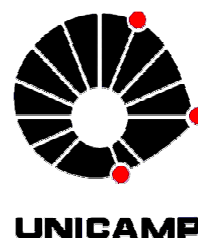


**Estudo por Ressonância Magnética Nuclear do domínio repetitivo da
proteína PthA de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri***



Aluno: Fabio Rogério de Moraes
Instituto de Física Gleb Wataghin – Unicamp
Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME) – LNL S

Orientadora: Ana Carolina Zeri
Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME) – LNL S

Co-Orientador: Dr Celso Benedetti (CeBiME) – LNL S

Relatório Final CNPq/PIBIC

**Campinas
2007**

Introdução:

Uma das mais importantes atividades agrícolas do estado de São Paulo é a citricultura, sendo uma das maiores bases econômicas do país, com uma movimentação de mais de R\$ 5 bilhões por ano.

O Cancro cítrico é uma doença que ataca a maior parte das variedades de citrus, entre elas é mostrado na tabela 1 uma lista de espécies mais resistentes ao cancro cítrico, causado bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, sendo que pouco se sabe sobre os mecanismos de infecção não tendo, portanto, nenhuma forma de combate direto a essa doença. No caso de uma planta infectada (exemplo mostrado na figura 1) a forma de combate adotada é a completa erradicação da planta e das outras em um raio de 30 metros, sendo que nenhuma planta deve ser plantada no local por um período de dois anos (FUNDECITRUS).

1. Poncan	6. Laranja Natal	10. Laranja Baianinha
2. Mexerica do Rio	7. Tangor Murcote	11. Limão Siciliano
3. Limão Taiti	8. Limão Cravo	12. Limão Galego
4. Laranja Pêra	9. Laranja Hamlin	13. Pomelo
5. Laranja Valência		
É bom lembrar que nenhuma variedade é imune ao cancro cítrico (FUNDECITRUS)		

Tab. 1 – Variedades e espécies mais resistentes (em ordem decrescente).



Fig. 1 – Exemplo dos sintomas de infecção por cancro cítrico.

As proteínas PthA de *Xanthomonas*, necessárias para o desenvolvimento do cancro cítrico, pertencem à família de proteínas AvrBs3-like de proteínas efetoras de

bactérias e são proteínas constituídas por três domínios, sendo uma região C terminal com seqüências de localização nuclear e também características de ligação a DNA; uma região N terminal necessária para o transporte da proteína pelo sistema excretor do tipo 3 (T3SS – Type 3 Secretion System); e uma região central com um número variado de repetições (acima de 12) de um peptídeo com 34 aminoácidos (Swarup, Yang et al. 1992; Szurek, Rossier, et al. 2002), rico em leucina, sendo que o número de repetições é responsável pela especificidade de alvos para infecção (Brunings, A.M. 2003). A proteína PthA possui quatro isoformas (PthA 1, PthA 2, PthA 3 e PthA 4) sendo que no presente trabalho vamos utilizar PthA2 para os estudos desejados.

A estrutura da PthA não é conhecida e os detalhes do enovelamento da região central não são claros. O objetivo dessa pesquisa é saber quantas repetições são necessárias para a formação de um domínio estável, utilizando a técnica de espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Teoria:

(a) Biologia Molecular:

(a.1) Polymerase Chain Reaction (PCR)

Uma das técnicas que permite amplificar uma seqüência de DNA utilizando primers (oligonucleotídeos), que são uma cópia das regiões inicial e final de interesse. Através de um termociclador, controlamos a temperatura das amostras fazendo com que o DNA seja amplificado a cada ciclo. O primeiro passo de cada ciclo consiste em elevar a temperatura da amostra à 95°C, desnaturando assim a fita dupla de DNA tendo duas fitas simples. Em seguida abaixamos até uma temperatura entre 55 e 65°C, que é a temperatura de anelamento dos primers as seqüências de DNA. O último passo do ciclo é elevar a temperatura de 72°C onde a enzima Taq Polymerase irá colocar as bases nitrogenadas existentes na solução de forma a completar a seqüência de DNA, duplicando assim a cada ciclo a amostra. Uma visualização do processo é dada na figura 2.

