ALINE SAMPAIO PINTO

**Caracterização estrutural e análises funcionais das proteínas periplasmáticas
NrtT e PotF de transportadores do tipo ABC de
Xanthomonas axonopodis pv. *citri***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2015

ALINE SAMPAIO PINTO

**Caracterização estrutural e análises funcionais das proteínas periplasmáticas
NrtT e PotF de transportadores do tipo ABC de
Xanthomonas axonopodis pv. *citri***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Andrea Balan

Versão original

São Paulo
2015

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

© reprodução total

Pinto, Aline Sampaio.

Caracterização estrutural e análises funcionais das proteínas periplasmáticas NrtT e PotF de transportadores do tipo ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ABC transporter / Aline Sampaio Pinto. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Balan.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia estrutural e funcional de proteínas.

Versão do título para o inglês: Structural characterization and functional analysis of the NrtT and PotF periplasmic proteins of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ABC transporter.

1. Proteínas de transporte 2. Fitopatógenos 3. Putrescina 4. SAXS
5. Análises biofísicas 6. Alcano sulfonatos I. Balan, Profa. Dra. Andrea II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB057/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Aline Sampaio Pinto.

Título da Tese: Caracterização estrutural e análises funcionais das proteínas periplasmáticas NrtT e PotF de transportadores do tipo ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ABC transporter.

Orientador(a): Profa. Dra. Andrea Balan.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Comissão de Ética no uso de Animais
CEUA/CNPEM

Certificado de Isenção

Certificamos que o projeto “Caracterização estrutural e análises funcionais do transportador de Nitrito/Nitrato do tipo ABC em Xanthomonas axonopodis pv. citri” (protocolo nº 10), sob responsabilidade de Andrea Balan Fernandes, foi analisado na presente data pela CEUA- Comissão de Ética no uso de Animais, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal que justifique a aprovação quanto aos princípios éticos exigidos pela Comissão.

Campinas, 26 de novembro de 2013

_____
Dra. Carolina F. M. Z. Clemente
Presidente

_____
Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio
Bióloga

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus. Toda dificuldade e obstáculos ao longo dessa trajetória foram vencidos graças a Ele que não me deixou cair tampouco desistir.

Aos meus pais, pelo apoio e confiança, sem os quais este sonho jamais teria sido realizado.

Ao Gustavo Cremonesi. Além de amigo e namorado, um grande companheiro em toda a minha trajetória acadêmica. Agradeço por toda paciência, respeito e compreensão em cada decisão tomada e em cada desafio e dificuldade vencidos.

À Carla Cristina, Cristiane Tambascia, Joice Helena e Mariana Moraes. Pela amizade mais que verdadeira, por todo apoio pessoal e profissional, pela convivência divertida mesmo nas horas mais difíceis. Agradeço por cada pré-inóculo colocado, cada placa retirada da estufa, cada coluna equilibrada e, principalmente, por cada brinde, cada viagem, cada piada e por cada momento toranja. Obrigada por estarem presentes na minha vida e na minha carreira tornando-as mais alegres e inesquecíveis.

Aos pequenos Nick, Lui, Black e Mia, por tanto carinho e amor e por tornarem a trajetória mais fofa entre uma passeio e outro, uma brincadeira e outra.

À minha orientadora Andrea Balan por ter me aceitado como aluna com tanto entusiasmo e motivação. Agradeço por todo conhecimento adquirido, amizade, por nunca ter desistido, mas, principalmente, pela oportunidade dada que me fez crescer pessoal e cientificamente.

Juliana Fattori. Agradeço à conterrânea pela amizade, caronas, pelos diversos ITC's realizados e pela paciência com cada um deles.

Vanessa Pegos Micheli Fagundes e Rafael Canevarollo, pela amizade, convivência, discussões científicas e tudo o que fez dessa jornada mais rica cientificamente e mais alegre.

À banca examinadora por se disponibilizarem em avaliar esse trabalho, contribuindo para um trabalho mais sofisticado e elaborado.

Ao coordenador e técnica do laboratório de Cristalização (RoboLab) do Laboratório Nacional de Biosciência (LNBio) por produzir as condições e as placas de cristalização.

Aos coordenadores e técnicos do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biosciência (LNBio) pela disponibilidade, atenção e cuidado prestados à mim e às minhas amostras.

Aos coordenadores e técnicos das linhas de luz MX2 e SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela disponibilidade e atenção prestada.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Este projeto foi realizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisas e Energia em Materiais (CNPEM) sendo financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, número processo 2011/22386-2.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

PINTO, ALINE SAMPAIO. **Caracterização estrutural e análises funcionais das proteínas periplasmáticas NrtT e PotF de transportadores do tipo ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.

A bactéria fitopatogena *Xanthomonas citri* (*X. citri*) é o agente causador do cancro cítrico, doença que afeta muitas áreas de cultivo de citros com impacto significativo no comércio mundial destes frutos. Muitos estudos reportam transportadores do tipo ABC como essenciais para o crescimento e patogênese de *X. citri*, dentre eles os transportadores envolvidos na captação dos mais diversos nutrientes incluindo fontes de nitrogênio e enxofre. O gene *nrtT* codifica a proteína periplasmática do transportador ABC responsável pelo suposto transporte de nitrato/nitrito/taurina. No presente trabalho, mostramos que a deleção deste gene afeta o crescimento *in vitro* de *X. citri*, porém, análise fenotípica do cancro e o crescimento bacteriano se mostraram reduzidos e atrasados durante a infecção de *X. citri* deletéria do gene *nrtT* em folhas de *Citrus sinensis*. Nossas análises também mostraram que a produção de goma xantana e capacidade de aderência são afetadas pela ausência de *nrtT*, indicando sua importância para o crescimento e desenvolvimento da bactéria na planta, uma vez que estes compostos são considerados fatores diretamente relacionados ao desenvolvimento e patogenicidade de *X. citri*. Foi estabelecido um protocolo de clonagem, expressão e purificação de NrtT para ensaio biofísicos e estruturais. Análises de DLS mostraram que NrtT apresenta polidispersividade de 5,9% e conformação monomérica, dados esses confirmados SAXS. Análises de CD e SAXS revelaram que o alcano sulfonatos MOPS altera a estrutura secundária de NrtT além de conferir maior estabilidade térmica nos ensaios de desnaturação, o que nos leva a supor que NrtT seja ligadora de alcanos sulfonatos e não necessariamente de nitrato/nitrito. Ensaios de cristalização estão em etapa de refinamento para a obtenção de cristais de NrtT. Outra proteína tida como importante para o desenvolvimento do cancro, é a proteína PotF descrita como uma proteína periplasmática ligadora de putrescina (PotF) de *X. citri*. Foram estabelecidos os protocolos de expressão e purificação e as análises biofísicas mostram que PotF tem 5,2% de polidispersividade e se apresenta no estado monomérica, dados estes confirmados por SAXS. A presença de putrescina não alterou de forma significativa a conformação nem a estabilidade térmica de PotF, entretanto, análises de SAXS mostraram alterações na estrutura de PotF, indicando um movimento da estrutura quando na presença de putrescina. Já foram obtidos cristais bidimensionais e tridimensionais e estão em etapa de refinamento para a co-cristalização com putrescina para monitorarmos as alterações conformacionais e os aminoácidos envolvidos na ligação proteína-ligante.

Palavras-chave: Proteínas de transporte. Fitopatógenos. SAXS. Alcano sulfonatos.

ABSTRACT

PINTO, ALINE SAMPAIO. **Structural characterization and functional analysis of the NrtT and PotF periplasmic proteins of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ABC transporter.** 2015. 101 p. Ph.D thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.

The phytopathogen *Xanthomonas citri* (*X. citri*) is the causative bacterium of citrus canker, a disease that affects many areas of citrus cultivation in tropical and subtropical regions, with significant impact on world trade of these fruits. Many studies report the type ABC transporters as essential for growth and pathogenesis of *X. citri*, including transporters involved in the uptake of various nutrients such as nitrogen and sulfur sources. The *nrtT* gene encodes the periplasmic protein of ABC transporter responsible for the uptake and transport of nitrate/nitrite/taurine. In the present study, we show that deletion of this gene no affects growth *in vitro* of *X. citri*, however, phenotypic analysis of cancer and bacterial growth have shown reduced and delayed during infection of *X. citri* in absence of *nrtT* gene in leaves of Citrus sinensis. Our analyzes have also shown that xanthan gum production and adherence capacity are affected by the absence of *nrtT*, indicating their importance for the growth and development of bacteria in the plant, since these compounds are considered factors directly related to the *X. citri* development and pathogenic. A cloning, expression and purification protocol was established for NrtT biophysical and structural assay. DLS analysis showed that NrtT presents polydispersity of 5.9% and monomeric conformation, these data confirmed by SAXS. CD and SAXS revealed that the alkane sulfonates MOPS alters the NrtT secondary structure as well as conferring greater thermal stability in denaturation assays, which leads us to assume that NrtT linker is sulfonates alkanes and not necessarily nitrate/nitrite. Crystallization trials are refining step for obtaining NrtT crystals. Another protein considered to be important for the development of cancer is PotF, described as a protein periplasmic binding protein putrescine from *X. citri*. The expression and purification protocols have been established and biophysical analyzes show that PotF has 5.2% of polydispersity and is presented in the monomeric state, these data confirmed by SAXS. The presence of putrescine did not significantly alter the conformation or the thermal stability of PotF, however, SAXS analysis PotF in the presence of putrescine shows changes in the structure possibly resulting from connection with putrescine. To determine the crystallographic structure, the tests are in the refining step, however, have been obtained two-dimensional and three-dimensional crystals and in the refining step for co-crystallization to putrescine we monitor conformational changes and protein-amino acids involved in binding linker.

Keywords: Transporter proteins. Phytopathogens. SAXS. Alkanesulfonates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características de <i>Xanthomonas citri</i>	18
Figura 2 - Imagens da manifestação do cancro cítrico.....	20
Figura 3 - Representação gráfica da organização dos transportadores do tipo ABC.....	23
Figura 4 - Análise estatística dos transportadores do tipo ABC identificados no genoma de <i>X. citri</i> e no proteoma da bactéria (SOARES et al., 2010) durante infecção em plantas de citros que foram usados como alvo nesse trabalho....	26
Figura 5 - Organização genética dos genes <i>nrtT</i> em <i>X. citri</i> em comparação com <i>X. campestris</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	28
Figura 6 - Organização genética dos genes <i>pot</i> em <i>X. citri</i> em comparação com <i>X. campestris</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	31
Figura 7 - Construção do mutante de <i>X. citri</i> portador de deleção no gene <i>nrtT</i> (<i>Xac::nrtT</i>).....	35
Figura 8 - Representação esquemática da construção da cepa complementar (<i>Xac::nrtTc</i>).....	36
Figura 9 - Comparação dos mapas dos vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO.....	41
Figura 10 - O papel do gene <i>nrtT</i> no fenótipo, adesão e formação de biofilme nas linhagens selvagem, mutante e complementar.....	55
Figura 11 - Comparação do crescimento in vitro das linhagens selvagem e mutante.....	56
Figura 12 - Crescimento in vitro das linhagens selvagem (<i>Xac WT</i>) e mutante (<i>Xac::nrtT</i>) de <i>X. citri</i> em diferentes meios de cultura.....	58
Figura 13 - Crescimento das linhagens de <i>X. citri</i> selvagem, mutante <i>Xac::nrtT</i> e complementar <i>Xac::nrtTc</i> em folhas de <i>Citrus sinensis</i> e análise fenotípica da infecção e patogenicidade.....	60
Figura 14 - Reação de PCR para confirmação da presença do gene <i>nrtT</i> na linhagem complementar.....	61
Figura 15 - Análises estruturais comparativas das proteínas ligadoras de alcano sulfonatos de <i>X. citri</i> (SsuA2) e de nitratos de <i>Synechocytis</i> sp. com a NrtT de <i>X. citri</i>	62

Figura 16 - Clonagem, expressão, purificação e clivagem com SUMO-protease da proteína NrtT de <i>X. citri</i>	64
Figura 17 - Análises da homogeneidade da NrtT em solução.....	65
Figura 18 - Análises biofísicas e espectroscópicas de NrtT na presença e ausência de possíveis ligantes.....	67
Figura 19 - Cristais de NrtT obtidos em diferentes condições de refinamento..	68
Figura 20 - Curvas extraídas dos dados experimentais de SAXS da NrtT na ausência e presença de MOPS.....	70
Figura 21 - Esquema geral dos genes do regulon <i>cys</i> de <i>E. coli</i> e ortólogos previstos identificados no genoma de <i>X. citri</i>	73
Figura 22 - Possíveis interações de NrtT com outras proteínas em <i>X. citri</i> e comparação do potencial eletrostático de superfície do bolsão das proteínas periplasmáticas ligadoras de sulfonatos alifáticos ou alceno sulfonatos.....	74
Figura 23 - Produção e caracterização da PotF de <i>X. citri</i> a partir do vetor pET28a em células de <i>E. coli</i> Arctic Express.....	76
Figura 24 - Estabilidade e alterações estruturais da PotF em presença e ausência de putrescina.....	77
Figura 25 - Características do bolsão de ligação e estruturais da PotF de <i>X. citri</i>	79
Figura 26 - Comportamento da PotF na presença e ausência de putrescina analisado por ensaio de SAXS.....	82
Figura 27 - Cristais obtidos a partir do refinamento fino de PotF.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências e informações dos oligonucleotídeos de inicialização para construção da cepa complementar do gene <i>nrtT</i> de <i>Xanthomonas citri</i> (<i>Xac::nrtTc</i>) no vetor de <i>X. citri</i> , pKX33.....	36
Tabela 2 – - Composição do meio de cultivo XAM1 e suas variações.....	37
Tabela 3 - Sequências e informações dos oligonucleotídeos de inicialização para sub-clonagem do gene <i>nrtT</i> de <i>Xanthomonas citri</i> no vetor de expressão pET28aSUMO.....	43
Tabela 4 - Crescimento das linhagens de <i>X. citri</i> nas diferentes composições do meio XAM1.....	57

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

6xHisTag	Cauda de seis histidinas
ABC	TP-Binding cassette
ATP	Trifosfato de adenosina
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3'-indolifosfato Toluidina P
BLAST	Ferramenta de procura de alinhamento local básico
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico complementar
CV	Cristal Violeta
DLS	Dynamic Light Scattering - Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirubonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - ácido etilenodiamino tetra-acético
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> - Cromatografia líquida rápida de proteína
g	Gravidade
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Quilodalttons
Kegg	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas
LB	Luria-Bertani
NaCl	Cloreto de sódio
NBD	<i>Nucleotide-Binding Domain</i> - Domínio ligador de nucleotídeo
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium</i> - Nitro-azul tetrazolio
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de Poliacrilamida
pb	<i>pares de base</i>
PCR	Polymerase chain reaction - Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i> – Banco de dados de proteína
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> - Polivinilideno Fluorídrico
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	<i>Rotações por minuto</i>
RT	Transcriptase reversa
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> - Espalhamento de Raio-X a baixos ângulos
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Docecil sulfato de sódio
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Docecil sulfato de sódio
TAE	Tris-Acetato-EDTA

Taq	NA-polimerase de <i>Thermococcus</i> sp
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TMD	<i>Transmembrane domains</i> - Domínio transmembrana
Tris	Hidroximetil-aminomanto
UFC	Unidades formadoras de colônia
<i>X. citri</i>	<i>Xanthomonas citri</i>
X-gal	5-bromo-4cloro-3-inodolil-B-D-galactopiranosideo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Xanthomonas citri</i> e o cancro cítrico	18
1.2	Transportadores ABC	21
1.3	Organização genômica do putativo transportador ABC de nitrato/nitrito/taurina em <i>Xanthomonas citri</i> .	26
1.4	Organização genômica do putativo transportador ABC de putrescina em <i>Xanthomonas citri</i> .	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos gerais	33
2.2	Objetivos específicos	33
2.2.1	<i>NrtT</i>	33
2.2.2	<i>PotF</i>	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Análise do efeito da mutação do gene <i>nrtt</i> no crescimento e patogenicidade de <i>Xanthomonas citri</i> .	34
3.1.1	Extração de DNA genômico de <i>X. citri</i> .	34
3.1.2	Construção do mutante <i>Xac::nrtT</i> e do vetor de expressão para complementação da mutação.	34
3.1.3	Curvas de crescimento <i>in vitro</i> e avaliação do ligante de <i>NrtT</i> .	37
3.1.4	Análise do fenótipo provocado pela infecção das linhagens de <i>X. citri</i> em folhas de <i>Citrus sinensis</i> e curva de crescimento <i>in vivo</i> .	38
3.1.5	Quantificação da produção de goma xanthana.	38
3.1.6	Análise da aderência celular e produção de biofilme.	39
3.1.7	Extração de RNA e construção de DNA complementar (cDNA).	40
3.1.8	Reação de Transcriptase reversa (Reverse Transcriptase - RT-PCR).	40
3.2	Obtenção das proteínas de interesse na forma solúvel para ensaios espectroscópicos e de cristalização.	40
3.2.1	Clonagem, expressão e purificação das proteínas de interesse.	41
3.2.2	Análise da expressão das proteínas a partir de Western blot.	46
3.2.3	Quantificação e pureza das proteínas.	47
3.3	Caracterização do comportamento das proteínas e verificação de possíveis alterações estruturais na presença de ligantes por meio de análises biofísicas.	47
3.3.1	Análises Biofísicas.	47
3.4	Caracterização estrutural das proteínas por modelagem molecular, ensaios de cristalização e experimentos de espalhamento de raios-x a baixos ângulos.	50

3.4.1 Caracterização da proteína periplasmática por modelagem molecular por homologia.	51
3.4.2 Análises por espalhamento de raios-X a baixos ângulos (Small angle X-ray Scattering - SAXS).	51
3.4.3 Ensaios de cristalização.	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES BIOFÍSICAS, ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA PROTEÍNA NrtT DE <i>X. citri</i>.	53
4.1 Ausência do gene <i>nrtt</i> influencia o crescimento, patogenicidade, aderência, produção de goma e biofilme.	53
4.2 Análises biofísicas e estruturais sugerem que <i>nrtt</i> é potencialmente ligadora de alcanos sulfonatos.	61
4.2.1 A proteína <i>NrtT</i> conserva resíduos essenciais para a interação com alceno sulfonatos.	61
4.2.2 <i>NrtT</i> foi expressa na forma solúvel fusionada à SUMO e se mantém estável após a clivagem.	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES BIOFÍSICAS E ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA PotF DE <i>X. citri</i>.	76
5.1 PotF conserva o sítio de interação com putrescina e tem encaixe perfeito entre a modelagem e o envelope gerado por SAXS.	76
5.1.1 PotF é expressa na forma solúvel e enovelada.	76
5.1.2 A interação de putrescina com a PotF não altera a estabilidade térmica mas a fluorescência dos triptofanos.	77
5.1.3 A interação de putrescina com a PotF não altera a estabilidade térmica mas a fluorescência dos triptofanos.	79
5.1.4 Os dados de SAXS confirmam o modelo e evidenciam ganho de estabilidade na PotF decorrente da interação com putrescina.	81
BIBLIOGRAFIA	87
ANEXOS	97
A - Condições e ligantes usados para experimento de Thermal Shift.	96
B - Validação do modelo tridimensional de NrtT.	98
C - Validação do modelo tridimensional de PotF.	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Xanthomonas citri* e o cancro cítrico

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*X. citri*) é um fitopatógeno gram-negativo, aeróbico quimiotrófico estrito, tendo o oxigênio (O₂) comoceptor final de elétrons, utilizando açúcares concentrados nas plantas como glicose, sacarose, frutose, xilose e galactose como fontes de carbono (KIM et al., 2004; TUNG; KUO, 1999). Morfologicamente se apresenta na forma de bacilo, possuindo um único flagelo polar. As colônias de *X. citri* apresentam uma coloração amarelada (Figura 1) devido à produção do pigmento xantomonadina (DAS, 2003; RAJAGOPAL et al., 1997), cuja função está associada à proteção da bactéria contra danos induzidos por luz, uma vez que mutantes deficientes de pigmentação ficaram vulneráveis à luminosidade quando comparados com a linhagem selvagem pigmentada (JENKINS et al., 1982).

X. citri tem um genoma de 5,17 Mpb e dois plasmídeos, conforme evidenciado no projeto genoma (DA SILVA et al., 2002), é causadora de uma das mais devastadoras doenças, o cancro cítrico, afetando muitas variedades importantes de citros (DA SILVA et al., 2002; GOTTWALD et al., 2002) como *Citrus sinensis*.

Figura 1 – Características de *Xanthomonas citri*. (A) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a forma de bacilo de *X. citri* (medindo 0,2 a 0,6 µm de diâmetro e 0,8 a 2,9 µm de comprimento), e seu único flagelo polar. Fonte: Elliot Watanabe Kitajima-NAP-NEPA-Esalq-USP. (B) *X. citri* crescidas em meio LB (Luria-Bertani). As colônias apresentam a pigmentação amarelada característica do gênero.

A bactéria *X. citri* se dispersa a partir de equipamentos e materiais contaminados ou em épocas quentes e úmidas quando a chuva e o vento a disseminam por longas distâncias. A bactéria se espalha primeiramente por respingos da água da chuva de uma planta infectada para a outra, entrando na planta hospedeira por meio de aberturas como estômatos e lesões (BRUNINGS;

GABRIEL, 2003; GRAHAM et al., 2004). No interior da planta as bactérias se instalam e se reproduzem nos espaços intracelulares onde secretam polissacarídeos como a goma xantana a qual atrai água e solvente para a lesão, de forma a alterar a permeabilidade da planta e consequente perda de nutrientes. A sobrevivência das bactérias é diminuída em solo e quando expostas à luz solar direta, mas podem sobreviver durante anos em tecidos infectados (GOTWALD et al., 2002; GRAHAM et al., 2004; SHUBERT et al., 2001).

O cancro cítrico é caracterizado por acúmulo de água, anéis de cloroses, lesões necróticas, salientes, de coloração marrom (Figura 2), muitas vezes circundadas por um halo amarelo quando em folhas e frutos de citros, diminuindo sua qualidade e rendimento (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; CIVEROLO, 1984; GOTWALD et al., 2002; GRAHAM et al., 2004). Esse impacto nas lavouras de citros traz enormes prejuízos para a economia nacional. O Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador de suco de laranja, detendo 50% da produção mundial. As exportações injetam na economia brasileira de US\$ 1,5 bilhão a US\$ 2,5 bilhões por ano e geram ao país cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos (NEVES et al., 2010). Além disso, as restrições de quarentena são impostas às áreas produtoras com cancro cítrico, dificultando assim, a comercialização de frutas frescas. Atualmente, não existem medidas preventivas eficazes para o tratamento dessa doença. O procedimento adotado na ocorrência de uma infecção é meramente paliativo, limitando-se à eliminação de plantas sintomáticas e de plantas localizadas num raio de 30 metros ao redor dessas, ou ainda, à erradicação total da plantação, caso a contaminação seja igual ou maior que 0,5%, sendo proibido o cultivo de citros no local pelos próximos dois anos (GOTWALD et al., 2002; GRAHAM et al., 2004; NEVES et al., 2010; SHUBERT et al., 2001). Assim, além da perda das plantas afetadas, torna-se necessário eliminar plantas ainda assintomáticas, mas potencialmente infectadas, aumentando o prejuízo para os citricultores e, consequentemente, afetando a economia brasileira como um todo. Em 2012, a incidência do cancro cítrico atingiu 1,39% dos pomares, registrando a maior incidência da doença desde seu primeiro relato, em 1957 (FUNDECITRUS, 2014). Por isso torna-se interessante a execução de pesquisas que visem o desenvolvimento de métodos que previnam a doença, permitindo uma maior produtividade da cultura (NEVES et al., 2010).

