluições variou-se a concentração de Imidazol de 10 mM, 100 mM e 250 mM no tampão de lise celular. A concentração de Imidazol em que a proteína foi eluída da resina é de 250mM. As amostras obtidas foram analisadas através de eletroforese em um gel SDSPAGE 15% (26). As bandas de proteína foram visualizadas através da coloração Coomassie brilliant blue (27).

3.4 Purificação da proteína: Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Desalting

A remoção do Imidazol da solução de proteína foi realizada através da cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-25 Superfine (HiTrap Desalting – Amersham Bioscience) de 5ml. A coluna possibilita a separação entre grupos de alto e baixo (limite de 5000 g/mol) peso molecular, por esse motivo foi usada na separação do Imidazol com 68 g/mol com a Xylellaína com 31×10^3 g/mol. Esse procedimento foi empregado em substituição a diálise, como uma forma mais eficiente de retirar o excesso salino da solução. O percurso da amostra através da coluna foi controlado pelo sistema de cromatografia líquida a altas pressões AKTA HPLC (Pharmacia Biotech) e as frações foram coletadas manualmente.

3.5 Purificação da proteína: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200

Essa purificação se utiliza do mesmo princípio que a realizada na coluna de Desalting, separar misturas pelo tamanho das moléculas. O extrato percorre uma coluna com uma resina porosa, o que faz com que ela possua diferentes caminhos de percurso, alguns com diâmetro pequeno (caminhos longos), outros com diâmetros maiores (caminhos curtos). Então massas moleculares diferentes percorrem o trajeto em tempos diferentes, permitindo sua separação. A amostra foi aplicada em uma coluna XK 16/20, com 1,6 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, preenchida com uma resina Superdex 200 (GE Healthcare). A coluna foi pré-equilibrada com tampão de lise celular. Esta etapa juntamente com as anteriores garantiu a obtenção de proteína pura. Novamente o sistema de cromatografia líquida a altas pressões AKTA HPLC foi utilizado para o controle do fluxo da solução.

As observações de proteínas de massas moleculares diferentes percorrem caminhos distintos na matriz da coluna cromatográfica permite que a cromatografia de exclusão molecular seja usada como um método freqüente para se determinar a massa de oligômeros. Para que o método seja valido é necessária a calibração com proteínas com massas moleculares conhecidas. Nesse experimento a calibração da coluna foi feita com um conjunto de proteínas com peso molecular variado e bem definido. Foram elas; albumina (66kDa), álcool desidrogenase (40kDa), amilase (24kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e lactoalbumina (14 kDa), a uma concentração de 2mg/ml.

3.6 Ressonância Magnética Nuclear

As mutações na Xylellaína foram planejadas para desestabilizar as interações que sustentam o nucleotídeo ligado a ela (ver Resultados 4.3). Para verificar se após as mutações o nucleotídeo ainda permanecia ou não ligado a estrutura, propôs-se utilizar a técnica de ressonância magnética nuclear de fósforo. O elemento a ser identificado é o fósforo (^{31}P), pois ele não é encontrado na proteína, e está presente apenas no nucleotídeo. Um fator que dificultou a realização dos experimentos foi o tampão em que o protocolo de expressão/purificação está estabelecido, o qual contém 50mM Na_2HPO_4 , e cujo grupo fosfato apresenta sinal de RMN em intensidade muito superior, mascarando o sinal do nucleotídeo.

O procedimento experimental na medição do espectro de ressonância consistiu na otimização para captar a freqüência do elemento que se deseja medir, com essa finalidade um filtro (passa-banda) foi acoplado ao espectrômetro reduzindo os ruídos de outros elementos, em seguida foi necessário sintonizar (Probe) a captação para a freqüência do P^{31} . Outra etapa do procedimento é a homogeneização do campo magnético para aumentar a eficiência do pulso aplicado (28). O tampão foi trocado, retirou-se Na_2HPO_4 da solução, em temperatura

ambiente a proteína se tornou mais instável. Em um fino tubo de ensaio para RMN foi colocada 500 μL de proteína e mais 50 μL de água deuterada para reduzir o ruído produzido pelo hidrogênio em solução. A ressonância magnética nuclear de um elemento está associada à absorção de energia quando há transição do núcleo entre os níveis de energia magnética nuclear adjacente. A energia é proporcional a intensidade de um campo magnético externo aplicado e à frequência da radiação eletromagnética fornecido por um oscilador. Como resultado final se tem um espectro de absorção de energia versus campo magnético ou frequência da radiação (28,29).

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Alvicler Magalhães e seu aluno de mestrado Rodrigo de Oliveira Silva (Laboratório de Espectroscopia de Alta Resolução (LEAR) por Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Física de São Carlos - IFSC/USP). Todas as medições foram feitas no laboratório de RMN da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária – São Carlos, utilizando um espectrômetro Varian 400MHz. Para a reprodução do experimento os dados de calibração do equipamento são, sequência de pulsos: tempo de espera (d1) de 0.1s, tamanho do pulso (pw) igual 3,3 μs e tempo de aquisição (at) igual 0,55s.

3.7 Espectrometria de Massas

Na identificação do local correto de clivagem da pró-região que ocorre durante o processo de ativação da enzima, foram utilizadas as técnicas de sequenciamento da região N-terminal e do fragmento proteico extraído de um gel eletroforético. Nenhum dos experimentos permitiu concluir o ponto de clivagem. Optou-se então pelo uso de espectrometria de massa para identificar entre quais resíduos a pró-região sofre clivagem. A espectrometria de massa tem contribuído progressivamente para a análise proteômica (30), ela

permite inferir com precisão a massa molecular de peptídeos e proteínas. Sinteticamente, os fragmentos são carregados e passam por uma câmara de vácuo, onde a aplicação de um campo eletromagnético faz com que moléculas com diferentes tamanhos e cargas (m e z) possuam diferentes trajetórias, através dessa relação é possível obter a massa (M) da substância analisada (29). O experimento realizado foi espectroscopia de massa por eletropulverização (ElectroSpray Ionization), nessa técnica a ionização dos fragmentos é feita por meio da pulverização da amostra. O experimento foi realizado no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncroton) em colaboração com o Prof. Dr. Fabio Gozzo. O equipamento usado consiste de um HPLC – nanoAcquity (ultraperformance LC) acoplada a um espectrômetro de massa MICROMASS (nanolockspray).

