

CRISTIANE TAMBASCIA PEREIRA

Estudos funcionais e estruturais para a Caracterização da via de captação e assimilação de sulfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

CRISTIANE TAMBASCIA PEREIRA

Estudos funcionais e estruturais para a Caracterização da via de captação e assimilação de sulfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Andrea Balan

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Pereira, Cristiane Tambascia.

Estudos funcionais e estruturais para a caracterização da via de captação e assimilação de sulfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* / Cristiane Tambascia Pereira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Balan.

Dissertação (Mestrado) – 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 molecular e estrutural de proteínas.

Versão do título para o inglês: Structural and functional studies for characterization of the sulfate uptake and assimilation pathway from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

1. *Xanthomonas citri* 2. Sulfato 3. Transportador ABC 4. Proteínas
5. Transporte 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/SBIB084/2013

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

Candidato(a): Cristiane Tambascia Pereira.

Título da Dissertação: Estudos funcionais e estruturais para a caracterização da via de captação e assimilação de sulfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

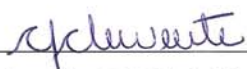
Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Comissão de Ética no uso de Animais
CEUA/CNPEM

Certificado de Isenção

Certificamos que o projeto “Estudos Funcionais e Estruturais para a Caracterização da Via de Captação e Assimilação de Sulfato em *Xanthomonas axonopodis pv. citri*” (protocolo n° **05**), 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, 21 de maio de 2013



Dra. Carolina F. M. Z. Clemente
Presidente



Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio
Bióloga

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do Projeto: Estudos Funcionais e Estruturais para a Caracterização da Via de Captação e Assimilação de Sulfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Pesquisador responsável: Andrea Balan

Experimentador: Cristiane Tambascia Pereira

Nível do treinamento do experimentador: -Iniciação científica, -mestrado, -doutorado, -doutorado direto, -pós-doutorado, -nível técnico, -outro, especifique: _____


Resumo do projeto:

Em estudos recentes realizados pelo nosso grupo envolvendo proteínas dos sistemas de transporte do tipo ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, foi identificado por homologia de seqüências de aminoácidos, um conjunto de proteínas que supostamente formariam o "regulon *cys*" de captação de enxofre, conforme caracterização em *Escherichia coli*. Apesar da grande importância econômica de *X. axonopodis*, fitopatógeno responsável pelo desenvolvimento do cancro cítrico em plantas, muito pouco é conhecido sobre o metabolismo desta bactéria em relação à captação de íons, e em especial, ao metabolismo de enxofre. As proteínas identificadas no regulon, constituem três transportadores do tipo ABC, responsáveis pelo transporte de sulfato e, na ausência deste, alcanosulfonatos e sulfonatos alifáticos, bem como todas as enzimas necessárias para a conversão dos compostos em sulfitos e alcanos, e seus reguladores de transcrição. Neste trabalho pretende-se estudar funcional e estruturalmente as proteínas da via específica de assimilação de sulfato, caracterizada pelo transportador do tipo ABC SbpCysUWA e pelas enzimas citoplasmáticas envolvidas na transformação de sulfato em sulfito (CysDNCHIJG).


A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 9.1.2012.


Parecer final: -projeto aprovado, -projeto recusado, -projeto com deficiências, favor comentários anexo.



Presidente de CIBio – ABTLuS-LNBio
Jörg Kobarg


Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Prof. Dr. Celso Edgardo Benedetti


Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Andrea Balan


Membro da CIBio – ABTLuS-SGT
Carolina Barbosa Marini


Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Fabio Squina


Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Sindelia Freitas Azzoni


Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Roberto Ruller

À minha mãe e ao meu irmão, pelo amor e
paciência sempre incentivando a minha
formação.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Andrea Balan, a chefe, por me acolher em seu grupo mesmo não tendo nenhuma experiência prévia no mundo científico, por sempre me motivar e me apoiar nas decisões pessoais e profissionais, por todo conhecimento teórico e prático que adquiri. Só tenho a dizer MUITO OBRIGADA por esses anos de exemplo e orientação;

À Msc. Vanessa Pegos, primeiramente, por me apresentar a chefe e também pela paciência e presteza em me ensinar a rotina do laboratório. O “querida” ficará eternizado. Obrigada pela amizade pessoal e acadêmica;

Ao Dr. Alexandre Moutran, pelos ensinamentos de Bioinformática.

À Dra. Melissa Fessel, com a valiosa contribuição nos experimentos funcionais.

Ao Dr. Daniel Trindade, Msc. Renata Rocha e Msc. Tereza Lima, pelos excelentes conselhos no universo da Biologia Molecular;

Aos **amigos** do “ABC Group” e do Laboratório : Aline Sampaio, Ana Léticia Lusa, Américo Ranzani, Carla Polo, Carolina Santacruz, Cássia Roesler, Gustavo Mercaldi, Jéssica Faria, Joice Paiva, Kelven Ulisses, Mariana Rangel, Michelle Fagundes e Thaís Maester; com toda certeza minha rotina foi muito mais doce na presença de vocês;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento e bolsa concedida;

Ao Laboratório Nacional de Biociências- LNBio/ CNPEM por toda infraestrutura cedida para realização desse trabalho;

Aos técnicos e responsáveis pelos Laboratórios de Espectrometria e Calorimetria (LEC), Espectroscopia de Massas (MAS) e Laboratório de Cristalização de proteínas (ROBOLAB) por ceder o espaço e orientação para desenvolver os experimentos e análises que contribuíram para a realização desse trabalho;

Às técnicas Andréia, Bianca, Givanil, Celisa, Daiane, Jaqueline Zanella, Romenia Tamires e Wanderley pelo auxílio, orientações, e pela contribuição nesse trabalho.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, muito obrigada!

Este projeto foi realizado no Laboratório Nacional de Biociências – LNBio no Centro Nacional de Pesquisas e Energia em Materiais – CNPEM sendo financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, número processo 2010/14207-8.

*“Nenhuma mente que se abre para uma nova
idéia voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

PEREIRA, C. T. **Estudos funcionais e estruturais para a Caracterização da via de captação e assimilação de sulfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Em *Escherichia coli*, a assimilação de sulfato e sua redução a sulfeto é mediada por um transportador do tipo ABC codificado pelos genes *sbpcysWUA* e várias enzimas codificadas pelos genes *cysNCDGHIJ*. Embora a importância deste sistema tenha sido largamente demonstrada neste e outros organismos, não existem relatos na literatura sobre a via na bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. citri*). Neste trabalho, utilizando uma abordagem funcional baseada em análises de bioinformática, proteômica e gene repórter, mostramos que a via de sulfato está presente e ativa em *X. citri*. Todas as proteínas da via foram modeladas e comparadas com ortólogos para determinação dos resíduos importantes para interação e atividade. Ainda, a partir da expressão e produção em larga escala da proteína ligadora de sulfato Sbp, primeiro componente da via, responsável pela captura do íon e liberação deste na permease, realizamos ensaios de biofísica que evidenciaram a capacidade de interação da proteína com sulfato. Os dados mostraram que apesar de não haver alteração estrutural após a interação com o ligante, há o aumento da estabilidade térmica. A proteína também foi usada para a produção de cristais que difrataram a baixa resolução mas que estão em fase de refinamento. O trabalho apresenta as primeiras evidências da funcionalidade desta via em *X. citri* durante o crescimento *in vitro* e infecção *in vivo* e abre perspectivas de estudos futuros para compreensão do papel deste íon na fisiologia do microrganismo.

Palavras-chave: *Xanthomonas citri*. Sulfato. Regulon *cys*. Proteína ligadora de sulfato.

ABSTRACT

PEREIRA, C. T. **Structural and functional studies for characterization of the sulfate uptake and assimilation pathway from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2013. 105 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In *Escherichia coli* the capture and reduction of sulfate to sulfide is mediated by an ABC-type transporter encoded by genes *sbpcysWUA* and several enzymes encoded by the genes *cysNCDGHIJ*. Although the importance of this system has been widely demonstrated in this bacterium and other organisms, there are no reports in the literature related to the way that sulfate is assimilated and reduced in plant pathogen bacteria, including *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. citri*). In this work, using a functional approach based on bioinformatics analysis, proteomics and gene reporter, we show that the route of sulfate is present and active in *X. citri*. All proteins from the pathway were modeled and compared with orthologs for identification of important residues for interaction and activity. Indeed, the sulfate binding protein Sbp, the first pathway component responsible for the ion capture and release in the permease at the internal membrane, was expressed and produced in large-scale for biophysical assays. The results revealed that Sbp interacts with sulfate without any structural change and that the interaction induces a significant increasing of thermal stability. Crystals of Sbp were produced in presence and absence of sulfate and are being refined. Altogether the results presented in this study show the first evidence of the functionality of the sulfate assimilation pathway in *X. citri*.

Keywords: *Xanthomonas citri*. Regulon *cys*. Sulfate binding protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colônias isoladas de <i>X. citri</i>	21
Figura 2 - Fenótipo de infecção de folhas de <i>Citrus sinensis</i> e cancriose provocada por <i>X. citri</i> após 14 dias de infecção.....	23
Figura 3 - Representação dos transportadores do tipo ABC.....	26
Figura 4 - Análise estatística dos Transportadores do tipo ABC identificados no genoma de <i>X. citri</i> e no proteoma da bactéria.....	28
Figura 5 - Genes pertencentes ao regulon <i>cys</i> caracterizado em <i>Escherichia coli</i> K12 (caixa cinza).....	30
Figura 6 - Grupamentos gênicos (operons) responsáveis pela formação da via de Sulfato em <i>X. citri</i>	47
Figura 7 - Árvore filogenética de diferentes organismos baseada na seqüência do rRNA 16S.....	51
Figura 8 - Presença das proteínas da via de sulfato em diferentes microrganismos.....	52
Figura 9 - Modelo da estrutura tri-dimensional do transportador de sulfato de <i>X. citri</i>	56
Figura 10 - Representação da etapa inicial da assimilação de sulfato.....	57
Figura 11 - Reação de fosforilação de APS pela enzima adenilsulfato quinase (CysC) originando PAPS, ADP e fosfato inorgânico.	58
Figura 12 - Modelo do complexo CysN*D de <i>X. citri</i> baseado nas coordenadas estruturais dos ortólogos de <i>P. syringae</i> (PDB 1ZUN).60	
Figura 13 - Modelo estrutural do complexo CysN*D + CysC de <i>X. citri</i> baseado nos dados de Mougous e colaboradores (2006).....	61
Figura 14 - Reação de redução de PAPS pela PAPS redutase CysH liberando sulfito, PAP e tiorredoxina dissulfeto.....	62
Figura 15 - Modelo da estrutura da PAPS redutase de <i>X. citri</i> (CysH) comparada com o ortólogo de <i>E. coli</i> (PDB 2O8V) e com a APS redutase de <i>P. aeruginosa</i> (PDB 2GOY).....	63
Figura 16 - Reação de redução do sulfito catalizada pela sulfito redutase (CysIJ).....	64

Figura 17 - Modelo em <i>cartoon</i> da estrutura tridimensional da proteína CysJ de <i>X. citri</i> (laranja) sobreposto ao ortólogo de <i>E. coli</i> (PDB 1DDG) (azul).	66
Figura 18 - Modelo em <i>cartoon</i> da estrutura tridimensional da proteína CysI de <i>X. citri</i> (amarela).	66
Figura 19 - Esquema das reações enzimáticas realizadas pela proteína siroheme sintase, CysG, para a formação de siroheme.	68
Figura 20 - Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína CysG de <i>X. citri</i> ...70	
Figura 21 - Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína CysG de <i>X. citri</i> ...71	
Figura 22 - Extratos de <i>X. citri</i> usados nos ensaios de espectrometria de massas...73	
Figura 23 - Amplificação dos genes da via de captação e assimilação de sulfato a partir de cDNA.	75
Figura 24 - Região do genoma de <i>X. citri</i> portadora do promotor do operon do transportador do tipo ABC <i>sbspcysWUA</i> ...77	
Figura 25 - Esquema geral de construção do vetor pKX33-p1017-eGFP.	78
Figura 26 - Etapas da clonagem do promotor p1017 do transportador de sulfato...79	
Figura 27 - Cultura de <i>X. citri</i> em meio LB observada em microscópio de fluorescência: campo claro A) e fluorescência B)	80
Figura 28 - Avaliação temporal da ativação do promotor p1017 em cultura de <i>X. citri</i> em meio LB.	81
Figura 29 - Microscopia de células de <i>X. citri</i> para avaliação qualitativa da ativação do promotor p1017 do operon <i>sbspcysWUA</i>82	
Figura 30 - Avaliação da ativação do promotor p1017 de <i>Citrus sinensis</i> infectada com <i>X. citri</i> transformada com pKX33-p1017-eGFP.	83
Figura 31 - Amplificação por PCR dos genes da via de sulfato ...85	
Figura 32 - Digestão enzimática do vetor pGEM-TEasy com suas respectivas enzimas de restrição mostrando os insertos obtidos...86	
Figura 33 - Digestão enzimática do vetor pET28a com suas respectivas enzimas de restrição mostrando os insertos obtidos...87	

- Figura 34 - Resultados dos testes de expressão da proteína CysD de *X. citri* em *E. coli* BL21 (DE3)...88**
- Figura 35 - Análise da expressão da proteína Sbp (37.5 kDa) de *E. coli* BL21(DE3) por SDS-PAGE 12%...89**
- Figura 36 - Etapas de purificação da proteína Sbp de *X. citri*...90**
- Figura 37 - Análises biofísicas da proteína SBP para estudos de interação com o íon sulfato...92**
- Figura 38 - Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da Sbp na presença de sulfato de magnésio evidenciando uma interação do tipo endotérmica...93**
- Quadro 1 - Cristais da proteína SBP de *X. citri* na presença e ausência do ligante Sulfato.....95**
- Figura 39- Cristais de BP e padrão de difração obtidos na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas...96**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Desenho dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região promotora.....36
- Tabela 2** - Sequência dos oligonucleotídeos inicial e final com a exibição dos sítios de restrição acrescidos aos genes40
- Tabela 3** - Reação de Amplificação.....40
- Tabela 4** - Comparação dos genes envolvidos na via de captação de sulfato em *X. citri* com os genes de *E. coli*, conforme resultado do BLASTp.....46
- Tabela 5** - Proteínas do regulon *cys* envolvidas com a captação de sulfato e redução deste a sulfito identificadas em ensaios de proteômica em diferentes meios de cultivo.....76
- Tabela 6** - Características dos genes e respectivas proteínas da via de captação e assimilação de sulfato de *X. citri* usados como alvo neste projeto. Dados obtidos no servidor KEGG.84
- Tabela 7** - Análise comparativa dos resultados positivos provenientes da variação das condições da PCR para otimização da reação dos diversos genes do regulon *cys*.85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6xHisTag - Cauda de seis histidinas

ABC - ATP-Binding Cassete

ATP - Trifosfato de adenosina

Blast - Basic local alignment tool

CD - Dicroísmo circular

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

C-terminal: Carboxi-terminal

DLS - Espalhamento dinâmico de Luz

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

ExPASy – Expert Protein Analysis System

FMN - Mononucleotídeo de Flavina

FMNH₂ - Mononucleotídeo de Flavina reduzida

g - Gravidade

IPTG - Isopropil-b-D- tiogalactosídeo

IMAC: Cromatografia de afinidade a metal imobilizado

ITC - Titulação isotérmica calorimétrica

kDa - kilodaltons

K_a - constante de associação

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas

LB - Luria-Bertani

NaCl - Cloreto de Sódio

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD(P)H - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCBI – National Center for Biotechnology Information

N-terminal - Amino-terminal

Pb- pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PDB - Protein Data Banking

pH - potencial Hidrogeniônico

PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil

PVP - Polivinilpirrolidona

RNA - Ácido ribonucleico

SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

TAQ: DNA-polimerase de Thermococcus

Tm – Temperatura média

Tris - Hidroximetil-aminamento

μM - micromolar

V - Volts

XGAL - 5-bromo-4cloro-3-inodolil-B-D-galactopiranosideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Exposição do problema: <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> e o cancro cítrico.....	21
1.2 Os transportadores do tipo ABC	24
1.3 Metabolismo de enxofre e o regulon <i>cys</i>	28
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Identificação e caracterização das proteínas por bioinformática.....	33
3.2 Modelagem molecular das proteínas por homologia.....	33
3.3 Construção da árvore filogenética.....	33
3.4 Crescimento de <i>X. citri</i> em diferentes meios de cultivos	34
3.5 Extração de RNA e construção de cDNA	34
3.6 Extração de proteínas totais.....	34
3.7 Quantificação das proteínas totais	35
3.8 Análise por espectrometria de massa (LC-MSMS)	35
3.9 Análise dos dados de espectrometria de massa	35
3.10 Confecção e ensaios com gene repórter para o promotor do transportador de sulfato	36
3.11 Extração de DNA genômico de <i>X. citri</i>	38
3.12 Amplificação dos genes <i>sbp</i> , <i>cysUT</i> , <i>cysW</i> , <i>cysA</i> , <i>cysD</i> , <i>cysNC</i> , <i>cysH</i> , <i>cysI</i> , <i>cysJ</i> e <i>cysG</i>	39
3.13 Ligação no vetor de Clonagem pGem® T-Easy.....	40
3.14 Transformação de células de <i>E. coli</i> através do método de choque térmico, e confirmação do inserto no vetor de clonagem	41
3.15 Sub-clonagem no vetor de Expressão pET28a	41
3.16 Indução, extração e purificação das proteínas recombinantes Sbp e CysD de <i>X. citri</i>	42
3.17 Dicroísmo circular	42
3.18 Espalhamento dinâmico de luz (<i>dynamic light scattering</i> - DLS) da proteína Sbp	43

3.19 Testes de cristalização da proteína Sbp	43
3.20 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da proteína Sbp na presença do ligante.....	43
3.21 Irradiação e difração dos cristais de SBP	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Conservação da via de sulfato em diferentes organismos.....	45
4.2 Caracterização de função das proteínas da via.....	53
4.2.1 O transportador do tipo ABC para captação de sulfato	53
4.2.2 A internalização e assimilação do sulfato no citoplasma bacteriano.....	56
4.3 Análise proteômica	72
4.4 RT-PCR	74
4.5 Análise da ativação do operon codificador do transportador ABC de sulfato <i>sbpcysWUA</i> de <i>X. citri</i>	76
4.6 Clonagem molecular dos genes <i>sbp</i> , <i>cysD</i> , <i>cysNC</i> , <i>cysH</i> , <i>cysI</i> , <i>cysJ</i> , <i>cysG_2159</i> e <i>cysG_3340</i>	84
4.7 Produção da proteína recombinante CysD	87
4.8 Produção da proteína recombinante Sbp.....	88
4.9 Ensaio de dicroísmo circular para análise do conteúdo de estrutura secundária e estabilidade térmica da Sbp de <i>X. citri</i>	90
4.10 Estudos de interação da Sbp com sulfato utilizando titulação calorimétrica (ITC)	92
4.11 Ensaio de cristalização SBP.....	94
5 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Exposição do problema: *Xanthomonas citri* pv. *citri* e o cancro cítrico

Xanthomonas citri pv. *citri* 306 (*X. citri*) pertence ao Reino Monera, Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales, Família Xanthomonadaceae e gênero *Xanthomonas*. Caracteriza-se por ser gram-negativa com flagelo polar, aeróbica quimiotrófica estrita que possui o oxigênio (O₂) como aceptor final de elétrons. Utiliza açúcares concentrados nas plantas como glicose, sacarose, frutose, xilose e galactose como fontes de carbono (KIM et al., 2004; TUNG; KUO, 1999). Suas colônias são usualmente amarelas como resultado da produção do pigmento conhecido como xantomonadina e sua temperatura ótima de crescimento é 28 a 30 °C (DAS, 2003).

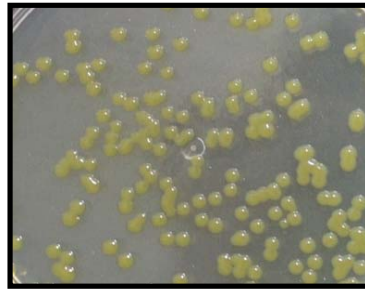


Figura 1 - Colônias isoladas de *X. citri*. O aspecto mucoso a coloração amarelada característica é devida à produção da goma xantana. Crescimento em meio de cultivo LB sólido durante 22 horas a 30 °C.

Essa bactéria é um importante fitopatógeno causador do cancro cítrico, doença que afeta plantas de citros. Plantas infectadas apresentam aspecto deteriorado uma vez que a *X. citri* causa lesões em folhas, caules e frutos. Em particular, nos frutos, a infecção leva ao crescimento reduzido, perda de sabor e redução na produção do suco de laranja. Estas características inviabilizam a utilização destes para a exportação o que leva à perdas econômicas significativas uma vez que o Brasil é o segundo maior exportador mundial nessa categoria (FUNDECITRUS, 2011).

O cancro cítrico é uma doença originária do continente asiático que se tornou endêmica em países da América do Sul como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, a doença foi reportada primeiramente em 1957 na região de Presidente Prudente e chegou a atingir a região nobre da citricultura paulista, em 1979 (FUNDECITRUS, 2011). No geral, a infecção no citros não é algo uniforme e se manifesta com o desenvolvimento da planta e em estações climáticas mais quentes. Embora a via de entrada da bactéria na planta seja a folha, os frutos são mais susceptíveis ao cancro e onde a doença se manifesta de forma mais severa (STALL; SEYMOUR, 1983). Existem três diferentes tipos de cancro cítrico causado por variantes de *X. citri*. Nosso grupo estuda o patovar *citri*, responsável pela cancrose mais severa ou tipo A (DAS, 2003). Por conta da grande difusão de *X. citri* nos pomares de diferentes espécies de citros, grandes investimentos anuais são feitos na tentativa de prevenir sua propagação e descobrir sua fisiopatologia.

A principal característica da cancrose é a hiperplasia do tecido vegetal que ocorre nos primeiros 10 dias após a invasão do estômato da planta pela bactéria (Figura 2). *X. citri* causa pequenas lesões circulares como pequeninas pústulas amareladas e brancas que apresentam um progressivo escurecimento. A partir deste estado, as lesões tornam-se rodeadas por água que pode ou não desaparecer no decorrer da patologia vegetal. Além disso, a bactéria passa a produzir polissacarídeos que permitem sua aderência e sobrevida no hospedeiro local. Sabe-se também que *X. citri* necessita de uma temperatura ótima para a invasão no tecido vegetal e, que sob condições tropicais, tende a continuar à margem das lesões (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DAS, 2003; GRAHAM et al., 2004). Neste ciclo de infecção é que a bactéria se torna endêmica permanecendo no local das infecções antigas, de forma a facilitar a propagação para outras áreas e a disseminação através da manipulação humana e veiculação hídrica (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

O genoma de *X. citri*, bem como os dois plasmídeos adicionais que ela possui, foram elucidados em 2002 por da Silva e colaboradores, numa parceria com o Fundo de Defesa da Citricultura de São Paulo (FUNDECITRUS), com o objetivo de obtenção de maior quantidade de informações sobre seu metabolismo e fisiologia. A importância da compreensão do mecanismo de infecção e patogênese, bem como de fatores

relevantes para este processo, possibilita o desenvolvimento de ferramentas para controle e prevenção do cancro. Resultados baseados em estudos de outras espécies do gênero têm revelado que aproximadamente 50 a 100 genes estão direta ou indiretamente relacionados com a capacidade das bactérias causarem doenças em plantas. Esses genes codificam, em sua maioria, proteínas que se localizam no envoltório celular ou são secretadas para o meio extracelular. O envoltório representa, portanto, um dos componentes celulares mais importantes envolvidos na patogenicidade e na evasão de sistemas de defesa do hospedeiro (DA SILVA et al., 2002).

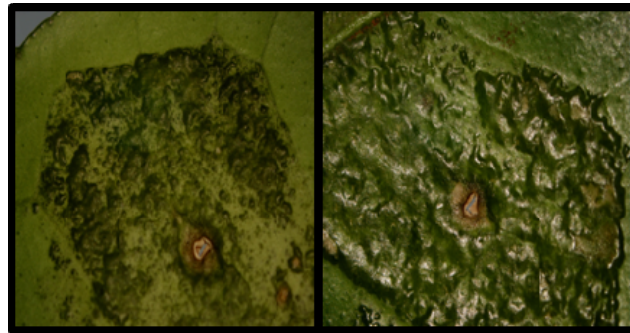


Figura 2 - Fenótipo de infecção de folhas de *Citrus sinensis* e cancrose provocada por *X. citri* após 14 dias de infecção. Aumento de 10X e 20X, respectivamente.

Tais grupamentos genicos, denominados *hrp* (*hipesensitive response and pathogenicity*), são responsáveis por codificar os sistema de secreção do tipo III essencial para patogenicidade e virulência bacteriana (GHOSH, 2004; GOTTIG et al., 2005). Estes foram primeiramente identificados em *Pseudomonas syringae* (LINDGREN, 1997) os quais mostram interações bactéria-planta a partir de sinais da última como disponibilidade de nutrientes, pH . Esses genes são responsáveis pela interação das células procarióticas dos hospedeiros e seus hospedeiros eucariontes. Para que tal interação aconteça foi identificado o sistema de secreção do tipo III sendo este, responsável pela excreção dos fatores patogênicos (DANGL, 1994; GIJSEGEM; GENIN; BOUCHER, 1993; RAHME; MINDRINOS; PANOPOULOS, 1992). No gênero *Xanthomonas*, o primeiro organismo a ter o cluster *hrp* estudado foi *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ARLAT et al., 1991). Buttner e Bonas, 2010, mostraram através de revisão e análises de bioinformática a importância desses genes na

patogenicidade e infectividade de *X.citri*, identificando 24 efetores ou candidatos a efetores no genoma bacteriano. (BUTTNER; BONAS, 2010).

A análise comparativa das sequências dos efetores de tipo III de *Xanthomonas* spp. revelou que as famílias de proteínas são conservadas e estes membros estão presentes em diferentes tipos de plantas e patógenos animais. Além disso, alguns efetores são homólogos às proteínas conhecidas atividades enzimáticas, tais como proteases de cisteína, fosfatases ou trans-glutaminases (GRANT et al., 2006; MUDGETT, 2005).

1.2 Os transportadores do tipo ABC

Os transportadores do tipo “ABC” (do inglês **A**TP-**B**inding **C**assete) são sistemas de transporte ativo constituintes de uma das maiores e mais importantes famílias de transportadores dependentes de ATP, distribuídos nos três domínios da vida, arqueas, bactérias e eucariotos. Podem reconhecer quase todo tipo de soluto de interesse biológico e sua importância fisiológica é decorrente do envolvimento no transporte de moléculas endógenas e, principalmente, da relevância em saúde pública, uma vez que são responsáveis por doenças como fibrose cística, doença de Tangier e no desenvolvimento do fenômeno de múltipla resistência à drogas em células cancerígenas e no tratamento de infecções microbianas (GOTTESMAN; AMBUDKAR, 2001).

