

**"EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
ENZIMAS GUMD E GUMC ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE
DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO PELA BACTÉRIA
XYLELLA FASTIDIOSA"**

OK

CELINA DE PIERI

USP/IFSC/SBI



8-2-001455

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

**São Carlos
2002**

De Pieri, Celina

Expressão, purificação e caracterização das enzimas GumD e GumC envolvidas na produção do exopolissacarídeo da bactéria *Xylella fastidiosa* / Celina De Pieri. – São Carlos, 2002. 85p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, 2002.

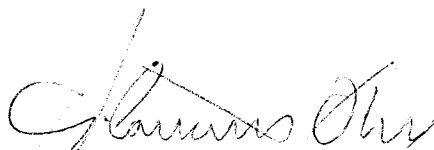
Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

1. GumD e GumC. 2. *Xylella fastidiosa*.

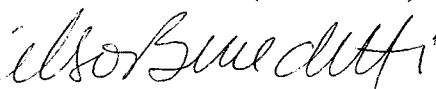
I. Título

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CELINA DE PIERI, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO FÍSICA APLICADA-OPÇÃO FÍSICA BIOMOLECULAR, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 24/06/2002.

COMISSÃO JULGADORA:



Prof. Dr. GLAUCIUS OLIVA(Orientador) – IFSC/USP



Prof. Dr. CELSO EDUARDO BENEDETTI – LNLS



Profa. Dra. HELOISA S. SELISTRE DE ARAÚJO – UFSCar

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram ao meu lado:

Ao meu pai, Geraldo de Pieri (in memoriam), pelo seu belo exemplo de vida. À minha mãe, Dirce Franceschi de Pieri, por todo o seu amor e dedicação. Ao meu irmão Márcio de Pieri, pelo seu apoio incondicional. E ao Alexis Sestini, por todo seu amor e compreensão.

Agradecimentos

- ◆ ***A Deus por todas as coisas que ele me proporciona vivenciar;***
- ◆ ***Aos meus professores de graduação da Universidade Estadual de Maringá, pelo aprendizado na área das Ciências Biológicas;***
- ◆ ***Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, por todo seu apoio e orientação nos meus primeiros passos para o desenvolvimento da pesquisa científica;***
- ◆ ***Ao Dr Márcio Falci, por ter me dado a oportunidade de conhecer o meu orientador Glaucius Oliva;***
- ◆ ***Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva, por proporcionar-me a integração ao Grupo de Cristalografia e pela sua orientação sempre presente;***
- ◆ ***À Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, pelo auxílio e orientação incondicionais no decorrer deste projeto;***
- ◆ ***Ao Prof. Dr. Richard Garratt, pelo auxílio amigo;***
- ◆ ***Ao Prof. Dr. Otávio Thiemann, pela colaboração no aperfeiçoamento deste projeto, sempre disposto a ajudar;***
- ◆ ***Às Prof^{as}. Dra. Leila Maria Beltramini, Dra. Ana Paula Ullian Araújo e Dra. Heloísa Selistre de Araújo, pela colaboração neste projeto;***

- ◆ *Aos secretários do Grupo de Cristalografia, Maria Helena, Jaciara e Fernando por todo apoio na área administrativa;*
- ◆ *À secretária de Pós-Graduação Wladerez A. Gounella Caiado, pela dedicação e carinho com que trata todos os alunos;*
- ◆ *Aos técnicos do Grupo de Cristalografia e Biofísica: Bianca, Susana, Andressa, Bel, Beth, Augusto, Geraldo, Gustavo, Beto e Eli por todo o apoio técnico;*
- ◆ *Aos amigos Valéria e Marcos de Carvalho pelo apoio e atenção prestados durante toda a minha estadia em São Carlos;*
- ◆ *Às minhas grandes amigas Elisangela e Carla pela amizade e convivência e, que, apesar de distantes, sempre me lembro com carinho;*
- ◆ *Aos meus amigos do Grupo de Cristalografia e Biofísica: Andressa, Ana Carolina, André Ambrósio, Antonio, Alécio, Artur, Adriana, Beth, Bianca, Castilho, Ceará, Diet, Dulce, Edson, Eli, Elisandra, Eugênio, Fábio, Fred, Hamilton, Hannes, Humberto, Ivan, João, Marcio Silva, Marcos Navarro, Melissa, Milton, Monique, Ney, Pavão, PH, Patrícia, Peninha, Raquel, Rosa, Sandra Cruz, Sandra Mharta, Stefano, Teresa, Tomich e Wanius, que proporcionaram um convívio agradável no ambiente profissional e social;*

- ♦ *Às minhas amigas de república Elisandra e Sandra pelo carinho e agradável convivência;*
- ♦ *Ao IFSC-USP, pela utilização das estruturas e serviços prestados;*
- ♦ *À FAPESP pelo apoio financeiro para realização deste trabalho;*

ÍNDICE

<i>Dedicatória</i>	<i>iii</i>
<i>Agradecimentos</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>x</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>xi</i>
<i>Tabela de Abreviaturas</i>	<i>xii</i>
<i>Resumo</i>	<i>xiii</i>
<i>Abstract</i>	<i>xix</i>

Capítulo 1 INTRODUÇÃO

Introdução.....	1
1.1) A Clorose Variegada de Citrus.....	2
1.2) <i>Xylella Fastidiosa</i>	2
1.3) A estrutura da goma fastidiana é semelhante a da goma xantana	4
1.4) Objetivos.....	9
1.5) Referências Bibliográficas.....	10

Capítulo 2 TÉCNICAS, MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Parte I – Clonagem dos Genes e Expressão das proteínas	12
2.1) Clonagem,. Uma visão geral.....	12
2.2) Clonagem dos genes gumD e gumC no vetor de expressão pMAL-c2x.....	17
2.3) Expressão das proteínas de fusão Gum-MBP.....	17
2.4) Subclonagem dos genes gumD e gumC nos vetores de expressão pET29a e pKK223-3 respectivamente.....	18
2.4.1) Desenho de Oligonucleotídeos para subclonagem dos genes gumD e gumC.....	18
2.4.2) Subclonagem do gene gumD no vetor de clonagem pCR-TOPO.....	22
2.4.2.1) Adição de Adeninas no inserto gumD para subclonagem no vetor de clonagem pCR-TOPO.....	22
2.4.3) Subclonagem do gene gumC no vetor de clonagem pGEM-T.....	22
2.4.4) Transformação das ligações gumD-pCR4-TOPO e gumC-pGEM-T.....	23
2.4.5) Extração dos DNAs Plasmidiais da gumD-pCR-TOPO e gumC-pGEM-T e ligação dos genes nos seus respectivos vetores de expressão.....	24
2.5) Expressão das Gum's.....	25
2.5.1) Expressão da enzima GumC no vetor pET29a.....	25
2.5.2) Expressão da enzima GumD (Glicosiltransferase I) no vetor pKK223-3.....	25
2.6) Lise das células contendo as enzimas Gum's.....	26
Parte II – Purificação das Proteínas	27
2.7) Métodos Cromatográficos.....	27
2.8) Purificação das proteínas de fusão Gum-MBP.....	31
2.9) Clivagem da fusão GumC-MBP com o Factor Xa.....	31
2.10) Teste de purificação das enzimas GumD e GumC para avaliar a melhor resina.....	32
2.11) Purificação em larga escala da enzima GumD.....	33
Parte III – Caracterização das Proteínas	34
2.12) Sequenciamento de Proteína.....	34
2.13) Focalização Isoelétrica.....	36
2.14) Determinação da Massa Molecular.....	37
2.15) Medidas de Dicroísmo Circular (CD – Circular Dichroism).....	37

2.15.1) Estimativa da estrutura secundária de proteínas.....	40
2.16) Medidas de Fluorescência.....	41
2.17) Caracterização da proteína GumC-MBP através do Imunoblotting.....	42
2.18) Produção de anticorpos anti-GumC-MBP em camundongos.....	44
2.19) Referências Bibliográficas.....	45

Capítulo 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES – ENZIMA GUMD

3.1) Experimentos de Expressão e Solubilidade da proteína GumD no vetor pMAL-c2x.....	46
3.2) Experimento de Purificação da GumD-MBP.....	48
3.3) Subclonagem do gene gumD no vetor de clonagem pCR-TOPO.....	50
3.4) Expressão da GumD (Glicosiltransferase I).....	52
3.5) Solubilidade da GumD.....	53
3.6) Teste de Purificação da GumD.....	54
3.7) Purificação em larga escala da enzima GumD.....	55
3.8) Caracterização da Proteína GumD.....	56
3.8.1) Sequenciamento do gene gumD.....	56
3.8.2) Caracterização da proteína GumD através do sequenciamento da região N-terminal.....	59
3.8.3) Determinação do ponto Isoelétrico (pI) da enzima GumD.....	59
3.8.4) Determinação da Massa Molecular da enzima GumD.....	62
3.8.5) Análise da proteína GumD quanto ao seu enovelamento por Dicroísmo Circular.....	64
3.8.6) Análise de Fluorescência da proteína GumD.....	66
3.9) Resumo dos resultados obtidos nos estudos realizados com a enzima GumD.....	67
3.10) Referências Bibliográficas.....	69

Capítulo 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES – GUMC

4.1) Experimentos de Expressão e Solubilidade da GumC no vetor pMAL-c2x.....	70
4.2) Experimento de Purificação da GumC-MBP e teste de clivagem com o Factor-Xa.....	71
4.3) Subclonagem do gene gumC no vetor de clonagem pGEM-T.....	76
4.4) Caracterização do gene gumC.....	77
4.5) Expressão da proteína GumC no vetor pET29a.....	78
4.6) Produção de anticorpo anti-GumC-MBP em camundongos.....	80
4.7) Resumo dos resultados obtidos nos estudos da enzima GumC.....	83

Capítulo 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	84
--------------------------------------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Sintomas da CVC: folhas e frutos da laranja doce tipo “pera”(fotos de Marcos A. Machado e Francisco Laranjeira, extraídas do site: www.fundecitrus.com.br	2
Figura 1.2 – Microscopia eletrônica da <i>Xylella fastidiosa</i> infectando o xilema de uma laranja (fotos de Marcos A. Machado e Francisco Laranjeira, extraída do site: www.fundecitrus.com.br	3
Figura 1.3 - Mecanismo proposto de biossíntese da goma fastidiana (modificado segundo Silva <i>et al</i> , 2001).....	7
Figura 2.1 - Mapa do vetor pMAL-c2X mostrando a região do polylinker e o sítio de clivagem do Factor Xa (figura extraída do pMAL Protein Fusion and Purification System).....	17
Figura 2.2 - Mapa do vetor pKK223-3 mostrando o “polylinker” (figura extraída do catálogo da Amersham Pharmacia Biotech).....	19
Figura 2.3 - Esquema mostrando o vetor pET29a (figura extraída do site www.novagem.com).....	20
Figura 2.4 – Esquema mostrando a escala de tempos e temperaturas utilizadas na PCR.....	21
Figura 2.5 – Esquema de purificação por cromatografia de afinidade (coluna de amilose).....	29
Figura 2.6 – Luz polarizada linearmente resolvida em duas componentes circulares à direita e à esquerda.....	38
Figura 2.7 – Luz plano polarizada ao passar pela amostra que absorve diferentemente duas componentes circulares à direita e à esquerda.....	39
Figura 2.8 – Esquema de interação Antígeno-Anticorpo.....	43
Figura 3.1 - Etapas de expressão e solubilidade da GumD-MBP analisadas em gel SDS-PAGE a 15%..	47
Figura 3.2 – Perfil cromatográfico da coluna de amilose: purificação da proteína de fusão GumD-MBP	49
Figura 3.3 – Etapa de purificação da GumD-MBP analisada em gel SDS-PAGE a 10%.....	50
Figura 3.4 – Clones do gene gumD no vetor de clonagem TOPO-TA analisados em gel de agarose a 0.8%.....	51
Figura 3.5 – DNA plasmidial (gumDpKK223-3) antes e após a clivagem com as enzimas de restrição, analisado em gel de agarose a 0.8%.....	52
Figura 3.6 – Teste de expressão da proteína GumD em células de <i>E. coli</i> BL21 induzidas com IPTG a 1mM (20°C) analisado em gel SDS-PAGE a 15%.....	53
Figura 3.7 – Teste de solubilidade da enzima Glicosiltransferase I analisado em gel SDS-PAGE a 15%.	54
Figura 3.8 – Etapas da purificação da enzima GumD analisadas em gel SDS-PAGE a 15%.....	56
Figura 3.9 – Estratégia do alinhamento das extremidades 5’ e 3’ do gene gumD nos vetores pMALc-2x, pCR4-TOPO e pKK223-3 produzido pelo programa SeqMan.....	57
Figura 3.10 – Seqüência de nucleotídeos do gene gumD e sua tradução em aminoácidos.....	58
Figura 3.11 – Focalização isoeétrica da enzima GumD obtida pelo sistema Phast System	60
Figura 3.12 – Gráfico de regressão linear com o eixo y sendo Log pH e eixo x distância do cátodo (mm).....	61
Figura 3.13 – Perfis cromatográficos da enzima GumD e dos padrões de massa molecular.....	63
Figura 3.14 – Curva de calibração da coluna de gel filtração Superdex-200, utilizando proteínas com massas moleculares conhecidas.....	63
Figura 3.15 – Espectro de dicroísmo circular da enzima GumD com varredura de 195 a 250nm.....	65
Figura 3.16 – Espectro de fluorescência da enzima GumD, mostrando emissão máxima do triptofano em 330nm.....	67
Figura 4.1 – Purificação parcial da proteína de fusão GumC-MBP em coluna de amilose analisada em gel SDS-PAGE a 15%.....	72
Figura 4.2 – Clivagem da proteína de fusão GumC-MBP com o Factor-Xa (1:100) analisada em gel SDS-PAGE a 10%.....	73
Figura 4.3 – Expressão e solubilidade da proteína de fusão GumC-MBP na presença de Triton X-100 analisadas em gel SDS-PAGE a 15%.....	74
Figura 4.4 – Purificação parcial da proteína de fusão GumC-MBP em coluna de amilose após adição de 0,5% de Triton X-100 no tampão de lise celular, analisada em gel SDS-PAGE a 15%.....	74

Figura 4.5 - Teste de clivagem da proteína de fusão GumC-MBP com o Factor Xa (1:100) na presença de 0.5% de Triton X-100.....	75
Figura 4.6 – Membrana de nitrocelulose mostrando a reação antígeno GumC-MBP com o anticorpo anti-MBP.....	76
Figura 4.7 –Gene gumC e o vetor pET29a digeridos com as enzimas <i>Hind</i> III e <i>Nde</i> I, analisados em gel de agarose 0.8%.....	77
Figura 4.8 – Estratégia de alinhamento das extremidades 5' e 3' do gene gumC nos vetores pMALc-2x e pET29a produzido pelo programa SeqMan.....	78
Figura 4.9 –Expressão da proteína GumC em células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) induzidas com IPTG 0.3mM a 20°C por 20hs, analisada em gel SDS-PAGE a 15%.....	79
Figura 4.10 –Teste de expressão utilizando 3 cepas diferentes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3, DE3-RIL e DE3-RP) analisado em gel SDS-PAGE a 15%.....	80
Figura 4.11 – Membrana de nitrocelulose mostrando a titulação do anticorpo anti-GumC-MBP.....	82
Figura 4.12 – Reação de Western-blotting mostrando as reações dos anticorpos anti-GumC-MBP e anti-MBP com o antígeno GumC-MBP.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –Enzimas de restrição e seqüências de clivagem (tabela extraída do livro O DNA Recombinante, Watson <i>et al.</i> , 1997).....	13
Tabela 3.1 – Padrões de massa molecular.....	62
Tabela 3.2 – Resultados de desconvolução do espectro de CD da enzima GumD.....	66
Tabela 3.3 – Resultados da predição de estruturas secundárias da enzima GumD usando o programa Gor.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Arg – Arginina
BCIP – 5-bromo-4 cloro-3 indolil fosfato
CAPS – 3-cyclohexylamino-1 butanesulfonic acid
CD – Dicroísmo Circular
Corante Ponceau - 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo) phenylazo]-2;7-naphthalenedisulfonic acid
CVC – Clorose Variegada de Citrus
dNTP – Desoxirribonucleicos
ddNTP – Desoxirribonucleicos que não apresentam a hidroxila no carbono 3
D.O. – Densidade Ótica
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EPS – Exopolissacarídeo
Factor-Xa – protease de plasma bovino que cliva após a Arg na seqüência de aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg
Glu – Glutamina
Gly – Glicina
Hi Trap ANX Sepharose – Coluna de troca aniônica fraca
Hi Trap DEAE Sepharose Fast Flow – Coluna de troca aniônica fraca
Hi Trap – CM Sepharose Fast Flow – Coluna de troca catiônica fraca
Hi Trap IEX – Coluna cromatográfica trocadora de íons
Hi Trap Q Sepharose Fast Flow – Coluna de troca aniônica forte
Hi Trap Q XL – Coluna de troca aniônica forte
Hi Trap SP Sepharose – Coluna de troca catiônica forte
Hi Trap SP XL – Coluna de troca catiônica forte
Hs – Horas
IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosida
Ile – Isoleucina
KDa – QuiloDalton
LB – Luria Bertani
Mes – Ácido 2-Morfolinoetanosulfônico monohidratado
Min – Minuto
MW – “ Mass Weight” , massa molecular
NTB – Nitroblue de tetrazólio
pb – Pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pI – Ponto isoelétrico
PVDF – “Polivinylidene Fluoride”
RMS – Desvio médio quadrático
rpm – Rotações por minuto
SDS- Detergente dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio
Stop codon – trinca de nucleotídeos terminador
TAE – tampão composto por Tris acetato e EDTA
TBS – “Tris buffered saline”
Tris – Hidroximetil-aminometano
Triton X-100 - t-octylphenoxyethoxyethanol
Tween-20 - polyoxyethylenesorbitan monolaurate

RESUMO

A Clorose Variegada de Citrus (CVC) é uma doença que vem atingindo grandes plantações de laranjas no Brasil e outros países como Estados Unidos, França e Espanha. O principal efeito da doença é o surgimento de manchas amarelas nas folhas que progridem para toda a extensão levando-a à necrose. Os frutos são pequenos, apresentam casca dura, sendo impróprios para o consumo. O agente causador da CVC é a bactéria *Xylella fastidiosa* que é limitada ao xilema. A bactéria é transmitida por insetos conhecidos como “cigarrinhas” que se alimentam na seiva do xilema. Esta bactéria apresenta em seu genoma um Operon contendo 9 genes (B,C,D,E,F,H,J,K,M) responsáveis pela biossíntese do exopolissacarídeo denominado goma fastidiana, que pode estar envolvido na sua patogenicidade. No presente trabalho, realizou-se estudos com as enzimas GumD (uma enzima glicosiltransferase I que faz a primeira adição de glicose-1-fosfato ao lipídeo prenol) e GumC (que provavelmente está envolvida na etapa de polimerização e/ou secreção do polissacarídeo formado através da membrana da bactéria), com o objetivo de contribuir para melhor entendimento da via biossintética. O gene gumD, que codifica a enzima GumD, foi clonado nos vetores de expressão pMAL-c2x e pKK223-3. A proteína GumD foi purificada através das cromatografias de troca aniônica e filtração a gel. O peso molecular e o pI da enzima foram determinados usando respectivamente a técnica de filtração a gel e o sistema Fast de eletroforese. A enzima foi caracterizada quanto ao seu enovelamento através da técnica de Dicroísmo Circular, apresentando um espectro característico de estrutura secundária enovelada, composta predominantemente por α -hélices. O gene gumC, que codifica para a proteína GumC, foi clonado nos vetores de expressão pMAL-c2x (no qual a enzima é expressa em fusão com a proteína MBP - Maltose Binding Protein) e pET29a (a proteína é expressa sem fusão). A proteína em fusão GumC-MBP foi parcialmente pura através da coluna de amilose e foi caracterizada através da técnica de Immunoblotting. A enzima GumC expressa no vetor pET29a está em fase de purificação. Anticorpos anti-GumC-MBP foram produzidos em camundongos e serão utilizados como uma forma de caracterizar a proteína GumC expressa sem fusão. Estudos estruturais destas enzimas poderão trazer informações fundamentais para o conhecimento da via biossintética, assim como para o desenvolvimento de inibidores específicos.

ABSTRACT

The Citrus Variegated Chlorosis (CVC) is a serious disease of orange trees in countries like Brazil, USA, France and Spain. Typical disease symptoms include conspicuous variegations with chlorotic areas on the upper side and small necrotic lesions on the lower side of the leaves. The affected fruits are smaller, hardened and without commercial value. Citrus variegated chlorosis is caused by *Xylella fastidiosa*, which is a xylem-limited bacterium. *X. fastidiosa* is transmitted by specific sharpshooter leafhoppers when the insect feeds on the xylem sap. *X. fastidiosa* has a nine-gene operon (B, C, D, E, F, H, J, K, and M genes) responsible for the biosynthesis of exopolysaccharides, denoted fastidian gum, which can be involved in its pathogenicity. GumD glycosyltransferase enzyme adds the first sugar, glucose-1-phosphate, to the prenol lipid. GumC enzyme probably is involved in the polymerization and/or exportation of the fastidian gum through the membrane of the bacterium. Studies were done on the GumD and GumC enzymes with the aim of getting a better understanding of the exopolysaccharide biosynthetic pathway. The gumD gene was cloned into the pMAL-c2x and pKK223-3 expression vectors, and GumD protein was purified through ion exchange and size exclusion chromatography. Then GumD molecular mass and pI were determined using, respectively, size exclusion chromatography and electrophoresis. In addition, according to circular dichroism spectroscopy, GumD prevalent secondary structure is α -helix. On the other hand, the gumC gene was cloned in two expression vectors: pMAL-c2x (the protein is expressed in fusion with Maltose Binding Protein – MBP) and pET29a (the protein is expressed without fusion in our strategy). GumC-MBP, the protein in fusion, was partially purified using an amylose column and the fusion between GumC and MBP was confirmed with immunoblotting technique. Purification trials of GumC enzyme expressed in pET29a are in course. Anti-GumC-MBP antibodies were already produced in mice and they will be used to characterize the GumC protein expression without fusion. Structural studies of GumD and GumC enzymes will provide information about the fastidian gum biosynthetic pathway, as well as to the development of specific inhibitors.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos grandes produtores de laranja a nível mundial e consequentemente, é um dos maiores produtores de suco concentrado dessa fruta. Esse fato é muito relevante para a economia do país, visto que a exportação de suco de laranja tem parcela significativa no equilíbrio da balança comercial brasileira, representando aproximadamente 10% das divisas geradas pelas exportações (US\$ 1 bilhão dos US\$10 bilhões anuais) (www.laranjabrasil.com). Igualmente importante para o país é o número de postos de trabalho gerados pela indústria de processamento de suco de laranja. A estimativa é que mais de 400.000 pessoas estejam empregadas nesse ramo da economia espalhadas por 204 cidades do território nacional (www.fundecitrus.com.br).

É uma indústria grande, mas grande também são seus problemas. Os produtores convivem com doenças e pragas que podem comprometer uma safra toda ou até mesmo toda a plantação. No Brasil as doenças que mais atacam a plantação de cítricos são o Cancro Cítrico e a Clorose Variegada de Citros (CVC) também conhecida como 'amarelinho'. Países como Estados Unidos, França e Espanha enfrentam problemas semelhantes e buscam saídas empregando recursos humanos e financeiros para elimina-los.

As duas doenças citadas são causadas por bactérias que se alojam no xilema da laranjeira, elemento responsável por conduzir a água da raiz até os ramos. O agente patogênico da CVC é a bactéria *Xylella Fastidiosa*. Outras linhagens de *Xylella* causam doenças em diversos tipos de plantações como cafezal, videira, pessegueiro e pereira (Beretta *et al.*, 1996; Mehta and Rosato, 2001).