O procedimento de medida consistiu na injeção da amostra de proteína em seu tampão usual, 10 mM de Tris, 50 mM NaCl e 50mM de NaH_2PO_4 . A amostra tem que estar extremamente pura ao ser injetada na câmara de vácuo para que haja somente os íons da proteína, por isso antes de entrar no espectrômetro a amostra passou por um sensível arranjo para purificação de soluções. Nesse sistema a proteína percorreu uma coluna de dessalinização (hidrofóbica) onde todo o sal foi removido, procedimento fundamental uma vez que as medidas realizadas envolvem cargas iônicas. Para a remoção total do sal foi necessário um fluxo de água durante 10 minutos. Em seguida um solvente foi injetado para a eluição da proteína da primeira coluna e aplicação em uma segunda coluna de cromatografia de fase reversa. Devido à fina espessura da coluna o fluxo aplicado foi nanolitros/seg, a finalidade dessa etapa é separar espécies com massa molecular diferentes, para que elas sejam injetadas em diferentes espaços de tempos. Em um fino capilar carregado, mantido em elevado potencial elétrico, a proteína foi pulverizada para dentro da câmara, esse mecanismo fez com que moléculas ficassem ionizadas. Dentro da câmara de vácuo um complexo sistema de eletroímãs e de leitores que permitiram identificar a razão massa/carga (m/z) de cada

fragmento. Esse arranjo experimental está ligado a uma interface computacional que possibilita a interpretação dos dados. Esta interface permitiu visualizar desde a eluição na coluna de cromatografia até os espectros de cada injeção de proteína. Os espectros consistem na ponderação de intensidade relativa de m/z versus m/z e através deles é possível verificar a massa molecular dos peptídeos e relacioná-los com possíveis regiões de clivagem.

3.8 Cinética enzimática

Por meio da análise da cinética enzimática da proteína nativa e de suas mutantes é possível obter importantes informações sobre o seu funcionamento. Com os parâmetros cinéticos como a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) e o K_m se obtém conhecimento sobre a afinidade entre a enzima e o substrato e a eficiência de catalise da enzima. Os ensaios cinéticos consistem em medidas de fluorescência em função do tempo, para a Xylellaína foi usado um fluorímetro de placa (WALLAC 1420). A placa usada nas medições é equivalente a placa utilizada nos experimentos de ELISA, ela possui 96 poços e é preta para evitar a exposição da substância a luz (gleiner bio-one, 96 Well Area Polystyrene Microplates 655 209). Em cada poço foi colocado 200 μ l de solução, contendo tampão acetato de sódio (100mM - pH 5,5) e DTT (2,5 mM) e 1 μ l de proteína. A solução foi incubada durante 5 minutos na temperatura de 30 °C. Em seguida foi adicionado e suavemente misturado 1 μ l do substrato carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-RF-MCA) produzido pela Sigma. Este substrato tem um grupo fluorescente, 4-methylcoumarin, que está submetido ao quench pela proximidade do grupo carbobenzoxy do substrato. Quando a molécula é clivada, os grupos se separam e é possível observar a fluorescência do MCA. Durante a coleta agitações periódicas realizadas pelo próprio fluorímetro garantiram a dispersão do substrato na solução. O comprimento de onda de excitação do substrato é 380 nm e o de emissão é

460 nm, ele é clivado entre a Arginina e o grupo Metilcumarínico (ZFR-MCA), sendo que MCA é a parte fluorescente. Como mencionado os parâmetros cinéticos com maior importância para posterior comparação entre os inibidores são a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) e o K_m (ver Resultados 4.4). Para determinar a concentração molar de enzima ativa é feita uma titulação com o inibidor clássico de cisteína protease E64 (N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine,) (40). Algumas reações foram preparadas no pipetador automático (Biomek 3000), para que no futuro possam ser realizados ensaios enzimáticos em larga escala, permitindo a produção em maiores quantidades e a reprodutibilidade entre os experimentos.

A realização das medidas de fluorescência no fluorímetro de placa permitiu a leitura de até 8 reações ao mesmo tempo. Mas ao colocar o substrato era provocado um atraso entre o início das reações, já que eles foram colocados uma a uma. Efetivamente esse procedimento não apresenta nenhum problema uma vez que o intervalo de tempo não é grande o suficiente para que as reações entrem no regime estacionário, sendo assim a única diferença nas curvas empregando esse procedimento é o coeficiente linear que é trasladado para cima.

Uma dificuldade experimental encontrada foi o modo que a solução ficava disposta dentro dos poços. Mesmo ao se preparar com extremo cuidado duas reações enzimáticas, numa mesma placa percebeu-se que em alguns conjuntos de medidas, as curvas obtidas tinham muitos ruídos chegavam até mesmo a serem aleatórias. Após alguns conjuntos de dados coletados percebeu-se que a má qualidade dos dados estava associada à maneira que a solução ficava disposta após a pipetagem. Se a solução se arranjasse de maneira côncava o formato não causaria interferência no procedimento (Figura 3.2), caso ao contrário, se a solução não ficasse côncava provavelmente aquele conjunto apresentaria problemas. Parte da leitura de fluorescência é dada pela reflexão da luz incidente o que explica o fenômeno ocorrido. A grande dificuldade é que não existe uma maneira correta para pipetar que faça

com que a solução se disponha de forma côncava, não se sabe por que na mesma placa algumas permaneciam de uma ou de outra forma. Outra evidência é que esses erros se reduziam na medida em que as placas eram reutilizadas. Mesmo com a pipetagem automatizada do Biomek não foi possível contornar esse problema. Este contratempo atrasou significativamente os experimentos realizados, para a padronização e automação de ensaios futuros se faz necessário um estudo mais aprofundado de modo a contornar-lo de forma eficaz.

Figura 3.2: Placa utilizada para os experimentos de fluorescência. Os poços em destaque azul são aqueles que a solução se arranjava de maneira a não apresentar interferência nas medidas, é possível visualizar um pequeno ponto branco no poço isso garante a disposição côncava da solução e a correta reflexão da luz. Dados incoerentes foram frequentemente obtidos em poços que a solução não apresentava o formato côncavo (poços em destaque em vermelhos).

Capítulo 4: Resultados

4.1 Estado de Oligomerização

Na resolução da estrutura molecular da Xylellaína, obteve-se que a célula unitária deve conter 4 moléculas independentes, correspondendo 38% de solvente no cristal. Esse resultado foi calculado através do coeficiente de Matthews, com base na densidade típica dos cristais de proteína (32), e informações sobre a Xylellaína e seu padrão de difração: peso molecular de cada monômero como sendo 30507 Da, grupo espacial P1, parâmetros da célula unitária $a=55,09\text{\AA}$; $b=69,31\text{\AA}$; $c=2,37\text{\AA}$; $\alpha=75,86^\circ$; $\beta=75,43^\circ$ e $\gamma=66,51^\circ$ (Figura 4.1 e Tabela 4.1).

Figura 4.1: Probabilidade em função do número de moléculas pelo coeficiente de Matthews (V_M). Comparação entre dados obtidos com todas as proteínas do PDB (Protein Data Bank - www.pdb.com) com os dados fornecidos para a Xylellaína. Cálculo realizado pelo programa Matthews Probability Calculator (33) (modificado <http://www.ruppweb.org/Mattprob>).

Tabela 4.1: Número de moléculas na unidade assimétrica (N), probabilidade em função do número de moléculas Prob(N), coeficiente de Matthews (V_M) e porcentagem de solvente (V_S). Cálculo realizado pelo programa Matthews Probability Calculator (33,34) (modificado <http://www.ruppweb.org/Mattprob/>).