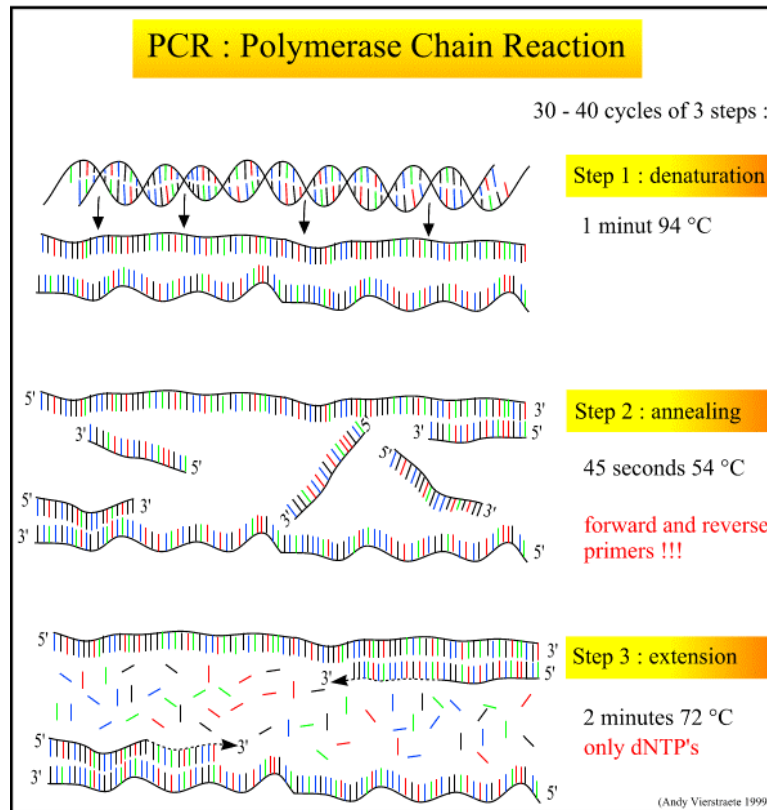


Fig. 2 – Técnica de PCR e suas etapas.

(a.2) Eletroforese

Para separar as amostras de DNA por tamanho utilizamos a técnica de eletroforese, que consiste em estabelecer uma diferença de potencial entre dois pontos e como o DNA possui uma carga líquida negativa ele irá responder a essa diferença de potencial migrando para o lado onde o potencial é maior. A amostra é colocada em um gel de agarose, que é um composto polimérico, e por isso o DNA irá migrar com uma velocidade que é proporcional ao seu tamanho, já que quanto maior o tamanho da amostra mais difícil será para passar pelos “buracos” do gel. Utilizando um marcador padrão é possível comparar e obter o tamanho em pares de base do DNA. Para visualizar o resultado é colocado no preparo do gel brometo de etídeo, que é fluorescente e se intercala na molécula de DNA, resultando em uma banda na região onde se encontra o DNA.

Para separar amostras de proteína outro tipo de gel é utilizado, o gel de acrilamida. O conceito para esse tipo de gel é o mesmo: separar proteínas de acordo com seu tamanho (em kDa) para poder comparar com um marcador. Esse tipo de gel possui duas fases, onde a primeira (chamada de gel de amostra) ajuda a proteína a se desenovelar, o que é desejado para uma migração mais fácil; enquanto a segunda fase

(gel de separação) é responsável por separar as amostras de acordo com seu tamanho. Não há brometo de etídeo nesse tipo de gel, e as amostras podem ser visualizadas utilizando um corante que se liga à proteína evidenciando sua presença e um descorante para tirar o corante do resto do gel (onde não há proteína).

(a.3) Expressão e purificação de proteínas (pet28a-GST TEV)

Com o clone desejado em um vetor de expressão pet28a - GST TEV (Carneiro, F.R.G. et al 2006) em uma célula competente BL21, podemos induzir a expressão de proteínas utilizando o composto IPTG em uma fase de crescimento ótimo da bactéria (controlado pela absorção de luz a 600nm utilizando um espectrofotômetro), que irá então produzir proteínas fusionadas a proteína GST (Glutathione S-transferase) com um sítio de restrição para a protease TEV (Tobacco Etch Virus). Nessa etapa é possível produzir a proteína marcada com isótopos ^{15}N e/ou ^{13}C fazendo com as bactérias cresçam em um meio mínimo, onde as únicas fontes de carbono e nitrogênio são moléculas com os isótopos desejados (Cloreto de Amônia ou Sulfato de Amônia, no caso de ^{15}N , e Glucose, para marcar com ^{13}C).