Figura 2 - Imagens da manifestação do cancro cítrico. (A) imagem gerada por microscopia de varredura mostrando a presença de *Xanthomonas* na abertura do estômato. Manifestação do cancro em: **(B)** galho da planta, **(C)** folha e **(D)** fruto. Fotos de GOTTWALD et al., 2002.

Uma vez dentro da planta, as bactérias crescem principalmente em associação com a superfície, que leva à formação de biofilmes. Estes consistem geralmente de biofilmes de células microbianas ligados a uma superfície e coberto com uma matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos. A densidade populacional formadora de biofilme pode executar processos biológicos que células individuais não conseguem executar (COSTERTON et al., 1995).

A sobrevivência de fitopatógenos, como *X. citri* no hospedeiro, requer a regulação dos sistemas de captação e exportação de moléculas específicas através da membrana plasmática. A importância dos sistemas de transporte através da membrana é exemplificada pela porcentagem de genes dedicados a estes componentes. Por exemplo, *X. citri* apresenta 38 transportadores por Mb de genoma, resultando em um total de 201 transportadores. *E. coli* apresenta 354 transportadores em um genoma de 4.6 Mb, o que corresponde a 20% (HIGGINS, 2001). Mutações *knockout* de genes de *X. citri* que codificam diferentes tipos de transportadores, como *wzm/wzt* (exportação de lipopolissacarídeos), *exbD1* captação de íons), *tatBand* e *tatCof* (via de translocação dupla de arginina) *cydC*

(exporte de glutatona e cisteína), *corA* (transporte de magnésio e cobalto) e *yrbE* (transporte de fosfolípídeos e colesterol) podem causar sintomas atenuados, perda da patogenicidade, atraso nos sintomas e redução na densidade celular quando comparados com a linhagem selvagem durante ensaios de infecção em folhas de toranja (*Citrus Paradise* Macf. Cv. Duncan), alterando a manifestação e desenvolvimento do cancro cítrico. Os genes *wzm/wzt*, *tatBand*, *tatCof*, *cydC* e *yrbE* são componentes de transportadores do tipo ABC, o que mostra a importância desse sistema para a infecção e patogenicidade de *X. citri* (YAN; WANG, 2012).

1.2 Transportadores ABC

Transportadores do tipo ABC (ATP Binding Cassete) são proteínas integrais de membrana responsáveis não apenas pela aquisição de nutrientes, mas também para a regulação múltipla de outras funções celulares (LINTON; HIGGINS, 1998), o que justifica sua grande quantidade e variedade em diferentes organismos: 28 tipos em *Saccharomyce*, 58 em *Ceanorhabditis*, 51 em *Drosophila*, 129 em *Arabidopsis*, 69 em *E. coli* e 47 em *X. citri*, o que representa mais 5% do genoma (DAVIDSON et al., 2008; LINTON; HIGGINS, 1998; REES et al., 2009; WILKENS, 2015). O papel fundamental desses transportadores consiste na translocação unidirecional de uma variedade de substratos através da membrana celular em um processo dependente da hidrólise de ATP, caracterizando um transporte ativo contra o gradiente de concentração (GEORGE; JONES, 2012; LEWIS et al., 2012; MOUSSATOVA et al. 2008). Além da captação de nutrientes e transporte, os transportadores ABC estão envolvidos em outros processos como exportação de toxinas e resistência à drogas (HIGGINS, 2007; LAGE, 2003), reparo do DNA (DOOLITTLE et al., 1986; HIGGINS et al., 2001), patogênese e infecção (LEWIS et al., 2012), exportação de peptídeos, proteínas, antibióticos, polissacarídeos e lipídios, divisão celular, imunidade bacteriana e nodulação em plantas (GEORGE; JONES, 2014).

Existem mais de 250 membros na superfamília ABC que basicamente podem ser divididos em importadores e exportadores (GEORGE; JONES, 2012). Importadores são tipicamente associados com a captação de nutrientes hidrofílicos, como peptídeos, íons e açúcares para dentro da célula. Tais transportadores são muito comuns em bactérias e ausentes em eucariotos. Por outro lado, os transportadores ABC do tipo exportadores estão presentes tanto em procariotos como eucariotos e exportam o substrato do citosol para o meio externo (GEORGE;

JONES, 2012; MOUSSATOVA et al., 2008). Os transportadores ABC compartilham uma estrutura básica comum independente da função, caracterizada pela presença de dois domínios transmembrana (*Transmembrane domains* – TMDs), responsáveis pela formação do poro de passagem e dois domínios solúveis localizados na face citoplasmática da membrana, conhecidos como domínios ligadores de nucleotídeos (*Nucleotide-Binding Domain* - NBD) ou ATPases. Os transportadores do tipo importadores (Figura 3A) são divididos em grupos I, II e III de acordo com as propriedades de suas proteínas transmembrana inseridas na membrana plasmática (ERKENS et al., 2012; WILKENS, 2015). Os importadores do tipo I e II (Figura 3B) capturam seus ligantes por meio de proteínas solúveis ligadoras de substrato (*substrate-binding proteins* – SBPs), e fator de acoplamento de energia (*energy-coupling factor* - ECF), respectivamente (ERKENS et al., 2011). Estas proteínas são responsáveis pela afinidade e especificidade do sistema e são únicas para cada transportador. Por outro lado, os importadores do tipo III capturam seus substratos a partir de um componente incorporado a membrana associada a um fator de acoplamento de energia (ERKENS et al., 2011, KERR, 2002; LINTON, 2007).

Exportadores transportam moléculas do citoplasma para o meio externo a partir de uma interação direta entre a proteína transmembrana com o ligante a ser exportado, sem a necessidade de proteínas auxiliares (Figura 3B). Em todos os transportadores, porém, os elementos com maior conservação são os domínios NBDs, responsáveis pela liberação de energia a partir da hidrólise de ATP permitindo a translocação do ligante através da membrana. Tais domínios apresentam motivos de interação com ATP denominados Walker A e Walker B, um motivo assinatura específico para a família de transportadores ABC e outros resíduos fundamentais para acoplamento dos íons de magnésio e interação das ATPases (DASSA; BOUIGE, 2001; HIGGINS, 1990; KERR, 2002; LINTON, 2007; MOUSSATOVA et al., 2008; REES et al., 2009; WANNER; SOPPA, 1999) (Figura 3C). Por outro lado, os TMDs são os menos conservados, e podem apresentar diversas conformações e diferentes números de hélices- α que formam o canal. O mecanismo de transporte ainda não é completamente conhecido, mas sabe-se que a proteína periplasmática tem papel fundamental quando interage com os componentes de membrana, levando à sinalização e modificações conformacionais que ativam as ATPases, para a hidrólise do ATP e início do transporte (DAVIDSON et al., 2008).

Figura 3 - Representação gráfica da organização dos transportadores do tipo ABC. (A) Transportadores do tipo exportadores e **(B)** importadores. **(C)** Destaque das regiões conservadas nos domínios ligadores de nucleotídeos. Estão esquematizados os domínios TMD e NBD indicando a importância da hidrólise de ATP para a realização do transporte. No alinhamento estão indicados os motivos correspondentes às regiões conservadas dos transportadores ABC (DAVIDSON et al., 2008; LINTON, 2007).

A predição da distribuição dos genes dos componentes dos transportadores tipo ABC ao longo dos genomas bacterianos revelou que quanto maior o genoma, maior o número de transportadores ABC encontrado, assim como bactérias

ambientais e de vida extracelular também apresentam maior número desses componentes. Independente do número de transportadores por organismo ou em qual nicho o mesmo está inserido, o número de transportadores das famílias de íons metálicos e de reparo de DNA apresentam valores similares sugerindo fortemente que esses sistemas são importantes para adaptação dos organismos em seus nichos específicos (HARLAND et al., 2005; LEWIS et al., 2012).

O papel de transportadores ABC na infectividade e patogênese tem sido evidenciado em muitos organismos, principalmente relacionado aos mecanismos de evasão, resistência ao hospedeiro, fatores de superfície celular e excreção, auxílio na captação de nutrientes, entre outros (LEWIS et al., 2012). Adicionalmente, estes transportadores apresentam relevância médica por serem ativos em doenças degenerativas, no fenômeno de resistência múltipla à drogas, tornando-os uma significativa parte dos alvos da indústria farmacêutica (HIGGINS; 1990, 2001; MOUSSATOVA et al., 2008). O conhecimento detalhado de etapas do transporte e atividade pode fazer dos transportadores alvos para a terapêutica antimicrobiana, o desenvolvimento de vacinas e defensivos agrícolas (KEMNER et al., 1997; LEWIS et al., 2012; LI et al., 2011). Apesar desta relevância, poucos são os estudos evidenciando o papel destes transportadores em *Xanthomonas* (BALAN et al., 2008; ARAÚJO et al., 2013; PEGOS et al., 2014). A primeira descrição da contribuição de um transportador ABC na virulência foi descrita em *Agrobacterium tumefaciens* com o transportador de açúcares, glicose e galactose. ChvE é uma proteína periplasmática que participa da quimiotaxia e indução do gene da virulência em resposta aos monossacarídeos presentes na planta (KEMNER et al., 1997). Em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a presença de manganês, cujo transporte é mediado por um transportador do tipo ABC YebN é crucial para virulência e proteção contra o estresse oxidativo (LI et al., 2011). O papel de transportadores de compostos nitrogenados (MOIR; WOOD, 2001; MORENO-VIVIÁN et al., 1999) e sulfonados (ARAÚJO et al., 2013; EJIM et al., 2004; SENARATNE et al., 2006) tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças e patogênese.

Nosso grupo tem trabalhado na compreensão do papel dos transportadores ABC na nutrição, infecção e patogênese de *X. citri*. O genoma de *X. citri* tem cerca de 4% dos genes codificando componentes dos transportadores ABC, sendo ao menos 32 exportadores e 87 importadores. Dos importadores, 28 foram expressos durante o período de infecção da bactéria em *Citrus sinensis* (SOARES et al., 2010),

incluindo alguns transportadores ABC caracterizados pelo nosso grupo, tais como o sistema de putrescina (SAMPAIO et al., *in press.*), maltose (MEDRANO et al., 2014; SOUZA et al., 2009), molibdato (BALAN et al., 2008; SANTACRUZ-PEREZ et al., 2013), tolueno, sulfato (PEREIRA et al., *in press.*), oligopeptídeos (MOUTRAN et al., 2007), fosfato (PEGOS et al., 2014) e alceno sulfonatos (ARAÚJO et al., 2013). Na Figura 4 tem-se um panorama dos transportadores identificados em *X. citri* (SOARES et al., 2010). Dos 87 transportadores do tipo importadores somente 28 são ativos durante a infecção e dos 32 exportadores, 14 foram identificados como expressos. Todos os transportadores do tipo exportadores transportam drogas e lipídios. Por outro lado, os importadores ativos estão envolvidos em captação de moléculas essenciais no crescimento bacteriano como fosfato, sulfato, molibdato, açúcares, putrescina e nitrato/sulfonatos. Embora o estudo de transportadores ABC tenha atingido um progresso expressivo nos últimos 20 anos, ainda se faz necessários mais estudos para se ter compreensão detalhada do seu mecanismo de transporte e função.

Dois passos críticos merecem maior atenção para a compreensão desse transporte: a captura e a liberação dos ligantes (transporte) envolvendo a proteína ligadora e a sua interação com o componente de membrana, e sinais transmitidos para os domínios NBDs para que a energia da quebra das moléculas de ATP seja convertida em alterações estruturais. Em estudos de proteômica, evidenciamos a presença de duas proteínas expressas em condições variadas de cultivo: a NrtT e a PotF (PEGOS et al., 2014), ambas proteínas periplasmáticas pertencentes a transportadores ABC, com funções ainda desconhecidas, embora tenham sido relacionadas por análises de bioinformática, à captação de nitrato/nitrito/taurina e putrescina, respectivamente. Tais componentes funcionam como fontes de nitrogênio, sendo o nitrato a mais utilizada para organismos fotossintetizantes, incluindo cianobactérias, algas e plantas. Até o presente não existem dados sobre a captação deste íon em *X. citri*.

Figura 4 - Análise estatística dos transportadores do tipo ABC identificados no genoma de *X. citri* e no proteoma da bactéria (SOARES et al., 2010) durante infecção em plantas de citros que foram usados como alvo. (A) Tipos de transportadores identificados no genoma de *X. citri*, (B) quantidade de transportadores identificados no genoma de *X. citri* (em verde) e quantidade de transportadores expressos durante o período de infecção (em vermelho). (C) transportadores de moléculas específicas identificados em *X. citri*.

1.3 Organização genômica do putativo transportador ABC de nitrato/nitrito/taurina em *Xanthomonas citri*.

O nitrogênio é um elemento chave em biologia, incorporado da biosfera a partir de processos assimilatórios conduzidos por micro-organismos e plantas. Diversos compostos contendo nitrogênio podem ser usados por diferentes organismos como fonte de tal, incluindo íons inorgânicos como nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) ou amônia (NH_3) e compostos orgânicos simples como uréia, aminoácidos e algumas bases nitrogenadas (HERRERO et al., 2001; MORENO-VIVIÁN et al., 1999). A assimilação de compostos nitrogenados é essencial para a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos, sendo fundamental para o metabolismo celular (MORENO-VIVIÁN et al., 1999; PARKER; NEWSTEAD, 2014). Tal composto ainda

apresenta papel de destaque na agricultura: a assimilação de nitrato realizada por algas, fungos, bactérias e plantas superiores é responsável pela transformação de mais de 10^4 megatons de nitrogênio inorgânico a cada ano (GUERRERO et al, 1981).

Em bactérias, a assimilação de nitrato ocorre a partir de um sistema de transporte ativo que internaliza o nitrato para que seja reduzido a nitrito e posteriormente a amônia, tal processo ocorre em duas reações catalisadas pelas enzimas ferredoxina-nitrato redutase e ferredoxina-nitrito redutase respectivamente (HERRERO et al., 2001; MORENO-VIVIÁN et al, 1999). A regulação e assimilação de nitrato/nitrito é descrita em micro-organismo como cianobactérias (KOROPATKIN et al., 2006; OHASHI et al., 2011, OMATA, 1995) e *E. coli* (JIA et al., 2009; ZHENG et al., 2013), porém, não há informação sobre esses mecanismos em *X. citri*. Por outro lado já é conhecida a presença das enzimas redutases no gênero *Xanthomonas* (KETCHUM; PAYNE, 1992; WOODARD et al., 1990).

De acordo com o banco de dados Kegg (<http://www.genome.jp/kegg/>), os genes associados ao transporte de nitrato/nitrito/taurina em *X. citri* se encontram organizados na forma do *operon nrtBCDT* junto a genes que codificam enzimas associadas ao metabolismo dos compostos a serem transportados. A proteína periplasmática ligadora de substrato NrtT é codificada pelo gene *nrtT* (XAC0829) seguido pelos genes que codificam as ATPases *nrtCD* (XAC0828). Por último se encontra o gene *nrtB* que codifica um homodímero de permeases do sistema (XAC0827) (Figura 5A). À montante do gene *nrtT* se encontram os genes *ftsE* e *ftsX* ambos componentes, ATPásico e de membrana, respectivamente, de um sistema de transporte do tipo ABC envolvido no processo de divisão celular e transporte de sal em *E. coli* (LEEuw et al., 1999). Os genes *ftsE* e *ftsX* de *X. citri* compartilham 62% e 72% de identidade de sequência com os seus ortólogos em *E. coli*.

A organização do *operon nrtBCDT* se mantém no gênero *Xanthomonas* e sofre pequenas alterações em outras espécies de procariotos não sendo encontrado em *E. coli*. Por outro lado, esta bactéria apresenta um *operon* de captação de taurina, o qual inclui o sistema de transporte ABC e o gene *tauD*, responsável pela óxido-redução do composto. TauD é encontrado em *X. citri* com identidade de sequência de 61%.

Figura 5 - Organização genética dos genes *nrtT* em *X. citri* em comparação com *X. campestris*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. (A) Organização genômica dos genes envolvidos com transporte de nitrato/nitrito/taurina. As setas marrons representam genes putativos de transportador ABC de nitrato/nitrito/taurina. Nomes dos genes e código do banco de dados KEGG são mostrados para cada gene. A porcentagem de identidade de sequência de nucleotídeos de possíveis ortólogos relacionados das proteínas de *X. citri* é também mostrada. Não foi encontrado gene *nrtT* ou correspondente em *E. coli*. (B) Possíveis regiões promotoras identificadas no genoma de *X. citri* usando o programa Softberry Bprom (<http://www.softberry.com>). (C) Possíveis regiões transcritas identificadas no genoma de *X. citri* usando o programa BioCyc (<http://biocyc.org/>). Genes pertencentes aos mesmos transcritos são mostrados das mesmas cores. Promotores são mostrados como caixas pretas e as respectivas sequências tracejadas.

Em *Pseudomonas aeruginosa* são encontrados dois *operons* codificantes de proteínas envolvidas no transporte de nitrato/nitrito/taurina (PA2305-2310 e PA3497-3523). O primeiro apresenta uma organização semelhante ao de *X. citri* também com um gene codificante de uma enzima envolvida no metabolismo de taurina, a

taurina desidrogenase. O segundo *operon* é muito extenso e apresenta uma série de proteínas hipotéticas putativamente envolvidas no metabolismo de aldeído, adenilsuccinato, acetolactato, regulador transcricional e divisão celular. Dentre esses genes se encontra uma oxidoredutase que compartilha 76% de identidade de sequência com *ftsX* de *X. citri*, e sete genes que codificam proteínas hipotéticas que compartilham de 67 a 75 % de identidade com *ftsX* de *X. citri*, indicando que um *operon*, semelhante ao de *X. citri* se encontra misturado com outros genes em um *operon* mais extenso, porém não foram encontradas proteínas relacionadas com o metabolismo de taurina nem similares ao transportador *ftsEX*. Análises de regiões promotoras e transcritas do genoma de *X. citri* revelam que a organização do *operon* também é distinta em *X. citri*, evidenciado pela presença de três regiões promotoras putativas (Figura 5B), umas delas dentro do gene *nrtT*, e quatro transcritos putativos (Figura 5C).

1.4 Organização genômica do putativo transportador ABC de putrescina em *Xanthomonas citri*.

Putrescina, assim como outras poliaminas (espermidina e espermina) estão presentes em quase todas as células procarióticas e eucarióticas. Estes pequenos cátions alifáticos são protonados em pH fisiológico e facilmente ligam-se a ácidos nucleicos. Por meio desta interação, as poliaminas são conhecidas por estarem envolvidas na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas e por mediar o crescimento e proliferação celular (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; KUSANO *et al.*, 2007; TABOR; TABOR, 1985). Chattopadhyay e colaboradores (2002) mostraram que poliaminas intracelulares protegem células de *E. coli* de moléculas reativas como O₂, H₂O₂ e OH, que podem interagir com diversos componentes celulares, como DNA, RNA, proteínas e lipídios, resultando em mutagênese seguida por redução na taxa de crescimento e morte celular. O conteúdo de poliamina intracelular é controlado através do próprio metabolismo das poliaminas e pelo equilíbrio nas atividades de captação/exportação do sistema de transporte de poliamina de modo coordenado (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002).

Em *E. coli* foram identificados pelo menos três sistemas dedicados ao transporte de poliaminas. Destes, dois sistemas são transportadores ABC, um preferencial para espermidina (PotABCD) e outro específico para putrescina (PotFGHI). Adicionalmente, a proteína PotE, uma proteína transmembrana possui

atividade de absorção e excreção de poliaminas, especialmente em pH ácido (KASHIWAGI et al., 1997; TERUI et al., 2014). O terceiro sistema composto por proteínas Puu funciona para absorção de putrescina que será usada como fonte de energia, em particular, na ausência de glicose (KURIHARA et al., 2009; TERUI et al., 2014).

Em *X. citri* o *operon potFGHI* codifica o putativo sistema de transporte de putrescina. O gene *potF* (XAC2476) codifica a proteína periplasmática, *potG* e *potH* (XAC2470-71) codificam as permeases, e *potI* (XAC2472) codifica o homodímero de ATPases (Figura 6A). A organização genômica dos genes *pot* em *X. citri* é conservada no gênero e idêntica em *X. campestris*, partilhando mais de 98% de identidade de sequência de aminoácidos. Por outro lado, difere do que foi descrito para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em *X. citri* o gene que codifica a proteína ligadora periplasmática, PotF, situa-se quatro *loci* à montante dos genes que codificam as permeases PotGH e ATPase PotI. Por outro lado, *potF* situa-se perto de genes que codificam transportadores relacionados à resistência a multidrogas. Genes relacionados à poliaminas/putrescina são evidenciados na organização de *P. aeruginosa*, incluindo o gene *spuE* que codifica uma proteína ligadora de poliamina adicional. Por outro lado, *E. coli* apresenta em um único *operon* genes codificantes de todos os componentes de transportadores ABC de putrescina (gene *potFGHI*) e poliaminas (*potABCD*). Análises de regiões promotoras e transcritas do genoma de *X. citri* revelam que a organização do *operon* também é distinta em *X. citri*, evidenciado pela presença de quatro regiões promotoras putativas (Figura 6B) e cinco transcritos putativos (Figura 6C).

Apesar das diferenças encontradas na organização genética, PotF de *X. citri* é altamente conservada em todas as espécies do gênero *Xanthomonas*, com identidades de sequência de aminoácidos superiores a 96% de cobertura de sequência. Além disso, PotF de *X. citri* também partilha 61 e 72% de identidade de sequência de nucleotídeos com as proteínas ligadoras de putrescina de *E. coli* e *P. aeruginosa* (PotF e SpuD, respectivamente). Mesmo diante da grande quantidade de dados disponíveis relacionados com o transporte e função de poliaminas, nada foi descrito até o momento para o gênero *Xanthomonas*.

Figura 6 - Organização genética dos genes *pot* em *X. citri* em comparação com *X. campestris*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. (A) Organização genômica dos genes envolvidos com transporte de putrescina-poliamina. As setas marrons representam genes putativos de transportador ABC de putrescina/poliamina. Nomes dos genes e código do banco de dados KEGG são mostrados para cada gene. A porcentagem de identidade de sequência de nucleotídeos de possíveis ortólogos relatados das proteínas de *X. citri* é também mostrada. (B) Possíveis regiões promotoras identificadas no genoma de *X. citri* usando o programa Softberry Bprom. Promotores são mostrados como caixas pretas e as respectivas sequências tracejadas. (C) Possíveis regiões transcritas identificadas no genoma de *X. citri* usando o programa BioCyc.

Embora o genoma de *X. citri* tenha sido caracterizado e anotado, as deduções feitas com base em análises *in silico* exigem uma investigação experimental para detectar quais os genes que estão relacionados com o processo de adaptação do patógeno-hospedeiro, e quais estão associados com a própria patogênese. Por isso, os estudos de genômica funcional são necessários para elucidar o mecanismo de instalação do patógeno e proliferação em plantas, e a indução de sintomas de cancro cítrico no hospedeiro. Do ponto de vista funcional

genômico, análises com mutantes por inoculação em plantas hospedeiras permite a identificação de genes necessários para a adaptação, patogênese e virulência, proporcionando uma melhor compreensão da colonização e infecção potencial das bactérias (LAIA et al., 2009)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar estrutural e funcionalmente as proteínas periplasmáticas NrtT e PotF a partir de diferentes técnicas, obtendo informações a cerca de sua relevância para o crescimento, infecção e patogênese da bactéria X. citri.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 NrtT

- Analisar a relevância da proteína NrtT para *Xanthomonas citri* durante o crescimento *in vitro* e *in vivo*, a partir de análises comparativas entre a linhagem selvagem e mutante deletado para o gene *nrtT*;
- Clonagem do gene *nrtT*, expressão e purificação da proteína NrtT;
- Caracterizar funcionalmente a proteína NrtT a partir da definição de seu(s) ligante(s) específico(s), por meio de análises biofísicas como dicroísmo circular, espalhamento dinâmico de luz, fluorescência intrínseca do triptofano e fluorimetria de varredura diferencial;
- Caracterização estrutural da NrtT por meio de modelagens estruturais e experimentos de espalhamento de luz a baixo ângulo na presença de diferentes ligantes.

