

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**Interação jacalina-Dps revela provável  
mecanismo de glicosilação bacteriano**

**Ebert ‘Ita’ Seixas Hanna**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área de concentração: Bioagentes Patogênicos.

Ribeirão Preto – SP

2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# 1

## Introdução

### I – Glicoproteínas em procariotos

#### I.a – *Aspectos Gerais*

Há pouco menos de 30 anos acreditava-se que glicoconjugados ligados a proteínas ou peptídeos, normalmente produzidos por mecanismo de síntese ribossomal, estavam ausentes em procariotos. Atualmente, as evidências de que glicoproteínas estão presentes em todos os reinos dos seres vivos são claras (Messner, 1997; Moens e Vanderleyden, 1997; Schaffer *et al.*, 2001; Benz e Schimidt, 2002; Upreti *et al.*, 2003 e Szymanski e Wren, 2005). No entanto, as informações disponíveis no que se refere à estrutura dessas glicanas, seu processo de biossíntese, sua importância, e como seria

possível explorar esse sistema são, de certa forma, muito limitadas. Desde o primeiro relato de uma glicoproteína em uma halobactéria (Mescher e Strominger, 1976), as descrições de outras glicoproteínas em diversos gêneros de procariotos já somam cerca de 70 exemplos (revisado por Upreti *et al.*, 2003), sendo a maior parte destes as subunidades que recheiam a camada superficial, ou envelope, da célula bacteriana, chamadas de glicoproteínas de camada “S” (CSG – do inglês “cell surface glycoproteins” – ver nota abaixo). Outros exemplos são os referentes às proteínas celulares secretadas e não-secretadas, como exoenzimas, proteínas de superfície e proteínas de membrana. Ainda não foi descrita nenhuma glicoproteína funcionalmente localizada no espaço intracelular bacteriano. Muito embora as glicoproteínas bacterianas possuam glicanas mais complexas que as eucarióticas, elas compartilham

**Nota.** Glicoproteínas da camada superficial (CSG)

Conhecidas também como “S-layers”, as CSGs foram descritas na maioria dos grupos filogenéticos bacterianos. Essas estruturas são montadas em cadeias cristalinas bidimensionais que cobrem completamente a célula bacteriana, sendo a glicosilação uma freqüente forma de modificação pós-traducional<sup>2</sup>. Esses glicoconjugados se diferenciam das glicoproteínas eucarióticas no que diz respeito a sua composição e estrutura, e sua forma cristalina característica tem levado sua utilização no campo da nano-biotecnologia (Schaffer & Messner, 2004).

de várias similaridades estruturais e biossintéticas, sugerindo que essas modificações pós-traducionais tenham papéis semelhantes nos mais diversos organismos.

I.b – *Características estruturais das glicoproteínas bacterianas*

Os açúcares têm papéis fundamentais em diversas funções biológicas e, quando conjugados a proteínas, podem alterar de forma substancial sua estrutura e função. Comparado com DNA e proteínas, o estudo sobre açúcares é bastante limitado, uma vez que estes são, de certa forma, de difícil síntese e manipulação laboratorial (Sears e Wong, 2001). Existem, também, aparelhos que possibilitam o seqüenciamento de proteínas e DNA, fornecendo resultados de alta eficiência, ao passo que a caracterização estrutural de sacarídeos é muito complexa e trabalhosa. Além disso, não

há informação descrita que codifica uma estrutura sacarídica em particular, e a manipulação genética de organismos para estudos estruturais é feita de forma indireta, no sentido de interferir nos mecanismos de biossíntese dessas glicanas.

A maior parte das cadeias glicídicas de glicoproteínas pode ser classificada em dois grupos, de acordo com a ligação do açúcar ao aminoácido peptídico. Açúcares ligados ao resíduo asparaginil (Asn), através de um grupamento amida, são denominados de N-ligadas. Por outro lado, aqueles que se ligam a um resíduo treoninil (Thr) ou serinil (Ser), através da substituição de um grupamento hidroxila, são denominados O-ligados (Kobata e Furukawa, 1992). Nas O-glicosilações, as glicanas são normalmente acopladas através de uma ligação glicosídica entre N-acetil-galactosamina e um resíduo de aminoácido, treonina ou serina (GalNAc- $\alpha$ -O-Ser). Já nas N-ligadas, um resíduo de N-acetil-glicosamina é ligado a asparagina, obedecendo a seqüência consenso ]-Asn-X-Thr/Ser-[ na cadeia polipeptídica, onde “X” denota qualquer aminoácido, com exceção de prolina (Varki *et al.*, 1999).

Da mesma maneira, em procariotos os carboidratos de glicoproteínas podem estar N- ou O-ligados aos resíduos Asn, Ser/Thr, respectivamente, ou ainda, O-ligados à um resíduo tirosinil [Tyr (Schaffer *et al.*, 2001)]. Entretanto, as regras para as modificações pós-traducionais em procariotos parecem menos definidas (Schaffer *et al.*, 2001 e Moens e Vanderleyden, 1997). O-glicosilação em células eucarióticas está associada a uma região rica em resíduos de prolina. Esta região é também observada em diversos gêneros eubacterianos e archae (Lechner e Wieland, 1989; Bröckl *et al.*, 1991; Plummer *et al.*, 1995; Dobos, *et al.*, 1996 e Schaffer *et al.*, 2001;). Contudo, constatou-se que as O-glicosilações em *Flavobacterium meningosepticum* (Plummer *et al.*, 1995) e *Thermoanaerobacter kivui* (Peters *et al.*, 1992) seguem seqüências consensuais, como aspartil-serina/aspartil-treonina e valinil-tirosina, respectivamente. Além disso, se compararmos estruturalmente os substituintes glicídicos das glicoproteínas bacterianas, encontraremos uma enorme diversidade de glicanas (Moens e Vanderleyden, 1997; Schaffer *et al.*, 2001 e Upreti *et al.*, 2003), como exemplo a semelhança com antígenos somáticos de bactérias Gram-negativas (Messner *et al.*, 1990). Outra particularidade dessas glicanas é a presença de açúcares não muito comuns, como por exemplo o 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxihexose em *Neisseria meningitidis* (Stimson *et al.*, 1995 e Virji, 1997) e em *Campylobacter jejuni* (Thibault *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2002 e Szymanki e Wren, 2005). A tabela 1 traz alguns outros exemplos de ocorrência de glicoproteínas em procariotos.

**Tabela 1. Exemplos de glicoproteínas em procariotos (Upreti *et al.*, 2003)**

Classificação		Organismo	Glicoproteína	Açúcar de ligação
<b>CSGs</b>				
Eubactéria	Gram positiva	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Glicopeptídeo GP I	Ramnose- <i>N</i> -Asn
		<i>Clostridium thermo-hydrosulfuricum</i>	Gp 140 kDa	$\beta$ -glicose- <i>O</i> -Tyr
Arqueo bactéria	Gram positiva	<i>Acetogenium kivui</i>	Gp 80 kDa	Desconhecido
	Gram negativa	<i>Halobacterium halobium</i>	HMW CSG	$\beta$ -GalNAc- <i>N</i> -Asn $\beta$ -Glicose- <i>N</i> -Asn Gal- <i>O</i> -Thr
<b>Glicoproteínas associadas à membrana</b>				
Eubactéria	Gram positiva	<i>Streptococcus mutans</i>	IDG-60	Ac. siálico, manose, galactose e GlcNAc
	Gram negativa	<i>Chlamidia trachomatis</i>	MOMP (40 kDa)	$\beta$ -GlcNAc- <i>N</i> -Asn
		<i>Escherichia coli</i>	104 kDa TibA	? ( <i>O</i> -ligada)
Arqueo bactéria	Gram positiva	<i>Methanosarcina mazei</i>	Membrane-bound glycoprotein	Desconhecido
	Gram negativa	<i>Haloferax volcanii</i>	Gps 150, 98, 58 e 54 kDa	Desconhecido
<b>Flagelos/Pili glicosilados</b>				
Eubactéria	Gram positiva	<i>Streptococcus sanguis</i>	Long fibril protein	Desconhecido
	Gram negativa	<i>Campylobacter jejuni</i>	Flagelinas T1 e T2	<i>N</i> e <i>O</i> -ligados <sup>1</sup>
		<i>Neisseria meningitidis</i>	Pilina	2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-hexose
Arqueo bactéria	Gram negativa	<i>Halobacterium halobium</i>	Flagelinas sulfatadas	Glicose- <i>N</i> -Asn
<b>Glicoproteínas celulares</b>				
Eubactéria	Gram positiva	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Gps 250 e 72 kDa	Ramnose ou glicose- <i>O</i> -Ser
Eubactéria	Gram positiva	<i>Cellulomonas fimi</i>	Celulases	Manose ou Gal- <i>O</i> -Thr
	Gram negativa	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Endoglucosidase 1.2 kDa	Man- <i>O</i> -Ser/Thr
	Micobactéria	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Complexo antigênico 45 kDa	$\alpha$ -Manose- <i>O</i> -Thr

### I.c – *Papel das glicosilações protéicas nos procariotos*

Muitas informações sobre o estudo funcional que as glicanas exercem sobre uma determinada glicoproteína bacteriana derivam de análises obtidas de células eucarióticas. Assim, essas estruturas exercem uma gama ampla de papéis, como: (i) manter a conformação e a estabilidade da molécula; (ii) proteger o arcabouço protéico contra a ação de enzimas; (iii) promover a sinalização para reconhecimento intra ou extracelulares; (iv) oferecer grupamentos capazes de proporcionar a adesão; (v) modular propriedades físico-químicas, como solubilidade, viscosidade, carga superficial, etc., e (vi) orientar localização celular (Moens e Vanderleyden, 1997; Schaffer *et al.*, 2001; Benz e Schmidt, 2002 e Upreti *et al.*, 2003). Em procariotos, no entanto, o estudo funcional das glicoproteínas é escasso, e quase todo o conhecimento sobre essas estruturas é derivado das análises das CSGs de arqueobactérias (Szymanski e Wren, 2005 e Upreti *et al.*, 2003). *H. halobium*, por exemplo, parece glicosilar sua “S-layer” para manter uma estrutura bacilar (Lechner & Wieland, 1989). Esse microrganismo acopla uma glicosaminoglicana sulfatada, N-ligada, na porção inicial da cadeia polipeptídica, e um polímero composto por cerca de 15 dissacarídeos glucosil-galactose, O-ligados a resíduos de treonina próximos ao domínio ancorado à membrana, que se assemelham a um tipo de oligossacarídeo encontrado em colágenos animais. Esses glicoconjugados parecem ter funções estruturais na célula bacteriana semelhantes às exercidas por glicoconjugados do tecido conjuntivo em mamíferos. Quando *H. halobium* é incubado com um antimicrobiano que inibe o acoplamento de glicosaminoglicanas ao arcabouço protéico (bacitracina), observa-se que as células bacterianas passam a ter um formato esférico (Lechner & Wieland, 1989). Outro exemplo é o da celulase de *Cellulomonas fimi*: sua atividade enzimática é similar entre as formas glicosiladas e desglicosiladas, assim como a estabilidade às variações de temperatura e pH. No entanto, o complexo enzimático na forma glicosilada tem maior afinidade por seu substrato, a celulose, e é protegido da ação de uma protease própria (Langsford *et al.*, 1987).

Resultados interessantes foram obtidos com a clonagem e expressão das  $\beta$ -glucanases de bactérias do gênero *Bacillus*. O gene que codifica esta enzima, que normalmente não é glicosilada, foi clonado e expresso em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), e em uma linhagem de *Escherichia coli*. A enzima codificada pelas

leveduras continha pontos de glicosilação, resultando em uma termoestabilidade superior a do *Bacillus sp*, e a da expressa em *E. coli* (Olsen e Thomsen, 1991). Além disso, glicoproteínas de *Bacillus thuringiensis* ligam-se a domínios lectínicos expressos no intestino de larvas de insetos; dessa interação decorre a atividade larvicida do bacilo. A dose letal dessa toxina aumenta, até 10 vezes, quando há oxidação prévia dos componentes sacarídicos com periodato, 40 vezes quando se inibe a glicosilação em presença da tunicamicina, ou cerca de 7 vezes quando açúcares (e.g. N-acetilglicosamina) são utilizados como inibidores (Muthukumar & Nickerson, 1987).

#### I.d – Glicosilação protéica em bactérias patogênicas

Existe uma considerável quantidade de informação sobre os vários aspectos das glicoproteínas em geral, discutidos em vários manuscritos (Messner, 1997; Moens e Vanderleyden, 1997; Schaffer *et al.*, 2001). Entretanto, glicoproteínas produzidas por patógenos de insetos e mamíferos têm granjeado parte do foco no estudo sobre esse fenômeno (Sandercock *et al.*, 1994). Assim, os melhores exemplos têm sido produzidos pelo estudo de bactérias patogênicas Gram-negativas, listadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Exemplos de glicoproteínas em bactérias patogênicas Gram-negativas (Benz e Schimidt, 2002).