N	Prob(N) por resolução	V_M $\text{\AA}^3/\text{Da}$	V_S %solvente
1	0,0019	7,99	84,6
2	0,0053	3,99	69,2
3	0,3371	2,66	53,8
4	0,6535	2	38,4
5	0,0022	1,6	23,01

Durante a cristalização o sistema evolui na direção da diminuição da energia livre de Gibbs (ΔG), apesar do aumento na entropia (ΔS) ocasionado pela ordenação do sistema, há uma compensação entálpica (ΔH) ocasionada pelo aumento das interações entre as moléculas. Existem diversas formas de dispor os monômeros dentro da unidade assimétrica (Figura 4.2), mas o arranjo que apresenta a maior interface de contato apresenta a maior probabilidade de ocorrência e o menor ΔG .

Figura 4.2: Representação em cartoons de algumas disposições de duas cadeias da Xylellaína. Em destaque o arranjo que apresenta maior superfície de contato entre as cadeias, esferas no centro da estruturas representam a Cisteína catalítica.

A análise sobre a disposição das cadeias da Xylellaína foi realizada de maneira criteriosa pelo programa PISA (35). Este programa permite prever a probabilidade de um estado quaternário ocorrer. O arranjo tetramérico final (Figura 4.3) possui 0,841 probabilidade de ocorrência, contra 0,172 do segundo mais provável.

Figura 4.3: Representação de cartoons da estrutura cristalina tetramérica da Xylellaína e da célula unitária em verde.

A área de interface de dimerização entre as cadeias A - B é de 2027,6 Å² e entre as cadeias C - D de 2025,1 Å². A interface de contato da Xylellaína apresenta uma característica importante, a pró-região faz parte dessa interface. As cadeias A - B estão arranjadas de

maneira que a pró-região da cadeia A e a pró-região da cadeia B se encontram uma de frente pra outra (Figura 4.4), impedindo a movimentação do pró-segmento. Sendo assim o arranjo cristalino obtido torna o sítio catalítico inacessível ao substrato, o mesmo acontece para as cadeias C - D.

Figura 4.4: (A) Em cartoons o arranjo dimérico enfatizando através de esferas a interface de contato entre as cadeias. (B) Destaque em amarelo e vermelho as pró-regiões de cada pró-enzima, as esferas representam a cisteína catalítica.

O arranjo tetramérico da Xylellaína não é necessariamente o estado de oligomerização em que a proteína se encontra dentro da célula. Diversos aspectos físicos e químicos podem ocasionar diferentes formas de oligomerização da proteína em solução. Este estudo se torna importante uma vez que o enovelamento quaternário pode estar relacionado com o mecanismo de inativação da protease dentro organismo devido à disposição das cadeias.

Foram realizados alguns experimentos com a finalidade de se obter mais informações sobre a oligomerização da proteína em solução aquosa. Os dois experimentos iniciais foram: Eletroforese com Gel Nativo e Cromatografia de Exclusão Molecular. O gel nativo indicou a presença de uma única banda (Figura 4.5) e quando comparada com as proteínas do marcador, observa-se que o oligômero tem um tamanho molecular acima de 140 kDa. Porém o gradiente do gel nativo seleciona tanto por raio hidrodinâmico, que leva em consideração quão globular é a proteína, como também por carga superficial. O resultado obtido com o gel nativo é, no entanto uma estimativa do peso molecular do oligômero. Considerando estes fatores, o valor de 140 kDa concordaria com arranjo tetramérico. Algo se pode deduzir desse experimento é a existência de uma única banda, confirmando assim a presença de um único estado oligomérico. Mesmo depois da incubação com DTT, procedimento adotado na ativação da enzima (explicado a seguir), esse resultado ainda foi verificado.

Figura 4.5: Gel Nativo – Xylellaína Nativa: (a) Sem adição de DTT (b) Com adição de DTT

Na cromatografia de exclusão por tamanho molecular também há um único pico eluído com 12,46 ml de solução tampão, que comparado com a curva de calibração, corresponde a um tamanho molecular de 84 kDa (Figura 4.6). Após a incubação com DTT (2,5mM) durante 5 minutos a 30 °C, a proteína foi novamente aplicada na coluna de cromatografia. A eluição ocorreu com 12,41 ml de tampão. Estimando uma incerteza de 1,5 ml na eluição da proteína não é possível distinguir entre as preparações com e sem o agente redutor. Isto corrobora a hipótese de que não há alteração do estado oligomérico da proteína depois de ativada. O resultado do experimento de exclusão molecular sugere um valor diferente de agregação do que obtido com a eletroforese, podendo indicar que houve a separação em um dímero. No entanto, deve-se considerar que as estimativas de massa por colunas de exclusão molecular baseiam-se na hipótese de que a forma das mesmas seja aproximadamente globular, o que pode não ser efetivamente o caso da Xylellaína em solução.

Figura 4.6: Cromatografia de exclusão molecular pelo tamanho da proteína (superdex 200) – Absorção em 280nm da Xylellaína Nativa (4 °C) X volume de eluição em ml. Sem adição de DTT (em azul), com adição de DTT (em vermelho).

Nenhum dos dois experimentos anteriores foi conclusivo para verificar qual é o estado oligomérico da Xylellaína em solução. Resultados recentes obtidos com a técnica de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) em colaboração com a Dra. Ana Carolina M. Figueira e o

aluno de doutorado Mario de Oliveira Neto, mostram que há grande probabilidade da proteína estar no estado dimérico quando em tampão. O raio de giro obtido pela técnica de SAXS condiz com o calculado através do dímero da estrutura cristalográfica (Figura 4.7 A). Com os dados de SAXS também foi gerado um envelope da proteína que se ajusta ao dímero (Figura 4.7 B), confirmando este estado oligomérico em solução (tampão usual da proteína).

Figura 4.7: (A) Função de distribuição da distância da Xylellaína para dímero (dados experimental e modelo) e para o tetrâmero (modelo). (B) Esferas representando o envelope proteico obtido através dos dados de SAXS e em cartoon o dímero da estrutura cristalográfica.

4.2 Pró-Região

Ao realizar um experimento *in vitro* tentando compará-lo com o que ocorre *in vivo*, podem ocorrer consideráveis alterações no material biológico devido sua exposição a uma grande quantidade de oxigênio. Para reverter este efeito e tornar o ambiente mais próximo com o que se tem dentro de uma célula, é comumente aplicado um agente redutor (36). O DDT (Ditiotreitol) é um agente redutor usado com frequência para reduzir interações entre sulfetos em proteína e outras moléculas biológicas. A adição de DTT é o procedimento padrão para a ativação da Xylellaína. As interações de sulfetos entre as Cisteínas catalítica são clivadas, aumentando a afinidade da enzima pelo substrato (ver Cinética Enzimática 4.4). Se for realizada uma eletroforese com a mesma amostra proteica, antes e depois da aplicação do DTT, percebe-se que antes da ativação o padrão apresenta duas bandas próximas, após a aplicação do DTT uma das bandas desaparece (resultado não mostrado). Este experimento sugere que sem DDT a solução é uma mistura de enzima e pró-enzimas, o que condiz com a presença de duas bandas. Após a ativação da proteína ocorre a clivagem da pró-região, o que resulta no aparecimento de uma única banda. Concluindo a clivagem da pró-região está relacionada com a ativação da enzima.