2.2.2 PotF

- Expressar e purificar a proteína PotF na forma solúvel, pura e monodispersa;
- Caracterizar o comportamento da proteína e verificar possíveis alterações estruturais na presença de seu ligante putrescina por meio de análises biofísicas como dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz e fluorescência intrínseca do triptofano;
- Caracterização estrutural da proteína PotF por meio de modelagens estruturais e experimentos de espalhamento de luz a baixo ângulo na presença de putrescina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise do efeito da mutação do gene *nrtT* no crescimento e patogenicidade de *Xanthomonas citri*.

3.1.1 Extração de DNA genômico de *X. citri*.

Foram crescidas culturas de *X. citri* em 3 mL de meio LB (sem NaCl) com ampicilina a 0,1 mg/mL a 28 °C, 250 rpm por 16 horas. As culturas foram centrifugadas a 10.000 x g. por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para a extração de DNA genômico com o kit comercial *AxyPrep Bacterial Genomic DNA mini-prep* (Axygen), conforme instruções do fabricante. O rendimento obtido foi de 200 a 300 ng/μL de DNA.

3.1.2 Construção do mutante *Xac::nrtT* e do vetor de expressão para complementação da mutação.

Para avaliar o papel fisiológico da proteína NrtT durante o crescimento de *X. citri* *in vivo* e *in vitro*, uma cepa *knockout* de *nrtT* (*Xac::nrtT*) foi gerada por mutagênese sítio-específica.

A inativação sítio-específica do gene *nrtT* foi conduzida em uma cepa de *X. citri* 306, usando um plasmídeo suicida de acordo com procedimentos publicados previamente (OSHIRO et al., 2006). O primeiro passo envolveu a clonagem do gene *nrtT* no plasmídeo PUC4 após amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos de iniciadores senso (5' GCGGCGCTCGGATCCGCGCGTTGGCG 3') e anti-senso (5' CGCTCGAAAAGCTTTCATTTGCT 3'), tendo as enzimas *Bam*HI e *Hind*III como sítios de restrição sublinhados nos oligos. A inativação do gene *nrtT* foi obtida pela clonagem de um cassete derivado de pHP45omega que codifica resistência à espectinomicina/estreptomicina (sm/st) e apresenta massa molecular de aproximadamente 3 kb. O cassete foi clivado do vetor com a enzima *Bam*HI e inserido no mesmo sítio de clivagem localizado no gene *nrtT* (Figura 7). Um clone conduzindo uma cópia do gene *nrtT* (*nrtT::sm/st*) foi selecionado e confirmado por análise de restrição e sequenciamento automático de DNA. A cópia mutada do gene *nrtT* foi recuperada para a próxima etapa de clonagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O gene mutado *nrtT::sm/st* foi clonado no vetor suicida pNPTS138 (5.360 pb - originalmente construído pelo Dr. Alley e gentilmente cedido pela

professora Dra. M.V. Marques do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo). O plasmídeo suicida pNPTS138 permite a seleção de integração cromossômica única após células transformadas serem plaqueadas em placas contendo canamicina e subsequente seleção do evento de substituição do gene após uma segunda etapa de seleção em meio de cultura contendo sacarose (uma vez que os plasmídeos contêm o gene *sacB* que confere sensibilidade à sacarose) e espectinomicina. O plasmídeo foi nomeado de pNnrtT e introduzido por eletroporação na cepa *X. citri* 306 como previamente descrito (OSHIRO et al., 2006).

Figura 7 – Construção do mutante de *X. citri* portador de deleção no gene *nrtT* (*Xac::nrtT*). (A) Deleção cromossomal do gene *nrtT* obtido após eletroporação do plasmídeo suicida pNnrtT na cepa *X. citri* 306. (I) a primeira etapa na construção de *X. citri* mutante foi a inserção de um fragmento de 3 kpb que codifica resistência a espectinomicina e estreptomicina no sítio *Bam*HI do gene *nrtT*, gerando um plasmídeo de cerca de 8,3 kpb. **(B)** amplificação por PCR do gene *nrtT* de colônias de *X. citri* selecionadas utilizando os oligonucleotídeos de inicialização específicos para a construção. Amostras: P: peso molecular; WT: cepa selvagem; 1-3 colônias selecionadas por resistência a espectinomicina e sacarose. A presença de uma única banda de 3 kb indica o sucesso da substituição de gene (amostras de 1 a 3).

A seleção inicial para o evento de substituição do gene foi conduzida em placas contendo canamicina, seguida por crescimento por 16 horas de colônias selecionadas em meio de cultura não seletivo e subsequentemente plaqueadas em meio contendo 3% de sacarose e 50 µg/mL de espectinomicina para selecionar células que tinham sido submetidas a um segundo evento de *crossover* levando a excisão do plasmídeos carregando a cópia selvagem de *nrtT*. PCR com os oligos senso e anti-senso utilizados para a amplificação inicial foram usados para confirmar a deleção cromossomal.

O vetor complementar (*Xac::nrtTc*) foi construído a partir da clonagem da região promotora localizada à montante do operon *nrtBCDT* seguida do gene *nrtT*

diretamente no plasmídeo de *X. citri* pKX33 de 5,7 kpb (BALDINI et al.,1999). Para a construção foi utilizada uma região promotora tido como o promotor para a expressão de *nrtT*. Para rastrear e monitorar o gene complementar foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos contendo sítios para clivagem com enzimas de restrição (Tabela 1). O primeiro par de oligos é referente à região promotora e o segundo, referente ao gene *nrtT*.

Figura 8 – Representação esquemática da construção da cepa complementar (*Xac::nrtTc*).

Esquema dos genes organizados no operon *nrtBCDT*, indicando as regiões usadas como região promotora e gene que compõem o vetor complementar, utilizando o plasmídeo pKX33.

Tabela 1 - Sequências e informações dos oligonucleotídeos de inicialização para construção da cepa complementar do gene *nrtT* de *Xanthomonas citri* (*Xac::nrtTc*) no vetor de *X. citri*, pKX33. São mostradas as enzimas de restrição utilizadas para a sub-clonagem da região promotora e do gene *nrtT* no plasmídeo pKX33. **Tmg:** é a temperatura de *melting* geral do oligo, considerando toda a sua extensão, incluindo o sítio de restrição; **Tme:** é a temperatura de *melting* do oligo considerando apenas a região deste que se anela ao *template*; **[GC]:** representa a porcentagem de guanina e citosina em todo o oligo. **Hairpin:** é a temperatura provável para a formação de grampos. O oligo sense foi elaborado para garantir a remoção do peptídeo sinal da proteína.

Oligos	Sequência (5'-3')	Enzima	Tmg (°C)	Tme (°C)	[GC] %	Hairpin (°C)
Senso1	GTC GAC CGT TGC TGG ATA TCG ACG C	<i>SalI</i>	69,2	62	58,3	47,5
Anti-senso1	GAA TTC GGG GGA AGA CGC ATC GC	<i>EcoRI</i>	68,4	64,1	60,9	27,6
Senso2	CCC ACG AAT TC TTG CCG CAC C	<i>EcoRI</i>	67,2	61,9	61,9	28,0
Anti-senso2	CGA GGA TCC TCA GCT CCC GC	<i>BamHI</i>	67,2	57,3	70,0	43,2

A construção complementar foi comercialmente sintetizada inserida no vetor pKX33 e usada para transformar a cepa *Xac::nrtT* competente por eletroporação. A seleção das colônias contendo o gene complementar foi feita a partir do crescimento da cultura transformada em meio LB com ampicilina (amp) canamicina (can) e espectinomicina (spec) seguida de uma varredura a partir de amplificação por PCR.

3.1.3 Curvas de crescimento *in vitro* e avaliação do ligante de NrtT.

Para analisarmos a influência da mutação no crescimento *in vitro* de *X. citri* compararmos o crescimento das cepas selvagem (*Xac*) e mutante (*Xac::nrtT*) em meio LB (Luria-Bertani), rico em nutrientes, e meio XAM1, descrito por Wengelnik e Bonas (1996) e modificado por Carvalho (2006). O meio XAM1 apresenta composição que mimetiza o interstício das folhas de *Citrus sinensis* e apresenta quantidade de nutrientes controlada. Para que pudéssemos determinar o ligante de NrtT durante o crescimento de *X. citri*, células foram crescidas em meio XAM1 contendo variações nas fontes de nitrogênio e enxofre, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo XAM1 e suas variações. As variações C, E e G tiveram o sulfato de magnésio substituído pelo cloreto de magnésio a fim de garantir que o sulfato não interferisse no crescimento das linhagens. Como fonte de nitrogênio, as variações A e B ofereceram sulfato de amônio, as variações F e G ofereceram MOPS, a variação h oferece Taurina e as variações C, D e E não tinham nenhuma fonte de nitrogênio. Em negrito estão os principais compostos que foram alterados nos meios.

Meio	Composição
XAM1	(NH₄)SO₄ ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgSO₄ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1a	(NH ₄)SO ₄ ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1b	(NH ₄)SO ₄ ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgCl₂ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1c	KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1d	KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgCl₂ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1e	CaSO₄ ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgSO₄ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1f	MOPS ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgSO₄ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1g	MOPS ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgCl₂ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.
XAM1h	Taurina ; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ; MgSO₄ ; Frutose; Sacarose; Casaminoácidos e BSA.

Para o ensaio da curva, as linhagens selvagem e mutante foram crescidas em triplicatas em meio LB com os devidos antibióticos (ampicilina para a linhagem selvagem, ampicilina e espectinomicina para a linhagem mutante) a 28 °C por 16 horas agitando a 250 rpm. As culturas foram diluídas em água Mili-Q estéril até atingir absorbância em 600 nm de 0,8 (equivalente a 8x10⁶ ufc/ml), e 5 µL dessa diluição foram usados para inocular 5 mL de meio LB, XAM1 e suas variações com 0,1 mg de ampicilina. O crescimento foi mantido por 96 horas e as coletas foram feitas a cada 24 horas após a inoculação. As coletas consistiram da remoção de 20

μL da cultura e sua diluição em 180 μL de água Mili-Q estéril para diluição seriada (10^{-1} a 10^{-9}) e cada diluição foi plaqueada em meio LB com ampicilina (sem NaCl para a linhagem selvagem), incubada a 30 °C de dois a três dias para a obtenção de colônias bacterianas visíveis para a contagem. Cada diluição foi feita em triplicata.

3.1.4 *Análise do fenótipo provocado pela infecção das linhagens de X. citri em folhas de Citrus sinensis e curva de crescimento in vivo.*

Para análises fenotípicas durante a infecção em folhas de laranjeira, as linhagens selvagem (*XacWT*), mutante (*Xac::nrtT*) e mutante complementado (*XAC::nrtTc*) crescidas por 16 horas em meio LB e previamente centrifugadas, foram ressuspensas em água Mili-Q estéril até atingir absorbância em 600 nm de 0,1 (equivalente a 10^6 ufc/ml), e inoculadas entre as nervuras da folha de *Citrus sinensis* em posições específicas. O fenótipo da infecção foi monitorado durante 14 dias. Para a construção da curva de crescimento, foram coletados a cada 48 horas após a infecção, três discos com cerca de 1 cm de diâmetro de três folhas inoculadas, para a triplicata. Cada disco foi macerado em cadinho com pestilo esterilizado em 1 mL de água MilliQ para liberação das células das folhas. Foram removidos 20 μL da amostra e diluídos em 180 μL de água Mili-Q estéril para diluição de forma seriada (10^{-1} a 10^{-9}). Cada diluição foi plaqueada em meio LB com ampicilina (sem NaCl para a linhagem selvagem) e incubada a 28°C de dois a três dias para a obtenção de colônias bacterianas visíveis para a contagem. O número de colônias obtido foi utilizado para construir a curva de crescimento *in vivo* que analisa o logaritmo da unidade formadora de colônia por centímetro quadrado ao longo dos dias após a inoculação.

3.1.5 *Quantificação da produção de goma xanthana.*

Análise da produção da goma xantana visa avaliar a quantidade de polissacarídeos produzidos pelas diferentes linhagens de *X. citri*, permitindo comparar com a produção da cepa mutante conforme protocolo estabelecido anteriormente (VOJNOV et al., 1998).

As linhagens *XacWT* e *Xac::nrtT* foram crescidas em meio LB com os devidos antibióticos a 28 °C por 16 horas agitando a 250 rpm. Após o crescimento, as culturas foram diluídas em água Mili-Q estéril até atingir absorbância em 600 nm de 0,1 (10^6 ufc/mL) para o mutante e o selvagem, na qual cada 3 mL foram usados para

inocular 100 mL de meio LB com ampicilina. Também foram testados os meios M9 e XAM1, porém, a quantidade de sal nesses meios interferiu nos resultados da liofilização, não sendo possível alcançar valores reprodutíveis nas triplicatas. O crescimento foi mantido por 24 horas e a absorbância em 600 nm foi medida. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 5 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 100 mL de cloreto de potássio 2% e 200 mL de etanol e em seguida foram centrifugados a 6.000 rpm, 4 °C por 20 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos cônicos tipo *falcons* previamente pesados e submetidos à liofilização por 18 horas. A goma liofilizada foi pesada para comparação de peso entre as linhagens selvagem e mutante.

3.1.6 Análise da aderência celular e produção de biofilme.

Para medir o nível de células aderidas a uma superfície abiótica, culturas das linhagens selvagem, mutante e complementar foram crescidas por 16 horas em meio LB, 250 rpm a 28 °C (10^8 ufc/mL). Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 14.000 rpm e as células peletadas foram ressuspensas em 10 mM de tampão de Tris-HCl pH 8,0. Aliquotas de 200 µL foram transferidas para tubos *ependorf* estéreis de 1,5 mL e foram incubadas durante 6 hs a 28°C. A aderência foi monitorada através da coloração com cristal violeta 1% (CV 1%) durante 45 minutos após repetitivas lavagens dos tubos para remover as células não aderidas. O excesso de corante foi removido por lavagem com água mili-Q com o auxílio de uma pipeta, e o cristal violeta foi solubilizado pela adição de 250 µL de etanol 99% em cada tubo. A quantidade de CV retido foi quantificada em espectrofotômetro de UV-visível a 590 nm. O ensaio foi repetido três vezes com 10 repetições de cada vez (GUO et al., 2012)

Para observar a adesão bacteriana em superfície biótica, as culturas por 16 horas foram diluídas para 10^6 ufc/mL em meio LB. Na superfície abaxial, em três pontos distintos da folha, foram gotejados 20 µL da suspensão bacteriana cultivada em LB a 10^4 ufc/mL das linhagens selvagem, mutante e complementar. As folhas foram mantidas a 30 °C e adesão foi monitorada através da coloração com CV 1%. As folhas contendo as suspensões bacterianas nos tempos 24 e 48 horas foram lavadas em água destilada para remoção do excesso de amostras na superfície da folha. Posteriormente, durante 30 minutos, as regiões com amostra biológica foram

coradas com CV 1% e em seguida, submeteu-se as folhas a duas lavagens sequenciais com água destilada para remoção do excesso de corante. As folhas foram secadas a temperatura ambiente e fotografadas.

3.1.7 Extração de RNA e construção de DNA complementar (cDNA).

Após o crescimento das cepas *XacWT*, *Xac::nrtT* e *Xac::nrtTc* em variações do meio XAM1, as culturas foram centrifugadas a 10.000 x g. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para a extração de RNA utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a obtenção do RNA purificado, fragmentos de cDNA foram amplificados com transcriptase reversa e oligos (dT)15 presentes no kit *GoScript™ ReverseTranscription System* (Promega), também seguindo as instruções do fabricante.

3.1.8 Reação de Transcriptase reversa (Reverse Transcriptase - RT-PCR).

A fim de analisarmos a transcrição do gene *nrtT* durante o crescimento das cepas selvagem, mutante e complementar em diferentes disponibilidades de nutrientes, realizamos ensaios de transcrição reversa (RT-PCR). As culturas de *XacWT*, *Xac::nrtT* e *Xac::nrtTc* crescidas nos meios XAM1, XAM1f e XAM1h por 24 horas, 250 rpm a 28 °C tiveram seu RNA extraído e convertido em cDNA. O cDNA foi utilizado como molde para uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos de inicialização do próprio gene *nrtT*. Para a reação foram utilizados 0,4 mM dNTP; 1,5 mM MgSO₄, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 7,5 % DMSO (Dimetilsulfóxido) e 1,0 unidade de *Taq* DNApolimerase (Invitrogen) em termociclador. As temperaturas utilizadas foram: 94 °C por 45 segundos para a desnaturação, 66 °C por 1,5 minutos para o anelamento e 72 °C por 2 minutos para a extensão da enzima. Um total de 35 repetições foram realizadas. O resultado da PCR foi confirmado pela análise dos fragmentos em gel de agarose 1% (massa/volume) com 1% de *Gel Red®* (Biotium) em TAE (40 mM Tris-HCl; 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA), também utilizado como tampão de corrida.

3.2 Obtenção das proteínas de interesse na forma solúvel para ensaios espectroscópicos e de cristalização.

3.2.1 Clonagem, expressão e purificação das proteínas de interesse.

Para a obtenção de proteínas na forma solúvel, demos início aos testes de expressão das proteínas periplasmáticas NrtT e PotF, previamente clonadas no vetor de expressão pET28a (Figura 9A). Os testes de expressão para NrtT não resultaram em proteína na fração solúvel mesmo após tentativas de re-novelamento devido à grande perda de proteína no processo. Como não foram obtidos resultados satisfatórios com NrtT clonada pET28a, foi adotada a técnica de fusão com a proteína SUMO cuja remoção é feita com SUMO protease que reconhece especificamente o sítio de clivagem (DAVIS et al., 1999; MARBLESTONE et al., 2006). Estudos apontam tal fusão como responsável pela melhoria na solubilidade e no rendimento da expressão heteróloga de diferentes proteínas (BUTT et al., 2005; MARBLESTONE et al., 2006). Foi produzido um novo par de oligonucleotídeos de inicialização para amplificar e sub-clonar NrtT no vetor de expressão pET28a-SUMO. O vetor pET28aSUMO não é um vetor comercial, consiste de uma modificação no vetor pET28a no qual foi adicionada em sua sequência original, a sequência polinucleotídica que codifica a proteína SUMO entre os sítios de *NheI* e *BamHI* (Figura 9B).

A sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína NrtT foi obtida no banco de dados Kegg e foi analisada pelo programa de predição *Structural Biology Helper* (<http://lge.ibi.unicamp.br/lnbio/index2.php?refer=2>), no qual identificamos uma região com cerca de 84 pb correspondente ao peptídeo sinal. Esta região foi excluída da construção para expressão e permanência da proteína no citoplasma. Para a amplificação do gene *nrtT* por PCR (*Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase), foram usados variações de temperatura baseados no seguinte cálculo: a primeira temperatura de anelamento foi resultado da média das temperaturas de *melting* específicas dos oligonucleotídeos sense e anti-sense, subtraindo 4 °C. A terceira temperatura foi resultado da média das temperaturas de *melting* gerais dos oligonucleotídeos sense e anti-sense subtraindo 4 °C. A segunda temperatura de anelamento foi a média da primeira e terceira temperaturas. Todo procedimento foi realizado com 0,4 mM dNTP; 1,5 mM MgSO₄, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 7,5 % DMSO (Dimetilsulfóxido) e 1,0 unidade de *Taq* DNA Polimerase *High Fidelity* (Invitrogen) em termociclador. O resultado da PCR foi confirmado pela análise dos fragmentos em gel de agarose 1%

(massa/volume) com 1% de Brometo de Etídio em TAE (40 mM Tris-HCl; 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA), também utilizado como tampão de corrida. As bandas referentes aos insertos amplificados foram purificadas com o uso do kit de purificação de gel da Qiagen, conforme especificações do fabricante.

Figura 9 – Comparação dos mapas dos vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO. Mapa gerado pelo programa pDRAW32 a partir da sequência de bases de cada vetor. **(A)** Mapa de pET28a, **(B)** mapa de pET28aSUMO.

O inserto amplificado e purificado foi clonado no vetor de clonagem pGEM-Teasy (Promega) a fim de facilitar o sequenciamento do mesmo. Para a reação de ligação foram utilizados 50 ng do vetor, 1000 ng do produto de PCR e 1,0 unidade de T4 DNA ligase. A reação foi mantida por 48 horas a 4 °C. Decorrido este período, a cepa de *E coli*, DH5 α , foi transformada com a reação de ligação em pGEM-Teasy por choque térmico e foi crescida em 1 mL de LB a 37 °C, 200 rpm por 2 horas. A cultura crescida foi centrifugada a 10.000 rpm, 4 °C por 5 min., o sobrenadante foi descartado deixando cerca de 200 μ L de meio onde foi ressuspensionado o *pellet*. A ressuspensão foi plaqueada em meio LB sólido com ampicilina e X-gal para seleção das colônias contendo o gene inserido em pGEM-Teasy. Após o crescimento de 24 horas, dez colônias brancas crescidas na placa de LB foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina. Após o crescimento por 14 a 18 horas a 37 °C, 200 rpm, foram retirados 5 μ L de cada cultura para uma varredura dos clones por PCR a fim de detectar clones que apresentavam os insertos. Para a amplificação dos

fragmentos foram utilizados os oligonucleotídeos M13 sense e anti-sense, utilizando colônias azuis como controle negativo, uma vez que a amplificação do vetor vazio resulta em uma banda de aproximadamente 250 pb. A presença dos insertos foi confirmada por análise em gel de agarose 1% e as amostras que apresentaram os fragmentos correspondentes ao gene *nrtT* foram submetidas a uma mini preparação de DNA plasmidial utilizando o kit comercial *Mini-prep* (Qiagen), segundo instruções do próprio fabricante. Os insertos isolados tiveram sua sequência confirmada por sequenciamento automático, utilizando oligonucleotídeos sense e anti-sense do próprio vetor (M13), empregando o sistema de sequenciamento por sondas disponível no LNBio.

Para a sub-clonagem no vetor de expressão pET28aSUMO, o inserto foi clivado do pGEM-Teasy utilizando enzimas de restrição *Fast digest* (Fermentas), de acordo com os sítios inseridos nos oligonucleotídeos (Tabela 3). Para a clivagem de pET28aSUMO e do inserto em pGEM-Teasy foram utilizados 4 ng do inserto, 1,5 ng do vetor, 10 unidades da enzima *EcoRI*, 15 unidade da *XhoI* em tampão O (Fermentas). As reações foram mantidas em banho seco a 37 °C por 3 horas. Após análise em gel de agarose 1%, o fragmento e o vetor foram purificados do gel com o uso do kit de purificação de gel da Qiagen, conforme especificações do fabricante. A ligação do inserto em pET28aSUMO foi feita utilizando a proporção 8:1 (inserto:vetor), 5 unidades/ μ L da enzima T4 DNA ligase e tampão específico da enzima com adição de 1 mM de ATP. A reação foi mantida a 22 °C por 16 horas. Para a confirmação das construções e análise de sua sequência, foi realizado um sequenciamento automático tendo como iniciadores os oligonucleotídeos sense e anti-sense do gene.

Após a confirmação da sequência da proteína NrtT clonada em pET28aSUMO, foi dado início aos testes de expressão, transformando a cepa de *E. coli*, BL21 (DE3), com o plasmídeo pET28aSUMO-NrtT. Foram realizados testes de expressão em escala analítica (50 mL de cultura) para determinar as melhores condições de indução da expressão variando temperatura, agente indutor e tempo de indução em meio LB. Após a determinação das melhores condições, a expressão foi conduzida em larga escala (10 L de cultura). Para a expressão heteróloga de NrtT foi feito um pré-inóculo de 100 μ L da cultura permanente em meio LB contendo canamicina e crescido a 37 °C, 200 rpm de 16 a 18 horas. Após o crescimento do pré-inóculo, o mesmo foi utilizado para realizar um inóculo de 2% em meio LB com

canamicina. As células cresceram a 30 °C, 250 rpm até atingir absorbância em 600 nm entre 0,4 e 0,6. A expressão foi induzida com 0,5 mM de IPTG a 30 °C, 250 rpm por 4 horas.