Podem ser separados em dois grandes grupos: exportadores e importadores (exclusivos de procaríotos) (Figura 3A). A estrutura organizacional destes transportadores é formada por duas permeases que formam o poro de passagem na membrana, duas ATPases que geram energia para o transporte, e no caso de importadores, uma proteína periplasmática responsável pela captação do substrato (Figura 3) (DAVIDSON et al., 2008). Tais proteínas são responsáveis pela captação de diversas biomoléculas como açúcares, aminoácidos, peptídeos e íons inorgânicos e direcionamento das mesmas até o respectivo transportador na membrana (KUBENA et al., 1986; JACOBSON; QIOCHO, 1988; SACK et al., 1989). Apesar de pouca identidade seqüencial, compartilham suas estruturas terciárias consistindo de dois domínios

interligados por uma alça, que formam uma fenda para interação com o ligante. Na presença do ligante específico essas proteínas sofrem mudanças conformacionais decorrentes do fechamento dos domínios para acomodação do substrato no sitio de ligação (KUBENA et al., 1986).

As permeases, compostas por dois domínios transmembrana (TMD) (03B), são os domínios de menor conservação, podendo ser formadas de 6 a 20 hélices transmembrana na organização homo ou heterodimérica (YOUNG ; HOLLAND, 1999). Por outro lado, as ATPases são os componentes mais conservados, com domínios e motivos bem característicos que podem ser usados para a identificação dos transportadores em genomas (DAVIDSON et al., 2008).

Várias classificações de transportadores do tipo importador são conhecidas mas a mais recente baseia-se nas características estruturais (LOCHER, 2009), onde os transportadores do tipo I apresentam de 5 a 8 hélices em cada subunidade e transportam moléculas pequenas como íons e aminoácidos, e os transportadores do tipo II apresentam 10 hélices em cada domínio transmembranico e são responsáveis pela captação de grandes moléculas como metais chelantes e vitaminas.

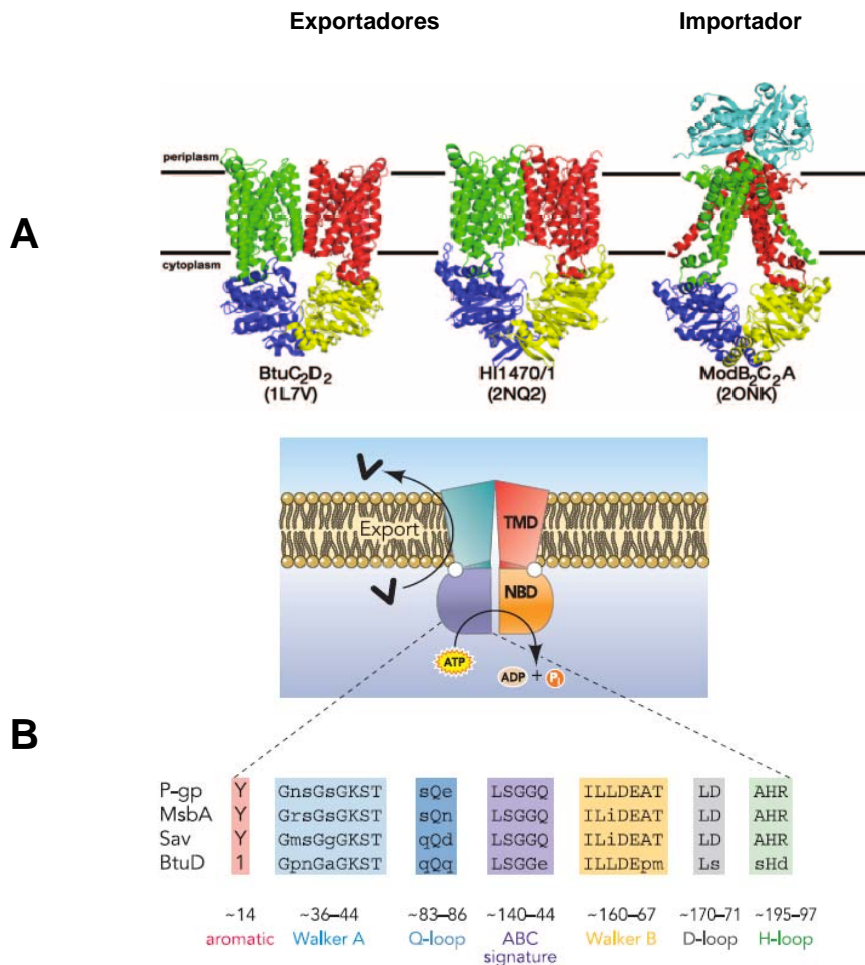


Figura 3 - Representação dos transportadores do tipo ABC. **A)** Destaque das regiões conservadas nos domínios ligadores de nucleotídeos **B)** Estão esquematizados os domínios TMD e NBD indicando a importância da hidrólise de ATP para a realização do transporte. No alinhamento estão indicados os motivos correspondentes à regiões conservadas dos transportadores ABC.
 Fonte: Retirado de Davidson et al., 2007 e Linton, 2007.

O mecanismo de transporte ainda não é completamente conhecido mas é sabido que a proteína periplasmática tem papel fundamental, uma vez que a interação destas na forma ligada com os componentes de membrana leva à sinalização e modificações conformacionais que ativam as ATPases, conhecidos como domínios ligadores de nucleotídeos (NBD), para a hidrólise do ATP e início do transporte (DAVIDSON et al., 2008).

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 encontrados, assim como bactérias ambientais e de vida extracelular também apresentam maior número desses componentes (HARLAND et al., 2005). Curiosamente notou-se que 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 de suma importância para adaptação dos organismos em seus nichos específicos.

O papel de transportadores ABC na infectividade e patogênese bacteriana tem sido extensivamente estudado. Esses papéis estão relacionados com evasão, resistência ao hospedeiro, fatores de superfície celular e excreção, auxílio na captação de nutrientes, entre outros (LEWIS; WEEN; MCDEVITT, 2012). O conhecimento detalhado de etapas do transporte e atividade pode fazer dos transportadores alvos úteis para a terapêutica antimicrobiana, o desenvolvimento de vacinas e defensivos agrícolas (KEMNER; LIANG; NESTER, 1997; LEWIS; WEEN; MCDEVITT, 2012; LI et al., 2011).

A primeira descrição da contribuição de um gene de transportador ABC 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 minossacarídeos que ocorrem na planta (KEMNER; LIANG; NESTER, 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). Sabe-se que a aquisição de enxofre e compostos sulfonados também é essencial para o desenvolvimento de doenças e patogênese (BOGDAN et al., 2001; EJIM et al., 2004; LESTRATE et al., 2000; SENARATNE et al., 2006; YANG et al., 2002).

Baseado nas análises proteômicas realizadas por Soares e colaboradores (2010), identificaram-se os transportadores que foram ativados durante o processo de infecção em plantas de laranja doce. A Figura 4 mostra o resultado destas análises. Dos 87 transportadores do tipo importadores somente 28 são ativos durante a infecção

e dos 32 exportadores, 14 foram identificados como expressos. Inclui, o componente periplasmático Sbp foi identificado nesse estudo (SOARES et al., 2010).

Mecanismos de inibição de proteínas associadas à via de captação ou assimilação de sulfato e enxofre podem caracterizar-se em estratégias interessantes para o controle de microrganismos patogênicos. Como exemplo, baseados na importância desta via em *Mycobacterium tuberculosis* (BHAVE; MUSE; CARROLL, 2007), nosso grupo tem estudado seus componentes para o desenvolvimento de inibidores e novas drogas (FESSEL; BALAN, em preparação).

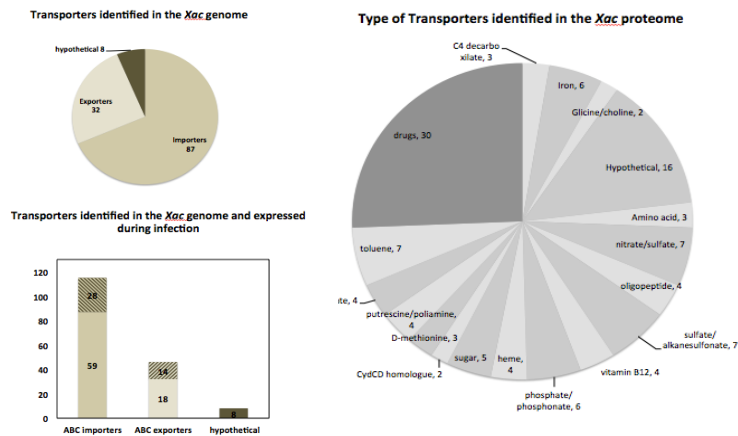


Figura 4 - Análise estatística dos Transportadores do tipo ABC identificados no genoma de *X. citri* e no proteoma da bactéria (SOARES et al., 2010) durante infecção em plantas de citros que serão usados como alvo nesse trabalho.

1.3 Metabolismo de enxofre e o regulon *cys*

Como mencionado anteriormente, o enxofre é um elemento essencial para o desenvolvimento de doenças e patogênese, bem como para a vida (SENARATNE et al., 2006). Bactérias, fungos e plantas utilizam-se do sulfato como fonte de enxofre para síntese de vários compostos incluindo os aminoácidos cisteína e metionina. Na sua forma reduzida, o enxofre é usado na biossíntese de metionina e cisteína. Cisteína é incorporada em moléculas como proteínas, coenzimas e outras. Em *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus subtilis* (GUILLOUARD et al., 2002), a assimilação do

enxofre pode ocorrer pelas vias de captação de sulfato, tiosulfato, alcano sulfonatos e sulfonatos alifáticos, cujos 26 genes correspondentes pertencem ao regulon *cys* (Figura 5) (EICHHORN; VAN DER PLOEG, 2002; KERTESZ, 1999; STEC et al., 2006).

Em situações na qual o enxofre inorgânico ou sulfato são abundantes, o sistema de captação ativado é o transportador do tipo ABC de sulfatos (SO_4^{2-}), cuja proteína ligadora Sbp leva o composto até a proteína de membrana para que este seja translocado ao citoplasma (Figura 5). A Sbp tem alta afinidade pelo sulfato conforme demonstra sua constante de dissociação (K_d) na faixa de nanomolar (HE; QUIOCHO, 1991). A inibição do transporte é efetuada por sulfito, selenito, selenato, cromato e molibdato, sendo que os últimos podem ser transportados por transportadores específicos. A análise do genoma de diferentes microrganismos tem mostrado que os genes envolvidos com a captação de sulfato são conservados em uma ampla faixa de organismos, incluindo nas espécies de *X. citri*, *X. campestris* pv. *campestris* e *Xyllela fastidiosa*. Segundo a organização do regulon *cys*, caracterizado em *E. coli*, após a incorporação do sulfato ou tiosulfato pelo transportador SbpCysTWA, as proteínas citoplasmáticas CysD, CysN, CysC, CysH, CysI, CysJ, CysK, CysM e CysG são responsáveis pela oxidação e redução do enxofre a sulfito.

Na limitação de cisteína, sulfato ou tiosulfato, duas outras vias alternativas podem ser ativadas: a via de transporte de alcano sulfonatos ($R\text{-C-SO}_3^-$) através do operon *ssu* (Sulfonate-Sulfur Utilization) (Figura 5), seguida pela via de transporte de taurina ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$) pelo operon *tau* (Taurine-Sulfur Utilization) (Figura 5) (STEC et al., 2006). Neste transporte, as proteínas ligadoras são SsuA e TauA, respectivamente. As proteínas SsuB/TauB são responsáveis pela hidrólise do ATP e SsuC/TauC são as proteínas formadoras de poros de membrana, respectivamente (EICHHORN; VAN DER PLOEG, 2002; VAN DER PLOEG et al., 1999).

A regulação dos operons *ssu* e *tau* é realizada por duas proteínas do regulon *cys* (CysB e Cbl), da família de ativadores transcricionais LysR, que se ligam à região promotora dos operons. A proteína CysB possui dois repressores, cisteína e tiosulfato, (EICHHORN; VAN DER PLOEG, 2002). A ausência da proteína Cbl na célula faz com que as proteínas TauD, SsuE e SsuD não sejam sintetizadas (KERTESZ, 1999; VAN DER PLOEG et al., 1999).

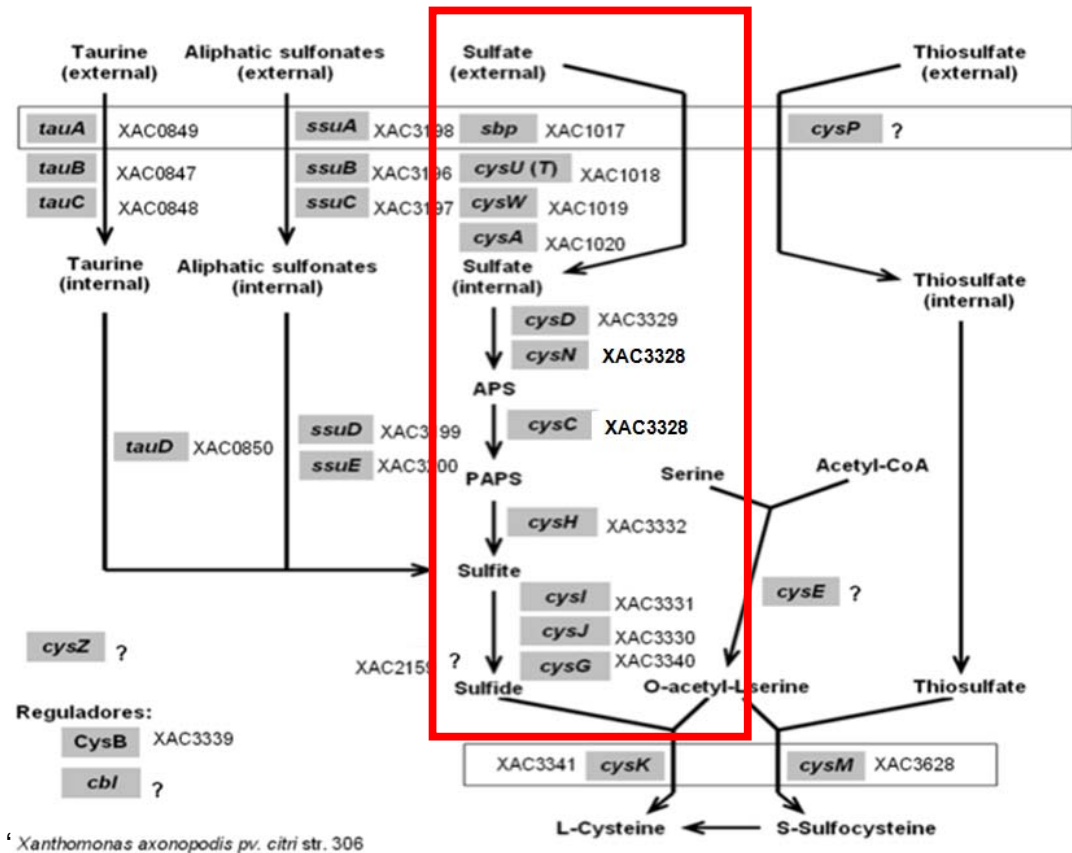


Figura 5 - Genes pertencentes ao regulon *cys* caracterizado em *Escherichia coli* K12 (caixa cinza). Os genes anotados lateralmente seriam os correspondentes encontrados em *X. citri*. Os pontos de interrogação mostram ortólogos que apresentaram baixa identidade de sequência. A caixa vermelha mostra os genes envolvidos na via de assimilação e transformação do sulfato em sulfite.

Nos estudos realizados pelo nosso grupo, todas as proteínas envolvidas neste regulon foram identificadas em *X. citri*, inclusive um dos reguladores (Figura 5). O papel deste regulon ou de seus componentes, contudo ainda não foi estabelecido e não existem trabalhos relacionados à captação de sulfato ou sulfonatos em *X. citri*. Estudos realizados pelo nosso grupo com as proteínas periplasmáticas do sistema transportador de alcanosulfonatos e sulfonatos alifáticos, tanto do ponto de vista estrutural como funcional através da obtenção de mutantes de *X. citri* deletados para estes genes, tem revelado que tanto a SsuA (ARAÚJO et al., submetido) como a NrtA (dados não publicados) são fundamentais para o desenvolvimento do cancro e para a produção de goma xantana, um dos componentes relacionados à patogenicidade da bactéria.

Neste trabalho, pretendemos dar o primeiro passo para o preenchimento desta lacuna, estudando as proteínas da via de captação de sulfatos em *X. citri*, de forma a caracterizar as funções de cada uma, entender os mecanismos de atividade, os substrato e regiões de interação. Este projeto permite a caracterização de possíveis alvos para o desenvolvimento de estratégias de contenção deste microrganismo, baseadas na inibição de uma via importante.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto foi caracterizar funcional e estruturalmente as proteínas pertencentes ao sistema de transporte e assimilação de sulfato de *X. citri*. Para tal foram realizados os seguintes objetivos parciais:

- análises de bioinformática e filogenia das proteínas envolvidas na via de captação e assimilação de sulfato;
- clonagem dos genes codificadores da proteína ligadora periplasmática Sbp, da ATPase CysA, e das enzimas CysD, CysN, CysC, CysH, CysI, CysJ e CysG de *X. citri*, em vetor de clonagem pET28a (Novagen);
- expressão e testes de solubilidade das proteínas;
- purificação da proteína Sbp expressa na forma solúvel por cromatografia de afinidade a metal e filtração em gel;
- caracterização funcional e estrutural da Sbp por métodos espectroscópicos;
- análise da expressão das proteínas da via de síntese de cisteína em diferentes condições de cultivo, usando ensaios de proteômica;
- análise da ativação do operon do transportador ABC de sulfato *sbpcysWUA* in vitro e in vivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação e caracterização das proteínas por bioinformática

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos das proteínas de interesse foram obtidas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A busca por ortólogos das proteínas e sequências foi feita com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e KEGG2, do Instituto Central de Bioinformática para investigação em Química da Universidade de Kyoto (www.genome.jp).

3.2 Modelagem molecular das proteínas por homologia

Para a construção dos modelos das estruturas tridimensionais das proteínas da via de captação e assimilação de sulfato, as sequências das proteínas a serem modeladas foram submetidas ao BLASTp X PDB para identificação de estruturas que pudessem ser usadas como moldes. A partir da identificação de uma ou mais estruturas, as sequências de aminoácidos foram alinhadas usando o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/.../clustalw2) e o alinhamento em formato .pir foi usado como um dos arquivos de entrada para a construção do modelo utilizando o programa Modeller (SALI; BLUNDELL, 1993). No caso de modelos com baixa identidade de sequências com a proteína de interesse, também utilizamos o servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para a construção de alguns dos modelos e comparação com os modelos gerados pelo Modeller.

3.3 Construção da árvore filogenética

Para verificar como ocorreu a evolução do operon de captação e assimilação de sulfato em *X. citri*, utilizamos como base uma árvore gerada a partir de sequências dos rRNAs de diferentes organismos provenientes de variadas famílias, obtidas a partir da enciclopédia de genes e genomas KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). A partir da

árvore filogenética, a presença ou ausência dos genes da via de captação e assimilação de sulfato foram relacionadas. A construção da árvore foi realizada utilizando-se o Neighbour Joining no programa MEGA 5 (www.megasoftware.net).

3.4 Crescimento de *X. citri* em diferentes meios de cultivos

Células de *X. citri* selvagem foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) sem sal com antibiótico ampicilina por aproximadamente 24 horas. As culturas foram centrifugadas, lavadas em água tipo MilliQ estéril e inoculadas em meio LB sem sal, meio Mínimo M9 (2 mM de Sulfato), M9 com metade da concentração de sulfato (1 mM de Sulfato), M9 meio sulfato e meio XAM1 (3.8 mM de Sulfatos), que mimetiza o ambiente da folha (LAIA, 2007). As culturas foram crescidas durante 72 horas a 30 °C com 180 rpm de agitação.

3.5 Extração de RNA e construção de cDNA

Células provenientes de 1 mL de culturas bacterianas crescidas nos meios LB e M9 foram centrifugadas e submetidas à extração do RNA com o conjunto de reagentes "*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™ Reverse Transcription System* (Promega), também seguindo as instruções do fabricante.

3.6 Extração de proteínas totais

As células provenientes dos vários meios de cultura foram ressuspensas em tampão Tris-Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, aquecidas a 70 °C por 30 minutos para, em seguida, serem submetidas à sonicação por 1 minuto com pulsos e intervalos de 15 segundos na amplitude de 20 %. O extrato foi centrifugado a 21.000 g por 30 minutos. As proteínas quantificadas pelo método de Bradford (1976) para aplicação de 100 ug

em gel de SDS-PAGE 12 %. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de comassie e cortado em sete bandas (14 kDa a 126 kDa) submetidas à clivagem com tripsina seguindo o protocolo de digestão *in gel* do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio (PAES LEME et al., 2008).

3.7 Quantificação das proteínas totais

Os extratos de proteínas periplasmáticas foram quantificados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Dois microlitros das amostras diluídos em 98 uL de água milli-Q são adicionados ao reagente de Bradford (previamente diluído 2:3), de forma que fiquem dentro da faixa de absorbância obtida com a curva padrão. A curva padrão é feita com concentrações conhecidas de albumina de soro bovina (BSA). Após misturar as amostras diluídas e o reagente de Bradford também diluído, deixou-se a reação acontecer por 10 minutos e então se mediu a absorbância. Os valores de absorbância foram plotados comparando-se com os obtidos na curva padrão, fornecendo assim a concentração de cada amostra.

3.8 Análise por espectrometria de massa (LC-MSMS)

As amostras dos extratos de *X. citri* obtidos foram injetadas automaticamente em coluna C18 (100 µm x 100 mm) (Waters, California, CA, USA) no nano *Acquity Ultra Performance LC* (Waters) acoplado à uma interface de ESI nanospray no espectrômetro de massa Q-ToF Ultima (Waters). Os peptídeos foram eluídos da coluna com gradiente de 2-98% de acetonitrila durante 45 minutos sob fluxo de 0,6 µl/min.

3.9 Análise dos dados de espectrometria de massa

Os arquivos de dados gerados pelo Q-ToF foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3, 2009 (Matrix Science, Boston, MA, USA). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3 (Matrix Science), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de

carbamidometilação, modificações variáveis de oxidação da metionina, 0,1 Da de tolerância de massas para precursores e 0,1 Da de tolerância de massas para fragmentos. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Os dados da busca do Mascot foram organizados pelo programa Scaffold.

3.10 Confecção e ensaios com gene repórter para o promotor do transportador de sulfato

Primeiramente foi realizada a identificação da região promotora do óperon do transportador de sulfato a partir do banco de dados KEGG. A partir de então foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 1) para amplificação de um fragmento com cobertura de aproximadamente 1 kb da região à montante do início do operon.

Tabela 1 - Desenho dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região promotora.

Promotor	Tamanho	Primer	Seqüência
p1017	776 bp	F_p1017_Apal	5'- GGGCC ATGTACCAGCGCGTTGTATTTGCG-3'
		R_p1017_Ncol	5'- CA TGG AACGGAAACGGGAATATGTCACGACG-3'

As seqüências de clonagem e subclonagem no vetor pKX33 de *X. citri* foram realizadas conforme Vanini e colaboradores (2008) e os vetores utilizados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Celso Benedetti do LNBio.

A reação de PCR realizada para amplificação foi a mesma descrita na seção 5.12. De posse da região promotora amplificada (p1017), a mesma foi ligada no vetor de clonagem pGEM (Promega) e seguida submetida à transformação bacteriana conforme seções 3.13 e 3.14, respectivamente. O segundo vetor a ser utilizado para subclonagem foi o pGEM portador do gene *EGFP*, previamente utilizado por Barbosa e Benedetti (2007). Após a inserção do fragmento de interesse neste vetor, obtivemos a construção fragmento do promotor (p1017) à montante do gene da proteína EGFP, para sua regulação. Posteriormente, o fragmento contendo p1017-EGFP foi clivado com as enzimas de restrição *Apal* e *NotI* e ligado no vetor pBlueScript, também previamente clivado com as mesmas enzimas. Para a subclonagem final, o referido fragmento foi

ainda retirado do vetor pBlueScript com as enzimas *KpnI* e *SacI*, e inserido no vetor pKX33, também digerido com essas enzimas. Uma vez obtida a construção pKX33/p1017-eGFP tornou-se possível a transformação de *X. citri*, dando início aos experimentos de análise *in vitro* e infecção da planta. Vale ressaltar que em cada uma dessas etapas os vetores construídos foram utilizados para transformação de *E. coli* DH5 α e as colônias selecionadas foram submetidas à uma varredura de clones por PCR de colônia para confirmar a presença dos insertos, seguido de seqüenciamento, conforme descrito posteriormente nos ensaios de clonagem molecular.

As células de *X. citri* competentes foram transformadas por choque térmico para inserção do vetor pKX33/p1017-EGFP. As células de *X. citri* transformadas foram selecionadas para resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina.

De posse da bactéria transformada contendo o vetor alvo, e da bactéria selvagem como controle, as mesmas foram inoculadas em meio LB por 24 horas. Posteriormente, as mesmas foram visualizadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 (Nikon, Melville, NY, USA) para análise qualitativa do experimento. Para tal análise, optou-se pela quantificação por fluorimetria que fornece valores de RFU (*relative fluorescence units*) que servem de referência para análise da expressão do promotor *in vitro*. Para quantificação desses, a fluorescência no período de 24 horas, o protocolo para análise fluorimétrica foi adaptado de Drew e colaboradores (2006). Primeiramente, nos tempos 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 21 h foram coletados 1 mL de cultura bacteriana dos quais 100 μ L foram utilizados para leitura da O.D. em placa e os 900 μ L restantes foram centrifugados a 12000 g. O pellet foi ressuspenso em 100 μ L de água tipo MiliQ e o material empregado para determinação da intensidade de fluorescência com excitação em 485 nm e emissão em 512 nm, em fluorímetro de placas EnSpire, Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Todas as amostras preparadas foram colocadas em uma placa de 96 poços, e então medidas no fluorímetro de placas EnSpire® (Perkin Elmer), no qual se observou diferenças apenas em relação à intensidade de fluorescência, justificada pelo diferentes volumes iniciais utilizados.