1.1) - A Clorose Variegada de Citrus

A doença provocada pela *Xylella Fastidiosa* foi identificada no Brasil em 1987 e é considerada como a pior que surgiu nos últimos anos. As áreas mais afetadas pela doença são o Triângulo Mineiro e o Norte e o Nordeste de São Paulo. Segundo recente levantamento da Fundecitrus (Fundo de defesa da citricultura) nos próximos três anos o Estado de São Paulo deverá perder 42 milhões de pés de laranja (o equivalente a 24% do total de árvores no Estado) devido ao amarelinho. Em 2001, cerca de 10 milhões de árvores foram erradicadas, causando prejuízo de cerca de R\$ 650 milhões.

O principal efeito da doença CVC é o surgimento de manchas amarelas nas folhas que progridem para toda a extensão levando-a à necrose (fig.1.1). Os frutos amadurecem mais cedo, produzindo, portanto, menor quantidade de suco por fruto. Ocorre também um endurecimento da casca das laranjas doentes o que pode danificar as máquinas de processamento de suco (De Negri, 1990; Malavolta *et al.*, 1990).

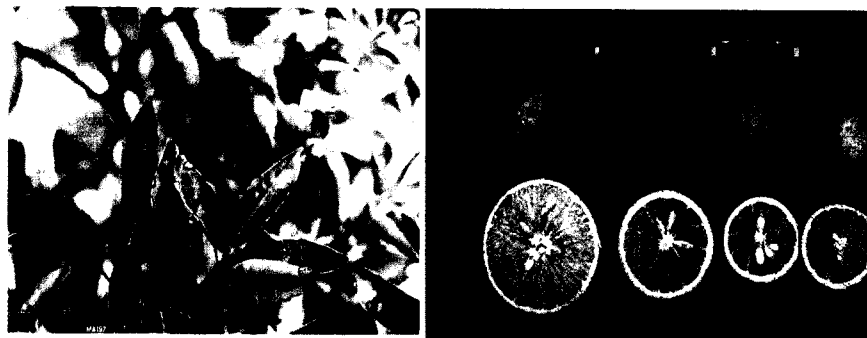


Figura 1.1) – Sintomas da CVC: folhas e frutos da laranja doce tipo “pera” (fotos de Marcos A Machado e Francisco Laranjeira, extraídas do site: www.fundecitrus.com.br).

1.2) – *Xylella fastidiosa*

A bactéria *Xylella fastidiosa*, é limitada ao xilema (figura 1.2), elemento condutor de água nas plantas. Insetos vetores, comumente conhecidos como

cigarrinhas, contendo aparelho bucal perfurador/sugador que se alimentam na seiva do xilema, transmitem a bactéria de plantas doentes para plantas saudáveis. O mecanismo pelo qual a bactéria *Xylella fastidiosa* causa a doença CVC ainda não é totalmente conhecido.

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

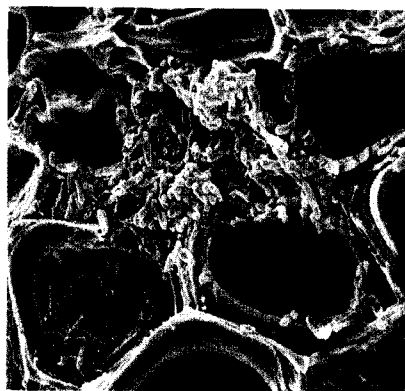


Figura 1.2 - Microscopia eletrônica da *Xylella fastidiosa* infectando o xilema de uma laranjeira (fotos de Marcos A Machado e Francisco Laranjeira, extraídas do site: www.fundecitrus.com.br).

Diversos fatores têm sido associados com patogenicidade de bactérias fitopatogênicas, incluindo a produção de enzimas extracelulares, produção de toxinas e fitohormônios e produção de exopolissacarídeos (EPS) (Agrios, 1988). Em diversas bactérias, as moléculas de exopolissacarídeos (EPS) são relacionadas à patogenicidade e estão associadas à morte celular, devido a oclusão dos vasos do xilema, à lesões de mucóides e na promoção da interação planta-bactéria, o que favorece o crescimento da bactéria nos tecidos da planta (Chatterjee and Vidaver, 1985).

A bactéria *Xylella fastidiosa* foi a primeira bactéria fitopatogênica a ter seu genoma completamente sequenciado por diversos laboratórios de pesquisa do Estado de São Paulo com a ajuda financeira da FAPESP e da Fundecitrus, com o

objetivo principal de busca por novos mecanismos de acabar com a CVC dos laranjais (Simpson *et al.*, 2000).

Através da análise do genoma, por técnicas de bioinformática, os genes da *Xylella fastidiosa* podem ser estudados e correlacionados a genes de outras bactérias. A análise seqüencial do genoma de uma região de aproximadamente 12 Kb de DNA revelou a existência de 22 genes que codificam para a síntese de proteínas regulatórias e enzimas envolvidas na síntese de um exopolissacarídeo (EPS) similar a goma xantana, produzida pela *Xanthomonas campestris* (Silva *et al.*, 2001). Esta é a bactéria causadora do apodrecimento de crucíferas, como repolho, rabanete e nabo (Williams, 1980) e produz um polissacarídeo extracelular chamado goma xantana, que, devido a suas propriedades reológicas tais como alta viscosidade e pseudoplasticidade e estabilidade em condições extremas, é muito utilizado em indústrias de alimentos e agricultura como emulsificante, espessante e estabilizante (Baird, 1983; García-Ochoa *et al.*, 2000).

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

A estrutura da goma xantana, que tem sido bastante estudada (Melton *et al.*, 1976; Jansson *et al.*, 1975), consiste de um polissacarídeo β -1,4-D-glicose com uma cadeia lateral com um trissacarídeo composto de uma manose, uma molécula de ácido glicurônico e uma segunda manose. Os resíduos de manose são acetilados e piruvilados em sítios específicos mas em diferentes graus (Stankowski *et al.*, 1993; Cadmus *et al.*, 1976; Jansson *et al.*, 1975). Estudos mostraram que a subunidade de pentassacarídeo é primeiro sintetizada, ligada a uma molécula de lipídeo carreador (difosfato prenol), de maneira seqüencial a partir de precursores D-glicose, D-manose, ácido glicurônico, acetil coenzima A e fosfoenolpiruvato (Ielpi *et al.*, 1983;

1981; 1981; Harding *et al.*, 1987). As unidades de pentassacarídeos são subseqüentemente polimerizadas à um polissacarídeo de alto peso molecular e transportadas para fora da célula. Portanto, a biossíntese de goma xantana é um processo complexo e preciso, controlado por múltiplas enzimas (Sutherland, 1977). Dois grupos de genes estão envolvidos na biossíntese de goma xantana: os genes xpsIII, xpsIV e xpsVI, responsáveis pela síntese da glicose, ácido glicorônico e manose, respectivamente (Köplin *et al.*, 1992; Hötte *et al.*, 1990; Harding *et al.*, 1987) e os genes gum ou xpsI, que codificam as enzimas envolvidas na polimerização do pentassacarídeo ligado ao poliprenol e secreção do polímero para o meio extracelular (Katzen *et al.*, 1998). Os genes gum são agrupados em um operon (operon Gum) constituído por um conjunto de 16 kb contendo 12 genes designados gum B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L e M. O gene gum D codifica a enzima Glicosiltransferase I, responsável pela transferência da glicose-1-fosfato ao fosfato poliprenol para formar o monossacarídeo-lipídeo; gumM codifica a enzima Glicosiltransferase II que catalisa a adição da segunda glicose para formar o dissacarídeo-lipídeo; gumH codifica a enzima Glicosiltransferase III que catalisa a adição da primeira manose formando o trissacarídeo-lipídeo; gumK codifica a enzima Glicosiltransferase IV que catalisa a adição do ácido glicorônico para formar o tetrassacarídeo-lipídeo; gumI que codifica a enzima Glicosiltransferase V que catalisa a adição da segunda molécula de manose para formar o pentassacarídeo-lipídeo; gumF codifica a enzima acetiltransferase que catalisa a acetilação da manose interna; gumG que codifica a enzima acetiltransferase II que catalisa a acetilação da manose externa; gumL que codifica a enzima piruvato cetal transferase que catalisa a piruvilação da manose externa; gumB, C e E estão envolvidos na polimerização e secreção do polissacarídeo através da membrana da bactéria; gumJ possivelmente

esteja envolvido em um estágio paralelo de polimerização e secreção do polissacarídeo.

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

Portanto, é possível que a exemplo do que ocorre com a *Xanthomonas*, o Operon Gum de *Xylella fastidiosa* esteja diretamente envolvido na patogenicidade causando a Clorose variegada de citros (CVC). A análise seqüencial do Operon Gum da *Xylella fastidiosa*, uma região de aproximadamente 12 Kb de DNA do cosmídeo 7A2 do Projeto Genoma da *Xylella fastidiosa*, revelou a presença de um operon homólogo ao Operon Gum da *Xanthomonas campestris* (Silva *et al.*, 2001). O Operon Gum da *Xylella fastidiosa* apresenta 9 genes (B, C, D, E, F, H, J, K, M), sendo ausentes os genes *gumI*, G e L, que codificam as enzimas Glicosiltransferase V, acetiltransferase II e Piruvato cetal transferase, respectivamente, sendo ausentes em outras regiões do genoma. Todos os genes relatados para a síntese de moléculas precursoras necessárias como substratos para a atividade das enzimas que codificam para o operon gum foram encontrados no genoma da *Xylella fastidiosa*. O exopolissacarídeo produzido através de reações catalisadas pelas enzimas do Operon gum tem sido chamado de goma fastidiana. Na figura 1.3 estão esquematizadas todas as etapas do mecanismo de produção da goma fastidiana proposto por Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 2001).

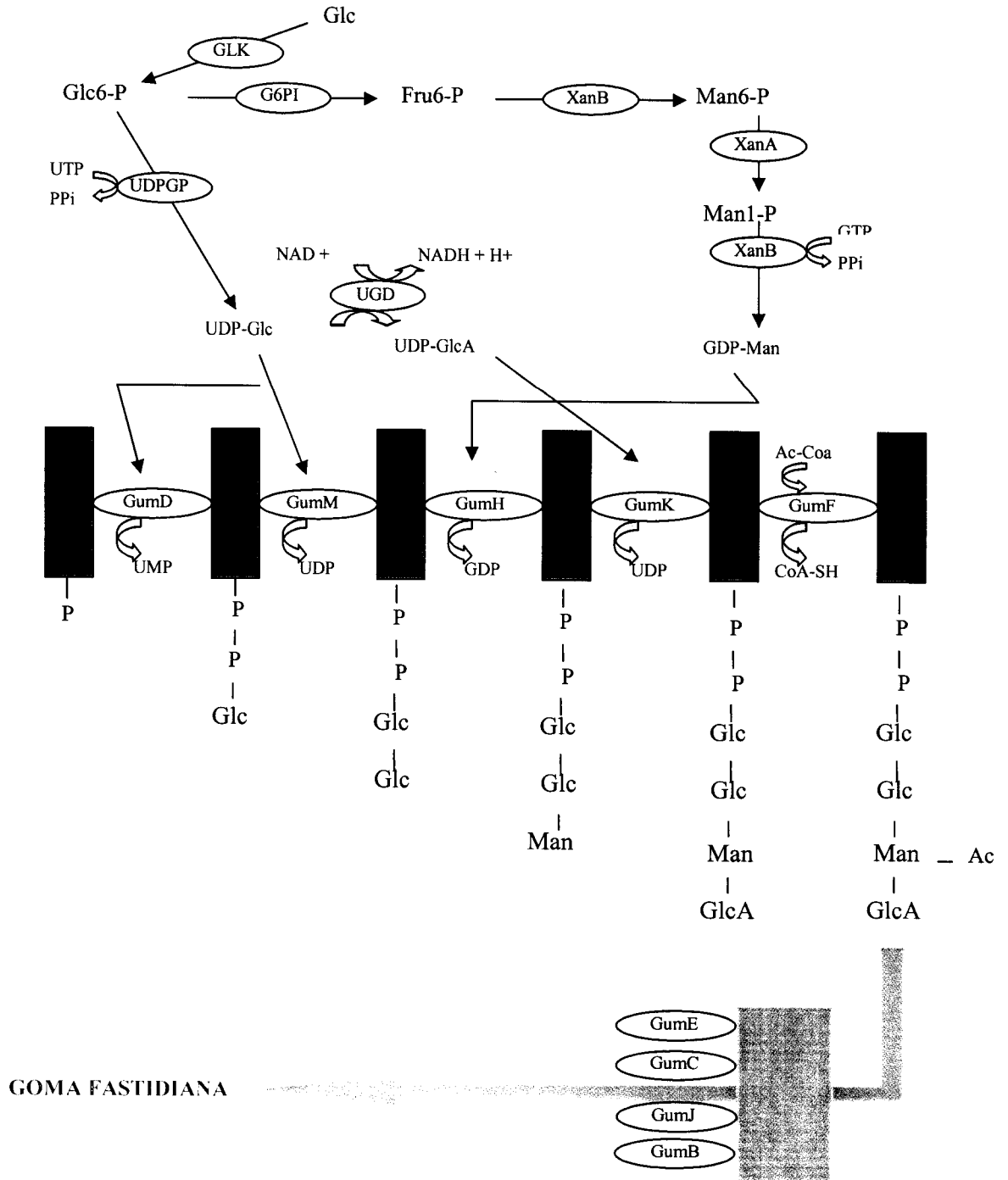


Figura 1.3) – Mecanismo proposto de biosíntese da goma fastidiana (modificado segundo Silva *et al*, 2001). As enzimas estão mostradas em ovas amarelos: glicosiltransferases I, II, III e IV (GumD, M, H e K respectivamente); acetiltransferase I (GumF), as proteínas GumE, C, J e B relacionadas como prováveis enzimas envolvidas no processo de polimerização e transporte. As setas para as reações sequenciais que adicionam açúcares ao poliprenol (lipídio carreador esquematizado em retângulo azul) não são mostradas. Glc, D-glicose; GlcA, D-ácido glicurônico; Man, D-manose; Ac, ester acetil; PPi, pirofosfato.

Estudos recentes (Patrícia Brant Monteiro, comunicação pessoal) mostraram que a *X. fastidiosa* produz a goma fastidiana e outros estudos mostraram que o xilema das plantas infectadas está bloqueado, o que impede o fluxo normal de água (Machado *et al.*, 2001).

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

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

1.4) - Objetivos

No presente trabalho nos propomos a estudar duas enzimas envolvidas na via biossintética da goma fastidiana: a Glicosiltransferase I (GumD), enzima que cataliza a primeira adição de glicose, e GumC, enzima envolvida na secreção e/ou polimerização da goma.

Estas enzimas foram escolhidas dentre as nove pois estudos mostraram que, com *X. campestris* ocorre uma diminuição na virulência da bactéria com a deleção do gene gumD ou alterações nos últimos estágios da biossíntese (secreção e polimerização) da goma xantana (Katzen *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1997).

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Subclonagem dos genes gumD (que codifica a síntese da enzima GumD) e gumC (que codifica a síntese da enzima GumC) em vetores de expressão;
- Expressão e purificação das enzimas GumD e GumC;
- Caracterização das enzimas GumD e GumC.

1.5) – Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3o edição. Editora Academic Press, Inc. San Diego, Califórnia, EUA 1988.
- BAIRD, J.K.; SANDFORD, P.A. and COTTRELL, L.W. Industrial application of some new microbial polysaccharides. **Bio/Technology**, v.1 p.778-783, 1983.
- BERETTA, M.J.G.; HAKAKAVA, R. and CHAGAS, C.M. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. **Plant Dis.**v.80, p.821-821, 1996.
- CADMUS, M.C.; ROGOVIN, S.P.; BURTON, K.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A. and JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Can J. Microbiol.** v.22, p.942-948, 1976.
- CHATEERJEE, A.K. and VIDAVER, A.K. Genetics of pathogenicity factors: application to phytopathogenic bacteria. In D.S. Ingram and P.H. Williams, **Advances in plant pathology**, vol.4, Academic Press, Inc., Ltd., London, Inglaterra, 1985.
- CHOU, F.; CHOU, H.; LIN, Y.; YANG, B.; LIN, N.; WENG, S. and TSENG, Y. The *Xanthomonas campestris gumD* Gene Required for Synthesis of Xanthan Gum Is Involved in Normal Pigmentation and Virulence in Causing Black Rot **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** v.233, p.265-269, 1997.
- DE NEGRI, J.D. Clorose variegada de citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais. **Com. Tec.** No. 82, Ext. Rural, CATI, Campinas 1990.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A. and GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotech. Advances** v. 18, p. 549-579, 2000.
- HARDING, N.E.; CLEARY, J.M.; CABANAS, D.K.; ROSEN, I.G. and KANG, K.S. Genetic and Physical Analyses of a Cluster of Genes Essential for Xanthan Gum Biosynthesis in *Xanthomonas campestris* **J. Bacteriol.** v. 169, p. 2854-2861, 1987.
- HOTTE, B.; RATH-ARNOLD, I.; PUHLER, A. and SIMON, R. Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **J Bacteriol.** v.172(5), p.2804-2807, 1990.
- IELPI, L.; COUSO, R. and DANKERT, M. Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid. **Biochem Biophys Res Commun.** v.102(4), p.1400-1408, 1981.
- IELPI, L.; COUSO, R. and DANKERT, M Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. **FEBS Lett.** V.130(2), p.253-256, 1981.
- IELPI, L.; COUSO, R. and DANKERT, M. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. **Biochem. Int.** v.6, p.323-333, 1983.
- JANSSON, P.E.; KENNE, L. and LINDBERG, B. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris* **Carbohydr Res.** v.45, p.275-282, 1975.
- KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; IELMINI, V.; BECKER, A.; PUHLER, A. and IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris gum* Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence **J. bacteriol.** v. 180, p.1607-1617, 1998.
- KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G. and PUHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes Are Involved in UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis **J. Bacteriol.** v.174, p. 191-199, 1992.

- MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; MEDINA, C.L.; SOUZA, R.P.; RIBEIRO, R.V.; SILVA, J.A.B. and STUCHI, E. Anais do I Simpósio Genoma Funcional da *Xylella fastidiosa*- Serra Negra, 2001.
- MALAVOLTA, E. Nova anomalia dos citros: estudos preliminares . **Laranja Cordeirópolis**, v.11, no.1, p. 15-18, 1990.
- MELTON, L.D.; MINDT, L.; REES, D.A. and SANDERSON, G.R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydr Res.** v.46(2), p.245-257, 1976.
- MEHTA, A. and ROSATO, Y.B. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.** v.51, p.311-318, 2001.
- SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A. and ARRUDA, P. Fastidian gum: the *xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity **FEMS Microbiol. Lett.** v. 203, p.165-171, 2001.
- SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature.** v.406(6792), p.151-157, 2000.
- SUTHERLAND, I.W. Bacterial exopolysaccharides – their nature and production. Surface carbohydrates of the prokariotic cell. **Academic Press, Inc.**, New York, 1977.
- STANKOWSKI, J.D.; MUELLER, B.E. and ZELLER, S.G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydr Res.** v.17, p.241:321-61993, 1993.
- WILLIAMS, P.H. Black rot: continuing threat to world crucifers. **Plant. Dis.** V.64, p.736-774, 1980.

TÉCNICAS, MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Este capítulo será dividido em 3 partes: Clonagem dos genes e expressão das proteínas, purificação e caracterização das proteínas.

PARTE I – CLONAGEM DOS GENES E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

2.1) - CLONAGEM, UMA VISÃO GERAL

A ciência teve um grande desenvolvimento após o início dos estudos de Biologia Molecular os quais permitem a obtenção de quantidades significativas de proteína através da técnica de DNA recombinante.

Esta técnica foi desenvolvida por Herbert Boyer e Stanley Cohen em 1973, e se baseia em transplantar um gene de um organismo para o outro, formando organismos recombinantes (Cohen *et al.*, 1973). O DNA recombinante é elaborado fora da célula viva com o uso de enzimas chamadas de restrição, que cortam o DNA em determinados sítios, e de enzimas chamadas “ligases”, que inserem o pedaço cortado do DNA (inserto) no DNA vetor, ou seja, o DNA do plasmídeo ou viral que será capaz de entrar numa célula ou num microorganismo hospedeiro. Uma vez que o DNA estranho entra no hospedeiro, passa a ser chamado organismo recombinante.

As enzimas de restrição fragmentam o DNA em pequenos pedaços, em sítios bem específicos, determinados por uma sequência de DNA de quatro bases ou de comprimento maior. Estas sequências de DNA são palindrômicas (tabela 2.1).

Após a utilização das enzimas de restrição para a digestão do inserto, as mesmas enzimas de restrição serão utilizadas para a digestão do vetor clonante (plasmídeo).

MICROORGANISMOS	ABREVIACÃO DA ENZIMA	SEQUÊNCIA	NOTAS*
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5'... G G · C C ...3' 3'... C C · G G ...5'	1
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5'... T · C G A ...3' 3'... A G C · T ...5'	2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	5'... G C G · C ...3' 3'... C ↓ G C G ...5'	3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5'... C · T N A G ...3' 3'... G A N T · C ...5'	4
<i>Moravella bovis</i>	<i>MboII</i>	5'... G A A G A (N) ₄ ...3' 3'... C T T C T (N) ₄ ...5'	5
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5'... G A T · A T C ...3' 3'... C T A · T A G ...5'	1
	<i>EcoRI</i>	5'... G · A A T T C ...3' 3'... C T T A A · G ...5'	2
<i>Providencia stuarti</i>	<i>PstI</i>	5'... C T G C A · G ...3' 3'... G A · C G T C ...5'	3
<i>Microcoleus</i>	<i>MstII</i>	5'... C C · T N A G G ...3' 3'... G G A N T · C C ...5'	4
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	<i>NotI</i>	5'... G C · G G C C G C ...3' 3'... C G C C G · G C G ...5'	6

* Notas
1. A enzima produz extremidades cegas (*blunt ends*).
2. A fita única é a fita 5'.
3. A fita única é a fita 3'.
4. O par de bases N pode ser qualquer par: purina ou pirimidina.
5. A enzima não corta dentro da sequência de reconhecimento, mas em qualquer sequência que se encontre distante a oito nucleotídeos do sítio 3' de reconhecimento.
6. *NotI* possui uma sequência de reconhecimento de oito bases e corta, muito raramente, o DNA de mamíferos.

Tabela 2.1 –Enzimas de restrição e sequências de clivagem (tabela extraída do livro O DNA Recombinante, Watson *et al*, 1997).

Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA que se replicam espontaneamente e têm fita dupla. Sua função entre outras é de transportar o inserto para dentro da célula hospedeira onde ele será replicado. Vetores de clonagem possuem elementos genéticos, tais como genes de resistência a antibióticos que podem ser úteis para selecionar as células que adquiriram o plasmídeo, promotores que permitem a regulação da expressão da proteína recombinante e sítios de multiclonagem (polilynker), regiões do DNA que têm sítios sobrepostos de enzima de restrição que podem ser usados para inserir o pedaço cortado de DNA (inserto) com várias enzimas (Watson *et al.*, 1997).

A ligação do gene a ser clonado ao plasmídeo (vetor de clonagem) é catalisada por enzimas específicas, denominadas ligases, que formam uma ponte fosfodiéster nas extremidades das fitas de DNA.

Em bactérias, o processo de introdução do DNA recombinante (plasmídeo e gene de interesse) em organismo hospedeiro é denominado transformação e geralmente é feito por eletroporação ou choque térmico (Cox *et al.*, 2000).

A avaliação dos processos de clonagem é feita através de técnicas como eletroforese em gel de agarose, a PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenciamento de DNA.

