

CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA sHSPA de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Gisele Audrei Pedroso, Maria Célia Bertolini, Eduardo Hilario – Bioquímica – Farmácia-Bioquímica – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química – Instituto de Química – Campus de Araraquara.

A citricultura é um dos agronegócios mais competitivos do Brasil no mercado internacional. No ano de 2003 movimentou cerca de US\$ 3,23 bilhões e foi responsável por 1,87% do total da pauta de exportação e 4,47% das vendas internacionais do setor agrícola. Entretanto, como nas demais culturas agrícolas, os *citrus* são suscetíveis a diferentes pragas conhecidas, as quais causam danos às plantas e grandes prejuízos aos citricultores. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv citri (*Xac*) é responsável pelos maiores prejuízos. Atualmente, não há controle químico ou microbiológico para esta doença, e uma das medidas preventivas para a erradicação do cancro cítrico é remoção de galhos e ou plantas infectadas.

De acordo com a importância econômica desta praga, o sequenciamento do genoma completo da *Xac* foi finalizado pela rede ONSA da FAPESP (da qual nosso laboratório foi membro), como um primeiro passo para o melhor entendimento da doença e busca de estratégias de controle e combate ao agente patogênico bacteriano. Atualmente, nosso laboratório desenvolve estudos moleculares e bioquímicos voltados a análises funcionais de genes e proteínas envolvidas no processo infeccioso desta fitobactéria. Algumas das proteínas estudadas são alvos de estudos dentro do projeto SMOLBNet (“Structural Molecular Biology Net”, FAPESP), do qual nosso laboratório é membro. Neste projeto, o principal objetivo é obter modelos tridimensionais de proteínas através da utilização da radiação síncrotron ou ressonância magnética nuclear (LNLS, Campinas).

Nosso laboratório de pesquisa estuda algumas proteínas que possivelmente estão envolvidas com mecanismos de resistência a cobre em *Xac* (CopA, CopB e CutC). Compostos de cobre são frequentemente usados nas lavouras para combater bactérias e fungos patogênicos. No entanto, algumas espécies podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência a estes compostos. Recentemente, nosso laboratório identificou algumas proteínas de *Xac* que interagiram com as proteínas CopA, CopB e CutC, utilizando o sistema de duplo híbrido de leveduras (Dra. Elaine C. Teixeira, Tese de Doutorado). Algumas das proteínas que mostraram interação foram selecionadas para serem estudadas do ponto de vista estrutural, entre elas a XAC1151, que interagiu com CopB. Na bactéria *Xac*, o gene *hspA* (XAC1151) codifica para uma proteína de choque térmico de baixa massa molecular (sHSP, small heat shock protein) com 158 resíduos de aminoácidos. Essa proteína mostra uma grande identidade com proteínas sHSPs de diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* e de um outro patógeno de *citrus*, a *Xylella fastidiosa*.

Proteínas de choque térmico (HSPs), também chamadas de proteínas de estresse ou chaperonas constituem uma grande família de proteínas que estão presentes em diferentes organismos. São essenciais para a função celular normal e conferem estabilidade ao proteoma da célula por proteger um grupo diverso de proteínas relacionadas a transdução do sinal, metabolismo, tradução, e outras atividades, aumentando as condições de resistência celular ao estresse. Entretanto, HSPs estão também presentes em condições normais da célula (Sun & MacRae, 2005). A síntese das HSPs é estimulada em resposta a mudanças do ambiente quando os organismos são expostos a condições de estresse anormal ou extremo, como choque térmico, desidratação, umidade, luz, deficiência nutricional, estresse químico causado por compostos orgânicos ou oxidantes fortes, privação de oxigênio, exposição a metais pesados, ou estresse oxidativo (Laksanalamai & Robb, 2004).

A formação da estrutura tridimensional e a renaturação de proteínas são processos mediados através de chaperonas com atividade ATP-dependente, incluindo a HSP60 (chaperonina), HSP70, HSP90, HSP110. As HSPs parecem impedir a agregação irreversível e a insolubilização de proteínas desnaturadas, sem atividade chaperona e através de um processo ATP-independente. As sHSPs apresentam grande capacidade de ligar proteínas desnaturadas e entregá-las ao sistema de chaperonas ATP-dependente (Sun & MacRae, 2005). Membros desta família de proteínas apresentam um domínio central conservado de aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos chamado domínio α -cristalino (Kappe *et al.*, 2002). Além disso, as proteínas da família sHSP compartilham características em comum, como baixo peso molecular (12 a 30 kDa), formação de grandes oligômeros (9 a 30 subunidades), resultando em uma estrutura quaternária dinâmica (Stromer *et al.*, 2003). As seqüências

N- e C-terminal não são conservadas e contribuem para a diversidade estrutural das sHSPs. Ambas as extremidades são essenciais para a multimerização e atividade chaperona (Sun & MacRae, 2005; Ganea, 2001). As extensões N- e C-terminais são flexíveis e são enriquecidas em resíduos de aminoácidos polares e carregados que contribuem para a solubilidade das sHSPs (Ganea, 2001).