A maioria das cisteíno protease da superfamília Papaina são sintetizadas com um pró-segmento de 60-110 resíduos que tem entre uma das funções bloquear o sítio catalítico, mantendo a proteína inativa dentro da célula (37). Como foi visto esta pró-região também está presente na Xylellaína, mas diferentemente das outras proteínas da sua família, a pró-região possui 30 resíduos na região N-terminal. Esse resultado foi obtido a partir do experimento de espectrometria de massa. O espectro obtido pode ser visualizado na Figura 4.8.

Figura 4.8: Intensidade relativa em unidade arbitraria versus massa molecular sobre a carga do peptídeo.

Os picos no espectro de massa indicam quais fragmentos protéicos estão presentes na solução aplicada. Por meio da massa molecular desses fragmentos e do software Masslynx foi possível obter quais regiões, na sequência da proteína, correspondem aos fragmentos obtidos (Tabela 4.2). Por exemplo, o software busca entre todos os intervalos dentro da sequência, aquele que corresponde a uma massa de 27725 Da. Como resultado ele obtém que o fragmento do resíduo 25 ao 269 apresenta massa correspondente ao valor procurado.

Tabela 4.2: Massa Molecular/Carga dos peptídeos clivados durante o experimento, regiões da proteína que possuem massa molecular aproximada aos dados obtidos.

Massa Molecular/Carga Observada	Resíduo Inicial	Resíduo Final
23239	30	237
23509	30	240
23551	31	241
27107	30	269
27725	25	269

Devido à maior incidência de fragmentos que começam a partir do resíduo 30, se conclui que o sítio de clivagem da pró-região deve ocorrer nesse local ou próximo a ele (Figura 4.9).

↓

TVLKRRKKS**GYGYIPDIADIRDFS****YTP****KS**VIAALPPKVDLTPPFQVYDQGRIGSCTANALAAAIQ
 FERIHDKQSPEFIPSRLFIYYNERKIEGHVNYDSGAMIRDGIKVLHKLGVCPKEKWPYGDTPADP
 RTEEFPPGAPASKKPSDQCYKDAQNYKITEYSRVAQDIDHLKACLAVGSPFVFGFSVYNSWVG
 NNSLPVRIPLPTKNDTLEGGHAVLCVGYDDEIRHFRIRNSWGNNVGEDGYFWMPYEYISNTQLA
 DDFWVIKTVRK

Figura 4.9: Seqüência de resíduos da Xylellaína – destaque em vermelho a região em que a proteína é clivada.

Analisando os fatores de temperatura (B-factor), parâmetro que fornece informação sobre a liberdade conformacional da molécula, percebe-se que a região onde ocorre a clivagem destaca-se por causa da sua flexibilidade. Esse resultado sugere que a movimentação do local pode estar relacionada com a clivagem da alça. Como esperado outras regiões que também possuem grande liberdade conformacional são as N-terminal e C-terminal da pró-enzima. Pode-se dizer que a estrutura da Xylellaína como um todo é pouco móvel, pois analisando o fator de temperatura, percebe-se que a pouca variação em seu valor (Figura 4.10). O interior da proteína é mais rígido que o exterior, pois é na região interior que ocorre o ataque nucleofílico.

Figura 4.10: Gradiente da liberdade vibracional da estrutura protéica. Quanto mais vermelho menor o grau de liberdade, azul maior o grau de liberdade. Os dados de fator de temperatura foram ponderados pelo maior valor obtido.

Sabe-se que a Xylellaína se auto-ativa (23), provavelmente uma molécula de protease acione o mecanismo de outras moléculas. Percebe-se que a região de clivagem é sobressalente, o acionamento pode ser facilitado devido à exposição desse local (Figura 4.11). A pró-região além da oclusão do sítio catalítico auxilia no correto enovelamento da proteína, pois a tentativa de expressar a proteína sem os 30 resíduos do N-terminal fez com que a proteína ficasse completamente insolúvel (Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, Comunicação pessoal).

Figura 4.11: Superfície protéica (verde), sítio catalítico (amarelo) e pró-região (vermelho). Em destaque os resíduos onde provavelmente ocorre a clivagem da pró-região.

4.3 Nucleotídeo

Na resolução da estrutura cristalográfica da Xyllelaína, foi encontrada uma densidade eletrônica que foi bem modelada como um nucleotídeo Uridina di-fosfato (UDP). O nucleotídeo está ligado de forma não covalente a Xyllelaína. Sabe-se que em diversas proteínas nucleotídeos agem como cofatores, porém a presença de um ribonucleotídeo como cofator na estrutura protéica de uma cisteína protease não foi reportado anteriormente. O nucleotídeo está localizado na região externa da proteína, pouco acima do sítio catalítico (Figura 4.12).

Figura 4.12: Em stick nucleotídeo Uridina di-fosfato (UDP) ligado de forma não covalente a Xylellaína. Em vermelho a pró-região ocluindo o sítio catalítico em amarelo.

Apesar de não existir ligações covalentes que liguem o nucleotídeo à Xylellaína, a interação com resíduos da pró-região e da proteína formam um bolsão que o sustenta firmemente (Figura 4.13). O bolsão de sustentação da Uridina di-fosfato (UDP) é formado por seis resíduos. Três destes resíduos são provenientes da pró-região, D21, R23 e F25, e os demais, K111, K115 e Y164, provém da hélice $\alpha 4$ (dois primeiros) e da alça de transição entre os dois domínios (último resíduo). Atentando para interações originárias da proteína, os resíduos K111 e K115 fazem ligações de hidrogênio com os oxigênios do grupo fosfato. Também ocorre ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia principal Y164 e o anel pirimídico. Além das interações de hidrogênio, o nucleotídeo é sustentado pelo empilhamento dos anéis aromáticos, Y164, UDP e F25, sendo F25 um resíduo da pró-região. O resíduo F25

não contribui na sustentação do nucleotídeo somente com o empilhamento, sua cadeia lateral também faz uma ligação de hidrogênio com a base pirimídica. Por fim, mesmo sem interagir diretamente com o nucleotídeo a ligação de hidrogênio entre R23 e D21 é importante, pois ela provoca uma torção, que possibilita os resíduos seguintes interagirem com a pró-região.

Figura 4.13: Principais interações de sustentação do nucleotídeo Uridina di-fosfato (UDP).

Como hipótese se considera a presença do nucleotídeo relacionada com a inibição/ativação da proteína, já que ele estabelece algumas interações com a pró-região. Supõe-se que ele possa atuar de forma direta, dificultando ou auxiliando a clivagem do pró-segmento, ou até mesmo, como sinalizador regulando o contato com outras proteínas ativadoras. Para verificar esta hipótese foi elaborado um experimento que consiste na desestabilização do nucleotídeo, através da extinção das interações provenientes da pró-região (Figura 4.14), para entender se ocorre ou não alguma mudança no sistema UDP/proteína.

Figura 4.14: Representação esquemática das interações entre proteína (verde) - nucleotídeo (azul) e nucleotídeo e pró-região (vermelho).

Para suprimir essas interações foram realizadas mutações pontuais em três resíduos na sequência da Xylellaína. As mutações foram: Arginina 23 mutada para Alanina, Fenilalanina 25 para Alanina e por último, Arginina 23 e Fenilalanina 25 por Alaninas (Figura 4.15).