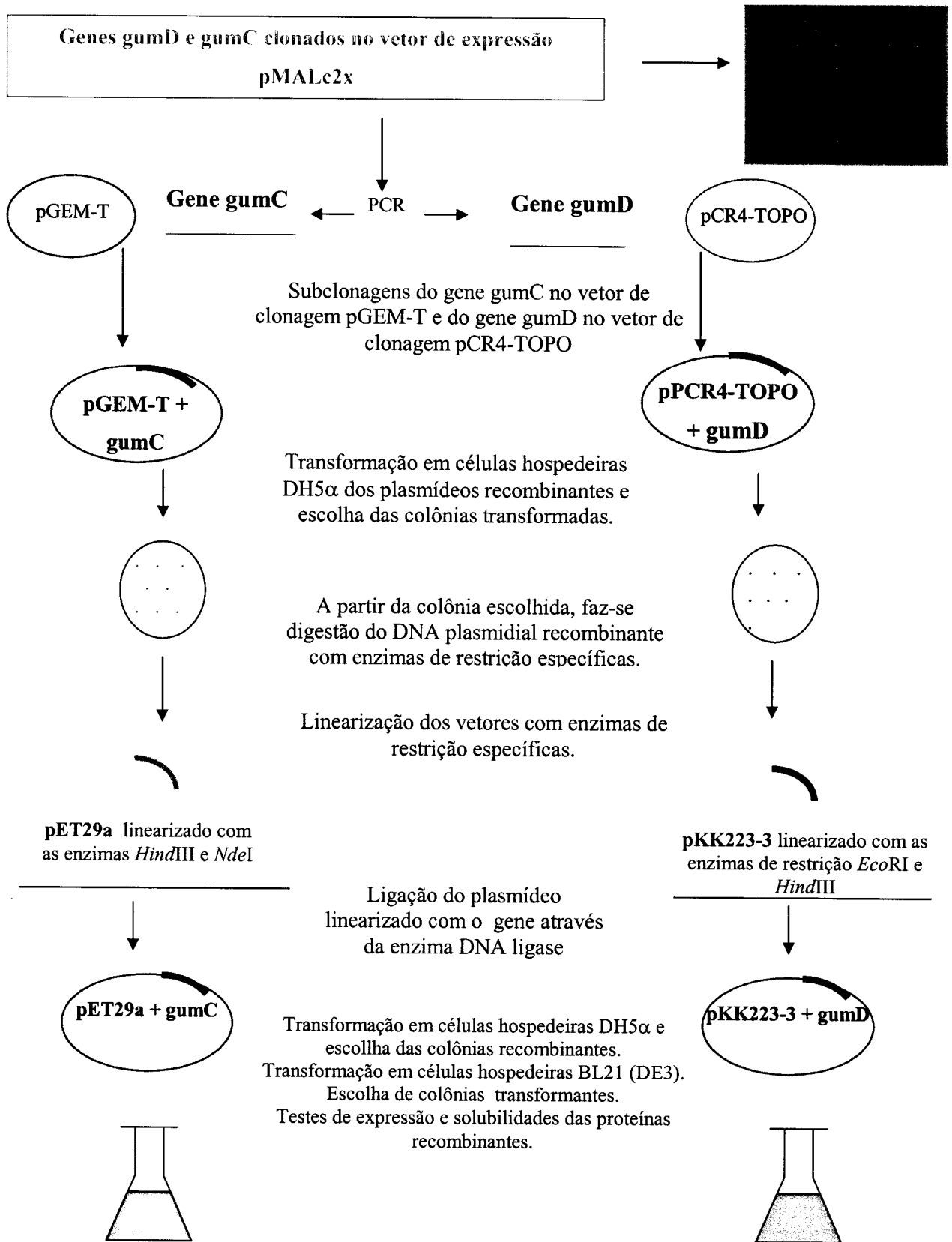
A eletroforese em gel de agarose permite a separação dos DNAs por massa molecular e é muito utilizada nas diversas etapas do processo de clonagem.

A técnica da PCR foi idealizada por Kary Mullis em meados de 1980 (Mullis *et al.*, 1987) e causou uma revolução na genética molecular. O método permite a amplificação de segmentos de DNA *in vitro*, explorando certas características do processo de replicação do DNA. A enzima DNA polimerase usa o DNA de fita única como molde e uma pequena porção do DNA de fita simples (“primer”) como inicializador da síntese. A amplificação do gene ocorrerá a partir da hibridização dos “primers” que se ligam em sítios específicos do gene a temperaturas mais baixas. Em seguida, a DNA polimerase inicia a polimerização, uma vez que no meio reacional estão presentes os desoxirribonucleicos (dNTPs). A cada ciclo de PCR duas novas fitas duplas de DNA são sintetizadas a partir de um único DNA molde (Watson *et al.*, 1997).

O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger utiliza o mecanismo da síntese de DNA pela DNA Polimerase como na PCR. Assim, necessita dos iniciadores (“primers”), do DNA molde e dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs), como a PCR, diferindo desta última por utilizar ddNTPs, que são desoxirribonucleotídeos que não apresentam a hidroxila no carbono 3. Dessa forma interrompem o crescimento da cadeia, gerando fragmentos de diferentes tamanhos

marcados no último nucleotídeo e com uma fluorescência em comprimento de onda específico. Os fragmentos de DNA marcados são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e sua fluorescência é detectada num sequenciador automático (Cox *et al.*, 2000).

Neste trabalho foram utilizadas diversas técnicas da biologia molecular na subclonagem e expressão das duas enzimas estudadas. Abaixo é mostrado um fluxograma do desenvolvimento da subclonagem dos genes *gumD* e *gumC*.



2.2) – Clonagem dos genes *gumD* e *gumC* no vetor de expressão pMAL-c2x

O operon *gum* foi sequenciado e seus genes foram clonados no vetor de expressão pMAL-c2X (fig.2.1) no Laboratório do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo Prof. Dr. Paulo Arruda e colaboradores.

A clonagem para os genes *gumC* e *gumD* no vetor pMAL-c2x foi feita com os sítios de clivagem para as enzimas *EcoRI* e *XbaI*, sítios estes mostrados na fig. 2.1).

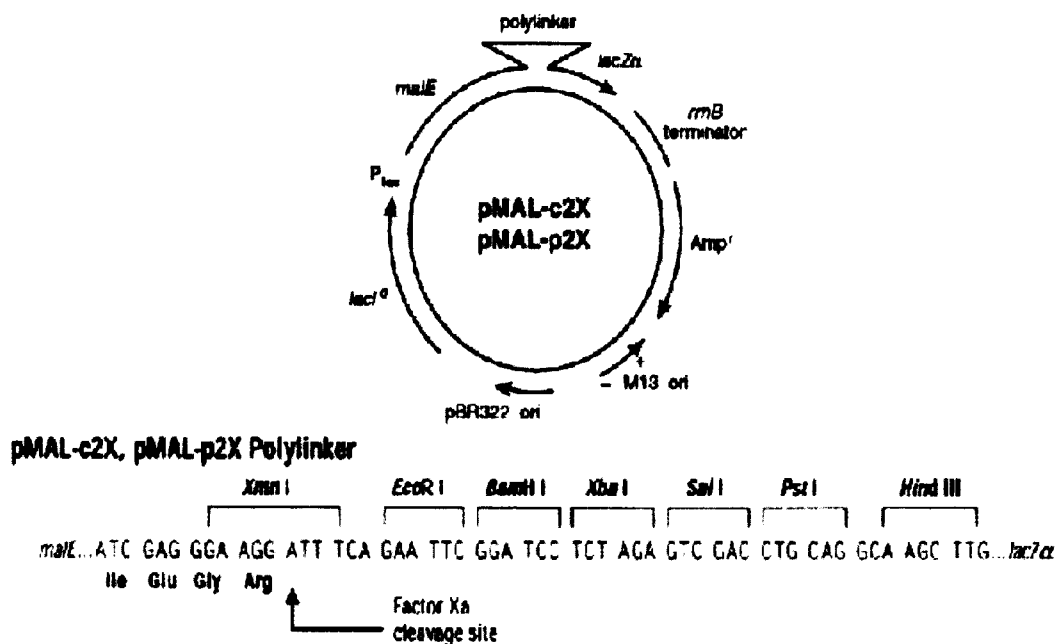


Figura 2.1 - Mapa do vetor pMAL-c2X mostrando a região do polylinker e o sítio de clivagem do Factor-Xa (figura extraída do pMAL Protein Fusion and Purification System).

2.3) - Expressão das proteínas de fusão Gum-MBP

Cepas BL21 (DE3) e DH5α de *Escherichia coli* (*E. coli*) foram transformadas com o vetor pMAL-c2X contendo o inserto *gum* para expressão das proteínas de fusão Gum-MBP. As células de bactérias foram estocadas a -80°C em Tris/HCl 25 mM pH8,0 contendo 100 mM de Sulfato de Magnésio e 65% de glicerol. Uma

pequena porção destas células foi plaqueada em meio LB (Luria Bertani) sólido (1% de bacto tripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 15 g/L de ágar) previamente autoclavados, e 100 µg/mL de ampicilina, como meio de selecionar os recombinantes. Essas células cresceram a 37°C durante 12 horas.

Pré-inóculos consistiam de 5 mL de meio LB líquido juntamente com 30 µL de glicose 33%, 100 µg/mL de ampicilina e 1 colônia transformante. O crescimento deu-se a 37°C sob agitação a 250 rpm por 12 horas. Deste pré-inóculo, 5 mL foram adicionados a 500 ml de meio LB, 100 µg/mL de ampicilina e 3 mL de glicose 33% e foram incubadas nas mesmas condições usadas para o pré-inóculo.

Quando a cultura atingiu a densidade óptica de 0,8 em 600 nm, a expressão das Gum-MBP foi induzida com isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG), na concentração final 0,6 mM, continuando em agitação por mais 4 horas a 37°C. As células foram separadas do meio por centrifugação a 4000 g durante 15 minutos a 4°C e ressuspendidas em 25 mL de tampão de lise ou tampão de coluna (20 mM de Tris-HCl, pH 7,4 com 200 mM de NaCl, 1 mM de EDTA e 1 mM de azida sódica) e congeladas a -20°C.

Para o teste de expressão foi retirado uma alíquota da cultura de células antes da indução, t_0 e 4hs após a indução, t_4 .

2.4) – Subclonagem dos genes gumC e gumD nos vetores de expressão pET29a e pKK223-3 respectivamente

2.4.1) - Desenho de Oligonucleotídeos para subclonagem dos genes gumD e gumC

O gene *gumD* foi subclonado em pKK223-3 (fig. 2.2), e para isso foram desenhados “primers” (oligonucleotídeos):

“Primer” 1: Oligo 3’ :

Sequência (5’- 3’): TGC AAA GCT TCA ATA AGC ATT TTT CGT AC

Sítio *Hind*III Códon de
terminação

“Primer” 2: Oligo 5’:

Sequência (5’- 3’): CAG AAT TCA TGC TTC TGG CAG ATC TGA AC

Sítio *Eco*RI ATG
iniciador

Foram sintetizados “primers” com sítios de restrição para as endonucleases *Hind*III e *Eco*RI. O primer 5’ foi sintetizado com um ATG iniciador após o sítio de restrição *Eco*RI.

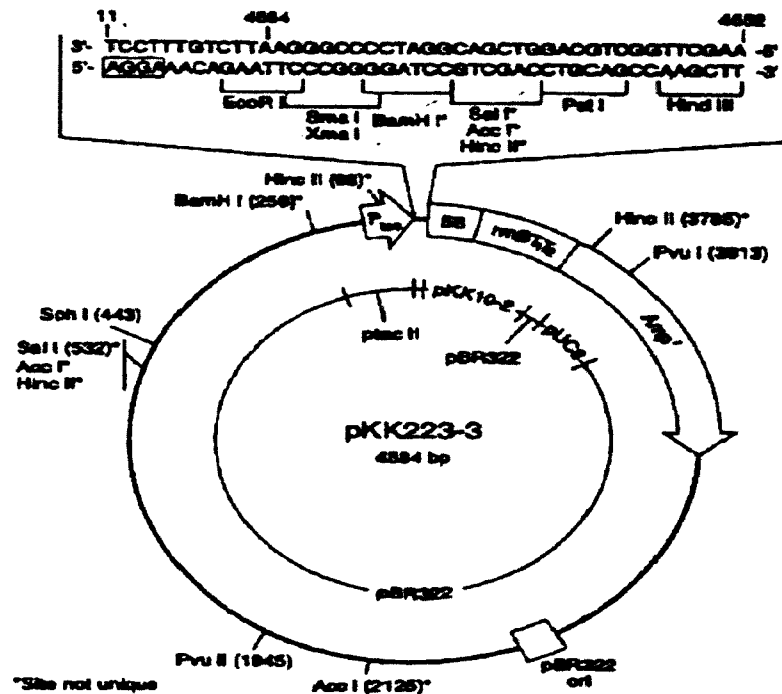


Figura 2.2 - Mapa do vetor pKK223-3 mostrando o “polylinker” (figura extraída do catálogo da Amersham Pharmacia Biotech).

O gene *gumC* foi subclonado no vetor pET29a (fig.2.3), utilizando os “primers”:

“Primer” 1: Oligo 3:

Seqüência (5’ - 3’): ACA AGC TTA TTC CAC GCT CAT CAC GTT TA

Sítio *Hind*III Códon de
terminação

“Primer” 2: Oligo 5:

Seqüência (5’ - 3’): CAC ATA TGG ATT ATC CCA ATC AAA CTT C

ATG
Sítio *Nde*I iniciador

Foram sintetizados “primers” com sítios de restrição para as endonucleases *Hind*III e *Nde*I.

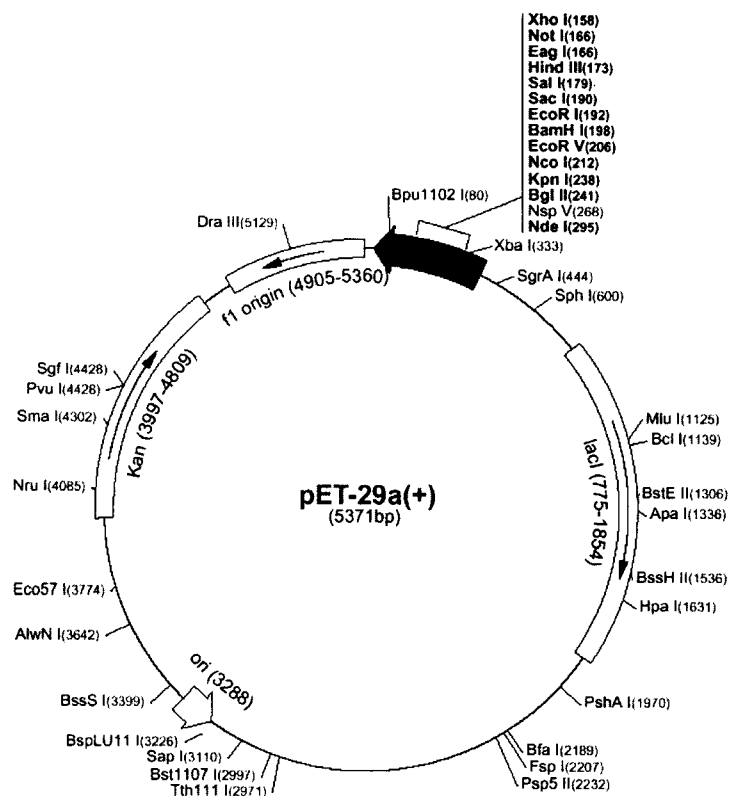


Figura 2.3 – Esquema mostrando o vetor pET29a (figura extraída do site www.novagem.com).

Os “primers” para o gene *gumC* foram desenhados conservando-se o códon terminador (“stop codon”) original, para que só a proteína *GumC* fosse expressa, sem cauda de histidina.

Através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) conseguiu-se obter cópias dos genes gum já com sítios de digestão para subclonagem no vetor escolhido. Para isto foi utilizado o seguinte protocolo (“kit” Promega).

- ◆ 6 μL do DNA plasmidial gum-pMAL;
- ◆ 1 μL dNTP (mistura de bases de nucleotídeos) 10mM;
- ◆ 0,5 μL “Primer” (oligo 3’);
- ◆ 0,5 μL “Primer” (oligo 5’);
- ◆ 5 μL de MgCl_2 25mM;
- ◆ 5 μL de tampão do PCR 10X;
- ◆ 0,5 μL da enzima Taq polimerase 5U/uL ;
- ◆ 31,5 μL de H_2O .

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

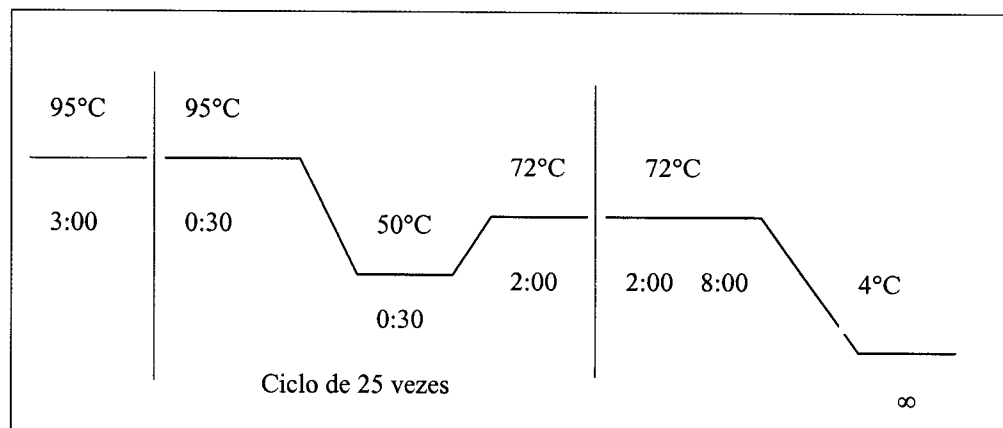


Figura 2.4 - Esquema mostrando a escala de tempos e temperaturas utilizadas na PCR.

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

Em seguida fez-se gel preparativo com o produto final de PCR e purificação deste com o kit Prep A Gene Purification Systems (Bio-Rad).

2.4.2) Subclonagem do gene gumD no vetor de clonagem pCR 4-TOPO

2.4.2.1) – Adição de Adeninas no inserto gumD para subclonagem no vetor de clonagem pCR 4-TOPO (Invitrogen)

Após a purificação do produto de PCR, adiciona-se adeninas (A) nas extremidades 3' dos fragmentos com a ajuda da Taq polimerase para posterior ligação com o vetor plasmidial pCR4-TOPO que apresenta uma sequência de 3 timinas (T) na extremidade 3'.

A reação de adição das Adeninas nos produtos de PCR seguiu o seguinte protocolo:

- 6 μ L de DNA purificado;
- 1 μ L de PCR Buffer (10X);
- 1 μ L de dATP (10mM);
- 1 μ L da enzima Taq polimerase (5U/ μ l);
- 1 μ L de H₂O.

A reação ocorreu a 72°C por 15 minutos.

A ligação do vetor com o inserto foi feita com uma mistura contendo 3 μ L do DNA (após a adição de Adeninas), 1 μ L do vetor de clonagem pCR4-TOPO e 1 μ L de solução salina. Esta reação se processa em 30 minutos a 22°C e não necessita da enzima DNA ligase.

2.4.3) – Subclonagem do gene gumC no vetor de clonagem pGEM-T

A partir do gene gumC amplificado por PCR e purificado, fez-se a ligação deste com o vetor de clonagem pGEM-T (PROMEGA), seguindo o protocolo abaixo:

- ◆ 5 µL tampão 2X concentrado (PROMEGA);
- ◆ 1 µL do vetor pGEM;
- ◆ 2 µL do DNA gumC;
- ◆ 1 µL H₂O milliQ;
- ◆ 1 µL da enzima T4 DNA ligase (PROMEGA);

Esta reação ocorreu a 4°C, por 12hs.

2.4.4) – Transformação das ligações gumD-pCR4- TOPO e gumC-pGEM

Após a ligação do DNA dos genes gumD no vetor pCR 4-TOPO e gumC no vetor pGEM-T, fez-se a transformação, seguindo o protocolo de Hanahan (1983), em células competentes DH5α onde 5 µL da ligação foi adicionado em 50 µL de bactérias DH5α competentes previamente descongeladas. Deixou-se em repouso por 30 minutos em gelo. O choque térmico foi realizado à 42°C durante 2 minutos. Deixou-se as bactérias no gelo por mais 3 minutos e adicionou-se 270 µL de meio de cultura SOC (2% bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose, pH 6,8) previamente aquecido e incubou-se a 37°C por 60 minutos.

A mistura (200 µL) foi plaqueada em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. Incubou-se durante a noite a 37°C.

Após crescimento das colônias recombinantes, escolheram-se 6 colônias. Fez-se pré inóculos com 5 mL de meio LB, 100 µg/mL de ampicilina contendo as colônias e estes foram crescidos a 37°C, 250 rpm, por 12 horas.

2.4.5) - Extração dos DNAs Plasmidiais da gumD-pCR4-TOPO e gumC-pGEM-T e ligação dos genes nos seus respectivos vetores de expressão

Extraiu-se o DNA plasmidial da cultura das colônias transformantes usando o Kit Concert (Invitrogen). A análise desta extração foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. O rendimento da extração plasmidial foi da ordem de 250 ng/uL.

Fez-se digestão do DNA plasmidial gum-vetor de clonagem (gumC-pGEM e gumD- pCR4-TOPO) utilizando as endonucleases *HindIII* e *EcoRI* para a gumD e *HindIII* e *NdeI* para a gumC, seguindo o protocolo do “kit” da Gibco:

- ◆ 96 µL de DNA gum-vetor de clonagem;
- ◆ 1 µL de cada enzima de restrição;
- ◆ 11 µL de tampão 10X (Gibco);
- ◆ 1 µL de H₂O.

Utilizando o mesmo protocolo, digeriu-se o vetor pKK223-3 (com as mesmas endonucleases utilizadas na digestão do DNA plasmidial gumD-pCR4-TOPO) e o vetor pET29a (com as endonucleases usadas para a digestão da gumC-pGEM).

As reações de digestão ocorreram a 37°C por 15 minutos. Os insertos e vetores digeridos foram purificados em gel de agarose preparativo.

Fez-se a ligação dos DNAs gum com seus respectivos vetores seguindo o mesmo protocolo descrito no item 2.4.4. Para a transformação em DH5α, utilizou-se

o protocolo: 100 μ L de DH5 α competentes, 5 μ L da ligação gum-vetor, deixou-se 1,5 min. a 42°C, depois deixou-se em banho de gelo por 1 min. Em seguida adicionou-se 400 μ L de meio LB e deixou-se em estufa a 37°C por 1h. Após plaqueou-se todo o volume em meio sólido LB/ágar.

Fez-se nova transformação utilizando agora a cepa de *E. coli* BL21 (DE3). O protocolo de transformação utilizado foi o de Hanahan (1983) relatado anteriormente (item 2.4.4).

2.5) - Expressão das Gum's

2.5.1) – Expressão da enzima GumC no vetor pET29a

Experimentos de expressão da GumC no vetor pET29a em células de *E. coli* BL21 (DE3) foram realizados com 6 colônias. Pré-inóculos de 5 mL de meio LB e kanamicina (30 μ g/mL) contendo a colônia foram crescidos a 37°C, 250 rpm até densidade ótica (D.O.) 0,8 e então induzidos com IPTG. Fez-se uma bateria de testes variando a concentração de IPTG (0,3 e 1 mM), a temperatura de indução (20 e 37°C) e o tempo de indução para a temperatura de 37°C (2, 4 e 6 hs) e 20°C (10, 20 e 30 hs). Centrifugou-se a cultura a 4000 g por 15 min. a 4°C e o “pellet” foi ressuspendido em tampão Mes/NaOH 50mM pH 6,0.

2.5.2) - Expressão da enzima GumD (Glicosiltransferase I) no vetor pKK223-3

Experimentos de expressão da GumD foram feitos com duas cepas de *E. coli* a DH5 α e a BL21 (DE3). Fez-se pré-inóculos com 5mL de meio LB, 100 μ g/mL de ampicilina e 1 colônia transformante. A cultura foi crescida a 37°C, 250 rpm e atingida DO 0,8, induziu-se com IPTG. Fez-se uma bateria de testes variando a concentração de IPTG (1 mM, 3 mM e 5 mM), a temperatura (37°C e 20°C) e o

tempo para temperatura de 37°C (2 e 4 horas) e 20°C (10, 20 e 30 horas). Centrifugou-se a cultura a 4000 g por 15 min. a 4°C e o “pellet” foi ressuspenso em tampão Tris/HCl 50mM pH8,5 contendo 0,5% Tween-20.

A expressão das enzimas foi observada através de gel SDS-PAGE a 15%.