Após um tempo de indução podemos separar as proteínas do resto dos componentes celulares. A proteína pode estar em duas frações: Solúvel e/ou Insolúvel. Para estudos por RMN que realizamos no CeBiME – LNLS é necessário que a proteína seja solúvel. Utilizamos a proteína fusionada a GST pois ela pode ser purificada ao passarmos por uma coluna contendo glutathione, e em seguida usamos a enzima TEV-protease para separar a proteína de interesse.

(b) Ressonância Magnética Nuclear:

(b.1) Conceitos Básicos

Todas as partículas (elétrons, prótons, nêutrons, etc) possuem intrinsecamente uma propriedade conhecida como spin, que é a manifestação da natureza magnética dessas partículas. A origem teórica do spin aparece quando se resolve a equação de Dirac em Mecânica Quântica. Em 1922 os físicos Otto Stern e Walther Gerlach demonstraram experimentalmente que essa grandeza é quantizada, ou seja, ela pode possuir apenas um número discreto de valores. Partículas que possuem spin semi-inteiro são conhecidas como férmions (obedecem à distribuição de Fermi-Dirac) enquanto se o

spin for inteiro ela será um bóson (obedecem à distribuição de Bose-Einstein), como mostra a figura 3.

$s = \frac{1}{2}; \frac{3}{2}; \frac{5}{2} \dots$ <p>Férmions</p>	$s = 1; 2; 3 \dots$ <p>Bósons</p>
--------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------

Fig. 3 – Possíveis valores de spin das partículas.

Em RMN estamos interessados nas partículas que possuem spin $\frac{1}{2}$, o que é o caso de prótons e nêutrons. Os átomos mais utilizados no estudo de proteínas são ^1H , ^{13}C e ^{15}N , pois todas têm o spin desejado (partículas com spin maiores do que meio também apresentam sinal no espectro de RMN porém o sinal é mais complicado não sendo, portanto, interessante para o estudo, mas amplamente utilizadas em estudos de amostras sólidas por RMN). Como o spin tem uma natureza magnética ele irá interagir com campos e ondas eletromagnéticas, obedecendo às leis da mecânica quântica.

Quando na presença de um campo magnético $\vec{B} = B_o \hat{z}$ o spin de uma partícula (com spin $\frac{1}{2}$) pode ter duas orientações correspondentes aos autovalores da projeção no eixo z (definido como a direção do campo magnético) do operador momento angular de spin.

$$S_z \left| \frac{1}{2}, \mu_s \right\rangle = \mu_s \hbar \left| \frac{1}{2}, \mu_s \right\rangle$$

onde μ_s (momento magnético de spin) é o autovalor correspondente ao estado da partícula, que no caso de spin meio pode assumir apenas dois valores: $\pm \frac{1}{2}$.

Partículas que possuem a mesma função de onda espacial mas funções de onda de spin diferentes possuem a mesma energia, dizemos então que o estado é degenerado. Essa degenerescência pode ser quebrada aplicando-se um campo magnético onde as energias serão então separadas de acordo com o valor da projeção de seu momento magnético (efeito Zeeman) como exemplificado pela figura 4.

Só para exemplificar, se a partícula tivesse spin 1, teríamos três funções de ondas com a mesma energia e portanto haveria 3 linhas na figura 4, devido aos 3 valores possíveis do momento magnético de spin (-1; 0; +1).

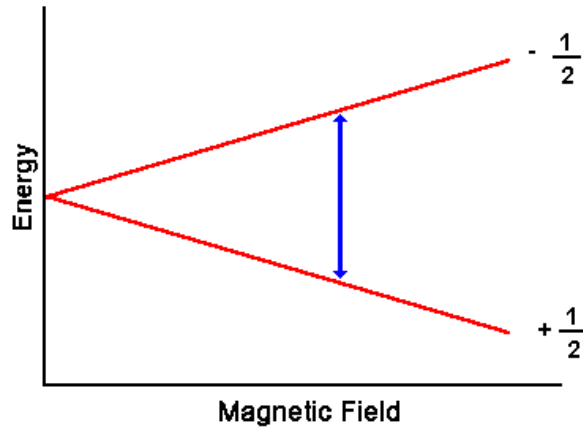


Fig. 4 – Quebra da degenerescência devido ao efeito Zeeman.