Figura 4.15: Mutações realizadas na estrutura de Xylellaína nativa (em destaque). As mutações foram realizadas nos resíduos R23, F25 e R23F25, todos foram mudados para A.

Mesmo sem saber de que forma as mutações afetaram a estabilização do nucleotídeo, supõe-se que ocorreu algum tipo de interferência naquela região. A primeira evidência que a desestabilização do nucleotídeo com uma mutação pontual afetou o enovelamento da proteína é sugerida pelo fato do rendimento de expressão do gene mutante ser menor do que o da nativa empregando o mesmo protocolo (Figura 4.16). Após a aplicação do IPTG (0,1 mM), nota-se que a proteína aparece em sua maioria no pelet. É provável que a célula tenha dificuldades de expressar uma protease que não esteja inibida e acabe forçando a formação de corpos de inclusão como forma de evitar proteólises indesejadas.

Figura 4.16: (A) Análise de expressão da Xylellaína nativa e das mutantes – PX pelet da nativa (N), RF, R e F mutantes; SX sobrenadante da nativa (N), RF, R e F mutante. (B) Purificação da mutante R, eluição com 50, 100 e 250 mM de Imidazol.

A comparação entre a proteína nativa e as mutantes pode ser feita por diversas técnicas. A estrutura molecular obtida por cristalografia de raio-X, nos fornece muitas informações sobre as interações que estabilizam a proteína, aspectos relevantes na relação estrutura/função. No entanto, a relação funcional entre a enzima e a catalise do substrato é comumente estudada por meio da cinética enzimática da reação. Por isso essa técnica foi utilizada para comparar a Xylellaína nativa e suas mutantes. Através da análise cinética espera-se que identificar alguma alteração na funcionalidade das proteínas mutantes.

4.4 Cinética Enzimática

A reação de catalise acontece quando a enzima (E) na presença do substrato (S) produz um intermediário, enzima-substrato (ES), nesta etapa o substrato é transformado e liberado resultando na enzima livre e no produto. Nesse experimento a enzima é a protease Xylellaína, supõe que o nucleotídeo seja seu cofator, o substrato usado é o peptídeo ZFRMCA (Z-benzyloxycarbonyl-7-amino-4-methylcoumarin). Depois da reação de hidrólise catalisada pela protease os produtos formados são ZFR e MCA, o subproduto MCA possui propriedades fluorescentes (Ver Descrição Experimental), através de sua formação a reação é caracterizada (Figura 4.17).

Figura 4.17: Esquema representativo da reação de hidrólise do substrato ZFRMCA. Em verde a enzima (E), azul o cofator (UDP), laranja o substrato (ZFRMCA) e em amarelo o produto (ZFR e MCA).

Cada etapa da reação ocorre com uma velocidade constante (k_1 , k_{-1} e k_2). O modelo utilizado para descrever a reação de catálise do substrato foi Michaelis-Menten (39).

Obedecendo as considerações e aproximações exigidas para aplicação desse modelo, se obtêm a Equação 1 que descreve a produção do produto:

$$v = \frac{V_{Max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Onde v é a velocidade do produto produzido, V_{Max} é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten. K_m é definido como a concentração do substrato necessária para que a reação atinja metade da sua velocidade máxima. Sua obtenção é importante para caracterizar a reação de catalise, pois ele está diretamente relacionado com afinidade enzima-substrato. Quanto menor o seu valor maior é afinidade do substrato pela a enzima, sendo necessária uma quantidade menor de substrato para alcançar a velocidade máxima. K_m é entendido como a taxa de dissociação do complexo enzima-substrato pela taxa de formação de ES.

$$K_m = \frac{k_2 + (-k_1)}{k_1} \quad (2)$$

Para se aplicar o modelo de Michaelis-Menten algumas considerações devem ser satisfeitas. O substrato deve estar saturado em relação à enzima ($[S] \gg [E]$) para que todos os sítios catalíticos sejam ocupados durante a reação. Os parâmetros cinéticos devem ser medidos no regime estacionário da reação, ou seja, a produção e a dissociação do intermediário ES devem ser iguais:

$$k_1[E] + k_1[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

Isso implica que somente o início da reação quando o consumo de substrato é linear com o tempo pode ser considerado (Figura 4.18).

Figura 4.18: Curvas da intensidade do produto (MCA) pelo tempo para diferentes concentrações de substrato [ZFRMCA].

Ajustando os dados de intensidade versus tempo a uma equação linear, se obtêm através do coeficiente angular da reta, os valores de intensidade pelo tempo para cada concentração de substrato aplicada.

Figura 4.19: Ajuste linear da intensidade fluorescente para cada concentração de [MCA] livre. O coeficiente angular da reta ($y = ax + b$) é igual $a = 37374(153) \mu\text{M}^{-1}$ e $b = -135(85)$, reta usada para converter os ensaios cinéticos.

Ainda se faz necessário converter esses valores para concentração de ZFRMCA/tempo por concentração de substrato, essa conversão é feita usando a relação linear entre intensidade e concentração de MCA livre, produto fluorescente da reação (Figura 4.19). Os dados obtidos para a Xylellaína nativa com DTT estão na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores de velocidades iniciais por tempo obtidos em quadruplicata para a Xylellaína Nativa com DTT versus a concentração de substrato.

μM de MCA/s				[ZFRMCA] 10 ³ μM
A	B	C	D	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,0077	0,0059	0,0058	0,0069	0,0078
0,0134	0,0117	0,0123	0,0108	0,0156
0,0181	0,0181	0,0215	0,0230	0,0313
0,0297	0,0304	0,0263	0,0247	0,0625
0,0336	0,0366	0,0378	0,0381	0,1250
0,0479	0,0429	0,0469	0,0438	0,2500
0,0564	0,0554	0,0503	0,0537	0,5000

A obtenção do valor de K_m se dá através da taxa de produção de produto para diferentes concentrações de substrato. Como foi descrito no método experimental a proteína é incubada em uma solução de acetato de sódio com DTT. Os dados obtidos representam com confiabilidade o modelo proposto. Como esperado, com o aumento da concentração de substrato o seu consumo também cresce de forma hiperbólica. Os dados obtidos foram analisados através do software SigmaPlot (SYSTAT). Os dados foram ajustados pelo método de regressão não linear a uma hipérbole, $y = \frac{ax}{b + x}$, onde x é taxa de substrato consumido, y a concentração de substrato, a é a velocidade máxima da reação e b a constante de Michaelis-Menten. A curva para a reação da enzima nativa pode ser visualizada na Figura 4.20.

Figura 4.20: Curva Michaelis-Menten da hidrólise do substrato fluorescente ZFRMCA. (●) proteína nativa com DTT (◇) proteína nativa sem DTT.

Como foi mostrado anteriormente (ver Pró-região 4.2), o DTT é um agente redutor sua função na proteína é reduzir a Cisteína catalítica, o resultado obtido confirma que na presença de DDT a afinidade entre enzima e o subtrato aumenta, como esperado já o ambiente se torna mais parecido com o biológico. Sem a presença do DTT a proteína apresenta K_m de 80,1(6) μM , porém na presença do DTT a afinidade aumenta consideravelmente para 68,6(6) μM (Figura 4.20). Confirmando que a redução da Cisteína catalítica (Cys58), está relacionada com a ativação da proteína.