Já para o ensaio *in vivo*, *X. citri* e *X. citri* transformada com o plasmídeo pKX33/p1017-EGFP foram semeadas em meio de cultura sólido LB sem NaCl, na

presença de ampicilina e ampicilina+canamicina, respectivamente. Após 72 horas de incubação a 30 °C, colônias foram coletadas e ressuspendidas em água deionizada autoclavada para uma densidade óptica de 0,3 a 600 nm, equivalente à cerca de 10⁸ UFC/mL. Em seguida, as suspensões de bactérias foram infiltradas separadamente em diferentes folhas de laranja (*Citrus sinensis*). Após períodos de tempo indicados nas figuras, folhas foram coletadas, picotadas e incubadas com 3 mL de água, por 30 min. A suspensão, contendo as bactérias, foi centrifugada a 11800 g em microtubos numa centrífuga Eppendorf, e concentrada para ~150 µL, baseado em metodologia descrita por Vanini et al., 2008. Esse material foi empregado para determinação da intensidade fluorescência com excitação em 485 nm e emissão em 512 nm, em fluorímetro de placas EnSpire, Multimode Plate Reader (Perkim Elmer) e para quantificação de proteínas, pelo método de Bradford, com albumina bovina sérica como padrão. Para obtenção dos valores normalizados, fluorescência/proteína, para cada ponto analisado, as intensidades de fluorescência, em unidades arbitrárias (u.a.), foram divididas pelo valor da concentração de proteínas, em mg/mL. Alíquotas das suspensões bacterianas isoladas das folhas foram, ainda, analisadas por microscopia de fluorescência em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 com sistema de captura de Cool SNAP_Proc (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

3.11 Extração de DNA genômico de *X. citri*

Culturas bacterianas crescidas em 3 mL de meio LB (sem NaCl e com ampicilina a 0.1 mg/mL) sob agitação (200 rpm) a 30 °C durante à noite foram coletas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos e ressuspensas em tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, 0,5 % SDS, 2 % PVP). Foi adicionado 10 µL de Lisozima a 10 mg/ml. A suspensão foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 1 h. Após centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e adicionados 300 µL de isopropanol. O material foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por mais 1 h para precipitação do DNA total e centrifugado por 10 min a 13000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. Após a secagem do DNA, este foi ressuspenso em 100

μ L de água. Posteriormente, o DNA genômico foi purificado através do kit comercial da Qiagen® PCR purification (Qiagen, California, CA, USA) para livrar a amostra de contaminantes e tratado com 5 μ L de RNase 10 mg/ml por 20 min a 37 °C e inativada a 65 °C durante 5 min.

3.12 Amplificação dos genes *sbp*, *cysUT*, *cysW*, *cysA*, *cysD*, *cysNC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ* e *cysG*

Para amplificação dos genes de interesse, os oligonucleotídeos inicial e final (Tabela 2) foram desenhados a partir das sequências gênicas disponibilizadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram adicionadas de sítios de restrição na região inicial e final do gene para sub-clonagem no vetor de expressão pET28a. Apenas o gene *sbp* foi clonado sem os 72 primeiros nucleotídeos que correspondem ao peptídeo sinal da proteína, uma vez que o objetivo é a produção da proteína recombinante no citoplasma bacteriano do hospedeiro.

A reação de amplificação utilizada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) está descrita na Tabela 3.

As reações de PCR foram visualizadas através de gel de agarose 0.8% com brometo de etídio e sistema de fotodocumentação Kodak. Após confirmação do êxito da reação a mesma foi purificada com Kit de purificação de PCR da Qiagen.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos inicial e final com a exibição dos sítios de restrição acrescentados aos genes.

Genes/ Sítios	Sequência de Nucleotídeos	
SBP BamHI/Hi	F	5' GGT GGA TCC TTG CTG GTC C 3'
	R	5' AAG CTT TTA CTT GTT CGG CTG 3'
CysD Nde I / Eco RI	F	5' CAT ATG ACT CTG CCG CC 3'
	R	5' GAA TTC TCA GAA ATA CCC C 3'
CysNC NdeI/BamHI	F	5' CAT ATG GGC AGC GAA TGG 3'
	R	5' GGA TCC TTA GCG TTG CAG 3'
CysI Nde I / Eco RI	F	5' CAT ATG AGC CAC TCC GTC 3'
	R	5' GAA TTC TCA TGC GAG CAA 3'
CysH Nde I / Eco RI	F	5' CAT ATG ACC GCG CTG CCT 3'
	R	5' GAA TTC CTA GAT ATC TTC GTG 3'
CysJ NdeI/ BamHI	F	5' CAT ATG ACC GCC GCC AGT 3'
	R	5' GGA TCC CTA ATA GAC ATC TC 3'
CysG1 Nde I / Eco RI	F	5' CAT ATG CCG TTG TTC CCG 3'
	R	5' GAA TTC CTA GCG GAG CGG 3'
CysG2 NdeI/ BamHI	F	5' CAT ATG AAG TCA TTT CCG ACG G 3'
	R	5' GGA TCC TCA GGC TGC GTG 3'

Tabela 3 - Reação de amplificação

Reagentes	Volume
DNA Genômico/ 200ng	1.4 uL
Tampão 10x	5 uL
Cloreto de Magnésio/50mM	2 uL
DNTP mix/ 2mM	4 uL
Primer F 10pmol	2 uL
Primer R 10pmol	2 uL
DMSO/-	4 uL
Taq Dna Polimerase / 5U/uL	0.5uL
H2O Milliq	29.1uL
Reação Final	50 uL

3.13 Ligação no vetor de clonagem pGem® T-Easy

Após o produto da PCR ter sua quantidade dosada em espectrofotômetro Nanodrop, seguiu-se à reação de ligação conforme instruções do fabricante. A reação foi realizada a 16 °C durante 18 horas.

3.14 Transformação de células de *E. coli* a partir do método de choque térmico, e confirmação do inserto no vetor de clonagem

As células de *E. coli* contendo pGEM+fragmento PCR foram transformadas segundo Sambrook e colaboradores (2001), (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001). As colônias crescidas em placa de meio LB após 18 horas de incubação tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos e analisados quanto à presença do inserto através de clivagem com enzimas de restrição específicas. Todas as reações foram realizadas separadamente devido à incompatibilidade dos tampões enzimáticos. As reações foram realizadas de acordo com instruções dos fabricantes das enzimas. As clonagens foram confirmadas em gel de agarose a 0.8% e os plasmídios os quais liberavam um inserto após a análise de restrição foram sequenciadas para verificação de mutações.

3.15 Sub-clonagem no vetor de expressão pET28a

Para a sub-clonagem no vetor de expressão pET28a, os insertos foram clivados do pGEM-Teasy utilizando enzimas de restrição de acordo com os sítios inseridos nos oligonucleotídeos de cada construção (Tabela 1). Para a clivagem dos vetores de expressão e dos fragmentos em pGEM-Teasy foram utilizados 500 ng do vetor, 1 µg do inserto, 20 unidades de cada enzima do sítio de clonagem e tampão específico para enzimas. As reações foram mantidas em banho seco a 37 °C por 2 horas. Após análise em gel de agarose 0.8%, os fragmentos e os vetores foram purificados de acordo as instruções do *Kit Gel Extraction da Qiagen*. A ligação dos insertos no vetores de expressão digerido foi feita utilizando a proporção 2:1 (inserto:vetor), 5 unidades/µL da enzima T4 DNA ligase e tampão específico da enzima a 16 °C *overnight*. Para a confirmação das construções e análise de sua seqüência, foi realizado um seqüenciamento automático tendo como iniciadores os oligonucleotídeos do vetor.

3.16 Indução, extração e purificação das proteínas recombinantes Sbp e CysD de *X. citri*

Cepas de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformados com os clones confirmados por seqüenciamento. As condições iniciais estabelecidas para a produção das proteínas recombinantes foram meio LB, 200 rpm, IPTG 0,1 mM e 2 horas de indução a 37 °C. A extração das proteínas da fração solúvel foi realizada com 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% triton X-100 e 50 mM, NaCl. As amostras foram sonicadas por 5 min com intervalos de 30 segundos e centrifugadas por 40 minutos a 4 °C na velocidade de 21.700 *g*. A purificação das proteínas a partir dos extratos solúveis foi realizada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado em coluna Histrap (GE, Califórnia, CA, USA) de 5 mL no aparelho AKTA FPLC (GE). A eluição das proteínas foi analisada em gradiente de imidazol de 0 mM à 1M acompanhados de Tris-Cl 10mM pH 8.0 e NaCl 500 mM. A análise da expressão das proteínas e purificação foram realizadas através de SDS-PAGE 12 %. Nos testes de produção da proteína CysD a mesma se mostrou insolúvel em todas as condições e os experimentos de caracterização foram realizados apenas com a proteína periplasmática Sbp.

3.17 Dicroísmo circular

Foram realizados experimentos de Dicroísmo Circular (CD) para acessar informações sobre o enovelamento da proteína, fornecendo dados preliminares sobre a estrutura secundária e as propriedades dinâmicas da mesma. Os espectros para análise da estrutura secundária foram realizados com a amostra a 5 µM e as leituras foram feitas na faixa de 260 a 200 nm no espectropolarímetro Jasco J-180 (JASCO, Easton, MD USA), no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do LNBio. O equipamento contém um módulo de Peltier para o controle da temperatura. Os dados foram coletados com uma varredura de 50 nm/min com 20 acumulações para a amostra e 10 acumulações para o tampão. O aumento da temperatura para a desnaturação ocorreu de 10 °C a 103 °C a uma taxa de 1 °C/min. Os dados foram analisados e tratados no programa *OriginPro 8*.

3.18 Espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* - DLS) da proteína Sbp

DLS fornece informações sobre o raio hidrodinâmico da proteína e monodispersividade populacional (homogeneidade estrutural) a qual tem sido demonstrada como essencial para o sucesso dos ensaios de cristalização (WÄRDELL; JAKOBSSON; NILSSON, 1993). As análises foram realizadas a 18 °C, utilizando 70 µL da amostra com pelo menos 1 mg/mL de concentração.

3.19 Testes de cristalização da proteína Sbp

Foram testados seis kits iniciais comerciais disponíveis no laboratório de cristalização do LNBio. As placas de 96 poços foram montadas pelo robô *HoneyBee* (Formula Matrix, USA). Gotas contendo 1 µL da solução do poço foram equilibradas contra 1 µL da solução do poço por difusão de vapor usando-se método da gôta sentada (*sitting drop*). As placas foram incubadas a 18 °C. A visualização das placas foi feita por meio de lupas e a partir de fotos tiradas pelo robô Rock Imager (Formula Matrix) 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 gôta, diferenciando de um cristal de sal que não absorve a UV.

3.20 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da proteína Sbp na presença do ligante

Para os experimentos de ITC foram realizados vários testes preliminares para otimização das concentrações da proteína Sbp. A concentração ótima de proteína foi de 50 µM, titulada com 300 µL de Sulfato de Magnésio (200 µM). Os ensaios foram realizados a 15 °C usando o equipamento VP-ITC microcal no Laboratório de Calorimetria e Espectroscopia do LNBio. Ligante e proteína foram mantidos no mesmo tampão de 10 mM de Tris-HCL pH 8 e 50 mM de NaCl. Primeiramente, realizou-se

experimento de titulação do tampão para averiguar possíveis trocas de calor. A titulação foi feita com 27 injeções de ligante, sendo a primeira de 1 μL (0.66 μM) e as demais 3 μL (2 μM).

3.21 Irradiação e difração dos cristais de Sbp

Os dados cristalográficos da proteína SBP foram coletados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). O comprimento de onda da linha foi de 1.743 Å e os dados coletados o detector MARMOSAIC foi usado para gravar os dados com oscilação de $\Delta\varphi = 0.5^\circ$. Os cristais foram mantidos num fluxo de nitrogênio a 110 K para minimizar os danos da radiação. Soluções crioprotetoras como PEG400 e glicerol em várias concentrações foram testadas para evitar o congelamento dos cristais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor clareza dos resultados, os mesmos serão apresentados em três partes: parte I referente à caracterização através de bioinformática e conservação, parte II referente à funcionalidade do sistema e parte III, a caracterização da proteína SBP de *X. citri*.

PARTE I - CONSERVAÇÃO DA VIA DE SULFATO EM DIFERENTES ORGANISMOS, FILOGENIA E FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

4.1 Conservação da via de sulfato em diferentes organismos

As análises de bioinformática tiveram dois objetivos principais: (i) a identificação e caracterização funcional/estrutural das proteínas da via de assimilação de sulfato e redução a sulfito a partir da identificação de domínios, regiões de interação e sítios de ligação ao substrato e, (ii) a caracterização de possíveis enovelamentos e estados oligoméricos que pudessem ajudar nos experimentos de clonagem e expressão das mesmas.

A busca no genoma de *X. citri* por transportadores do tipo ABC, levou-nos à identificação de três grupamentos gênicos envolvidos com a assimilação de sulfato, alcanos sulfonatos e sulfatos éster, respectivamente discriminados: *sbpcysUTWA*, *ssuABCDE* e *tauABCD*. A via de entrada preferencial de enxofre na célula é através de íon inorgânico, tendo o sulfato como maior representante. As demais vias são ativadas na carência ou ausência total deste íon, mas levam, da mesma forma, à síntese de cisteína.

Em *E. coli*, os três transportadores pertencem ao regulon *cys*, que compreende, além destes, enzimas necessárias para a assimilação de sulfato, redução a sulfito e formação de cisteína (STEC et al., 2006). Utilizando a ferramenta BLASTp, cada gene do regulon *cys* de *E. coli* teve sua sequência alinhada com o genoma de *X. citri* para identificação de possíveis ortólogos. A Tabela 4 apresenta a lista de todas as proteínas

de *E. coli* usadas para o BLASTp e os respectivos ortólogos de *X. citri* identificados, com suas funções e principais características. Todos os genes da via de captação de sulfato e conversão a sulfito descritos em *E. coli* foram identificados em *X. citri*. Fica evidente que *X. citri* apresenta a via completa cujas proteínas apresentam alta identidade sequencial. Interessantemente, a proteína CysC de *X. citri* é fusionada à proteína CysN, o que não ocorre em *E. coli*. Identificar quais alterações funcionais são decorrentes desta fusão e quais as consequências para a via são perguntas interessantes que podem ser resolvidas através da caracterização das mesmas.

Tabela 4 - Comparação dos genes envolvidos na via de captação de sulfato em *X. citri* com os genes de *E. coli*, conforme resultado do BLASTp.

Proteína	Organismo				Identidade
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>		<i>Escherichia coli</i>		
	Gene	Função	Gene	Função	
SBP	xac1017	Ligadora de Sulfato	b3917	Ligadora de Sulfato	216/345 (62.6%)
CysU/T	xac1018	Permease Sulfato	b2424	Permease de Sulfato/Tiosulfato	137/288 (47.6%)
CysW	xac1019	Permease Sulfato	b2423	Permease de Sulfato/Tiosulfato	145/323 (44.9%)
CysA	xac1020	ATPase do transportador de Sulfato	b2422	ATPase do transportador de Sulfato/Tiosulfato	173/388 (44.6%)
CysD	xac3329	Sulfato adeniltransferase subunidade 2	b2752	Sulfato adeniltransferase subunidade 2	201/302 (66.6%)
CysN	xac3328	Bifuncional: Sulfato Adeniltransferase subunidade1/ AdenilSulfato Kinase	b2751	Sulfato Adeniltransferase Subunidade 1	238/500 (47.6%)
CysC	xac3328	Bifuncional: Sulfato Adeniltransferase subunidade1/ AdenilSulfato Kinase	b2750	Adenilsulfato kinase	116/181 (64.0%)
CysH	xac3332	Fosfoadenil fosfosulfato redutase	b2762	Fosfoadenil fosfosulfato redutase	147/252 (58.3%)
CysJ	xac3330	Sulfato redutase subunidade Alfa	b2764	Sulfato redutase subunidade Alfa	269/629 (42.8%)
CysG	xac2159	Siroheme sintetase	b3368	Bifuncional Siroheme sintetase/ Siroheme ferroquelatase	128/462 (27.7%)
	xac3340	Siroheme sintetase		185/511 (36.2%)	

****Nota:** Os números apresentados na coluna identidade referem-se ao número de aminoácidos idênticos sobre o total de aminoácidos alinhados, conforme o programa CLUSTAL <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. As porcentagens refletem a identidade sequencial da região alinhada.

De acordo com o que já vem sendo descrito para *E. coli* e *P. syringae* (MOUGOUS et al., 2006), a partir da captação e entrada do sulfato (SO_4^{-2}) até a formação de sulfeto, 13 genes estão envolvidos e organizados na forma de 3 operons principais (Figura 6). O primeiro operon codifica cinco genes correspondentes ao

transportador do tipo ABC (*sbp*, *cysU/T*, *cysW* e *cysA*), responsável pelo transporte do sulfato do periplasma para o citoplasma bacteriano; o segundo grupamento codifica dois genes, *cysNC* e *cysD*, cujos produtos efetuam a redução de sulfato à 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) tendo como intermediário a adenosina fosfosulfato APS; no terceiro, *cysHIJ*, *cysH* codifica a fosfoadenosina fosfosulfato redutase (CysH) que é responsável pela conversão de PAPS a sulfito, e *cysI* e *cysJ* codificam duas subunidades de uma sulfito redutase que vai converter sulfito em sulfeto. CysI e CysJ formam uma mesma enzima na qual CysI corresponde à subunidade beta e CysJ à subunidade alfa.

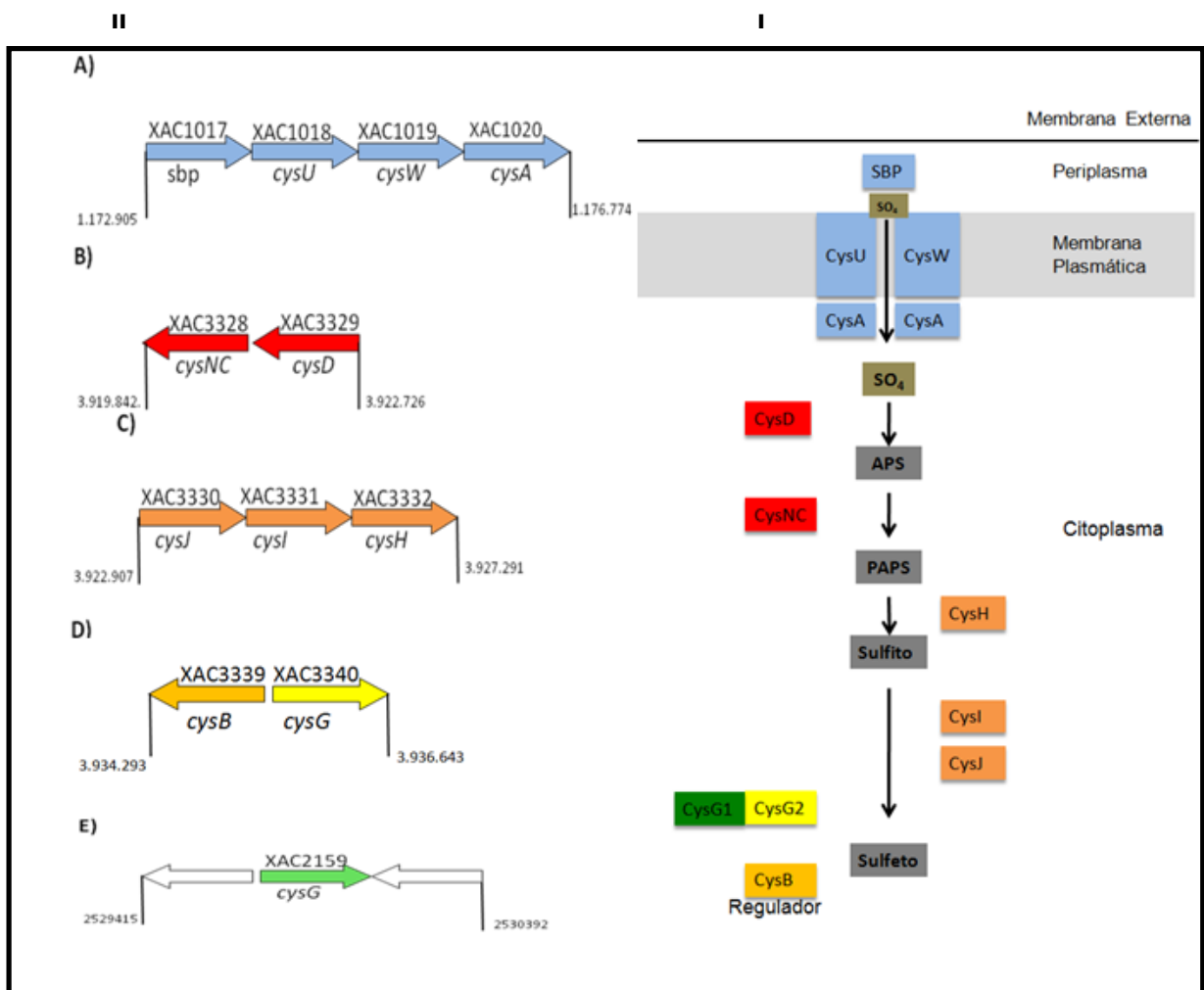


Figura 6 - Grupamentos gênicos (operons) responsáveis pela formação da via de Sulfato em *X. citri*. Esquema representativo das reações de redução de sulfato a sulfeto em *X. citri* (II) e organização dos genes envolvidos (I). Os dados foram obtidos baseados em alinhamentos e no banco de genomas KEGG.

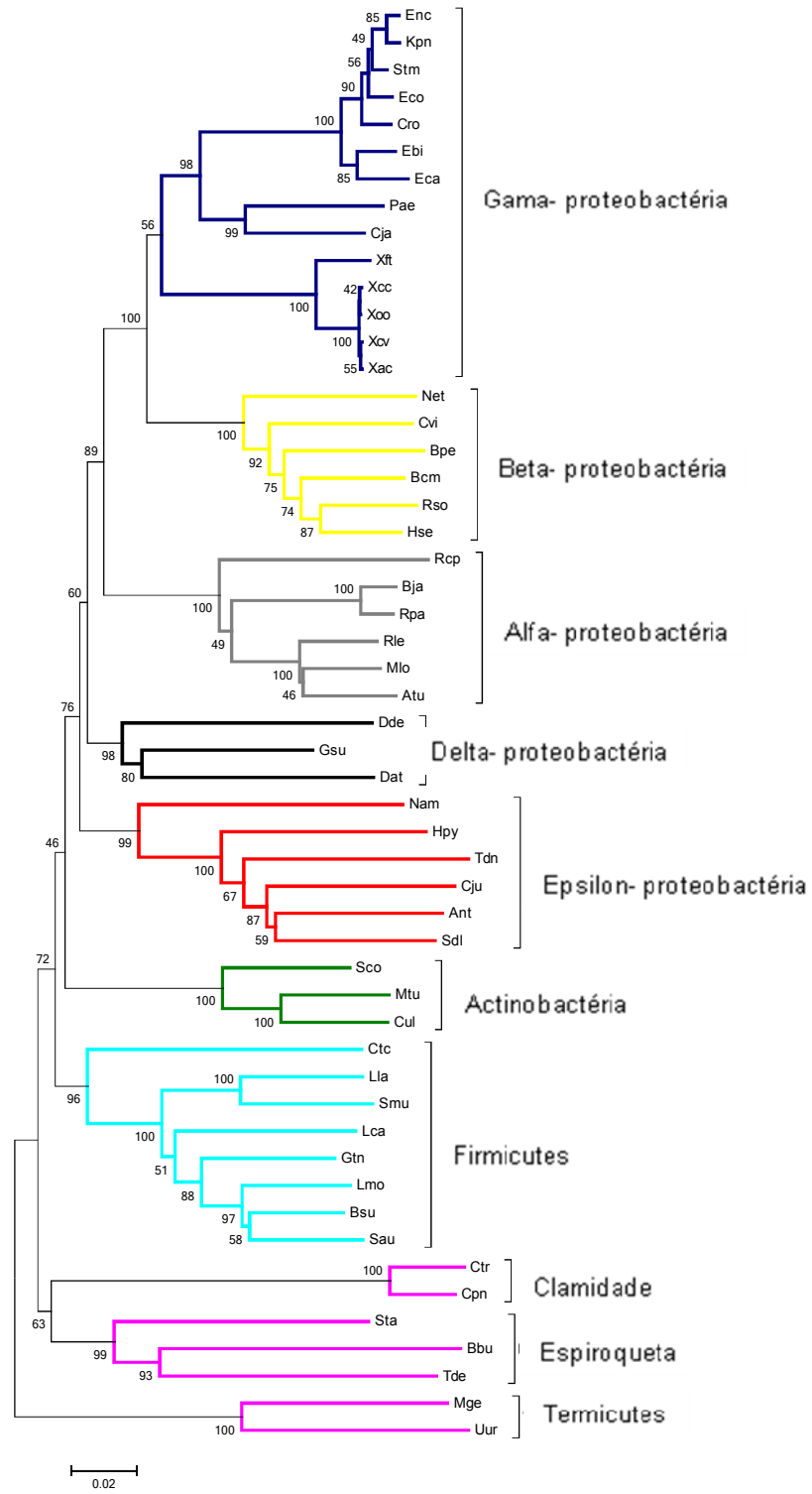
Nesta reação de conversão de sulfito a sulfeto, ainda há a presença de uma terceira enzima, a CysG, descrita como uroporfirina-III C-metiltransferase/precorrina-2 desidrogenase/sirohidroclorina ferro quelatase responsável pela formação do Siroheme, cujo gene se encontra em outra região do genoma próximo ao gene do regulador de todo o regulon *cys*, denominado *cysB* (HAVERKAMP; SCHWENN, 1999; MOUGOUS et al., 2006).

O fato de *X. citri* e *E. coli*, bactérias que são filogeneticamente distantes, apresentarem a via de captação de sulfato e redução a sulfeto completa, levantou a questão de onde esta via poderia ter surgido e como se apresentaria nos diferentes grupos. Para responder a esta pergunta, escolhemos organismos representativos de diferentes filos e a partir destes, construímos uma árvore filogenética baseada na sequência do rRNA 16S. Em seguida, para cada organismo identificado, verificou-se a presença ou ausência dos genes de interesse. Na Figura 7 é apresentada a árvore filogenética evidenciando os grandes grupos de bactérias. Nota-se que *X. citri* encontra-se, juntamente com *E. coli*, no grupo das gama-proteobactérias. Para estudarmos a presença dos genes do sistema *cys* nas diferentes bactérias, a tabela da Figura 8 foi construída tendo como base a mesma organização da árvore, seguindo a evolução filogenética e as cores, mas evidenciando a presença dos genes da via de sulfato nos diferentes organismos. Os resultados revelam que o sistema completo surgiu a partir do ramo que originou alfa, beta e gama-proteobactérias. Anterior a este evento, os grupos epsilon e delta-proteobactéria são os que já possuem representantes da via em alguns microrganismos mas com algumas ausências (vermelho e verde na Figura 7). A ausência total da via foi observada em Termicutes, Clamídiæ e Espiroqueta, sugerindo que nestes organismos outras formas de assimilação e redução de sulfato devem estar presentes. Interessantemente, nos Firmicutes, cuja maioria dos representantes são gram-positivos e com baixo conteúdo CG em seu genoma, os representantes *Bacillus subtilis* (bactéria de solo e água), *Geobacillus thermodenitrificans*, apresentam o final da via de sulfato (enzimas responsáveis pela redução de PAPS até sulfito), mas não o transportador. Em Actineobactérias, cujo filo é caracterizado por organização filamentosa e produção de cadeias de esporos, é interessante notar a presença da

maioria dos componentes da via, principalmente em *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium ulcerans*, organismos patogênicos, ambos da ordem actinomicetos.