Para a realização deste trabalho, a sequência polinucleotídica da ORF XAC1151 (477 pb) foi amplificada a partir do DNA genômico da *Xac* utilizando oligonucleotídeos específicos e clonada no vetor pOAD. Para a produção da proteína em *E. coli* foi necessário subclonar o gene XAC1151 no vetor pET-28a. Para isto, 3 µg de DNA plasmidial do vetor pET-28a e da construção pOAD-XAC1151 foram digeridas com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. O fragmento de aproximadamente 500 pb (correspondente ao gene XAC1151) e o vetor pET-28a digerido foram purificados, quantificados, ligados e o produto resultante da ligação usado na transformação de células competentes de *E. coli* linhagem DH10B. As células foram plaqueadas em meio contendo o antibiótico canamicina e, posteriormente, clones recombinantes da construção plasmidial pET28a-XAC1151 foram crescidos em meio de cultura e o DNA plasmidial extraído. Aliquotas do DNA plasmidial foram digeridas com as enzimas *EcoRI/HindIII* e clones confirmadamente positivos foram armazenados a -80°C para uso posterior, com adição de glicerol para uma concentração final de 16%.

Para a produção da proteína recombinante, o DNA plasmidial pET28a-XAC1151 foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* linhagem BL21(DE3) pLys-S. Inicialmente, para verificar a produção da proteína recombinante fusionada à cauda de His na extremidade N-terminal (His6-XAC1151) em *E. coli*, foi realizada um ensaio de produção em pequena escala (50 mL). Após ter sido verificada a produção da proteína recombinante, um ensaio de solubilidade foi realizado para avaliar a solubilidade da proteína recombinante. Neste ensaio foi variada a concentração final de IPTG (0,1 ou 0,4 mM) e temperatura de incubação durante a produção da proteína recombinante (30 ou 37°C). Como pode ser observado pela Figura 1, a proteína foi obtida em grande quantidade e mostrou ser parcialmente solúvel nas diferentes condições analisadas. Aparentemente, a solubilidade da His6-XAC1151 (24 kDa) foi maior quando as células foram induzidas a 37°C (Figura 1A, linhas 5 e 7).

A produção da proteína recombinante foi posteriormente realizada em larga escala (3 L) usando o clone produtor e as melhores condições de produção, previamente definidas a partir do ensaio de produção em pequena escala e do ensaio de solubilidade. Após o término do ensaio de produção em larga escala, as células foram coletadas por centrifugação (5.000 x g, 10 min, 4°C) e homogeneizadas em 75 mL do tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol, 1 mM de benzamidina e 1 mM de PMSF). As células foram lisadas, em gelo, através de sonicação (modelo *Vibra-Cell*, *Sonics*). Foi usada a potência máxima (100%) e realizados ciclos alternados de 9 segundos de pulso e 9 segundos de espera por até 4 minutos. Em seguida, o extrato celular bruto foi centrifugado (20.000 x g, a 4°C por 20 minutos) e o sobrenadante aplicado em uma coluna *HiTrap Chelating FF* de 5 mL acoplada ao sistema de purificação de proteínas Akta Prime (*Pharmacia*). A metodologia da purificação foi seguida segundo as indicações do fabricante e a proteína eluída através de um gradiente linear de 20-500 mM de imidazol. As frações coletadas durante a purificação foram analisadas através de SDS-PAGE 12% (Figura 1B). Como pode ser observado, a proteína foi obtida com alto grau de pureza (Figura 1B, linhas 3-6) e as frações contendo a proteína pura foram reunidas e dialisadas a 25°C contra 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo concentrações decrescentes de NaCl (500→10 mM). Posteriormente, a amostra foi concentrada a vácuo usando o sistema *SpeedVac Plus* (*Savant*) e dialisada contra 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 10 mM de NaCl. A determinação da concentração da proteína foi realizada com a utilização do kit *Bradford Reagent* (*Amresco*), onde após homogeneização, os valores de absorbância foram quantificados em um espectrofotômetro *Beckman*, modelo DU-640, no comprimento de onda de 595 nm e a concentração de proteínas foi calculada em mg/mL, utilizando uma curva padrão construída com soroalbumina bovina (BSA, *Sigma*). A proteína foi estocada a 4°C para o uso posterior.