2.6) – Lise das células contendo as enzimas Gum's

Após a expressão de ambas as enzimas e centrifugação do meio de cultura a 4000g, por 15 minutos a 4°C, as células foram ressuspendidas em seus tampões respectivos.

Fez-se vários experimentos de lise utilizando diferentes métodos:

- lise através do congelamento (N₂ líquido) e descongelamento (banho-maria a 42°C) por 5 vezes sem a adição de lisozima;
- lise com adição de 1% (massa/volume) de lisozima, através da técnica de congelamento e descongelamento (5 vezes) seguida de sonicação (5 vezes de 1 minuto – intervalo de 40 segundos);
- lise através da técnica de sonicação (6 vezes de 1 minuto – intervalo de 50 segundos).

Para avaliar a expressão das proteínas de fusão MBP-Gum e a lise celular, foi utilizado eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes pelo método Laemmli (1970). O gel foi revelado com 0,010% de Comassie brilliant blue G-250.

PARTE II - PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após o estabelecimento de protocolos de lise celular e de expressão das enzimas passou-se aos procedimentos de purificação das proteínas recombinantes GumD e GumC. Nesta segunda parte do capítulo serão apresentadas as técnicas de cromatografia líquida utilizadas.

2.7) – Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos tem sido utilizados para fins de identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas (neste caso chama-se de cromatografia analítica), e para o isolamento de compostos (cromatografia preparativa). Os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma fase fixa que pode encontrar-se empacotada em coluna (aberta ou fechada) denominada fase estacionária, e a outra um fluido que percola através dela, denominada fase móvel. A cromatografia pode ser classificada de acordo com a fase móvel usada: se a fase móvel for um gás, é dito cromatografia gasosa; se um líquido, cromatografia líquida. Neste trabalho utilizamos a cromatografia líquida.

Antes de iniciarmos uma purificação devemos ter algum conhecimento prévio sobre a proteína que desejamos trabalhar, como: massa molecular, ponto isoelétrico teórico e se a proteína é ou não de fusão. Com base nessas informações, poderemos traçar um esquema de purificação, de modo que tenhamos o menor número de passos na purificação aliado a um bom rendimento da amostra pura. A cromatografia por afinidade tem facilitado a purificação de proteínas expressas em fusão.

No presente trabalho os genes que codificam para a síntese das enzimas GumD e GumC foram clonados em vetores que permitem a expressão de proteína de fusão (pMAL-c2x) e também foram expressas sem estarem em fusão.

Utilizou-se neste trabalho o sistema de purificação com a resina de amilose para purificar as enzimas GumD-MBP e GumC-MBP.

O extrato celular lisado é preparado e a proteína de fusão é purificada através da ligação por afinidade na coluna de amilose enquanto todas as outras proteínas da bactéria passam através da coluna. A proteína de fusão é eluída da coluna usando um ligante livre como a maltose. A proteína de fusão é clivada com uma protease específica, o Factor-Xa. A proteína desejada é então separada da MBP através de uma segunda passagem da mistura na coluna de amilose, onde a MBP se liga à coluna enquanto a proteína de interesse passa através desta (fig.2.5).

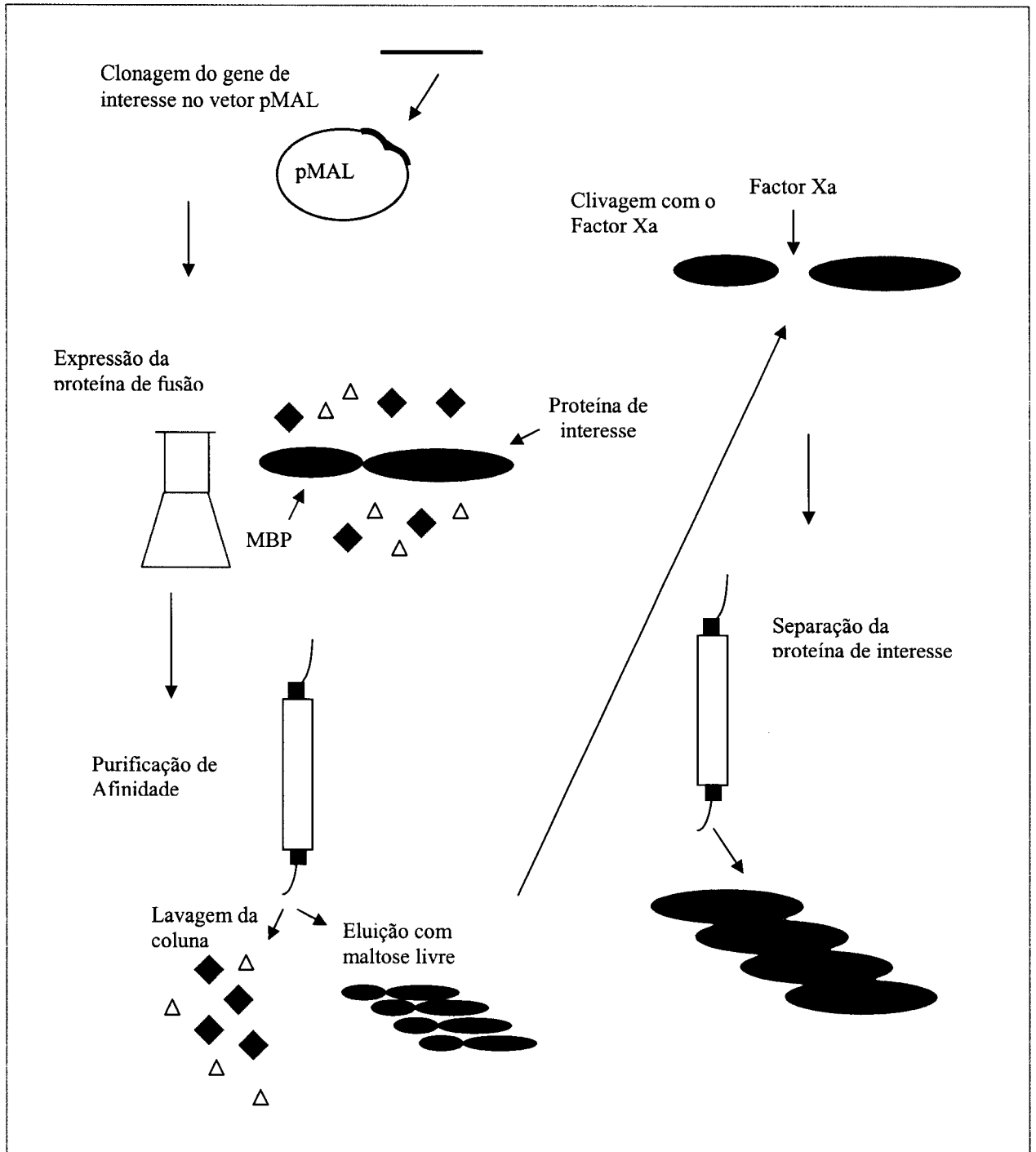


Figura 2.5 – Esquema de purificação por cromatografia de afinidade (coluna de amilose).

Quando a proteína de interesse não apresenta nenhuma fusão, utiliza-se a estratégia de três passos: captura, purificação intermediária e polimento. Na fase da captura, como sugere o nome, é importante “capturar” a proteína de interesse e

separá-la o mais rápido possível das outras proteínas que estão presentes no extrato lisado da bactéria recombinante, que por ventura possam ser enzimas proteolíticas que degradariam a proteína de interesse. Na purificação intermediária, o objetivo é separar a proteína de interesse da maioria dos contaminantes. A última fase é destinada ao “polimento” da amostra, ou seja, retirar os últimos traços de contaminantes.

Nesta estratégia utiliza-se técnicas como a precipitação com sulfato de amônio e as cromatografias líquidas como cromatografia de troca iônica, cromatografia de fase reversa, cromatografia de filtração a gel e cromatografia de afinidade a íons quelantes ou anticorpos.

Neste trabalho utilizou-se as cromatografias de troca iônica e filtração a gel.

A cromatografia de troca iônica é aplicada na separação de substâncias contendo grupamentos ionizáveis, como os aminoácidos e baseia-se no intercâmbio de íons entre a fase móvel e resinas contendo grupos funcionais do tipo ácido sulfônico (resina aniônica ou trocadora de cátions) ou amônio quaternário (resina catiônica ou trocadora de ânions). A afinidade de cada proteína por grupos carregados na coluna é afetada pelo pH (que determina o estado de ionização da molécula) e a concentração de sais ionizáveis livres que competirão com as proteínas pelo solvente (Cox *et al.*, 2000).

A cromatografia de exclusão ou de filtração molecular baseia-se no tamanho das moléculas do soluto que passam através da fase estacionária, constituída por um gel poroso: as moléculas maiores não conseguem penetrar nos poros e são arrastadas pela fase móvel, enquanto as moléculas de menor tamanho, capazes de entrar nos poros da fase estacionária são retidas por mais tempo no interior da coluna. A fase sólida consiste de poros variando entre 100 e 250µm. Nesse tipo de cromatografia, as

macromoléculas não são fisicamente retidas. Entretanto, as diferentes proteínas serão eluídas em diferentes volumes de retenção, de acordo com sua massa molecular.

As proteínas expressas na forma de fusão serão chamadas de GumD-MBP e GumC-MBP e as expressas sem fusão de GumD (expressa no vetor pKK223-3) e GumC (expressa no vetor pET29a).

2.8) - Purificação das proteínas de fusão Gum-MBP

Juntou-se à parte solúvel (25mL) do lisado celular (relatado conforme ítems 2.3 e 2.6) 50 mL de tampão de coluna, totalizando 75 mL e esta foi aplicada na coluna de amilose (2,3 cm de diâmetro por 1,8cm de altura, ou seja, 7,5 mL de resina), previamente equilibrada com 30 mL de tampão de coluna (o mesmo utilizado para ressuspender e lisar as células). O fluxo utilizado foi de 0,6 mL/minuto. Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de coluna. Em seguida eluiu-se a proteína de fusão Gum-MBP com 25 mL de tampão de coluna com 10 mM de maltose.

2.9) – Clivagem da fusão GumC-MBP com o Factor-Xa

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

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

A clivagem foi acompanhada em intervalos de tempo através de gel SDS-PAGE a 15%.

2.10) – Teste de purificação das enzimas GumD e GumC para avaliar a melhor resina

Utilizou-se o “kit” de colunas de troca iônica HiTrap IEX Selection Kit para o teste de purificação. Este “kit” apresenta 7 colunas de troca iônica:

- HiTrap SP Sepharose Fast Flow, 1mL, forte trocadora de cátions ;
- HiTrap CM Sepharose Fast Flow, 1mL, fraca trocadora de cátions;
- HiTrap Q Sepharose Fast Flow, 1mL, forte trocadora de ânions;
- Hitrap DEAE Sepharose Fast Flow, 1mL, fraca trocadora de ânions;
- Hitrap ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub), 1mL, fraca trocadora de ânions;
- HiTrap Q XL, 1mL, forte trocadora de ânions;
- HiTrap SP XL, 1mL, forte trocadora de cátions.

Fez-se preparações da cultura lisada de células a partir de 250 mL de meio LB, ressuspendidas cada uma em 13 mL de tampão. Para a enzima GumC foi usado o tampão Mes/NaOH 50 mM pH 6,0. A enzima GumD foi testada em dois tampões diferentes: Tris/HCl 50 mM pH 8,5 contendo 0,5% de Tween-20 e Citrato de sódio/ácido cítrico 100mM pH6,0 contendo 0,5% Tween-20.

Primeiramente lavou-se as colunas com 3 mL H₂O e equilibrou-se com 3 mL de tampão. Aplicou-se 1mL do sobrenadante do lisado. Lavou-se com 3 mL do mesmo tampão. Aplicou-se 3 mL de tampão com 1 M de NaCl. Lavou-se a coluna com H₂O.

Para todas as colunas retirou-se uma alíquota da aplicação, da lavagem com o tampão e da eluição com 1M de sal e aplicou-se em gel SDS-PAGE 15%.

2.11) - Purificação em larga escala da enzima GumD

Preparou-se uma cultura de células com 500 mL de meio LB, com o “pellet” ressuscitado em 25 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,5 com 0,5% de Tween-20. A lise celular foi realizada através da sonicação como descrito no item 2.6. Após a centrifugação, o sobrenadante do lisado foi filtrado em membrana Millipore 0,22 μm e diluído para 50 mL com tampão de lise ou de coluna.

Aplicou-se o filtrado em coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose Fast Flow (75 mL de resina) previamente equilibrada com o mesmo tampão do lisado, seguindo o seguinte programa, no sistema AKTA Explorer:

Fluxo: 1mL/minuto

Lavar coluna : até 150 mL (2 volumes de coluna) de tampão A: Tris/HCl 50 mM pH 8,5 e 0,5% Tween-20

Gradiente: 0 a 100% de tampão B; tampão B = tampão A + 1M de NaCl

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

Lavar coluna: 50 mL de tampão B

Lavar coluna: 50 mL de tampão A

Coletor: 5 mL/fração

As frações eluídas foram analisadas através de gel SDS-PAGE a 15%. As frações contendo proteína de massa molecular próxima à calculada para a enzima GumD foram reunidas e dialisadas contra o tampão Tris/HCl 50mM pH 8,5 com 0,5% de Tween-20 e 0,1M NaCl (tampão C). Concentrou-se em centriprep 50 até 2mL.

Aplicou-se a amostra em coluna de filtração a gel Superdex 200 (115 mL de resina) pré equilibrada com o tampão C em sistema FPLC seguindo o programa:

Passar 240 mL de tampão (2 volumes de coluna)

Fluxo: 0,5mL/minuto

Coletor: 1,2 mL/fração

Após análise em gel SDS-PAGE a 15%, juntou-se as frações contendo a enzima e dialisou-se contra tampão A.

Concentrou-se até 2mL em centriprep 50 e aplicou-se em coluna de troca aniônica MonoQ (1 mL de resina) no sistema AKTA, segundo o programa:

Fluxo: 1,5 mL/minuto

Lavar a coluna: 20 mL de tampão A (o mesmo utilizado para a cromatografia na coluna DEAE)

Gradiente: 0 a 80% de tampão B (tampão A + 1M NaCl)

Comprimento do gradiente: 60 mL (60 volumes).

PARTE III – CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Neste ítem são descritas as metodologias empregadas na caracterização das enzimas GumD e GumC.

2.12) - Sequenciamento de Proteína

O método químico empregado para o sequenciamento de proteínas é baseado na degradação de Edman. Por este método a proteína reage com fenilisotiocianato e o resíduo NH₂-terminal é removido como derivado feniltiohidantoína. Este aminoácido amino-terminal é separado cromatograficamente e identificado contra padrões. A cadeia polipeptídica menos o aminoácido amino-terminal é isolada e a reação de Edman é repetida para identificar o próximo amino-terminal. Este método é destinado para sequenciamento de polipeptídeos, com no máximo 30 aminoácidos (Devlin, T.M., 1998).

Para o sequenciamento completo de proteína o método é bem mais complexo. Primeiramente a composição de aminoácidos e o resíduo amino-terminal (N-terminal) são determinados. Após, a proteína será degradada com enzimas proteolíticas específicas (tripsina, por exemplo). O objetivo é obter fragmentos da proteína para serem sequenciados separadamente pela degradação de Edman. Para se determinar a ordem dos fragmentos de tripsina, e conseqüentemente, a seqüência de aminoácidos da proteína, é necessário clivar novamente a proteína com outra enzima proteolítica (por ex, pepsina), que clivará em outros pontos da cadeia de aminoácidos. Estes fragmentos também serão separados e sequenciados. As seqüências de cada fragmento obtido pelas duas clivagens são então examinadas, com o objetivo de encontrar peptídeos da segunda clivagem que estabeleçam continuidade, pela sobreposição, com os fragmentos obtidos pela primeira clivagem (Cox *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi realizado sequenciamento da região N-terminal da enzima GumD.

A amostra utilizada para o sequenciamento foi obtida através da transferência da banda do gel de SDS-PAGE para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) da BIO-RAD. A membrana foi corada com corante Ponceau a 0,5% em ácido acético 0,1% por 5 min. Após a secagem da membrana a banda da proteína foi recortada e enviada para sequenciamento, que foi realizado pela Prof.^a Dra. Maria Luiza V. Oliva do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

Os reagentes utilizados nessa técnica estão descritos abaixo:

1 – Tampão de transferência: Tris-base 48 mM

CAPS 39 mM

SDS 0,035% (m/v)

800 mL de água destilada e 200 mL de metanol

Correr a 150 V por 5 horas.

2 – Corante Ponceau: 0,5% de Ponceau em 0,1% de ácido acético.

3 – Solução descorante: ácido acético a 1%.

2.13) - Focalização Isoelétrica

Focalização Isoelétrica é a técnica usada para determinar o ponto isoelétrico (pI) de uma proteína. Proteínas são moléculas anfóteras, apresentam redes de cargas negativas, positivas ou nulas dependendo de sua composição de aminoácidos, do enovelamento e do pH do meio em que estão. A rede de cargas de uma proteína é a soma de todas as cargas positivas e negativas das suas cadeias laterais e dos resíduos amino e carboxi-terminal. O ponto isoelétrico é um pH específico no qual a soma da rede de cargas da proteína é zero ou nula. Proteínas são negativamente carregadas em valores de pH acima do seu pI e positivamente carregadas abaixo dele (Protein Electrophoresis Technical Manual, Amersham Pharmacia Biotech)

Na técnica de focalização isoelétrica um gradiente de pH é estabelecido ao longo de um gel à base de uma mistura de compostos orgânicos de baixa massa molecular denominados anfólitos. Esses anfólitos (anfóteros) têm a propriedade de agir como ácidos (doadores de prótons) ou bases (acceptores de prótons). Quando uma mistura proteica é aplicada ao gel, cada proteína migra sobre ele até o valor do pI. Proteínas com diferentes pIs são então distribuídas de diferentes formas sobre o gel (Protein Electrophoresis Technical Manual).

Utilizou-se o sistema PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech) para determinar o pI da proteína GumD. Foi aplicado aproximadamente 3,5 mg/mL, da proteína GumD que estava em tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,5 contendo 0,5% de

Tween-20, em gel PhastGel IEF 3-9, o qual permite a determinação do pI situado no intervalo de pH 3 a 9. A determinação do pI da Gum D foi realizada sob condições padrão do equipamento e a coloração foi realizada com Coomassie Blue (R-250).

2.14) - Determinação da Massa Molecular

Para a determinação da Massa Molecular da enzima GumD utilizou-se uma coluna Superdex-200 (25 mL de resina) e um sistema HPLC AKTA Explorer System (Amersham Pharmacia Biotech). A coluna Superdex-200 é usada em separações de proteínas na faixa de 10.000 a 600.000 kDa de massa molecular.

O método utilizado para as análises cromatográficas da proteína GumD bem como dos padrões (Thrioglobulina de 669 kDa, Ferritina de 440 kDa e Aldolase de 158 kDa) utilizados, foi o mesmo:

- ◆ Aplicação da amostra com 50mL (2 volumes) de tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,5 com 100 mM NaCl e 0,5% de Tween-20;
- ◆ Fluxo: 0,5 mL/min;
- ◆ Volume de amostra: 500 uL;

2.15) - Medidas de Dicroísmo Circular (CD – Circular Dichroism)

A espectropolarimetria baseia-se no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais ou assimétricos (Nakanish *et al.*, 1994). No caso das proteínas, estes grupos assimétricos envolvem principalmente as ligações peptídicas, as cadeias laterais dos aminoácidos, e grupos prostéticos.

Um feixe de luz circularmente polarizado, consiste de dois feixes de onda plana, linearmente polarizados, ortogonais entre si e fora de fase por 90° (fig.2.6a). A luz plano polarizada pode ser dividida em duas componentes opostas, com

polarização circular e vetor campo elétrico (\vec{E}) de mesma amplitude (fig.2.6b). Quando uma luz-plano polarizada atravessa uma amostra opticamente ativa (composto quiral), essa luz é convertida em luz elípticamente polarizada. Quando os vetores campo elétrico das duas componentes circulares estão na mesma direção sua soma resulta no semi-eixo maior da elipse, e quando estão em direções opostas sua soma resulta no semi-eixo menor (fig. 2.7). A combinação das duas componentes resulta em luz elípticamente polarizada, cuja elipticidade é definida como o arco tangente da razão do eixo menor com o eixo maior da elipse (Nakanish *et al.*, 1994; Campana P.T., 1998).

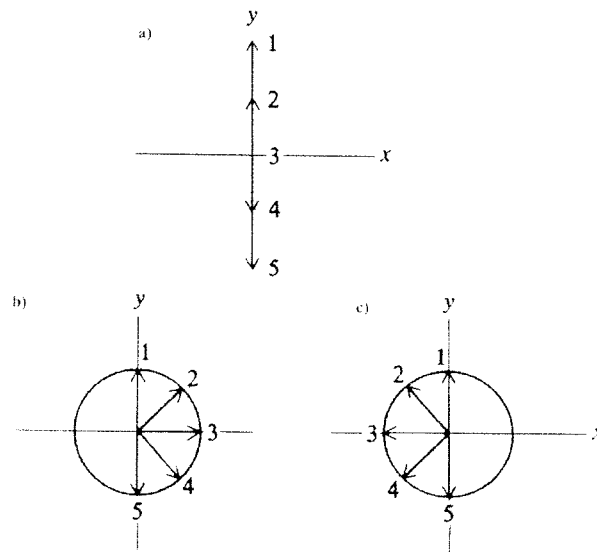


Figura 2.6 – Esquema mostrando em a) luz incidente polarizada linearmente, b) e c) resolução da luz linearmente polarizada em componentes polarizadas circularmente à direita e à esquerda, respectivamente (Cantor and Schimel., 1942).

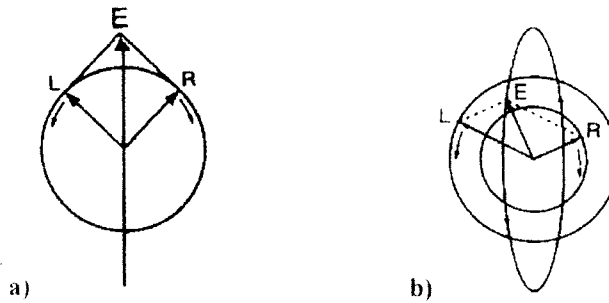


Figura 2.7 – Efeitos de uma amostra opticamente ativa sobre a luz linearmente polarizada, a) antes de incidir na amostra tem-se luz plano polarizada resolvida em duas componentes circulares à direita e à esquerda. b) após passar pela amostra que absorve diferentemente as duas componentes, R e L terão tamanhos diferentes. Se a componente R é menos intensa que L o vetor campo elétrico tem a resultante elíptica mostrada na figura (Nakanish *et al.*, 1994).

Este fenômeno de absorção diferenciada da luz circularmente polarizada é chamado dicroísmo circular e, está relacionado com a elipticidade (θ), dada em graus, por meio da expressão:

$$\theta = 32.98(A_e - A_d)$$

onde A_e é a absorbância da luz circularmente polarizada à esquerda;

A_d é a absorbância da luz circularmente polarizada à direita.

Para comparar resultados provenientes de amostras diferentes, frequentemente, utiliza-se a elipticidade molar, ($[\theta]$) (Fasman, 1996):

$$[\theta] = \frac{100 \times M_r \times \theta_{obs}}{l \times C}$$

Onde M_r é a massa molecular média dos resíduos que compõem a proteína (aproximadamente 115 g/mol)

θ_{obs} é a elipticidade medida (em m graus)

I é o comprimento do caminho ótico da cubeta (em cm)

C é a concentração da proteína analisada (em mg/mL).

2.15.1) - Estimativa da estrutura secundária de proteínas

O espectro de CD é a contribuição linear de todas as frações de estrutura secundária que constituem uma dada proteína. Sendo assim, pela análise e desconvolução de um espectro de CD é possível estimar a composição de estruturas secundárias. Para isso é necessário empregar um programa para desconvolução espectral. Por outro lado, através do espectro de CD também é possível agrupar as proteínas em cinco classes distintas: toda- α , toda- β , $\alpha+\beta$ (regiões separadas), α/β (regiões interconectadas) e randômica (altamente desordenada), utilizando-se um método matemático chamado análise de "cluster" (Venyaminov *et al.*, 1994, <http://lamar.ColoState.EDU/~sreeram/CDPro/>).