Figura 7 - Árvore filogenética de diferentes organismos baseada na seqüência do rRNA

16S. As cores apresentadas na árvore são representativas de grandes grupos, como alfa-proteobactérias (cinza), betaproteobactérias (amarelo), deltaproteobactérias (preto), epsilonproteobactéria (vermelho), gamaproteobactéria (azul escuro) e Firmicutes (azul claro). Termicutes, Clamidia e Espiroqueta (rosa). As abreviaturas correspondem aos seguintes organismos: *Escherichia coli* K-12 MG1655, eco; *Shigella flexneri* 301, sfl; *Erwinia billingiae*, ebi; *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae*, enc; *Klebsiella pneumoniae*, kpn; *Citrobacter rodentium*, cro; *Serratia proteamaculans*, spe; *Pantoea ananatis*, pao; *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b), apl; *Xylella fastidiosa temecula*, xft; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913, xcc; *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, xcv; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, xac; *Xanthomonas oryzae* KACC10331, xoo; *Xanthomonas albilineans*, xao; *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1, pae; *Cellvibrio japonicus*, cja; *Azotobacter vinelandii*, avn; *Marinobacter aquaeolei*, maq; *Neisseria meningitidis* MC58, nme; *Chromobacterium violaceum*, cvi; *Ralstonia solanacearum*, rso; *Burkholderia cenocepacia*, bcm; *Bordetella pertussis*, bpe; *Herbaspirillum seropedicae*, hse; *Nitrosomonas eutropha*, net; *Helicobacter pylori*, hpy; *Sulfurimonas denitrificans*, tdn; *Campylobacter jejuni*, cju; *Arcobacter nitrofigilis*, ant; *Sulfurospirillum deleyianum*, sdl; *Nautilia profundicola*, nam; *Geobacter sulfurreducens*, gsu; *Desulfovibrio desulfuricans* G20, dde; *Desulfobacterium autotrophicum*, dat; *Agrobacterium tumefaciens* C58, atu; *Bradyrhizobium japonicum*, bja; *Mesorhizobium loti*, mlo; *Rhodobacter capsulatus*, rcp; *Rhizobium leguminosarum*, rle; *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, rpa; *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mtu; *Corynebacterium ulcerans*, cul; *Streptomyces coelicolor*, sco; *Bacillus subtilis*, bsu; *Geobacillus thermodenitrificans*, gtn; *Staphylococcus aureus* N315 (MRSA/VSSA), sau; *Listeria monocytogenes* EGD-e, lmo; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, lla; *Streptococcus mutans* UA159, smu; *Lactobacillus casei* ATCC 334, lca; *Clostridium tetani* E88, ctc.



4.2 Caracterização de função das proteínas da via

Para a caracterização mais aprofundada de cada componente da via, além de análises de bioinformática baseadas na comparação de seqüências, utilizando programas como BLASTp ou ClustalW, construímos modelos tridimensionais das proteínas, baseados em ortólogos com estrutura resolvida, que pudessem nos trazer informações como conservação de resíduos que interagem com os ligantes/substratos, enovelamento característico, regiões de interação, estados oligoméricos, etc.

4.2.1 O transportador do tipo ABC para captação de sulfato

O transportador do tipo “ABC” (ATP-Binding Cassete) realiza a importação de sulfato através da membrana celular acoplando a hidrólise de ATP aos movimentos das permeases. Este transportador é composto por cinco proteínas, Sbp, CysU(T), CysW e CysA, que se organizam na membrana celular conforme a Figura 6A.

A proteína ligadora SBP (XAC1017) (Figura 9A, componente amarelo) é responsável pela afinidade e especificidade do sistema e captura o sulfato no periplasma, levando-o até o componente de membrana. Estas proteínas são muito conservadas entre ortólogos, principalmente na região de interação com o sulfato, caracterizada por um bolsão entre dois domínios (detalhe com resíduos evidenciados em "palito"). O alinhamento das seqüências de aminoácidos também mostra que estes são conservados no ortólogo de *S. typhimurium*, cuja estrutura depositada no Banco de Dados de Proteínas com o código 1SBP (HE; QUIOCHO, 1991), foi usada como molde.

Após a ligação do sulfato, estas proteínas interagem diretamente com as permeases na membrana através de regiões de interface localizadas na entrada da fenda, exposta para o exterior, as quais denominamos de RI e RII (Figura 9 A e B, superfície em rosa). Novamente, os resíduos que correspondem às regiões descritas são conservados, sugerindo que as proteínas periplasmáticas interagem com regiões semelhantes nas permeases. Uma vez que a interação entre a proteína periplasmática e permease é o que transmite o sinal para a translocação do substrato, é possível que o

mecanismo de transporte seja conservado mesmo em transportadores de bactérias filogeneticamente distantes como *S. typhimurium* e *X. citri*.

As permeases CysU (XAC1018) (Figura 9 A, em azul) e CysW (XAC1019) (Figura 9 B, em azul claro), formam o heterodímero responsável pela formação do poro na membrana plasmática e translocação do sulfato para o meio interno. Curiosamente, na literatura, a maioria dos transportadores de íons são homodímeros, como o é o caso do transportador de molibdato em *E. coli* e *S. carnosus* (MAUPIN-FURLOW et al., 1995; NEUBAUER et al., 1999). Para o transportador de sulfato, encontrou-se dois genes anotados como permeases desse transportador, caracterizando-o como um heterodímero. As proteínas de membrana foram modeladas a partir das permeases da estrutura do transportador de molibdato (PDB 2ONK, ModC) (HOLLENSTEIN; FREI; LOCHER, 2007) e, a partir da sua organização estrutural e identidade de seqüências, identificamos as regiões denominadas MI e MII (Figura 9 C, em vermelho) como possíveis regiões de interação com RI e RII da proteína ligadora SBP. Os resíduos formadores desta região são apresentados na Figura 9C e são extremamente conservados nos ortólogos de *S. typhimurium*. A mesma Figura também mostra a seqüência assinatura das permeases, motivo EAA, localizada aproximadamente 100 resíduos antes da porção C-terminal (DAVIDSON et al., 2008; HIGGINS, 2001). Estas regiões são definidas como responsáveis pela interação com as ATPases. Na modelagem molecular, portanto, pode-se observar que as permeases do transportador de sulfato, se ajustam à função predita, com hélices transmembrana formando o poro e a região do motivo conservado EAA exatamente na região de interação com a ATPase. Curiosamente, os transportadores de alceno sulfonatos e sulfonatos alifáticos também identificados em *X. citri*, são homodímeros respectivamente formados por SsuB e TauB e não heterodímeros. A identidade de seqüências entre as 4 permeases CysUW, SsuB e TauB é de aproximadamente 28%. As proteínas, ao formarem o poro por onde o substrato é translocado, podem assumir a conformação voltada para a face interna (*inward*), quando a permease fica aberta ao interior da célula (Figura 9 A), ou externa (*outward*) quando a permease está aberta para o exterior.

Finalizando a caracterização do Sistema ABC de captação de sulfato de *X. citri*, duas cópias da proteína XAC1020 formam as ATPases do sistema (Figura 9 A, em

verde), responsáveis pela hidrólise do ATP. Estes domínios são conhecidamente os mais conservados nos transportadores ABC e apresentam motivos característicos envolvidos tanto na interação como na quebra (hidrólise) do substrato (ATP). Na Figura 9 D, apresentamos os resíduos e motivos conservados no modelo, diferenciados por cores. Os motivos Walker A e Walker B (em vermelho) são constituídos pelos aminoácidos GxxGxGKS/T (no qual x refere-se a qualquer aminoácido) e $\phi\phi\phi\phi$ D (ϕ refere-se a resíduos hidrofóbicos), respectivamente. Tais motivos delimitam concavidades na qual a molécula de ATP se acomoda e, juntamente com o motivo P-loop, formam as regiões de assinatura das ATPases. Exclusivamente em procariotos, existe uma seqüência assinatura de ATPases composta de 5 resíduos denominada C-Loop (LSGGQ) (DAVIDSON et al., 2008; HIGGINS, 2001), também bastante conservada em *X. citri*. Em adição a essas assinaturas ainda há alguns motivos característicos e altamente conservados nas ATPases: Q-loop, e H-loop. Esses são identificados de acordo com uma região invariável de glutamina e prolina respectivamente (OSWALD; HOLLAND; SCHIMITT, 2006).

Através desta análise é possível dizer que o transportador de sulfato de *X. citri* é conservado em relação ao seu correspondente em *S. typhimurium*, e que ainda, o modelo proposto, baseado na estrutura de um transportador de íons (molibdato), é bastante adequado, uma vez que as regiões e motivos funcionais são dispostos de forma conservada viabilizando análises de interação proteína-proteína, *pull-down*, bem como a elucidação da interação das permeases do transportador com o componente periplasmático.

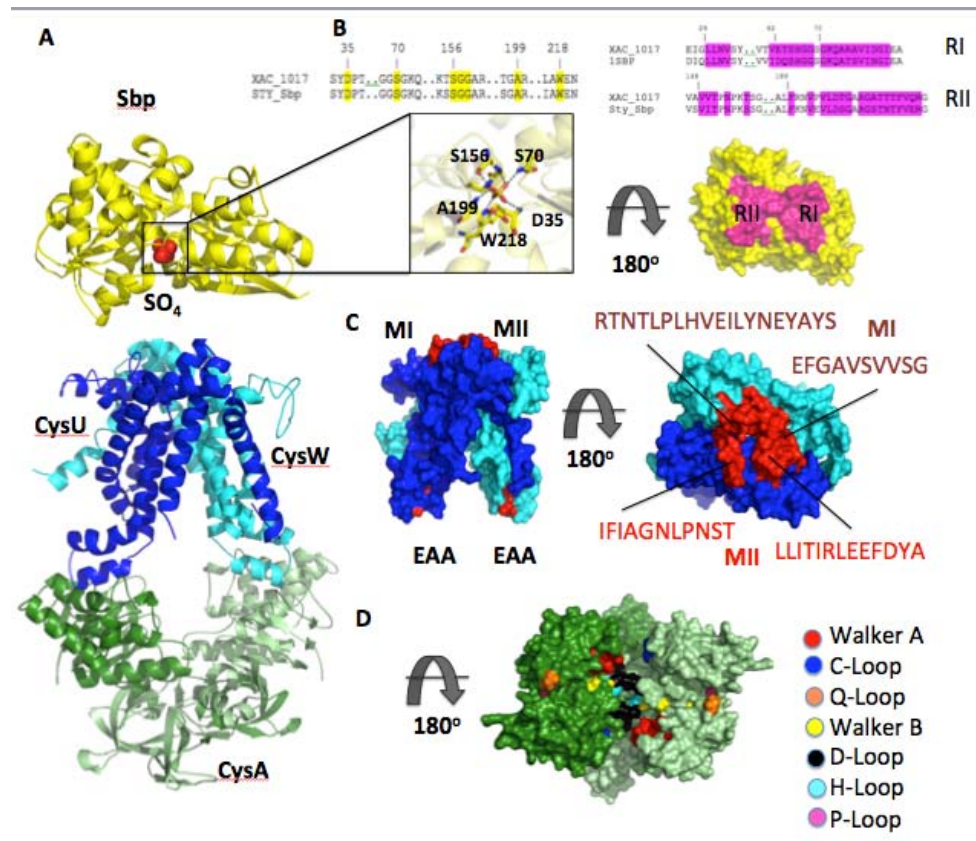


Figura 9 - Modelo da estrutura tri-dimensional do transportador de sulfato de *X. citri*. Componentes do transportador de sulfato do tipo ABC de *X. citri*, modelados a partir do transportador de molibdato (PDB 2ONK). **A)** proteína periplasmática SBP com o sulfato localizado no bolsão e **B)** detalhe em amarelo destacando os resíduos envolvidos na ligação com o sulfato e conservados no ortólogo de *S. typhimurium*. **C)** representação em *cartoon* e superfície das permeases CysU (em azul) e CysW (azul claro). As regiões em vermelhos destacam as regiões de interação com o componente periplasmático (MI e MII) e ATPases (EAA). **D)** As ATPases CysA estão indicadas em tons de verde e a legenda mostra os motivos funcionais conservados.

4.2.2 A internalização e assimilação do sulfato no citoplasma bacteriano

Redução de SO_4^{-2} a PAPS – Enzimas CysN*D/ CysC

A assimilação de sulfato é um componente crítico para o metabolismo primário bacteriano. Após a internalização do sulfato, o passo inicial é a ativação do íon, o qual é adenilado pela enzima ATP sulfurilase ou sulfato adeniltransferase (CysN*D) originando 5'-adenosina fosfosulfato (APS) e liberando fosfato inorgânico (Figura 10).

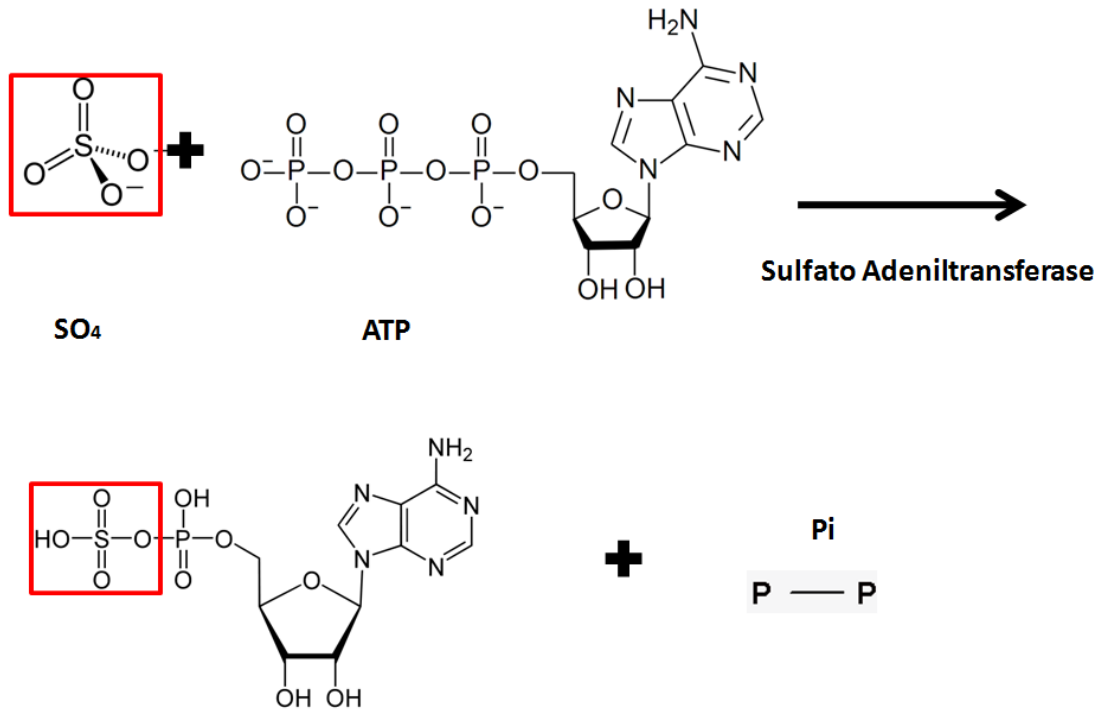


Figura 10 - Representação da etapa inicial da assimilação de sulfato. Depois de internalizado o íon (SO_4^{2-}) é convertido em APS através da ação das enzimas CysN e CysD, as quais juntas formam a sulfato adeniltransferase.

Em proteobactérias essa reação de “ativação” é termodinamicamente desfavorável ($K_{eq} = 1.1 \times 10^{-8}$ em pH 8.0) (LIU; MARTIN; LEYH, 1994) e para que ocorra, estes organismos utilizam a associação de uma proteína regulatória G (CysN) ao complexo, de forma que acoplam a hidrólise de GTP à reação de formação de APS. Assim, CysN e CysD atuam conjuntamente na formação de APS. Ainda, para a formação de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), uma terceira enzima se associa ao complexo, a proteína adenylylato quinase (CysC), cuja função é fosforilar o APS liberando ADP e fosfato inorgânico (Figura 11).

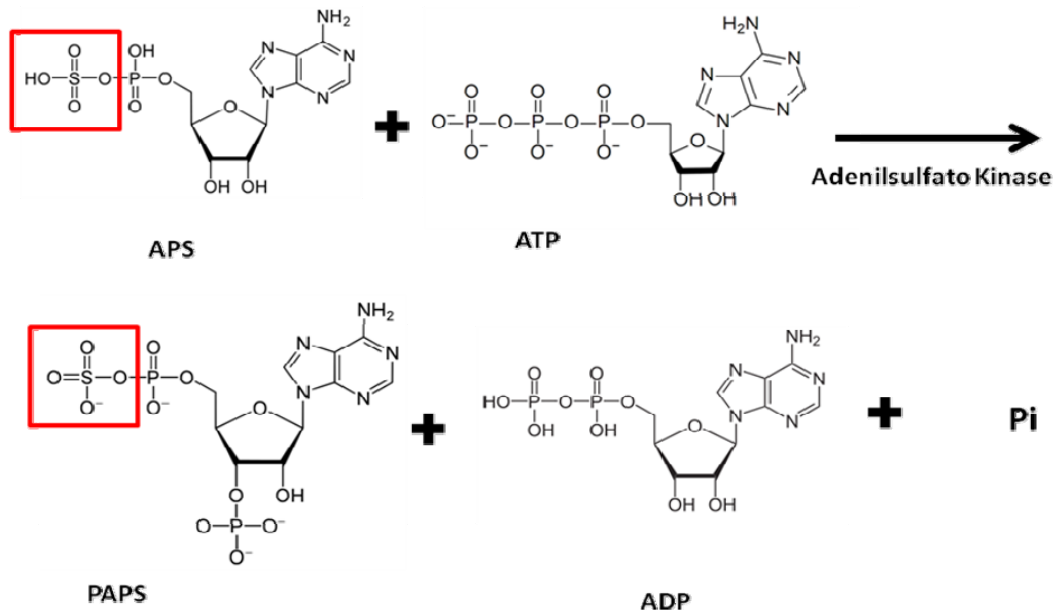


Figura 11 - Reação de fosforilação de APS pela enzima adenilsulfato quinase (CysC) originando PAPS, ADP e fosfato inorgânico.

A base molecular desta reação foi bem evidenciada em *Pseudomonas syringae* através da resolução da estrutura do complexo entre CysN e CysD sob entrada no PDB 1ZUN (MOUGOUS et al., 2006). Neste organismo CysC é fusionada à proteína CysN e os autores descrevem que para a formação do complexo, foi necessária a retirada do domínio C que corresponde a região da CysC. Adicionalmente, mostraram através de mutações, que a CysC em *P. syringae* não é funcional, porém importante para a dimerização. A estrutura do complexo CysN*D oferece evidências de que motivos no domínio G da proteína regulatória CysN, mediam, de forma alostérica, interações entre os sítios de ligação do nucleotídeo.

Utilizando as coordenadas estruturais do complexo CysN*D de *P. syringae* (PDB 1ZUN), nós modelamos as proteínas correspondentes em *X. citri*: CysN e CysD, as quais apresentam identidade de seqüências de 35.2% e 60%, respectivamente. Como em *P. syringae*, a CysN é fusionada em *X. citri* e outras bactérias do gênero.

O modelo do complexo CysN*D de *X. citri* é apresentado na Figura 12 em cartoon e superfície e evidencia três domínios característicos da CysN: domínio G ou sítio de ligação do GTP (em azul), domínio 2 e 3 (em verde claro e escuro, respectivamente) e a proteína CysD (em laranja). O domínio G da CysN apresenta uma

molécula de GDP no sítio (em palito rosa), conforme observado na estrutura cristalina do ortólogo. O alinhamento de seqüências mostrado, mostra que o sítio é bem conservado, diferindo-se de *P. syringae* em apenas um aminoácido (Figura 12).

Neste complexo, segundo o complexo de *P. syringae*, CysD é a subunidade menor responsável pela formação do substrato APS na presença de ATP e sulfato, que forma contatos íntimos com duas regiões da CysN, subunidade maior da enzima. A Figura 12C mostra o sítio de ligação de ATP gama-S (AGS) em CysD. Pelo alinhamento seqüencial mostra-se que *X. citri* também conserva os resíduos de interação desta região.

Mougous e colaboradores (2006) mostraram que nos casos onde a CysC é fusionada à CysN, esta proteína aparentemente perde a função, mas apresenta papel fundamental para dimerização do complexo (BERENDT et al., 1995; MOUGOUS et al., 2006), cujo modelo foi apresentado pelos autores. Baseados nestes dados, construímos um modelo do complexo CysN*D + CysC evidenciando a localização desta proteína para dimerização (Figura13A e B). Adicionalmente, *P. syringae* possui uma região, denominada P-loop, que quando comparada com outras proteínas CysC ativas, apresenta uma série de mutações, que poderiam justificar a sua inatividade. A comparação da seqüência da CysC de *P. syringae* com a de *X. citri* evidenciou, mais uma vez, conservação de resíduos, incluindo os mutados (Figura13C) sugerindo que em *X.citri* a proteína CysC não tenha sua função como quinase. Curiosamente há no genoma em *P. syringae* outra anotação de sulfato quinase o que não encontramos em *X.citri*.

Juntos, os dados demonstram que há conservação estrutural e de resíduos de interação com os substratos nas enzimas responsáveis pela conversão de sulfato em PAPS de *X. citri*, sugerindo que esta reação pode ocorrer nesta bactéria. Ainda, a fusão de CysN*D e a CysC com conservação de resíduos mutados sugere um mecanismo conservado de interação e redução do substrato.

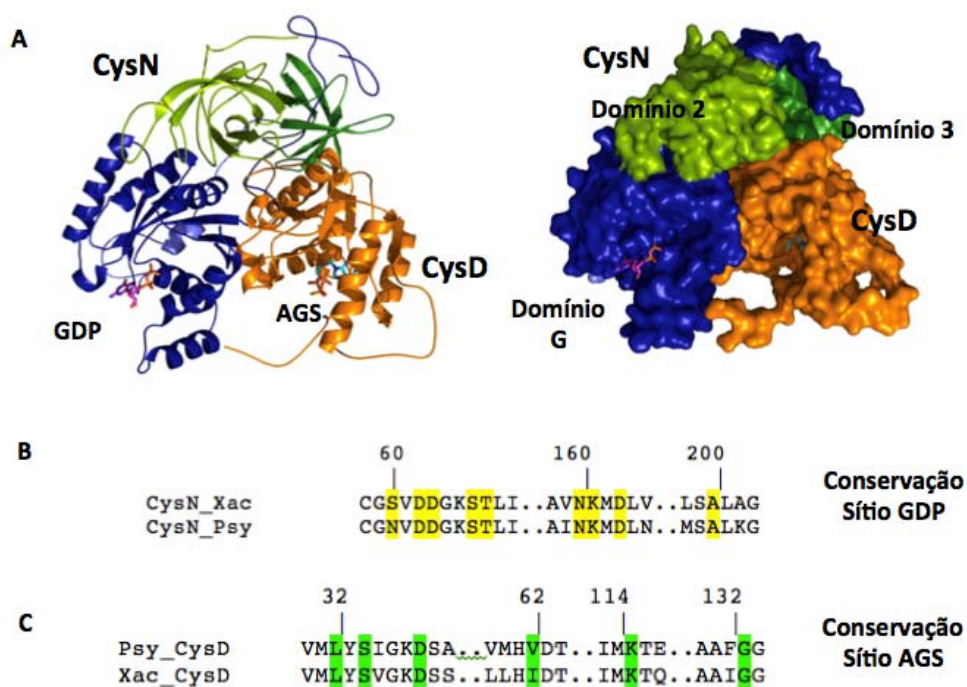


Figura 12 - Modelo do complexo CysN*D de *X. citri* baseado nas coordenadas estruturais dos ortólogos de *P. syringae* (PDB 1ZUN). A) estrutura de CysN*D em *cartoon* e superfície evidenciando os três domínios de CysN: domínio G (em azul), domínio 2 e 3 (em verde claro e escuro, respectivamente) e a proteína CysD (em laranja). Os alinhamentos das proteínas CysN-domínio G e CysD estão apresentados em B) e C) respectivamente, com os resíduos de interação com os substratos em amarelo e verde. GDP (guanosina di-fosfato) e AGS (ATP gama-S).

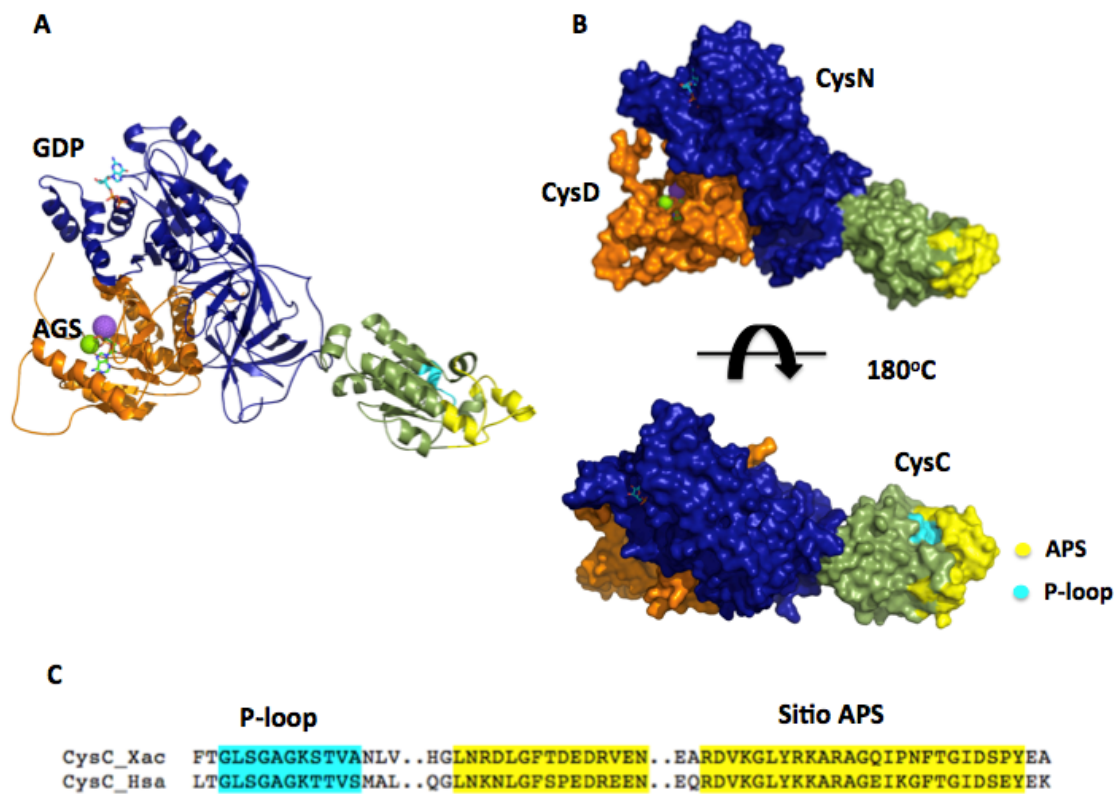


Figura 13 - Modelo estrutural do complexo CysN*D + CysC de *X. citri* baseado nos dados de Mougous e colaboradores (2006). A proteína CysC foi modelada com as coordenadas estruturais da proteína CysC de *Homo sapiens* que apresenta 49% de identidade. Em seguida, para a construção do complexo CysC + CysN*D, as coordenadas estruturais da CysC foram adicionadas às do complexo. **(A e B)** estrutura de CysN*D+CysC em *cartoon* e superfície evidenciando CysN em azul, CysD (em laranja) e CysC (em verde). A região amarela é o sítio de interação ao APS e em azul claro a região P-loop. **(C)** alinhamento entre as regiões P-loop de *X. citri* e *P. syringae*.