Tabela 3 - Sequências e informações dos oligonucleotídeos de inicialização para sub-clonagem do gene *nrtT* de *Xanthomonas citri* no vetor de expressão pET28aSUMO. São mostradas as enzimas de restrição utilizadas para a sub-clonagem do inserto no vetor pET28aSUMO. **T_{mg}**: é a temperatura de *melting* geral do oligo, considerando toda a sua extensão, incluindo o sítio de restrição; **T_{me}**: é a temperatura de *melting* do oligo considerando apenas a região deste que se anela ao template; **[GC]**: representa a porcentagem de guanina e citosina em todo o oligo. **Hairpin**: é a temperatura provável para a formação de grampos. O oligo sense foi elaborado para garantir a remoção do peptídeo sinal da proteína.

Oligos	Sequência	Enzima	T _{mg} (°C)	T _{me} (°C)	[GC] %	Hairpin (°C)
Sense	GAA TTC GAA GGC AAG CTG CGG ATC GCC	<i>EcoRI</i>	71,6	69,1	59,3	42,1
Anti-sense	CTC GAG TTA TCA GCT CCC GCC CGC AAT CAG	<i>XhoI</i>	72,6	70,0	60,0	39,4

A expressão da proteína PotF sub-clonada em pET28a, foi conduzida na cepa *ArcticExpress* (DE3) (Agilent Technologies). Foi feito um pré-inóculo de 100 µL da cultura permanente em meio LB contendo 20 µg/mL de gentamicina e crescido a 37 °C, 200 rpm de 16 a 18 horas. Após o crescimento do pré-inóculo, o mesmo foi utilizado para a expressão de PotF a partir de um inóculo de 2% em meio LB sem antibiótico. As células cresceram a 30 °C, 230 rpm até atingir absorbância em 600 nm entre 0,6 e 0,8. A temperatura foi diminuída para 12°C e a expressão foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 24 horas. Conforme o manual do fabricante, a cepa *ArcticExpress* é uma variação da cepa BL21 com chaperonas capazes de atuar em baixas temperaturas. A super-expressão de proteínas heterólogas pode resultar em uma grande quantidade de proteínas enoveladas incorretamente ou presas nos corpos de inclusão. Dessa forma, diminuindo a temperatura de expressão é possível diminuir a velocidade de produção dessas proteínas e o seu enovelamento pode ser feito corretamente. Entretanto a eficiência das chaperonas de *E. coli* GroEL e GroES apresentam apenas 30% da sua capacidade de enovelamento a 12 °C. Para superar este obstáculo, *ArcticExpress* co-expressam chaperonas da bactérias *Oleispira antarctica* (cpn10 e cpn60) capazes de atuar em baixas temperaturas (4-12 °C), conservando identidade de aminoácidos de 74% e 54% com GroEL e GroES respectivamente, aumentando potencialmente o rendimento da proteína recombinante solúvel ativa.

Após a expressão, as culturas expressando tanto NrtT quanto PotF foram centrifugadas a $8.440 \times g$ por quinze minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (50 mM Fosfato de sódio pH 7,4; 150 mM NaCl; 5% Glicerol, 3 mg de lisozima) por litro de cultura. Devido a presença de cisteínas em PotF, foi adicionado ao tampão 1 mM do agente redutor β -mercaptoetanol a fim de reduzir as cisteínas e evitar pontes dissulfeto entre as proteínas. As amostras foram incubadas com agitação durante 30 minutos a 4°C para ação da lisozima. Em seguida, as amostras foram lisadas em desruptor (LA Biosystems) cinco vezes e centrifugadas a $21.700 \times g$, 4 °C por uma hora. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 μ m (Millipore).

O sobrenadante filtrado foi purificado utilizando-se um sistema de *FPLC* (*Fast Protein Liquid Chromatography*) disponível no laboratório da marca Amersham Pharmacia (GE Healthcare). Devido a presença da cauda de seis histidinas (6xHis-tag) no N-terminal a partir do vetor pET28a (PotF) e pET28aSUMO (NrtT), a primeira etapa de purificação foi realizada a partir de uma cromatografia de afinidade por metal (Ni^{2+}) utilizando a coluna *HisTrap HP* 5 mL (GE Healthcare) pré-equilibrada como o tampão A (50 mM Fosfato de sódio pH 7,4; 150 mM NaCl; 5% Glicerol). A injeção das amostras e a lavagem da coluna foram feitas com tampão A e a eluição, realizada em duas etapas, foi feita com o tampão B (50 mM Fosfato de sódio pH 7,4; 150 mM NaCl; 5% Glicerol, 500 mM Imidazol). A primeira parte da eluição consistiu em passar 10% (NrtT) e 15% (PotF) do tampão B a fim de remover os contaminantes. Após o fim do pico de contaminantes, foi injetado 100% do tampão B para a eluição das proteínas de forma concentrada. A confirmação da purificação foi feita a partir de análises por SDS-PAGE 15% no qual pudemos observar frações que continham bandas com o tamanho de 47 kDa (NrtT-SUMO) e 40 kDa (6xHisTag-PotF). Estas frações foram reunidas e concentradas em filtro *amicon ultra* (Millipore) de 10 kDa e as centrifugações foram feitas em centrífuga para tubos do tipo *falcon da eppendorf* a 4 °C, 2700 rpm por 5 minutos até atingir um volume de aproximadamente 1,8 mL. Para concentração de PotF foi adicionado 1 mM do agente redutor DTT (Ditiotreitol) a fim de reduzir as cisteínas e evitar pontes dissulfeto entre as proteínas.

A proteína NrtT-SUMO foi clivada com SUMOprotease com intuito de remover a fusão SUMO. Foi adicionado 1 mg de SUMO protease à cada 5 mg de proteína e a clivagem foi mantida por 16 horas a 4 °C. A remoção da cauda de

histidina da proteína PotF foi feita usando 1mg de trombina por 16 horas a 4 °C. As amostras clivadas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular com a coluna *HiLoad Superdex 75 16/60* (GE Healthcare) a fim de separar diferentes conformações oligoméricas que a proteína possa apresentar. Todas as etapas cromatográficas foram monitoradas a partir de SDS-PAGE.

3.2.2 *Análise da expressão das proteínas a partir de Western blot.*

A partir de um gel 15% de poliacrilamida contendo as amostras, foi montada a transferência das amostras do gel para a membrana PVDF. Antes da transferência, a membrana foi ativada com metanol em banho de 10 segundos, seguido de um banho de água Mili-Q por 5 minutos. A reação de transferência foi preparada em cuba específica utilizando três papéis cromatográficos abaixo do gel. Sobre o gel foi colocada a membrana de PVDF seguindo a orientação da corrente elétrica aplicada que deve seguir do gel para a membrana. Por fim, foram adicionados mais três papéis cromatográficos sobre a membrana. O aparato foi banhado pelo tampão Taubin (25 mM Tris-Base pH: 8,3; 192 mM Glicina; 10% metanol; 0,1% SDS). A amperagem utilizada para a transferência foi proporcional à área do gel (1 mA/cm²).

Para o tratamento da membrana após a transferência, a mesma foi banhada por três vezes de cinco minutos em TBS-Tween (50 mM Tris-Base pH: 8,4, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20). A inativação de ligações inespecíficas foi realizada com a solução com 5% de leite em TBS-Tween (p/v). A membrana foi incubada por 16 horas agitando a 4 °C. No dia seguinte, a solução de leite foi descartada e a membrana lavada com TBS-Tween duas vezes de 5 minutos em temperatura ambiente. A membrana foi banhada com a solução de anticorpo anti-poliHistidina (GE Healthcare) para NrtT e PotF na proporção de 1:5000 em TBS-Tween. Outra membrana foi banhada com o anticorpo anti-NrtT apenas para NrtT na proporção 1:3000. A ação dos anticorpos foi mantida sob agitação por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente com tampão TBS-Tween por cinco vezes de cinco minutos para a posterior adição do anticorpo secundário (Anti-IgG conjugado a fosfatase alcalina da Sigma) na proporção de 1:3500 diluído em TBS-Tween. As membranas foram mantidas por duas horas agitando em temperatura ambiente.

A revelação das membranas foi feita incubando-as na solução reveladora, que apresenta substratos da fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,02% BCIP e 0,03% NBT, ambos da Promega) mantidas sob agitação em temperatura ambiente por até uma hora. Para parar a reação foi adicionada a solução de EDTA 10 mM em TBS-Tween por 5 minutos.

3.2.3 Quantificação e pureza das proteínas.

Após os passos de purificação, a concentração da proteína foi estimada por absorbância de 280 nm utilizando o espectrofotômetro *nanodrop* (Thermo Scientific). A partir dos valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) obtidos através do programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>) e dos valores de absorbância a 280 nm, foi determinada a concentração molar da proteína através da Lei de Beer-Lambert:

$$A_{280} = \epsilon \cdot l \cdot C$$

onde A_{280} é a absorbância medida a 280 nm, l é o caminho ótico (cm), C é a concentração molar da amostra de proteína e ϵ é coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$).

A pureza da amostra foi analisada tanto por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante sob condições redutoras (SDS-PAGE), como também através de análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

3.3 Caracterização do comportamento das proteínas e verificação de possíveis alterações estruturais na presença de ligantes por meio de análises biofísicas.

3.3.1 Análises Biofísicas.

Para obtenção dados referentes à estrutura secundária e estabilidade térmica das proteínas, foram realizadas análises biofísicas como Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*) e Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism – CD*). Para análises da interação das proteínas com seus possíveis ligantes foram realizados experimentos de Fluorescência Intrínseca do triptofano e Fluorimetria de varredura diferencial (*Differential scanning fluorimetry – DSF*). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria

(LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas, e todos os dados obtidos foram exportados e tratados no programa *OriginPro 8* (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

a) **Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS).**

O DLS é um dos mais populares métodos utilizados para determinar o tamanho de partículas. Emitindo um feixe de luz monocromático, como um laser, em uma solução com partículas esféricas em movimento Browniano (aleatório) causa um deslocamento da luz quando esta atinge a partícula em movimento, alterando o comprimento de onda da luz incidente. Esta alteração está relacionada com o tamanho da partícula. É possível calcular a distribuição do tamanho de esfera e fornecer uma descrição do movimento da partícula no meio, medindo o coeficiente de difusão da partícula e usando a função de auto correlação (BERNE; PECORA, 1976). Assim, é possível obter informações quanto ao raio hidrodinâmico da proteína e à dispersividade populacional (homogeneidade estrutural) a qual tem sido demonstrada como essencial para o sucesso dos ensaios de cristalização (GOLDBURG, 1994; WÄRDELL et al., 1993). As amostras foram previamente centrifugadas a 13.000 rpm por 30 min e as análises foram realizadas no equipamento *DLS - Wyatt - Protein Solutions* (DynaPro 99) a 18 °C, utilizando 80 µL da amostra a 1 mg/mL. Foram coletadas 300 aquisições de 10 segundos cada.

b) **Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism* – CD).**

A espectroscopia de CD é uma importante técnica para estudar função, forma e enovelamento de proteínas. É provavelmente uma das mais importantes técnicas para a investigação inicial de proteínas purificadas, permitindo a obtenção de informações rápidas e confiáveis quanto à conformação e estabilidade das proteínas (CORRÊA; RAMOS, 2009).

A técnica de CD baseia-se na absorção diferenciada da luz circularmente polarizada a esquerda e a direita por cromóforos intrínsecos das proteínas, como aminoácidos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e ligações peptídicas. Estes cromóforos dão origem aos sinais de CD em duas regiões: (1) região de UV distante (240-180 nm), a UV absorvida corresponde a absorção de ligação peptídica, o espectro de CD pode ser analisado para obter o teor de características estruturais

secundárias regulares, tais como uma hélice- α e folha- β ; (2) região de UV próxima (320-260 nm) que reflete os ambientes das cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e, assim, fornece informações sobre a estrutura terciária da proteína (KELLY et al., 2005).

Outra aplicação do CD é o monitoramento da estabilidade da proteína, aumentando condições desnaturantes como a temperatura, substâncias químicas (uréia e cloreto de guanidina) e extremos de pH (geralmente ácido). A transição do desenovelamento pode ser facilmente determinada ao escolher um comprimento de onda em que a diferença de sinal entre a proteína enovelada e desenovelada é grande. Por exemplo: proteínas ricas em hélices- α têm um grande sinal de CD a 222 nm, entretanto, quando desnaturada, a proteína passa a ter pouco ou nenhum sinal, fazendo com que o monitoramento a 222 nm seja eficaz para o acompanhamento da desnaturação (CORRÊA; RAMOS, 2009; KELLY; PRINCE, 2000).

Dessa forma, realizamos análises de CD para acessar informações sobre o enovelamento da proteína, dados preliminares da estrutura secundária e as propriedades dinâmicas da mesma. Essas informações foram avaliadas na presença e na ausência de moléculas consideradas possíveis ligantes de NrtT devido a presença de nitrogênio na sua composição e, com Putrescina no caso de PotF. As proteínas e os ligantes foram diluídos em água Mili-Q para uma concentração final de 3 μ M e de 10 a 50 μ M respectivamente. Para cada espectro foram coletadas 20 acumulações a 50 nm/min a 10 °C. Cada desnaturação térmica foi monitorada de 10 a 100 °C com intervalos de 1 °C/min. Ambos os experimentos foram executados no espectropolarímetro *Jasco J-180* (JASCO, Easton, MD USA) equipado com um Peltier para o controle da temperatura.

c) Fluorescência intrínseca do triptofano.

A fluorescência do triptofano (Trp) é uma sonda capaz de fornecer informações acerca da conformação e enovelamento da proteína em solução e amplamente utilizada para obter informações termodinâmicas e cinética. O triptofano é comumente usado como sonda, primeiramente devido a sua atividade cromófora, ou seja, capaz de emitir fluorescência quando estimulado a 280 nm; e segundo porque muitas proteínas apresentam esse aminoácido em sua composição (LAPTENOK et al., 2011; PAN et al., 2011). Devido à sua característica hidrofóbica,

o triptofano localiza-se em regiões menos expostas na conformação proteica, logo, alterações na emissão de fluorescência de tal resíduo, pode indicar modificação na estrutura da macromolécula. Essas alterações na posição do triptofano são monitoradas a partir da intensidade da fluorescência desse aminoácido (PAN et al., 2011).

Para as análises das proteínas foram utilizados 3 μM das proteínas alvos e 2, 10 e 50 μM de ligantes. A excitação foi feita no comprimento de onda de 280 nm e a aquisição dos dados foi obtida entre 300 e 400 nm a 1 nm/seg em espectrofluorímetro PC1/K2 (ISS).

d) Fluorimetria de varredura diferencial (*Differential scanning fluorimetry - DSF*).

Também conhecido como *thermal shift*, o DSF permite medir o aumento da fluorescência de um ambiente sensível a sonda SYPRO Orange (ERICSON et al., 2006; MCFEDRIES et al., 2013). A sonda SYPRO Orange, por apresentar características hidrofóbicas, se liga a regiões proteicas com a mesma característica, entretanto, os resíduos hidrofóbicos tendem a se posicionar em regiões menos expostas. Para que a sonda consiga alcançar tais posições, é necessário o desenovelamento que expõe os resíduos hidrofóbicos. (ERICSON et al., 2006; NELSON; COX, 2011). A partir da interação da sonda com resíduos hidrofóbicos há a emissão de fluorescência que pode ser detectada por um equipamento de *Real-Time* PCR. Essa fluorescência nos permite estimar a temperatura de *melting* da proteína, monitorando o seu desenovelamento de acordo com a intensidade da fluorescência emitida pela sonda (ERICSON et al., 2006).

Para os experimentos de DSF foram utilizados 13 μM de proteína, concentrações variáveis de ligantes e tampões conforme mostrado na tabela 1 dos anexos, e 90 vezes da sonda SYPRO® Orange *Protein Gel Stain* (Sigma Aldrich). A temperatura foi variada de 20 a 100 °C a 1 °C por minuto no equipamento 7500 *Real Time Pcr System* (Applied Biosystems).

3.4 Caracterização estrutural das proteínas por modelagem molecular, ensaios de cristalização e experimentos de espalhamento de raios-x a baixos ângulos.

3.4.1 Caracterização da proteína periplasmática por modelagem molecular por homologia.

A modelagem das proteínas periplasmáticas foi realizada com o intuito observar sua provável estrutura terciária, com especial atenção às regiões do bolsão de interação com o ligante e de interação com as permeases de cada transportador. As sequências primárias das proteínas de interesse foram obtidas a partir do banco de dados Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>). A busca por proteínas com similaridade de sequência foi feita a partir dos programas BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997) e CLUSTALX (CHENNA et al, 2003). Como moldes para a modelagem foram usadas proteínas com estrutura resolvida que apresentassem maior similaridade de sequência para cada proteína. As modelagens foram feitas pelo programa Modeller (SÖDING et al., 2005 - <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) e a observação das estruturas foi feita pelo programa *Pymol* (DeLANO, 2002).

Os modelos gerados foram validados a partir do alinhamento com proteínas homólogas de estrutura resolvida, e a partir do gráfico de Ramachandran no programa WinCoot (EMSLEY; COWTAN, 2004).

3.4.2 Análises por espalhamento de raios-X a baixos ângulos (Small angle X-ray Scattering - SAXS).

A técnica de SAXS é um método que possibilita analisar macromoléculas em solução, obtendo informações estruturais de amostras não cristalinas como determinação da forma, composição oligomérica, existência de corpo rígido e formação de complexos (MERTENS; SVERGUN, 2010). Ensaios de SAXS para a proteína NrtT foram realizados na linha de luz SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas - SP. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente com tempo de exposição de 300 segundos para os tampões e as amostras. A concentração utilizada de NrtT foi de 10 μ M e 30 μ M do ligante. Dos espectros obtidos das amostras foram subtraídos os tampões a partir do programa Fit-2D (HAMMERSLEY, 1995).

Para a proteína PotF, os experimentos de SAXS foram realizados no equipamento XEUSS (Xenocs) localizado no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. Cristiano Oliveira. A concentração

utilizada foi de 100 μ M de PotF e 300 μ M de putrescina. As amostras foram colocadas em capilares de quartzo reutilizáveis e mantidos em um suporte cuja temperatura foi mantida a 20 °C. Foram coletados 20 espectros de 30 minutos cada para cada amostra (com e sem putrescina). Os dados coletados permitiram a determinação dos envelopes a partir de modelagem molecular *ab initio* usando o pacote de programas Atsas 2.1 (KONAREV et al., 2006; PETOUKHOV et al., 2007) e os gráficos foram construídos no programa *OriginPro 8* (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3.4.3 Ensaios de cristalização.

Utilizamos inicialmente a técnica de matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991) para uma varredura inicial a fim de encontrar condições que sejam favoráveis para a cristalização das proteínas periplasmáticas. Foram testados seis kits iniciais baseados em kits comerciais (*Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* e *SaltRx* da Hampton Research; *Precipitant Synergy* e *Wizard I e II* da Emerald Biosystems; *PACT* e *JCSG+* da Nextal/Qiagen) disponíveis no laboratório de cristalização (RoboLab) do LNBio. Gotas contendo 1,0 μ L da proteína foram equilibradas contra 1,0 μ L da solução do poço por difusão de vapor usando-se método *sitting drop* em placas de 96 poços montadas pelo robô *HoneyBee* (Digilab). As placas foram incubadas a 18°C. A visualização das placas foi feita por meio do robô de visualização *Rock Maker* (Formulatrix) que também fotografa com zoom e com emissão de luz UV. A incidência de luz UV permite diferenciar cristais de proteína uma vez que a luz UV é absorvida pelos triptofanos fazendo com que o cristal fique iluminado na gota, diferente de um cristal de sal que não absorve a UV e fica apagado na gota. De condições promissoras obtidas com os ensaios iniciais, realizou-se os refinamentos, que consistiam em variar de acordo com as características dos cristais obtidos os seguintes pontos: precipitante, solução tamponante, e sal. Essas condições foram produzidas e pipetadas pelo *HoneyBee* na proporção de 1:1 em placas de 96 poços ou pipetadas manualmente na proporção 2:1 (proteína:solução do poço) em placas de 48 poços

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES BIOFÍSICAS, ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA PROTEÍNA NrtT DE *X. citri*.

Para expormos de maneira clara os resultados, os mesmos são divididos duas partes: Parte I referente às análises biofísicas, estruturais e funcionais da proteína NrtT; Parte II referente às análises biofísicas e estruturais da proteína PotF, ambas de *X. citri*.

4.1 Ausência do gene *nrtT* influencia o crescimento, patogenicidade, aderência, produção de goma e biofilme.

É sabido que mutantes *knockout* de diferentes genes envolvidos na patogenicidade de *X. citri* influenciam o metabolismo dessa bactéria. Em nossos experimentos a primeira evidência de alteração fenotípica nos mutantes *Xac::nrtT* foi a formação de colônias menores e com menor intensidade da cor amarela após o crescimento de 24 horas em placas contendo meio LB quando comparada com a linhagem selvagem *Xac* (Figura 10A). Estes resultados sugeriram que a ausência do gene *nrtT* poderia alterar o fenótipo das colônias devido à deficiência na produção de goma xantana, fenótipo já observado em trabalhos anteriores com diferentes mutantes (ARAÚJO et al., 2013; CROSSMAN; DOW, 2004; VONJNOV et al., 1998). Neste caso, analisamos a produção da goma xantana nas linhagens selvagem e mutante a partir do cálculo do peso sobre o número de células. De fato, os resultados evidenciaram que a deleção do gene *nrtT* em *X. citri* leva à redução de 26% na produção da goma xantana quando comparada com a linhagem selvagem (Figura 10B). A goma xanthana é um mecanismo essencial para bactéria em processos de infecção e desenvolvimento de cancro cítrico (NITSCHKE; RODRIGUES, 2000; RAMIRÈZ et al., 1988), além de ter sido relacionada à virulência, uma vez que este polissacarídeo é importante para a atração de líquidos e nutrientes à região da infecção, levando ao fenótipo conhecido como anasarca (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; GUO et al., 2010; KATZEN et al., 1998). Adicionalmente, a goma influencia a formação de biofilme uma vez que favorece a colonização da bactéria.

Uma vez notada a deficiência na produção da goma na linhagem mutante, foram avaliados a produção de biofilme e aderência das linhagens. O biofilme pode oferecer maior proteção contra estresses ambientais e aumentar a resistência

bacteriana contra as respostas de defesa do hospedeiro e tolerância antimicrobiana. Os biofilmes também permitem o metabolismo de consórcio e podem aumentar a possibilidade de transferência horizontal de genes (COSTERTON et al., 1999).

Para a maioria das bactérias patogênicas, a fixação em superfícies e sucessiva formação de biofilme são passos essenciais para o desenvolvimento de infecções crônicas e manutenção de tecidos do hospedeiro (COSTERTON et al., 1999). Em patógenos de plantas, a formação de biofilme também permite o aumento da densidade de células bacterianas que por sua vez ajuda a atingir uma massa crítica de células em um local específico para iniciar e manter interações com plantas hospedeiras (DANHORN; FUQUA, 2007). A formação de biofilmes em *X. citri* parece ser uma característica comum durante o período de infecção e mutantes de *X. citri* que não produzem biofilme apresentam ineficiência na fixação de superfície, agregação e, conseqüentemente, são deficientes na patogênese (GOTTIG et al., 2009; MALAMUD et al., 2011; SGRO et al., 2012). Nossas análises mostraram que tanto a produção de biofilme como a aderência são alteradas no mutante *Xac::nrtT*. A produção de biofilme em superfície abiótica é cerca de 24% menor na linhagem *Xac::nrtT* quando comparada com a produção de biofilme por *X. citri* (Figura 10C). Similarmente, a aderência de *Xac::nrtT* em folhas de *Citris sinensis* após 14 e 48 horas da infecção é reduzida quando comparada com a linhagem selvagem (Figura 10D). Nestes ensaios, contudo, não foi observado o efeito recuperado na linhagem complementar *Xac::nrtTc*, mesmo após 48 horas de infecção.