Outra constate importante para caracterizar a cinética da reação é a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m). Para determinar essa constate é necessário conhecer o coeficiente catalítico que é igual a:

$$k_{cat} = \frac{V_{Max}}{[E]} \quad (4)$$

No seu cálculo é necessário determinar a concentração de enzima ativa $[E]$ em solução. Conhecer a concentração correta de enzima ativa é importante, pois esse valor pode

apresentar grandes variações de um experimento realizado com a mesma amostra em dias subsequentes (Figura 4.21).

Figura 4.21: Curvas evidenciam que sempre é necessário quantificar a enzima ativa de uma amostra. Em preto, curva obtida no primeiro dia de experimento, em vermelho a mesma amostra de proteína, mas após um dia de espera. Dados obtidos com o fluorímetro de cubeta.

A concentração de enzima ativa é obtida através da titulação com inibidor (I), para uma reação do tipo tight-bind (39) a titulação pode ser dividida em três regiões (Figura 4.22): Região A, quando $[E] > [I]$ a curva é praticamente linear a concentração de inibidor qualquer alteração em seu valor altera significativamente a velocidade da reação. A região B ocorre quando $[E] \approx [I]$, possui grande importância, pois fornece a informação desejada. E finalmente a região C, que acontece quando $[E] < [I]$, a alta concentração de inibidor provoca a saturação a fazendo tender a zero (39).

Figura 4.22: Curva de resposta de concentração para um inibidor de enzima, ela apresenta três regiões descrita por Murphy (2004). Figura adaptada (35).

Para a Xylellaina a concentração de enzima ativa foi obtida através da curva de velocidade de hidrolização do ZFRMCA contra a concentração do inibidor de cisteíno protease E64 (Figura 4.23). E64 (N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine, (38) é um potente inibidor irreversível de cisteíno proteases, é frequentemente utilizado com esta finalidade, porém apresenta alto grau de toxicidade o que impossibilita o seu uso farmacológico.

Figura 4.23: Taxa de MCA por concentração de inibidor E64. Curva usada para obter a concentração de enzima ativa em uma amostra de proteína (enzima nativa).

Novamente os pontos foram analisados através do software SigmaPlot e através do método de regressão não linear se ajustou os pontos a um decaimento hiperbólico, $y = \frac{ab}{b + x}$, o valor de concentração de enzima ativa é dado pela constante b .

Todas as etapas de análise da reação enzimática foram feitas tanto para a nativa quanto para as três mutantes. Todas as curvas obtiveram parâmetro de qualidade R^2 superiores a 0,97. Os valores obtidos para K_m e para a eficiência catalítica estão na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Comparação entre os valores obtidos para K_m (μM) e k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$) da Xylellaína nativa e das mutantes.

	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$)
NATIVA	69(6)	0,22
R	35(4)	0,12
F	124,6(9)	0,33
RF	28(1)	0,25

Comparando os dados pode-se perceber que ocorreu maior variação entre os valores obtidos para K_m do que nos valores obtidos para eficiência catalítica. Enquanto alguns valores de K_m são o dobro e até o quádruplo (RF = 28(1) μM e F = 124,6(9) μM), os valores da eficiência catalítica permanecem muito próximos, mesmo quando se considera as incertezas. Lembrando que o K_m se relaciona com a afinidade entre enzima e substrato, pode-se concluir que as mutações afetaram particularmente a maneira que a enzima reconhece o substrato. Concordando com a hipótese proposta as mutações na região do nucleotídeo alteraram a ativação da enzima, mas não sua propriedade de catalisar o substrato. Sendo assim o nucleotídeo está relacionado com o mecanismo de ativação da Xylellaína.

4.5 Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) foi usada para entender como as mutações pontuais afetaram o bolsão do nucleotídeo, se conseguiram causar ou não o desprendimento da UDP. O uso dessa técnica possibilita fazer essa verificação, pois o fósforo está presente somente no nucleotídeo. O espectro de RMN do UDP no tampão fosfato foi obtido para verificar a eficiência da técnica (Figura 4.24). Os picos referentes aos P_{α} e o P_{β} da UDP estão em 0 ppm e outro em -13,1 ppm. O pico do meio, posição -8,6 ppm, corresponde ao fosfato encontrado na solução tampão da proteína .

Figura 4.24: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do elemento ^{31}P . O pico do meio é referente ao tampão fosfato.

Após três purificações com colunas de propriedades diferentes, se acredita que a única forma do UDP continuar na solução seria permanecer ligado à estrutura protéica. A técnica foi então aplicada primeiramente à proteína nativa. Logo se percebeu que a presença do tampão fosfato impossibilitaria a obtenção de resultados conclusivos, pois o sinal de RMN era dominado pelo fosfato do tampão (em concentração de 50 mM), enquanto a enzima estava em concentração de 5 mg/ml (equivalente a 0,15mM). A concentração de fosfato era de ~ 300

vezes a de enzima, o que dificulta enormemente a visualização dos picos ocasionados pela UDP (Figura 4.25).

Figura 4.25: Espectro de ressonância magnética nuclear onde os picos do P provenientes da UDP são fortemente mascarados pelo tampão padrão que cotem fosfato.

O experimento foi refeito sem o tampão fosfato, nessa medida com a proteína nativa foi confirmada a presença de dois picos (Figura 4.26). O aparecimento dos dois picos confirma o uso da técnica de ressonância magnética nuclear para verificar a presença da UDP junto à estrutura proteica. O intervalo entre os dois picos no espectro da UDP livre é de aproximadamente 13 ppm, enquanto que na proteína é 12 ppm. Acredita-se que essa diferença seja ocasionada por causa dos diferentes ambientes que se encontra o nucleotídeo.

Com a enzima em tampão fosfato a presença do UDP na estrutura dos três mutantes não foi observada com RMN. Somente o pico referente ao fosfato do tampão foi identificado, mas como foi visto esse resultado pode ser um falso negativo. As três proteínas mutantes tem

estabilidade reduzida e não foi possível fazer a mudança do tampão fosfato sem precipitar a preparação.

Figura 4.26: (A) Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do elemento ^{31}P , indicando que o ribonucleotídeo está ligado à Xylellaina. (B) Representação em 3D da UDP.

Capítulo 5: Discussão

A finalidade das mutações foi promover a desestabilização do nucleotídeo, para verificar através de comparações se a UDP possui ou não funcionalidade. Os resultados dos ensaios cinéticos mostraram que com apenas mutações pontuais mudanças consideráveis na inibição da proteína são obtidas. Não podemos ao certo saber de que forma as mutações alteraram o sistema proteína/nucleotídeo, mas podemos com base na estrutura molecular sugerir algumas explicações.

Tanto as mutantes R como a RF possuem um valor de K_m menor que o da proteína nativa, o que significa que a afinidade entre enzima e substrato aumentou. Uma possível explicação é que sem a Arginina a pró-região tenha ganhado maior liberdade se afastando da proteína. A ligação de hidrogênio entre a Arginina23 e o Aspartato21, provoca uma dobra na pró-região importante para o bloqueio do sítio catalítico (Figura 5.1).