<b>Microrganismo</b>	<b>Carboidratos identificados</b>	<b>Proteína</b>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	GlcNAc	OspA; OspB
<i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	Ácido Pseudoamínico (Pse5Ac7Ac)	Flagelina
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Alto conteúdo manose	MOMP
<i>Ehrlichia chafeensis</i> <i>Ehrlichia canis</i>	Glc, Gal, Xyl	P120 e P140
<i>Escherichia coli</i>	Heptose	TibA e AIDA-I
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$\alpha$ -(1,2)-Man <sub>1-3</sub>	45/47 kDa
<i>Neisseria meningitidis</i>	$\beta$ -Gal-(1,4)- $\alpha$ -Gal-(1,3)-2,4-diacetamido-2,4,6-d(OH) <sub>3</sub> hexose	Pilina
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$\alpha$ -Gal-(1,3)-GlcNAc	Pilina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\alpha$ -5N $\beta$ OHC <sub>4</sub> 7NFmPse-2-4)- $\beta$ -Xyl-(1,3)- $\beta$ -FucNAc	Pilina e Flagelina



A presença de glicoproteínas em *Borrelia burgdorferi*, o agente etiológico da doença de Lyme, foi sugerida com base na coloração positiva com periodato (Sambri *et al.*, 1992). A coloração com PAS positiva (Tsai & Frasch, 1982) aliada ao resultado de digestões com endoglicosidase F, evidenciaram a presença de glicoproteínas de superfície de 31 e 34 kDa. A função desses glicocomplexos é ainda desconhecida.

Em *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoea* as modificações pós-traducionais têm sido descritas para um tipo de pilus denominado tipo-IV, que é indispensável para a adesão de *N. meningitidis* a células eucarióticas. A presença de glicanas, e seus resíduos de açúcares, foi demonstrada através de ensaios de desglicosilação química, espectrometria de massa, e mutações em genes responsáveis pela incorporação de carboidratos (UDP galactose-4-epimerase – *galE*) (Virji, 1997). Gonococos expressam sialiltransferases, que podem acoplar moléculas de ácido siálico em resíduos de galactose terminal no LPS, resultando em notável resistência a morte mediada pelo complemento (Smith *et al.*, 1995). Postula-se, também, que *N. gonorrhoea*, por exporem resíduos de galactose terminal na pilina, possam acoplar moléculas de ácido siálico quando infectam o hospedeiro (Smith *et al.*, 1992). Além disso, o soro normal humano contém anticorpos que reagem com resíduos  $\alpha$ -galactosil terminais (anti- $\alpha$ -Gal), encontrados em estruturas de parede celular bacterianas e nos pili de *N. meningitidis* (Hamadeh *et al.*, 1995). Epitopos reconhecidos por anti- $\alpha$ -Gal também estão presentes em glicoproteínas cerebrais humanas (Jaison *et al.*, 1993). É possível que tais anticorpos intermedeiem a passagem do meningococo para o sistema nervoso central (Virji, 1997).

O modelo de estudo da glicosilação protéica em procariotos tem sido o patógeno intestinal *Campylobacter jejuni*. Interessantemente, esse microrganismo apresenta os dois sistemas de glicosilação (*N*- e *O*-ligados) e, por esse motivo, os estudos referentes a genes responsáveis pelos processos de glicosilação nesse microrganismo encontram-se bem avançados. Destaca-se que *C. jejuni* apresenta um grupo de genes (*pgl*), entre outros, que codifica um sistema muito similar ao complexo oligossacaril-transferase encontrado em eucariotos e arqueobactérias (Szymanski *et al.*, 1999 e Wacker *et al.*, 2002). Análise detalhada por espectrometria de massa combinada à ressonância magnética nuclear (NMR) da flagelina, uma das glicoproteínas de *C. jejuni*, identificou o resíduo ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-L-glicero-L-manononolítico como o principal substituinte entre os cerca de 19 sítios contendo resíduos Ser/Thr

(Thibault *et al.*, 2001). Essas nonuloses (C<sub>9</sub>-açúcar), heptoses, e hexoses similares, apesar de serem atípicas na célula eucariótica, estão sendo identificadas com mais frequência em procariotos (Stimsom *et al.*, 1995; Gil-Serrano *et al.*, 1999; Benz & Schmidt, 2001 e Thibault *et al.*, 2001).

Em *Chlamydia trachomatis*, a glicosilação de uma proteína de membrana (“major outer-membrane protein” - MOMP) foi sugerida através do estudo de interação com lectinas vegetais (Swanson & Kuo, 1990). Em estudos posteriores, demonstrou-se que oligossacarídeos *N*-ligados, constituintes da glicana em MOMP, são essenciais para a adesão e infectividade em ensaios com células HeLa (Swanson & Kuo, 1994; Kuo *et al.*, 1996). Em outro gênero de patógeno intracelular, *Erlichia sp.*, duas proteínas imunodominantes, que provavelmente localizam-se na superfície bacteriana, exibem regiões ricas em resíduos de serina (McBride *et al.*, 2000), e também apresentaram afinidade por lectinas vegetais. A clonagem dos respectivos genes em *E. coli* mostrou que a proteína recombinante continha resíduos de xilose, glicose e galactose como componentes de suas glicanas. Além disso, esses experimentos despertaram a noção de que *E. coli* era, por sua vez, capaz de glicosilar proteínas.

Das enterobactérias, *E. coli* é o único exemplo caracterizado como produtor de glicoproteína. Destaca-se que, desde 1975 carboidratos eram detectados em análises de pilina purificada (Tomoeda *et al.*, 1975), mas a idéia de glicosilação foi considerada muito improvável e essa idéia não foi levada adiante (Benz e Schmidt, 2002). Posteriormente, dois loci gênicos (*tibA* e *tibC*), relacionados com sistemas de adesão e invasão de células epiteliais, foram caracterizados nas linhagens enteropatogênica (EPEC) e enterotoxigênica (ETEC) (Lindenthal e Elsinghorst, 1999; Lindenthal e Elsinghorst, 2001). A proteína TibA é um autotransportador que requer glicosilação para sua atividade, e *tibC* codifica as glicosil-transferases responsáveis por essas modificações pós-traducionais. Em um sistema semelhante, linhagens de *E. coli* enteropatogênica de aderência difusa (DA-EPEC) continham os loci gênicos situados em um plasmídio, que codifica o autotransportador AIDA-I (adesina envolvida em aderência difusa) e as glicosiltransferases AAH (Benz e Schmidt, 1989; Suhr *et al.*, 1996 e Benz e Schmidt, 2001). A caracterização estrutural dos resíduos heptosil de AIDA-I originou no primeiro relato de modificação protéica contendo resíduos de heptoses.

A identificação de numerosas glicoproteínas em patógenos abre, então, questões que orientam caminhos para análises futuras. Apesar de ser meramente didática, a

divisão entre glicoproteínas de patógenos e bactérias comensais ainda não é baseada em características discriminatórias. Assim, os resultados obtidos com nossos estudos, através da identificação de uma provável glicoproteína de outro patógeno intestinal (*Salmonella enterica*), vêm somar às informações obtidas com os vários microrganismos, no sentido de tentarmos compreender esse fenômeno da glicosilação, e sua influência na relação parasita-hospedeiro.

#### I.e – *Mecanismos de biossíntese das glicoproteínas procarióticas*

Em células eucarióticas, as glicoproteínas são sintetizadas no ambiente intracelular, onde complexos nucleotídeo-açúcar e dolicol (ou outro lipídeo)-açúcar são utilizados como intermediários (Szymanski e Wren, 2005). Nas N-glicosilações, resíduos glicídicos de complexos nucleotídeo-açúcar do citosol são direcionados para o retículo endoplasmático, onde serão ligadas a um composto lipídico isoprenóide ancorado à membrana dessa organela (dolicol-fosforil), formando o complexo dolicol-fosforil-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>, que, no espaço luminal, tem sua glicana transferida para um resíduo asparaginil da proteína. Três resíduos de glicose, ligados em um braço terminal da cadeia oligossacarídica, facilitam, de maneira ainda não elucidada, o acoplamento à cadeia polipeptídica, sendo removidos no trajeto em direção aos compartimentos do aparelho de Golgi. Nesse trajeto, e no aparelho de Golgi, a cadeia glicídica sofre uma série de modificações, no sentido de remover e/ou adicionar alguns resíduos de açúcar, completando a biossíntese e direcionando a recém-formada glicoproteína para a secreção, ou para a membrana da célula (Varki *et al.*, 1999).

De maneira diferente, as O-glicosilações ocorrem principalmente no lúmen das vesículas de Golgi, de modo que cada monossacarídeo seja adicionado, passo a passo, utilizando uma série de glicosil-transferases e vários nucleotídeo-monossacárides como intermediários (Varki *et al.*, 1999). Os cernes oligossacarídicos encontrados nas glicanas O-ligadas são mais variados que nas N-ligadas e sua ocorrência afeta, em maior proporção, a estrutura e estabilidade do esqueleto polipeptídico (Fasman, 1998). Em mucinas, por exemplo, oligossacarídeos O-ligados são responsáveis por uma conformação linear da molécula, e a eliminação dessas glicanas altera a estrutura terciária das moléculas, que passa a ser globular (Rose et al, 1984).

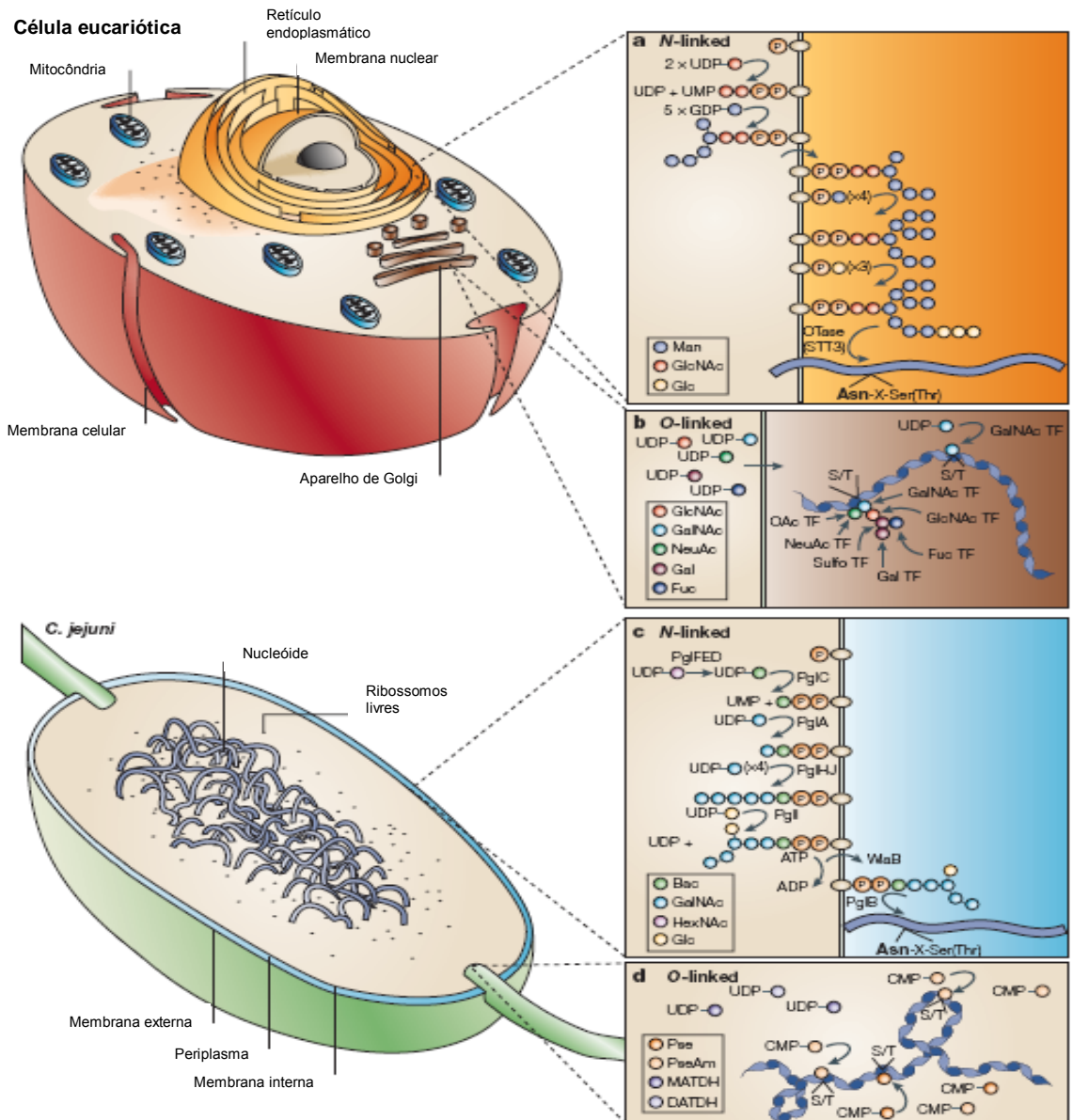
Os procariotos têm uma parte significativa de seus genomas relacionado a biossíntese de glicoconjugados. Ocasionalmente, as enzimas necessárias para a síntese

de glicoproteínas compartilham das mesmas vias de produção de outros glicocomplexos, como os lipooligossacarídeos (LOS), lipopolissacarídeos (LPS) e cápsulas, por exemplo, sem que haja qualquer compartimentalização celular aparente<sup>1</sup> (Stimson *et al.*, 1995). Porém, o mecanismo biossintético de glicoproteínas desses organismos foi identificado para poucos exemplares. Como o Golgi e o retículo endoplasmático são estruturas inexistentes, seria provável que os procariotos utilizassem vários mecanismos diferentes de glicosilação, envolvendo a participação de glicosil-transferases, podendo seguir a rota de glicosilação não-enzimática conhecida como glicação, recentemente descrita para *E. coli* (Mironova *et al.*, 2001 e Mironova *et al.*, 2003).