Essas análises mostraram que, de alguma maneira, a deleção do gene *nrtT* influencia a formação de goma e conseqüentemente os processos de adesão e formação de biofilme que poderiam levar à alterações no crescimento. Para que pudessemos verificar se o mutante *Xac::nrtT* tinha alguma dificuldade no crescimento e desenvolvimento do fenótipo do cancro cítrico em comparação com a linhagem selvagem, foram realizadas curvas de crescimento *in vitro* e *in vivo* e análises fenotípicas durante o processo de infecção em folhas de *Citrus sinensis*.

Figura 10 – O papel do gene *nrtT* no fenótipo, adesão e formação de biofilme nas linhagens selvagem, mutante e complementar. (A) morfologia e coloração das colônias de *XacWT*, *Xac::nrtT* e *Xac::nrtTc* em placas de meio LB evidenciando que a mutação causa diminuição da colônia e perda da coloração característica da bactéria. **(B)** Análise da produção da goma xantana nas linhagens selvagem e mutante, evidenciando a redução de 26% em *Xac::nrtT* quando comparada com *XaacWT*. **(C)** Análise da produção de biofilme nas linhagens *XacWT* e *Xac::nrtT* em superfície abiótica. A redução de 24% na formação do biofilme evidencia que a mutação afeta o metabolismo da bactéria **(D)** Análise da adesão das células selvagem, mutante e complementar em superfície de folhas de laranjeira. Novamente, a mutação afeta a adesão quando comparada com a linhagem selvagem. Por outro lado, a linhagem complementar não recuperou o fenótipo esperado.

Comparando o crescimento das linhagens selvagem e mutante nos meios de cultivo LB e XAM1, ambas apresentaram as fases *lag* e *log* da curva de crescimento bem definidas (Figura 11A e B). Em ambos os meios as linhagens iniciaram a fase logarítima com cerca de 35 a 40 horas após a inoculação, sendo que em meio XAM1, *Xac::nrtT* teve um atraso de aproximadamente 5 horas em relação a *XacWT* para iniciar a fase *log*. Contudo, não foram vistas diferenças significativas entre o crescimento das linhagens selvagem e mutante nos diferentes meios de cultivo testados, indicando que o gene *nrtT* não é essencial para o crescimento de *X. citri* nestas condições.

Figura 11 – Comparação do crescimento in vitro das linhagens selvagem e mutante. As curvas de crescimento de *XacWT* e *Xac::nrtT* são mostradas em (A) meio LB e (B) meio XAM1. Nota-se que apesar de crescimento inferior, não há diferença significativa no comportamento das duas linhagens nos dois meios.

Segundo as análises de bioinformática e anotação do genoma, o *operon nrtBCDT* não tem função definida, mas sua predição sugere relação à captação de nitrato/taurina/sulfonatos. Em *E. coli*, os sistemas de captação destes componentes são transportadores do tipo ABC que pertencem ao conhecido regulon *cys* (EICHHORN et al.; 2000; KERTESZ, 1999; STEC et al., 2006). No regulon *cys* de *E. coli*, existe um transportador ABC para sulfato, de alta afinidade, que é induzido na carência do íon. Adicionalmente, ainda pertencente ao regulon *cys*, na ausência do sulfato dois outros transportadores ABC são ativados, um para captura de alceno sulfonatos e outro para taurina (EICHHORN et al.; 2000). Como estes sistemas ABC são de alta afinidade e normalmente induzidos em condições de carência, é possível que a proteína NrtT não seja necessária nas condições ensaiadas uma vez que

tanto LB como o meio XAM1 oferecem quantidades sulficientes de enxofre e nitrogênio.

Assim, para fazermos um rastreamento melhor e possivelmente identificarmos a molécula de captação de NrtT, criamos variações de compostos nitrogenados ou sulfatos no meio XAM1 a fim de avaliar o crescimento das linhagens nessas condições. Dado que a linhagem complementar não vinha dando resultados esperados, os ensaios foram realizados apenas com as linhagens de *X. citri* *XacWT* e *Xac::nrtT*. Os resultados são apresentados na tabela 4 e mostram que *XacWT* e *Xac::nrtT* apresentam crescimento similar em LB e XAM1, meios que contém todas as fontes de nitrogênio e enxofre necessárias ao crescimento da bactéria e algumas variações na composição dos meio foram inviáveis para o crescimento das linhagem. Adicionalmente, estes dados mostram que a NrtT não é necessária quando estes elementos estão conjuntamente presentes. Por outro lado, a única combinação que permitiu o crescimento da *X. citri*, mas não de *Xac::nrtT*, foi na retirada a fonte de amônia ((NH₄)SO₄) e incluído MOPS (meio XAM1f), o que sugere que a NrtT poderia se ligar a alceno sulfonatos como o MOPS, mas para utilização como fonte de nitrogênio e não de sulfato, uma vez que há disponibilidade de sulfato no meio e mesmo sob essas condições a linha *Xac::nrtT* não apresentou crescimento. De fato, se o MOPS fosse fonte de sulfato também, a linhagem selvagem deveria crescer no meio XAM1g, onde o MOPS seria fonte de sulfato (MgSO₄ foi substituído por MgCl₂) e nitrogênio. O crescimento de *XacWT* em XAM1f (MOPS) é inferior ao crescimento obtido no meio XAM1 original (Figura 12), mas superior ao crescimento em XAM1h (Taurina).

Tabela 4 – Crescimento das linhagens de *X. citri* nas diferentes composições do meio XAM1.

Alguns componente como sulfato de magnésio são essenciais para o crescimento das cepas, entretanto, o crescimento de *Xac::nrtT* não foi observado quando sua única fonte de nitrogênio era MOPS. Essa dados indica uma possível função de NrtT para a captação e transporte de alcanos sulfonatos.

	LB	XAM1	XAM1a -MgSO ₄	XAM1b -MgSO ₄ +MgCl ₂	XAM1c -MgSO ₄ -NH ₄ SO ₄	XAM1d -MgSO ₄ -NH ₄ SO ₄ +MgCl ₂	XAM1e -NH ₄ SO ₄ +CaSO ₄	XAM1f -NH ₄ SO ₄ +MOPS	XAM1g -NH ₄ SO ₄ +MOPS -MgSO ₄ +MgCl ₂	XAM1h -NH ₄ SO ₄ +Taurina
<i>XacWT</i>	+++	++	-	-	-	-	-	++	-	+
<i>Xac::nrtT</i>	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	+

Esses dados nos dão os primeiros indícios de que NrtT seja uma proteína captadora de sulfonatos para a assimilação de fontes de nitrogênio. Interessantemente, em outro trabalho relacionado do nosso grupo, mostramos que diferentemente do que acontece em *E. coli* que apresenta os sistemas ABC de captação de taurina (TauABCD) e de alcano sulfonatos (SsuABCDE), *X. citri* apresenta dois sistemas de captação de alcano sulfonatos, codificados pelos *operons ssu1* e *ssu2*, cujas proteínas ligadoras são distintas entre si, e quando comparadas com a proteína ligadora de taurina, se organizam em um grupo filogenético diferente (PEREIRA et al., *em prep.*). Estes dados serão discutidos posteriormente, mas é interessante ressaltar que estudos realizados pelo nosso grupo com a proteína ligadora de alcanos sulfonatos de *X. citri*, SsuA2 também mostraram que o crescimento da linhagem mutante *Xac::ssuA2* foi comparável ao da linhagem selvagem *in vitro*, entretanto, os ensaios *in vivo* demonstraram que a SsuA2 é importante para o desenvolvimento do cancro (ARAÚJO et al., 2013).

Figura 12 – Crescimento *in vitro* das linhagens selvagem (*Xac WT*) e mutante (*Xac::nrtT*) de *X. citri* em diferentes meios de cultura.. Curva de crescimento *in vitro* de *XacWT* e *Xac::nrtT* em meio XAM1, XAM1f e XAM1h onde a fonte de amônio é constituída por sulfato de amônio, MOPS e taurina, respectivamente. Os dados mostram que NrtT pode ligar-se a alcano sulfonatos como MOPS mas para a assimilação do nitrogênio, uma vez que há disponibilidade de sulfato no meio.

Dessa forma, analisamos o efeito da deleção do gene *nrtT* no processo de infecção e patogenicidade de *X. citri*. Culturas das diferentes linhagens foram inoculadas em três setores de uma mesma folha conforme apresentado na Figura

13A. A partir de então, foram realizadas curvas de crescimento a partir das células recuperadas das folhas. A ausência do gene *nrtT* em *X. citri* alterou a forma de infecção, crescimento bacteriano e desenvolvimento do cancro cítrico. Os resultados das análises de crescimento mostram que o mutante *Xac::nrtT* apresenta crescimento bastante inferior ao da linhagem selvagem (Figura 13B). Similarmente, as folhas de *C. sinensis* inoculadas com a cepa mutante mostraram sintomas do cancro bastante atenuados e atrasados quando comparados com a cepa selvagem, com evidência para o aparecimento de clorose ou clareamento das folhas por deficiência de clorofila e diminuição na retenção de água, sintoma característico do cancro (Figura 13C).

Essas informações são coerentes com os resultados apresentados anteriormente em relação à produção de goma, adesão e formação de biofilme, evidenciando que a deficiência da NrtT tem um efeito no processo de infecção. De fato, a deficiência na produção de goma e formação de biofilme já foram relacionadas à deficiência no crescimento e patogenicidade de *X. citri* (KATZEN *et al.*, 1998; YAN & WANG, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013). No caso da SsuA2, a proteína ligadora de alcano sulfonatos de *X. citri*, a ausência desta proteína poderia afetar a via de síntese de cisteína, um aminoácido presente em todas as enzimas da via de síntese de goma xantana (ARAÚJO *et al.*, 2013). A ausência de genes não diretamente relacionados à biossíntese da goma mas que afetam a sua produção poderia ser relacionada à captação de compostos envolvidos na produção de intermediários que sinalizam a via de biossíntese de goma (KATZEN *et al.*, 1998).

Resultado intrigante foi o obtido com a linhagem complementar que apresenta crescimento intermediário entre a linhagem selvagem e a mutante, o que de certa forma é esperado uma vez que esta linhagem apresenta um plasmídeo adicional. Porém, de forma inesperada, a linhagem complementar não recuperou o fenótipo característico do cancro, ou mesmo alguns dos sintomas mais comuns e apresentou dados semelhantes ao do mutante. Para certificar que a linhagem complementar não havia perdido o gene ao longo do processo de infecção, análises por PCR foram realizadas a partir da amplificação do gene sintético e células recuperadas do 10º dia após a infecção, utilizando os oligonucleotídeos: i) sense e anti-sense da região promotora; ii) sense e anti-sense do gene *nrtT*; iii) sense da região promotora e anti-sense do gene *nrtT*.

Figura 13 - Crescimento das linhagens de *X. citri* selvagem, mutante *Xac::nrtT* e complementar *Xac::nrtTc* em folhas de *Citrus sinensis* e análise fenotípica da infecção e patogenicidade. (A) Posição de infiltração das amostras em *Citrus sinensis*. **(B)** Curva de crescimento das linhagens em folhas de *C. sinensis*. O gráfico mostra o número de unidades formadoras de colônia ao longo dos dias após a infecção de 10^{-6} unidades formadoras de colônias. **(C)** Fenótipo da evolução da doença promovida pelas linhagens selvagem (*Xac* WT), mutante (*Xac::nrtT*) e complementar (*Xac::nrtTc*) ao longo dos dias. A presença do fenótipo do cancro pode ser evidenciada na linhagem selvagem a partir do oitavo dia de infecção. Por outro lado, os sintomas são retardados na linhagem mutante e diferentes, com destaque para o desenvolvimento de clorose e formação de pequenas pústulas. Os sintomas do complementar foram semelhantes ao da linhagem mutante.

Analisando em gel de agarose os produtos da amplificação, os fragmentos de tamanho esperado para cada amplificação foram amplificados tanto no gene sintetizado (Figura 14A), como a partir das células recuperadas do 10º dia após a infecção (Figura 14B), evidenciando a formação correta da construção e a presença do gene *nrtT* na linhagem complementar. Entretanto a presença do gene não reflete

a sua expressão, logo foram realizados experimentos de RT-PCR a partir de RNA extraído do crescimento das linhagens de *X. citri* em meio XAM1, XAM1f e XAM1h para monitorar a expressão do gene *nrtT* durante o crescimento em meios de culturas com diferentes disponibilidades de nutrientes. Outra vez tivemos um resultado inesperado, onde diversas bandas foram amplificadas tornando nosso experimento inconclusivo (dados não mostrados). Novos experimentos de RT-PCR serão realizados para analisar a expressão do gene *nrtT* na linhagem complementar.

Figura 14 - Reação de PCR para confirmação da presença do gene *nrtT* na linhagem complementar. Amplificação dos fragmentos referentes à região promotora (P) com cerca de 775 pb, gene *nrtT* (n) com cerca de 1023 pb, e promotor+gene formando o cassete de complementação (C), a partir do plasmídeo pKX33*nrtT* (A) e DNA de cultura bacteriana extraído da planta (B) no 10º dia após a infecção.

4.2 Análises biofísicas e estruturais sugerem que *nrtT* é potencialmente ligadora de alcanos sulfonatos.

4.2.1 A proteína *NrtT* conserva resíduos essenciais para a interação com alcano sulfonatos.

A busca por uma estrutura que pudesse ser usada como molde para a construção do modelo da proteína periplasmática *NrtT*, realizada com o programa BLASTp x PDB, sugeriu como melhor opção a proteína ligadora de alcano sulfonatos da própria *X. citri* (*SsuA*, PDB 3KSX), a qual compartilha 33% de identidade e 49% de similaridade, seguida pela proteína ligadora de nitrato de *Synechocytis* sp (*NrtA*, PDB 2G29) com 41% de identidade e apenas 5% de similaridade. O modelo da *NrtT* foi então produzido a partir das coordenadas estruturais de *SsuA* e *NrtA*. Os dados de alinhamento e validação dos modelos estão apresentados na Figura 1 dos anexos. A sobreposição do modelo com as duas proteínas moldes permitiu a identificação do bolsão onde o ligante se encaixa

entre os dois domínios da proteína. Após a superposição as proteínas foram comparadas lado a lado de acordo com o potencial eletrostático da entrada do bolsão (Figura 15A), do volume ocupado pelo bolsão (superfície interna, Figura 15B) e resíduos formadores do sítio (Figura 15C). Inicialmente, a partir do potencial eletrostático das proteínas com vista para a entrada do bolsão, observamos a predominância de resíduos carregados positivamente ou neutros (cor azul escuro ou azulado) nas três proteínas.

Figura 15 - Análises estruturais comparativas das proteínas ligadoras de alcano sulfonatos de *X. citri* (SsuA2) e de nitratos de *Synechocytis* sp. com a NrtT de *X. citri*. (A) vista no formato superfície da entrada do bolsão das proteínas periplasmáticas evidenciando o potencial eletrostático onde as cargas positivas, neutras e negativas são apresentadas em azul, cinza e vermelho, respectivamente. (B) Bolsão de ligação ao ligante evidenciando resíduos de aminoácidos importantes para a interação entre SsuA (BALAN *et al.*, 2008) e NrtA (KOROPAKTIN *et al.*, 2006) com seus respectivos ligantes. Essas análises mostram o quanto NrtT conserva características estruturais de SsuA, indicando uma possível interação com alcanos sulfonatos.

Interessantemente, a NrtT apresenta potencial eletrostático na entrada do bolsão positivo, mais próximo aos valores identificados na proteína NrtA do que na SsuA, onde a entrada tende ao neutro. Por outro lado, a superfície representativa do volume interno mostra que este em NrtT é mais similar ao da SsuA, o que está de acordo com as análises dos resíduos que formam o bolsão. Como a SsuA foi resolvida na presença de ligantes, os resíduos da interação puderam ser mapeados e foram usados para identificar similares na NrtT (Figura 16C). A análise revela que NrtT conserva os resíduos que na SsuA coordenam o sulfato do alceno sulfonato, a Ser¹⁴¹, Gly⁶⁸, Gly⁸⁶ e Glu³⁶. A presença de um dipolo para formação de cargas de atração e dos resíduos mencionados tem sido evidenciada pelo nosso grupo como características importantes para coordenação de íons (ARAÚJO et al., 2013; SANTACRUZ-PEREZ et al., 2013). Estes dados corroboram os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* em meio XAM modificado, que evidenciaram um papel de NrtT na assimilação de MOPS, um alceno sulfonato.

4.2.2 *NrtT* foi expressa na forma solúvel fusionada à SUMO e se mantém estável após a clivagem.

Para iniciarmos os estudos de caracterização da NrtT, demos início aos procedimentos de clonagem. O produto de PCR do gene *nrtT* gerou um fragmento no gel de agarose com massa molecular esperada de cerca de 900 pb (Figura 16A). Este fragmento foi clonado em vetor pGEM T-easy e subclonado no vetor de expressão pET28a-SUMO. Ambas as construções foram confirmadas por análises de restrição e sequenciamento (dados não mostrados).

Nossos resultados mostraram que as estratégias de clonagem e expressão adotadas foram eficientes uma vez que a proteína NrtT foi obtida na forma solúvel quando fusionada à proteína SUMO e purificada a partir da cauda de seis histidinas (Figura 16B). A clivagem da fusão foi prontamente realizada na presença de SUMO-protease e foi confirmada por *western blot* uma vez que ao observarmos a membrana anti-his (Figura 16C), não aparece nenhuma banda com o tamanho esperado (32 kDa) na etapa da exclusão molecular. Por outro lado, nessa mesma etapa analisada por anti-NrtT (Figura 16D) é possível observar uma banda com tamanho referente à NrtT sem fusão. NrtT, mesmo após a clivagem, se manteve estável para as análises biofísicas, de SAXS e iniciais de cristalização.

Figura 16 – Clonagem, expressão, purificação e clivagem com SUMO-protease da proteína NrtT de *X. citri*. (A) Gel de agarose 1% do produto de PCR de NrtT. A banda indicada pela seta apresenta tamanho esperado de cerca de 900 bp referente ao tamanho da sequência do gene *nrtT*. A banda se mostrou com concentração e níveis de pureza elevados. **M** - marcador de peso molecular. (B) SDS-PAGE 15% corado com comassie evidenciando as frações utilizadas na purificação e clivagem; Ensaios de *western blot* realizados utilizando anticorpos anti-histidina (C) e anti-NrtT (D), para a confirmação da clivagem da cauda SUMO I: fração insolúvel **S**: fração solúvel, **NC**: fração eluída da cromatografia de afinidade a níquel antes da clivagem com SUMO-protease, **CI**: amostra após a clivagem com SUMO-protease, **EM**: fração eluída da cromatografia de exclusão molecular e amostra usada para os testes biofísicos e cristalográficos.

4.2.3 A NrtT é uma proteína globular e monomérica e não se altera na presença de ligante.

Para analisarmos o estado oligomérico de NrtT em solução e alterações conformacionais decorrentes da interação com possíveis ligantes, realizamos ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Os dados de DLS indicaram que as amostras de NrtT são estruturalmente homogêneas com polidispersividade de 5,9 % (Figura 17A) e raio hidrodinâmico (R_h) de 2,6 nm, o que é compatível com uma conformação monomérica. Esses resultados foram confirmados a partir dos dados obtidos por SAXS, onde NrtT, na ausência de ligante, apresentou raio de giro (R_g) de 2,7 nm (Figura 17B). Essas medidas foram observadas *in silico* no programa *Pymol* (Figura 17C). O R_g de uma proteína pode ser comparado com o R_h uma vez que ambos determinam, de um modo geral, a distância dos resíduos de aminoácidos de uma extremidade ao centro de massa da proteína (BRÉCHOT; DURAND, 2012).

Figura 17 - Análises da homogeneidade da NrtT em solução. (A) Espectro de DLS da NrtT obtido com 1 mg/mL de proteína purificada em tampão contendo 50 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 150 mM de NaCl e 5 % de glicerol. NrtT é essencialmente monodispersa e de acordo com o raio hidrodinâmico, monomérica. (B) Curva de P(r) obtida nas análises de NrtT por SAXS. As evidências do estado monomérico são obtidas de acordo com o raio de giro. (C) Medida *in silico* do possível raio de giro da NrtT baseado no modelo.

4.2.4 NrtT apresenta aumento da estabilidade térmica na presença de MOPS e alterações em sua estrutura secundária, mas não na estrutura terciária.

Para avaliarmos o conteúdo de estrutura secundária e enovelamento da NrtT realizamos, primeiramente, análises de espectros de dicroísmo circular na ausência e presença de diferentes ligantes adicionados a solução contendo NrtT. Os espectros obtidos revelaram que, tanto na presença de MOPS, quanto na presença de taurina, NrtT sofreu alterações no seu conteúdo de estrutura secundária, sendo estas alterações mais significativas na presença de MOPS. Evidenciamos que este conteúdo de estrutura secundária é alterado com mudanças nos perfis do espectro

entre a proteína-apo e na presença dos ligantes (Figura 18A), tendo o sinal reduzido devido a perda de estrutura secundária provocada pela ligação. Aparentemente, o conteúdo de folha- β é reduzido deixando mais evidente a porção de hélice- α . Essa alteração pode justamente ocorrer devido a mudanças conformacionais que a proteína deve sofrer na região central da molécula onde se encontra uma folha- β que une os dois domínios da proteína. Similarmente, análises de fluorescência dos triptofanos mostraram que MOPS e taurina proporcionam um *quenching* na fluorescência da NrtT (Figura 18B), alterando, de alguma forma, a posição dos triptofanos na estrutura proteica e consequentemente sua emissão de fluorescência. Segundo o modelo gerado, não há triptofanos localizados dentro do bolsão de interação com o ligante, porém há dois resíduos localizados um em cada domínio da proteína (W^{78} no domínio I e W^{141} no domínio II) os quais poderiam se tornar mais escondidos na estrutura da proteína com o movimento de fechamento destes (Figura 18B, destaque). Estas análises não nos permitiram concluir efetivamente qual é o ligante de NrtT, por outro lado, experimentos mais conclusivos como desnaturação térmica nos deram resultados mais promissores.

Os ensaios de desenovelamento térmico de NrtT na presença de todos os possíveis ligantes nos mostrou que o maior aumento da estabilidade térmica ocorre na presença de MOPS, sugerindo que a proteína efetua um maior número de interações com este alceno sulfonato do que com qualquer outro testado (Figura 18C). De fato, a comparação das curvas mostra um aumento na temperatura de desenovelamento de NrtT na presença de MOPS de cerca de 8 °C, muito superior quando comparada com a temperatura de desenovelamento de NrtT na presença de outros ligantes como a taurina, que aumentou a estabilidade térmica de NrtT em apenas 2,07 °C (Figura 18D). Estes resultados nos aponta fortemente a interação entre NrtT e alcanos sulfonatos, sendo corroborados pelas análises de DSF, onde MOPS conferiu aumento em torno de 8,4 °C na temperatura de desenovelamento de NrtT e taurina 2,5 °C, reforçando a hipótese de que NrtT poderia se ligar a alceno sulfonatos. Por outro lado, é interessante ressaltar que não houve diferenças nos resultados apresentados com os alceno sulfonatos HEPES e MES, ambos com estruturas similares a MOPS.