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

As medidas de CD procederam em um espectropolarímetro Jasco J715. A solução contendo a enzima GumD na concentração de 0,23 mg/mL foi adicionada

em cubeta de quartzo, do tipo circular, de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram medidos num intervalo de 195 a 250 nm, à temperatura ambiente, 22°C com, em média 8 varreduras.

2.16) - Medidas de Fluorescência

O fenômeno da fluorescência ocorre em compostos particulares, denominados fluoróforos, que quando excitados em um dado comprimento de onda (em geral, seus máximos de absorção), emitem luz em comprimento de onda de menor energia. Assim, a fluorescência pode ser definida como a luz emitida quando o estado excitado singlete (S1) decai para o estado singlete fundamental (So).

Em proteínas os aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina são sondas intrínsecas das proteínas. Os resíduos de triptofano são os aminoácidos mais fluorescentes, geralmente responsáveis por 90% da fluorescência nas proteínas devido apresentarem dois anéis aromáticos. Através desta técnica vários processos importantes podem ser estudados como: interações das proteínas com biomoléculas e com ligantes, associação proteína-proteína, desnaturação e reenovelamento. Os valores máximos de emissão estão relacionados a posição dos fluoróforos na biomolécula, sendo maiores os comprimentos de onda quando estes encontram-se expostos ao solvente (Lakowicz, J.R., 1983; Campana, P.T., 1998).

O espectro de fluorescência foi realizado no espectrofluorímetro K2, modo estático, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico e a temperatura ambiente, 22°C. O comprimento de onda de excitação foi 280 nm e a emissão monitorada de 295 a 450 nm. Um filtro com 85% de transmitância para comprimento de onda acima de 295 nm, posicionado no canal da emissão, teve a função de eliminar a luz espalhada. A amostra medida continha a enzima GumD

(0,06 mg/mL) em tampão Tris/HCl 10 mM pH 8,5 com 0,5% de Tween-20. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz pelo tampão, o espectro do tampão foi subtraído do espectro da amostra.

As medidas de CD e Fluorescência foram realizadas em colaboração com a especialista de laboratório Andressa Patrícia Alves Pinto. As análises dos respectivos espectros foram realizadas em colaboração com a Prof.^a Dra. Leila Beltramini do Grupo de Biofísica e Espectroscopia do Instituto de Física de São Carlos - USP.

2.17) - Caracterização da proteína GumC-MBP através de Imunoblotting

Imunoblotting é a técnica usada para identificar antígenos macromoleculares que reagem com um anticorpo específico. As proteínas são primeiramente separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Os sítios de ligação da membrana que não reagiram são bloqueados para suprimir adsorção não específica de anticorpos. As proteínas imobilizadas reagem com o anticorpo específico. Após, o complexo Ag-Ac (antígeno-anticorpo) reage com um segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) que está marcado com fosfatase alcalina que será visualizada após o uso de solução reveladora (Sambrook and Russell, 2001).

A amostra contendo a proteína de fusão GumC-MBP foi aplicada em gel SDS-PAGE a 15%. Este gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi corada com Ponceau 0,5% e a banda da proteína foi marcada na membrana. Após, deixou-a em contato com uma solução de leite em pó dissolvido em TBS por 12 horas para o bloqueio de sítios inespecíficos. A membrana foi lavada em TBS para retirada do leite e incubada com o primeiro anticorpo (anticorpo monoclonal anti-MBP) por 2 horas. Lavou-se a membrana com TBS e colocou-a em contato com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) marcado com fosfatase

alcalina por mais 2 horas. Lavou-se com TBS novamente. A membrana então foi revelada com uma solução contendo NTB (nitroblue de tetrazólio) e BCIP (5-Bromocloroindolil-fosfato) por 10 minutos. Lavou-se com água para interromper a reação.

A figura 2.8 abaixo, mostra como acontece a reação:

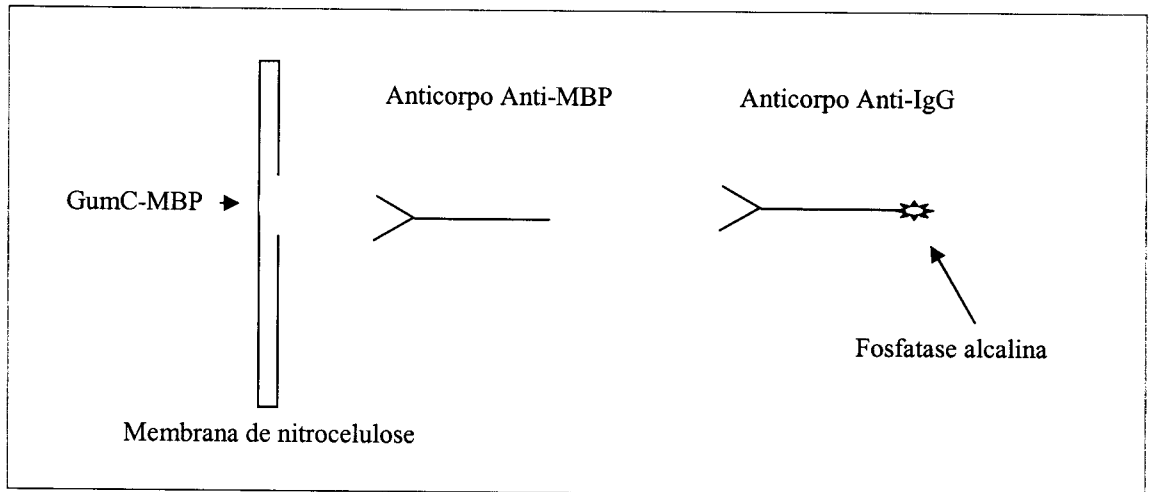


Figura 2.8 – Esquema de interação Antígeno-Anticorpo.

Os reagentes utilizados nessa técnica estão descritos abaixo:

1 – Tampão de transferência: Tris-base 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,035% (m/v)

800 mL de água destilada e 200 mL de metanol

Correr a 150 V por 5 horas.

2 – TBS (Tris buffered saline): NaCl 1,5 M

Tris/HCl 0,5 M

1000 mL de água destilada (10 vezes concentrado)

Acertar pH para 8,0.

3 – Tampão AP (alkaline phosphatase): Tris/HCl 100 m M

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

Água destilada 250 mL

Acertar o pH para 9,5.

4 – Solução Reveladora: 1 comprimido do reagente Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma) contendo NBT(nitroblue de tetrazólio) e BCIP (5-Bromo-4 cloro-3 indolil-fosfato) dissolvido em 10 mL de tampão AP.

5 – Solução de Bloqueio: 2,5 g de leite mólco desnatado em 50 mL de TBS [1x].

8 – Corante Ponceau: 0,5% de Ponceau em ácido acético 0,1%.

9 – Solução descorante: ácido acético a 1%.

2.18) - Produção de anticorpos anti-GumC-MBP em camundongos

A produção de anticorpos anti-GumC-MBP foi feita de acordo com a literatura (Sambrook and Russell., 2001). Três camundongos foram utilizados na produção do anticorpo. Este experimento foi realizado em colaboração com a Prof.^a Dra. Heloísa S. Selistre de Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

2.19) - Referências Bibliográficas

- CAMPANA, P.T. Desnaturação e reenovelamento da frutalina, uma lectina ligante de D-Galactose. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física de São Carlos – USP 1998.
- CANTOR, C.R. and SCHIMMEL, P.R. (1942) **Techniques for the study of biological structure and function**. Freeman and Company, 1980.
- COHEN, S.; CHANG, A.; BOYER, H. and HELLING, R. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 70, p. 3240-3244, 1973.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. Quarta edição, Ed. Edgard Blucher Ltda.
- FASMAN, G.D. **Circular Dichroism**. Nova Iorque, Plenum Press 1996.
- Ion Exchange Chromatography Principles and Methods Amersham pharmacia biotech.
pMAL System Manual.
- LACKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence spectroscopy. **Plenum Press, Nova Iorque** 1983.
- MULLIS, K. and FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Meth. Enzymol.** V. 230, p. 335-350 1987.
- NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; and WOODY, R.W. **Circular Dichroism – Principles and Applications**. Nova Iorque, VCH Publishers, Inc 1994.
- NELSON, D.L. and COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York 2000.
- Protein Electrophoresis Technical Manual (Amersham Pharmacia Biotech).
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual** 3 ed. New York v. 3, 2000.
- SREERAMA, N. and WOODY, R.W. Estimation Of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set **Anal. Biochem.** v. 287, p. 252-260, 2000.
- VENYAMINOV, S.Y. and VASSILENKO, K.S. Determination of tertiary structure class from Circular Dichroism Spectra. **Anal. Biochem.** V. 222, p. 176-184, 1994.
- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. and ZOLLER, M. **O DNA Recombinante**. 2 edição. Ouro Preto (MG) 1997.

ENZIMA GUMD

Neste capítulo serão descritos os resultados e discussões dos experimentos de expressão, purificação e caracterização realizados com a enzima GumD, cujo gene foi subclonado nos vetores pMAL-c2x e pKK223-3.

3.1) - Experimentos de Expressão e Solubilidade da proteína GumD no vetor pMAL-c2X

O gene *gumD* foi inserido no polylinker do vetor pMAL de forma a fazer fusão com o gene *malE*, que codifica a proteína que liga maltose (MBP), resultando na expressão de uma proteína de fusão MBP.

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

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

Células da cepa de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o DNA plasmidial (gumD-pMAL-c2x). Foi realizado um primeiro teste de expressão de acordo com instruções do manual do vetor pMAL (pMAL Protein Fusion and Purification System) utilizando IPTG na concentração final 0,6mM a 37°C por 4 horas e teste de solubilidade onde as células foram lisadas pela técnica do congelamento-descongelamento.

A figura 3.1 mostra um gel de eletroforese onde estes experimentos foram avaliados. Foi observada a expressão da proteína de fusão GumD-MBP, com massa molecular estimada em 98 kDa. Em relação a lise celular, observou-se uma maior quantidade de proteína de fusão no “pellet” em relação ao sobrenadante.

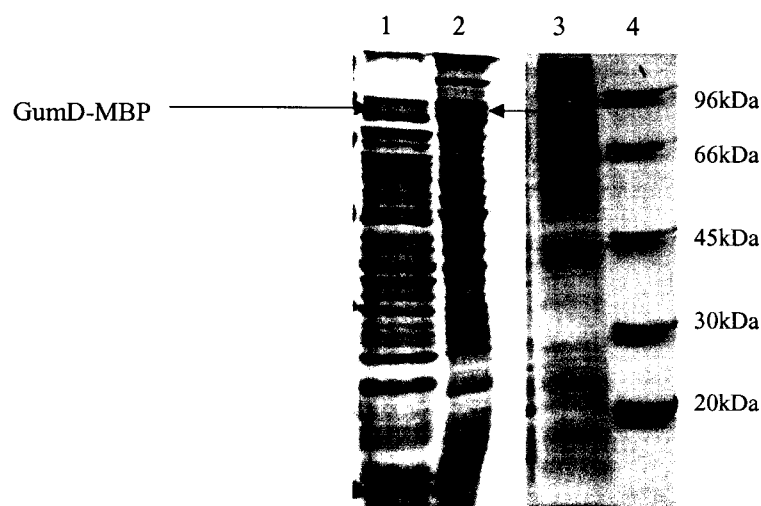


Figura 3.1– Etapas de expressão e solubilidade da proteína de fusão GumD-MBP analisadas em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: cultura de células após indução e lise celular (sobrenadante). Coluna 2: cultura de células após indução e lise celular (“pellet”). Coluna 3: culturas de células antes da indução (t_0). Coluna 4: padrão de massa molecular (kDa).

Na tentativa de melhorar a expressão, foram realizados novos experimentos modificando a concentração de IPTG, onde a cultura de células foi induzida com 0,3, 0,5 e 0,6mM de IPTG. Aliquotas foram retiradas antes da indução, t_0 , 2hs após indução, t_2 e 4hs após indução, t_4 , para análise em gel SDS-PAGE.

Através da análise de gel, observou-se que o nível de expressão é o mesmo quando se usa 0,3, 0,5 ou 0,6 mM de IPTG. A partir destes resultados os experimentos de expressão foram realizados com 0,3mM IPTG.

Devido grande parte da proteína de fusão GumD-MBP permanecer no “pellet” após lise celular, novas tentativas de expressão foram realizadas. Os experimentos de expressão tiveram duas variantes como, temperatura (20 e 37°C) e tempo de indução dependente da temperatura, 37°C (2, 4 e 6 hs) e 20°C (20hs). Analisando o gel SDS-PAGE observou-se que a insolubilidade permanece a mesma.

Também tentou-se transformar o DNA plasmidial em células de *E. coli* BL21 (DE3) para verificar aumento de expressão, porém isso não ocorreu.

3.2) - Experimento de Purificação da GumD-MBP

Apesar de observar pouca proteína solúvel no sobrenadante, testes de purificação com o sobrenadante foram iniciados, com a enzima expressa utilizando 0,3mM de IPTG na indução por 4 horas a 37°C. Após a indução a cultura foi centrifugada e o “pellet” ressuspendido em 25mL de tampão de coluna ou tampão de lise e foi lisado pela técnica de congelamento e descongelamento. Após a centrifugação o sobrenadante do lisado foi diluído cinco vezes com o tampão de lise e foi aplicado em coluna de amilose. Após a lavagem da coluna com o mesmo tampão de lise, a proteína de fusão foi eluída com 10 mM de maltose.

A figura 3.2 mostra o perfil da coluna de amilose, onde o primeiro “pico” representa a eluição das proteínas que não se ligaram à resina e o segundo pico a eluição da proteína de fusão GumD-MBP após aplicação de tampão de coluna com 10 mM de maltose.

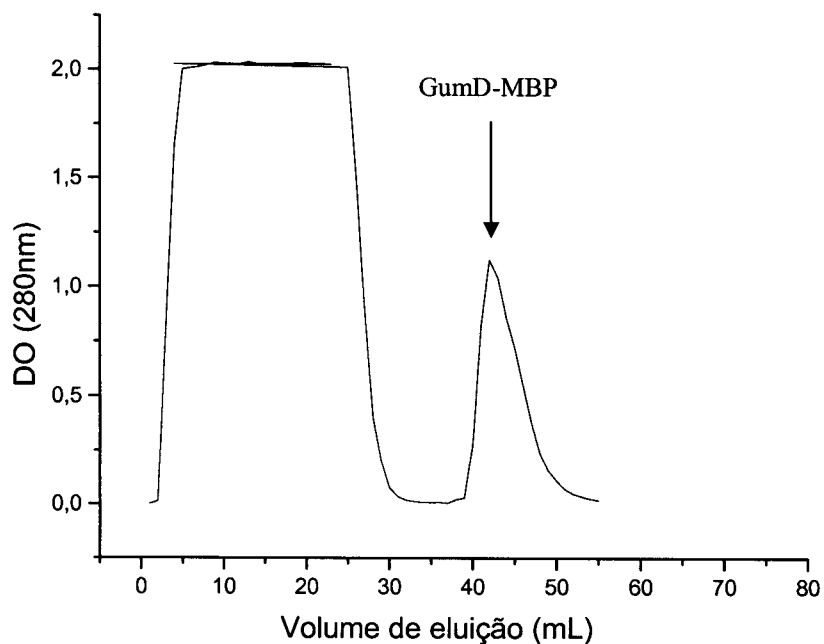


Figura 3.2 – Perfil cromatográfico da coluna de amilose: purificação da proteína de fusão GumD-MBP.

A análise do gel SDS-PAGE a 10% (figura 3.3), mostra baixo rendimento da proteína de fusão, eluída da coluna de amilose. Um fato importante a ser observado é que a proteína MBP da própria bactéria *E.coli* (massa molecular de aproximadamente 42.000), compete com a proteína de fusão pelos sítios de ligação da resina de amilose, diminuindo a eficiência desta etapa de purificação da proteína de fusão, além de outras proteínas da bactéria também se ligarem à resina.

Testes de clivagem com o Factor-Xa não foram realizados para a proteína de fusão GumD-MBP em virtude da amostra eluída da coluna amilose conter pouca quantidade da proteína.

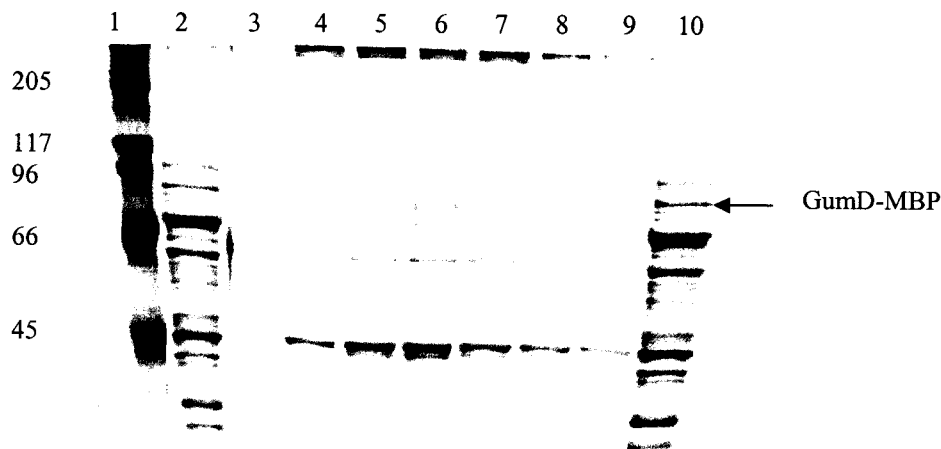


Figura 3.3- Etapa da purificação parcial da proteína de fusão GumD-MBP analisada em gel SDS-PAGE a 10%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: cultura de células após indução e após lise celular (sobrenadante ou pré-coluna). Coluna 10: fração da coluna de amilose após aplicação da amostra. Colunas de 3 a 9: frações da coluna de amilose após eluição do tampão de coluna mais 10mM de maltose.

Tendo em vista a baixa solubilidade e expressão e conseqüente baixo rendimento da proteína GumD-MBP, optou-se em fazer uma subclonagem do gene *gumD* em outro vetor de expressão. O vetor escolhido para subclonagem do gene *gumD* foi o pKK223-3.

3.3) - Subclonagem do gene *gumD* no vetor de clonagem pCR4-TOPO

O experimento de clonagem do gene foi realizado seguindo a estratégia que é a de amplificar o DNA através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) partindo dos 'primers' desenhados para cada gene e utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (item 2.4.1). Esta enzima adiciona 3 Adeninas nos dois lados da fita de DNA o que permite que este DNA seja ligado ao vetor pCR4 TOPO (Invitrogen), que apresenta 3 timinas na extremidade 3', facilitando a confirmação dos sítios de restrição do inserto. Experimentos de clonagem utilizando-se diretamente o produto

de PCR, sem a subclonagem no vetor pCR4-TOPO foram realizados, porém, em nenhum caso o resultado foi positivo.

Conseguiu-se 6 clones desta ligação (fig. 3.4) e então, após a escolha de um clone partiu-se para a digestão do gene *gumD* utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Observa-se na figura 3.4 o gene *gumD* (1495pb) e o vetor pCR4-TOPO (4584pb) após digestão com as enzimas de restrição.

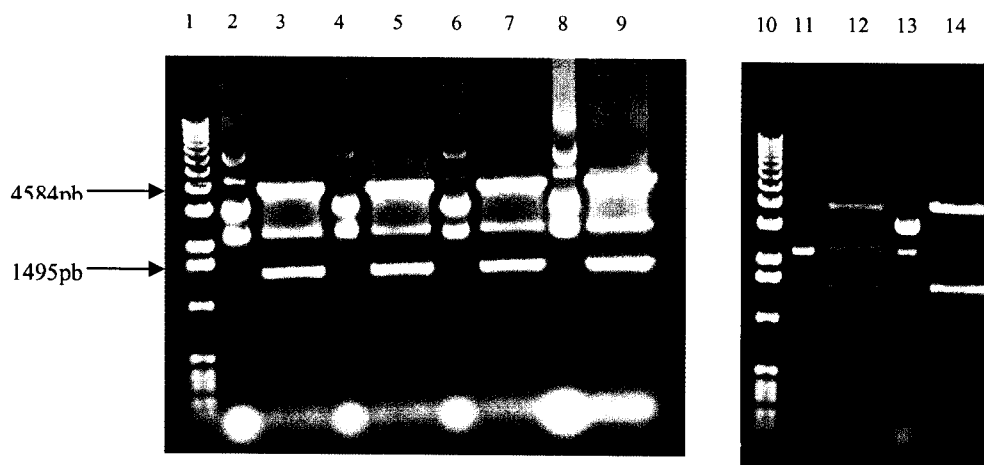


Figura 3.4 – Clones do gene *gumD* no vetor de clonagem TOPO-TA analisados em gel de agarose a 0,8%. Colunas 1 e 10: marcador de massa molecular. Colunas 2, 4, 6, 8, 11 e 13: clones 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (*gumD*-pCR4-TOPO), respectivamente. Colunas 3, 5, 7, 9, 12 e 14: Clones 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (*gumD*-pCR4-TOPO), respectivamente, digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*.

O vetor de expressão pKK223-3 também foi tratado com as mesmas enzimas. A ligação do gene com o vetor de expressão foi realizada e conseguiu-se a inserção destes em células DH5 α . O sucesso da ligação do vetor de expressão ao gene *gumD* foi checado através da digestão do plasmídeo recombinante utilizando as enzimas de restrição usadas anteriormente. O produto desta digestão foi analisado através de gel de agarose 0,8%, onde observou-se o gene *gumD*, que apresenta aproximadamente 1495pb (fig.3.5).

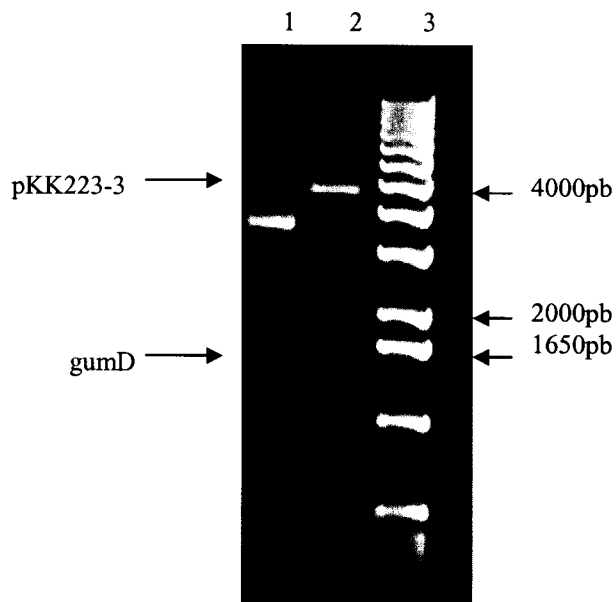


Figura 3.5 - DNA plasmidial (gumD-pKK223-3) antes e após a clivagem com as enzimas de restrição, analisado em gel de agarose 0,8%. Coluna 1: DNA plasmidial do clone gumD-pKK223-3 antes da clivagem. Coluna 2: clone gumD-pKK223-3 digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Coluna 3: marcador de massa molecular.

3.4) – Expressão da GumD (Glicosiltransferase I)

A expressão da enzima GumD (cujo gene foi clonado no vetor pKK223-3) foi testada variando-se as cepas de *E. coli* DH5 α e BL21 (DE3), concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução. Observou-se uma maior expressão da proteína GumD (massa molecular calculada em 56kDa) utilizando as bactérias de expressão *E. coli* BL21 (DE3). Através da análise de géis SDS-PAGE, observou-se que ocorre uma maior indução à medida em que aumentamos a concentração de IPTG (temperatura de 20°C) e o tempo de indução, porém aumenta também a quantidade de proteína recombinante em corpo de inclusão. Assim, escolheu-se trabalhar com uma concentração de 1mM de IPTG, a temperatura de 20°C e com tempo de indução de 10 horas (fig.3.6).