As glicosil-transferases estão localizadas normalmente na parte externa da superfície celular de bactérias, e são essas enzimas que montam os oligossacarídeos (para serem *N*- ou *O*-ligados) de maneira a transferir o resíduo glicosídico de um intermediário nucleotídeo-açúcar, ou lipídeo-açúcar (e.g. dolicol-fosforil-açúcar) para a cadeia oligossacarídica crescente (Sumper, 1987). Em *Halobacterium sp.*, no entanto, a cadeia oligossacarídica é completada e sulfatada no citosol através de um mecanismo ainda desconhecido, e resíduos terminais de glicose são metilados com a suposta finalidade de sinalizar a mobilidade dessa cadeia para a superfície celular. É na superfície celular que ocorre a *N*-transferência para a proteína, num processo funcionalmente semelhante ao que ocorre no lúmen do retículo endoplasmático, porém, sem qualquer edição pós-acoplamento. A ausência de modificações pós-acoplamento parece ser comum em procariotos. *Methanothermus fervidus* constitui uma exceção, uma vez que este microrganismo processa a glicana após acoplamento à cadeia polipeptídica (Hartmann & König, 1989).

Os resultados obtidos em trabalhos com glicoproteínas de algumas arqueobactérias revelaram o envolvimento de intermediários lipídicos (por exemplo, C60-poli-isoprenóide) na transferência de cadeias oligossacarídicas para a cadeia polipeptídica. Esses resultados indicam que, assim como na célula eucariótica, a glicosilação protéica em procariotos seja um processo mediado por membranas (Zhu *et al.*, 1995). Assim, é perfeitamente possível que a face extracelular da membrana citoplasmática bacteriana funcione como a região luminal do retículo endoplasmático. O apêndice 4 resume os modelos para *N*- e *O*-glicosilações montados a partir de dados recentes obtidos a partir de *Campylobacter jejuni*.

**Esquema 1.** Modelo para a biossíntese de glicoproteínas *N*- e *O*-ligadas em eucariotos (a;b) em comparação com bactérias (Szymanski e Wren, 2005). Em *C. jejuni*, a *N*-glicosilação parece ser procedida através da adição sequencial de açúcares de intermediários nucleotídeo para um carreador lipídico, resultando na formação de um heptassacarídeo ramificado (c). Essa glicana é contravertida para a face externa da membrana citoplasmática, voltando-se para a região periplasmática, num processo similar ao de eucariotos (a). No entanto, o oligossacarídeo é editado a tetradecâmero e transferido para a cadeia polipeptídica pelo complexo oligossacaril-transferase. Um dos membros chave desse complexo é a proteína *Stt3*, que tem como ortólogo em *C. jejuni* a *PglB*, que é o componente necessário para a transferência do heptassacarídeo ao resíduo *Asn* (c). Em eucariotos as *N*-glicanas são variáveis devido ao remodelamento que ocorre no aparelho de Golgi, enquanto que o heptassacarídeo em *C. jejuni* permanece sem alterações. O processo de *O*-glicosilação em eucariotos ocorre em passos sucessivos de transferência de açúcares dos intermediários nucleotídeo para um resíduo *Ser* ou *Thr*, no aparelho de Golgi (b). Como o flagelo de *C. jejuni* atravessa os lados interno e externo da membrana, a *O*-glicosilação dos monômeros de flagelina parece ocorrer na face interna da membrana, onde os complexos nucleotídeo-açúcar são individualmente adicionados para *Ser* ou *Thr* da proteína nascente (d). **Bac**: 2,4 diacetamido-2,4,6-tridesoxi-glucose; **DATDH**: diacetamido tridesoxi-hexose; **MATDH**: monoacetamido tridesoxi-hexose; **NeuAc**: ácido N-acetil-neuramínico; **Pse**: ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeseoxi-2-nonosulônico; **PseAm**: análogo 5-acetamidino de **Pse**; e **TF**: transferase.



A capacidade de adaptação das bactérias nas mais variadas condições ambientais, e em situações de estresse, é formidável. Assim, é possível que as bactérias tenham adquirido um aparato gênico, através de transferência lateral (ilhas de glicosilação), que lhes atribuíram a aptidão de glicosilar suas proteínas. Os trabalhos nesse campo estão apenas começando a identificar e compreender os sistemas de glicosilação bacterianos, e análises futuras devem nos levar a uma jornada de descobertas sobre esse fenômeno biológico universal.

## II – Gênero *Salmonella*

### II.a – Aspectos gerais

*Salmonella* é um gênero bacteriano pertencente à família Enterobacteriaceae, composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e geralmente flagelados (Brocchi *et al.*, 1998). Os sistemas de classificação taxonômica de *Salmonella* são, ainda, controversos. A classificação aceita atualmente divide o gênero em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo *S. enterica* subdividida em 6 subespécies (apêndice 5). Todas as sorovariedades (ser.) patogênicas para seres humanos e outros vertebrados estão classificadas como *S. enterica* subespécie *enterica* (Brenner *et al.*, 2001). Assim, a sorovariedade Typhimurium é designada formalmente como *S. enterica* subsp *enterica* ser. Typhimurium, ou simplesmente *S. enterica* Typhimurium.

**Apêndice 5.** Espécies, subespécies e sorovariedades\* de *Salmonella* (Brenner *et al.*, 2001).

<b>Espécies e subespécies de <i>Salmonella</i></b>	<b>Quantidade sorovariedades</b>	<b>Habitat usual</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1454	Animais de sangue quente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	489	Ambientais e animais de sangue frio
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	94	Ambientais e animais de sangue frio
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	324	Ambientais e animais de sangue frio
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	70	Ambientais e animais de sangue frio
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	12	Ambientais e animais de sangue frio
<i>S. bongori</i>	20	Ambientais e animais de sangue frio

\*Sorovariedade é um sistema de classificação antigênica baseado em diferenças estruturais de complexos lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas (antígeno somático - 'O'), e em diferenças estruturais de componentes flagelares (antígeno flagelar - 'H'). Atualmente, são conhecidas cerca de 2463 sorovariedades de *Salmonella*.

## II.b – Infecções por *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

A subespécie *S. enterica enterica* pode causar um grande espectro de infecções, que variam de assintomáticas a sistêmicas, dependendo da sorovariedade bacteriana e do hospedeiro envolvido. Como exemplo, *S. enterica* Typhi é responsável por infecção sistêmica grave em seres humanos, denominada febre tifóide (Brocchi *et al.* 1998). *S. enterica* Typhimurium, comumente isolada de casos de gastroenterites em humanos, causa um tipo de infecção em camundongos muito semelhante à febre tifóide em humanos. Portanto, a infecção murina pela sorovariedade Typhimurium é um modelo experimental muito útil para vários estudos que correlacionam à febre tifóide humana (Ohl e Miller, 2001). Em geral, as infecções por *S. enterica* são resultantes da ingestão de líquidos ou alimentos contaminados. Estas colonizam a mucosa ileal e placas de Peyer. As sorovariedades invasivas atravessam a barreira intestinal para infectar e proliferar em órgãos linfo-reticulares, causando doença sistêmica que pode ser fatal (Ohl e Miller, 2001).

## II.c – Interação com o hospedeiro

Uma característica importante na virulência de *Salmonella* é a capacidade de aderir ao tecido intestinal do hospedeiro através da expressão de vários tipos fímbrias (Johnes, 2005). Giannasca *et al.* (1995) observaram um padrão de adesão de *S. enterica* semelhante ao de uma aglutinina de amendoim (PNA), sugerindo a presença de aglutininas fímbricas que se ligariam a resíduos terminais de D-Galactose (mais especificamente Gal $\beta$ (1-3)GalNAc). Um estudo recente apontou uma região da molécula de uma das fímbrias (Fímbria tipo I) responsável pela adesão e formação de biofilmes no tecido epitelial da mucosa intestinal de camundongos (Boddicker *et al.*, 2002). Ressalta-se que não existem relatos de glicosilação em fímbrias, pili ou quaisquer proteínas de *Salmonella*. Após a adesão e colonização, as células bacterianas iniciam a invasão através da expressão do sistema de secreção tipo III, que injeta proteínas efetoras para o citoplasma da célula eucariótica, ocasionando num rearranjo de proteínas do citoesqueleto, formando as clássicas estruturas na membrana denominadas “ruffles” (Darwin e Miller, 1999). A bactéria é, então, internalizada, e a célula epitelial infectada passa a secretar citocinas e prostaglandinas que agem no recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção (Wallis e Galyov, 2000). Algumas sorovariedades de *Salmonella* são capazes de sobreviver e multiplicar no

interior de células fagocíticas do hospedeiro, sendo carregadas para a circulação sistêmica. No interior de macrófagos, por exemplo, a célula bacteriana passa a expressar uma série de genes regulados pelo sistema PhoP/PhoQ, codificando proteínas que possibilitarão a sobrevivência no interior de uma célula fagocitária. Além disso, a expressão de um gene denominado *dps* é um fator determinante na sobrevivência de *Salmonella* no interior de macrófagos (Halsey *et al.*, 2004).

### III – Dps: a proteína que protege o DNA bacteriano

A capacidade de proteger macromoléculas vitais em períodos de extrema adversidade é vital para a sobrevivência de um organismo. Nesse sentido, muitos microrganismos desenvolveram mecanismos protetores de biomoléculas em resposta a ambientes de estresse nutricional ou oxidativo (Almirón *et al.*, 1992 e Grant *et al.*, 1998). Inúmeros trabalhos de pesquisa têm mostrado mudanças metabólicas na transição da fase exponencial de crescimento bacteriano para a fase estacionária, quando os componentes nutricionais são mais escassos. Assim, uma proteína ligante de DNA, designada Dps (do inglês “DNA-binding protein from starved cells”), foi inicialmente identificada em *Escherichia coli*, cuja expressão é ativada durante a fase estacionária de crescimento (Almirón *et al.*, 1992), ou em presença de espécies reativas de oxigênio (Martinez & Kolter, 1997). Em situações de estresses nutricional e/ou oxidativo, Dps é produzida em grande quantidade, e os mais diversos gêneros bacterianos são capazes de produzir moléculas homólogas, sugerindo que a proteção do DNA via biocristalização por Dps, ou proteínas homólogas, seja crucial e amplamente encontrada em procariotos (Wolf *et al.*, 1999). Esse processo não requer consumo de energia e consiste em um fator de virulência bacteriana, uma vez que confere resistência em habitats adversos através de um mecanismo de transição de fases da cromatina bacteriana (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2001).