A energia de interação entre o momento magnético de spin e o campo magnético é dada pela energia potencial:

$$W = -\vec{\mu}_s \cdot \vec{B}$$

Mas o momento magnético de spin é proporcional ao momento angular de spin. A constante de proporcionalidade é dada o nome de razão giromagnética (classicamente é uma medida da carga pela massa).

$$\vec{\mu}_s = \gamma \vec{S} \rightarrow W = -\gamma \vec{S} \cdot \vec{B}$$

A força pode ser encontrada como menos a derivada da energia potencial:

$$\vec{F} = \nabla (\vec{\mu}_s \cdot \vec{B})$$

O torque que essa força (que tem origem no campo magnético) causa é então dado por:

$$\vec{\Gamma} = \vec{\mu}_s \times \vec{B} = \gamma \vec{S} \times \vec{B}$$

Mas assim como a força pode ser escrita como a derivada temporal do momento, o torque pode ser escrito como a derivada temporal do momento angular (de spin nesse caso):

$$\vec{\Gamma} = \frac{d\vec{S}}{dt} \rightarrow \frac{d\vec{S}}{dt} = \gamma \vec{S} \times \vec{B}$$

Essa equação caracteriza um movimento de precessão do momento angular de spin em torno do campo magnético. Essa é a precessão de Larmor, cuja frequência angular de precessão depende da magnitude do campo magnético:

$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

Para campos magnéticos intensos a separação entre os níveis tem tal energia que é possível causar uma transição entre os estados de spin com fótons de frequência na região de Rádio Frequência (RF) do espectro eletromagnético. A energia necessária para provoca tal transição é:

$$E = \frac{\hbar \omega_0}{2} = \frac{h \nu_0}{2}$$

A frequência ν_0 é a frequência de Larmor da partícula, que é dado por:

$$\nu_0 = -\frac{1}{2\pi} \gamma (1 + \delta) B_0$$

$$\delta \equiv \frac{\nu - \nu_{TMS}}{\nu_{TMS}}$$

onde δ é uma grandeza adimensional conhecida como desvio químico (chemical shift), que é extremamente útil, pois se os dados utilizados fossem em termos da frequência, os diferentes espectrômetros resultariam em diferentes dados, já que a frequência de Larmor depende da intensidade do campo do espectrômetro. A necessidade dessa definição é também necessária porque núcleos que estão rodeados por diferentes núcleos terão um movimento de precessão diferente pela “interferência” de outros spins a sua volta, do que teria se ele estivesse só. A frequência ν_{TMS} é a frequência de um composto de referência escolhido arbitrariamente.

A magnetização devido aos momentos magnéticos de spin está basicamente alinhada com o campo magnético B_0 na direção \hat{z} . Para mudarmos a direção do vetor magnetização é necessário criar outro campo de modo que o campo efetivo esteja na direção desejada. Como o campo B_0 é extremamente alto (entre 10 à 20 Tesla, para experimentos com proteínas) utilizamos o fenômeno de ressonância de modo que com um campo magnético fraco oscilante (RF) é possível mudarmos a magnetização com pulsos de 90° . Se mudarmos o sistema de referência para um referencial girante com frequência igual a do campo magnético oscilante:

$$\omega_{ref. girante} = -\omega_{RF}$$

que é próximo à frequência angular de Larmor ω_0 , veremos uma precessão da magnetização em uma frequência diferente da frequência de Larmor:

$$\Omega = \omega_0 - \omega_{ref. girante} = \omega_0 + \omega_{RF}$$

que é a frequência de offset. Utilizando a relação entre frequência angular e campo magnético, podemos achar o campo magnético aparente ΔB que causa essa precessão no referencial girante.

$$\Omega = -\gamma\Delta B \rightarrow \Delta B = -\frac{(\omega_0 - \omega_{ref. girante})}{\gamma}$$

Se a frequência angular do referencial girante fosse igual à de Larmor o campo aparente seria nulo, ou seja, não haveria nenhuma precessão. Dessa forma, qualquer campo magnético seria capaz de causar uma variação na direção do vetor magnetização, mesmo sendo fraco, já que a precessão é em torno do campo efetivo. O campo magnético efetivo no referencial girante é então a soma vetorial do campo de RF com o campo aparente:

$$B_{Efetivo} = \sqrt{B_{RF}^2 + \Delta B^2}$$

Podemos então dar pulsos de RF de forma que a magnetização, antes na direção \hat{z} sofra uma variação de 90° (isso só depende do tempo em que ficamos aplicando a RF), ficando então no plano XY. Ao pararmos de aplicar o campo B_{RF} a magnetização irá então voltar para sua posição inicial, causando uma corrente induzida na bobina (a mesma que gera o sinal de RF). Esse sinal é medido e é a partir dele que obtemos o sinal e geramos o espectro característico de RMN.