Redução de PAPS a Sulfito - enzima CysH

O próximo passo na via de sulfato é a redução de PAPS a sulfito (HSO_3^{-1}) realizada pela enzima fosfoadenil fosfosulfato redutase ou CysH (Figura14). Esta reação ocorre em duas etapas onde na primeira a tiorredoxina ($\text{Tio}[\text{SH}]_2$) doa dois elétrons do seu grupo tiol para a CysH, e na segunda, a atividade da enzima origina sulfito, fosfoadenil fosfato (PAP) e tiorredoxina dissulfeto ($\text{Tio}[\text{SH}]_2$ -dissulfeto).

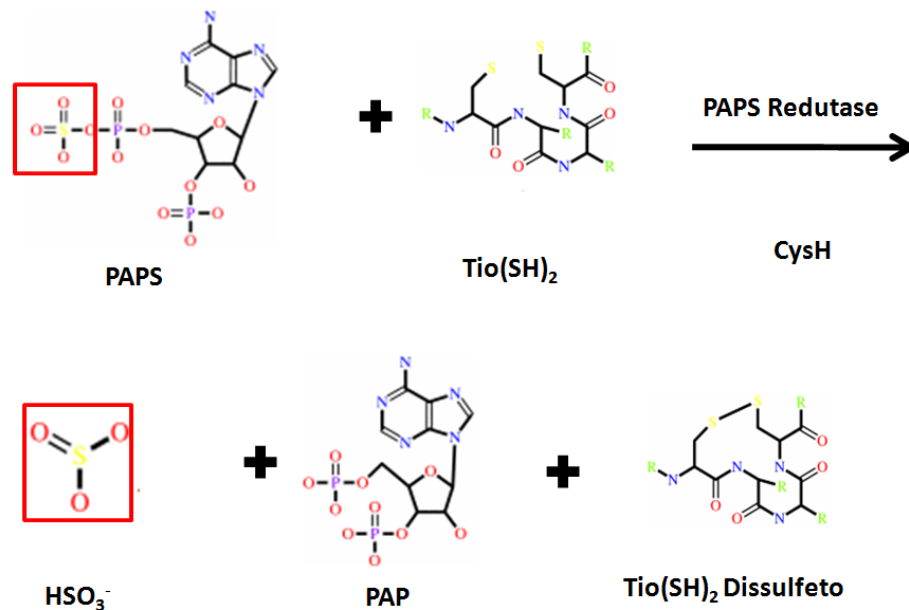


Figura 14 - Reação de redução de PAPS pela PAPS redutase CysH liberando sulfito, PAP e tiorredoxina dissulfeto.

Como em *E. coli*, em *X. citri* a enzima PAPS redutase é codificada pelo gene *cysH* que está no mesmo operon que os genes *cysI* e *cysJ*. A busca por ortólogos desta proteína revelou maior identidade de seqüências (57%) com a PAPS redutase de *E. coli* (CysH, PDB 2O8V). As coordenadas estruturais da enzima de *E. coli* foram usadas como molde para a construção do modelo da CysH de *X. citri*, e a estrutura da proteína APS redutase de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 2GOY) foi usada para comparações e sobreposição com os modelos de CysH, por ter sido cristalizada com substratos e cofatores (CHARTRON et al., 2006). Segundo Chartron e colaboradores (2006), PAPS redutases e APS redutases pertencem a uma mesma família, as sulfonucleotídeo redutases, que catalizam a conversão de APS para sulfito, mas são divididas em duas classes de acordo com a especificidade do substrato e pela presença ou ausência de um grupamento de ferro-enxofre. Neste caso, as APS redutases contêm o grupamento ferro e as PAPS redutases, como a CysH, não.

A Figura 15 apresenta o modelo da CysH de *X. citri* e as comparações com as estruturas de CysH de *E. coli* (2O8V) e a APS redutase de *P. aeruginosa* (PDB 2GOY). A sobreposição das proteínas mostra conservação estrutural, mesmo entre APS e PAPS redutases (Figura15A). A estrutura de *P. aeruginosa* foi resolvida com substrato e

cofator e estes são apresentados na sobreposição. O alinhamento das seqüências primárias das proteínas mostram que CysH de *X. citri* e *E. coli* conservam os resíduos do sítio ativo (Figura 15D em azul e 15B) e evidencia a presença da cisteína 239 (em vermelho), a qual seria a responsável pela formação do dímero, estrutura essencial para a atividade da enzima (SAVAGE et al., 1997). Por outro lado, diferentemente do que foi observado nestas duas enzimas, a APS redutase de *P. aeruginosa* apresenta os resíduos de formação do grupamento de Ferro (Figura 15D, em rosa) e os resíduos de interação com o APS. Ambos os sítios não são evidenciados ou conservados nas proteínas CysH.

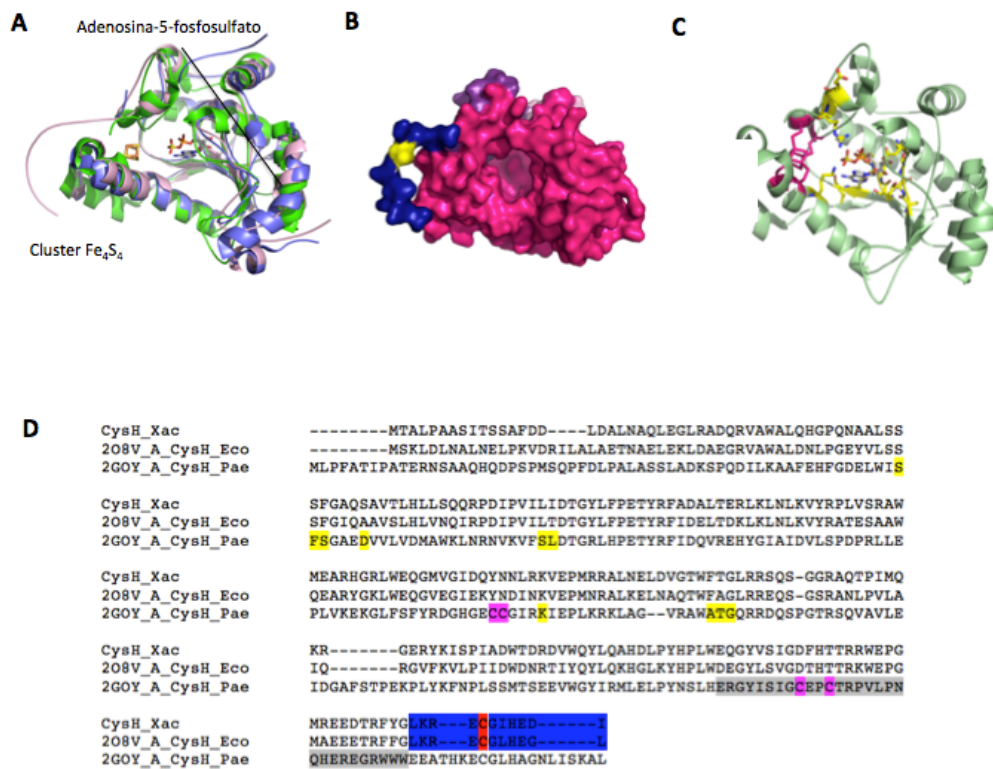


Figura 15 - Modelo da estrutura da PAPS redutase de *X. citri* (CysH) comparada com o ortólogo de *E. coli* (PDB 208V) e com a APS redutase de *P. aeruginosa* (PDB 2GOY). A) Sobreposição das três enzimas evidenciando a conservação do enovelamento. O grupamento Ferro e o APS são apresentados em stick e pertencem à proteína de *P. aeruginosa*. CysH de *X. citri* e *E. coli* em rosa e azul, respectivamente e APS redutase de *P. aeruginosa* em verde. B) CysH de *X. citri* em superfície, evidenciando a região do sítio ativo (em azul) e a cistina necessária para a dimerização. C) Estrutura da APS de *P. aeruginosa* com a localização dos resíduos de interação com APS (amarelo) e formação do grupamento ferro (rosa). D) alinhamento das seqüências das três proteínas com destaque para os resíduos acima mencionados.

Redução de Sulfito a Sulfeto – enzimas CysI, CysJ e CysG

Continuando o processo de redução do sulfato a sulfeto, o sulfito gerado na etapa anterior deve ser reduzido pela sulfito redutase dependente de NADPH (CysIJ) (Figura16).

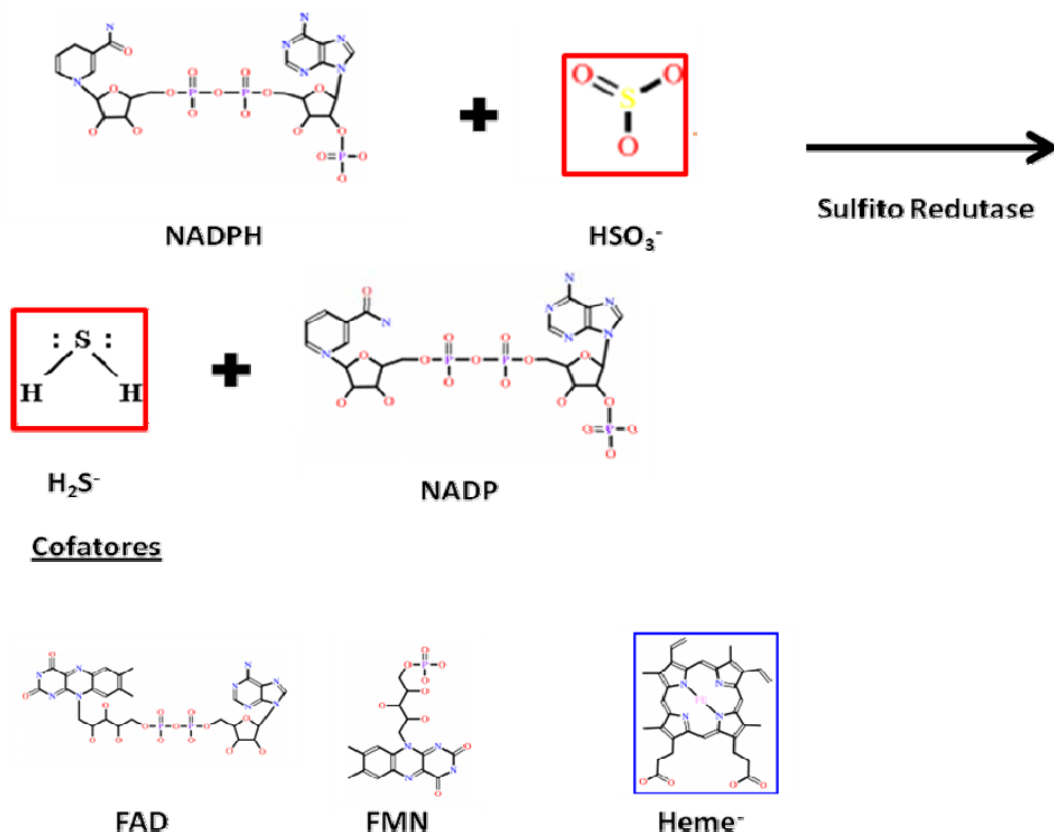


Figura 16 - Reação de redução do sulfito catalizada pela sulfito redutase (CysIJ). A mesma ocorre na presença de NADP⁺ para a formação de sulfeto e NADPH. Esta reação precisa dos cofatores FAD, FMN e siroheme, sendo o último gerado pela enzima CysG.

A enzima sulfito redutase em proteobactérias é composta de duas subunidades, alfa e beta, constituídas respectivamente pelas proteínas CysJ e CysI. As sulfeto redutases empregam o uso do siroheme porfirina acoplado a um grupamento de Ferro-Enxofre (F_4S_4) para realizar a transferência de seis elétrons. Em *E. coli* e, como esperado em *X. citri*, dado que as enzimas são conservadas, CysI é a β -hemoproteína e a CysJ é a α -flavoproteína. Estas enzimas formam um oligômero composto de oito

unidades flavoprotéicas e quatro unidades homoprotéicas (CRANE; SIEGEL; GETZOFF, 1995). O componente flavoprotéico oxida NADPH e FAD reduzindo a flavina mono-nucleotídeo (FMN) que será cofator na reação de redução efetuada pelo componente β -hemoprotéico ou proteína CysI. Esta etapa é ainda dependente da presença do siroheme, que é produzido pela proteína CysG, como será discutido posteriormente. Após receber os elétrons em questão esta subunidade é responsável pela redução de sulfito a sulfeto para ser utilizado na biosíntese de cisteína.

Para a construção dos modelos de CysI e CysJ, foram usadas proteínas diferentes. A CysJ foi modelada a partir das coordenadas estruturais da proteína sulfito redutase (NADPH) flavoproteína componente alfa de *E. coli* (PDB 1DDG), que apresenta 29% de identidade de seqüência e uma molécula de FAD no sítio ativo. Apesar da baixa identidade de seqüências o modelo da CysJ se ajustou à estrutura de *E. coli* (Figura 17A) e *X. citri* conserva todos os resíduos de interação com FAD, com exceção do ácido aspártico 194 que em *E. coli* é uma glicina (Figura 17B). Outra característica importante que ressalta a conservação do sítio de interação ao substrato e sugere a funcionalidade da CysJ é o potencial eletrostático da superfície do bolsão do FAD, que também se mantém semelhante (Figura 17 C e D).

O modelo da CysI de *X. citri* foi baseado no ortólogo de *E. coli* (PDB 1AOP) que apresenta 44% de identidade. A Figura 18 demonstra que CysI de *X. citri* é conservada estruturalmente em relação à estrutura de *E. coli* (Figura 18A) e pode coordenar o siroheme através de uma rede de resíduos positivos, conforme demonstrado na Figura 18B. Adicionalmente as cisteínas que coordenam o grupamento Ferro também estão dispostas de forma ideal. Os resíduos conservados e dois diferenciais são apresentados no alinhamento (Figura 18C).

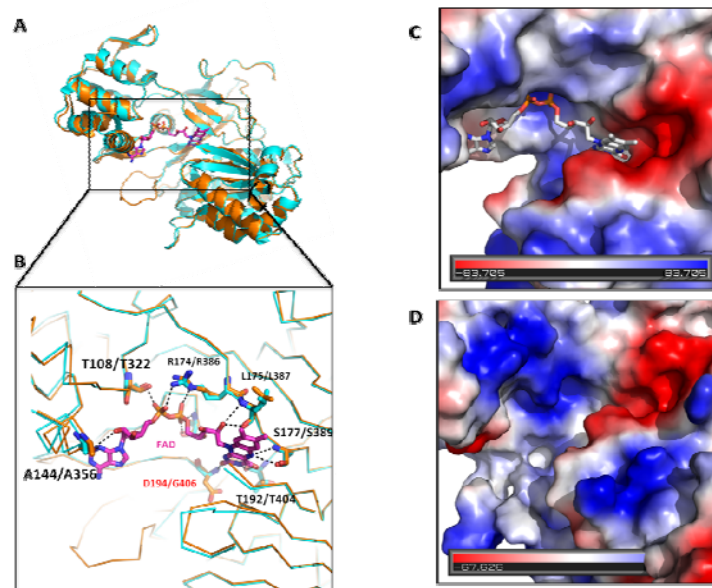


Figura 17 - Modelo em *cartoon* da estrutura tridimensional da proteína CysJ de *X. citri* (laranja) sobreposto ao ortólogo de *E. coli* (PDB 1DDG) (azul). A ilustração mostra os dois domínios e a fenda onde o substrato se liga (em "stick") **A) e detalhe do sítio de ligação e conservação dos resíduos envolvidos na ligação com FAD **B**). **C**) e **D**) representam a superfície eletrostática do sítio ativo colorido por carga, onde vermelho indica carga negativa e azul positiva.**

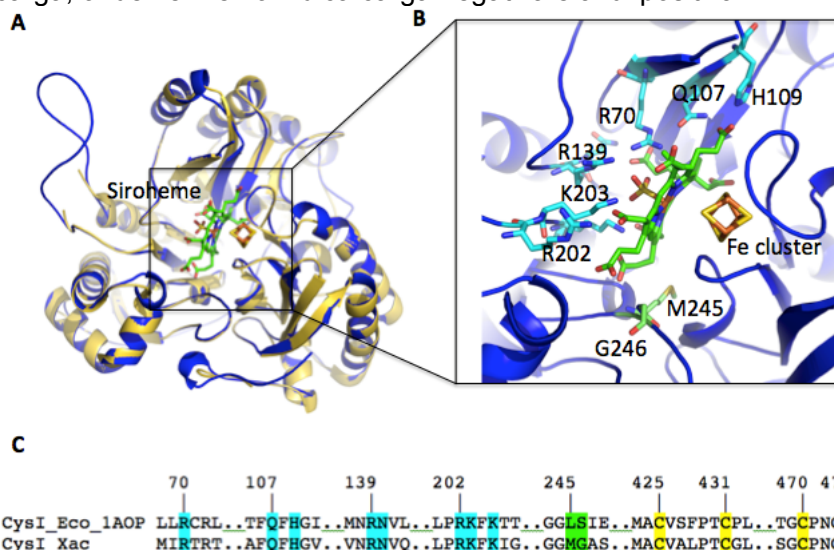


Figura 18 - Modelo em *cartoon* da estrutura tridimensional da proteína CysI de *X. citri* (amarela). Sobreposição ao ortólogo de *E. coli* (PDB 1AOP) (azul) mostrando o siroheme em "stick" verde e o grupamento ferro em amarelo **A) e detalhe do sítio de ligação e conservação dos resíduos envolvidos nas interações com siroheme e grupamento ferro **B**). Em **C**), o alinhamento das seqüências das proteínas e conservação dos resíduos de interação com siroheme conservados (azul), não conservados (verde) e cisteínas formadoras do grupamento ferro (amarelo).**

Estes dados mostram que as proteínas CysI e CysJ formadoras do complexo sulfito redutase são conservadas e apresentam as características estruturais necessárias para a interação e conversão dos substratos até sulfeto. Contudo, como mencionado anteriormente, para que esta etapa de redução de sulfito a sulfeto ocorra, é necessária a presença de siroheme, utilizado como cofator e que é gerado pela enzima siroheme sintase, CysG.

No processo de formação de siroheme, ocorrem 4 reações em 3 etapas. Na primeira, a CysG promove a metilação de uma molécula de uroporfirinogênio III utilizando adenosil-L-metionina (SAM) e originando S-adenosil L-homocisteína (SAH) e precorrina I (Figura 19A). Nesta etapa ainda ocorre uma segunda reação que é a metilação da precorrina I novamente na presença do SAM, originando a precorrina II e outra molécula de SAH (Figura 19B). Na segunda etapa, a CysG atua como uma precorrina II desidrogenase que reduz a precorrina II na presença de NAD(+) formando a sirohidroclorina e NADH (Figura 19C). Finalmente, na terceira etapa a CysG atua como uma sirocloridina ferroquelatase que incorpora o Ferro à sirocloridina formando siroheme e liberando dois H⁺ (Figura 19D). Na literatura, apenas essa classe de proteína pode ser descrita como siroheme sintase uma vez que consegue transformar o uroporfirinogênio III em siroheme (STROUPE et al., 2003).

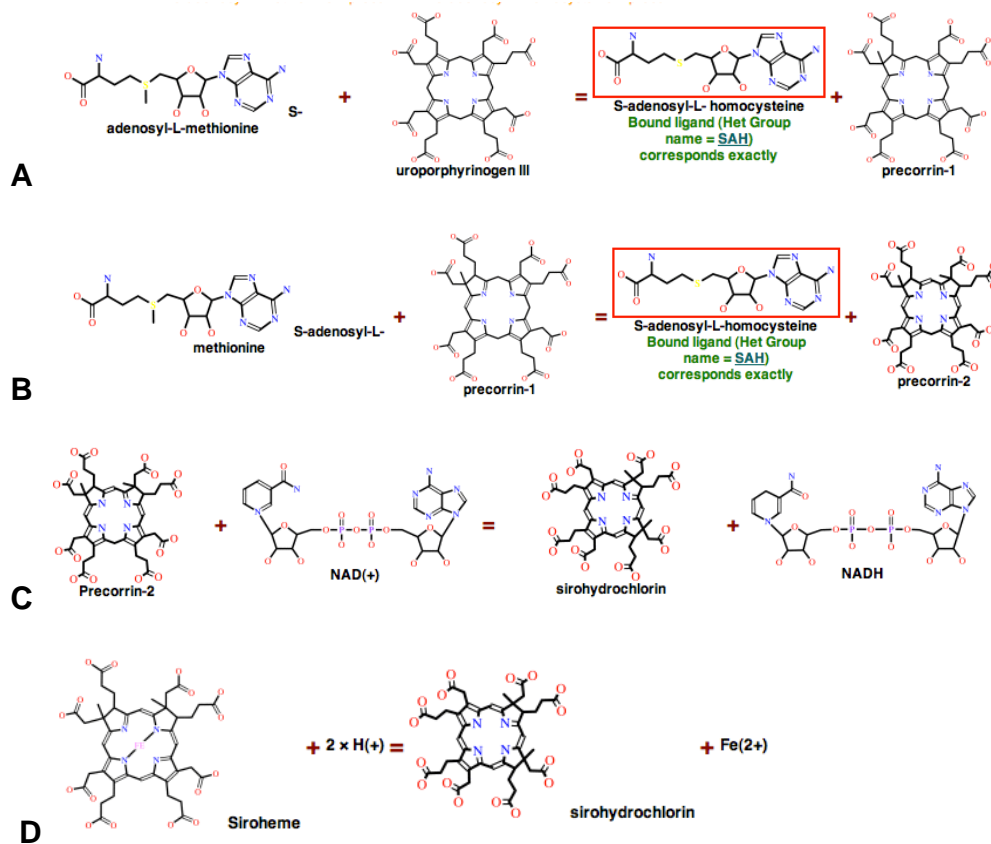


Figura 19 - Esquema das reações enzimáticas realizadas pela proteína siroheme sintase, CysG, para a formação de siroheme. A Figura apresenta 3 etapas: 1) metilação do uroporfirinogenio III e precorrina I (**A** e **B**, respectivamente); 2) redução da precorrina II e formação da sirohidroclorina (**C**) e 3) formação de siroheme (4) **D**).

O número de enzimas envolvidas neste processo pode variar de organismo para organismo. *Bacillus megaterium* utiliza três enzimas separadamente para que tal processo ocorra. Já em *Saccharomyces cerevisiae*, duas enzimas são utilizadas, e em *S. typhimurium* os três processos são realizados por apenas uma enzima (STROUPE et al., 2003).

Na busca pelos genes envolvidos na produção do siroheme em *X. citri*, foram identificados dois resultados para *cysG*: XAC2159_ *cysG* e XA3340_ *cysG*. O alinhamento entre ambas as seqüências de aminoácidos mostrou que eles conservam identidade seqüencial de apenas 19.2%. Ainda, outra diferença entre tais proteínas é que XAC2159_ *cysG* não está anotada como uroporfirinogenio-III C metiltransferase.

Nossas análises de bioinformática mostram que esta enzima não conservou nenhum dos resíduos esperados para uma CysG, sugerindo uma função diferenciada.

Stroupe e colaboradores (2003), ao resolverem a estrutura do ortólogo de CysG de *S. typhimurium* identificaram dois dos três sítios responsáveis pelas reações de formação do siroheme. A enzima foi dividida em duas regiões denominadas CysGA (porção C-terminal) e CysGB (porção N-terminal) (Figura 21A).

Na modelagem da CysG de *X. citri*, usamos as coordenadas estruturais da CysG de *S. typhimurium* (35.2% de identidade, PDB 1PJQ). O alinhamento das seqüências contudo, mostrou que a proteína de *X. citri* não apresenta uma região interna. Neste caso, somente os domínios comprimindo as regiões N e C-terminais foram modelados. A estrutura da CysG de *S. typhimurium* é apresentada em azul na Figura 20 A e apresenta 2 domínios separados por alças. Os modelos de CysG de *X. citri* estão nos domínios C e N (Figura 20, em rosa). A estrutura mostra a proteína ligada à moléculas de SAH, referente à etapa I do processo evidenciando a região de interação com o substrato e conservação dos resíduos na proteína de *X. citri* (Figura 21 B e C). Neste domínio encontra-se também os resíduos 211-214 responsáveis pela dimerização do complexo. A Figura 21C mostra a modelagem da região dimerizada.

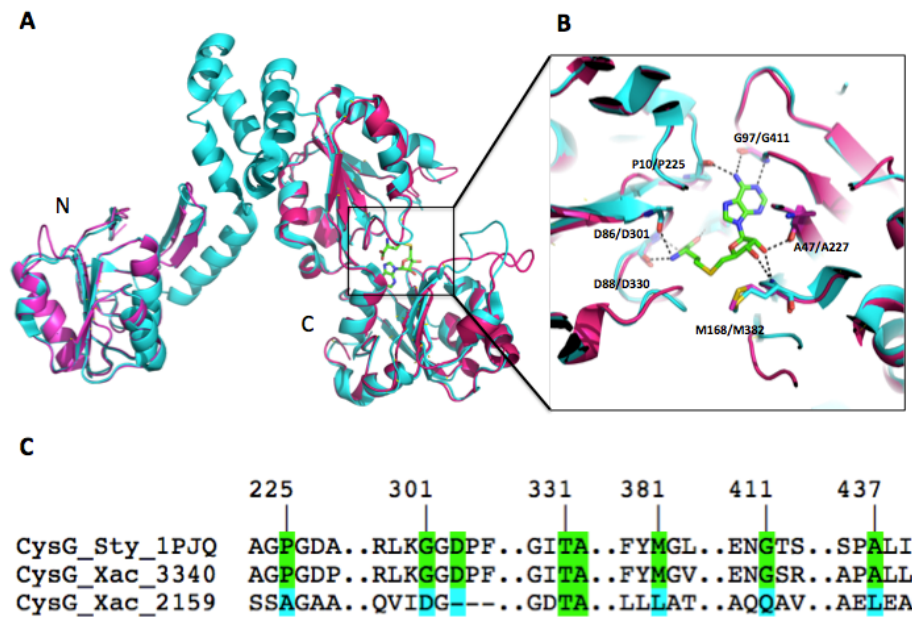


Figura 20 - Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína CysG de *X. citri* **A)** Modelo em cartoon da estrutura tridimensional da proteína CysG de *X. citri*, região N e C terminal (rosa) sobreposto ao ortólogo de *S. typhimurium* (PDB 1PJQ) (azul) mostrando uma molécula de SAH "stick" verde. **B)** detalhe dos resíduos que interagem com a SAH e conservação e **C)** alinhamento de seqüências com os resíduos conservados em CysG_3340 de *X. citri* e CysG de *S. typhimurium* (em verde). Ainda o alinhamento mostra que a proteína CysG_2159 não apresenta nenhum dos resíduos para interação com SAH (em azul).