Além da sua ligação ao DNA e formação de biocristais, a resolução da estrutura cristalina de Dps suscitou outra hipótese para sua função: de estrutura similar as ferritinas, grupo de proteínas responsáveis pelo estoque de ferro iônico, Dps parece proteger o DNA de agentes oxidativos sequestrando íons ferro, que poderiam gerar radicais livres altamente reativos (Grant *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2003). O fato de Dps estar sob controle transcricional de *oxyR* e do fator sigma *rpoS*, sistemas operacionais



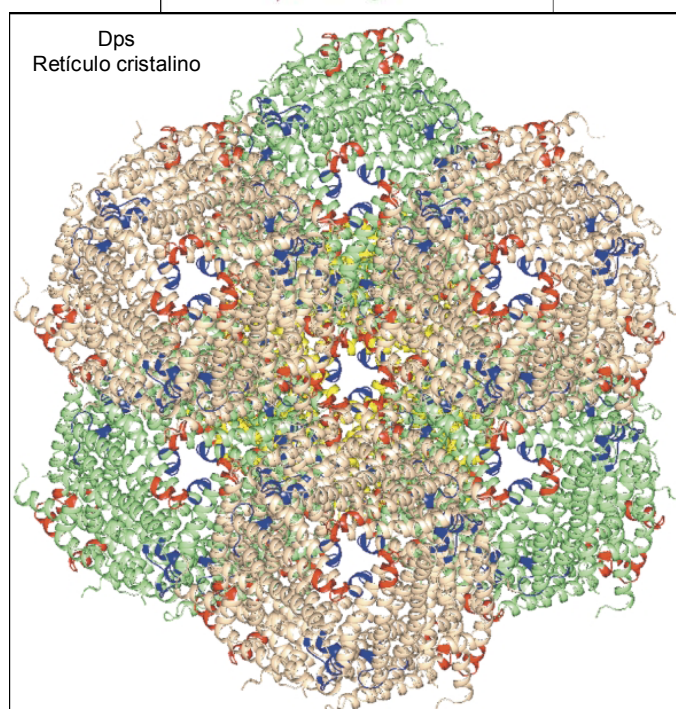
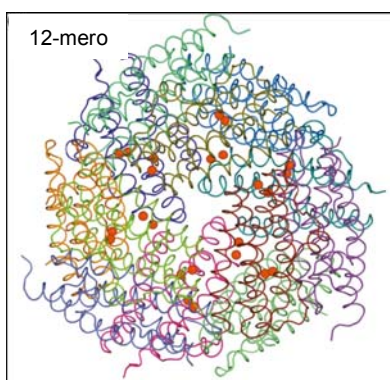
de genes induzidos em ambientes oxidativos e na fase estacionária de crescimento, respectivamente, parece confirmar a funcionalidade dessa proteína (Ivanova et al., 1997). Por fim, a construção de um mutante *dps*-nulo produziu linhagens atenuadas na virulência, e altamente suscetíveis à inativação por agentes oxidantes, reforçando a idéia de proteção da molécula de DNA por Dps (Halsey et al., 2004).

#### *Modelo de interação com o DNA*

Dps interage com o DNA bacteriano através da formação de dodecâmeros, resultando na rápida formação de co-cristais. No entanto, o mecanismo de formação de multímeros, bem como o modo de interação com o DNA não são totalmente elucidados. Como os dodecâmeros observados na cristalização protéica são idênticos aos do complexo Dps-DNA, acredita-se que, em ambos os casos, haja a mesma interação proteína-proteína (Ceci et al., 2004). Os multímeros de Dps formam um retículo cristalino hexagonal, de maneira que três dodecâmeros adjacentes determinam orifícios que são limitados por uma região rica em resíduos de lisina, provenientes da região N-terminal dos monômeros. Assim, no complexo Dps-DNA, presume-se que o DNA seja acomodado nos orifícios, interagindo com os resíduos de lisina (ver esquema 2).

Um dado interessante é que em eucariotos fosfoproteínas nucleares contêm resíduos GlcNAc O-ligados, e formam complexos multiméricos reversíveis que são sensíveis ao estado de fosforilação (Comer e Hart, 1999 e Iyer e Hart, 2003). A fosforilação e glicosilação parecem trabalhar em sintonia no sentido de intermediar interações protéicas. Um dado interessante é que Dps foi descrita como fosforilada em estudo com *E. coli* (Freestone, et al., 1998). No entanto, não há, na literatura, indicações de que modificações pós-transcricionais, como glicosilações, ocorram em alguma Dps. Desse modo, a caracterização de glicosilação em Dps, apontada em nossos trabalhos, pode trazer um dado importante para um fenômeno presumivelmente geral entre os seres vivos, que é a alternância entre glicosilação e fosforilação de moléculas componentes do nucleóide (bacteriano) ou núcleo celular (eucariotos).

**Esquema 2.** A estrutura geral do dodecômero é apresentada como 12-mero. Cada monômero é desenhado de uma cor diferente. As esferas vermelhas representam 24 íons de Ferro nos centros correspondentes à ferroxidase. A interação entre dodecâmeros de Dps forma um retículo cristalino hexagonal, determinando orifícios por onde presume-se que o DNA seja acomodado (Rem *et al.*, 2003)



#### IV – Lectinas vegetais como ferramentas em pesquisa

Lectinas são proteínas que possuem um domínio não catalítico que se liga específica e reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo (Peumans e van Damme, 1995). Embora as primeiras descrições de lectinas datem do final do século XIX (Stillmark, 1888), é recente a idéia de que elas possam mediar fenômenos biológicos a partir do reconhecimento de glicanas, especialmente as expressas em superfícies celulares (Lis e Sharon, 1998). Experimentos que visavam avaliar a interação de lectinas com microrganismos começaram a ser publicados apenas no final da década de 60, quando foi demonstrado que a Concanavalina A, lectina de origem vegetal, ligava-se especificamente a lipopolissacarídeos da parede de algumas bactérias Gram-negativas (Doyle, 1994). Ensaios lectino-enzimáticos foram inicialmente utilizados na detecção do agente etiológico do carbúnculo (*Bacillus anthracis*), sendo amplamente empregados atualmente (Pevzner *et al.*, 2004). Além disso, lectinas vegetais têm sido uma importante ferramenta utilizada por glicobiologistas na purificação de glicocomplexos (Lis e Sharon, 2004).

##### *Considerações gerais sobre a jacalina*

Jacalina é uma lectina de origem vegetal (*Artocarpus integrifolia*), constituída de duas cadeias polipeptídicas, uma mais pesada denominada “ $\alpha$ ”, contendo o sítio de reconhecimento do carboidrato (CRD – “carbohydrate recognition domain”), e outra mais leve denominada “ $\beta$ ”, que se associam para formar um tetrâmero contendo dois heterodímeros  $\alpha/\beta$  (Do & Lee, 1998). Possui reconhecida propriedade de ligação ao dissacarídeo Gal $\beta$ 1-3GalNAc-*O*- $\alpha$ Ser/Thr, denominado antígeno-T, através do resíduo subterminal GalNAc (Sastry *et al.*, 1986), e interage com compostos glicídicos que apresentam resíduos de D-galactose terminais, preferencialmente na conformação beta ( $\beta$ -D-galactopiranosídeo), podendo, em alguns casos, interagir com  $\alpha$ -D-galactopiranosídeos de proteínas N-glicosiladas (Do & Lee, 1998), manose e oligomanosídeos (Bourne *et al.* 2002). Jacalina foi utilizada na purificação de imunoglobulina A (Roque-Barreira e Campos-Neto, 1985), no estudo de patógenos intestinais (Johansen *et al.*, 1994), e no estudo da interação entre a glicoproteína gp120 do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e o receptor CD4 de linfócitos T humanos (Corbeau *et al.*, 1995). Além disso, essa lectina tem sido utilizada em

processos de purificação de antígenos glicoconjugados de microrganismos em coluna cromatográfica em trabalhos desenvolvidos pelo nosso programa de pós-graduação (Cardoso, 2000; Fortunato, 2000 e 2004; Coltri, 2002). Nesse sentido, antígeno bruto de *S. enterica* Typhimurium produzido em culturas líquidas, foi cromatografada em coluna de Sepharose®-jacalina. O material retardado na coluna revelou uma banda de aproximadamente 18.000 Daltons em SDS-PAGE, que foi intensamente corada por periodato/prata alcalina (Tsai e Frasch, 1982). Análises posteriores identificaram essa fração protéica como análoga a Dps, e nossos resultados indicaram que a Dps purificada de *S. enterica* (J-Dps) seja uma proteína glicosilada.

# 2

## Objetivos

Glicosilação protéica parecia ser uma peculiaridade de organismos que possuíam células aparelhadas com estruturas intracelulares delimitadas por membranas, no caso, os eucariotos. Mais recentemente, reuniram-se evidências de que glicoproteínas podem estar presentes em todas as formas de vida e desempenhar papéis biológicos relevantes. O isolamento de uma glicoproteína de um patógeno motivou o presente estudo, que teve como objetivos identificar e parcialmente caracterizar o glicoconjugado de *Salmonella enterica* que interagiu com jacalina. Acreditamos que a caracterização de glicosilação de uma proteína que se liga ao DNA na célula bacteriana seja de extrema relevância biológica, e possa contribuir para avanços no estudo da patogênese da infecção. Na dependência da repercussão funcional da glicosilação da Dps, é possível que terapias alternativas para a infecção por *S. enterica*, e, mesmo para outras bactérias, sejam desenhadas.

Para tanto, buscou-se atingir as seguintes metas:

- ✓ purificar glicoconjugado de *S. enterica* por cromatografia de afinidade, em coluna de jacalina imobilizada;
- ✓ identificar o material purificado através de seqüenciamento N-terminal;
- ✓ produzir anticorpos policlonais específicos para o glicoconjugado isolado;
- ✓ ensaiar, imunoquimicamente, a ligação do material isolado a lectinas diversas;
- ✓ avaliar a dinâmica de interação com jacalina durante diversos períodos de cultivo;
- ✓ construir uma linhagem de *S. enterica* recombinante produtora do componente isolado em coluna de jacalina, independente da fase de crescimento;
- ✓ seqüenciar o gene responsável pela produção desse constituinte;
- ✓ obter dados de seqüência polipeptídica através de “peptide mass fingerprint”;
- ✓ caracterizar a(s) glicana(s) contida(s) no material purificado, através de estudos em espectômetro de massa.

# 3

## **Materiais e Métodos**

### **I – Preparação de antígenos bacterianos**

#### *I.a – Cultivo de linhagens bacterianas*

A linhagem de *Salmonella enterica* Typhimurium utilizada é a UK-1 (Universal Killer)  $\chi$  – 3761, cortesia de ROY CURTIS III (Washington University, Washington – D.C.), e mantida à temperatura negativa de 70°C (-70°C) em glicerol 20%. As sementeiras foram feitas em meio líquido e/ou sólido Luria Bertani – LB (Gibco-Life Technologies, Paisley, Scotland). Para purificação de Dps por cromatografia líquida, o clone recombinante de *S. enterica* (UK-1 pGEM T®/dps) foi cultivado em caldo LB suplementado com 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (USB-Amersham Life Science, Buckinghamshire, England - UK). Todas as linhagens foram

incubadas a 37°C em agitador (New Brunswick Scientific, New Jersey – USA) até a fase estacionária de crescimento.

#### I.b – *Preparação de extrato antigênico para cromatografia*

O extrato bruto bacteriano foi preparado a partir da massa bruta obtida após centrifugação dos cultivos em caldo LB a 7000 rpm e em 4°C. O sobrenadante de meio de cultura foi desprezado e o material restante foi ressuspense em solução salina tamponada com fosfato 10 mM, pH 7,2 contendo azida sódica 0,2%. Para a preparação do antígeno bruto o material foi dividido em vários tubos cônicos plásticos (Eppendorf) e lavados por centrifugação 14000 rpm em tampão PBS/azida por três vezes. Após a última lavagem cada material foi ressuspense em 600µl do mesmo tampão e submetido ao ultra-som em aparelho sonicador (3 pulsos de 30 segundos) sob banho de gelo. Logo após, o mesmo foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante (extrato bruto) coletado para dosagem de proteínas totais (LOWRY et al., 1951). Para purificação de Dps por cromatografia líquida, o extrato bruto do clone recombinante de *S. enterica* (UK-1 pGEM T®/dps) foi precipitado com solução de sulfato de amônio [990 ml água deionizada; 1,21 g Tris (pH 7,0 com HCl 4 N); 767 g sulfato de amônio; completado para 1000 ml com água deionizada], com porcentagem de saturação a 90%, precipitado foi ressuspense em tampão de dissociação Dps/DNA [Tris-Cl 50 mM (pH 8,0); NaCl 2 M; e EDTA 0,1 mM] e dialisado contra o mesmo tampão utilizando membrana YM-10 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, USA).

#### I.c – *Extração de proteínas totais*

A extração de proteínas totais foi feita a partir da centrifugação de 1,5 ml de uma cultura bacteriana em LB. O sedimento bacteriano foi, então, ressuspense em 100 µl tampão redutor [fórmula para 10 ml: 3,55ml água deionizada; 1,25 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 6.8); 2,5 ml glicerol; 2,0 ml SDS 10% (m/v); 0,2 ml azul de bromofenol 0,5% (m/v); 0,5 ml β-mercapto etanol (imediatamente antes do uso)]. Após ressuspensão total do sedimento, os tubos foram incubados em banho seco a 100°C por 10 minutos. Centrifugou-se novamente (14000 rpm – 2 minutos), e 10 µl do sobrenadante de cada amostra aplicados em SDS-PAGE.