Métodos Experimentais:

(a) Laboratório de Biologia Molecular:

Para obter repetições de diversos tamanhos partimos de um DNA template da PthA2 e utilizamos primers (Rep N e Rep C), mostrados na figura 5 desenhados para se anelar no começo de cada repetição. Através da técnica de PCR conseguimos insertos com vários tamanhos já que o anelamento do primer é aleatório. Esses fragmentos foram então clonados em um plasmídeo vetor de clonagem pGEM e transformado em DH5 α para a obtenção em larga escala de cada inserto.

<p>Oligo RepN 5' -GGATCCCTGACCCCGGAGCAGG-3' 13C+G/17N (sequência inicial)- 16C+G/22N</p> <p>Oligo RepC 5' -CTCGAGTCAGCCATGGGCCTGGCACAG-3' 13C+G/18N(sequência inicial)- 18C+G/27N</p>

Fig. 5 – primers utilizados para a obtenção dos insertos de vários tamanhos.

Para saber quais as repetições de cada inserto, as amostras foram mandadas para seqüenciamento.

O plasmídeo com inserto foi purificado, para ser clivado utilizando enzimas de restrição. O resultado final dessa etapa de purificação é o inserto, que pode agora ser clonado em um plasmídeo vetor de expressão pet28a-GST TEV que foi descrito acima.

Primeiramente transformamos o plasmídeo do vetor de expressão com inserto na célula competente DH5 α para aumentarmos a quantidade de plasmídeos, já que esse tipo de célula é ideal para se replicar e armazenar. Só então os plasmídeos foram transformados em célula competente BL21 que é ideal para a expressão de proteínas.

Seguindo os passos da expressão e purificação de proteínas, poderemos isolar a proteína que foi traduzida do inserto ligado ao vetor de expressão, e então prepararemos a amostra para estudos por RMN. A concentração ideal para uma amostra de proteína é entre 0.5mM e 1 mM, e o tampão ideal é o tampão Fosfato, com pH dependendo do PI de cada proteína. A sonda criogênica que está sendo instalada no LRMN permitirá o estudo de amostras em concentrações mais baixas, de até 0.1mM.

(b) Laboratório de RMN:

O processo de obtenção e purificação de proteínas ainda está em andamento, mas mesmo assim tenho participado das atividades do laboratório como as aulas do curso “Técnicas Experimentais do LNLS” para alunos da Unicamp, assim como tenho acompanhado as visitas de pesquisadores ao LNLS para palestras e cursos, como foi o caso dos pesquisadores Thomas Szyperski da University at Buffalo (New York) e Eriks Kupce da Varian (Oxford), que estiveram no LNLS em fevereiro e maio de 2007, respectivamente.

Resultados:

Na etapa de obtenção dos insertos de diversos tamanhos, conseguimos isolar 9 amostras. Para isso utilizamos a técnica de PCR seguindo o protocolo:

1µL de DNA plasmidial pet28a PthA2
1µL do primer RepN (5µM)
1µL do primer RepC (5µM)
0,5µL de dNTPs (10mM)
0,5µL de MgCl ₂ (50mM)
2µL Taq. Polymerase buffer 10x
0,3µL Taq. Polymerase
13,7µL de H ₂ O

O resultado do PCR foi clonado no vetor pGEM e transformado em DH5α. Foi feito um inóculo e então um mini-prep utilizando o kit da Qiagen. Uma das amostras continha uma repetição, uma com duas repetições, 3 com três repetições, 3 com quatro repetições, e uma amostra com ~ 6 repetições. Os insertos são mostrados na figura 6, logo após serem clivados do vetor de expressão utilizando as enzimas de restrição BamHI e XhoI (sítios de restrição dos primers) e separados no gel de agarose.

Os respectivos tamanhos dos insertos destacados da figura 6 estão definidos em cima de cada poço do gel onde utilizamos a notação 1R para o inserto com uma

repetição e assim por diante (os índices *a*, *b* e *c* é para separar amostras diferentes com o mesmo número de repetições).