Figura 18 - Análises biofísicas e espectroscópicas de NrtT na presença e ausência de possíveis ligantes. (A) Espectro de CD mostrando que NrtT apresenta perfil de proteína alfa/beta corroborando com as predições realizadas. Na presença de ligantes, MOPS ocasionou uma perda do sinal de NrtT, indicando alterações na estrutura provenientes de uma possível interação. **(B)** Dados de fluorescência intrínseca do triptofano na presença de MOPS e sulfato de amônio, onde ambos proporcionaram um *quenching* do sinal de NrtT, indicando o enterramento dos triptofanos envolvidos na proteína. O destaque representa a NrtT em *cartoon* com o W⁷⁸ e W¹⁴¹ evidenciados em esferas. **(C)** Curva de desnaturação térmica de NrtT, evidenciando que MOPS induz um aumento de 8 °C na estabilidade térmica da NrtT. **(D)** Variações de temperatura de NrtT na presença dos diferentes ligantes testados por CD e DSF. Valores iguais ou inferiores a 3 °C não são considerados significativos.

4.2.5 NrtT apresenta os primeiros micro-cristais para determinação da estrutura.

Com o intuito de resolvermos a estrutura da proteína NrtT na presença do seu ligante, realizamos ensaios de cristalização da proteína na ausência e presença de todos os possíveis ligantes. A cristalização da proteína na forma aberta, sem ligante e fechada seria extremamente interessante para mostrarmos dois aspectos

importantes da proteína: (i) o movimento de abertura e fechamento e estados proteicos da NrtT e (ii) o verdadeiro ligante da NrtT e a caracterização completa do bolsão. Os ensaios de cristalização iniciais mostraram muitos precipitados, separação de fases e agrupamentos de cristais. Essas condições foram submetidas a um refinamento detalhado, variando pH, concentrações do precipitante e de sal. Realizadas e armazenadas sob as mesmas condições que as condições iniciais, as condições de refinamento mostraram melhora em quatro condições, onde verificamos a formação de micro-cristais e de cristais mal formados (Figura 19A - D). Tais condições ainda estão em fase de refinamento e novas tentativas serão realizadas.

Figura 19 - Cristais de NrtT obtidos em diferentes condições de refinamento. (A) 100 mM HEPES pH 6,8, 200 mM Cloreto de Magnésio, 10 % PEG 8.000; **(B)** 100 mM HEPES pH 6,8, 200 mM Cloreto de Magnésio, 17% PEG 8.000; **(C)** 100 mM Bis-Tris pH 6,3, 200 mM Cloreto de Magnésio, 5 % PEG 3.350; **D:** 100 mM Bis-Tris pH 6,3, 200 mM Cloreto de Magnésio, 10 % PEG 3.350. Os ensaios foram realizados com 10 mg/mL de proteína pura diluída em tampão contendo Fosfato de sódio 50 mM pH:7,4; NaCl 150 mM e Glicerol 5%.

Como não foi possível obter a estrutura da proteína por cristalografia, partimos para análises de SAXS realizadas na presença e ausência de MOPS. Dados coletados a partir de SAXS permitem extrair diretamente das curvas de espalhamento diversas informações em relação à forma, massa molecular (MM), raio de giro (R_g), volume da partícula hidratada (V_p) e diâmetro máximo da partícula (D_{max}) (MERTENS; SVERGUN, 2010). As curvas de espalhamento na presença e ausência de MOPS (Figura 19A) foram obtidas a partir da transformada de Fourier indireta, gerando também a função de distribuição da distância, $p(r)$. A $p(r)$ (Figura 19A, no destaque) é uma representação do espaço real dos dados de espalhamento e permite visualizar graficamente as peculiaridades da forma da partícula, ou seja, moléculas com formatos diferentes apresentam uma curva de espalhamento diferente e característica de cada enovelamento (BRECHÓT; DURAND, 2012; MERTENS; SVERGUN, 2010). Os nossos dados mostraram que não houve

diferenças significativas entre as curvas da NrtT na presença ou ausência de MOPS que resultasse em alteração no formato ou na oligomerização da proteína.

O raio de giro (R_g), definido pela raiz quadrática média do raio (r) no volume (v) da proteína, é usado como fator de informação sobre o tamanho médio da molécula espalhadora em solução e é dependente da $p(r)$. Adicionalmente, o R_g é determinado geralmente usando a lei de Guinier a partir de uma inclinação da curva de Guinier, que representa o logaritmo da intensidade do espalhamento *versus* q^2 (MERTENS; SVERGUN, 2010). O R_g observado em NrtT sofreu mínima alteração na presença de MOPS (de 2,07 para 2,1 nm), sugerindo que a possível interação entre NrtT com MOPS não leva à alterações estruturais significativas mas um leve alongamento da proteína, que pode ser devido à reorganizações dos domínios (Figura 20A). Adicionalmente, o D_{max} de NrtT, apresentou um aumento mais significativo na presença de MOPS (de 6,1 para 6,3 nm).

O gráfico de Kratky foi construído a partir da equação $q^2 \cdot I(q)$ *versus* q , onde q é o espalhamento e I é a intensidade do espalhamento e pode mostrar o estado conformacional da proteína na presença e ausência de ligantes (RAMBO; TAINER, 2011). Os resultados mostraram que a interação de NrtT com MOPS torna a proteína mais enovelada e diminui sua flexibilidade (Figura 20B). Proteínas globulares apresentam o gráfico de Kratky na forma de um sino com a curva próxima de zero em valores q grande. Por outro lado qualquer grau de flexibilidade interna a curva transformada será descrita por um pico parabólico inicial seguido por uma elevação na linha de base na região do q grande do gráfico de *Kratky* (BRECHÓT; DURAND, 2012; MARTENS; SVERGUN, 2010; RAMBO; TAINER, 2011).

Resultado similar foi obtido a partir do gráfico de Porod-Debye (Figura 20C), construído a partir da equação $q^2 \cdot I(q)$ *versus* q^4 , onde foi possível observar que NrtT perde flexibilidade na presença de MOPS, sugerindo compactação na estrutura de NrtT em decorrência desta interação. Este resultado seria esperado no caso de interação da NrtT com seu ligante, uma vez que é sabidamente conhecido que proteínas ligadoras periplasmáticas ao interagirem com seus substratos perdem flexibilidade devido ao fechamentos dos ligantes e adição de novas interações (RAMBO; TAINER, 2011). Porod-Debye prediz um comportamento dentro de um alcance limitado dos dados de SAXS, onde a aplicação da lei prevê um platô na região de baixa resolução dos dados de SAXS quando transformado por q^4 . A presença de um platô no gráfico de Porod-Debye valida a suposição de que existe

uma partícula dispersora com um nítido contraste de densidade eletrônica homogênea entre a partícula e solvente (BRECHÓT; DURAND, 2012; MARTENS; SVERGUN, 2010; RAMBO; TAINER, 2011).

Figura 19 – Curvas extraídas dos dados experimentais de SAXS da NrtT na ausência e presença de MOPS. (A) curva de espalhamento de NrtT, evidenciando que a possível interação com MOPS não interfere no estado oligomérico da proteína. No destaque é mostrada a $p(r)$ das amostras apresentando pequena diferença do R_g entre a proteína-apo e ligada a MOPS. **(B)** Gráfico de Kratky de NrtT mostrando que a interação com MOPS deixa a proteína mais globular. **(C)** Gráfico de Porod-Debye, mostrando que a interação entre NrtT e MOPS causa perda na flexibilidade da proteína, corroborando com os resultados anteriores. **(D)** Envelope da NrtT gerado *ab initio* a partir da estrutura tridimensional modelada de NrtT, com encaixe compatível com a estrutura da proteína e seu estado monomérico.

Apesar dos resultados obtidos evidenciarem alteração no R_g e D_{max} , tal alteração é muito pequena para ser notada nos envelopes (dados não mostrados). Os envelopes gerados *ab initio* a partir do programa DAMMAVER, se sobrepuseram adequadamente sobre a estrutura tridimensional modelada de NrtT (Figura 19D) e

corroboram os dados de DLS que NrtT, após a clivagem com SUMO protease se mantém monomérica, globular e estável em solução.

4.2.6 *Seria a NrtT mais uma proteína de X. citri com papel para assimilação de alcano sulfonatos? Qual seria o papel do operon nrtBCD?*

Diante dos resultados apresentados até o momento, podemos sugerir que NrtT é uma possível proteína ligadora de alcano sulfonatos ou sulfonatos alifáticos e neste caso, o *operon nrtTBCD* formaria um terceiro sistema de captação destes componentes em *X. citri*. De fato, estudos realizados em nosso grupo têm mostrado que, diferentemente do que é observado em *E. coli*, *X. citri* apresenta dois sistemas do tipo ABC dedicados à captação de compostos sulfonados, codificados pelos operons *ssuABCD*(1) e *ssuABCDE*(2) (PEREIRA et al., *in press.*). Em *E. coli* ao menos 27 genes codificam proteínas pertencentes ao regulon *cys*, o qual apresenta três sistemas de transporte do tipo ABC: o de sulfato (SbpCysUWA), o de taurina (TauABCD) e o de alcano sulfonatos (SsuABCDE) (EICHHORN et al., 2000; VAN DER PLOEG et al., 1999, 2000). Estes dois últimos são induzidos na carência de sulfato. A busca por ortólogos destes genes em *X. citri* revelaram que a bactéria conserva o sistema de sulfato SbpCysUWA e todas as enzimas para redução do mesmo a sulfito, conforme mostrado na Figura 21 (caixas verdes em A e B). Ainda, baseados em análises filogenéticas das proteínas periplasmáticas TauA e SsuA de *E. coli*, SsuA(1) e SsuA(2) de *X. citri*, evidenciamos que *X. citri* não apresenta um sistema para captação de taurina mas possivelmente dois sistemas distintos de captação de alcano sulfonatos, SsuDEACB e SlfASsuDACB (Figura 21A e B, caixas azul e cinza, respectivamente).

Para verificar o grau de similaridade da NrtT com as proteínas periplasmáticas descritas anteriormente, fizemos um alinhamento das 5 sequências. NrtT não apresenta identidade maior do que 14% em relação às demais proteínas, das quais as únicas similares entre si são a SsuA de *E. coli* e SsuA(2) de *X. citri* (56% de identidade). Por meio das análises no programa STRING 9.1 (<http://string-db.org/>), que avalia possíveis interações entre proteínas, identificamos que, por confiança, a NrtT está relacionada às proteínas dos transportadores ABC, como esperado, mas não apenas às proteínas codificadas pelo mesmo *operon* que são: NrtB (permeases), NrtCD (ATPases) e TauD (Taurina dioxigenase) (Figura 22A). Esta última codifica uma enzima cujo ortólogo no transportador de *E. coli* é responsável

pela oxidação da taurina em sulfito. Interessantemente, os dados de crescimento da *X. citri* em meio XAM1f (Figura 12) sugerem que a NrtT poderia ter um papel no transporte de alceno sulfonatos ou sulfonatos alifáticos para a assimilação de nitrogênio mas não de sulfato. Neste sentido, a taurina poderia ser o ligante de preferência para esta proteína, uma vez que este sulfonato apresenta nitrato e sulfato em sua composição, entretanto, não foram evidenciadas interações significativas entre NrtT e taurina. Outro dado interessante é que o operon onde se encontra o gene *nrtT* também contém um gene cuja função está relacionada à atividade de uma taurina dioxigenase. Se esta hipótese for verdadeira, *X. citri* teria um sistema de substituição do sistema de captação de taurina, captando compostos nitrogenados a partir de alceno sulfonatos. Estudos de calorimetria ainda devem ser realizados para verificar a interação desta proteína com estes e demais compostos, de forma que possamos identificar o verdadeiro ligante desta proteína. Adicionalmente, as análises sugerem que, apesar de mais fracamente, a proteína NrtT poderia se associar às permeases dos transportadores de alceno sulfonatos, XAC0848 (SsuC1) e XAC3197 (SsuC2), indicando que poderia haver a utilização de vários transportadores por uma mesma proteína periplasmática (Figura 22A e B). De fato, em um elegante estudo realizado com mutantes dos sistemas de captação de alceno sulfonatos em *E. coli*, Eichhorn e colaboradores (2002) mostrou que pode haver interação cruzada nesta bactéria, onde mutantes deletérios para componentes do transportador ABC de alceno sulfonato, são substituídos pelos componentes do transportador ABC de taurina. Por outro lado, os mutantes deletérios para os componentes do transportador de taurina, não foram capazes de crescer tendo apenas taurina como fonte enxofre, mostrando que o sistema de alceno sulfonatos é bastante diverso, mas o de taurina é mais restrito.

Um fator relevante na interação cruzada destas proteínas é a região de interface, que nas proteínas periplasmáticas localiza-se na superfície que apresenta a entrada da fenda ou bolsão, tanto no domínio I como domínio II. Para compararmos estas regiões nas proteínas de *X. citri* de *E. coli*, analisamos o potencial eletrostático dessas regiões nas proteínas de *X. citri*: NrtT (modelo), SsuA1 (modelo), SsuA2 (estrutura cristalográfica) e de *E. coli*: TauA (modelo) e SsuA (estrutura cristalográfica) (Figura 22C).

Figura 21 - Esquema geral dos genes do regulon *cys* de *E. coli* e ortólogos previstos identificados no genoma de *X. citri*. (A) Genes do regulon *cys* de *E. coli*. (B) Possíveis ortólogos encontrados em *X. citri*. Caixas verdes indicam os genes da via de captação e assimilação de sulfato (SO₄²⁺), sistema de captação responsável pela ligação e redução de sulfato a sulfito. Linhas da mesma cor nas caixas de *X. citri* (em vermelho, verde e preto) representam genes que possivelmente pertencem ao mesmo operon. CysP, identificado apenas em *E. coli*, é o componente periplasmático de captação de tiossulfato que utiliza o mesmo transportador de sulfato. Caixas azul indicam os genes que são descritos para o transporte e assimilação de alcano sulfonatos. Com base na identidade de sequência e de modelagem molecular, o transportador de taurina e TauD da via de *E. coli* (mostrados em cinza) não foram identificados em *X. citri*, mas parecem ser substituídos por outros homólogos putativos dos sistemas de captação de alcano sulfonatos ou sulfonatos alifáticos e enzimas óxido-reduutoras (SsuD1 e SifA, respectivamente) (mostrado em azul escuro). As caixas vermelhas mostram os genes regulatórios, *cysB* e *cbl*. Todos os genes são identificados pelo seu código KEGG e quando presente, o nome da proteína putativa. (Figura retirada de PEREIRA et al., em preparação).

Figura 22 – Possíveis interações de NrtT com outras proteínas em *X. citri* e comparação do potencial eletrostático de superfície do bolsão das proteínas periplasmáticas ligadoras de sulfonatos alifáticos ou alceno sulfonatos. (A) Rede de interações de NrtT em *X. citri* baseada em confiança e **(B)** em evidência, segundo o programa String 9.1. No gráfico de confiança as linhas mais fortes representam interações mais fortes, entre elas, são identificadas interações com as permeases NrtB, codificada pelo mesmo *operon*, e as permeases dos dois outros sistemas de captação de alcenos sulfonatos (Ssu). No gráfico de evidência as linhas verdes representam genes do mesmo *operon* e possível co-ocorrência. **(C)** Comparação do potencial eletrostático de superfície de NrtT e seu homólogos em *X. citri* e as proteínas do regulon *cys* de *E. coli*, TauA (ligadora de taurina) e SsuA (ligadora de alceno sulfonatos). O código PDB das proteínas que apresentam estrutura resolvida está em parênteses.

Os dados revelam que as três proteínas de *X. citri* apresentam um perfil semelhante sendo que as regiões de cargas positivas e negativas (mostradas em

azul e vermelho, respectivamente) na SsuA1 e SsuA2 podem ser diretamente correlacionadas. Ainda, estas proteínas apresentam potencial eletrostático similar na SsuA de *E. coli*. Outra evidência é que existem diferenças entre as superfícies de NrtT e TauA. Estes dados contudo, devem ser avaliados com cautela, uma vez que a localização dos resíduos, estrutura conformacional e suas superfícies caracterizadas nos modelos de SsuA1, NrtT e TauA é dependente das estruturas usadas como molde.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANÁLISES BIOFÍSICAS E ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA PotF DE *X. citri*.

5.1 PotF conserva o sítio de interação com putrescina e tem encaixe perfeito entre a modelagem e o envelope gerado por SAXS.

5.1.1 *PotF é expressa na forma solúvel e enovelada.*

Para as análises biofísicas e estruturais da proteína PotF de *X. citri*, o gene *potF* foi clonado no vetor pET28a, nos sítios das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Após a transformação de *E. coli Arctic express* com vetor resultante pET28a-PotF, a expressão foi induzida com 0,5 mM de IPTG a 12 °C, 200 rpm durante 24 horas. A proteína foi expressa na fração solúvel com massa molecular de 40 kDa, conforme evidenciado por SDS-PAGE (Figura 23A) e por *western blot* utilizando anticorpos anti-histidina (Figura 23B). Extratos das células induzidas foram obtidos e submetidos à purificação por cromatografia de afinidade a metal, uma vez que a PotF foi expressa fusionada a cauda de histidina. Após as etapas de purificação e clivagem foi possível obter 5,6 mg de proteína por litro de cultura. Além de expressa na forma solúvel, as amostras de DLS apresentaram polidispersividade de 5,2 %, sendo que a maioria da amostra corresponde à PotF no estado monomérico com raio hidrodinâmico de 2,6 nm, o que é compatível com a massa molecular estimada de 32 kDa (Figura 23C). Adicionalmente, para verificarmos o padrão de enovelamento da PotF e obter dados do conteúdo de estrutura secundária, espectros de dicroísmo circular foram adquiridos usando a proteína recombinante na ausência e presença de putrescina. O espectro obtido foi característico de uma proteína com conteúdo de estrutura secundária alfa/beta como esperado para proteínas ligadoras periplasmáticas, apresentando valores dos picos mínimos em 208 nm e 222 nm. A influência da cauda de histidina foi avaliada na comparação dos espectros da proteína antes e depois da clivagem com trombina. As análises mostraram que não há diferenças significativas na estrutura secundária entre PotF não-clivada e clivada (Figura 23D).

Figura 23 – Produção e caracterização da PotF de *X. citri* a partir do vetor pET28a em células de *E. coli Arctic Express*. (A e B) SDS-PAGE 12% e western blot, respectivamente, das frações obtidas após o protocolo de extração. I: fração insolúvel; S: Fração solúvel; NC: amostra purificada por afinidade antes da clivagem com trmbina; CI: amostra purificada ppor exclusão molecular e clivada com trombina. (C) Perfil da proteína PotF purificada e clivada com trombina após medidas de DLS. PotF apresentou 5,2 % de polidispersividade, raio hidrodinâmico de 3,0 nm e massa molecular estimada de 32 kDa, (D) Espectro de dicroísmo circular da PotF antes e após a clivagem com trombina, evidenciando que não há alterações significativas decorrentes da clivagem (190-200 nm).

5.1.2 A interação de putrescina com a PotF não altera a estabilidade térmica mas a fluorescência dos triptofanos.

Ensaio de desnaturação térmica da PotF na presença e ausência de diferentes concentrações de putrescina evidenciaram que a PotF é uma proteína termo-estável com temperatura de desenovelamento (T_m) de $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual não foi alterada na presença de diferentes concentrações putrescina (Figura 24A). De fato, a adição de putrescina também não alterou o conteúdo de estrutura secundária da PotF, que manteve seu perfil alfa/beta (Figura 24B).

Figura 24 – Estabilidade e alterações estruturais da PotF em presença e ausência de putrescina. (A) Espectro de desenovelamento térmico da PotF na ausência e presença de 2 μ M de putrescina em tampão contendo 50 mM fosfato de sódio pH 7,4, 150 mM NaCl e 5% de glicerol. (B) Espectro de dicroísmo circular da PotF na ausência e presença de diferentes concentrações de putrescina. (C) Espectro de fluorescência intrínseca dos triptofanos da PotF. (D) Modelo da estrutura da PotF construído a partir das coordenadas estruturais da proteína ligadora de putrescina SpuD de *P. aeruginosa* (código PDB 3TTM) (WU et al., 2012), evidenciando a localização dos quatro triptofanos e os domínios I (cartoon azul claro) e II (cartoon azul escuro). No modelo a putrescina é mostrada em palito vermelho, utilizando como exemplo a posição na PotF de *E. coli*.

Usualmente, em proteínas ligadoras periplasmáticas, a interação com o ligante promove um aumento da estabilidade térmica e alteração conformacional (LOCHER et al., 2002; REES et al., 2009) que se devem, respectivamente, ao aumento do número de interações de hidrogênio efetuadas entre proteína e ligante e fechamento dos domínios. Os dados apresentados com a PotF mostram que as interações da proteína com a putrescina podem envolver apenas a abertura e fechamento dos domínios sem interações de hidrogênio, uma vez que o bolsão é bastante hidrofóbico. Adicionalmente, a fluorescência dos triptofanos é

significativamente apagada na presença de putrescina (Figura 24C). Segundo o modelo da PotF construído a partir das coordenadas estruturais da proteína ligadora de putrescina SpuD de *P. aeruginosa* (código PDB 3TTM) (WU et al., 2012), existem quatro triptofanos na estrutura da PotF, sendo dois localizados diretamente no bolsão de interação com a putrescina (W²⁴⁹ e W¹⁹⁷) (Figura 24D, putrescina em vermelho), dessa forma, podemos supor que putrescina esteja interagindo com PotF, causando o enterrando os triptofanos na estrutura diminuindo sua emissão de fluorescência, provocando o *quenching* observado no experimento.

5.1.3 A interação de putrescina com a PotF não altera a estabilidade térmica mas a fluorescência dos triptofanos.

Como mencionado anteriormente, o modelo da estrutura tridimensional da PotF de *X. citri* foi construído a partir das coordenadas estruturais da proteína ligadora de putrescina SpuD de *P. aeruginosa* (código PDB 3TTM) (WU et al., 2012), uma vez que este ortólogo apresenta 53% de identidade de sequência de aminoácidos. A estrutura desta proteína foi resolvida na presença de putrescina o que facilitou a comparação do sítio de ligação e características estruturais entre as duas proteínas. Para análise dos resíduos envolvidos, após a obtenção do modelo da PotF, este foi usado para sobreposição com a SpuD (molde) e SpuE (ligadora de espermina de *P. aeruginosa*, código PDB 3TTN) e análise do bolsão de interação. Os resíduos envolvidos na ligação com o ligante foram selecionados em cada proteína e mapeados em PotF de *X. citri* (Figura 25A). Os resíduos conservados S⁴¹, D⁴², Y⁴³, S⁶⁷, W²⁴⁶, D²⁸⁰ e Y³¹⁶, e os similares Y⁴⁰, T⁸⁸, D¹⁸⁸ e W¹²⁸ estão voltados para o sítio de ligação, que predominantemente apresenta carga negativa favorecendo a ligação com a putrescina, carregada positivamente. Estes resultados corroboram fortemente a anotação inicial e função predita da PotF como proteína ligadora de putrescina. A validação do modelo gerado de PotF se encontra na Figura 2 dos anexos.

As características do potencial eletrostático de superfície comparadas entre as proteínas mostra que a PotF está mais próxima às proteínas ligadoras de putrescina do que espermina (Figura 25B). Estas características, como discutido para a proteína NrtT, seriam importantes tanto para atração do ligante como para a interação com as permeases na membrana. É interessante destacar as cargas muito semelhantes de SpuD e SpuE, proteínas que compartilham o mesmo transportador

na membrana, mas diferentes ligantes. Por outro lado, quando observamos PotF e PotD de *E. coli*, que usam dois transportadores distintos na membrana, podemos ver diferenças significativas entre os perfis de carga, o que indica que as interações com permeases são diferentes. (Figura 25B).