## II – Análise da interação entre lectinas e célula bacteriana por citometria de fluxo

### II.a – Contagem de colônias em placa

Esse método é utilizado para estimar a população bacteriana (UFC/ml) do material a ser analisado em citômetro de fluxo (FACS). Um pré-inóculo foi feito em 3 ml de caldo LB suplementado com glicose 20% (20 µl para cada ml de meio), e incubado a 37°C por 18 horas. Posteriormente, diluiu-se o crescimento 1:30 em 20 ml de LB-glicose, e incubou-se a 37°C até que o crescimento alcançar a densidade óptica ( $\lambda=600\text{nm}$ ) de aproximadamente 0,600. O material foi centrifugado a 7000 rpm, 4°C e lavado em 10 ml de tampão PBS estéril. Ressuspendeu-se o material em 2 ml de PBS esterilizado e fez-se diluições seriadas de ordem 10 (de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) no mesmo tampão. Cem µl das diluições entre  $10^{-5}$  a  $10^{-10}$  foi semeado em placas de Petri contendo LB-água ('spread plates') e incubadas a 37°C, por 18 horas, para contagem de colônias, com o intuito de estimar o número de células bacterianas na amostra original.

### II.b – Preparação das lectinas biotinizadas

As lectinas vegetais utilizadas foram jacalina (*Artocarpus integrifolia*), GSIB4 (*Griffonia simplicifolia*), Euforbina (*Euphorbia milii* var. *milii*) e PNA ("Peanut Agglutinin" – lectina de amendoim), cortesia da Profª. Dra. Maria Cristina Roque Barreira (FMRP – USP), sendo marcadas de acordo com o protocolo de marcação com biotina segundo o "Kit" EZ-Link™ (Pierce Chemical Co., Rockford, IL – USA). Em resumo, 38 µl de sulfo-NHS-biotina foram adicionados a 1 mg de lectina diluída em 0,5 ml de PBS (pH 8,0), e incubados 37°C "overnight", seguido de exaustiva diálise contra PBS. Por fim, o material dialisado foi ressuspensão em 500 µl de PBS (concentração final = 2 mg/ml), e estocado a 4°C até o uso.

### II.c – Citometria de fluxo

Suspensões bacterianas (1 ml, em PBS), contendo  $10^6$  UFC/ml, foram submetidas à incubação com 100 µl das lectinas biotinizadas, ou com PBS (controle de fluorescência intrínseca), por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após centrifugação (5000 rpm) e lavagem (PBS), as células bacterianas foram

incubadas com conjugado estreptavidina-fluoresceína por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram novamente lavadas, e após fixação com tampão PBS-formol 1%, procedeu-se as análises de citometria de fluxo. A porcentagem de ligação foi estimada através da subtração da fluorescência de bactérias incubadas apenas com estreptoavidina-fluoresceína (controle negativo).

### III – Purificação de antígenos por cromatografia

#### III.a – Cromatografia de afinidade em coluna “Hi-Trap®” - PNA

Extrato bruto antigênico de *S. enterica* UK-1 (item I.b) foi aplicado em coluna de PNA imobilizada “HiTrap®” (Amersham Pharmacia Biotech AB – Uppsala – Sweden), com volume do leito de 1,0 ml. O material que não interagiu com a resina foi eluído com tampão de ligação (PBS acrescido de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), enquanto o material adsorvido à coluna foi eluído com D-Galactose 0,4 M, dissolvida no mesmo tampão. Foram coletadas frações de 2,0 ml, sendo monitoradas em espectrofotômetro pela leitura de absorbância a 280 nm. As frações com leituras acima de 0,01 foram coletadas em uma amostra única e ultradiafiltrada contra água destilada, utilizando membrana YM-10 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, USA). Alíquotas dessa preparação foram armazenadas a 4°C. Essa amostra foi utilizada como fonte de antígenos para corrida eletroforética (SDS-PAGE 12,5%).

#### III.b – Cromatografia de afinidade em coluna de jacalina imobilizada

Extrato bruto antigênico de *S. enterica* UK-1 (item I.b) foi aplicado em coluna de jacalina imobilizada em Sepharose (matrizes ativadas de brometo de cianogênio – Sigma), com volume do leito aproximado de 2,5 ml. O material que não interage com a resina é eluído com tampão PBS/NaCl 0,5 M, enquanto que o material adsorvido à coluna é eluído com D-Galactose 0,4 M, dissolvida no mesmo tampão. São coletadas frações de 2,5 ml, sendo monitoradas em espectrofotômetro pela leitura de absorbância a 280 nm. As frações com leituras acima de 0,01 foram coletadas em uma amostra única e ultradiafiltrada contra água destilada, utilizando membrana YM-10 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, USA). Alíquotas dessa preparação foram

armazenadas a  $-20^{\circ}$  C. Essa amostra foi utilizada como fonte de material ligante de jacalina (J-Dps) em vários experimentos.

As amostras de linhagens recombinantes (ver adiante) obtidas por cromatografia em FPLC foram submetidas ao mesmo protocolo de purificação em coluna de jacalina.

### III.c – *Cromatografia líquida por filtração em gel (FPLC)*

Esse protocolo de purificação foi baseado no descrito por Almirón *et al.* (1992). Dps em extratos brutos bacterianos foi purificada por cromatografia líquida no sistema FPLC (“Amersham Biosciences”). O material ultradiafiltrado contra tampão de dissociação (item I.b), contendo NaCl 2 M para a dissociação do complexo Dps-DNA, foi submetido à filtração em gel utilizando matriz de Sepharose G-100 pré-empacotada, com fluxo de 1,0 ml/min. As amostras são aplicadas na coluna previamente equilibrada com o tampão de dissociação, que é utilizado para eluição das frações contidas no material aplicado.

### III.d – *Cromatografia de afinidade em coluna DNA-celulose®*

Os materiais provenientes de purificação em coluna de filtração em gel foram ultradiafiltrados contra tampão de interação Dps/DNA (Tris-Cl 50 mM pH=8,0; NaCl 50 mM; e EDTA 0,1 mM) utilizando membrana YM-10 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, USA) e avaliados conforme o padrão de migração eletroforética (SDS-PAGE 12,5%). As frações correspondentes à Dps foram selecionadas para o ensaio de afinidade em coluna DNA/celulose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), segundo as especificações do fabricante. O material que não interagiu com a matriz foi eluído com tampão de interação, enquanto que o material adsorvido à coluna foi eluído com tampão de dissociação (item I.b). Foram coletadas frações de 2.5 ml, sendo monitoradas em espectrofotômetro pela leitura de absorbância a 280 nm. As frações com leituras acima de 0,01 foram colecionadas em uma amostra única e ultradiafiltrada contra água destilada, utilizando membrana YM-10 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, USA). Alíquotas dessa preparação foram armazenadas a  $-20^{\circ}$ C.

## IV – Análise eletroforética de antígenos bacterianos

### IV.a – Eletroforese em gel de poliacrilamida

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida (12.5%) em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema “Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System” (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA – LAEMMLI, 1970). As soluções das amostras foram adicionadas de tampão de amostra concentrado 5 vezes [6,25 µl Tris-HCl a 0,5 M pH 6,5; 10 µl SDS 10% (m/v); 12,5 µl Glicerol; 1 µl azul de brofenol 0,5% (m/v) – diluiu-se 1:5 nas soluções das amostras], e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas 80-120 mA, 200 V. As colorações dos géis utilizadas foram: “Coomassie Blue” R-250; os “kits” de coloração diferencial proteína/glicoproteína ProQ™ Emerald 300 e SYPRO® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR – USA); método da prata (BLUM et al., 1987); e PAS/Prata alcalina (Tsai e Frasch, 1982). Os marcadores com massas moleculares (MM) conhecidas foram: BioRad™ [“Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA – USA”: Fosforilase B (97.4 kDa); Albumina Sérica Bovina (66.2 kDa); Ovalbumina (46 kDa); Anidrase Carbônica (31 kDa); Inibidor de Tripsinogênio (21.5 kDa); e Lisozima (14.4 kDa)], SYPRO® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR – USA), listados na tabela III, ou a mistura de marcadores moleculares pré-corados para eletrotransferência - Rainbow® (Amersham Intl – Buckinghamshire/UK).

**Tabela III** Características de proteínas incluídas no padrão de pesos moleculares “CandyCane Glycoprotein®” (Molecular Probes Inc., Eugene, OR – USA)

Protein (pt)	Molecular Weight	Glycoprotein? (gp)
$\alpha_2$ -Macroglobulin <sup>1</sup>	180,000	yes *
Phosphorylase b <sup>2</sup>	97,000	no
Glucose oxidase <sup>3</sup>	82,000	yes
Bovine serum albumin <sup>4</sup>	66,000	no †
$\alpha_1$ -Acid glycoprotein <sup>4</sup>	42,000	yes
Carbonic anhydrase <sup>5</sup>	29,000	no
Avidin <sup>6</sup>	18,000	yes *
Lysozyme <sup>6</sup>	14,000	no

#### IV.b – Eletrotransferência em nitrocelulose

Os componentes protéicos, separados em gel de poliacrilamida, foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose (Imobilon™, Millipore, Bedford, USA) em cuba contendo solução A [200 ml metanol; 3 g Tris (Trismabase); 14,4 g glicina; água deionizada (qsp 1000 ml)]. A transferência teve duração de 2 horas à temperatura ambiente (150 mA – “Mini-Protean - 3” – BioRad). Em seguida, as membranas contendo antígenos solúveis de *S. enterica*, foram colocadas em cuba com tampão de bloqueio [PBS adicionado de 0,1% Triton X-100 (v/v) e 3 % de leite em pó desnatado (m/v)], durante 2 horas a 37°C. Para a caracterização visual das bandas eletrotransferidas (“Western blotting”) o tampão de bloqueio foi trocado pelo mesmo tampão contendo anticorpos murinos anti-J-Dps, na diluição 1:5000, por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 2 vezes (tampão de bloqueio) por 20 minutos e colocadas no tampão contendo anticorpos anti-IgG de camundongo, conjugados com peroxidase eqüina. Após nova etapa de lavagens, as membranas foram incubadas em solução 0,1% de Triton X-100 (v/v) em PBS por 1 hora e em solução Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8) 2 vezes, 15 minutos cada, em temperatura ambiente. As membranas foram reveladas, então, com 4-cloro-1-naftol [20 ml Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8); 7 µl água oxigenada 30 V; e 5 ml 4-cloro-naftol 0,3% (m/v - em metanol)]. A reação foi interrompida com diversas lavagens em água deionizada.

#### IV.c – Eletrotransferência em PVDF

A fração protéica, separada por SDS-PAGE 12,5%, foi eletrotransferida para uma membrana de PVDF (Polivinil difluoreto – Imobilon™, Millipore, Bedford, USA) em cuba contendo tampão CAPS a 10 mM metanol 10%, pH 11. A transferência teve duração de 2 horas a temperatura ambiente (85-135 mA, 150V – “Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System” – GIBCO BRL, Gaithersburgh, USA –TOWBIN et al., 1987). A banda correspondente ao antígeno de *S. enterica*, de aproximadamente 18 kDa, foi enviada ao Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas, da Universidade de Brasília (CBSP – UnB), sob coordenação do Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, para seqüenciamento N-terminal, em um sistema de seqüenciamento protéico ABI 477A-120A (Applied Biosystems, Inc.).

## V – Ensaios lectino-enzimáticos (ELLA)

### V.a – *Ensaio de afinidade lectina/J-Dps*

Cada poço de uma microplaca de ELISA de poliestireno (96 poços, NUNC, Inc. Naperville, USA) foi revestido com 2 µg de J-Dps (“coating”), diluída em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,6 (50 µl/poço). Após 18 horas de incubação a 4°C, várias lavagens sucessivas foram feitas com PBS contendo 0.05% (v/v) de Tween-20 (PBS-T). O bloqueio de reações inespecíficas foi procedido com 100µl/poço de gelatina a 1% (m/v), em PBS-T, por 1 hora a 37°C em banho maria. Posteriormente, as placas foram incubadas, por 2 horas a 37° C, com 100 µl/poço (triplicata) da solução de lectina marcada com biotina (item II.b), diluída a 20 µg/ml em PBS-T-gelatina. O controle negativo foi feito com 100 µl de PBS-T-gelatina. Após 3 lavagens com PBS-T-gelatina, a placa foi incubada por 1 hora (100 µl/poço) com neutravidina conjugada com peroxidase (Sigma), diluída 1:4000 em PBS-T-gelatina. A placa foi novamente lavada 4 vezes, e a reação revelada com a adição de 100 µl/poço de solução reveladora [peróxido de hidrogênio 0,1% (19 µl 30V - Merck), ortofenilenodiamino 5 mg (Sigma), ácido cítrico 0,1 M (3 ml) e fosfato de sódio 0,2 M (3.2 ml); água destilada (qsp 6,25 ml) – pH 5,5], incubando-se por 15 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida através da adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M. A leitura de absorvância foi feita em comprimento de onda de 492 nm, em leitor automático Multiskan (MMC/340P, version 2.20).