Figura 5.1: A interação entre R23 e D21 provoca uma curva na pró-região que possui grande importância para direcioná-la para o sítio catalítico. Interação Π -tag entre o nucleotídeo e o resíduo F25.

Analogamente sem a Arginina e sem a Fenilalanina, a pró-região também perde a interação R23-D21. Esta ligação aparenta ser a ligação mais importante para manter a pró-região próxima à proteína. Novamente o que se observa é um aumento de afinidade pelo substrato (Figura 5.2).

Figura 5.2: A interação entre R23 e D21 provoca uma curva na pró-região que possui grande importância para direcioná-la para o sítio catalítico. Interação Π -tag entre o nucleotídeo e o resíduo F25.

O valor de K_m para a mutante F aumentou, a enzima perdeu afinidade com a mutação. A presença da cadeia lateral volumosa da F25 pode representar um impedimento estérico que dificulta uma maior aproximação da pró-região com o nucleotídeo-âncora. Ao removê-la, possivelmente reforçam-se as ligações de hidrogênio que prendem a pró-região ao nucleotídeo, dificultando a sua hidrólise para ativação da enzima (Figura 5.3).

Figura 5.3: A interação entre R23 e D21 provoca uma curva na pró-região que possui grande importância para direcioná-la para o sítio catalítico. Interação Π -tag entre o nucleotídeo e o resíduo F25.

A forma de uma proteína está diretamente relacionada com a sua sequência de aminoácidos. Proteínas da mesma família possuem resíduos fortemente conservados que garante não só seu correto enovelamento dentro do organismo, mas também sua eficiência funcional na catálise do substrato. A Xylellaína possui baixa identidade sequencial, mas considerável homologia estrutural com as demais cisteíno proteases da sua família Papaína A, em especial as do grupo das catepsinas (cisteíno proteases lisosomais de mamíferos) (20). A discussão feita a seguir está baseada na síntese dos resultados obtidos para a Xylellaína e também em uma comparação funcional entre elas e algumas outras Cisteíno proteases conhecidas e bem estudadas.

Dentro da família das proteases encontram-se tanto proteínas com atuação endo quanto exopeptidases (42,43), sendo mais comum a atividade endopeptidase. As Catepsina B e Catepsina X exercem atividade endo e exopeptidase, a exopeptidase é possível devido à presença de um loop e de um mini-loop de oclusão (respectivamente) na estrutura molecular dessas enzimas. Eles permitem a interação de um aceptor negativo da enzima à extremidade

C-terminal do substrato (44), permitindo a catálise do carboxipeptídeo. Foi verificado que a Xylellaína apresenta atividade endopeptidase (23), mas a presença de dois loops em regiões próximas a aqueles encontrados nas Catepsinas B e X, sugeriu que a enzima também poderia apresentar função exopeptidase. Através de ensaios de atividade realizados com enzimas mutantes buscou verificar atividade exopeptidase na Xylellaína. As mutações foram feitas nas regiões que se supunham pertencer aos loops. Esse experimento foi realizado integralmente pela equipe de pesquisa do Prof. Flávio H. Silva, e por meio de comunicação pessoal, sabe-se que as mutações foram inefetivas, ou seja, elas não ocasionaram nenhuma alteração nos resultados obtidos com a enzima nativa.

Como foi verificado através do experimento de espectrometria de massa a Xylellaína possui uma pró-região com 30 resíduos, esse pró-segmento é menor do que os encontrados nas outras pró-proteínas da família. As pró-catepsinas B, K e L apresentam uma pró-região variando entre 74 a 40 resíduos. Eles se iniciam na região C-terminal e são direcionados a passar pelo sítio catalítico por um motivo de tipo grampo de cabelo encontrado entre uma pequena hélice alfa e uma folha-beta. Essa região é denominada PBL (Protein Binding Loop). Diferente das B, K e L as pró-catepsinas X não possui o motivo PBL para direcionar e estabilizar a enzima, garantido que ela permaneça inativa. Por outro lado, a pró-catepsina X possui próxima a região de conexão entre a pró-região e a enzima, uma interação entre a Cisteína 31 e Cisteína 28 faz com que o pró-segmento permaneça sobre o sítio catalítico. Os mecanismos que garante a inativação da proteína diferem dentro da família Papaína e pode ser usada para subclassificação. Os resultados obtidos para a Xylellaína apresentam um sistema de inibição ainda não reportado em outras cisteíno proteases, como foi verificado estruturalmente, a presença de um nucleotídeo colabora na torção da pró-região, fazendo com que ela oclua o sítio catalítico. Nenhum outro sistema de inibição, como os descritos para a cathepsinas foi verificado na Xylellaína. Interações de hidrogênio e o empilhamento da

uracila com Fenilalanina e a sustentam o nucleotídeo próximo a pró-região. Funcionalmente através da comparação entre a cinética enzimática de enzimas mutante é possível afirmar que o nucleotídeo também participa do mecanismo de inativação e ativação da enzima, pois sua desestabilização alterou consideravelmente a afinidade entre a enzima e o substrato.

Capítulo 6: Conclusão

O sucesso na conclusão das etapas anteriores realizadas com a Xylellaína, desde a escolha da construção para a subclonagem visando à expressão do gene até a obtenção da estrutura molecular, indica que os estudos seguem um caminho lógico e promissor. O atual trabalho realizado com a Cisteíno protease também apresentou resultados interessantes auxiliando na compreensão do seu mecanismo de ação. O conjunto de informações adquiridas sobre a Xylellaína junto com a estrutura molecular torna o ambiente promissor para pesquisa para pesquisas futuras.

Um sistema de regulação das cisteíno protease é a inativação da enzima dentro do organismo até que um estímulo externo exija sua atuação. Por isso entender qual é o estado inativo dentro da célula e o processo para sua ativação, além de fornecer conhecimento básico sobre o metabolismo do patógeno, pode ajudar no desenvolvimento de fármaco específico.

A pró-região encobre o sítio catalítico da proteína tornando-a inativa, quando ativada esse segmento (≈ 30 resíduos) é clivado permitindo o acesso a o sítio catalítico. Por meio de recentes resultados obtidos pela técnica de SAXS, verificou-se que no tampão padrão para a estabilização da proteína ela se encontra no estado dimérico. Sendo assim a afirmação sobre a presença de um único estado oligomérico em solução, mesmo após a ativação necessitar ser revista, pois se sabe que na forma dimérica a pró-região está imobilizada tornando a protease inativa.

Foi possível verificar que o nucleotídeo influencia o processo de inibição da enzima, mesmo sem ter certeza que as mutações realizadas foram eficazes o suficiente para causar o desligamento do nucleotídeo. A diferença entre os valores de eficiência catalítica obtido para a proteína nativa e as mutantes, confirma que qualquer pequena alteração na interação proteína-nucleotídeo influencia na sua atividade enzimática. Dessa forma se pode concluir que o nucleotídeo possui funcionalidade sobre a estrutura molecular da proteína.