O sequenciamento mostrou que os clones 3Rb, 3Rc, 4Ra e 6R apresentavam mutações em algumas das repetições e foram portanto inutilizados.

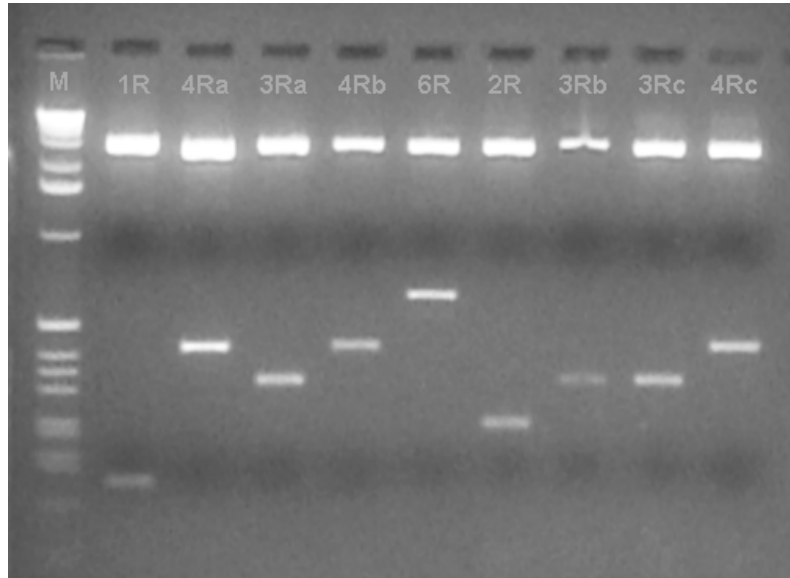


Fig. 6 – *Insertos clivados do vetor de clonagem pGEM, utilizamos a notação \underline{nR} para o inserto com \underline{n} repetições (os índices *a*, *b* e *c* é para separar amostras diferentes com o mesmo número de repetições).*

O protocolo seguido para a reação de digestão dos plasmídeos com insertos e também do vetor de expressão pET28a-GST TEV (as enzimas e buffer são da marca Promega) é:

<i>Insertos</i>	<i>PET28a-GST TEV</i>
20µL de DNA plasmidal	6µL de DNA plasmidal
2,5µL da enzima Bam HI	3µL da enzima Bam HI
1,5µL da enzima Xho I	3µL da enzima Xho I
5µL do buffer react D	5µL do buffer react D
20µL de H ₂ O	33µL de H ₂ O

todas as reações de digestão foram deixadas na estufa 37°C a noite toda.

Agora com os insertos purificados, clonamos as amostras no vetor de expressão pet28a-GST TEV. O protocolo de ligação dos insertos no vetor é:

5 μ L do vetor pet28a-GST TEV digerido
1 μ L da enzima ligase
4 μ L de buffer da ligase
6-8 μ L do inserto digerido
2 μ L de H ₂ O

O volume da amostra do inserto colocado variou de 6 a 8 μ L devido à intensidade da banda de cada amostra (mostrado na figura 6). Após a ligação, o vetor pet28a-GST TEV com inserto foi transformado duas vezes (a primeira em DH5 α e depois em BL21).

Para início escolhemos dois dos clones para fazer o teste de expressão: os clones 2R e 4Rc. Fizemos então um pré-inóculo de cada amostra deixando crescer a noite toda. No dia seguinte passamos 1mL de cada pré-inóculo para outro frasco e medimos a taxa de crescimento das células, monitorando com um espectrofotômetro até atingirmos uma OD₆₀₀ de 0,6 – 0,8 (para um comprimento de onda de 600nm). Nessa hora a indução com IPTG foi feita, e deixamos as células no incubador por mais 4 horas.

O teste de indução com IPTG mostrou que a ambas as proteínas estavam sendo expressas, como mostra a figura 7. As colunas A, B e C são a amostra antes da indução com IPTG (4Rc), a amostra 2R e a amostra 4Rc, respectivamente, enquanto a coluna M é o marcador utilizado.