A proteína recombinante His6-XAC1151, previamente purificada, dialisada, concentrada e quantificada foi levada ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, para iniciar os ensaios de cristalização. Inicialmente, foram preparadas caixas de cristalização usando o método da gota sentada, em placas de 24 poços (*Chryschem*), com as soluções dos kits *Crystal Screen* e *Crystal Screen II* (*Hampton Research*), *JBScreen 1-10* (*Jena Bioscience*) e *Wizard I e II* (*Emerald*), usando 2

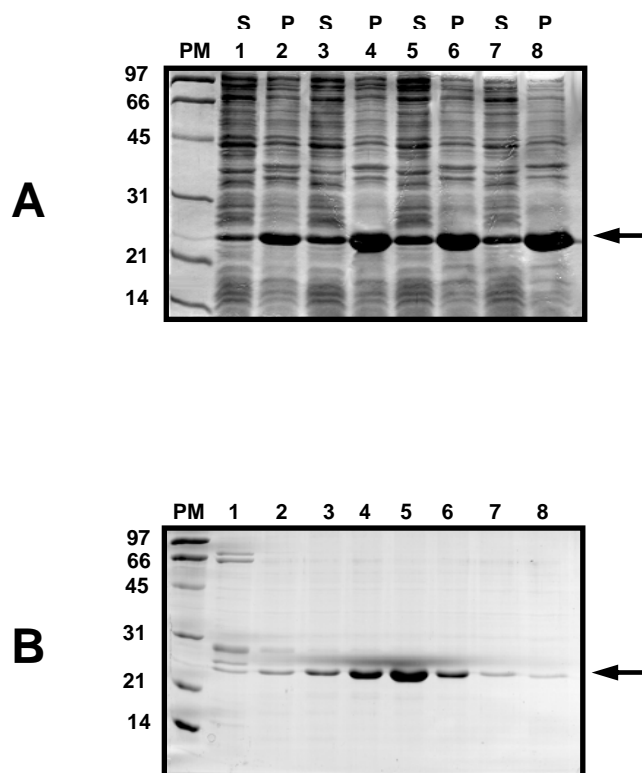


Figura 1: Análise da produção em pequena escala da proteína His6-XAC1151 em *E. coli* e frações obtidas na purificação. (A) Análise da produção em pequena escala. As linhas correspondem ao (PM), padrão de massa molecular *Low Range* (Bio-Rad); (1, 3, 5 e 7), sobrenadante após centrifugação (S) e (2, 4, 6 e 8), precipitado após centrifugação (P). Induções realizadas a 30°C (linhas 1-4) e 37°C (linhas 5-8) sob agitação de 250 rpm durante 4 horas. A concentração final de IPTG foi variada: 0,1 mM (linhas 1-2 e 5-6) e 0,4 mM (linhas 3-4 e 7-8). (B) Perfil da purificação. As linhas (1-8) correspondem às frações contendo a proteína recombinante eluídas da coluna *HiTrap Chelating FF*. A purificação foi realizada em tampão 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 500 mM de NaCl, 1 mM de benzamidina, 1 mM PMSF e a proteína eluída com 500 mM de imidazol. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, descorados e secos a vácuo. A seta indica a proteína recombinante com aproximadamente 24 kDa.

μL da proteína na concentração de 7,5 mg/mL. Foram então adicionados 300 μL das diferentes soluções tampão nos reservatórios e 2 μL à gota de proteína. As caixas foram deixadas em repouso em sala climatizada a 18°C e verificadas semanalmente quanto à presença de cristais. Em nossas observações iniciais, verificamos a presença de cristais de diferentes formas geométricas da proteína His6-XAC1151 nas placas de cristalização. A proteína cristalizou em pelo menos 15 diferentes condições analisadas. Novos refinamentos variando o pH do tampão e a concentração do precipitante foram realizados com o objetivo de obter cristais maiores e de melhor qualidade. Conseguimos obter bons cristais para a coleta de dados de raios-X quando a proteína foi cristalizada em 100 mM Tris-HCl, pH 7,7, contendo 1,2 M (NH₄)₂HPO₄ e, nestas condições, os cristais cresceram em até cinco semanas. Na Figura 2 estão representados alguns cristais obtidos, exibindo diferentes geometrias e, possivelmente, diferentes grupos espaciais.

Três cristais cúbicos foram usados em três coletas independentes de dados de difração de raios-X usando a fonte de luz síncrotron na linha de luz D03B-MX1 (LNLS). Para evitar a formação de gelo sobre o cristal e danos durante a coleta dos dados, os cristais foram crioprotetidos com 100 mM de Tris-HCl, pH 7,7, 1,2 M de (NH₄)₂HPO₄, contendo 25% de glicerol. Os cristais foram montados em uma alça de nylon e os dados foram coletados a -173°C, usando um fluxo contínuo de N₂. Durante a coleta foi usado o comprimento de onda de 1,43 Å, o detector MAR CCD 165 (*MarResearch*), tempo da exposição de 35 segundos e oscilando o cristal em passos de 0,7°.