Figura 25 – Características do bolsão de ligação e estruturais da PotF de *X. citri*. (A) Alinhamento das sequências de aminoácidos de PotF de *X. citri* e proteínas relacionadas. Xac_2476_PotF: proteína ligadora de putrescina de *X. citri*; Eco_b0854_PotF: proteína ligadora de putrescina de *E. coli* (código do PDB: 1A99, VASSYLYEV *et al.*, 1998); Pae_PA0300_SpuD: proteína ligadora de putrescina de *P. aeruginosa* (código do PDB: 3TTM, WU *et al.*, 2012); Pae_PA0301_SpuE: proteína ligadora de espermidina de *P. aeruginosa* (código PDB: 3TTN, WU *et al.*, 2012) e Eco_b1123_PotD: proteína ligadora de espermidina/putrescina de *E. coli* (código PDB: 1POT, SUGIYAMA *et al.*, 1996). Resíduos em negrito estão envolvidos com a interação ao ligante. Os números dos resíduos são descritos de acordo com as estruturas das proteínas. O padrão de conservação de resíduos é mostrado como: (*) idêntico, (:) similar, (.) diferente. (B) Comparação do potencial eletrostático de superfície da PotF de *X. citri* e proteínas ligadoras de espermidina e putrescina vistas pela entrada do bolsão. As cores vermelho, azul e cinza representam, respectivamente, potencial eletrostático negativo, positivo e neutro. Caracterização dos volumes dos bolsões destacados como superfícies vermelhas na representação em *cartoon*.

Outra característica estudada nas cinco proteínas foi o volume do bolsão. Com base na análise de superfície interna, PotF de *X. citri* tem um longo canal para interação com o ligante que difere dos encontrados em PotF de *E. coli*, SpuD ou nas proteínas de ligação de espermina (Figura 28B inferior). Como não observamos nenhuma outra proteína ligadora de putrescina ou espermina em *X. citri*, é possível que a PotF seja responsável pela captura de ambos os ligantes.

5.1.4 Os dados de SAXS confirmam o modelo e evidenciam ganho de estabilidade na PotF decorrente da interação com putrescina.

Como mencionado anteriormente, classicamente, para a interação das proteínas ligadoras periplasmáticas com seus respectivos ligantes, os domínios devem sofrer uma movimentação característica de abertura para exposição do bolsão e fechamento para coordenação do ligante (LOCHER et al., 2002). Tais estados estruturais, aberto e fechado, podem ser monitorados de diferentes maneiras e têm sido estudados nos diferentes grupos de proteínas periplasmáticas (I, II e III). Também é bastante conhecido que a interação da proteína com seu ligante aumenta a sua estabilidade (ARAÚJO, 2013; HIGGINS, 2001; KORKHOV et al., 2012; LOCHER et al., 2002). Em nossas análises biofísicas, apesar de não conseguirmos evidenciar variações significativas nos estados ligado e não ligado, temos evidências de que a PotF interage com a putrescina. Para obtermos mais informações em relação ao comportamento desta proteína em solução, realizamos medidas de SAXS de PotF na presença e ausência de putrescina. Os dados de espalhamento a baixo ângulo da proteína na forma ligada e não ligada foram fitados a partir da transformada de Fourier indireta (IFT) pelo programa GNOM (PETOUKHOV et al., 2007). Após a normalização em escala absoluta e plotagem dos dados em intensidade do espalhamento $I(q)$ versus o espalhamento $[q]$, podemos evidenciar que há diferenças no comportamento da proteínas nos dois estados distintos (Figura 26A). A partir da curva $p(r)$ que, de uma maneira geral, representa a forma da molécula, é possível evidenciar que as amostras apresentam diferenças nas regiões inicial e final das curvas, indicando alterações na conformação nos dois estados (Figura 26B). A distância máxima ($D_{\max}$) calculada para cada estado (entre dois resíduos mais distantes) também evidencia diferenças entre a proteína não ligada e ligada, onde o $D_{\max}$ foi calculado em 80 Å e 75 Å,

respectivamente. Em relação ao raio de giro, não houve diferenças uma vez que os valores para a proteína não ligada e ligada foram 21,09 Å e 21,08 Å, respectivamente. Estes dados sugerem que há apenas a aproximação dos domínios, sem alteração do conteúdo de estrutura secundária. De fato, análises das estruturas cristalográficas das proteínas ligadoras de putrescina e espermidina de *P. aeruginosa* (SpuD e SpuE, respectivamente) mostram que as alterações conformacionais na presença dos ligantes em comparação com as estruturas não ligadas é muito pequena, com valores de RMSD (*root-mean-square deviation*) de 0,3 Å (WU et al., 2012). Adicionalmente, os dados de SAXS relacionados às concentrações da proteína permitiram obter o cálculo estimado da massa molecular de PotF, segundo RAMBO & TAINER (2011), em aproximadamente 38 kDa, o que é consistente com os dados obtidos previamente.

Outra possível forma de analisar os dados é a partir do gráfico de Kratky ($I \cdot q^2$ vs. q) que mostra o grau de flexibilidade da proteína (MARTENS; SVERGUN, 2010; RAMBO; TAINER, 2011). Nossas análises evidenciam que a putrescina diminui a flexibilidade da PotF (Figura 26C), sugerindo em decorrência, um possível aumento da estabilidade. O envelope tridimensional de PotF obtido a partir das análises de SAXS foi gerado a partir da modelagem *ab initio* utilizando o programa DAMMIN (PETOUKHOV et al., 2007) e como molde a proteína PotF modelada a partir da proteína ligadora de putrescina SpuD-apo de *P. aeruginosa* (código PDB: 3TTK; WU et al., 2012) (Figura 25D). Os resultados mostram que o envelope é compatível com uma proteína globular, como visto previamente no gráfico de Kratky, e apresentou boa complementariedade com o modelo, indicando que a proteína se encontra em estado monomérico em solução, conforme evidenciado previamente pela curva $p(r)$ e por meios das análises de DLS. O envelope de PotF ligada à putrescina também foi gerado usando como modelo a proteína SpuD de *P. aeruginosa* (código PDB: 3TTM; WU et al., 2012), porém não foi possível identificar diferenças em relação ao envelope da proteína não ligada (dados não mostrados).

Embora nossos dados de CD não mostraram diferenças na estrutura secundária de PotF na presença de putrescina, os dados de SAXS permitiram monitorar diferenças mais sutis como a diminuição da flexibilidade da proteína ao se ligar a putrescina e sugerir alterações estruturais.

Figura 26 – Comportamento da PotF na presença e ausência de putrescina analisado por ensaio de SAXS. (A) Curva de espalhamento a baixo ângulo obtidas para a PotF na presença e ausência de putrescina. **(B)** Curva de $p(r)$ das amostras, indicando que o raio da proteína PotF não sofre alterações significativas na presença de putrescina. **(C)** Avaliação da estabilidade da PotF segundo o gráfico de Kratky. A interação da putrescina confere maior rigidez à PotF. **(D)** Envelope de PotF sobreposto ao modelo da proteína obtido segundo as coordenadas estruturais da proteína SpuD de *P. aeruginosa* (PDB 3TTK), compatível com o estado monomérico da PotF.

Devido à presença de uma região não modelada no início da sequência de resíduos de aminoácidos de PotF, o envelope apresenta uma porção extra inferior não preenchida pela estrutura da PotF. Esta porção pode ser referente a uma hélice- α ou *loop* que não foi modelado durante as análises de modelagem molecular.

Os ensaios de cristalização iniciais geraram condições promissoras que foram submetidas a um refinamento fino. Nesse refinamento, tivemos o aparecimento de

cristais bi-dimensionais (Figuras 27 A e B), cristais mal formados (Figuras 27 C e F) e finalmente cristais tri-dimensionais (Figuras 27D e E).

Figura 27 - Cristais obtidos a partir do refinamento fino de PotF. **(A)** 100 mM HEPES pH 6,8, 200 mM Cloreto de Magnésio, 5 % PEG 8.000. **(B)** 100 mM HEPES pH 6,8, 200 mM Cloreto de Magnésio, 7 % PEG 8.000. **(C)** 100 mM Acetato de sódio pH 4,5, 20 mM Acetato de Zinco, 20 % PEG 1.000. **(D)** 100 mM Bis-Tris pH 6.3, 200 mM Cloreto de Magnésio, 7 % PEG 3.350. **(E)** 100 mM Tris HCl pH 8,5, 220 mM Sulfato de lítio, 30 % PEG 400. **(F)** 100 mM MES pH 6,5, 100 mM Sulfato de zinco, 30 % Isopropanol.

Os cristais obtidos, por não apresentarem tamanho suficiente para o feixe de luz no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), serão submetidos a mais uma etapa de refinamento para estimular o crescimento e melhorar a qualidade para a difração de Raios-X a partir de técnicas de *seeding* (BERGFORS, 2003; 2007). Também faremos co-cristalização de PotF-putrescina para que sejam monitorados os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com o ligante.

6 CONCLUSÕES

6.1 NrtT – possível ligadora de alcano sulfonatos.

Em nossas análises mostramos que a NrtT é uma proteína ligadora periplasmática que poderia estar envolvida na assimilação de compostos sulfonados que seriam usados como fonte de nitrogênio, conforme evidenciado pela incapacidade de crescimento da bactéria mutante em meio XAM1f. Todos os dados de bioinformática, biofísicos e estruturais evidenciam que MOPS induz as maiores diferenças comportamentais na proteína, incluindo alterações estruturais, aumento de estabilidade, alteração de flexibilidade, entre outros. A importância da captação de MOPS como fonte de nitrogênio levanta a suposição de que NrtT poderia substituir a proteína ligadora de taurina, elemento do regulon *cys* de *E. coli* não encontrado em *X. citri*. Neste caso, se esta hipótese for verdadeira, *X. citri* apresenta vários sistemas de transporte de sulfonatos ressaltando a importância destes compostos para a fisiologia bacteriana.

Por outro lado, na ausência do gene *nrtT* em ensaios de infecção em plantas de *C. sinensis*, verificou-se que o fenótipo de desenvolvimento da doença é afetado e que não houve complementação dos demais sistemas. Da mesma forma, a ausência de *nrtT* leva a um fenótipo atenuado da doença, similar ao observado no mutante *X. citri* portador de deleção no gene *ssuA(2)* que codifica uma proteína ligadora de alcano sulfonatos, o que foi previamente associado à alteração na produção da goma xantana e produção de biofilme.

Estruturalmente, não foi possível obter a estrutura cristalográfica da NrtT mas apenas alguns indicativos de que a proteína conserva alguns resíduos importantes para a interação com moléculas sulfonadas, como evidenciado em ensaios na presença de MOPS. Embora o papel de NrtT ainda não tenha sido elucidado, nossos dados nos permitem direcionar os estudos seguintes a partir das hipóteses levantadas, principalmente para o refinamento dos cristais a fim de obter a estrutura cristalográfica da proteína na presença do seu efetivo ligante.

6.2 PotF – proteína ligadora de putrescina.

Nossos estudos mostraram que *X. citri* apresenta uma proteína ligadora periplasmática com alta identidade de sequências com proteínas ligadoras de putrescina e espermina que, de fato, conserva e apresenta várias características

comprobatórias desta função. As análises biofísicas associadas aos ensaios de SAXS mostraram que a interação com a putrescina pode levar à pequenas alterações estruturais não significativas mas que diminuem a flexibilidade da proteína. A ausência de alterações evidentes pode ser associada ao tipo de interação promovida pela PotF com a putrescina, provavelmente mediada por interações hidrofóbicas.

Juntos, os dados apresentados neste trabalho constituem as primeiras evidências do papel funcional e estrutural das proteínas NrtT e PotF de *X. citri*, membros de transportadores ABC, ainda não caracterizados nesta bactéria, mas extensivamente estudados em bactérias de relevância, como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, entre outras.

BIBLIOGRAFIA¹

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, F. T., BOLANOS-GARCIA, V. M., PEREIRA, C. T., SANCHES, M., OSHIRO, E. E., FERREIRA, R. C. C., CHIGARDZE, D. Y., BARBOSA, J. A. G., FERREIRA, L. C. S., BENEDETTI, C. E., BLUNDELL, T. L., BALAN, A. Structural and physiological analyses of the Alkanesulphonate-Binding Protein (SsuA) of the Citrus pathogen *Xanthomonas citri*. **Plos one**, v.8, p.1-14, 2013.

BALAN, A., PEREZ, C. S., MOUTRAN, A., FERREIRA, L. C. S., NESHICH, G., BARBOSA, J. A. Crystallographic structure and substrate-binding interactions of the molybdate-binding protein of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1784, p. 393-399, 2008.

BALDINI, R. L.; TAHARA, S. T.; ROSATO, Y. B. A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. **Plasmid**, v.42, p. 126-133, 1999.

BERGFORS, T. Seeds to crystals. **Journal of Structural Biology**, v.142, p. 66-76, 2003.

BERGFORS, T. Succeeding with seeding: some practical advice. **Evolving Methods for Macromolecular Crystallography**, v.245, p. 1-10, 2007.

BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics**. New York: John Wiley, 1976. 376 p.

BOGDAN, J. A.; NAZARIO-LARRIEU, J.; SARWAR, J.; ALEXANDER, P.; BLAKE, M. S. *Bordetella pertussis* autoregulates *pertussis* toxin production through the metabolism of cysteine. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6823-6830, 2001.

BRÉCHOT, V. R.; DURAND, D. How random are intrinsically disordered proteins? A small angle scattering perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, p. 55-75, 2012.

BRUNINGS, A.; GABRIEL, D. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 141-157, 2003.

BUTT, R. T.; EDAVETTAL, S. C. HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO Fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 43, p. 1-9, 2005.

---

¹ De acordo com:

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

CARVALHO, F. M. S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 2006. 177f. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006.

CHATTOPADHYAY, M. K.; TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. **Biochemistry**, v. 100, p.2261-2265, 2002.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v.31, p. 3497-3500, 2003.

CIVEROLO, E. Bacterial canker disease of citrus. **Journal Rio Grande Valley Horticultural Society**, v. 37, p. 127-146, 1984.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, p. 164-173, 2009.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

CROSSMAN, L.; DOW, J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 623–629, 2004.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p. 401–422, 2007.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH C. S. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 414, p. 459-463, 2002.

DAS, A. K. Citrus canker: a review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, p. 52-60, 2003.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in Microbiology**, v.152, p. 211-229, 2001.

DAVIDSON, A. L.; DASS, E.; PRELLE, C.; CHEN, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, p. 317–364, 2008.

DAVIS, G. D.; ELISEE, C.; NEWHAM, D. M.; HARRISON, R. G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, p. 382–388, 1999.

- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, 2002.
- DOOLITTLE, R. F.; JOHNSON, M. S.; HUSAIN, I.; VAN HOUTEN, B.; THOMAS, D. C.; SANCAR, A. Dominal evolution of a prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active-transport proteins. **Nature**, v.323, p. 451-453, 1986.
- EICHHORN, E.; VAN-DER-PLOEG, J. R.; LEISINGER, T. Deletion Analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transpot systems. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2687-2795, 2000.
- EJIM, L. J.; D'COSTA, V. M.; ELOWE, N. H.; LOREDO-OSTI, J. C.; MALO, D.; WRIGHT, G. D. Cystathionine beta-lyase is important for virulence of *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3310-3314, 2004.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Biological Crystallography**, v.60, p. 2126-2132, 2004.
- ERICSSON, U. B.; HALLBERG, B. M.; DETITTA, G. T.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. Thermofluor-based hight-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, p. 289-298, 2006.
- ERKENS, G. B., BERNTSSON, R. P., FULYANI, F., MAJSNEROWSKA, M., VUJICIC-ZAGAR,A., TER BEEK, J., POOLMAN, B., SLOTBOOM, D. J. The structural basisof modularity in ECF-type ABC transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, p. 755–760, 2011.
- ERKENS, G. B., MAJSNEROWSKA, M., TER BEEK, J., SLOTBOOM, D. J. Energy coupling factor-type ABC transporters for vitamin uptake in prokaryotes. **Biochemistry**, v. 51, p. 4390–4396, 2012.
- FULYANI, F.; SCHUURMAN-WOLTERS, G. K.; ZAGAR, A. V.; GUSKOV, A.; SLOTBOOM, D. J. Functional Diversity of Tandem Substrate-Binding Domains in ABC Transporters from Pathogenic Bacteria. **Structure**, v.21, p. 1879-1888, 2013.
- FUNDECITRUS. **Pesquisa e Desenvolvimento – Levantamentos**. Disponível em: < <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cancro-citrico/7>>. Acesso em 26 abr. 2015.
- GEORGE, A. M. AND JONES, P. M. Perspectives on the structure–function of ABC transporters: the switch and constant contact models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 109, p. 95–107, 2012.
- GEORGE, A. M.; JONES, P. M. **Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology**, 1º Edição. Editora Caister Academic Press, Norfolk, U.K., p 227-248, 2014.
- GOLDBURG, W. I. Dynamic Light Scattering. **American Journal of Physics**, v. 67, p. 1152-1164, 1994.
- GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. **PLoS One**, v. 4, p. 4358, 2009.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v.10, p. 1-34, 2002.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, A. D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.1-15, 2004.

GUERRERO, M. G.; VEGA, J. M.; LOUSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, v.32, p. 169–204, 1981.

GUO, Y.; ZHANG, Y.; LI, J. L.; WANG, N. Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 25, p. 165-179, 2012.

HARLAND, D. N.; GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. An association between ATP binding cassette systems, genome sizes and lifestyles of bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 434-442, 2005.

HERRERO, A.; MOURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 411-425, 2001.

HIGGINS, C. F. ABC Transporters: From microorganisms to man. **Cellular Biology**. v.8; p. 67-113. 1990.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 205-210, 2001.

HIGGINS, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, v. 446, p. 749-757, 2007.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, p. 559–564, 2000.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 409-411, 1991.

JIA, W.; TOVELL, N.; CLEGG, S.; TRIMMER, M. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarX and a role for NirC in nitrite export and uptake. **Biochemical Journal**, v.417, p. 297-304, 2009.

JENKINS, C. L.; STARR, M. P. The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. **Current Microbiology**, v. 7, p. 323-326, 1982.

KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1607-1617, 1998.

KASHIWAGI, K.; SHIBUYA, S.; TOMITORI, H.; KURAISHI, A.; IGARASHI, K. Excretion and Uptake of Putrescine by the PotE Protein in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 6318-6323, 1997.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, p. 349-384, 2000.

KEMNER, J. M.; LIANG, X.; NESTER, E. W. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 2452-2458, 1997.

KERR, I. D. Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1561, p. 47-64, 2002.

KERTESZ, M. A. Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 4, p. 135-175, 1999.

KETCHUM, P. A.; PAYNE, W. Purification of two nitrate reductases from *Xanthomonas maltophilia* Grow in Aerobic Cultures. **Applies and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3586-3592, 1992.

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

KONAREV, P.V.; PETOUKHOV, M.V.; VOLKOV, V.V.; SVERGUN, D.I. Atsas 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, p. 277-286, 2006.

KORKOV, V. M.; MIREKU, S. A.; LOCHER, K. P. Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-f. **Nature**, v. 490, p. 367-373, 2012.

KOROPATKIN, N. M.; PAKRASI, H. B.; SHOTH, T. Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity. **PNAS**, v. 103, p. 9820-9825, 2006.

KURIHARA, S.; TSUBOI, Y.; ODA, S.; KIM, H. G.; KUMAGAI, K.; SUZUKI, H. The Putrescine Importer PuuP of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 2776-2782, 2009.

KUSANO, T.; YAMAGUCHI, K.; BERBERICH, T.; TAKAHASHI, Y. The polyamine spermine rescues Arabidopsis from salinity and drought stresses. **Plant Signaling & Behavior**, v. 2, p. 251-252, 2007.

LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 188-199, 2003.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I. T. FERRO; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. E. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-bases mutante library. **BioMed Central Microbiology**, v.9, p. 1-17, 2009.

LAPTENOK, S. P.; VISSER, N. V.; ENGEK, R.; WESTPHAL, A. H.; VAN HOEK, A.; VAN MIERLO, C. P. M.; STOKKUM, I. H. M.; VAN AMERONGEN, H.; VISSER, A. J. W. G. A General Approach for Detecting Folding Intermediates from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence of Single-Tryptophan-Containing Proteins. **Biochemistry**, v. 50, p. 3441-3450, 2011.

LEEuw, E.; GRAHAN, B.; PHILLIPS, G.; HAGEN-JONGMAN, C. M.; OUDEGA, B.; LUIRINK, J. Molecular characterization of *Escherichia coli* FtsE and FtsX. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 983-993, 1999.

LEWIS, V. G.; WEEN, M. P.; MCDEVITT, C. A. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. **Protoplasma**, v. 249, p. 919-942, 2012.

LI, C.; TAO, J.; MAO, D.; HE, C. A novel manganese efflux system, YebN, is required for virulence by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **PLoS One**, v. 6, p. 1-11, 2011.

LINTON, K. J. Structure and Function of ABC Transporters. **Physiology Reviews**. v.22, p. 122-130, 2007.

LINTON, K. J.; HIGGINS, CF. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 5-13, 1998.

LOCHER, K. P.; LEE, A. T.; REES, D. C. The *E. coli* BtuCD Structure: A Framework for ABC Transporter Architecture and Mechanism. **Science**, v. 296, p. 1091-1098.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v.157, p. 819–829, 2011.

MARBLESTONE, J. G.; EDAVETTAL, S. C.; LIM, Y.; LIM, P.; ZUO, X.; BUTT, T. R. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. **Protein Science**, v. 15, p. 182-189, 2006.

MCFEDRIES, A.; SCHWAID, A.; SAGHATELIAN, A. Methods for the Elucidation of Protein-Small Molecule Interactions. **Chemistry & Biology Review**, v.20, p. 667-672, 2013.

MEDRANO, F. J., SOUZA, C. S., ROMERO, A., BALAN, A. Structure of a sugar-binding protein from the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas citri*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 50, p. 564-571, 2014.

MERTENS, H. D. T.; SVERGUN, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angles X-ray scattering. **Journal of Structural Biology**, v.172, p. 128-141, 2010.

MOIR, J. W. B.; WOOD, N. J. Nitrate and nitrite transport in bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.58, p. 215-224, 2001.

MORENO-VIVIÁN, C.; CABELLO, P.; MARTÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6573-6584, 1999.

MOUSSATOVA, A.; KANDT, C.; O'MARA, M.; TIELEMAN, D. P. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1757-1771, 2008.

MOUTRAN, A., BALAN, A., FERREIRA, L. C. S., GIORGETTI, A., TRAMONTANO, A., FERREIRA, R. C. C. Structural model and ligand interactions of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* oligopeptide-binding protein. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 1169-1177, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5ª Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2011. 173 p.

NEVES, M. F.; THROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR, 2010. 137 p.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V. Effect of virulence and serial transfers of *Xanthomonas campestris* on xanthan gum production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 58-60, 2000.

OHASHI, Y.; SHI, W.; TAKATANI, N.; AICHI, M.; MAEDA, S. I.; WATANABE, S.; YOSHIKAWA, H.; OMATA, T. Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p. 1411-1424, 2011.

OMATA, T. Structure, Function e Regulation of the Nitrate Transport System of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. **Plant Cell Physiology**, v.36, p. 207-213, 1995

OSHIRO, E. E.; NEPOMUCENO, R. S. L.; FARIA, J. B.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Site-directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 171-179, 2006.

PAN, C.; MUIÑO, P. L.; BARKLEY, M. D.; CALLIS P. R. Correlation of Tryptophan Fluorescence Apectral Shifts and Lifetimes Arising Directly from Heterogeneous Environment. **The Journal of Physical Chemistry**, v.115, p. 3245-3253, 2011.

PARKER, J. L.; NEWSTEAD, S. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1 **Nature**, v. 507, p. 68-72, 2014.

PEGOS, V. R.; NASCIMENTO, J. F.; SOBREIRA, T. J. P.; PAULETTIN, B. A.; PAES-LEME, A.; BALAN, A. Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v.108, p.78-88, 2014.

PEREIRA, C. T.; MOUTRAN, A.; BALAN, A. **The sulfur transport and assimilation pathways in *Xanthomonas citri* based on genome analysis**. (In press).

PETOUKHOV, M. V.; KONAREV, P. V.; KIKHNEY, A. G. A.; SVERGUN D. I. ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v.40, p.223-228, 2007.