Em experimentos futuros a serem realizados está à confirmação, através de RMN, da presença do nucleotídeo nas proteínas mutantes. A realização desse experimento inclui a estabilização dos mutantes em um tampão que não contenha fosfato. A informação que será obtida com esse experimento nos ajudará a compreender melhor os resultados já obtidos dos ensaios de atividades das mutantes. Outro experimento não menos importante, mas de difícil realização é a verificação do nucleotídeo na proteína da própria *Xylella fastidiosa*. Este experimento é de difícil realização, pois obter o extrato da proteína nativa da própria bactéria exige outros métodos de extração e purificação da proteína, e somente poderá ser realizado com a colaboração do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva.

Capítulo 7: Perspectivas

A *Xylella fastidiosa* é a bactéria causadora de diversas doenças que trazem grandes perdas para o mercado agrícola. Não existe uma forma eficiente de se tratar a planta infectada, o controle da doença se faz através morte das plantas infectadas ou o combate ao inseto vetor. É necessária a obtenção de conhecimento sobre seus mecanismos moleculares de patogenicidade, alguns estudos que gere perspectivas de controle dessa praga. Por ser diferencialmente expressa em cepas patogênicas a inibição da Xylellaína é um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos. Visando a aplicação em futuros experimentos os ensaio enzimático realizados com a Xylellaína foram padronizado conjuntamente com a pós doutoranda do Laboratório de Química Medicinal e Computacional (IFSC), Dra. Deise Moreira Borchhardt. A Dra. Deise trabalha atualmente com ensaio de inibição da Cruzaína, uma cisteíno protease de *Trypanosoma cruzi*. A Cruzaína apresenta grande identidade estrutural com a Xylellaína (Figura 7.1).

Figura 7.1: Sobreposição das estruturas cristalográficas das proteínas Xylellaína (azul), Cruzaína (vermelho) e Falcipaína (amarelo), mostrando a similaridade estrutural (23).

As perspectivas de continuidade do estudo é testar esses inibidores também para a Xylellaína. Com o conhecimento do mecanismo bioquímico combinado com informações da estrutura tridimensional de alvos moleculares bem definidos é possível o planejamento racional. A padronização dos ensaios possibilitará a comparação entre os resultados obtidos com as duas proteínas.

Referências

1. HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.27, p.271-290, 1989.
2. PURCELL, H. A.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, p.131-151, 1996.
3. HARTUNG, J. S. et al. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with the other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, v.84, p.591-597, 1994.
4. ROSSETTI, V. et al. Présence de bactéries dans l'xylème d'orangers atteints de chlorose variée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes Rendus Hebdomadaires Seances de l'Academie Sciences*, v.310, p.345-349, 1990.
5. SOUZA et al. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.16, p.867-875, 2003.
6. MEIDANIS, J.; BRAGA, M.D.V.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Whole-genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, n.2, p.272-299, 2002.
7. HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.27, p.271-290, 1989.
8. SIMPSON, A. J. G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *X. fastidiosa*. *Nature*, v.406, p.151-157, 2000.
9. BHATTACHARYA, A. et al. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.17, n.19, p.12403-12408, 2002.
10. VAN SLUYS M. A. et al. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology*, v.3, p.1018-1026, 2003.
11. LAMBAIS, R. M. et al. Genomic approach to the understanding of *X. fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, p.459-462, 2000.
12. FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/cec_projeto.html>. Acesso em: Novembro de 2008.
13. LEUNG-TOUNG, R.; LI, W.; TAM, T. F.; KARIMIAN, K. Thiol-Dependent Enzymes and Their Inhibitors: A Review. *Current Opinion in Microbiology*, v.9, p.979-1002, 2002.
14. RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochimica Polonica*, v.51, p.861-873, 2004.

15. RAWLINGS, N. D.; BARRETT A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, v.27, p.325-331, 1999.
16. SAJID M.; MCKERROW J. H., Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.120, p.1-21, 2002.
17. BARRETT A. J.; RAWLINGS N. D., Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, v.382, p.727-733, 2001.
18. MENARD, R. et al. Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. *Acta Biochimica Polonica*, v.50, n.3, p.691-713, 2003.
19. MCKERROW J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.833-837, 1999.
20. MCGRATH M. E. The lysosomal cysteine proteases. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, v.28, p.181-204, 1999.
21. COPELAND, R. A., *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2.ed. New York: Wiley-VCH, 2000.
22. DOLENC I. et al. Oligomeric structure and substrate induced inhibition human cathepsin C. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.21626-21631, 1995.
23. NAGAROTO, V. et al. Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. *FEMS Microbiology Letters*, v.261, p.187-93, 2006.
24. LEITE, N. R. Estudos moleculares de duas triptofanil tRNA sintetases do parasita *Leishmania major* e de uma cisteíno protease da bactéria *Xylella fastidiosa*. 2007. 147f. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
25. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
26. LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
27. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
28. FRANK, J. M. van de Ven. *Multidimensional NMR in Liquids: Basic principles and experimental methods*. New York: WILEY-VCH, p.17-22, 1995.
29. CANTOR, C. R; SCHIMMEL P.R. *Biophysical Chemistry*. São Francisco: W. H. Freeman, 1980. v.2.

-
30. ZHOU, M.; VEENSTRA, T. Mass spectrometry: m/z. *Biotechniques*, n.5, v.44, p.667-678, 2008.
 31. PDB: Protein Data Banc. Disponível em: <<<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>> Acessado: 2006-2008
 32. BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. *Protein Crystallography*. New York: Academic Press, 1976.
 33. MATTHEWS PROBABILITIES. Disponível em: <http://www.ruppweb.org/Mattprob/>. Acessado em: 06, 2008.
 34. KANTARDJIEFF K. A.; RUPP B. Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, dna, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science*, n.12, p.1865-1871, 2003.
 35. E. KRISSINEL; K. HENRICK Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.*, n.372, P.774-797, 2007.
 36. WITTRUP K. D. Disulfide bond formation and eukaryotic secretory productivity. *Current Opinion in Biotechnology*, n.2,v.6, p.203-208, 1995.
 37. CYGLER, M.; MORT, J. S. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie*, v.79, n.11, p.645-652, 1997.
 38. LODISHSGV H. F; KONGS N. The secretory pathway is normal in dithiothreitol-treated cells, but disulfide-bonded proteins are reduced and reversibly retained in the endoplasmic reticulum. *The journal of biological chemistry*, v.268, n.27, p.20598-20605, 1993.
 39. COPELAND, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. New York: Wiley-Interscience, 2005.
 40. MATSUMOTO, K, et al. Inhibition of cysteine proteases by peptides containing aziridine-2,3-dicarboxylic acid building blocks. *Biopolymers: Peptide Science*, v.51, p.99-107, 1999.
 41. SCOTT, L. C. et al. Substituent effects on aromatic stacking interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v.5, p.1062-1080, 2007.
 42. RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. Merops: the peptidase database, *Nucleic Acid Research*, v.27, n.1, p.325-331, 1999.
 43. TURK, D. et al. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*. v.378, n.3-4, p.141-150, 1997.

44. KLEMENCIC, I. et al. Cathepsins X and B can Be Differentiated through Their Respective Mono- and Dipeptidyl Carboxypeptidase Activities. *Biochemistry*, v.40, n.9, p.2702-2711, 2000.
45. CYGLER, M., et al Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *the european molecular biology organization journal*, v.15, n.20, p.5492-5502, 1996.