### V.b – *Ensaio de inibição por açúcares*

O revestimento (“coating”) e bloqueio dos poços foram feitos conforme item anterior (V.a). Soluções de açúcares α-metil-D-galactose 0,1 M, β-metil-D-galactose 0,1 M (Sigma), e D-galactose 0,1 M (Mallinkodt Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, Méx. - México) com lectina biotinilada (20 µg/ml em PBS-T-gelatina) foram pré-incubados a 37°C por 30 minutos. Cada poço foi coberto, então, com 100 µl/poço da solução açúcar-lectina, e a placa incubada por 2 horas, a 37° C. O controle negativo foi feito com a solução de bloqueio. As lavagens, adição de neutravidina conjugada, revelação e interrupção da reação foram feitas conforme o item acima (V.a). A leitura de

absorbância foi feita em comprimento de onda de 492 nm, em leitor automático Multiskan (MMC/340P, version 2.20).

## **VI - Produção de anticorpos murinos anti-J-Dps**

Camundongos machos BALB/c de 7 a 8 semanas de vida, com aproximadamente 30 g, receberam 5 doses intraperitoneais de 10 µg de J-Dps. Na primeira preparação, o antígeno foi emulsionado em adjuvante completo de Freund. Nas 4 doses subseqüentes (21, 28, 35 e 42 dias após a primeira injeção), o antígeno foi emulsionado em adjuvante incompleto de Freund. Um grupo de 5 camundongos imunizados foi sangrado imediatamente antes da primeira (soro pré-imune), e 7 dias após a última injeção. Esses soros foram titulados em microplacas de poliestireno (96 poços, NUNC, Inc. Naperville, USA) pelo método imunoenzimático (ELISA), onde cada poço de uma placa foi revestido com 1µg J-Dps, diluído em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,6 (50 µl/poço). Após 18 horas de incubação a 4°C, foram feitas várias lavagens sucessivas com PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween-20 (PBS-T). O bloqueio de reações inespecíficas foi procedido com 100µl/poço de gelatina a 1% (m/v), em PBS-T, por 1 hora a 37°C em banho-maria. Em seguida, as placas foram incubadas com as amostras dos soros (100µl/poço), diluídas de 1:1000 a 1:256000 em PBS-T-gelatina, em triplicatas, por 2 horas a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-T-gelatina, as placas foram incubadas com anticorpos de coelho anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (1:4000 em PBS-T-gelatina – 100 µl/poço) por 1 hora. As placas foram lavadas novamente, por 4 vezes, e incubadas com 100 µl/poço de solução reveladora [ortofenilenodiamino (OPD), peróxido de hidrogênio e sais, em pastilhas para solução (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)], por 15 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida através da adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M. A leitura de absorbância foi feita em comprimento de onda de 490 nm em leitor automático (Multiskan MMC/340P, version 2.20), considerando-se reatividade satisfatória aquela que proporcionou densidade óptica pelo menos 4 vezes superior à proporcionada pelo soro pré-imune (controle negativo).

## VII – Ensaio imuno-lectino- enzimático da curva de crescimento

Extratos brutos de *S. enterica*, em diferentes períodos de crescimento, foram obtidos após centrifugação (5000 rpm; 4°C; 10 minutos) dos cultivos em caldo LB, incubados de 3 a 24 horas, e preparados conforme o item I.b. As proteínas foram dosadas através do método do biureto [BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL.,USA)], e as amostras cautelosamente diluídas no sentido de equalizar a quantidade de proteínas à da amostra menos concentrada. Para a confecção da microplaca de ELISA, cada poço de poliestireno (96 poços, NUNC, Inc. Naperville, USA) foi revestido com 2 µg de jacalina (“coating”), em um protocolo semelhante ao item V.a. Em primeiro lugar, os extratos bacterianos, em diferentes períodos de crescimento, foram adicionados (100 µl/poço) em triplicatas. Na seqüência, adicionou-se o anticorpo murino anti-J-Dps, o conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma Chemical Co.) e o revelador OPD, intercalados por lavagens, conforme descrição no item VI. A reação enzimática foi interrompida através da adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M, e a leitura de absorvância foi feita em comprimento de onda de 490 nm (Multiskan MMC/340P, version 2.20).

## VIII – Ensaios de desglicosilação protéica

### VIII.a – *Beta-eliminação com hidróxido de amônio*

Uma alíquota de J-Dps de aproximadamente 10 ηmoles foi seca em centrífuga a vácuo (“speed-vac”) para tratamento com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), utilizando o protocolo descrito pela Dra. Jane Thomas-Oates e colaboradores [comunicação pessoal (Rademaker *et al.*, 1998)]. Inicialmente, adicionaram-se 200µl NH<sub>4</sub>OH 25% (concentrado) e incubou-se 18 horas em banho-maria 45°C. Após esse período de incubação, a amônia foi evaporada utilizando-se de nova centrifugação a vácuo. O NH<sub>4</sub>OH residual foi eliminado através da adição de 200 µl de água ultra-pura (Milli-Q®), e centrifugação em “Speed-Vac”. Esse passo foi repetido uma vez mais e, por fim, a amostra foi estocada seca em refrigerador a –20°C para análises eletroforéticas.



### VIII.b – *Desglicosilação protéica com TFMS*

Aliquotas de J-Dps, livre de sais, foram transferidas para frascos de vidro, e selada com tampas de teflon. Esses materiais foram, então, liofilizados para tratameto com ácido tri-fluoro-metil sulfônico (TFMS), seguindo as especificações de “GlycoFree™ Deglycosylation Kit K-500” (Glyko, Inc. Novato-CA, USA). Brevemente, adicionaram-se 60 µl de tolueno (reagente B) à ampola contendo TFMS (reagente A), misturando levemente. As amostras foram mantidas em banho de gelo seco/etanol por 20 segundos e, em seguida, adicionaram-se, vagarosamente, 50 µl da mistura de reagentes (A+B) com uma seringa de vidro bem seca. As amostras foram colocadas no banho de gelo seco/etanol por mais 10 segundos e transferidas para um refrigerador a  $-20^{\circ}$  C. Os frascos foram agitados duas vezes em espaços de 5 minutos e mantidos no refrigerador por mais 4 horas. Após esse período, os frascos foram transferidos para o banho gelo seco/etanol por 20 segundos e, nesse momento, a capa de teflon da tampa retirada. Adicionaram-se 150 µl de piridina (reagente C), e nova incubação em banho gelo seco/etanol por mais 5 minutos. As amostras foram transferidas para banho de gelo (água) por 15 minutos e, em seguida, neutralizadas com 400 µl de bicarbonato de amônio 0,5%. As amostras foram, então, ultradiafiltradas contra água destilada, utilizando membrana YM-10 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, USA), para análises em espectrômetro de massa. Essas amostras foram utilizadas como fonte de Dps tratada com TFMS, e identificadas como TFMS+.

## **IX – Análises por Espectrometria de Massa**

### IX.a – *Caracterização de massas moleculares*

As amostras de Dps (1 nmol), tratadas ou não com TFMS (item VIII.b), foram analisadas por espectrometria de massa por pulverização ionizante (ESI-MS, *electrospray ionization–mass spectrometry*), no Laboratório de Glicobiologia de Parasitas, Instituto de Ciências Biomédicas II, USP. As análises foram realizadas em aparelho Finnigan LCQDuo *ion trap mass spectrometer* (Finnigan, ThermoQuest Inc., San Jose, CA). As amostras foram inicialmente ressuspensas em 10% de ácido fórmico, diluídas (1:2) com 100% acetronitrila contendo 0.2% de ácido fórmico, e introduzidas

no ESI-MS através de um capilar de sílica fundida de 30  $\mu\text{m}$  (diâmetro interno), em um fluxo de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Em todas as análises, a voltagem da fonte API (*atmospheric pressure ionization-API source*) foi mantida a 4,5-5,0 kV; a voltagem e temperatura do capilar foram mantidas a 12-22 V e 200-270°C, respectivamente. Os espectros foram adquiridos em modo positivo de ionização (ES+), na faixa de  $m/z$  500-2000, numa razão de 1 varredura a cada 3 segundos. Os espectros obtidos no primeiro octapole (ms1) foram processados por “deconvolution” utilizando o software Xcalibur (Finnigan, ThermoQuest) para determinação da massa molecular média das espécies multiplamente carregadas. Os parâmetros do aparelho foram otimizados utilizando-se como padrão de lisozima (Sigma, St. Louis).

#### IX.b – Caracterização parcial da glicana contida em J-Dps por GC-MS

Análises estruturais de glicanas contidas na molécula de Dps foram feitas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS), no Laboratório do Prof. Dr. Michael J. Ferguson, Universidade de Dundee, Escócia, Reino Unido. J-Dps, equivalente a 200 pmoles, foi misturado com 200 pmoles de *scyllo*-inositol, submetido à hidrólise com 0,5 N HCl metanólico por 4h, a 85°C (permetilação), e re-N-acetilado para análise da composição de monossacarídeos por GC-MS. Os padrões utilizados foram (1 nmol cada): Rha = ramnose; Fuc = fucose; Xyl = xilose; Man = manose; Gal = galactose; Glc = glicose; GalNAc = N-acetil galactosamina; GlcNAc = N-acetil glicosamina; e NANA = ácido N-acetil-neuramínico.

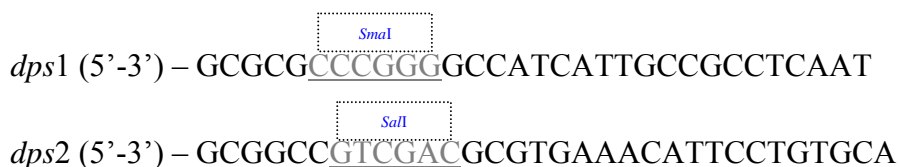
#### IX.c – Mapa peptídico e análise de íons oxônio

O mapa tríptico de amostras de Dps e a análise de íons oxônio (“parent ion scanning”) foram feitas no Laboratório de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto. As amostras foram secas em “speed-vac” e incubadas durante 24 horas com 50  $\mu\text{l}$  de solução contendo 0,5  $\mu\text{g}$  de tripsina (Promega, Madison, WI, U.S.A.) em bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  - pH 8,0 - 200 mM). A reação foi interrompida através da adição de 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico 10%. Os peptídeos trípticos foram desalinizados em colunas Poros R2™ (PerSeptive Biosystems, Hertford, UK) e eluídos com solução 60%(v/v) metanol e 5%(v/v) ácido fórmico. As análises dos peptídeos trípticos (“peptide mass fingerprint”) foram realizadas em espectrômetro de massa

electrospray-triplo quadrupolo (“ESI-Triple Quadrupole-MS”) Quatro II™ (Micromass, Manchester, UK), sob a coordenação do Prof. Dr. José César Rosa. As amostras foram aplicadas com o auxílio de uma seringa e bombeadas a uma taxa de 300 nanolitros por minuto, sob as seguintes condições: voltagem capilar 2,8 kV; voltagem do cone 40 V; e temperatura do cone 100°C. Os espectros foram analisados através do programa MassLynx 3.3 (Micromass), e todos os íons detectados foram submetidos à dissociação por colisão induzida (“Collision-induced dissociation” – CID-MS/MS) para dedução da seqüência de aminoácidos (energia de colisão 20-25 eV; pressão de argônio 0.4 mPa). Os peptídeos parentais da molécula de Dps foram analisados utilizando a ferramenta MS-Fit.