Na CysG de *S. typhimurium*, a porção N-terminal da proteína é denominada CysGB e apresenta dois resíduos relacionados ao sítio ativo da desidrogenase-ferroquelatase, Asp104 e Asn86 (Figura 20 B). O anel aromático do NAD (Figura 18 C) forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo Asp104, que faz outra ligação de hidrogênio com Asn86. Outro resíduo importante da CysG de *S. typhimurium* é a Ser128, localizada a 11 Å de distância do Asp104, e que é descrita como uma fosfoserina com modificação pós traducional (STROUPE et al., 2003). A presença dessa fosfoserina regula a inibição do domínio B na enzima. Em *X. citri*, somente identificamos o resíduo Asn86. Os demais não mostraram conservação nas regiões de interesse.

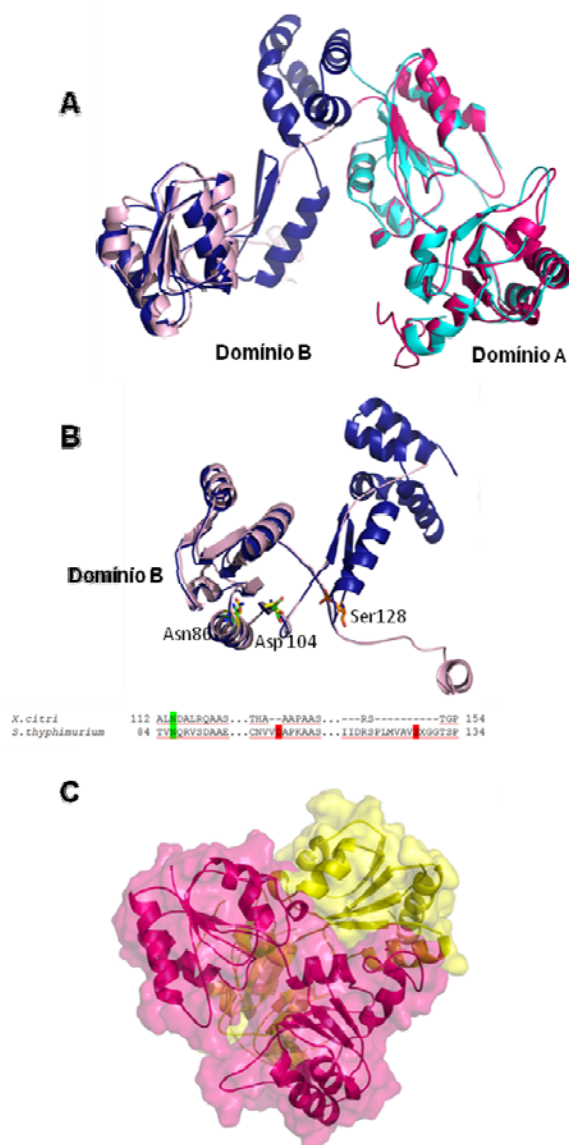


Figura 21 - Modelo da estrutura tri-dimensional da proteína CysG de *X. citri*. **A)** Representação em cartoon da estrutura tridimensional da proteína CysG de *X. citri*, regiões N e C terminais (rosa) sobrepostas ao ortólogo de *S. typhimurium* (PDB 1PJQ) (azul), usado como molde. Os domínios A e B são identificados. **B)** detalhe do domínio CysGB de *S. typhimurium*, onde se localiza o sítio ativo desidrogenase-ferrochelataze, sobreposto ao similar em *X. citri*. Os resíduos Asn86 e Asp104 do ortólogo de *S. typhimurium* são apresentados em palito verde e os resíduos equivalentes em *X. citri* mostrados em amarelo. A Ser128, presente apenas na CysG de *S. typhimurium* é evidenciada em palito laranja. **C)** Representação da organização estrutural da CysG de *X. citri* na forma de dímero, construída a partir da estrutura de *S. typhimurium*. Segundo este modelo, a região intermediária entre os dois domínios seria responsável pela dimerização.

PARTE II - FUNCIONALIDADE DA VIA – ANÁLISE PROTEÔMICA, RT-PCR e ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO PROMOTOR DO TRANSPORTADOR ABC DE SULFATO

4.3 Análise Proteômica

O estudo do proteoma reflete o conjunto de proteínas expressas pelo genoma do organismo em determinadas condições ambientais. Esta abordagem tem sido utilizada para o estudo da expressão gênica de um organismo sob condições contrastantes com a possibilidade de compreensão das suas formas de adaptação a novos ambientes (FACINCANI, 2007). Neste trabalho, as análises proteômicas visaram identificar quais proteínas da via de assimilação e redução de sulfato de *X. citri* eram expressas em diversas condições de cultivo. Três situações foram escolhidas: meio rico LB (controle), meio mínimo M9, meio mínimo com carência de sulfato (M9 com 1 mM de sulfato) e meio XAM1 que simula as condições encontradas em citros (LAIA, 2007). Os resultados apresentados foram realizados em triplicata em diferentes dias de cultivo. Inicialmente, iniciamos as obtenções de extratos protéicos utilizando a abordagem de eletroforese bidimensional (2D) em gel de poliacrilamida, técnica que se baseia na separação de proteínas pelo seus pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (M), associada à espectrometria de massas para a identificação das proteínas de diversos materiais (FEY; LARSEN, 2001). No entanto, tivemos muita dificuldade na padronização dos extratos protéicos uma vez que a produção da goma xantana afeta a migração das proteínas. Várias tentativas foram realizadas utilizando-se diferentes formas de lise bacteriana e preparação dos extratos para obtenção de 100 µg de proteínas por gel, quantidade desejável para a análise. O melhor protocolo de extração é o descrito na metodologia no qual não houve utilização de qualquer detergente para a melhora da lise celular. Infelizmente, mesmo após vários testes, não conseguimos obter uma focalização isoelétrica adequada, com amostragem adequada e livre de contaminantes (como ácidos nucléicos).

Neste caso, como a idéia era identificar todas as proteínas e não amostras diferenciais, utilizamos a preparação de gel de poliacrilamida padrão, a partir do qual,

as diversas bandas de proteínas foram recortadas e submetidas à lise celular, conforme apresentado na Figura 22. As amostras foram extraídas seguindo o protocolo gentilmente cedido pelo Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM). As proteínas digeridas com tripsina foram submetidas às análises no espectrômetro de massas Q-tof (MicroMass/Waters).

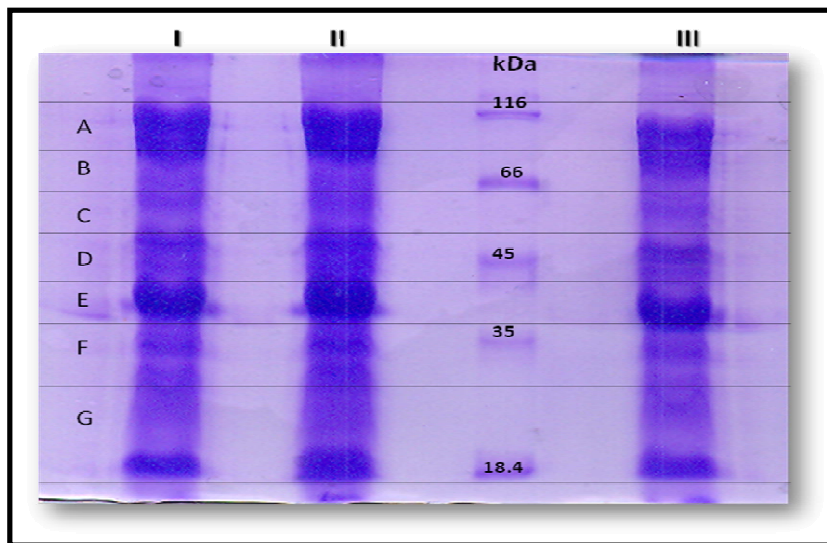


Figura 22 - Extratos de *X. citri* usados nos ensaios de espectrometria de massas. Gel de SDS-PAGE 12% evidenciando os recortes de bandas utilizadas para as análises proteômicas no gel do meio M9 bem como a triplicata dos experimentos denominados I, II e III. Por tratar-se de uma corrida padrão para os extratos de *X. citri* os mesmos recortes foram utilizados para os meios LB, M9 com 1 mM de sulfato de amônia e meio XAM1.

Análises do proteoma de *X. citri* realizadas anteriormente por Soares e colaboradores (2010) revelaram 1702 proteínas desta bactéria nas culturas crescidas em condições não infectantes (meio NB e TSE), totalizando 39% de todas as proteínas expressas no genoma bacteriano. Nestas condições, relativo à via de sulfato, contudo, somente a proteína periplasmática Sbp (XAC1017) foi identificada. Para análise das proteínas identificadas em nossos experimentos, foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3 com o auxílio do software Scaffold v.3.3.1, o que auxiliou na organização dos dados e confiabilidade na identificação das proteínas.

Segundo o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1137651&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>), *X. citri* possui 9.747 proteínas. A análise

proteômica de *X. citri* identificou 130 proteínas no meio XAM1 (1.33% do total de proteínas), 204 no meio LB (2.09%), 210 no meio M9 2 mM de sulfato de amônia (2.15%) e 247 (2.53%) no meio M9 com 1 mM de sulfato de amônia. Infelizmente, a abordagem não pareceu adequada para a identificação de um grande número de proteínas como previamente obtido nos ensaios realizados por Soares e colaboradores (2010). Contudo, apesar do número de proteínas identificadas ser bastante baixo quando comparado com o artigo referido, a proteína ligadora de sulfato, Sbp, foi identificada em todas as condições analisadas, exceto meio XAM1. Também identificamos a CysI somente em M9 com 1 mM de sulfato de amônia (Tabela 5). A presença da primeira proteína da via, que é responsável pela translocação do íon para o citoplasma é um forte indício da ativação do operon, mas ainda assim, seria especulativo afirmar que toda a via foi ativada. Por outro lado, deve-se levar em conta que o número de proteínas identificadas em relação ao total é muito baixo, o que poderia ter afetado os resultados. Como alternativa à estas análises e na tentativa de identificarmos um número maior de proteínas da via, utilizamos outra estratégia de análise proteômica, conforme descrito a seguir.

4.4 RT-PCR

Complementando os dados de proteômica, realizamos ensaios de transcrição reversa (RT-PCR) para análise qualitativa dos genes que poderiam ser expressos pela via de assimilação e redução de sulfato. Culturas de *X. citri* em meio LB foram crescidas durante 18 horas, tiveram seu RNA extraído para obtenção do DNA complementar e preparação das reações de PCR. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 23.

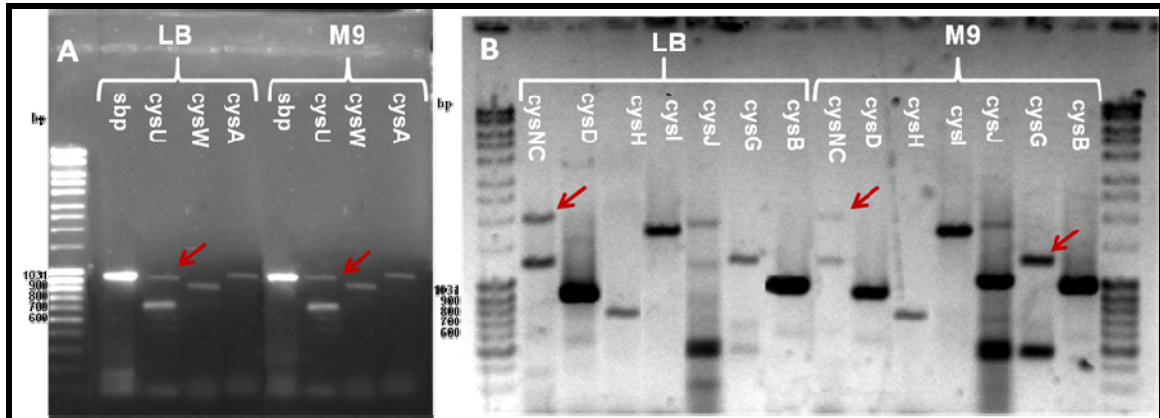


Figura 23 - Amplificação dos genes da via de captação e assimilação de sulfato a partir de cDNA. A) Genes que compõem o transportador do tipo ABC (operon *sbpcysWUA*) em meio LB e M9, respectivamente e **B)** genes responsáveis pela óxido/redução do sulfato no citoplasma (operons *cysDNC* *cysHIJ* e *cysGB*) em meio LB e em meio M9.

Os resultados mostram que todos os genes da via são amplificados nas condições analisadas, sugerindo fortemente que a mesma é ativada tanto em meio rico como em carência nutricional. Vale ressaltar, contudo, que seria interessante fazer a mesma análise com RNA proveniente de culturas crescidas em meio XAM1 e com M9 com menor concentração de sulfato, para verificar se há regulação diferencial destes genes. Estes ensaios não foram realizados por limitação de tempo do mestrado. A Tabela 5 apresenta o resumo dos dados obtidos com as duas técnicas, os quais evidenciaram que os genes *cys* são expressos em *X. citri* em meio rico e mínimo. Ainda, apesar de todas as proteínas não terem sido identificadas nos ensaios de proteômica, a presença da proteína ligadora periplasmática, Sbp, primeiro componente do sistema de captação, e da CysI sugere que a via é ativa. Mais importante, estes dados mostram pela primeira vez a funcionalidade de proteínas do regulon *cys* em *X. citri*, trazendo maior conhecimento sobre as vias de assimilação de enxofre nesta bactéria.

Tabela 5 - Proteínas do regulon *cys* envolvidas com a captação de sulfato e redução deste a sulfito identificadas em ensaios de proteômica em diferentes meios de cultivo.

Proteína	Gene	Função	RT-PCR		Meio de Crescimento			
			LB	M9	LB	M9	M9 1/2	XAM
SBP	xac1017	Ligadora de Sulfato	✓	✓	✓	✓	✓	
CysU/T	xac1018	Permease Sulfato	✓	✓				
CysW	xac1019	Permease Sulfato	✓	✓				
CysA	xac1020	ATPase do transportador de Sulfato	✓	✓				
CysD	xac3329	Sulfato adeniltransferase subunidade 2	✓	✓				
CysN/C	xac3328	Bifuncional: Sulfato Adeniltransferase subunidade1/ AdenilSulfato Kinase	✓	✓				
CysH	xac3332	Fosfoadenil fosfosulfato redutase	✓	✓				
CysI	xac3331	Sulfeto redutase subunidade Beta	✓	✓				✓
CysJ	xac3330	Sulfeto redutase subunidade Alfa	✓	✓				
CysG	xac2159	Siroheme sintetase						
	xac3340	Siroheme sintetase	✓	✓				

4.5 Análise da ativação do operon codificador do transportador ABC de sulfato *sbpcysWUA* de *X. citri*.

Os resultados obtidos *in vitro* evidenciaram a presença de todas as proteínas da via de sulfato em diferentes meios de cultivo. Para estudarmos a ativação do transportador do tipo ABC, primeiro complexo da via e essencial para a internalização de sulfato, realizamos ensaios de expressão com o gene repórter eGFP sob regulação da região promotora do operon *sbpcysWUA* (p1017). Estes ensaios foram realizados juntamente com a aluna de iniciação científica Cássia Roesler e a Dra. Melissa Fessel, e permitiriam a visualização da ativação do operon a partir da fluorescência da proteína eGFP. Esse gene, previamente extraído do genoma do cnidário bioluminescente *Aequorea victoria*, é amplamente empregado em diferentes aplicações, mas principalmente como gene repórter em análise de expressão gênica (CHALFIE et al., 1994). O fragmento referente à região promotora foi definido a partir da identificação no genoma da *X. citri*, dos genes do transportador ABC de sulfato e sua orientação. Conforme observado na Figura 24, o primeiro gene do operon é o gene XAC1017 (que codifica a SBP), cuja região à montante (em vermelho), foi amplificada por PCR.

observadas em microscópio de fluorescência, o que permitiu uma análise qualitativa da ativação do operon (Figura 27).

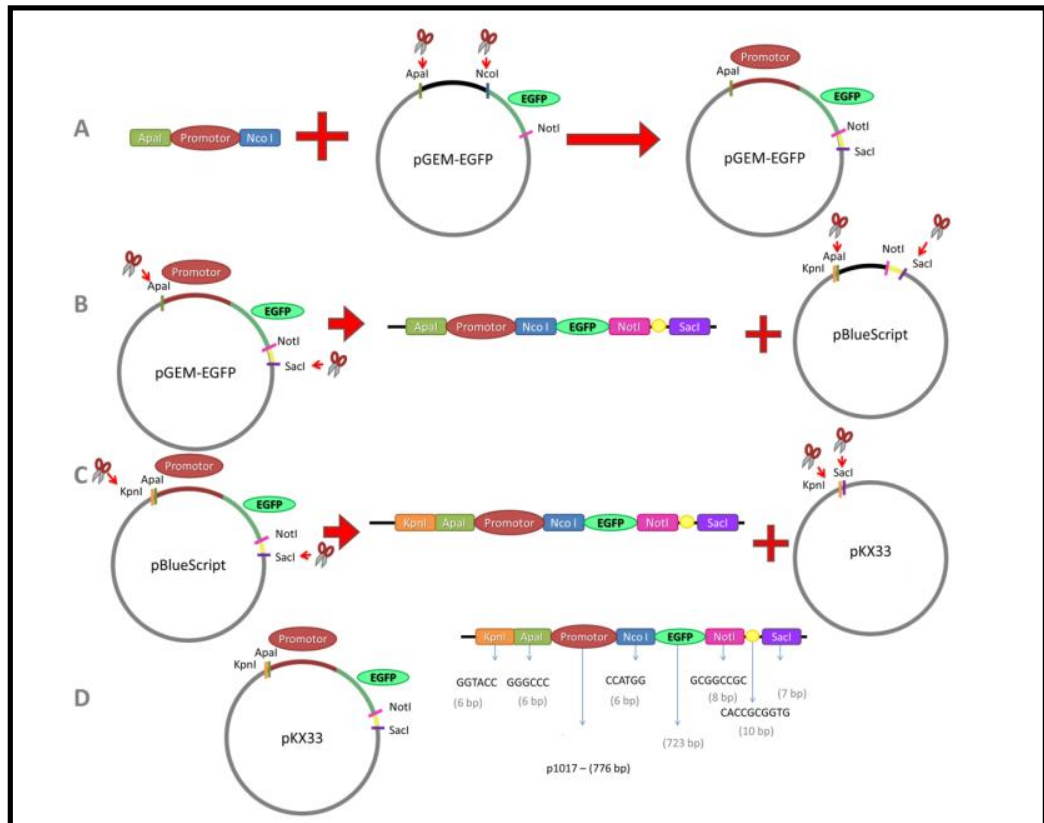


Figura 25 - Esquema geral de construção do vetor pKX33-p1017-eGFP. As tesouras indicam os sítios onde atuam as enzimas de restrição. **(A)** clonagem do fragmento contendo a região promotora p1017 à montante do gene EGFP (vetor pGEM-p1017-EGFP); **(B)** subclonagem do cassete p1017-EGFP no vetor pBlueScript, que contém o sítio da enzima de restrição *KpnI*; **(C)** subclonagem do cassete p1017-EGFP no vetor pKX33; **(D)** representação da construção final pKX33-p1017-EGFP, a ser usada na transformação de *X. citri*. Os tamanhos das regiões inseridas são mostrados ao lado do vetor final. A etapa de ligação ao vetor pGEM-T Easy e sua posterior digestão foi omitida da figura.

Posteriormente, a quantificação da fluorescência foi realizada por fluorimetria em placas de 96 poços. Em cada tempo analisado, valores de fluorescência em 485 nm sob excitação em 512 nm e de absorbância em 600 nm foram medidos a fim de se determinar a relação entre o valor de fluorescência e a absorbância da cultura. Esta normalização foi adotada como uma maneira de se evitar que o aumento na fluorescência em decorrência do acréscimo no número de células fosse interpretado

como um aumento da expressão de EGFP. O meio escolhido para os experimentos foi o meio rico LB. Para controle negativo foram realizadas as mesmas medidas em *X. citri* não transformadas conforme Figura 27.

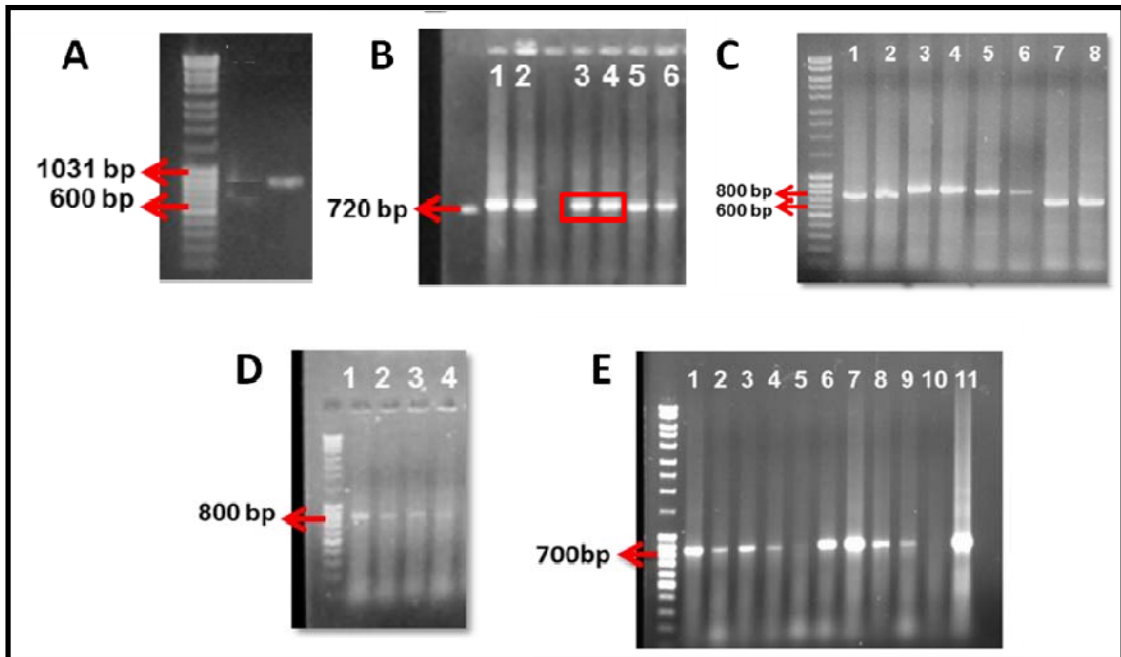


Figura 26 - Etapas da clonagem do promotor p1017 do transportador de sulfato. A) Amplificação do promotor por PCR; **B)** PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pGEM T Easy; **C)** PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pGEM-eGFP; **D)** PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pBlueScript; **E)** PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pKX33-1017-eGFP.

A ativação do operon *sbpcysWUA* de *X. citri* em meio LB é indicada pela presença da fluorescência de EGFP, sob controle do promotor p1017, em bactérias transformadas com o vetor pKX33-p1017-EGFP, a partir da análise de uma colônia crescida em placa com meio LB+ágar (Figura 27). Este resultado evidencia que o operon de captação de sulfato é ativado em meio rico, com alta concentração deste íon.

Para analisar a ativação do promotor e expressão da EGFP quantitativamente *in vitro*, determinamos os valores de fluorescência relativa para diferentes tempos a partir de uma cultura de *X. citri* portadora do plasmídeo repórter em LB (Figura 28). Os resultados mostram a ativação do promotor desde o início do cultivo, com aumento significativo da fluorescência a partir de 12 horas da inoculação bacteriana no meio

(Figura 28). Interessantemente, nota-se que a linhagem transformada cresce mais lentamente, mas ainda assim, apresenta aumento significativo na fluorescência quando comparado com a da *X. citri*. Após a verificação da ativação do promotor do operon *sbpcysWUA* em *X. citri* em meio LB, realizamos ensaios de ativação *in vivo*, após inoculação de *X. citri* transformada com o vetor pKX33-p1017-eGFP em folhas de *Citrus sinensis*. A avaliação qualitativa da fluorescência de EGFP de bactérias recuperadas das folhas indica que o promotor é ativado de forma dependente do tempo. Através dos ensaios de microscopia de fluorescência, foi possível observar ativação, referente à fluorescência de EGFP, a partir de 7 dias de infecção, que seguiu aumentando até o último dia aferido, após 18 dias do inóculo (Figura 29 C). Com essa estratégia, foi possível verificar que, apesar do aumento no número de bactérias extraídas, função de seu crescimento/multiplicação nas folhas, há um aparente aumento na fluorescência observada em cada bactéria transformada.

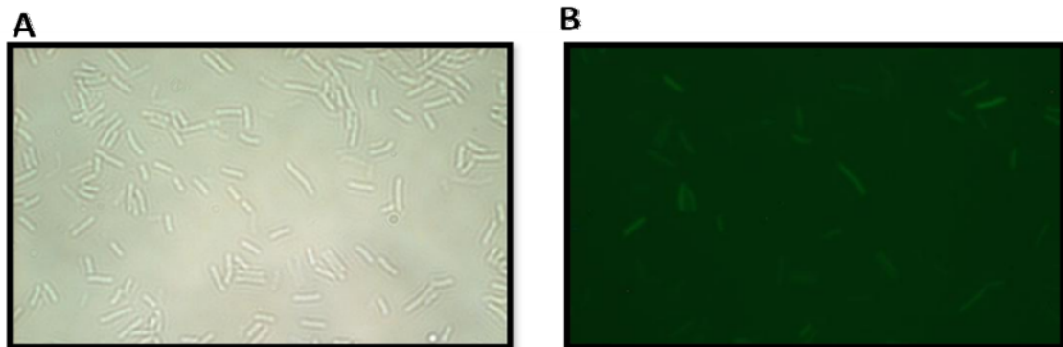


Figura 27 - Cultura de *X. citri* em meio LB observada em microscópio de fluorescência: campo claro A) e fluorescência B). Observa-se que o promotor referente ao gene do transportador de sulfato é ativado durante o crescimento das células em meio LB. As imagens foram realizadas com culturas crescidas em placa durante 12 horas.

Cabe ressaltar que não se observou fluorescência significativa em bactérias não transformadas.

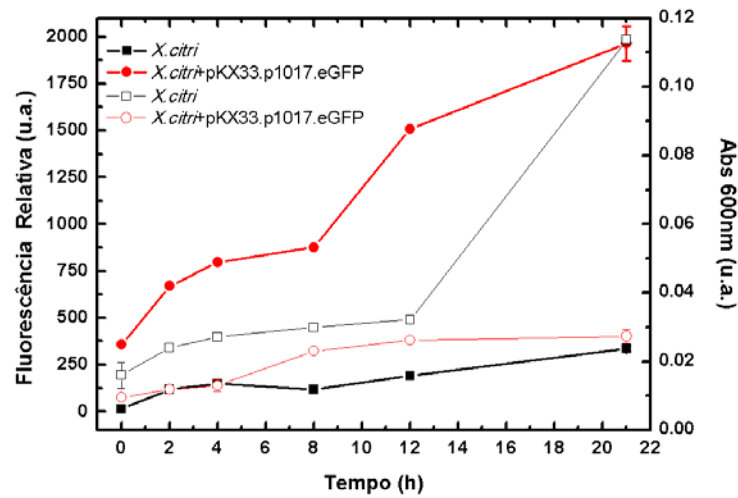


Figura 28 - Avaliação temporal da ativação do promotor p1017 em cultura de *X. citri* em meio LB. O gráfico apresenta a absorbância das culturas (de *X. citri* e *X. citri* transformada com o vetor pKX33-p1017-EGFP (caracteres vazios) e os valores de fluorescência da EGFP em unidades arbitrárias (u.a.) (caracteres cheios) mostrando aumento da fluorescência relativa (valores de fluorescência de EGFP normalizados pela absorbância em 600 nm) 12 horas após a inoculação da mesmo em meio LB.