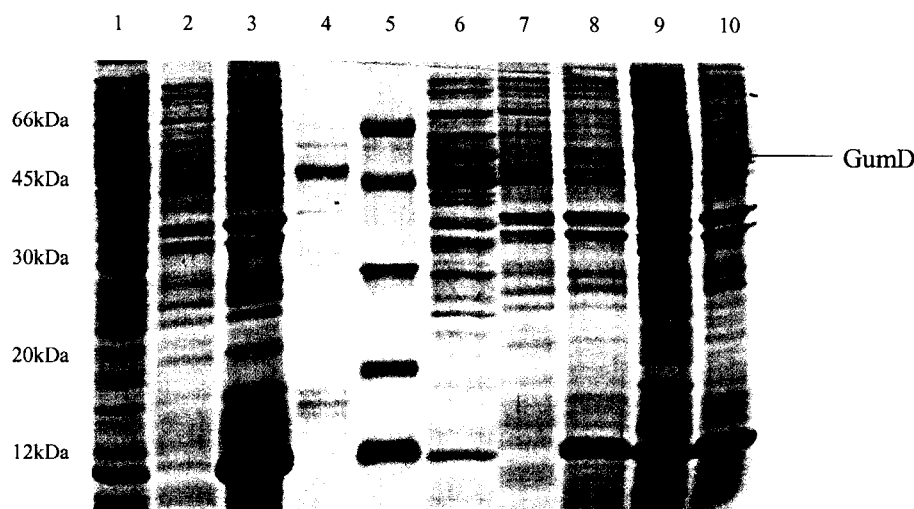


Figura 3.6 – Teste de expressão da proteína GumD em células BL21 (DE3) induzidas com IPTG a 1mM (20°C), analisado em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: cultura de células, sobrenadante, após 10 horas de indução. Colunas 2 e 7: cultura de células antes da indução. Coluna 3: cultura de células, “pellet”, após 10 horas de indução com IPTG. Coluna 4: proteína triptofanase usada como padrão. Coluna 5: padrão de massa molecular. Colunas 6 e 8: cultura de células, sobrenadante e “pellet”, respectivamente, 20 horas após a indução. Coluna 9 e 10: cultura de células, sobrenadante e “pellet”, respectivamente, 30 horas após a indução.

3.5) – Solubilidade da GumD

A lise das células foi testada por três técnicas diferentes: congelamento e descongelamento, congelamento e descongelamento com adição de lisozima seguido de sonicação e sonicação somente. A figura 3.7 mostra a lise das células comparando os diferentes protocolos.

Observou-se uma maior solubilidade da proteína GumD quando utilizou-se a técnica do congelamento e descongelamento com adição de lisozima seguida de sonicação. Porém, decidiu-se utilizar somente a técnica da sonicação para poupar a proteína de muitos choques bruscos que poderiam provocar alguma alteração no seu enovelamento.

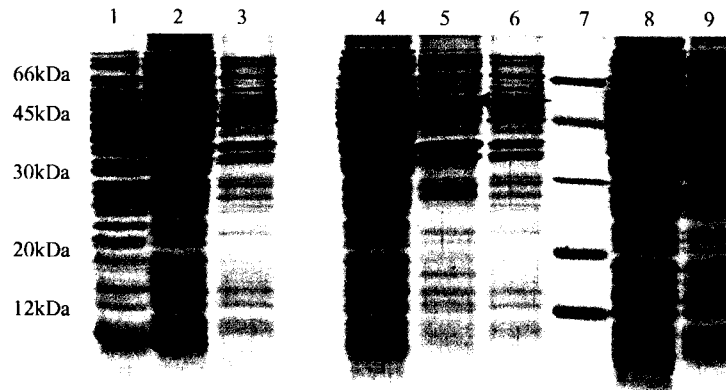


Figura 3.7 – Teste de solubilidade da enzima Glicosiltransferase I analisado em gel SDS-PAGE a 15%. Colunas 1 e 2: cultura de células lisadas pela técnica do congelamento e descongelamento, sobrenadante e “pellet”, respectivamente. Colunas 3 e 6: cultura de células antes da indução. Colunas 4 e 5: cultura de células lisadas pela técnica do congelamento e descongelamento com adição de lisozima seguida de sonicação, sobrenadante e “pellet”, respectivamente. Coluna 7: padrão de massa molecular. Colunas 8 e 9: cultura de células lisadas pela técnica da sonicação, sobrenadante e “pellet”, respectivamente.

3.6) - Teste de Purificação da GumD

Após estabelecidos os protocolos de expressão e lise celular partiu-se para a etapa de purificação da enzima GumD.

A estratégia utilizada no estabelecimento dos protocolos de purificação foi a utilização de um “kit” com sete tipos de colunas de troca iônica. O experimento foi realizado utilizando dois tampões de pH diferentes: Tris/HCl 50 mM pH 8,5 com 0,5% Tween-20 e Citrato de Sódio 100 mM pH 6,0 com 0,5% Tween-20.

Fez-se preparações de cultura lisada de células a partir de 250 mL de meio LB, ressuspendidas cada uma em 13 mL do tampão. Aplicou-se 1 mL do lisado em cada coluna. Observou-se interação da proteína glicosiltransferase I com colunas de troca aniônica: DEAE sepharose Fast Flow, Q sepharose Fast Flow, Q XL e ANX sepharose em pH 8,5. Em pH 6,0 a enzima interagiu com as colunas de troca catiônica CM e SP Sepharose Fast Flow e SP XL. Resolveu-se utilizar o tampão Tris/HCl pH 8,5 por este estar mais próximo ao pH fisiológico. A coluna de troca

aniônica DEAE Sepharose Fast Flow foi a escolhida para trabalhar em larga escala devido as outras proteínas contaminantes ligarem-se mais fracamente a essa resina.

3.7) - Purificação em larga escala da enzima GumD

A purificação da proteína em larga escala foi feita a partir de 500mL de meio de cultura que foi induzida com 1 mM de IPTG por 10 horas a 20°C. Após, a cultura foi centrifugada e o “pellet” ressuspensionado em 25 mL de tampão. A lise celular foi feita por sonicação e o lisado foi centrifugado. O sobrenadante foi diluído para 50mL com tampão de coluna, filtrado em membrana Milli-Pore e aplicado em coluna cromatográfica DEAE Sepharose Fast Flow.

A análise em gel SDS-PAGE a 15% mostrou duas bandas muito próximas com massa molecular de aproximadamente 56 kDa (massa molecular teórica da proteína GumD).

As frações contendo majoritariamente as duas proteínas foram dialisadas contra tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,5 contendo 0,5% Tween-20 e 100 mM de NaCl e concentradas em centriprep-50 de 20 até 2 mL e então aplicadas em coluna de filtração a gel Superdex-200.

Após análise em gel SDS-PAGE a 15% juntou-se as frações contendo a proteína de massa molecular próxima à esperada para GumD, dialisou-as contra tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,5 contendo 0,5% Tween-20 e concentrou-as até 2 mL. O concentrado foi aplicado em uma outra coluna de cromatográfica de troca aniônica (Mono-Q).

O rendimento da proteína GumD purificada é de 1,5mg por 0,5L de cultura de células.

Pelo gel SDS-PAGE a 15% mostrado na figura 3.8 pode-se acompanhar o processo de purificação da enzima GumD nas três colunas utilizadas.

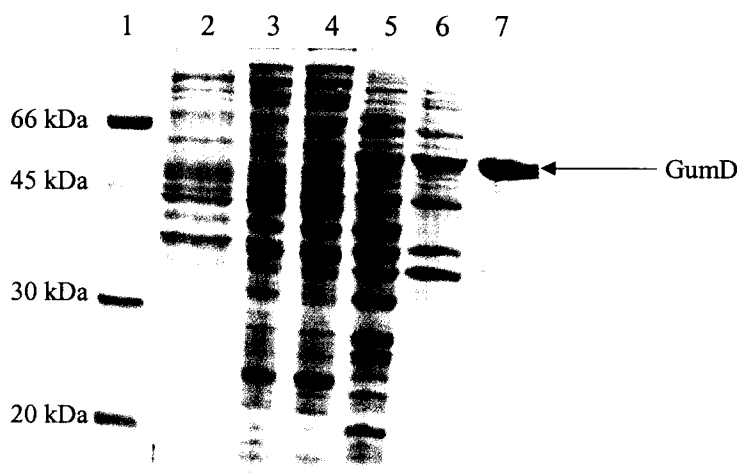


Figura 3.8 – Etapas da purificação da enzima GumD analisada em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: Cultura de células antes da indução. Coluna 3: Cultura de células após indução e lise celular (“pellet”). Coluna 4: Sobrenadante do lisado antes da aplicação na coluna DEAE Fast Flow. Coluna 5: “pool” das frações contendo a enzima GumD antes da aplicação na coluna Superdex-200. Coluna 6: “pool” das frações Pré Mono-Q. Coluna 7: fração eluída da coluna MonoQ.

3.8) – Caracterização da Proteína GumD

A enzima GumD foi expressa de forma solúvel e um protocolo de purificação foi estabelecido, como descrito no item 2.11. A partir da obtenção da proteína pura foram realizados experimentos para caracterizá-la como sequenciamento de aminoácidos N-terminal, determinação do pI e da massa molecular. A proteína GumD também foi caracterizada quanto ao seu enovelamento.

3.8.1) – Sequenciamento do gene gumD

O gene gumD clonado nos vetores pCR4-TOPO, pMAL-c2x e pKK223-3 foi sequenciado pelo método de Sanger utilizando o equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela especialista de laboratório Susana Andréa Sculaccio. Para o

sequenciamento do gene gumD (1495pb) clonado no vetor pCR4-TOPO foram utilizados os “primers” 5’ (T7) e 3’ (PRSET), para o vetor pMALc-2x foi utilizado o “primer” 5’(malE primer) e para o gene gumD no vetor pKK223-3 foram utilizados os “primers” 5’ (pKK223-3 forward) e 3’ (pKK223-3 reverse). As seqüências obtidas, foram verificadas utilizando o programa Chromas e alinhadas utilizando o programa Seqman (DNASar) (Lasergene Sequence Analysis Software – DNASar, 2001). Uma seqüência consenso foi obtida a partir das seqüências alinhadas (fig.3.9 e 3.10). Na figura 3.9 é mostrada a estratégia utilizada para o alinhamento das seqüências obtidas através do sequenciamento de DNA. Esta estratégia permitiu a leitura de cada posição por pelo menos duas reações de sequenciamento independentes, aumentando a confiabilidade da seqüência consenso obtida.

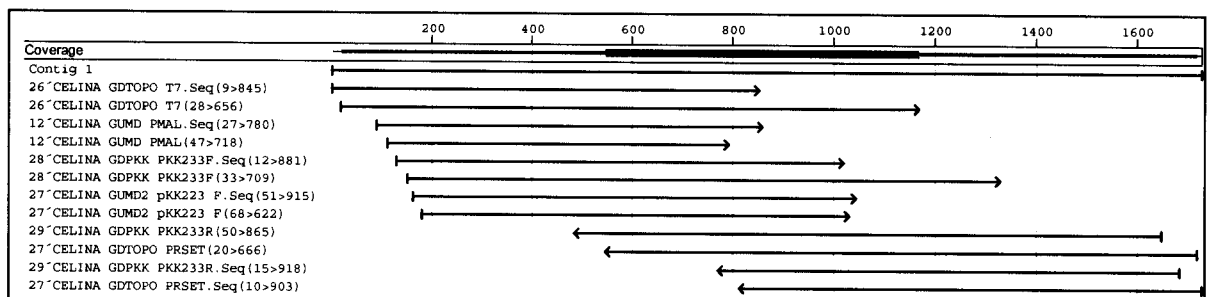


Figura 3.9 – Estratégia do alinhamento das extremidades 5’e 3’ do gene gumD nos vetores pMALc-2x, pCR4-TOPO e pKK223-3 produzido pelo programa SeqMan. Os alinhamentos indicados pela seta → (sentido esquerda para direita) representam os alinhamentos das extremidades 5’ e os alinhamentos indicados pela seta ← (sentido direita para esquerda) representam os alinhamentos das extremidades 3’.

A seqüência consenso obtida após o alinhamento das seqüências foi traduzida e submetida a uma busca por identidade utilizando o banco de dados BLAST (National Center for Biotechnology Information – NCBI). O resultado apresentou 100% de identidade com a enzima GumD da bactéria *Xylella fastidiosa* depositada no banco de dados. A figura 3.10 mostra a seqüência de nucleotídeos do gene gumD e a seqüência de aminoácidos deduzida a partir dela.

M	CTT	CTG	GCA	GAT	CTG	AAC	AGT	GTT	ACT	GAT	ATT	GCT	TCT	TCA	CCG	CGG	TTA
L	L	L	A	D	L	N	S	V	T	D	I	A	S	S	P	R	L
TTG	TCG	AAA	TAT	TCT	GCT	GCC	GCT	GAT	CTA	ATA	CTT	CGT	GTT	TTT	GAT	CTA	ACA
L	S	K	Y	S	A	A	A	D	L	I	L	R	V	F	D	L	T
ATG	GTG	GTG	CTC	TCT	GGT	GTA	ATG	ATT	TAC	AGA	TTG	TTG	TTT	GGT	ACT	TGG	ATG
M	V	V	L	S	G	V	M	I	Y	R	L	L	F	G	T	W	M
TTA	ATG	GTC	CCA	TAT	CGT	ATT	GCG	ATT	GGT	AAC	ACG	TTA	CTG	TAT	TCG	GTG	ATT
L	M	V	P	Y	R	I	A	I	G	N	T	L	L	Y	S	V	I
TGT	TTT	TCT	TTT	TTC	CCG	TTG	TAT	CGC	AGT	TGG	CGT	GGG	CGT	GCT	CTG	GCG	CGG
C	F	S	F	F	P	L	Y	R	S	W	R	G	R	A	L	A	R
GAG	CTG	TTA	GTA	CTT	AGT	AGT	GCG	TTC	TGT	GGT	GTA	TTT	ATC	TTG	TTT	TCG	TTG
E	L	L	V	L	S	S	A	F	C	G	V	F	I	L	F	S	L
CAT	ACA	CTG	ATT	GTT	CAA	TTG	GGA	CAT	CCT	GTC	TCC	TGG	TTA	TGG	ATT	ACT	TTC
H	T	L	I	V	Q	L	G	H	P	V	S	W	L	W	I	T	F
TGG	TTC	CTT	GGT	GCG	CTC	TCT	ACC	TTG	TTG	AGT	GCG	CGT	GTA	GCG	CIT	CGT	AGT
W	F	L	G	A	L	S	T	L	L	S	A	R	V	A	L	R	S
CTA	CTC	AAC	TGG	TTG	CAT	ATG	CGT	GGT	GTG	GAT	GTC	CAA	CGT	ATT	GTT	GTG	GTT
L	L	N	W	L	H	M	R	G	V	D	V	Q	R	I	V	V	V
GGG	CTG	CGT	CAT	CCT	GTG	ATG	AAA	ATT	CAC	CAT	TAT	CTG	AAT	CGT	AAT	ACA	TGG
G	L	R	H	V	M	K	I	H	H	Y	L	N	R	N	T	W	
ACA	GGG	ATG	CAA	TTG	ATT	GGG	TAT	TTC	AGT	ACT	TCC	TAC	GAT	GTC	TCT	GTA	TCT
T	G	M	Q	L	I	G	Y	F	S	T	S	Y	D	V	S	V	S
GAA	TAT	GTG	AGG	CGT	CTT	CCG	TCT	CTT	GGG	ACG	CCG	GAT	AGA	TTG	TTC	GAT	TTT
E	Y	V	R	R	L	P	S	L	G	T	P	D	R	L	F	D	F
TTA	GAA	AAA	AAT	CAC	GTT	GAG	CAA	GTA	TGG	ATT	TCG	ATG	CCT	CTT	GGT	GAG	CGT
L	E	K	N	H	V	E	Q	V	W	I	S	M	P	L	G	E	R
GAT	TAT	ATT	AAG	ACG	TTG	TTG	AAG	AAA	TTG	GAG	CGT	TAT	CCG	ATC	AAT	GTA	AAA
D	Y	I	K	T	L	L	K	K	L	E	R	Y	P	I	N	V	K
CTT	ATT	CCT	GAT	TTA	TTC	GAC	TTT	GGC	ACA	CTC	AAT	CAG	TCG	GGT	GAA	CAA	ATT
L	I	P	D	L	F	D	F	G	T	L	N	Q	S	G	E	Q	I
GGT	CAT	GTG	CCT	GTC	ATT	AAT	CTT	CGT	CAG	GGC	GGT	GTT	GAT	CGA	GAT	AAC	TAC
G	H	V	P	V	I	N	L	R	Q	G	G	V	D	R	D	N	Y
TTT	TTT	GTT	GCC	AAG	ACA	ATC	CAG	GAT	AAA	GTG	CTG	GCC	ATG	ATT	GCA	TTG	CTG
F	F	V	A	K	T	I	Q	D	K	V	L	A	M	I	A	L	L
TTG	CTG	TGG	CCG	TTG	TTA	ATC	ATC	ATT	GGG	ATT	GGT	ATC	AAG	TTC	AGT	TCC	CCA
L	L	W	P	L	L	I	I	I	G	I	G	I	K	F	S	S	P
GGT	CCG	GTA	TTG	TTC	CCG	CAA	CGC	CGC	CAT	GGC	TTG	AAT	GGG	CGT	GAG	TTT	TAT
G	P	V	L	F	R	Q	R	R	H	G	L	N	G	R	E	F	Y
GTG	CTC	AAA	TTT	CGT	TCG	ATG	CCG	GTG	CAT	GAC	GAT	CAA	AGT	CAG	CAT	CTG	AAG
V	L	K	F	R	S	M	R	V	H	D	D	Q	S	Q	H	L	K
CAA	GCC	AGT	CGT	AAT	GAC	AGT	CGT	ATC	ACT	GCT	TTT	GGT	GCG	TTC	CTG	CGT	CGC
Q	A	S	R	N	D	S	R	I	T	A	F	G	A	F	L	R	R
ACC	AGT	CTG	GAT	GAG	TTA	CCA	CAA	ATC	TTC	AAT	GTA	CTT	GGC	GGC	AGT	ATG	TCG
T	S	L	D	E	L	P	Q	I	F	N	V	L	G	G	S	M	S
ATT	GTT	GGC	CCG	CGT	CCT	CAT	GCG	GCG	CAG	CAC	AAC	AGT	TAT	TAC	GAG	AAA	TTG
I	V	G	P	R	P	H	A	A	Q	H	N	S	Y	Y	E	K	L
ATC	CAG	CAT	TAC	ATG	CAA	CGC	CAT	TAC	GTC	AAA	CCA	GGG	ATT	ACT	GGG	TGG	GCG
I	Q	H	Y	M	Q	R	H	Y	V	K	P	G	I	T	G	W	A
CAG	GTC	AAC	GGT	TTT	CGT	GGT	GAA	ACA	CAA	GAA	TTA	AGG	ACA	ATG	AAA	AAG	CGT
Q	V	N	G	F	R	G	E	T	Q	E	L	R	T	M	K	K	R
ATT	CAG	TAC	GAT	CIT	GAT	TAC	ATC	CGG	CGC	TGG	TCA	TTG	TGG	TTC	GAT	TTT	CGA
I	Q	Y	D	L	D	Y	I	R	R	W	S	L	W	F	D	F	R
ATT	ATT	GTT	TTG	ACT	TTA	GTA	CGT	GTA	CTT	GGT	CAG	AAA	AAT	GCT	TAT	TGA	
I	I	V	L	T	L	V	R	V	L	G	Q	K	N	A	Y		

Figura 3.10 – Sequência de nucleotídeos do gene gumD e sua tradução em aminoácidos. O códon iniciador está marcado em verde.

Comparando-se o alinhamento das seqüências obtidas do gene gumD clonado nos 3 diferentes vetores, observou-se no gene gumD clonado no vetor pMALc-2x uma mutação pontual e silenciosa (A12T). Esta mutação não foi observada nas outras construções (gumD-CR4-TOPO e pKK223-3).

Por estes alinhamentos conclui-se que o gene gumD encontra-se em fase na construção gumD-CR4-TOPO, gumD-pMAL-c2x e gumD-pKK223-3.

3.8.2) – Caracterização da proteína GumD através do sequenciamento da região N-terminal

O resultado do sequenciamento indicou a seqüência de 4 aminoácidos (-LLAD) correspondente ao N-terminal da enzima GumD. A metionina inicial não foi detectada porém este resultado não é inesperado uma vez que a *E. coli* apresenta enzimas específicas que clivam a metionina inicial das proteínas expressas quando o segundo resíduo não é muito grande (Lohmann *et al.*, 2001). Devido a amostra utilizada para a análise conter uma pequena quantidade da proteína (banda muito fina), não foi possível detectar uma quantidade maior de resíduos de aminoácidos.

3.8.3) – Determinação do ponto Isoelétrico (pI) da enzima GumD

Para o experimento de focalização isoeletrica foi utilizado 4 µL de uma alíquota contendo a proteína GumD numa concentração de 3 mg/mL. Foi usado neste experimento o Phast Gel com intervalos de pH de 3 a 9. A figura 3.11 apresenta o resultado da focalização isoeletrica da proteína GumD (poço 2).

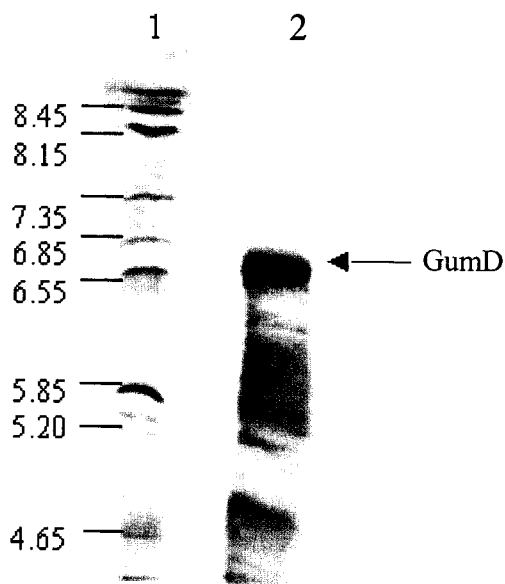


Figura 3.11– Focalização isoeétrica da enzima GumD obtida pelo sistema PhastSystem. Coluna 01: padrão de pI. Coluna 02: pI referente a GumD.

Após as medidas de distância dos padrões de pI em relação a um ponto fixo do cátodo, foi possível, utilizando-se o programa Origin 5.0, traçar o gráfico mostrado na figura 3.12. A equação que descreve o comportamento apresentado pela curva é $\text{Log pH} = 0,99 - 0,009 \times D$ (distância do cátodo).

A proteína GumD foi aplicada próximo a região superior ao gel (região do cátodo) e observou-se que a proteína migrou a uma distância de 17,3 mm em relação ao ponto fixo (distância do cátodo). Aplicando-se este valor a equação da reta $\text{Log pH} = 0,99 - 0,009 \times D$ (distância do cátodo), temos que o pI experimental da GumD é 6,83.

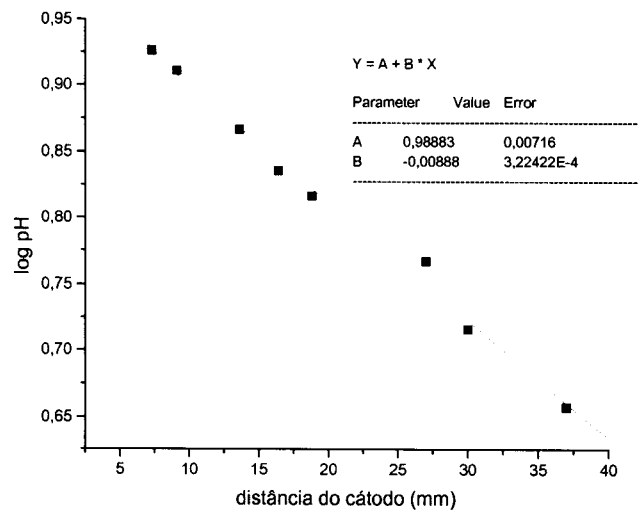


Figura 3.12 – Gráfico de regressão linear com o eixo y sendo Log pH e eixo x distância do cátodo (mm).