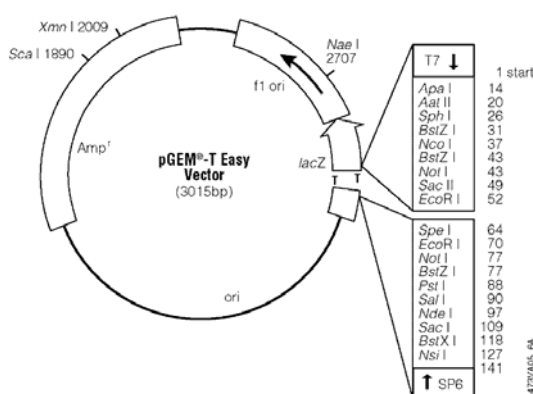
### X- Construção da linhagem recombinante de *S. enterica*

A obtenção da linhagem recombinante UK-1 pGEM T/*dps* foi realizada através da amplificação do gene *dps* de *S. enterica* utilizando-se os iniciadores *dps1* e *dps2*, descritos abaixo:



Os sítios de restrição *SmaI* e *SalI* foram desenhados para a construção de uma linhagem mutante *dps*-nula que ainda não foi concluída. O fragmento resultante da reação de amplificação (PCR) foi clonado em pGEM-T® *easy vector* [Promega Corporation, Madison, WI –USA (resistência a ampicilina)], e inserido em *S. enterica* UK-1 por eletroporação (12,5 kV/cm; 25 µFaraday; 200 Ω). As linhagens recombinantes foram selecionadas com relação a resistência à ampicilina. Os iniciadores *dps1* e *dps2* amplificam uma região que compreende 381 nucleotídeos acima (–381) e 380 (+380) abaixo do gene *dps*, incluindo sua região promotora, o sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon inicial e códon terminal (*stop codon*: +504), totalizando 1288 nucleotídeos [tamanho em gel de agarose: 1288 pares de bases (pb)]. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µl contendo: 25 pmoles de

cada iniciador; 1 µl do crescimento bacteriano (*S. enterica* UK1); 0,2 mM de cada dNTP; 1 UI de Taq DNA Polimerase (Promega, Madison – WI, USA); e água ultra-pura (qsp 50 µl). As condições de reação foram constituídas por 30 ciclos, com os seguintes passos: (1) desnaturação 94°C por 30 segundos; (2) pareamento dos iniciadores a 58°C, por 30 segundos; (3) extensão a 68°C, por 50 segundos. Para a extensão final, a temperatura de 68°C foi mantida por 10 minutos. As eletroforeses em gel de agarose 1% foram realizadas em sistema horizontal a 80 volts (Horizon 58 - GIBCO BRL, Gaithersburg, USA). O DNA resultante das reações de amplificação foi purificado segundo as especificações de “Concert™ Matrix gel extraction System” (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA). O mapa de restrição do vetor utilizado é mostrado na figura que segue, e a enzima utilizada na liberação do fragmento de clonagem foi *EcoRI* (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA).



**Figura do vetor.** Mapa circular do vetor pGEM®-T Easy incluindo marcações de seqüência dos principais pontos referenciais.

## XI – Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento do fragmento clonado foi feito por eletroforese em capilar, através de reações de amplificação com “DYEnamic ET dye terminator”, e análises no seqüenciador tipo capilar “MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech)”. Os parâmetros foram ajustado da seguinte maneira: voltagem de injeção 3 kV; tempo de injeção 60 segundos; voltagem de corrida eletroforética 9 kV; e tempo de corrida 120

minutos. Foram realizadas no mínimo 3 leituras de cada fita, utilizando os iniciadores descritos no item X, obtendo-se uma seqüência consenso de alta confiabilidade. Os vetores recombinantes purificados (“Perfectprep™ – Eppendorf, Westbury – NY, USA”) foram utilizados como fonte de DNA. As seqüências homólogas foram analisadas na página da “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se o programa Blastn [BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)].

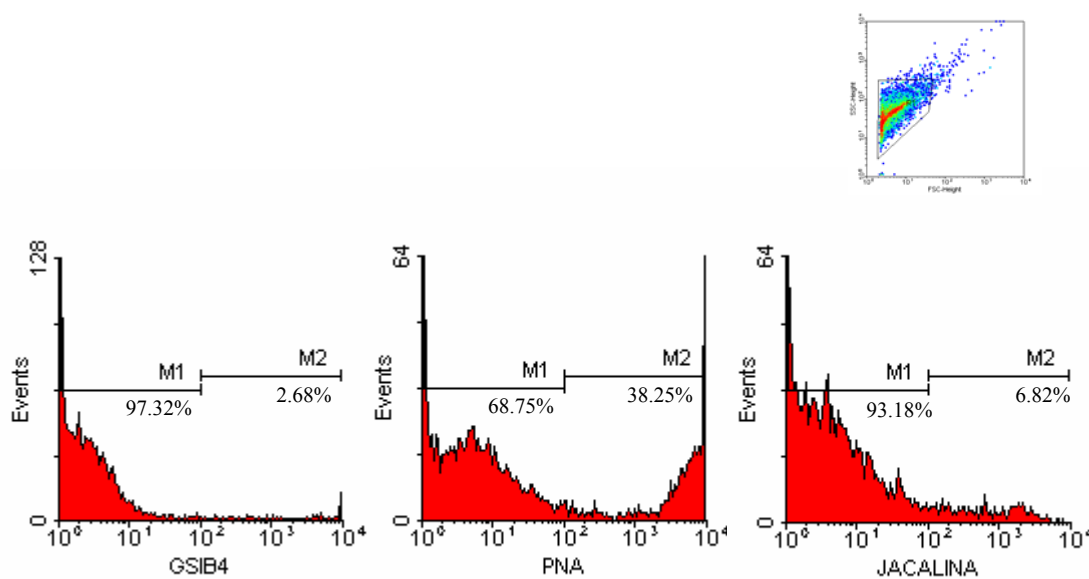
# 4

## Resultados

### I – Triagem de antígenos de *S. enterica*

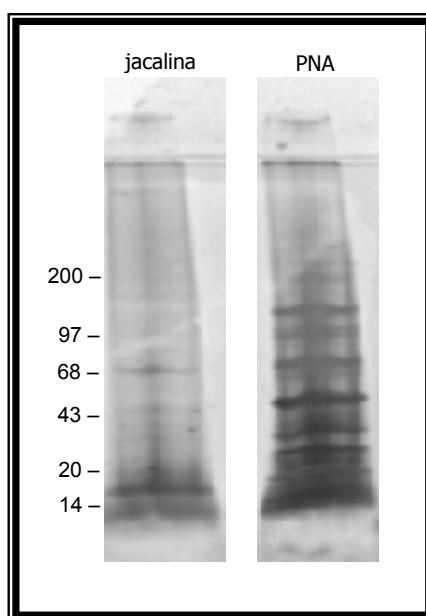
A idéia inicial do nosso projeto foi purificar possíveis adesinas que poderiam estar presentes em uma preparação de antígenos de *S. enterica*. Desse modo, esses antígenos foram submetidos à cromatografia de afinidade utilizando-se colunas com diversos açúcares imobilizados em matriz de agarose. Em nossos resultados não foi possível evidenciar nenhum antígeno purificável, dentre os açúcares testados [D-Galactose, D-Glicose, Melibiose, N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina (Pierce Chemical Co., Rockford, IL.,USA), D-Manose e  $\alpha$ -D-Lactose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)].

Uma outra estratégia de purificação de adesinas foi baseada em dados publicados, indicando que algumas bactérias produziam pilinas glicosiladas. Assim, um experimento inicial em citômetro (FACS) foi realizado para avaliar a ligação de lectinas vegetais (GSIB4, PNA e jacalina) na célula íntegra bacteriana, com o propósito de obtermos um novo direcionamento para o nosso trabalho. As lectinas foram marcadas com biotina e adicionadas à uma suspensão de *Salmonella enterica* Typhimurium com aproximadamente  $10^7$  células/ml. As leituras em FACS mostraram que PNA foi capaz de ligar-se, em maior proporção, às células bacterianas (figura 1). Jacalina, por sua vez, mostrou um resultado sutil de ligação, enquanto que GSIB4 apresentou resultados de ligação muito próximos ao controle de fluorescência (apenas células bacterianas). Dessa maneira, passamos a investigar prováveis ligantes de PNA e jacalina presentes em preparações de antígenos de *Salmonella enterica*.



**Figura 1 - Ligação de lectinas às células bacterianas.** Lectinas foram conjugadas à biotina e adicionadas a uma suspensão de *Salmonella enterica* Typhimurium com aproximadamente  $10^6$  UFC/100  $\mu$ l. A revelação foi feita com estreptoavidina-fluoresceína, e os dados foram adquiridos com o programa CELLQuest 3.1 e analisados com o programa WinMDI 2.8. **GSIB4** isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia*; **PNA** "peanut agglutinin" – aglutinina de amendoim; **jacalina**: lectina de *Artocarpus integrifolia*.

Colunas cromatográficas contendo jacalina ou PNA imobilizadas em matriz de Sepharose ou agarose (Amersham Pharmacia Biotech), respectivamente, foram utilizadas, então, no sentido de avaliarmos o padrão eletroforético de constituintes de *Salmonella* retardados nessas colunas, e eluídos com tampão contendo D-galactose 0,4M. Resultados prévios mostraram que a coluna PNA-agarose revelou um material mais abundante (figura 2), conforme anteriormente detectado pelo FACS (figura 1), com pelo menos 5 bandas bem separadas. Por outro lado, nossos resultados apontaram para um perfil eletroforético com banda aparentemente singular no ensaio com a coluna jacalina-agarose, o que nos motivou a utilizar coluna de jacalina imobilizada com o intuito de purificar antígenos de *S. enterica*.

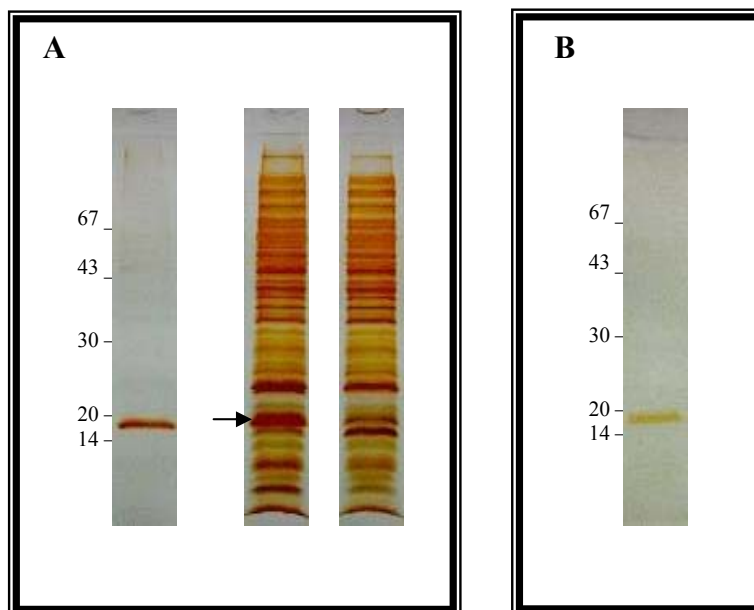


**Figura 2. Perfil eletroforético de antígenos bacterianos purificados em colunas cromatográficas.** Preparação de antígenos de *Salmonella enterica* Typhimurium cromatografados em colunas de jacalina e lectina de amendoim (PNA) imobilizadas em matriz polissacarídica. Os materiais retardados nessas colunas foram exaustivamente dialisados contra água, sendo demonstrados por SDS-PAGE em sistema PHAST gel (gradientede 8 a 25%) – jacalina e PNA – e corados pela prata.



Uma nova preparação de antígenos bacterianos foi produzida, e o procedimento de sonicação da suspensão bacteriana, proveniente da cultura de *S. enterica* em 1 litro de meio LB, produziu cerca de um grama de uma mistura de constituintes solúveis, que foi denominada de antígeno bruto. O perfil eletroforético desses constituintes é mostrado na figura 3. O gel foi submetido a dois métodos diferentes de coloração, o primeiro deles para revelação de proteínas (método da prata, painel A), e o segundo de carboidratos (PAS/prata, painel B). O antígeno bruto foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna com jacalina imobilizada. A eluição do material adsorvido com solução de D-galactose 0,2 M proporcionou cerca de 18 miligramas de preparação, e foi denominado de material 'Jac+', cuja análise eletroforética revela banda única de, aproximadamente, 18 kDa, corada para proteínas e carboidrato (figuras 3A e 3B), sugerindo sua natureza glicoprotéica. A mesma banda, de massa molecular correspondente, é aparentemente visualizada no antígeno bruto (figura 3A – pista 2), e não visualizada no material não retido na coluna, eluído com tampão PBS/NaCl 0,5 M (figura 3A – pista 3). Quando os perfis eletroforéticos corados com o método de PAS/prata são comparados, destaca-se, ainda, que a ligação da jacalina ao constituinte de *S. enterica* foi específica, uma vez que os demais glicoconjugados revelados são eluídos com tampão PBS/NaCl 0,5 M (figura 3A - pista 3). Verificou-se, ainda, não haver diferença no padrão de migração do material ligante de jacalina quando submetido à eletroforese em condições não redutoras.