Para a quantificação da fluorescência durante o crescimento da bactéria na planta, os valores de fluorescência foram medidos das bactérias extraídas das folhas e normalizados pela concentração de proteínas totais do extrato. Mais uma vez, tal relação foi adotada como uma maneira de se evitar que o aumento na fluorescência em decorrência do aumento no número de células fosse interpretado como um aumento da expressão de EGFP.

A curva temporal de fluorescência de *X. citri* transformada com pKX33-p1017-EGFP e extraída de *C. sinensis* infectada está apresentada na Figura 30 e revela o aumento de fluorescência relativa a partir do 3º dia após a infecção, o que corresponde ao início da fase logarítmica de crescimento da bactéria, conforme avaliado por Araújo e colaboradores (submetido). Os resultados obtidos, por terem sido normalizados em função da concentração protéica do extrato bacteriano (medida indireta da densidade celular), indicam o aumento na fluorescência por bactéria individual, como mostrado na Figura 29. Como os dados sugerem início da ativação do promotor em momento coincidente com o aumento da população de bactérias, é possível que a necessidade da importação de sulfato seja aumentada em fase de divisão bacteriana, ou que haja

alguma condição nutricional ou regulatória no início da fase logarítmica do crescimento de *X. citri* que requeira a ativação do promotor p1017. O experimento foi finalizado aos 18 dias haja visto que, devido a grande quantidade de bactérias inoculadas (D.O. 600nm= 0,3), havia abscisão foliar.

Conjuntamente, estes resultados evidenciam que o promotor p1017 é ativado tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo* sugerindo de forma inédita, juntamente com os dados de proteômica e RT-PCR apresentados, que a via de sulfato é ativa e funcional em *X.citri*.

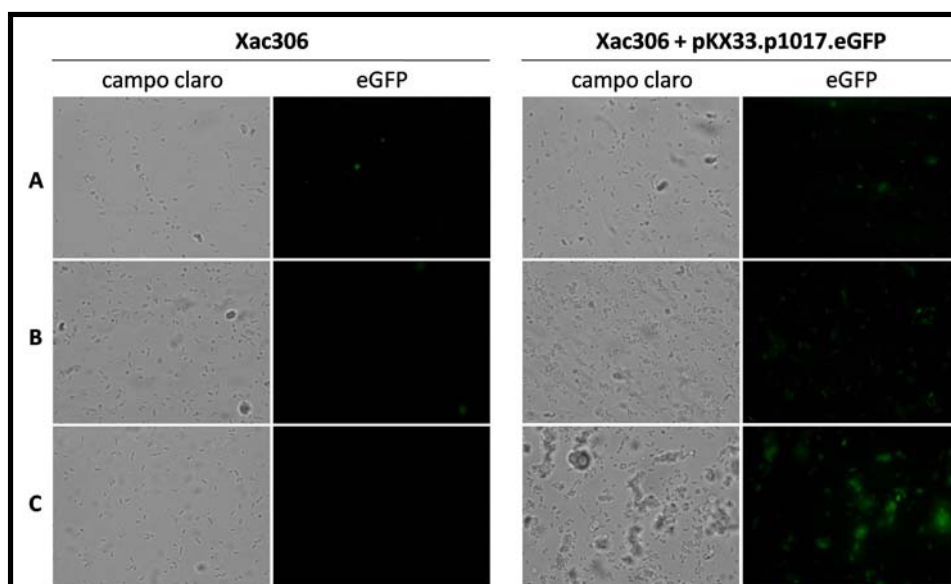


Figura 29 - Microscopia de células de *X. citri* para avaliação qualitativa da ativação do promotor p1017 do operon *sbcysWUA*. Observação da recuperação bacteriana em campo claro e escuro da bactéria selvagem e transformada com **A)** 7 dias após a infecção; **B)** 10 dias após a infecção; **C)** 18 dias após infecção. Em tempos de infecção inferiores a 7 dias, não foi possível observar fluorescência por microscopia.

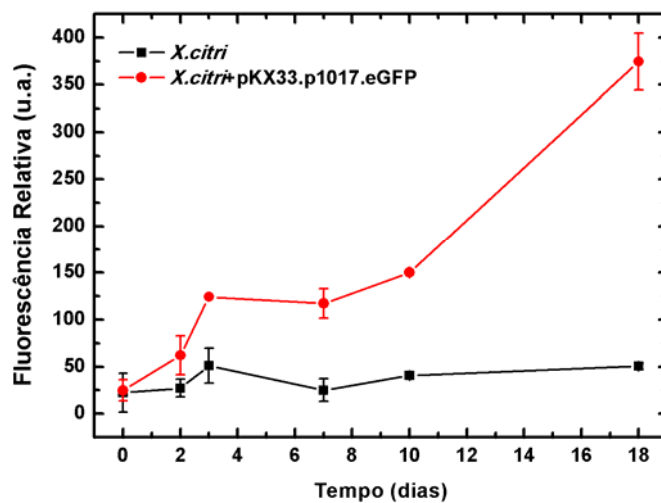


Figura 30 - Avaliação da ativação do promotor p1017 de *Citrus sinensis* infectada com *X. citri* transformada com pKX33-p1017-eGFP. O gráfico apresenta os valores de fluorescência da EGFP em unidades arbitrárias (u.a.) que foram normalizados pela quantidade de proteínas totais da amostra. Como controle negativo, *X. citri* não transformada foi utilizada para infectar folhas de *C. sinensis* e analisadas da mesma forma.

PARTE III - PRODUÇÃO E ANÁLISES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS DA VIA

4.6 Clonagem molecular dos genes *sbp*, *cysD*, *cysNC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysG_2159* e *cysG_3340*

Com o objetivo de produzirmos as proteínas da via de assimilação de sulfato de *X. citri* para estudos funcionais e estruturais, oligonucleotídeos de todos os genes foram desenhados e usados nas reações de amplificação através da reação em cadeia da polimerase. Os genes *cysU* e *cysW* que codificam as proteínas de membrana e Cys A que é a ATPase do transportador ABC foram excluídos desta análise e limitaram-se às análises de bioinformática apresentadas no início deste trabalho. A Tabela 6 mostra a lista dos genes e a massa molecular correspondente dos fragmentos e das proteínas de forma a facilitar as análises dos géis.

Tabela 6 - Características dos genes e respectivas proteínas da via de captação e assimilação de sulfato de *X. citri* usados como alvo neste projeto. Dados obtidos no servidor KEGG.

Proteína	Gene	Função anotada	Número de Nucleotídeos	Número de resíduos de aminoácidos
SBP	xac1017	Ligadora de Sulfato	1017	338
CysU/T	xac1018	Permease Sulfato	861	286
CysW	xac1019	Permease Sulfato	954	317
CysA	xac1020	ATPase do transportador de Sulfato	1038	345
CysD	xac3329	Sulfato adeniltransferase subunidade 2	909	302
CysNC	xac3328	Bifuncional: Sulfato Adeniltransferase subunidade1/ AdenilSulfato Kinase	1977	658
CysH	xac3332	Fosfoadenil fosfosulfato redutase	726	241
CysI	xac3331	Sulfeto redutase subunidade Beta	1707	568
CysJ	xac3330	Sulfeto redutase subunidade Alfa	1848	615
CysG	xac2159	Siroheme sintetase	978	325
	xac3340	Siroheme sintetase	1272	423

Depois de inúmeras tentativas de amplificação, incluindo síntese de novos oligonucleotídeos, os 8 genes alvo do sistema foram amplificados conforme apresentados na Figura 31. As amplificações foram conferidas em géis de agarose 0.8% corados com Brometo de Etídio. Os genes *cysI* e *cysD* (Figura 31, C e D,

respectivamente), foram amplificados de forma inespecífica e mesmo após diferentes tentativas utilizando condições variadas na PCR, não foi possível melhorar a qualidade da amplificação. De qualquer modo, os fragmentos de interesse amplificados foram eluídos e usados para a clonagem no vetor pGEM T-Easy (Promega).

Algumas das condições testadas são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise comparativa dos resultados positivos provenientes da variação das condições da PCR para otimização da reação dos diversos genes do regulon *cys*.

Variação do Gene	<i>sbp</i>	<i>cysD</i>	<i>cysNC</i>	<i>cysH</i>	<i>cysI</i>	<i>cysJ</i>	<i>cysG_2159</i>	<i>cysG_3340</i>
Concentração de DNA	✓	✓			✓		✓	
Gradiente de Temperatura	✓	✓			✓			
Varição - Cofator enzimático								
Adição DMSO	✓	✓		✓	✓		✓	✓
Adição Glicerol								
Varição da [] de DNTP								
Varição Taq Polimerase	✓			✓				✓
Redesenho dos primers	✓		✓			✓		

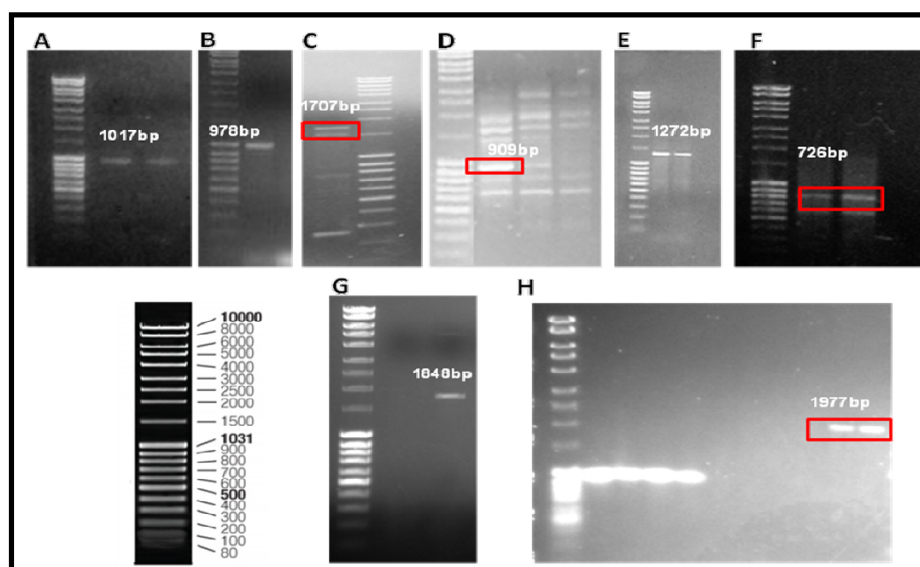


Figura 31 - Amplificação por PCR dos genes da via de sulfato *sbp*_XAC1017 **A**); *cysG1*_XAC2159; **B**) *cysI*_XAC3331 **C**); *cysD*_XAC3329 **D**); *cysG2*_XAC3340 **E**), *cysH*_XAC3332 **F**), *cysJ*_XAC3330 **G**) e *cysNC*_XAC3328 **H**). O marcador de massa molecular é o #SM0403 da Fermentas e a massa de cada fragmento é indicada.

Com exceção dos genes *cysJ_3330* e *cysH_3332*, que não ligaram no vetor pGEM T-Easy, e do gene *cysNC* que apresentou muitas mutações, todos os demais foram clonados com confirmação por análise de restrição e seqüenciamento conforme Figura 32.

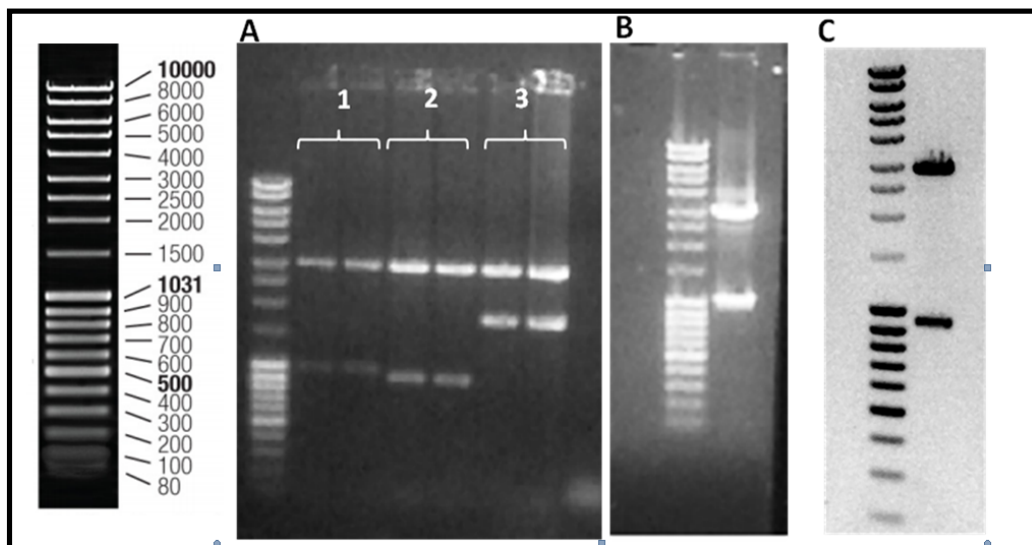


Figura 32 - Digestão enzimática do vetor pGEM-TEasy com suas respectivas enzimas de restrição mostrando os insertos obtidos. 1 e 5: Marcador de massa molecular - #SM0403 – Fermentas; **A)** Vetor pGEM-TEasy digerido com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* mostrando os insertos de *cysG2_XAC2159* (1), *cysD_XAC3329* (2) e *cysI_XAC3331* (3). **B)** Vetor pGEM-TEasy digerido com *NdeI* e *BamHI* mostrando o inserto *cysG_XAC3340* e **C)** Vetor pGEM-TEasy digerido com *NdeI* e *HindIII* mostrando *sbp_1017*.

Posteriormente os insertos foram extraídos do gel de agarose e sub-clonados no vetor de expressão pET28a previamente digerido com as enzimas de restrição específicas. Dos genes amplificados, quatro foram clonados no vetor de expressão: *sbp*, *cysD*, *cysG_2159* e *cysI*, conforme mostrado na Figura 33.

Cepas de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas para início dos testes de expressão das proteínas recombinantes sob controle de um agente indutor (IPTG). As proteínas CysG_2159 e CysI não expressaram na bactéria. A partir destes resultados, devido ao pouco tempo para realização dos experimentos do mestrado e após uma análise criteriosa, definimos como prioridade o trabalho com as proteínas Sbp e CysD, uma vez que estas são consideradas bons alvos para o desenvolvimento de inibidores.

São duas as estratégias de bloqueio da via que nos interessam: (i) o bloqueio da entrada do sulfato, ainda no periplasma, através da inibição da atividade da proteína ligadora periplasmática Sbp, responsável pelo primeiro passo de assimilação do sulfato, que é a captura do íon e liberação no poro na membrana, constituído por duas permeases. A inativação desta proteína leva à sérias deficiências na assimilação de sulfato, com efeitos drásticos para o microrganismo; e (ii) inativação da atividade da enzima CysD, envolvida na redução de sulfato a PAPS, passo fundamental na síntese de cisteína. Além de apresentar sítios para interação com substratos, esta enzima apresenta regiões de interação proteína/proteína que podem ser usadas como alvo para o bloqueio.

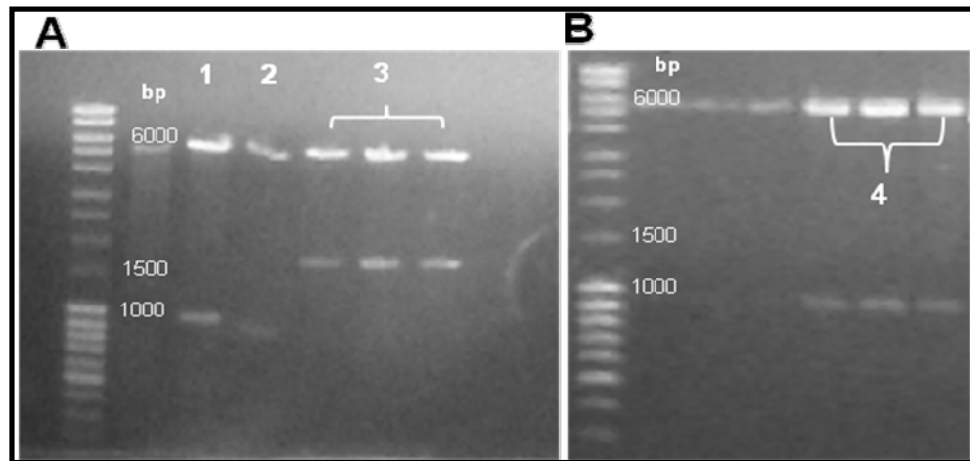


Figura 33 - Digestão enzimática do vetor pET28a com suas respectivas enzimas de restrição mostrando os insertos obtidos. A) 1, 2, e 3 Vetor pET28a digerido com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* mostrando os insertos de *cysG2_XAC2159*, *cysD_XAC3329* e *cysI_XAC3331*, respectivamente. B) Vetor pET28a digerido com *NdeI* e *HindIII* mostrando o inserto *sbp_1017* (4).

4.7 Produção da proteína recombinante CysD

Os ensaios de expressão em meio de cultivo LB acrescido de canamicina foram realizados em diferentes temperaturas e tempos de indução: 37 °C (2 horas), 30 °C (4 horas), 25 °C (7 horas) e 18 °C (20 horas, dados não mostrados). Outros fatores como a concentração final do agente indutor no meio (IPTG) e as condições de aeração da

cultura também foram avaliados (dados não mostrados). Em todos os testes a proteína foi expressa nas frações insolúveis, como mostra a Figura 34.

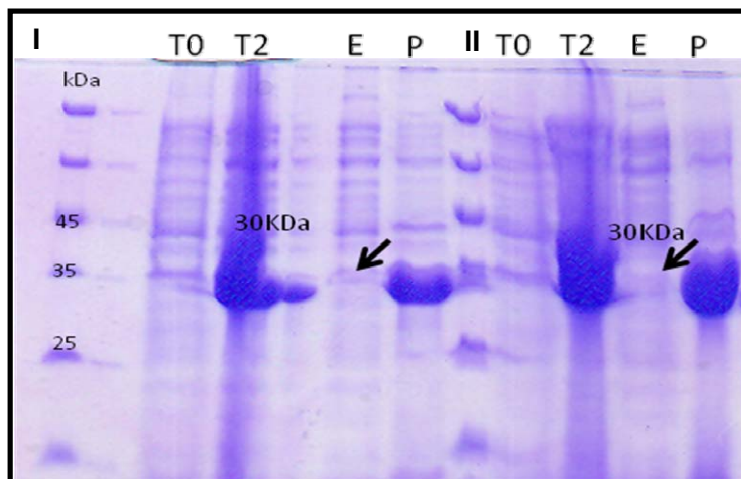


Figura 34 - Resultados dos testes de expressão da proteína CysD de *X. citri* em *E. coli* BL21 (DE3). A seta indica a presença da proteína de 31 kDa nos corpúsculos de inclusão bacterianos nas temperaturas 30°C (I) e 18°C (II). **T0:** Cultura não induzida, **T2:** Cultura induzida com 1mM de IPTG, **E:** Fração Solúvel após extração e **P:** Fração Insolúvel após extração.

Após as diferentes tentativas não foi possível melhorar as condições de expressão da proteína CysD e os esforços foram aplicados na produção da proteína Sbp.

4.8 Produção da proteína recombinante Sbp

Os ensaios de expressão da Sbp foram realizados em meio de cultivo LB nas temperaturas de 37 °C (2 horas) e 30 °C (4 horas). A proteína foi expressa na forma solúvel nas condições analisadas e apresentou massa molecular compatível com a esperada de 37.5 kDa (Figura 35). Como a proteína teve alto rendimento em todas as condições, padronizou-se o tempo de 2 horas a 37 °C para produção da mesma.

A partir da expressão da Sbp, a proteína foi submetida à purificação em duas etapas. Na primeira foi realizada a cromatografia de afinidade por níquel utilizando-se coluna pré-empacotada HiTrap® (GE, USA), acoplada ao sistema AKTA-FPLC (GE), previamente equilibrada com o tampão. Esta etapa foi realizada devido à presença de

uma cauda contendo 6 histidinas (6His) nas proteínas recombinantes, o que auxilia nos seu processo de purificação. Após o gradiente de imidazol as frações eluídas foram monitoradas em SDS-PAGE 12 %. As proteínas recombinantes foram eluídas com alto grau de pureza mas ainda com a presença de alguns contaminantes (Figura 36 B). Neste caso, procedemos com uma segunda purificação utilizando-se uma coluna de exclusão molecular (Super 16/60 200 de 120 mL), que adicionalmente, deu indicativos de monodispersividade da amostra. Como mostra a Figura 36 D o resultado final é a obtenção da proteína com alto grau de pureza e rendimento médio de 20 mg de proteína/500 mL de cultura induzida. A polidispersividade das amostras foram calculadas entre 11 e 13%, confirmadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Figura 36E).

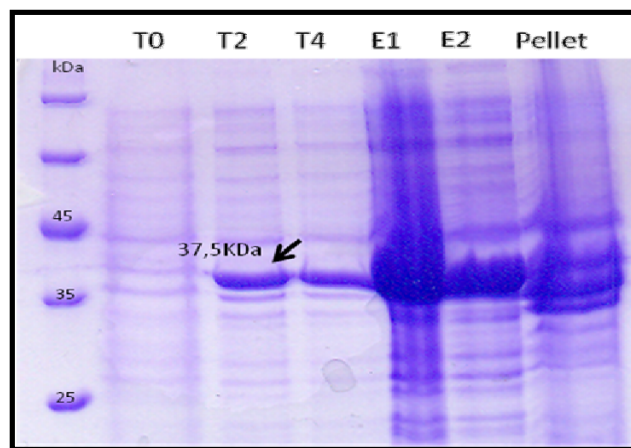


Figura 35 - Análise da expressão da proteína Sbp (37.5 kDa) de *E. coli* BL21(DE3) por SDS-PAGE 12%. 1. Marcador de peso molecular (Fermentas - SM0431), T0. Extrato celular total de cultura não induzida (Tempo zero); T2. Amostra de extrato celular de cultura induzida durante 2 horas a 37° C, T4. Extrato celular total de cultura induzida durante 4 horas a 30 °C. E1: Extrato celular fração solúvel (37° C, 2 horas); E2: Extrato celular fração solúvel (30 °C 4 horas); P: fração insolúvel (30 °C, 4 horas).

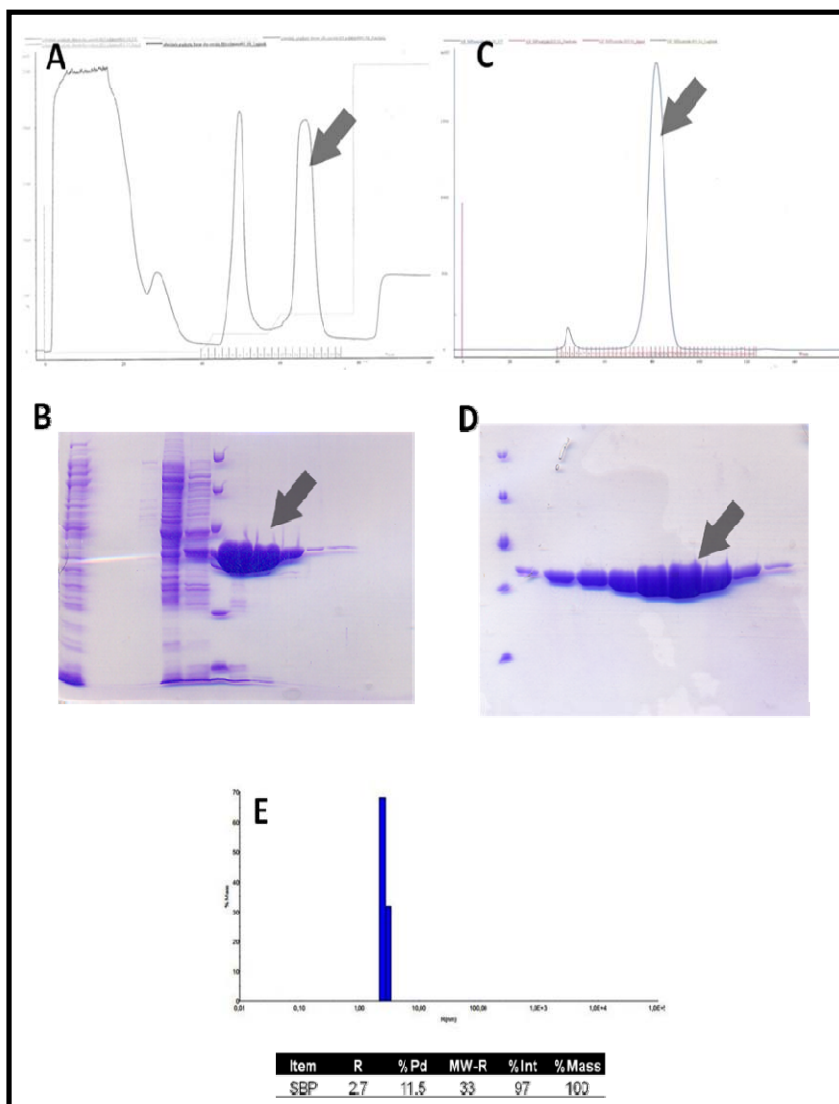


Figura 36 - Etapas de purificação da proteína Sbp de *X. citri*. **A)** Cromatograma de afinidade por Níquel no aparelho AKTA-FPLC; **B)** Visualização em SDS-PAGE 12 % da afinidade realizada mostrando a separação do contaminante (primeiro pico) da proteína (segundo pico); **C)** Cromatograma da exclusão molecular evidenciando a monodispersividade da amostra; **D)** Gel de SDS-PAGE 12 % evidenciando a obtenção da proteína pura e em alto rendimento; **E)** Perfil da proteína após a análise de DLS evidenciando seu estado puro e monodisperso, ideal para os estudos biofísicos e de cristalização.

4.9 Ensaios de dicroísmo circular para análise do conteúdo de estrutura secundária e estabilidade térmica da Sbp de *X. citri*

Para verificar se a proteína Sbp de *X. citri* expressa em *E. coli* apresentava-se enovelada e estável, realizamos ensaios de dicroísmo circular. Os ensaios revelaram

que a proteína Sbp apresenta enovelamento característico de proteínas periplasmáticas com topologia α/β de acordo com os picos negativos observados em 208 e 222 nm, e que a proteína não apresenta ganho de estrutura secundária na presença de sulfato de amônio e de magnésio, nem com sulfato de sódio ou molibdato de sódio que foi utilizado para controle do experimento (Figura 37A). Este resultado sugere que a interação da Sbp com o íon sulfato não é associado ao ganho de estrutura secundária, conforme evidenciado em outras proteínas periplasmáticas devido ao fechamento dos domínios (BALAN et al., 2008; HE; QIOCHO, 1991) De fato, baseados em ensaios de dinâmica molecular da proteína Sbp na forma fechada, porém sem o ligante, não foi possível verificar alteração conformacional significativa, ou mesmo a abertura dos domínios com ganho perda estrutural (dados não mostrados). Por outro lado, a interação da Sbp com o sulfato também foi avaliada em ensaios de estabilidade térmica mensurados através do monitoramento de sinal a 222 nm durante a varredura de 10 ° a 105 °C. Usualmente, a interação de proteínas com seus respectivos ligantes ou substratos leva ao aumento na estabilidade térmica devido a um aumento no número de interações estabelecidas entre ligante e proteína. Segundo o nosso modelo, a Sbp de *X. citri* deve estabelecer ao menos 6 novas ligações de hidrogênio com o íon sulfato (Figura 37C). Os resultados apresentados na Figura 37B evidenciam um aumento na T_m da Sbp de aproximadamente 10 °C quando a proteína está na presença do íon sulfato de amônio ($T_m= 65$ °C) em relação a proteína na ausência do mesmo ($T_m= 55$ °C). Com exceção do molibdato de sódio, todos os demais sais testados (contendo sulfato) levaram a um aumento da estabilidade térmica da Sbp, confirmando sua afinidade pelo íon.