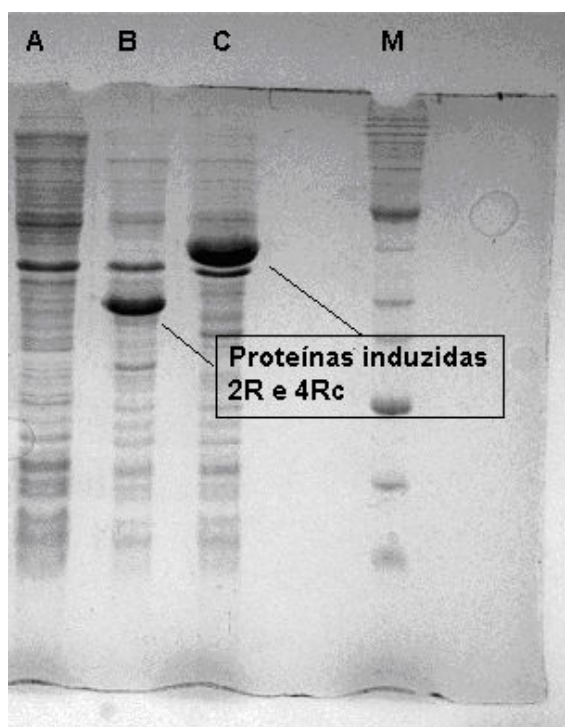


Fig. 7 – *Proteínas induzidas com IPTG após 4 horas de indução.*

Aparentemente a indução a uma temperatura de 37°C faz com que a maior porcentagem das proteínas sejam insolúveis. Agora são necessários novos testes para encontramos a melhor temperatura de indução.

Dificuldades Encontradas:

As técnicas utilizadas no laboratório de Biologia Molecular, assim como a teoria, foi sendo aprendida concomitantemente com o desenvolvimento do projeto e algumas dificuldades com o andamento do mesmo foram encontradas durante esse semestre. Com ajuda da Dr^a Tereza Lima e do doutorando Alexandre Quaresma conseguimos dar continuidade ao projeto, mesmo tendo sofrido um pequeno atraso no desenvolvimento.

Perspectivas:

Após refinar as condições para purificação das proteínas com a escolha da melhor temperatura de indução e de melhor concentração de IPTG, iremos preparar a proteína marcada com ¹⁵N para ensaios de RMN. Futuros ensaios de interação das

proteínas com DNA serão também realizados para investigar as interações recentemente observadas pelo grupo da professora Ula Bonnas (comunicação pessoal) para a proteína homóloga AvrBs3, além das interações com a Ciclofilina, inicialmente planejadas.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Dr^a Ana Carolina Zeri pelo trabalho de orientação e pela ajuda e amizade em todas as etapas do projeto também ao Dr Celso Benedetti pela co-orientação desde o início. A todos os amigos do laboratório que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho, em especial às Doutoradas Tereza Lima e Ísis Figueiredo e também ao doutorando Alexandre Quaresma.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e ao LNLS pela oportunidade.

Referencias Bibliográfica:

- Swarup, S., Y. Yang, et al. (1992). "**An Xanthomonas citri pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts.**" Mol Plant Microbe Interact **5**(3): 204-13.
- Brunings, A. M. a. G., D.W. (2003). "**Xanthomonas citri: breaking the surface.**" Mol Plant Pathology **4**(3): 141-157.
- Szurek, B., O. Rossier, et al. (2002). "**Type III-dependent translocation of the Xanthomonas AvrBs3 protein into the plant cell.**" Mol Microbiol **46**(1): 13-23.
- Flávia R.G. Carneiro, Tereza C.L. Silva, Adriana C. Alves, Thais Haline-Vaz, Gozzo, F.C. , Zanchin, N.I.T. "**Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1**" Biochemical and Biophysical Research Communications **343** (2006) 260-268.
- Gálan, J.E. ; Wolf-Watz, H. "**Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines**", Nature, Vol. 444, 30 de novembro de 2006: 567-573.
- Behlau, F. "**Epidemiologia do cancro cítrico (Xanthomonas axanopodis pv. citri) em laranja 'Pêra' (Citrus sinensis) sob condições de controle químico e cultural**", Dissertação de Mestrado em Agronomia USP – Esalq, 2006.

<http://fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html> acessado em 20-25/05/2007.

<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/> acessado continuamente desde 09/2006.

Cohen-Tannoudji, C., Diu, B., Laloe, F. “**Quantum Mechanics**” Wiley-Interscience 1977.

Keeler, J. “**Understanding NMR Spectroscopy**” Wiley 2005.