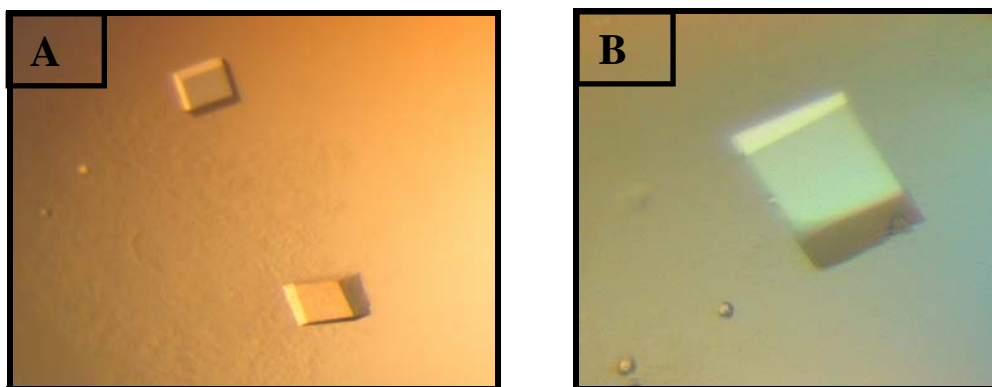


Figura 2: Cristalização da proteína His6-XAC1151. A proteína recombinante His6-XAC1151 foi usada nos ensaios de cristalização na concentração de 7,5 mg/mL. (A), formações cristalinas bi-piramidais obtidas durante as etapas de refinamento usando 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 200 mM NaOAc, contendo 30% PEG4000; (B), formações cristalinas cúbicas obtidas em 100 mM Tris-HCl, pH 7,7, 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. As placas de cristalização foram feitas usando 2 μL de proteína e 2 μL das diferentes soluções tampão nos suportes da gota em placas de 24 poços. Os cristais foram verificados através de uma lupa estereoscópica polarizadora.

Em cada coleta, foram obtidas 260 imagens e foi usado o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997). Os cristais difrataram bem e os dados foram coletados na resolução máxima de até 1,65 Å, excelente para estas análises estruturais. Os cristais pertencem ao grupo espacial romboédrico R3 e os parâmetros da célula unitária foram $a = b = 128,7$ Å e $c = 55,3$ Å. A proteína apresenta um domínio alfa-cristalino e a estrutura cristalográfica foi parcialmente resolvida usando como modelo estrutural da sHSP de *Triticum aestivum* (PDB código 1GME, van Monfort *et al.*, 2001), através do método de substituição molecular usando o programa AMoRe (Navaza, 1994) pelo pós-doutorando Dr. E. Hilário juntamente com o cristalógrafo Dr. Francisco Javier Medrano Martin. Entretanto, a partir dos dados coletados não foi possível determinar parte das regiões N- e C-terminais da estrutura, pois 41 e 15 resíduos de aminoácidos das extremidades N- e C-terminais, respectivamente, não estão presentes no mapa de densidade eletrônica obtido e verificamos que o nosso conjunto de dados não possui informações adicionais para complementar estas regiões. Estas extremidades estão em uma região de alta flexibilidade na molécula e isto dificulta obter dados de ambas as extremidades.

Acreditamos que a retirada de 30 resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína, correspondente à cauda poli-His, permitirá à proteína cristalizar em outros grupos espaciais e os dados de difração obtidos poderão ser utilizados para complementar nosso modelo estrutural. Por este motivo, a proteína foi produzida na forma não fusionada, utilizando o vetor pET3a, uma vez que a mesma foi resistente à digestão com a enzima proteolítica trombina (trabalho realizado pelo pós-doutorando), muito provavelmente devido à natureza oligomérica da proteína, o que impediu o acesso à digestão enzimática. Novos ensaios de cristalização foram realizados com a nova proteína sem a cauda de histidina (XAC1151), e as caixas estão sendo atualmente monitoradas quanto à presença de cristais.

Referências Bibliográficas:

- Ganea, E. (2001). *Curr. Protein Pept. Sci.* **2**, 205-225.
- Hilario, E., Teixeira, E. C., Pedrosa, G. A., Bertolini, M. C. and Medrano, F. J. (2006). *Acta Cryst.* **F62**, 446-448.
- Kappe, G., Leunissen, J. A. & de Jong, W. W. (2002). *Prog. Mol. Subcell Biol.* **28**, 1-17.
- Laksanalamai, P. & Robb, F. T. (2004). *Extremophiles*. **8**, 1-11.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 18015-18021.
- Sun, Y. and MacRae, T. H. (2005). *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2460-2476.
- van Monfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C. & Vierling, E. (2001). *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1025-1030.

Bolsa: CNPq/PIBIC