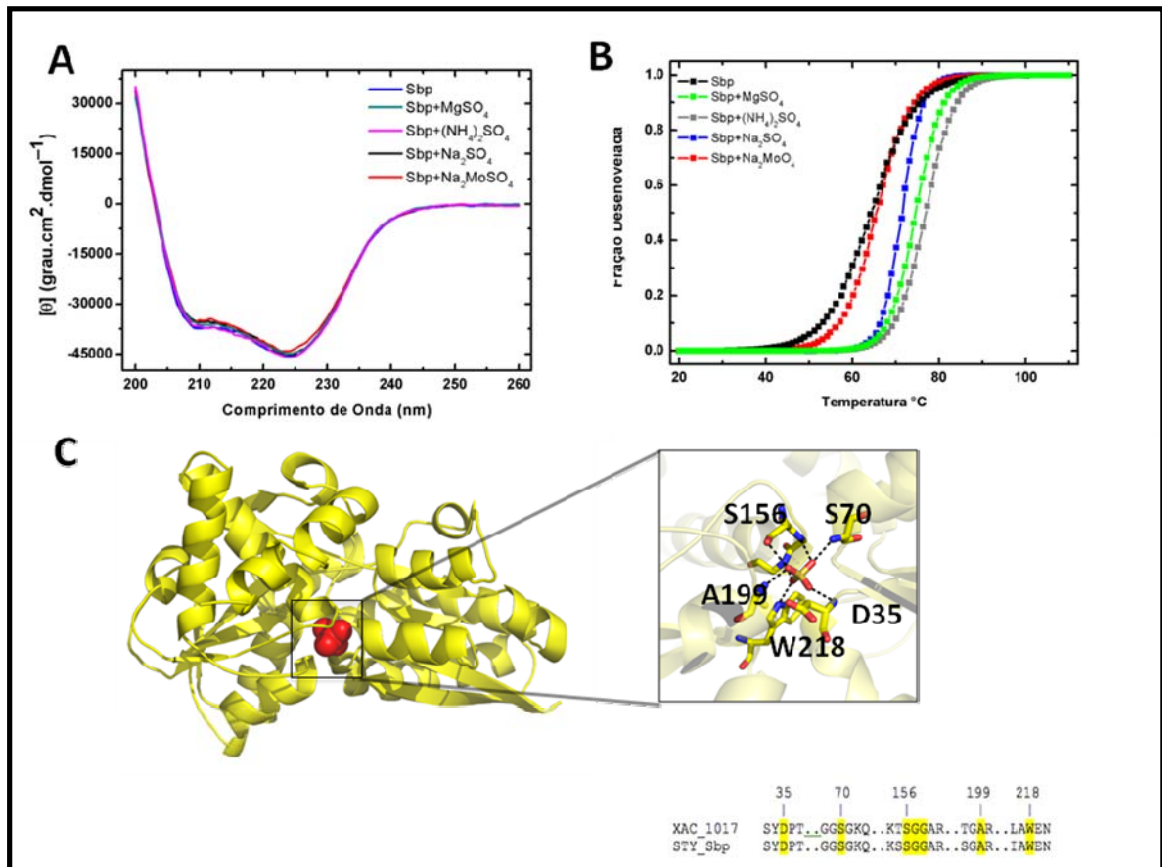


Figura 37 - Análises biofísicas da proteína Sbp para estudos de interação com o íon sulfato. A) Espectro de Dicroísmo circular e desenvolvimento da proteína Sbp na presença e ausência de sais de sulfato. Molibdato de Sódio foi usado como controle negativo da interação. **B)** Desenovelamento térmico da Sbp em presença e ausência de sais de sulfato e molibdato de sódio. **C)** Modelo tridimensional do ortólogo de *S. typhimurium* (PDB: 1SBP), evidenciando os possíveis resíduos conservados que devem interagir com o ligante.

4.10 Estudos de interação da Sbp com sulfato utilizando titulação calorimétrica (ITC)

Para verificarmos a interação da Sbp com sulfato foram realizados experimentos de titulação calorimétrica (ITC) usando como ligante sulfato de Magnésio. Várias curvas preliminares foram realizadas para determinação da melhor relação entre a concentração de proteína e ligante chegando na condição 50 μM de proteína e 200 μM de ligante com realização do experimento a 15 $^{\circ}\text{C}$, visto que em temperaturas mais

elevadas ocorreu precipitação da proteína. A curva apresentada na Figura 38 mostra que há diminuição da troca de calor desde a primeira adição do sulfato de magnésio, levando à estabilização a partir da 20ª injeção, o que seria o equivalente à aproximadamente 48 μM de ligante. Estes dados confirmam a estequiometria esperada de 1 sítio na proteína para cada molécula de ligantes. Os resultados ainda evidenciam a interação da Sbp com sulfato de magnésio numa reação endotérmica, diferentemente do que fora observado para outras proteínas periplasmáticas (DAVIDSON et al., 2008).

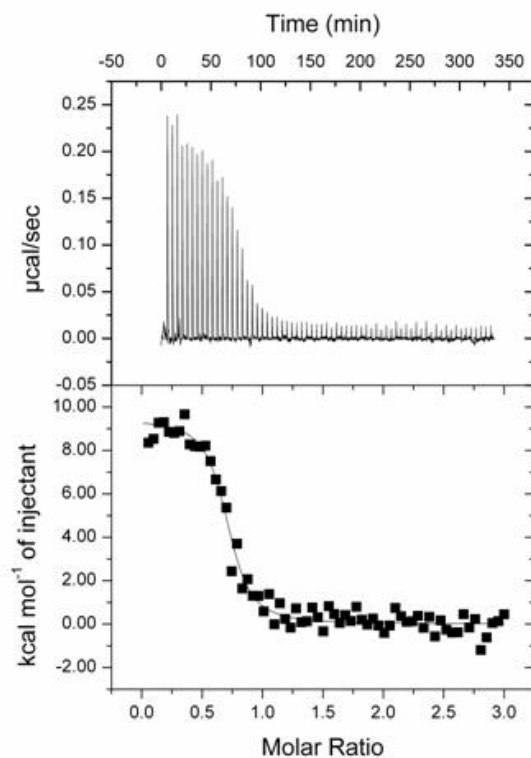
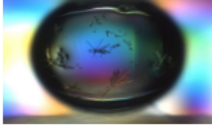
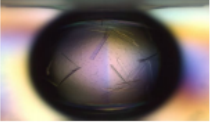
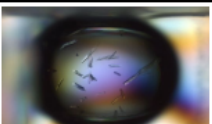
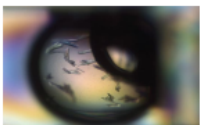

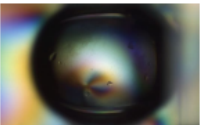


Figura 38 - Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da Sbp na presença de sulfato de magnésio evidenciando uma interação do tipo endotérmica. Foram aplicadas 27 injeções seqüenciais de 3 μL de sulfato de magnésio (200 μM) na amostra de 50 μM de Sbp em 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl. Os dados (quadrados pretos) foram ajustados para um sítio na proteína e a linha contínua representa o melhor ajuste. Os valores termodinâmicos foram calculados como: $N = 0.702$ sítios; $K_d = 7.16 \text{ E}6 \pm 2.95 \text{ E}5 \text{ mol}^{-1}$; $\Delta H = 9438 \text{ cal/mol}$ e $\Delta S = 64.1 \text{ cal/mol/deg}$.

4.11 Ensaios de cristalização Sbp

Após a confirmação da expressão da Sbp na forma enovelada e com atividade de interação com o sulfato, realizamos ensaios de cristalização com o intuito de obtermos dados para a caracterização estrutural desta proteína. A proteína foi submetida aos ensaios de cristalização em diferentes 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*), em três concentrações diferentes (8, 12 e 26.6 mg/ml), totalizando 1632 condições. A tabela 8 mostra alguns cristais obtidos em diferentes condições de cristalização, essencialmente em forma de agulhas e pequenos bastões. É interessante ressaltar que obtivemos cristais tanto na presença como ausência de sulfato, e que isso abre a possibilidade de obtermos a estrutura da proteína nas conformações aberta e fechada, algo inédito. Foram visualizadas um total de 83,01% de gotas claras, 10,09% de gotas com muito precipitados e 6,8% de cristais em forma de agulha (Quadro 1). Os cristais foram irradiados na linha MX2 do LNLS, em Campinas, mas apresentaram resolução muito baixa em torno de 3.5 Å (Figura 39 A e B). Adicionalmente, tivemos problemas de instabilidade do feixe durante a coleta, o que comprometeu o processamento dos dados de difração. Conseguimos identificar o grupo espacial tetragonal trapezoidal.P4212, mas não foi possível obter uma boa solução durante a substituição molecular, utilizando o ortólogo de *S. typhimurium* (PDB: 1SBP), que apresenta 61% de identidade com a Sbp de *X. citri*. Os refinamentos iniciais já foram realizados com algumas condições mais promissoras, porém o padrão de cristais na forma de agulha tem sido predominante. Nos refinamentos estamos testando variações de temperatura, concentração da proteína, concentração da solução mãe, pH, uso de aditivos, entre outros. O melhoramento dos cristais e obtenção desta estrutura serão ensaios futuros para o doutoramento.

Quadro 1 - Cristais da proteína Sbp de *X. citri* na presença e ausência do ligante Sulfato

Proteína	Condição	Cristais	Observação
12 mg/mL em 10mM Tris pH8	Sal: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,20 M Tampão: cacodilato de sódio 0,10 M pH 6,50 Precipitante: PEG 8.000 30%		Screening inicial; Gota 1µL+1µL; Sitting drop;
12 mg/mL em 10mM Tris pH8	Tampão: Tris 0,10 M pH 8,00 Precipitante: PEG 6.000 20%		Screening inicial; Gota 1µL+1µL;
8 mg/mL em 10mM Tris pH8	Tampão: Tris 0,10 M pH 8,00 Precipitante: PEG 6.000 20%		Refinamento; Gota 1µL+1µL; Sitting drop;
26.6 mg/mL em 10mM Tris pH8	Tampão: Tris 0,10 M pH 9,00 Precipitante: PEG 6.000 20%		Refinamento; Gota 1µL+1µL; Sitting drop;
8.9 mg/mL em 6,7 mM Tris pH 8 + 0,3 mM MgSO4	Tampão: Tris 0,1 M pH 7,5 Precipitante: PEG 6.000 20%		Refinamento; Gota 2µL+2µL; hanging drop;
26.6 mg/mL em 10mM Tris pH8	Sal: sulfato de amônio 2M Tampão: acetato de sódio 0,1M pH 4,6		Screening inicial; Gota 1µL+1µL;

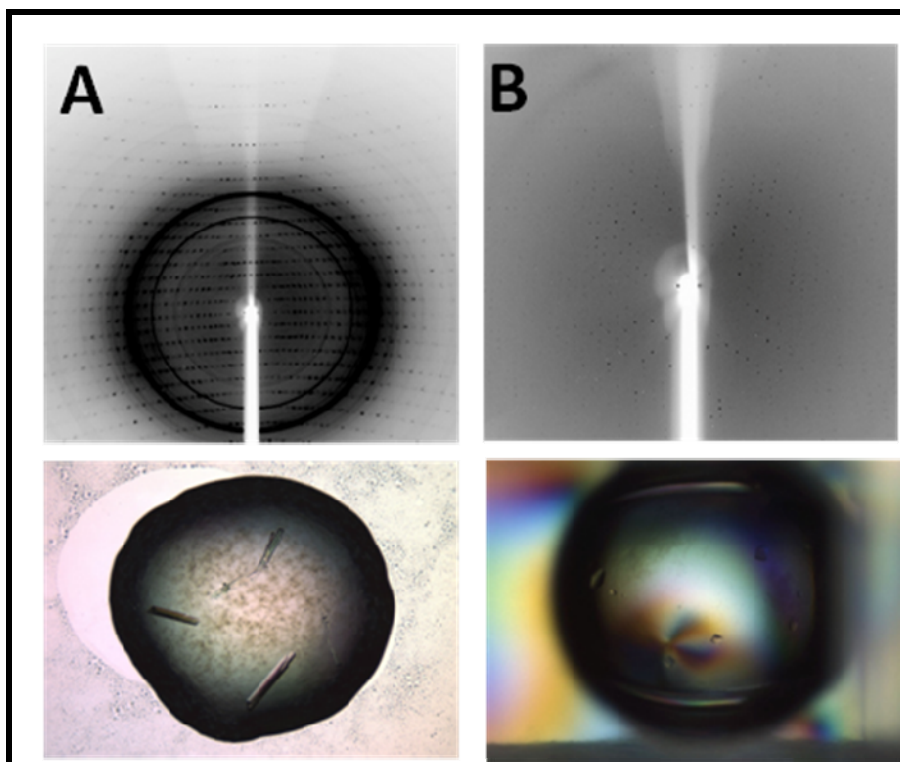


Figura 39 - Cristais de Sbp e padrão de difração obtidos na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas. A) Padrão de difração dos cristais de SBP com 1.9 Å de resolução e presença de twinning, e B) Padrão de difração dos cristais a 3.5 Å.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram pela primeira vez, um conjunto de evidências da presença e ativação da via de captação e assimilação de sulfato na bactéria fitopatogênica *X. citri*. Ainda, foram realizadas análises de todas as proteínas da via em questão com foco na proteína ligadora periplasmática, primeiro componente da via, que pode ser usado como um alvo para o desenvolvimento de inibidores. Estes dados levaram-nos a concluir:

a) os ensaios de bioinformática, modelagem molecular, alta identidade de seqüências entre os ortólogos e conservação de resíduos presentes em sítios funcionais, permitiram concluir que a via de assimilação e conversão de sulfato a sulfeto está completa em *X. citri*, o que inclui um sistema de transporte do tipo ABC para internalização do sulfato e todas as enzimas para a conversão do mesmo em sulfeto;

b) a via completa com todas as enzimas surgiu a partir do ramo filogenético que deu origem às alfa, beta e gama-proteobactérias, o que pode estar associada à forma de vida e conquista de novos ambientes por estas bactérias;

c) a ativação do transportador do tipo ABC de sulfato e de todas as proteínas da via foi evidenciada tanto em meio rico como mínimo, evidenciando a importância deste sistema para o crescimento da bactéria. Ainda, a ativação do operon que codifica o transportador ABC de sulfato *in vivo*, durante a infecção de folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) mostra que a captação deste íon também é importante para a infecção;

d) das proteínas da via, somente a Sbp foi obtida na forma solúvel, estável e pura, o que permitiu a realização dos estudos biofísicos que evidenciaram sua interação com o sulfato em uma reação de alta afinidade ($K_d = 7.16 \text{ E}^6 \pm 2.95 \text{ E}^5 \text{ mol}^{-1}$) e aumento da estabilidade térmica em cerca de 10°C;

e) cristais da Sbp foram obtidos em diferentes condições, inclusive na ausência de sulfato, o que é inédito, e estão em fase de refinamento para a determinação da estrutura tridimensional da proteína; Dado que este sistema se mostrou importante

para o crescimento e infecção da bactéria, a estrutura desta proteína, que é o primeiro componente da via, pode ser um excelente objeto de estudo para o desenvolvimento de inibidores de crescimento da bactéria.

REFERÊNCIAS*

ARAUJO, F. T.; SANCHES, M.; PEREIRA, C. T.; FERREIRA, L. C. S.; CHIGARDZE, D.; BOLANOS-GARCIA, V.; BLUNDELL, T. L.; BALAN, A. SsuA, the alkanesulfonate-binding protein from *Xanthomonas citri* is essential for citrus canker. Submetido a **PLoS One**.

ARLAT, M.; GOUGH, C. L.; BARBER, C. E.; BOUCHER, C.; DANIELS, M. J. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of hrp genes related to the larger hrpcluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 593–601, 1991.

BALAN, A.; ARAÚJO F. T.; SANCHES, M.; FERREIRA, L. C. S.; CHIGARDZE, D.; BOLANOS-GARCIA, V.; BLUNDELL, T. L.; BARBOSA, J. A. G. R. Crystal structure of the alkanesulfonate binding protein (SsuA) from the phytopathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* bound to HEPES, **Protein Data Bank**, entry 3E4R, 2008.

BARBOSA, R.; BENEDETTI, C. BigR, a Transcriptional Repressor from Plant-Associated Bacteria, Regulates an Operon Implicated in Biofilm Growth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 6185–6194, 2007.

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.

BERENDT, U.; HAVERKAMP, T.; PRIOR, A.; SCHWENN, J. D. Reaction mechanism of thioredoxin: 3'-phospho-adenylsulfate reductase investigated by site-directed mutagenesis. **Eur. J. Biochem.**, v. 233, p. 347-356, 1995.

BHAVE, D. P.; MUSE, W. B.; CARROLL, K. S. Drug targets in mycobacterial sulfur metabolism. **Infect. Disord. Drug Targets**, v. 7, p. 140-158, 2007.

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

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

* De acordo com:

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

- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 141-157, 2003.
- BUTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiol.**, v. 34, p. 107–133, 2010.
- CHARTRON, J. K. S.; CARROLL, C.; SHIAU, H.; GAO, J. A.; LEARY, C. R.; BERTOZZI, J.; STOUT, C. D. Substrate recognition, protein dynamics, and iron-sulfur cluster in *Pseudomonas aeruginosa* adenosine 5-phosphosulfate reductase. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 152–169, 2006.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.; PRASHER, D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CRANE, B. R.; SIEGEL, L. M.; GETZOFF, E. D. Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. **Science**, v. 270, p. 59-67, 1995.
- DANGL, J. L. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. **Current top Microbiol. Immunol.**, v. 192, p. 99-118, 1994.
- DAS, A. K. Citrus canker: a review. **J. Appl. Hort.**, v. 5, p. 52-60, 2003.
- DAVIDSON, A. L.; MALONEY, P. C. ABC transporters: how small machines do a big job. **Trends Microbiology**, v. 5, p. 171-191, 2007.
- DAVIDSON, A. L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 72, p. 317-364, 2008.
- 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.
- DREYFUSS, J.; PARDEE, A. B. Regulation of sulfate transport in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 6, p. 2275-2280, 1966.
- DREW, D.; LERCH, M.; KUNJI, E.; SLOTBOOM, D. J., DE GIER, J. W. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. **Nat. Methods**, v. 3, p. 303-313, 2006.
- 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* serovar. **Typhimurium Infect. Immun.**, v. 72, p. 3310-3314, 2004.

EICHHORN, E.; VAN DER PLOEG, J. R. Sulfonate-sulfur metabolism and regulation I *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.**, v. 172, p. 1- 8, 2002.

FACINCANI, A. P. **Análise proteômica do fitopatógeno (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2007. 170 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 5, p. 26-33, 2001.

FUNDECITRUS. **Histórico do Cancro cítrico**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Historico,46>>. Acesso em: 05 nov. 2011.

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

GIJSEGEM, F.; GENIN, M. N.; BOUCHER, C. Conversation of secretion pathway for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 1, p. 175-180, 1993.

GOLDBURG, W. I. Dynamic Light Scattering. **American Journal of Physics**, v. 67, p. 1152-1164, 1994.

GHOSH, P. Process of protein transport by the type III secretion system. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 68, p. 771–795, 2004.

GOTTESMAN, M. M.; AMBUDKAR, S. V. Overview: ABC transporters and human disease. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 33, p. 453-458, 2001.

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. 4358, p. 1-18, 2009.

GRANT, S. R.; FISHER, E. J.; CHANG, J. H.; MOLE, B. M.; DANGL, J. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 425–449, 2006.

GUILLOUARD, I.; AUGER, S.; HULLO, M. F.; CHETOUANI, F.; DANCHIN, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Identification of *Bacillus subtilis* CysL, a regulator of the *cysJI* operon, which encodes sulfite reductase. **J. Bacteriol.**, v. 148, p. 4681-4689, 2002.

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. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 434-442, 2005.

HAVERKAMP, T.; SCHWENN, J. D. Structure and function of a *cysBJIH* gene cluster in the purple sulphur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. **Microbiology**, v. 1, p. 115-125, 1999.

HE, J. J.; QUIOCHO, F.A. A nonconservative serine to cysteine mutation in the sulfate-binding protein, a transport receptor. **Science**, v. 251, p. 1479-1481, 1991.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 205-210, 2001.

HOLLENSTEIN, K.; FREI, D. C.; LOCHER, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**, v. 446, p. 213-216, 2007.

HUMMERJOHANN, J.; KÜTTEL, E.; QUADRONI, M.; RAGALLER, J.; LEISINGER, T.; KERTESZ, M. A. Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: role of cysteine biosynthetic intermediates. **Microbiology**, v. 44, p. 1375-1386, 1998.

JACOBSON, B. L.; QUIOCHO, F. A. Sulfate-binding protein dislikes protonated oxyacids. A molecular explanation. **J. Mol. Biol.**, v. 204, p. 783-787, 1988.

KERTESZ, M. A.; LEISINGER, T.; COOK, A. M. Proteins induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, or *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 1187-1190, 1993.

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

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

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

KUBENA, B. D.; LUECKE, H.; ROSENBERG, H.; QUIOCHO, F. A. Crystallization and x-ray diffraction studies of a phosphate-binding protein involved in active transport in *Escherichia coli*. **J. Biol.Chem.**, v. 261, p. 7995-7996, 1989.

LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv.citri implicados na patogênese.** 2007. 322 f. Tese (Doutorado em Genética e

Melhoramento de Planta) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

LESTRATE, P.; DELRUE, R. M.; DANESE, I.; DIDEMBOURG, C.; TAMINIAU, B.; MERTENS, P.; DE BOLLE, X.; TIBOR, A.; TANG, C. M.; LETESSON, J. J. Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 43-51, 2000.

LEWIS, V. G.; WEEN, M. P.; MCDEVITT, C. A. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. **Protoplasma**, v. 4, 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.

LINDGREN, P. B. The role of hrp genes during plant–bacterial interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 35, p. 115–129, 1997.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. **PhilosTrans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 364, p. 239-245, 2009.

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

LIU, C.; MARTIN, E.; LEYH, T. S. GTPase activation of ATP sulfurylase: the mechanism. **Biochemistry**, v. 8, p. 2042-2047, 1994.

MAUPIN-FURLOW, J. A.; ROSENTEL, J. K., LEE, J. H., DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R. P.; SHANMUGAM, K. T. Genetic analysis of the modABCD (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177 p. 4851-4856, 1995.

MOUGOUS, J. D.; LEE, D. H.; HUBBARD, S. C.; SCHELLE, M. W.; VOCADLO, D. J.; BERGER, J. M.; BERTOZZI, C. R. Molecular basis for G protein control of the prokaryotic ATP sulfurylase. **Mol. Cell.**, v. 21, p. 109-122, 2006.

MUDGETT, M. B. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v. 56, p. 509–531, 2005.

NEUBAUER, H.; PANTE, L. I.; LINDGREN, P. E.; GÖTZ, F. Characterization of the molybdate transport system ModABC of *Staphylococcus carnosus*. **Arch. Microbiol.**, v. 172, p. 109-115, 1999.

OSWALD, C.; HOLLAND I. B.; SCHMITT, L. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 372, p. 385-399, 2006.

PAES LEME, A. F.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; DEL BEL CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effects of Sucrose on the Extracellular Matrix of Plaque-Like Biofilm Formed in vivo, Studied by Proteomic Analysis. **Caries Res.**, v. 42, p. 435-443, 2008.

PROTEIN DATA BANK. **Annual report 2010**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 29 out. 2011.

PFLUGRATH, J. W.; QUIOCHO, F. A. Sulphate sequestered in the sulphate-binding protein of *Salmonella typhimurium* is bound solely by hydrogen bonds. **Nature**, v. 314, p. 257-260, 1985.

PFLUGRATH, J. W.; QUIOCHO, F. A. The 2 Å resolution structure of the sulfate-binding protein involved in active transport in *Salmonella typhimurium*. **J. Mol. Biol.**, v. 5, p. 163-180, 1988.

RAHME, L.; MINDRINOS, M. N.; PANOPOULOS, N. J. Plant and environmental sensory signals control the expression of the hrp genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 3499-3507, 1992.

SACK, J. S.; SAPER, M. A.; QUIOCHO, F. A. Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. **J. Mol. Biol.**, v. 206, p. 171-191, 1989.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring, 2001.

SAVAGE, H.; MONTOYA, G.; SVENSSON, C.; SCHWENN, J. D.; SINNING, I. Crystal structure of phosphoadenylyl sulphate (PAPS) reductase: a new family of adenine nucleotide alpha hydrolases. **Structure**, v. 15, p. 895-906, 1997.

SENARATNE, R. H.; DA SILVA, A. D.; WILLIAMS, S. J.; MOUGOUS, J. D.; READER, J. R.; ZHANG, T.; CHAN, S.; SIDDEERS, 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. **Mol. Microbiol.**, v. 59, p. 1744-1753, 2006.

SOARES, M. R.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, R. M.; MOREIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. C.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I.; MENEGHINI, R.; GOZZO, F. C. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **Proteome Sci.**, v. 9, p. 1-11, 2010.

STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Canler, a treat to citrus in the gulf-coast states. **A. Phytopathological Society**, v. 1, p. 581-585, 1983.

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. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 309-322, 2006.

STROUPE, M. E.; LEECH, H. K.; DANIELS, D. S.; WARREN, M. J.; GETZOFF, E. D. CysG structure reveals tetrapyrrole-binding features and novel regulation of siroheme biosynthesis. **Nat. Struct. Biol.**, v. 10, p. 64-73, 2003.

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-NOWICKA, R.; BYKOWSKI, T.; HYNIEWICZ, M.; LEISINGER, T. The *Escherichia coli* ssuEADCB gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic 101 sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 29358-29365, 1999.

VANINI, M.; SPISNI, A.; SFORÇA, M.; PERTINHEZ, T.; BENEDETTI, C. The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein-protein interaction. **Proteins**, v. 71, p. 2051-2064, 2008.

WALKER, K.; OLSON, M.F. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. **Curr. Opin. Genet.**, v. 15, p. 62-68, 2005.

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

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.

YOUNG, J.; HOLLAND, I. B. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. **BiochimBiophys. Act.**, v. 1461, p. 177-200, 1999.