RAJAGOPAL, L.; SUNDARI, C. S.; BALASUBRAMANIAN, D.; SONTI, R. V. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. **FEBS Letters Journal**, v. 415, p. 125-128, 1997.

RAMBO, R. P.; TAINER, J. A. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Dbye Law. **Biopolymers**, v. 95, p.559-571, 2011.

RAMÍREZ, M. E.; FUCIKOVSKY, L.; GARCÍA-JIMÉNEZ, F.; QUINTERO, R.; GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.19, p. 5-10, 1988.

REES, D. C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC transporters: the power to change. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 218–227, 2009.

SAMPAIO, A.; YANG, S.; OLIVEIRA, C. L. P.; BALAN, A. Structural and biophysical analysis of the Putrescine-binding protein PotF from *Xanthomonas citri*. (In press).

SANTACRUZ-PEREZ, C.; PEGOS, V. R.; HONORATO, R. V.; VERLI, H.; LINDAHL, E.; BARBOSA, J. A. R. G.; BALAN, A. A specific interdomain interaction preserves the structural and binding properties of the ModA protein from the phytopathogen *Xanthomonas citri* domain interaction and transport in ModA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, p. 20-30, 2013.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUM, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAN, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida again. **Plant Disease**, v. 85, p. 340-356, 2001.

SENARATNE, R. H.; DA SILVA, A. D.; WILLIAMS, S. J.; MOUGOUS, J. D.; READER, J. R.; ZHANG, T.; CHAN, S.; SIDDER, B.; LEE, D. H.; CHAN, J.; BERTOZZI, C. R.; RILEY, L. W. 5'-Adenosinephosphosulphate reductase (CysH) protects *Mycobacterium tuberculosis* against free radicals during chronic infection phase in mice. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 1744-1753, 2006.

SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G.; SCARPECI, T. E.; VALLE, E. M.; CORTADI, A.; ORELLANO, E. G.; GOTTIG, N.; OTTADO, J. Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to pathogen virulence. **Molecular Plant Pathology**, v.13, p. 1047–1059, 2012.

SOARES, M. R.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, R. M.; MOREIRA, L. M.; OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; MANEGHINI, R.; GOZZO, F. C. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **Proteome Science**, v.8, p. 1-11, 2010.

SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v.33, p. 244-248, 2005

SOUZA, C. S.; FERREIRA, L. C. S.; THOMAS, L.; BARBOSA, J. A. R. G.; BALAN, A. Crystallization, data collection and data processing of maltose-binding protein (MalE) from the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Acta Crystallographica Section F: Structural biology and Crystallization Communucations**, v.65, 105-107, 2009.

STEC, E.; WITKOWSKA-ZIMNY, M.; HRYNIEWICZ, M.M.; NEUMANN, P.; WILKINSON, A.J.; BRZOZOWSKI, A. M.; VERMA C.S.; ZAIM, J.; WYSOCKI, S.; BUJACZ, G.D. Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. **Journal of Molecular Biology**, v. 364, p. 309-322, 2006.

SUGIYAMA, S.; VASSYLYEV, D. G.; MATSUSHIMA, M.; KASHIWAGI, K.; IGARASHI, K.; MORIKAWA, K. Crystal Structure of PotD, the Primary Receptor of the Polyamine Transport System in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9519-9525, 1996.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines in Microorganisms. **Microbiological reviews**, v. 49, p. 81-89, 1985.

TERUI, Y.; SAROJ, S. D.; SAKAMOTO, A.; YOSHIDA, T.; HIGASHI K.; KURIHARA, S.; SUZUKI, H.; TOIDA, T.; KASHIWAGI, K.; IGARASHI, K. Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological significance in *Escherichia coli*. **Amino Acids**, v. 46, p. 661-670, 2014.

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

VAN DER PLOEG, J. R.; IWANICKA-NOWICKAS, R.; BYKOWSKI, T.; HRYNIEWICZ, M. M.; LEISINGER, T. The *Escherichia coli* ssuEADCB Gene Cluster Is Required for the Utilization of Sulfur from Aliphatic Sulfonates and Is Regulated by the Transcriptional Activator Cbl. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 29358-29365, 1999.

VASSYLYEV, D. G.; TOMITORI, H.; KASHIWAGI, K.; MORIKAWA, K.; IGARASHI, K. Crystal structure and mutational analysis of the *Escherichia coli* putrescine receptor. Structural basis for substrate specificity. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 273, p. 17604-17609, 1998.

VOJNOV, A. A.; ZORREGUIETA, A. DOW, J. M.; DANIELS, M. J.; DANKERT, M. Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of

xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, v.144, p. 1487-1493.

WANNER, C., SOPPA, J. Genetic Identification of Three ABC Transporters as Essential Elements for Nitrate Respiration in *Haloferax volcanii*. **Genetics Society of America**, v.152, p. 1417-1428, 1999.

WÄRDELL, K.; JAKOBSSON, A.; NILSSON, G. E. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. **Biomedical Engineering**, v.40 (4), p. 309-316, 1993.

WENGELNIK, K.; BONAS, U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.3462-3469, 1996.

WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. **F1000Prime Reports**, v. 7, p. 2015.

WOODARD, L. M.; BIELKIE, A. R.; EISSES, J. F.; KETCHUM, P. A. Occurrence of nitrate reductase and molybdopterin in *Xanthomonas maltophilia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3766-3771, 1990.

WU, D. H.; LIM, S. C.; DONG, Y. H.; WU, J. E.; TAO, F.; ZHOU, L.; ZHANG, L. H.; SONG, H. W. Structural basis of substrate binding specificity revealed by the crystal structures of polyamine receptors SpuD and SpuE from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Molecular Biology**, v. 416, p. 697-712, 2012.

YAN, Q.; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 25, p.69-84, 2012.

YANG, Z.; PASCON, R. C.; ALSPAUGH, A.; COX, M. C.; CUSKER, J. H. Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans* MET3 gene and a met3 mutant. **Microbiology**, v. 148, p. 2617-2625, 2002.

ZHENG, H.; WISEDCHASRI, G.; GONEN, T. Crystal structure of nitrate/nitrite exchanger. **Nature**, v. 497, p. 647-651, 2013.

ANEXOS

A - Tabela 1 – Condições e ligantes usados para experimento de Thermal Shift. As variações das concentrações dos ligantes foram feitas em triplicatas.

Poço		pH	Concentração
A1	Proteína +Tampão + Sypro	-	-
A2	Proteína +Tampão + Sypro	-	-
A3	Proteína +Tampão + Sypro	-	-
A4	NaCl ₂	-	50 mM
A5	NaCl ₂	-	50 mM
A6	NaCl ₂	-	50 mM
A7	NaCl ₂	-	100 mM
A8	NaCl ₂	-	100 mM
A9	NaCl ₂	-	100 mM
A10	NaCl ₂	-	200 mM
A11	NaCl ₂	-	200 mM
A12	NaCl ₂	-	200 mM
B1	MOPS	7.0	5 uM
B2	MOPS	7.0	5 uM
B3	MOPS	7.0	5 uM
B4	MOPS	7.0	10 uM
B5	MOPS	7.0	10 uM
B6	MOPS	7.0	10 uM
B7	MOPS	7.0	25 uM
B8	MOPS	7.0	25 uM
B9	MOPS	7.0	25 uM
B10	MOPS	7.0	50 uM
B11	MOPS	7.0	50 uM
B12	MOPS	7.0	50 uM
C1	HEPES	7.5	5 uM
C2	HEPES	7.5	5 uM
C3	HEPES	7.5	5 uM
C4	HEPES	7.5	10 uM
C5	HEPES	7.5	10 uM
C6	HEPES	7.5	10 uM
C7	HEPES	7.5	25 uM
C8	HEPES	7.5	25 uM
C9	HEPES	7.5	25 uM
C10	HEPES	7.5	50 uM
C11	HEPES	7.5	50 uM
C12	HEPES	7.5	50 uM
D1	(NH ₄)(NO ₃)		5 uM
D2	(NH ₄)(NO ₃)		5 uM
D3	(NH ₄)(NO ₃)		5 uM
D4	(NH ₄)(NO ₃)		10 uM
D5	(NH ₄)(NO ₃)		10 uM
D6	(NH ₄)(NO ₃)		10 uM
D7	(NH ₄)(NO ₃)		25 uM

D8	(NH ₄)(NO ₃)		25 uM
D9	(NH ₄)(NO ₃)	-	25 uM
D10	(NH ₄)(NO ₃)	-	50 uM
D11	(NH ₄)(NO ₃)	-	50 uM
D12	(NH ₄)(NO ₃)	-	50 uM
E1	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	5 uM
E2	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	5 uM
E3	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	5 uM
E4	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	10 uM
E5	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	10 uM
E6	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	10 uM
E7	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	25 uM
E8	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	25 uM
E9	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	25 uM
E10	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	50 uM
E11	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	50 uM
E12	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	50 uM
F1	Taurina	-	5 uM
F2	Taurina	-	5 uM
F3	Taurina	-	5 uM
F4	Taurina	-	10 uM
F5	Taurina	-	10 uM
F6	Taurina	-	10 uM
F7	Taurina	-	25 uM
F8	Taurina	-	25 uM
F9	Taurina	-	25 uM
F10	Taurina	-	50 uM
F11	Taurina	-	50 uM
F12	Taurina	-	50 uM
G1	Tirosina	-	5 uM
G2	Tirosina	-	5 uM
G3	Tirosina	-	5 uM
G4	Tirosina	-	10 uM
G5	Taurina	-	10 uM
G6	Taurina	-	10 uM
G7	Tirosina	-	25 uM
G8	Tirosina	-	25 uM
G9	Tirosina	-	25 uM
G10	Tirosina	-	50 uM
G11	Tirosina	-	50 uM
G12	Tirosina	-	50 uM
H1	Mg(NO ₃) ₂	-	5 uM
H2	Mg(NO ₃) ₂	-	5 uM
H3	Mg(NO ₃) ₂	-	5 uM
H4	Mg(NO ₃) ₂	-	10 uM
H5	Mg(NO ₃) ₂	-	10 uM
H6	Mg(NO ₃) ₂	-	10 uM
H7	Mg(NO ₃) ₂	-	25 uM
H8	Mg(NO ₃) ₂	-	25 uM

H9	Mg(NO ₃) ₂	-	25 uM
H10	Mg(NO ₃) ₂	-	50 uM
H11	Mg(NO ₃) ₂	-	50 uM
H12	Mg(NO ₃) ₂	-	50 uM

A

```

NrtT_xac      -----MPHRRFSRRIALLVLAALPLLHSAHAQAEGKLRIAKQFGIVYLL 44
SsuA2_xac     MRATGRQQTVCRSLMAARAAAYAAALASALLLASLVWAQPALAAEPAQLRIGYQKAVSSLV 60
               ::  : *:::*  :.* *  :.***. *  : : * :

NrtT_xac      LDVAQDQKLIEQQGKAAGVDIDVQFLQLSGGAAVNDALLTGSIDAGAGVGPLFTIWDRT 104
SsuA2_xac     L--AKQHRLLERFPRPRT----KITWVEFPAGPQLLEALNVGSIDLGGAGDIPPLFAQAAG 114
               *  *:::.*:::  :  :  : : : : . *  : : ** .***:.* *  :

NrtT_xac      RGRQNVRGVASLGNFPYYLISNNPRIKSIQDFTPKDRIAVPATGVSVQSRFLQHASQQRW 164
SsuA2_xac     ADLLYVGWVPPTPKAETILVPSKSALRTVADLKGG-RIAFQK-GSSAHNLLLRVLAKS-- 170
               .  *  *..  :  *:::.. : : : : . *  ***.  * *.. : * : : :

NrtT_xac      GDKGTHQLDALQVALPHPDAAAIIIRGRSEITAHFASPPFQEQLARNPAAHIVTSSYEI 224
SsuA2_xac     ---GLSMRDITPLYLSPANARAAFAAGQVDAAWIWD-PWYSALTLTGDSARLLANGEGLGL 226
               *  *  : * . : * * : * : : * : * : .  *  ..  ..  :

NrtT_xac      EGGPSSATVLYATEKFRQDNPKTYRAFVAALDQAAKFVTAHPEQAADIFLRNRGSG---I 281
SsuA2_xac     TGG-----FFLSRRYATAWGPFVQQVMGTLNQADGLLERDRAGSIKTLAQVSGLPFAV 281
               **  :  : : : :  :  : : : * : * : :  :  :  : : . *  :

NrtT_xac      DRALVLQILKDPK-VQFTVAPQNTLGLGKFMQHSGAIKQAPGKVGDFDDEPLIAGGS-- 338
SsuA2_xac     ERTLAHRPPASVQPLSAQVIKAQQATADLFYAQRLLPKRVLVAPAVWRAPDAGTAQAVSK 341
               : * : .  :  : : : . *  :  :  * :  * : .  :  * .  * .

```

B

B - Figura 1 – Validação do modelo tridimensional de NrtT. (A) Alinhamento de sequência dos resíduos de aminoácidos de NrtT e da proteína ligadora de alco sulfonatos SsuA2 de *X. citri*, indicando regiões de conservação **(B)** Gráfico de Ramachandran da modelagem de NrtT, gerado pelo programa COOT. Embora estejam presentes alguns pontos fora de regiões permitidas é importante ressaltar que por se tratar de uma modelagem, algumas posições são mal ajustadas, porém a porcentagem de *outliers* é inferior a 3 %.

A

```

PotF_xac      -ATGACGCTGCGACTGCTCGCCCTGACGCTGTCCATCACCCCTGTTGTCCGGCTGTGGCGG 59
SpuD_pae      ----ATGATGAAACGTTTCGGTAAGACCCTG---CTCGCCCTG-----ACCTTGGCGG 46
PotF_eco      ATGACCGCCTTAATAAAAAAATGGCTATCGG---GTCTGGTTGCGGG--TGCTCTGATGG 55
               . *. .*. :.. :. * * * * * . * ** . **

PotF_xac      -CGCTGGCGCGCCCGG--CAGCGCCGACG-CGCAGGCCAAGGTGCTCAACGTCTACAAC 115
SpuD_pae      GCTCTG--TGGCCGGTATGGCGCAGGCTGCGGACACAAGGTACTGCACGTGTACAAC 103
PotF_eco      ---CCGTCTCTGTCTGG--CACGCTCGCGGCTGAACAAAAACACTCCACATTTATAAC 109
               * *      *** .*** . * * * .***. .** .*** * * **

PotF_xac      ATTCCGATTACATCGCCGAAGACACCATTCGCCGCTTCGAAAAGAGCACCGGCATCAAGG 175
SpuD_pae      GGTCCGACTACATCGCGCCGGACACCTGGAGAAGTTCACCAAGGAAACCGGGATCAAGG 163
PotF_eco      GGTCTGATTATATCGCCCCGGACACGGTGGCCAATTTGAAAAGAAACCGGTATTAAAG 169
               . ** * * * * * . .***** * . . * * . . .***** ** **.*

PotF_xac      TGACCTACGACGTCTTCGACAGCGACGAAATGGTGGAAACCAAGTTGCTGGCCGGCGGCA 235
SpuD_pae      TCGTCTACGACGTCTACGACAGCAACGAAGTGTGGAAGCCAAGTTGCTGGCGGGCAAGT 223
PotF_eco      TCGTCTACGATGTTTTCGACTCTAACGAAGTACTGGAAGGCAAAATTAATGGCCGGGAGTA 229
               * . ***** ** *.:****: .*****.*. *****. ***.*..***** ** .. :

PotF_xac      GCGATTACGACGTGGTGGTGCCACGCTGAACTTCTTCGGCCGCGCAGATCCAGGCCGGCG 295
SpuD_pae      CCGGGTACGACGTGGTGGTGCCGTCACCTCCTTCCTCGCCAAGCAGATCAAGGCCGGGG 283
PotF_eco      CCGGCTTTGATCTGGTGGTTCATCTGCCAGCTTCTGGAGCGCCAGTTGACTGCGGGAG 289
               **.*: ** ***** ** : * : * * * * . . ***: * .. * * * *

PotF_xac      TCTTCCTGCCGCTGGACAAGAGCAAGATCCCCAATCTGGTCAATCTGGATCCGGACGTGA 355
SpuD_pae      TCTACCAGAAGCTCGACAAGTCCAAGCTGCCGAAGTGAAGAACCTGAACAAGGACCTGA 343
PotF_eco      TTTTCAGCCGCTGGACAAGAAGCAATTTGCCGAGTGAAGAATCTCGACCCGGAACCTGC 349
               * *.:**.*.*** *****.: ***. * ** .* *: * * * . * ..***. **.

PotF_xac      TGCGCCGCATCGCCGCGCAGGACCCGAACAACGCCTATGGCGTGCCGTACATGATCGGCA 415
SpuD_pae      TGCACACCCCTGGAAGTCAGCGACCCGGGCAACGAGCATGCGATTCCCTACATGTGGGCA 403
PotF_eco      TGAAGCTGGTCGCCAAACACGATCCCGACAATAAATTGCTATGCCCTATATGTGGGCGA 409
               **.. . * *... .. * * * ..*** .. :** . * * * * *: * *

PotF_xac      CCACTGGCATCGGCTACAACGTCGACAAGCTCAAGGCGATCTTCGGCAACACCGATGTCG 475
SpuD_pae      CCATCGGCATCGGCTACAACCCGGACAAGGTCAAGGCGGCCCTTCGGCGACAATGCGCCG 463
PotF_eco      CGACCGGGATTGGCTATAACGTTGATAAAGTTAAAGCGGTGCTGGGCGAAAAACGCGCCG 469
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PotF_xac      CCAACAGCTGGGATCTGGTGTTCAGCCGGAGAATCTGTCCAAACTCAAGGACTGTGGCG 535
SpuD_pae      TGGATTCTCTGGGACCTGGTATTCAAGCCGGAGAACATCCAGAAGCTGAAGCAGTGCGGCG 523
PotF_eco      TCGATAGCTGGGACTTGATCTCAAACCTGAAAATCTGGA AAAACTGAAAAGCTGCGGTG 529
               . * : ***** **.* ***** ** **.* * . * * . * * * *

PotF_xac      TGACCATCTCGGACACGCCTTCGGACATGATTCCTCGCGCTCAATTATCTCGGGCTCG 595
SpuD_pae      TCAGCTTCCTCGACTCGCCGACCGAGATTCTCCCGCGGCGCCTGCACTATCTCGGCTACA 583
PotF_eco      TCTCTTTCTGGATGCGCCAGAAGAAGTTTGTGCTACCGTGTGAATTATCTCGGCAAG 589
               * : :**** ** ***** . ** .* * * . * * . * * ***** :..

PotF_xac      ATCCGCACAGCACCACGCGCGCGAGATCGAAA--AGGCCGCGCGCTGATCAAGGCCA 652
SpuD_pae      AGCCGACACCGACAATCCCAAGGAAGTCAAGG---CGGCCGAAGAGCTGTTCTGAAGA 640
PotF_eco      ATCCCAACAGCACTAAAGCGGATGATTACACCGGACCGGCAACAGATCTGCTGTAAAGC 649
               * ** * * * . * . * . * * : * . . .*****. * * * : . . .

PotF_xac      TTCGCCCGTACGTGCAGAACTTCCACTCCAGCCAGTACGTGACCTCGCTGGCCAACGGCA 712
SpuD_pae      TCCGTCCCTACGTACCTACTTCCACTCGTGAAGTACATTTCGACCTGGCCAACGGCA 700
PotF_eco      TGGCCCGAACATTGCTTATTTCATCTCAATACATTAACGACCTGGCAACGGCG 709
               * * * * :**.* . : * ***** ** : .*.***.* :.* . *****.*****.

PotF_xac      ATACCTGCCTGGCGGTGGGTGGTCCGGCGACATCATCCAGGCGCGCGACCGTGCCGCGG 772
SpuD_pae      ACATCTGCGTCGCCATCGGCTACTCCGGCGACATCTACCAGGCCAAGTCCCGCGCCGAAG 760
PotF_eco      ATATTTGCGTCGCTATCGGCTGGGCGAGGTGATGTCTGGCAGGCGTCAAACCGCGCGAAGG 769
               * * * * * * * . * * * . * . * * * .** : ***** . * * * * . *

PotF_xac      AAGCCGGCAACAACATCAAGGTGGCCTACGCCATTCCAAAGGAGGGCGCGCCGCA-ATGG 831
SpuD_pae      AGGCGAAGAACAAGGTCAACGTCAAGTACAACATTCCCAAGGAAGGCGC-CGGCAGCTTC 819
PotF_eco      AAGCGAAGAATGGCGTGAATGTCTCGTTCGATTCCAAAAGAAGGGGCGATGGC-GTTC 828
               *.** .. * * . . * * * * . * : * . *****.*.*** ** * . * . *

PotF_xac      TTCGACATGCTGGCCATTCCCAAGGATGCCAAGCACCCGGACAACGCCTACGCCTTCATC 891
SpuD_pae      TTCGACATGGTCGCCATTCCCAAGGACCGCGAGAACACCGAGGGCGCCTGGCCTTCGTC 879
PotF_eco      TTTGATGTATTCGCCATGCGCTGCGGATGCCAAAAACAAGACGAAGCCTATCAGTTCCTG 888
               ** * * . * . * * * * * * . * * * * * . * * . . * * : . * * * *

```

```

PotF_xac      AATTATCTGTTGAAGCCGGACGTGGCCGCGGCCAATACCAACTTCATCCATTACGCCAAC 951
SpuD_pae      AACTTCCTGATGAAGCCGGAATCATGGCCGAGATCACCGACGTGGTTCAGTTCCCAAC 939
PotF_eco      AATTACCTGCTGCGCCGGATGTAGTAGCGCATATTCCGACCATGTGTTCTATGCCAAC 948
               ** *: *** **.. ***** . * . ** . *: :**. ** : . * : *: *****

PotF_xac      CCGGTGCGCACCG-CCACCCCGTTGGTGGATGCGGCGATCCGCAACGACCCCAACATCTA 1010
SpuD_pae      G-GCAACGCAGCGGCCACCCCGCTGGTGTCCGAGGCGATCCGCAACGACCCGGGCATCTA 998
PotF_eco      G-CCAATAAAGCAGCCACGCCGCTGGTGTGAGTGCAGGAGTCCGTGAGAACCAGGTATTTA 1007
               :. . * * . ***** ** ***** *.*****. * .***** . ** **

PotF_xac      CCGCGCCGCGGAAGTGACCGCCAAGATGTTTACCTATGCCATCAATCCG-CCTGACGTGG 1069
SpuD_pae      CCGGAGCGAAGAGGTCATGAAGAAGCTGTATACCTTCCCGACCTGCCGCGCAAGACCCA 1058
PotF_eco      TCCGCTGCGGATGTTTCGTGCGAAGCTGTTCACTCTGAAAGTGCAGGATCCGAAAATCGA 1067
               ***. .*. ** * . . . ***.***: ** : . . . : . * :... .

PotF_xac      ACCGGCTGT-ACACGCGGCTGTGGACCGAGATCAAGACCGGGCATTGA 1116
SpuD_pae      GCGGGCGATGACCCGCGAGCTG--GACCAAGATCAAGTCCGGCAAGTGA 1104
PotF_eco      CCGTGTGCGCACCCGCGCGTG--GACCAAAGTGAAGAGCGGAAAATAA 1113
               * *      **..***. ** *****..* ***: *** . * *. *

```

B

C - Figura 2 – Validação do modelo tridimensional de PotF. (A) Alinhamento de sequência dos resíduos de aminoácidos de PotF de *X. citri* (xac) com as proteínas ligadoras de putrescina PotF de *E. coli* (eco) e SpuD de *P. aeruginosa* (pae), indicando regiões de conservação **(B)** Gráfico de Ramachandran da modelagem de PotF, gerado pelo programa COOT. Não foram observados pontos fora de regiões permitidas (*outliers* de 0%).