Utilizou-se o programa ExpASy (<http://www.expasy.ch>) para determinar o valor do pI teórico. O programa calculou um pI para a GumD de 10,10. É importante ressaltar que para calcular o pI teórico é levado em conta a cadeia polipeptídica linear, ou seja, é feita a soma das cargas líquidas de todas as cadeias laterais dos aminoácidos e resíduos da região carboxi- e amino-terminal. Em solução, as proteínas apresentam um determinado enovelamento onde as interações entre os resíduos podem afetar a carga líquida da molécula levando a valores de pI diferentes dos valores calculados.

Antes mesmo da determinação do valor experimental do pI já havia evidência para o pI da proteína GumD apresentar-se abaixo de 8,5 pois neste pH a proteína encontra-se carregada negativamente e em pH 6,0 carregada positivamente. Este fato foi observado nos testes de purificação da GumD quando o “kit” com as 7 resinas iônicas foi testado em 2 tampões de diferentes pH (Tris/HCl 50 mM pH8,5 e Citrato de sódio 100 mM pH 6,0, ambos contendo Tween-20).

3.8.4) – Determinação da Massa Molecular da enzima GumD

A análise teórica da massa molecular da enzima GumD através do programa ExPASy revelou um monômero de 56 kDa. O resultado da eletroforese em gel SDS-PAGE a 15% (figura 3.8) mostrou a presença de uma banda de expressão com massa molecular aparente de 56 kDa.

Para verificação da massa molecular da enzima GumD em relação a sua estrutura quaternária, aplicou-se uma pequena quantidade da enzima, na concentração de 1 mg/mL, em coluna de gel filtração Superdex-200.

Utilizou-se 3 padrões de massa molecular: Thiriomioglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa) e Aldolase (158 kDa), os quais foram aplicados em outra preparação respeitando as mesmas condições estabelecidas para a aplicação da proteína GumD. A figura 3.13 mostra o perfil cromatográfico da enzima GumD sobreposto ao perfil dos padrões de massa molecular.

Abaixo, segue a tabela mostrando os padrões de massa molecular e seus respectivos volumes de eluição:

Padrões de Massa Molecular	MW em kDa	Volume de Eluição (mL)	Log MW
Thirioglobulina	669	8,896	2,8254
Ferritina	440	10,061	2,6434
Aldolase	158	12,35	2,1986

Tabela 3.1 – Padrões de massa molecular.

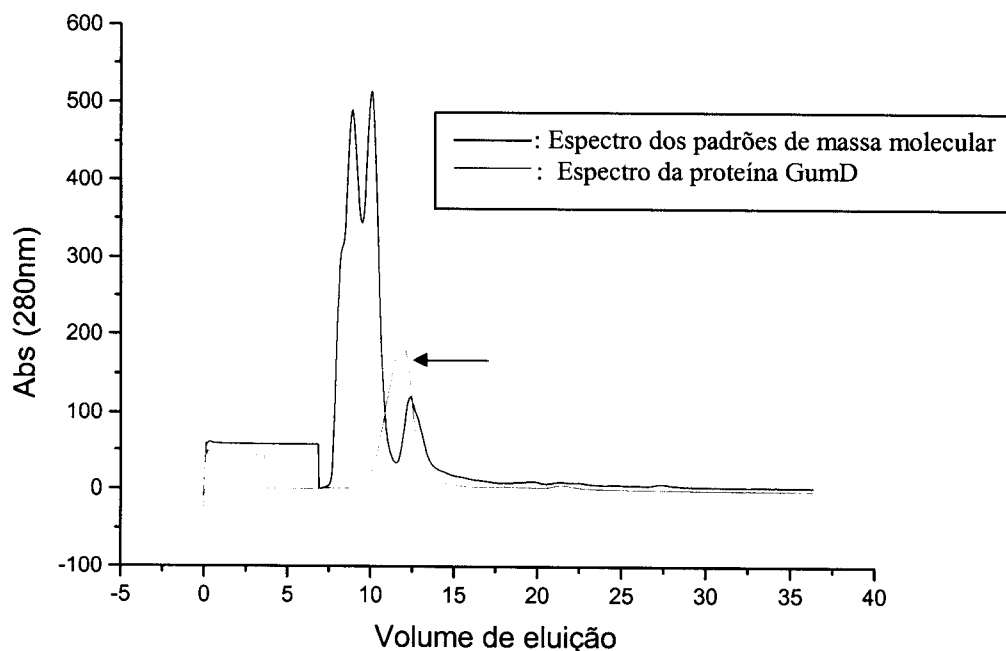


Figura 3.13 – Perfis cromatográficos da enzima GumD em vermelho e dos padrões de massa molecular em preto. A seta em vermelho mostra o pico referente a eluição da enzima GumD.

Utilizando-se os volumes de eluição dos padrões e o Log WM construiu-se um gráfico de regressão linear mostrado na figura 3.14. A equação $\text{Log} = 4,4681 - 0,18326 \times V_e$, descreve a equação da reta apresentada.

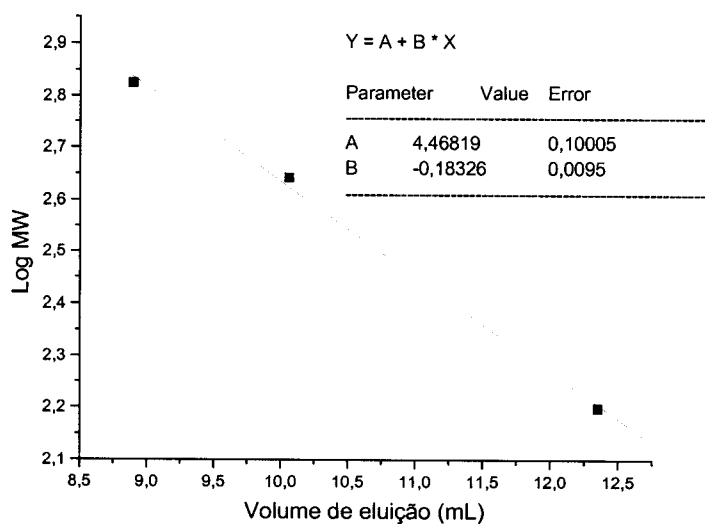


Figura 3.14 - Curva de calibração da coluna de gel filtração Superdex-200, utilizando proteínas com massas moleculares conhecidas.

O volume de eluição da proteína GumD foi de 11,921 mL e este valor foi aplicado na equação da reta, apresentando uma massa molecular de 192 kDa. Assim, sabendo-se que a massa molecular teórica do monômero é 56 kDa, a enzima GumD provavelmente apresenta-se em solução na forma de um trímero.

A mesma amostra da enzima GumD utilizada para determinação da massa molecular em coluna de filtração a gel foi analisada por espalhamento de luz (light scattering) e não apresentou nenhuma agregação ou precipitado. Porém a informação referente a massa molecular que pode ser observada por esta técnica não foi obtida com precisão devido a presença de bolhas do detergente Tween-20 atrapalhar a análise dos resultados.

3.8.5) – Análise da proteína GumD quanto ao seu enovelamento por Dicroísmo Circular

Devido a falta de um ensaio enzimático para a enzima GumD, necessário para verificação da sua atividade e conseqüente caracterização quanto ao seu enovelamento, utilizou-se outra técnica para a obtenção de informações referentes a estrutura secundária da proteína, chamada dicroísmo circular. A técnica de dicroísmo circular (Circular Dichroism – CD) foi utilizada nos estudos de enovelamento da proteína GumD devido a sua sensibilidade em distinguir a presença e a porção de elementos de estrutura secundária de proteínas.

Para este experimento foi utilizado uma alíquota de 500 μ L a 0,23 mg/mL da proteína GumD após sua purificação em coluna de troca aniônica MonoQ. A proteína foi dialisada contra Tris/HCl 10 mM pH8,5 com 0,5% de Tween-20 para retirada do sal NaCl eluído da cromatografia de troca aniônica. Um total de 8 varreduras, na

faixa de comprimentos de onda de 195 a 250 nm, foram tomadas para a construção de uma curva média.

A figura 3.15 mostra o espectro de CD da GumD, onde este apresenta um máximo positivo em 195,54 nm e dois mínimos negativos localizados em 209,3 e 220,7 nm respectivamente. Este espectro é característico de moléculas cuja estrutura secundária é predominante de α -hélices, e ilustra que a proteína encontra-se enovelada, muito provavelmente na sua forma “nativa”.

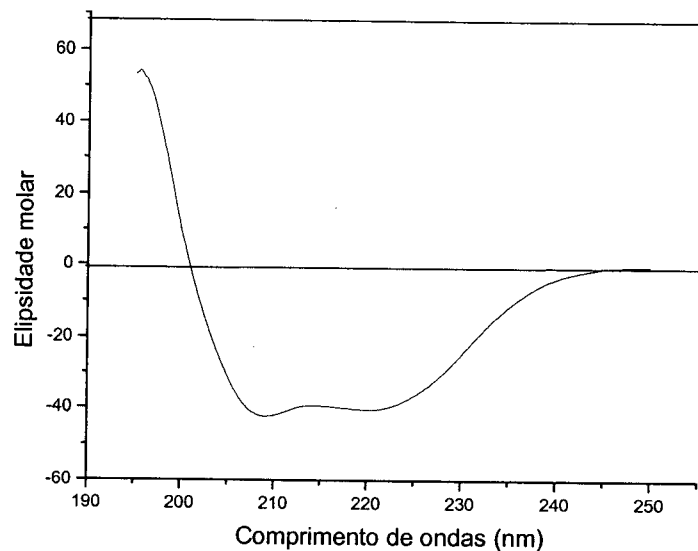


Figura 3.15 – Espectro de dicroísmo circular da enzima GumD com varredura de 195 a 250 nm.

Esse resultado foi então utilizado para o cálculo de desconvolução da curva média, para curvas equivalentes às proporções relativas a cada um dos elementos de estrutura secundária presentes. Para este cálculo foi utilizado o programa *Self Consistent* (SELCON-3) e o resultado da desconvolução pode ser observado na tabela 3.2.

Porções de estruturas secundárias	Frações (%)
α -hélice (Hr + Hd)	35,3
Folhas- β [S(r) + s(d)]	11,4
Turns	23,6
Elementos de estrutura não ordenada	32,0

Tabela 3.2 – Resultados de desconvolução do espectro de CD da enzima GumD.

A desconvolução baseada no espectro de CD da enzima GumD apresentou um RMS (desvio quadrático médio) de 8%, que poderia estar relacionado com o fato da amostra não estar homogênea. Na figura 3.8 observa-se contaminantes que correspondem a menos que 10%, porém, podem estar interferindo na decomposição deste espectro. No entanto, observa-se que o resultado de composição de estruturas secundárias é bastante próximo do obtido através de cálculo teórico utilizando-se o programa Gor IV (Garnier, J., 1996) (tabela 3.3). Somando-se o número de hélices (Hr + Hd) obtido na desconvolução (35,3%) pode-se considerar próximo ao número de hélices obtido por cálculo teórico (37,4%).

Porções de estruturas secundárias	Frações (%)
α -hélice	37,4
Folhas- β	21,49
Elementos de estrutura não ordenada	41,12

Tabela 3.3 - Resultados de predição de estruturas secundárias da enzima GumD usando o programa Gor.

3.8.6) – Análise de Fluorescência da proteína GumD

Para a complementação da caracterização da enzima GumD quanto a sua forma nativa, foi realizado um experimento de fluorescência, onde observa-se a emissão de fluorescência do aminoácido triptofano quando excitado no comprimento de onda de 290nm.

Para esse experimento foi utilizado uma alíquota de 500 μ L a 0,06 mg/mL da proteína GumD após sua purificação em coluna de troca aniônica MonoQ. A proteína foi dialisada contra Tris/HCl 10 mM pH8,5 com 0,5% de Tween-20 para retirada do sal NaCl eluído da cromatografia de troca aniônica. O comprimento de onda de excitação foi 290 nm e a emissão monitorada de 295 a 450 nm. A emissão máxima do triptofano foi em 330 nm, e este valor indica que os resíduos de triptofano não estão expostos em solução, ou seja, é um indício de que a proteína está na sua forma nativa. A figura 3.16 mostra o espectro de fluorescência da proteína GumD.

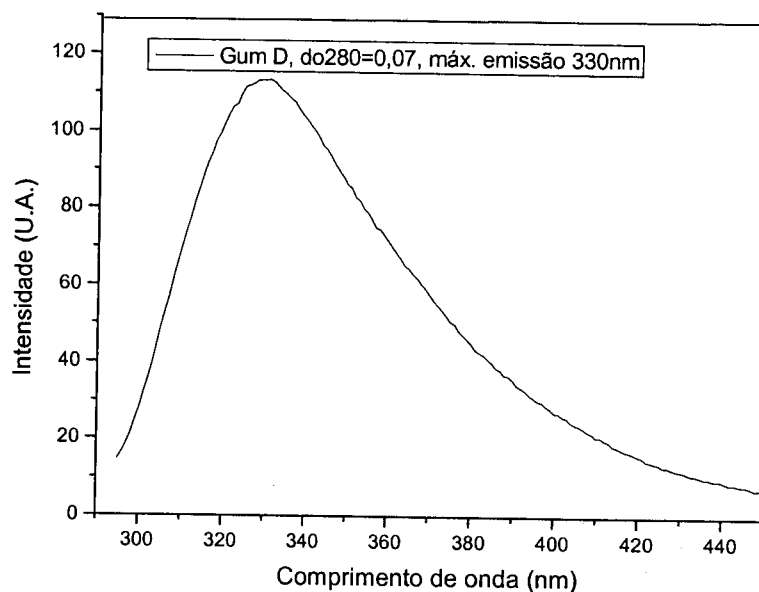


Figura 3.16 – Espectro de fluorescência da enzima GumD, mostrando emissão máxima do triptofano em 330 nm.

3.9) - Resumo dos resultados dos estudos realizados com a enzima GumD

Os resultados experimentais obtidos nos levaram a concluir que:

- A proteína de fusão GumD-MBP é expressa em pouca quantidade e permanece insolúvel;
- Tentativas para melhorar sua expressão foram realizadas variando-se a concentração de IPTG e a temperatura de indução, porém não se observou melhora na expressão;
- Transformou-se o DNA plasmidial (GumD-pMALc2x) em células de *E. coli* BL21 (DE3) e fez-se testes de expressão, porém nenhuma melhora na expressão da proteína de fusão GumD-MBP foi obtida;
- O gene gumD foi subclonado no vetor de expressão pKK223-3 e pequena fração da enzima GumD foi expressa de forma solúvel ;
- Experimentos para aumentar a expressão da proteína GumD foram realizados e observou-se uma melhor expressão quando esta é induzida com 1mM de IPTG a 20°C por 10horas;
- Após a utilização de três colunas cromatográficas: DEAE Fast Flow, Superdex-200 e Mono-Q conseguiu-se purificar a proteína GumD.
- A enzima recombinante GumD foi caracterizada através da análise seqüencial da região N-terminal, quanto a sua massa molecular e pI. Estudos espectrais indicaram que a enzima é expressa com enovelamento esperado para proteínas ativas.

3.10) – Referências Bibliográficas

GARNIER, J.; GIBRAT, F. and ROBSON, B. GOR secondary structure prediction method version IV. **Methods in Enzymology** v. 266, p. 540-553, 1996.

Lasergene Sequence Analysis Software for Windows and Macintosh – DNASTar – version 5, 2001.

LOHMANN, K.; WESTERDORF, B.; MAYTUM, R.; GEEVE, M.A. and KORNELIA J. Overexpression of Human Cardiac Troponin in *Escherichia coli*: Its purification and characterization. **Protein Expression Purif.** V.21, p.49-59, 2001.

ENZIMA GUMC

Neste capítulo serão apresentados os resultados de todos os experimentos desenvolvidos para a expressão, purificação e caracterização da enzima GumC.

4.1) - Experimentos de Expressão e Solubilidade da GumC no vetor pMAL-c2X

O gene gumC foi inserido no polylinker do vetor pMAL de forma a fazer fusão com o gene malE, que codifica a proteína que liga maltose (MBP), resultando na expressão de uma proteína de fusão GumC-MBP.

Foi realizado um teste de expressão para a proteína de fusão GumC-MBP contida na cepa de *E. coli* DH5 α , de acordo com instruções do manual do vetor pMAL, utilizando 0,6 mM de IPTG para indução por 4 horas a 37°C e teste de solubilidade onde as células foram lisadas pela técnica de congelamento e descongelamento seguido de sonicação. Observou-se a expressão da proteína de fusão, com massa molecular esperada em 94 kDa. Experimento de lise celular, mostrou uma maior quantidade de proteína de fusão no “pellet” em relação ao sobrenadante.

Tentou-se expressar a proteína de fusão GumC-MBP induzindo-a com 0,6 mM a 20°C por 10 horas na tentativa de aumentar a solubilidade desta. Nesse experimento conseguiu-se aumentar a expressão da proteína de fusão embora ainda permanecesse majoritariamente no precipitado.

Células da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas contendo o DNA plasmidial (gumC-pMALc2x) na tentativa de aumentar a solubilidade da proteína de fusão GumC-MBP. De fato observou-se um aumento na expressão da proteína de fusão, porém não aumentou a solubilidade da mesma.

4.2) - Experimento de Purificação da GumC-MBP e teste de clivagem com o Factor Xa

Após estabelecido o protocolo de expressão da proteína de fusão GumC-MBP em células de *E. coli* BL21 (DE3), utilizando o protocolo de indução com 0,6 mM de IPTG por 10 horas a 20°C e lise celular pelo método do congelamento e descongelamento com adição de lisozima seguido de sonicação, um primeiro experimento de purificação da GumC-MBP foi realizado a partir de 500mL de meio LB. A cultura de células foi centrifugada após a lise e diluída cinco vezes com o tampão de lise. A aplicação da proteína de fusão GumC-MBP em coluna de amilose foi semelhante a realizada para a proteína GumD-MBP e o perfil de eluição da GumC-MBP foi semelhante ao da GumD-MBP, mostrado na figura 3.2 para a proteína GumD-MBP.

A figura 4.1 de um gel SDS-PAGE a 15% mostra a eluição da proteína de fusão GumC-MBP.



Figura 4.1 - Purificação parcial da proteína de fusão GumC-MBP na coluna amilose, analisada em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 01: padrão de massa molecular. Colunas 02: cultura de células antes da indução. Coluna 03: cultura de células após indução e após lise celular (“pellet”). Colunas 04: cultura de células após indução e após lise celular (sobrenadante). Colunas 05 e 06: frações eluídas da coluna de amilose contendo a proteína de fusão GumC-MBP.

Pode-se observar que uma grande quantidade da proteína GumC-MBP permanece insolúvel.

Após purificação em coluna de amilose a amostra contendo a proteína de fusão GumC-MBP foi submetida aos experimentos de clivagem com o Factor Xa. Adicionou-se 0,2 μL de Factor Xa em 200 μL da amostra de modo que ficasse na concentração 1 Factor Xa : 100 GumC-MBP. Recolheu-se alíquotas após 2, 17, 24, 49 e 216 horas de clivagem com Factor Xa (figura 4.2).

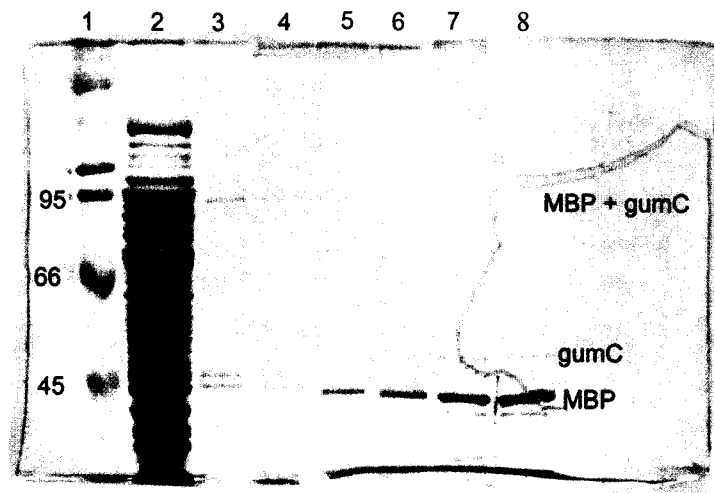


Figura 4.2- Clivagem da proteína de fusão GumC-MBP com Factor Xá (1: 100) analisada em gel de SDS-PAGE a 10%. Coluna 1: Padrão de massa molecular: BSA, 66 kDa; Ovalbumina, 45 kDa. Coluna 2: Cultura de *E. coli* após lise, sobrenadante, aplicada na coluna de amilose. Coluna 3: Fração eluída da coluna de amilose. Coluna 4-8: Fração eluída da coluna de amilose clivada com Fator Xa (1:100) durante 2, 17, 24, 49 e 216 horas, respectivamente.

Os experimentos de clivagem se mostraram muito lentos, tendo sido observada a clivagem parcial da proteína de fusão no período de 10 dias de clivagem.

Casos como esses são citados no manual do vetor pMAL e um dos motivos que pode levar a dificuldade na clivagem pelo Factor Xa é o próprio enovelamento da proteína de fusão que impede a interação da protease com o sítio de clivagem da proteína. O manual sugere adição de pequenas quantidades de detergente que pode fazer com que esta interação seja facilitada.

Na tentativa de melhorar a quantidade de proteína clivada e também de diminuir o tempo necessário de clivagem, realizou-se testes de clivagem na presença de SDS em diversas concentrações (0,003, 0,005 e 0,001%). Os resultados obtidos, não apresentaram nenhuma melhora na clivagem da GumC-MBP.

Devido a baixa solubilidade e conhecimento prévio da alta hidrofobicidade da GumC (a análise da seqüência da GumC, através de banco de dados, revelou a presença de 48% de resíduos hidrofóbicos), resolveu-se adicionar no tampão de ressuspensão do “pellet” (tampão de lise), 0,5% de detergente Triton X-100, para

observar se sua solubilidade aumentava. Na figura 4.3 está ilustrado o experimento de expressão da proteína GumC-MBP na presença do detergente Triton X-100. Observa-se o aumento da solubilidade e portanto o detergente foi incorporado em todas as etapas de purificação da GumC-MBP.

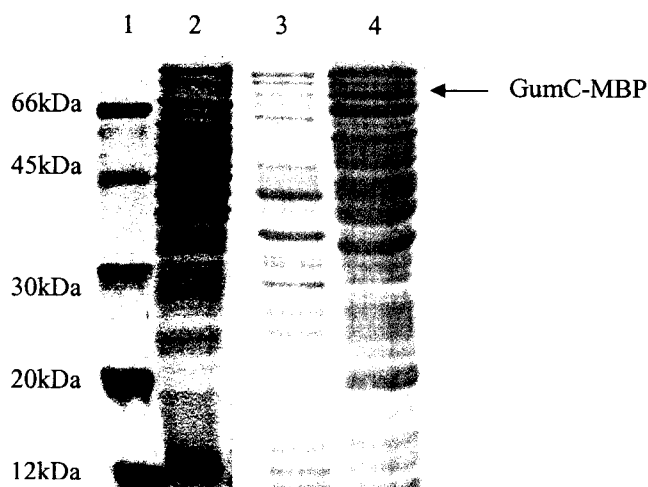


Figura 4.3—Expressão e solubilidade da proteína de fusão GumC-MBP na presença de Triton X-100 analisadas em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: culturas de células antes da indução. Coluna 3: cultura de células após indução e lise celular (“pellet”). Coluna 4: cultura de células após indução e lise celular (sobrenadante).

Experimento de purificação, partindo-se de 500mL de meio de cultura, na presença de 0,5% do detergente Triton X-100 ao tampão de lise celular está ilustrado na fig. 4.4.

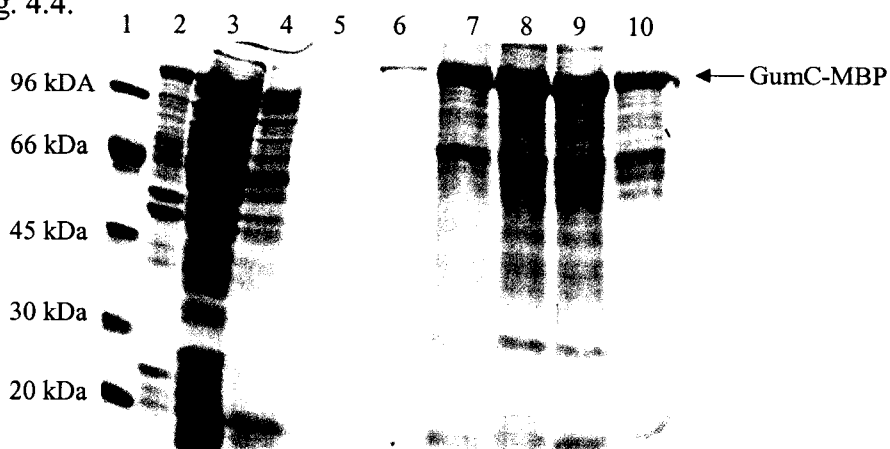


Figura 4.4—Purificação parcial da proteína de fusão GumC-MBP em coluna de amilose, após adição de 0,5% Triton X-100 no tampão de lise celular, analisada em gel de SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas 2 e 3: cultura de células após indução e lise celular (“pellet” e sobrenadante, respectivamente). Coluna 4: fração eluída na lavagem da coluna de amilose. Colunas 5, 6, 7, 8, 9 e 10: frações eluídas da coluna de amilose durante eluição da maltose.

Uma das frações eluídas da coluna de amilose (coluna 10 da fig. 4.4) foi utilizada para testes de clivagem com Factor Xa na concentração de 1: 100. Na figura 4.5 está ilustrado o experimento de clivagem da proteína de fusão após 24hs. Observou-se que com a adição do detergente Triton X-100 ocorre uma melhora no processo de digestão quando comparado com o experimento realizado na ausência do detergente (fig. 4.2).

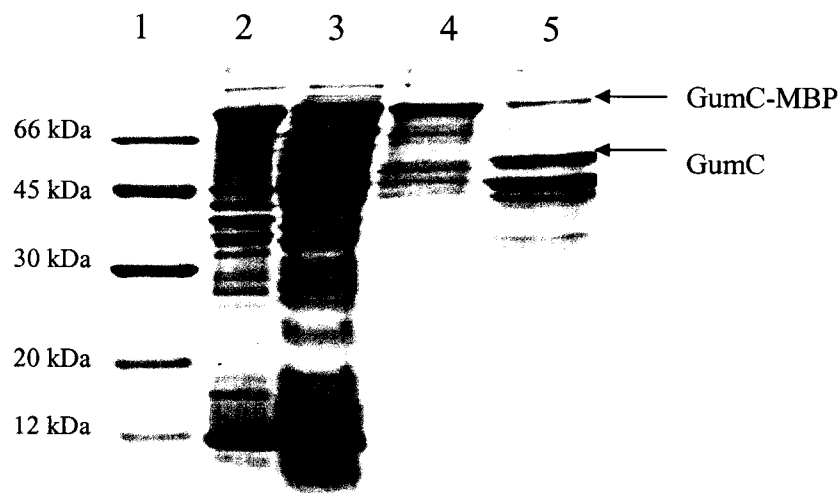


Figura 4.5 – Teste de clivagem da proteína de fusão GumC-MBP com o Factor Xa (1: 100) na presença de 0.5% de Triton X-100, analisado em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: cultura de células após indução (“pellet”). Coluna 3: cultura de células após indução (sobrenadante). Coluna 4: alíquota de uma fração eluída da coluna de amilose. Coluna 5: alíquota de uma fração contendo a proteína GumC-MBP após 24hs de clivagem com o factor- Xa.

A caracterização da proteína GumC-MBP foi feita através de Imunoblotting. Uma das frações eluídas da coluna de amilose foi eletrotransferida para membrana de nitrocelulose e corada com Ponceau. A membrana foi então incubada com o anticorpo anti-MBP durante 2hs. A membrana foi lavada com TBS e incubada por mais duas horas com o anticorpo anti-IgG de camundongo. Após essa incubação a membrana foi revelada com solução de NBT/BCIP (conforme item 2.17).

A figura 4.6 mostra a reação do antígeno (GumC-MBP) com o anticorpo (anti-MBP).

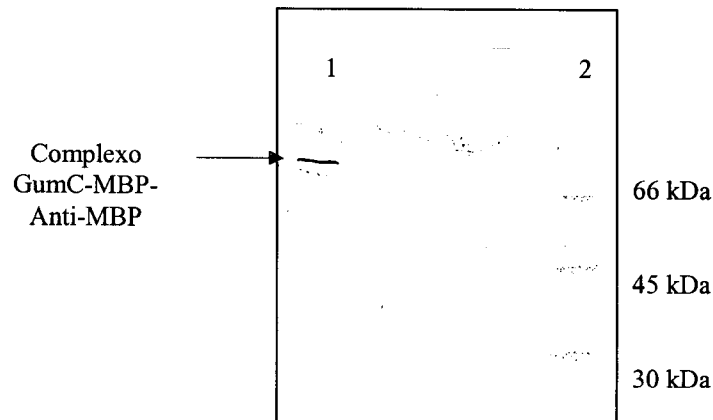


Figura 4.6 – Membrana de nitrocelulose mostrando a reação do antígeno GumC-MBP com o anticorpo anti-MBP. Coluna 1: reação GumC-MBP-Anti-MBP. Coluna 2: Padrão de massa molecular.

Observou-se (figura 4.4) que as frações eluídas da coluna de amilose, contendo a fusão GumC-MBP, não estavam totalmente puras. Portanto, outras colunas cromatográficas estão sendo utilizadas para melhorar a purificação da proteína em fusão. Paralelamente, experimentos de subclonagem do gene *gumC* (que codifica a proteína GumC) no vetor de expressão pET29a começaram a ser realizados.

4.3) - Subclonagem do gene *gumC* no vetor de clonagem pGEM-T

A subclonagem do gene *GumC* no vetor pET29a diretamente com o DNA produzido através da PCR não foi positiva. Portanto, o gene *GumC* foi subclonado no vetor de clonagem pGEM-T para melhor controle da digestão com as enzimas de restrição.

O experimento de clonagem do gene *gumC* também foi realizado seguindo a estratégia que é a de amplificar o DNA através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) partindo dos 'primers' desenhados para cada gene e utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase.

O DNA plasmidial GumC-pGEM-T foi clivado com as enzimas de restrição *Hind*III e *Nde*I e o vetor de expressão pET29a foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição. Após a ligação do inserto gumC no vetor pET29a, o produto foi utilizado para transformação em células da cepa de *E coli* DH5 α . O DNA plasmidial extraído das colônias foi digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Nde*I. A figura 4.7 mostra o gel de agarose 0,8% com o gene gumC e o vetor pET29a digeridos pelas enzimas *Hind*III e *Nde*I.

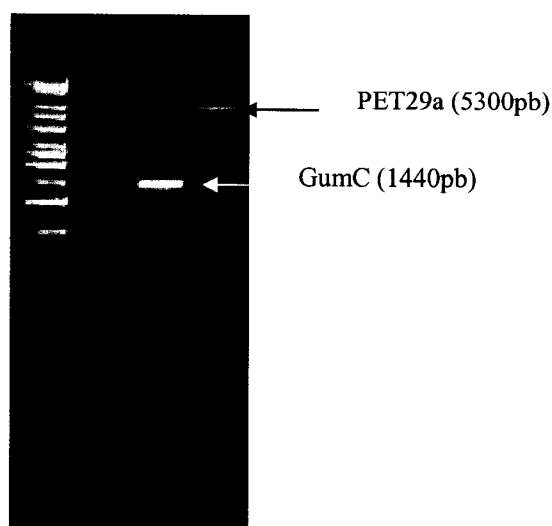


Figura 4.7 - Gene gumC e o vetor pET29a digeridos com as enzimas *Hind*III e *Nde*I, analisados em gel de agarose a 0,8%.

4.4) –Caracterização do gene gumC

O inserto gumC clonado nos vetores de expressão pMAL-c2x e pET29a foi sequenciado pelo método de Sanger utilizando o equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer). Para o sequenciamento do gene gumC (1440pb), no vetor pMALc-2x foi utilizado o “primer” 5’(malE primer) e para o gene gumC no vetor pET29a foram utilizados os “primers” 5’ (T7) e 3’(pET SP6). As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa SeqMan (DNASStar), onde uma seqüência consenso foi obtida. A estratégia utilizada para o alinhamento é mostrada na figura 4.8.

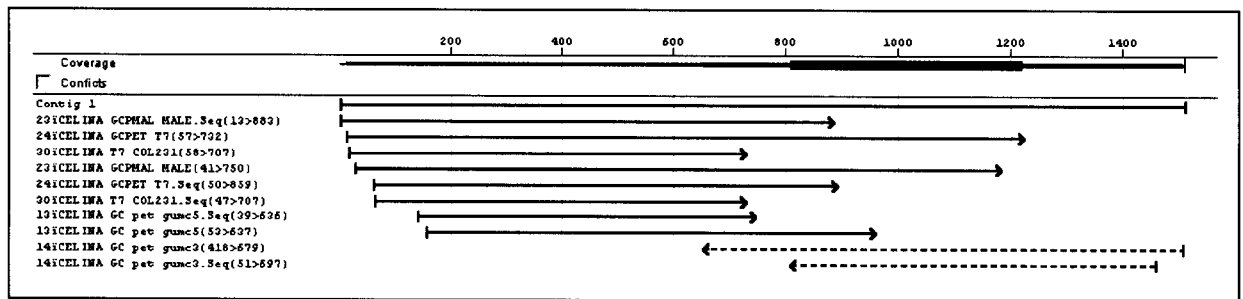


Figura 4.8 – Estratégia de alinhamento das extremidades 5’ e 3’ do gene gumC nos vetores pMALc-2x e pET29a produzido pelo programa SeqMan. Os alinhamentos indicados pela seta → (sentido esquerda para direita) representam os alinhamentos das extremidades 5’ e os alinhamentos indicados pela seta ← (sentido direita para esquerda) representam os alinhamentos das extremidades 3’.

Após, a seqüência consenso (1440pb) obtida pelo alinhamento foi traduzida e submetida a busca por identidade seqüencial através do BLAST, o que mostrou 100% de identidade com a enzima GumC da *X. fastidiosa*.

Por estes alinhamentos conclue-se que o gene gumC encontra-se em fase na construção gumC-pMAL-c2x e gumC-pET29a.

4.5) – Expressão da proteína GumC no vetor pET29a

Após transformação da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o DNA plasmidial (gumC-pET29a), testes de expressão foram realizados tendo variantes como: concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução. Observou-se uma maior expressão da proteína, quando esta foi induzida com 0,3mM de IPTG a 20°C por 20 horas, porém a proteína encontra-se insolúvel (fig. 4.9).

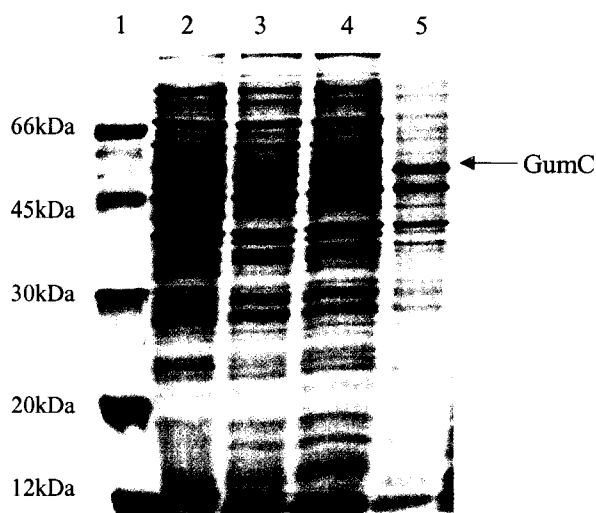


Figura 4.9 - Expressão da proteína GumC em células BL21 (DE3) induzidas com IPTG 0,3mM a 20°C por 20 horas, analisada em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Coluna 2: Cultura de células antes da indução. Coluna 3: cultura de células (“pellet”) após a indução. Coluna 4: cultura de células após indução (sobrenadante). Coluna 5: proteína GumC precipitada contendo impurezas.

Também foram realizados testes de expressão com outras cepas de *E. coli*, como BL21 (DE3-RIL) e BL21 (DE3-RP), ambas Codon Plus, nas mesmas condições anteriores (indução com 0,3 mM de IPTG a 20°C por 20 horas). Os resultados obtidos foram comparados com a expressão obtida anteriormente com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (fig. 4.9). Verificou-se uma melhor expressão utilizando as cepas de *E. coli* BL21 (DE3- RP) e BL21 (DE3-RIL). Uma melhora na solubilidade da proteína GumC foi observada quando se utilizou a cepa de *E. coli* BL21 (DE3-RIL). A figura 4.10 mostra este experimento.

Portanto, experimentos de purificação foram iniciados com a enzima GumC expressa nesta cepa.

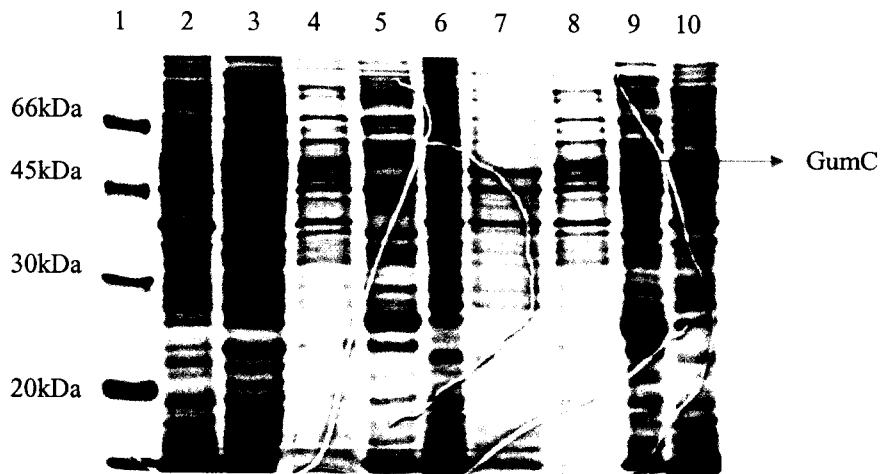


Figura 4.10- Teste de expressão utilizando 3 cepas diferentes de *E. coli* BL21 (DE3, DE3-Ril e DE3-RP), analisado em gel SDS-PAGE a 15%. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas 2: e 3 cultura de células BL21 (DE3) após indução e lise celular (sobrenadante e “pellet”, respectivamente). Colunas 4 e 8: cultura de células antes da indução. Coluna 5 e 6: cultura de células BL21 (DE3-RP) após a indução e lise celular (sobrenadante e “pellet”, respectivamente). Coluna 7: proteína GumC precipitada. Colunas 9 e 10: cultura de células de *E. coli* BL21 (DE3-RIL) após indução e lise celular (sobrenadante e “pellet”).

Inicialmente o mesmo procedimento adotado para a escolha de resina na purificação da enzima GumD foi utilizado para a GumC. As 7 colunas iônicas do kit da Amersham Pharmacia Biotech foram utilizadas como um “screening” para determinação da resina ideal. Observou-se interação da proteína GumC com a resina DEAE Sepharose no tampão Mes/NaOH 50 mM pH6,0.

Experimentos de purificação em larga escala da enzima GumC, expressa de forma “nativa” oriunda da clonagem no vetor pET29a, serão realizados para posterior caracterização da mesma.

Com o objetivo de um método de caracterização da proteína GumC resolveu-se utilizar a proteína de fusão GumC-MBP parcialmente pura para produção de anticorpos em camundongos.

4.6) – Produção de anticorpo anti-GumC-MBP em camundongos

A produção de anticorpos específicos em animais, como o camundongo é obtida quando injeta-se no animal uma pequena quantidade da amostra (antígeno) que se quer produzir anticorpo.

A proteína de fusão GumC-MBP eluída da coluna de amilose foi utilizada como antígeno. Três camundongos foram utilizados neste experimento. A primeira inoculação (primeira dose) foi realizada utilizando 50µL (100µg) do antígeno e 50µL de coadjuvante. Após 40 dias, fez-se a segunda inoculação, injetando 100µL (15µg) da proteína GumC-MBP sem a presença de coadjuvante. Decorridos 10 dias da segunda inoculação, sangrou-se o animal. O sangue total foi coagulado em banho-maria a 37°C e após centrifugado por 30 min., 10.000 rpm a 4°C. O soro (sobrenadante do centrifugado) contendo anticorpos contra a proteína de interesse foi incubado com um lisado de cultura de células da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para diminuir as reações cruzadas causadas pela contaminação com proteínas da bactéria *E. coli*. A titulação do anticorpo foi feita nas seguintes concentrações de anti-GumC-MBP em solução TBS 1:1000, 1: 5000, 1: 10.000, 1 : 15.000, 1:20.000, 1:30.000, 1:40.000, 1:50.000, 1: 60.000 e 1 : 70.000 por imunoblotting.

O resultado da titulação do anticorpo anti-GumC-MBP complexado com o antígeno GumC-MBP, mostrado na figura 4.11, indica que o anticorpo na concentração 1 : 30.000 apresenta um título bom.

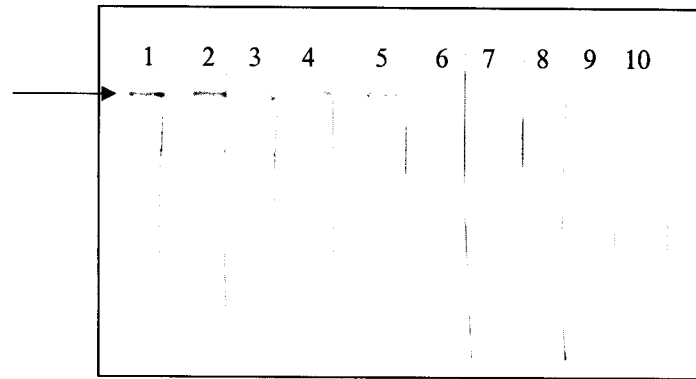


Figura 4.11 – Membrana de nitrocelulose mostrando a titulação do anticorpo anti-GumC-MBP. Colunas de 1 a 9 anticorpo anti-GumC-MBP complexado com a proteína GumC-MBP para diferentes diluições do anticorpo: 1 : 1000, 1 : 5000, 1 : 10.000, 1 : 15.000, 1 : 20.000, 1 : 30.000, 1 : 40.000, 1 : 50.000 1 : 60.000 e 1 : 70.000, respectivamente.

Este soro foi utilizado para reação com uma das frações eluídas da coluna de amilose contendo GumC-MBP através de Western-blotting. A mesma amostra foi utilizada em Western-blotting contra anti-MBP.

A figura 4.12 ilustra um gel de poliacrilamida da fração contendo a proteína GumC-MBP e as bandas correspondentes a reação da proteína com os anticorpos anti-MBP e anti-GumC-MBP.

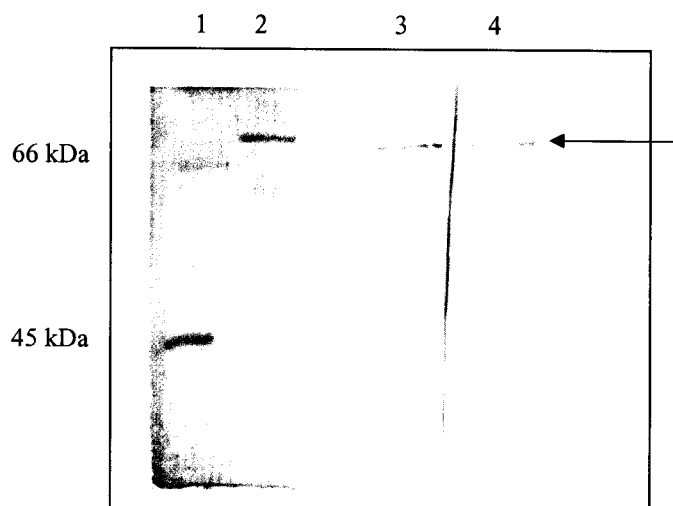


Figura 4.12 - Reação de Western-blotting mostrando as reações dos anticorpos anti-GumC-MBP e anti-MBP com o antígeno GumC-MBP (colunas 3 e 4 respectivamente). As colunas 1 e 2 representam o padrão de massa molecular e a proteína de fusão GumC-MBP em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue.

4.7) – Resumo dos resultados obtidos nos estudos da enzima GumC

- A proteína de fusão GumC-MBP, clonada no vetor de expressão pMAL-c2x, cujo DNA plasmidial (gumC-MBP) foi transformado em células de *E. coli* DH5 α , foi expressa de forma insolúvel;
- O DNA plasmidial foi então transformado em células de *E. coli* BL21 (DE3), o que aumentou consideravelmente a expressão da proteína GumC-MBP, porém uma parte da proteína de fusão permanecia insolúvel;
- Os experimentos de purificação da proteína de fusão GumC-MBP apresentaram um rendimento baixo da proteína de fusão devido a perda desta em corpo de inclusão. Testes de clivagem realizados com o Factor Xa se mostraram muito lentos, chegando a GumC-MBP ficar clivando por dias e ainda assim a clivagem não foi totalizada.
- A solubilidade da proteína de fusão GumC-MBP foi melhorada com adição de 0,5% do detergente Triton X-100 ao tampão de lise;
- A purificação parcial da fusão GumC-MBP serviu para a produção de anticorpos anti-GumC-MBP em camundongos;
- Paralelamente às tentativas de expressão e solubilização da proteína de fusão GumC-MBP, decidiu-se subclonar o gene gumC, que codifica para a proteína GumC, no vetor de expressão pET29a, sem a expressão de nenhuma fusão;
- Fez-se transformações em células de *E. coli* BL21 (DE3-RP) e BL21 (DE3-RIL) Codon Plus, na tentativa de melhorar a solubilidade da proteína GumC. Houve um aumento da solubilidade da GumC quando se trabalhava com as células de *E. coli* BL21 (DE3-RIL) Codon Plus;
- Os experimentos de purificação da enzima GumC expressa no vetor pET29a encontram-se em andamento.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o objetivo geral de contribuir no combate à doença CVC, estudos com duas enzimas envolvidas na via biossintética da goma fastidiana foram iniciados. Estudos tem mostrado que uma inibição da primeira ou última etapa de produção da goma, diminui a patogenicidade da bactéria *Xanthomonas campestris*. Devido a alta homologia entre o Operon das duas bactérias acredita-se que a mesma deva ocorrer em *Xylella fastidiosa*.

Assim as enzimas GumD, uma glicosiltransferase, e GumC, provavelmente envolvida na polimerização e / ou na exportação do exopolissacarídeo através da membrana, foram escolhidas para este trabalho.

A GumD teve seu gene clonado em dois vetores de expressão. A proteína expressa na forma solúvel foi purificada e caracterizada.

A proteína GumC também foi clonada em dois vetores de expressão. Procedimentos de purificação estão sendo desenvolvidos para a obtenção da enzima.

A partir do protocolo de purificação já estabelecido para a enzima GumD espera-se iniciar ensaios de cristalização e obtenção de cristais a fim de coletar-se dados de difração de raios-X e derivados isomorfos de átomos pesados para posterior resolução, análise e correlação com a função biológica da proteína. Também pretende-se estabelecer um teste de atividade enzimática para a enzima.

Para a proteína GumC espera-se estabelecer um protocolo de purificação e a partir daí passar para a etapa de caracterização e cristalização da enzima. Pretende-se também a obtenção de cristais para coletas de dados de difração de raios-X e

Capítulo 5 - Conclusões e Perspectivas

derivados isomorfos de átomos pesados já que esta enzima, como a GumD, também não apresenta nenhuma proteína com estrutura homóloga resolvida. A resolução, análise e correlação com a função biológica da enzima também fazem parte do projeto de doutorado da aluna.

Estudos cristalográficos das duas enzimas poderão produzir informações estruturais que irão contribuir para o conhecimento da via biossintética da goma fastidiana e para o desenvolvimento de inibidores específicos.