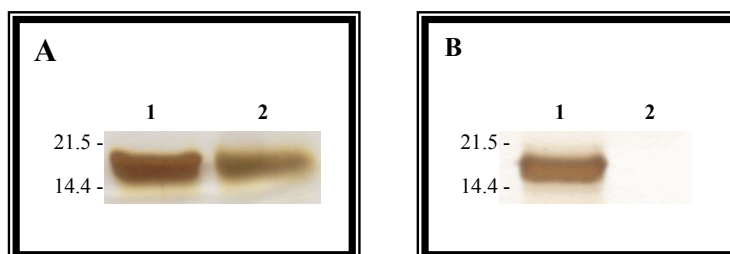
Em seguida, o material purificado em coluna de jacalina foi submetido a uma nova corrida eletroforética (SDS-PAGE 12,5%) e eletrotransferido para membrana PVDF. A banda de 18 kDa foi recortada e o seqüenciamento *N*-terminal (20 aminoácidos) foi realizado pelo Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas (UnB), sob supervisão do Prof. Marcelo Valle de Sousa. A seqüência obtida revelou 100% de identidade com uma proteína ligante de DNA de *S. enterica*, denominada "Dps" ("DNA-binding protein from starved cells"), primariamente descrita em *Escherichia coli*, mas também presente nos mais diversos gêneros bacterianos. Passamos, então, a denominar essa fração protéica de J-Dps.



**Figura 3. Perfil eletroforético das frações do antígeno bruto obtidas por cromatografia de afinidade em Sepharose®-jacalina.** O antígeno bruto de *S. enterica* foi cromatografado em coluna de jacalina imobilizada. O material aplicado e as frações obtidas foram submetidos a SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras. A figura mostra géis provenientes de uma mesma corrida corados, respectivamente, para proteínas (Painel **A**), e para carboidratos (Painel **B**). A fração adsorvida à coluna (‘Jac+’) e eluída com D-galactose 0,4 M apresenta banda única de massa molecular aparente 18 kDa (pista 1), revelada pelas duas colorações. Banda de mesma migração eletroforética (seta) é visualizada em amostra do antígeno bruto, que foi aplicado na coluna (pista 2), mas quase indetectável na fração não adsorvida à jacalina, eluída com PBS/NaCl 0,5 M (pista 3).

Em seguida, submetemos J-Dps a um protocolo eficiente de desglicosilação para glicoconjugados, que consiste em uma beta-eliminação utilizando hidróxido de amônio (Rademaker *et al.*, 1998). Os perfis eletroforéticos de J-Dps são mostrados na figura 4. Os géis mostram Dps “in natura” e desglicosilados com hidróxido de amônio, submetidos aos dois métodos diferentes de coloração citados anteriormente. O protocolo de desglicosilação mostrou-se eficaz e coerente com os perfis de coloração mostrados nos painéis A e B. É possível notar as bandas de J-Dps “in natura” (provavelmente glicosilada) em ambos os painéis (colunas 1A e 1B). Por outro lado, a banda de J-Dps, aparentemente desglicosilada, só é visível no painel A (coluna 2A e 2B), onde o gel foi corado com hidróxido de prata, não sendo

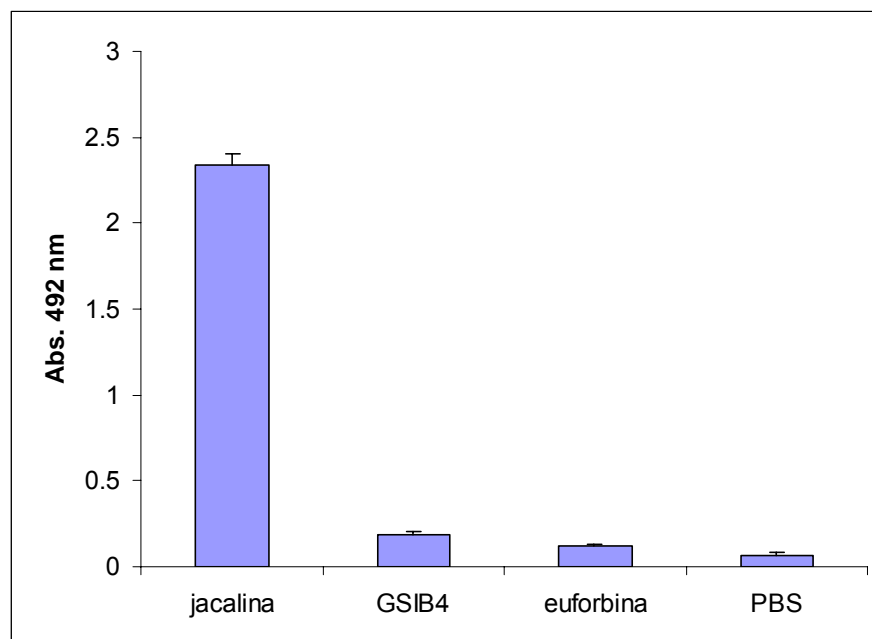
visualizada no painel B, correspondendo ao gel corado pela técnica de PAS para visualização de glicoconjugados.



**Figura 4. Perfis de coloração de J-Dps “in natura” e desglicosilado por hidróxido de amônio.** J-Dps “in natura” e desglicosilado por beta-eliminação foram submetidos a SDS-PAGE 12,5 % em condições redutoras, e corados para proteínas (Painel A), e para carboidratos (Painel B). As bandas do material “in natura” são notadas nos dois painéis (colunas 1A e 1B), revelada pelas duas colorações. A banda referente ao material submetido ao protocolo de desglicosilação só é evidenciada no painel A (coluna 2A e 2B). As marcações 21.5 e 14.4 são referentes aos pesos, em kDa, do inibidor de tripsinogênio e lisozima, respectivamente, da mistura de marcadores moleculares BioRad 161-0304.

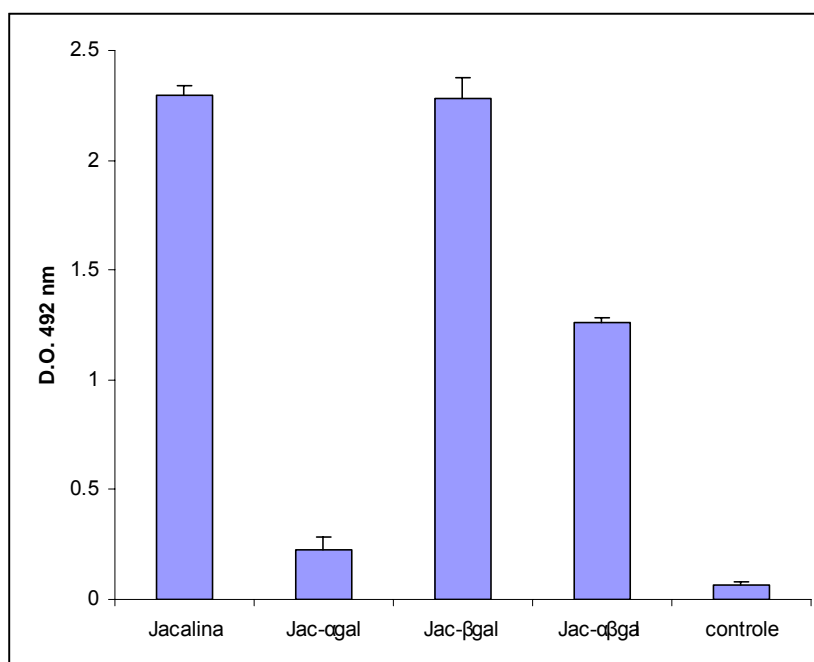
## II – Ensaio de afinidade jacalina/J-Dps em microplacas

Uma vez que J-Dps fora purificada em coluna de jacalina, uma lectina que se liga ao dissacarídeo Gal $\beta$ 1-3GalNAc, através do resíduo subterminal GalNAc alfa-O-ligado, buscou-se avaliar essa interação em microplacas (ensaio lectino-enzimático – ELLA). Além disso, procurou-se estudar as interações de outras lectinas vegetais específicas para  $\alpha$ -galactosídeos. Ensaiou-se paralelamente a reatividade de J-Dps imobilizada (1  $\mu$ g/poço) com GSIB4 (Chung *et al.*, 2003), euforbina (Dias-Baruffi *et al.*, 2000) e a própria jacalina. A figura 5 mostra que apenas jacalina ligou-se à J-Dps, proporcionando leitura de absorvância superior a 10 vezes à leitura de outras lectinas utilizadas, que obtiveram resultados similares ao observado com o controle negativo (lectina ausente), com leituras inferiores a 0,200.



**Figura 5. Ligação de J-Dps a lectinas ligantes de galactosídeos terminais.** As lectinas vegetais utilizadas foram biotiniladas e avaliadas quanto à reatividade com Dps imobilizado em placas de ELISA (1 µg/poço). Jacalina reagiu com J-Dps enquanto as outras lectinas proporcionaram resultados próximos ao do controle negativo (lectina ausente). Os resultados representam a média de leitura e o desvio padrão de triplicatas, e são expressos em absorvância de luz a 492 nm.

A inibição da interação de uma lectina com seu ligante é demonstrável através da utilização de açúcares específicos. Com base na conhecida especificidade de reconhecimento de açúcar da jacalina, utilizou-se uma solução 0,1 M de D-galactose, e soluções 0,1 M dos anômeros  $\alpha$ -metil-D-galactose ou  $\beta$ -metil-D-galactose, para os ensaios de inibição de ligação. Essas soluções de açúcar foram pré-incubadas com jacalina e, em seguida, avaliou-se a reatividade com J-Dps imobilizado em placas de ELISA (1 µg/poço). A figura 6 mostra que o anômero “ $\alpha$ ” da metil-D-galactose foi capaz de inibir quase totalmente a ligação J-Dps/jacalina, pois a leitura passou a ser próxima a do controle negativo (solução de bloqueio). Por sua vez, o anômero “ $\beta$ ” não inibe essa ligação. Como esperado, a solução de D-galactose, que contém uma mistura de anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ , inibiu parcialmente a interação. Tais resultados permitem concluir que  $\alpha$ -metil-D-galactose inibe a ligação jacalina/J-Dps, e sugerem que o domínio de reconhecimento do carboidrato (CRD) da lectina esteja envolvido nessa interação.

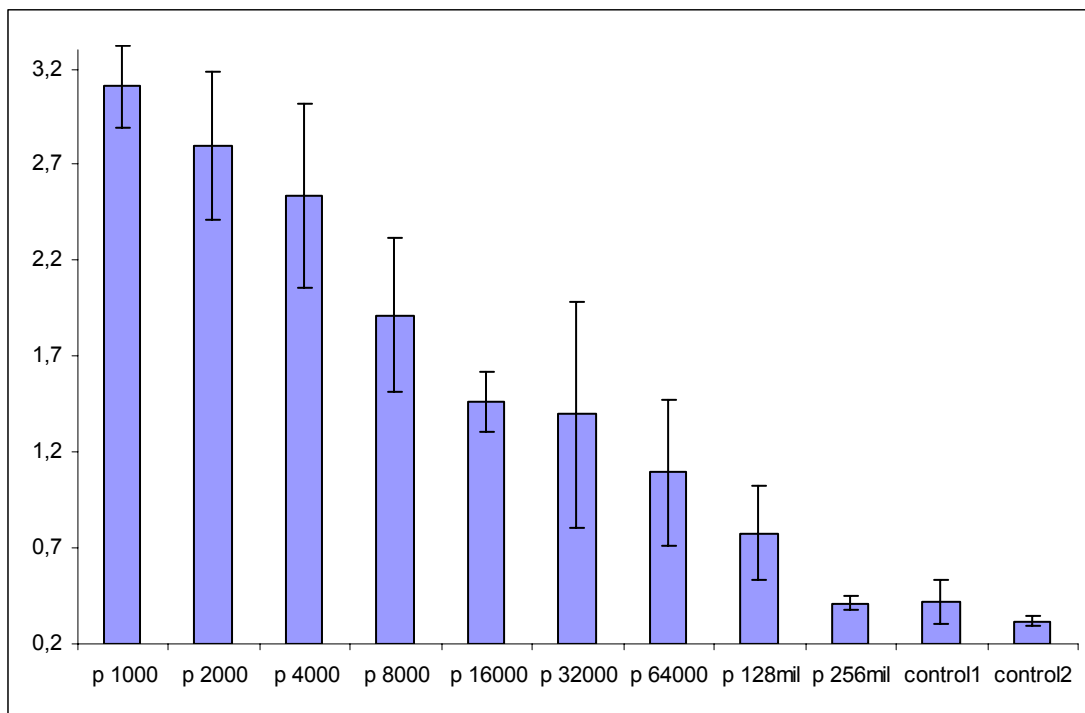


**Figura 6. Ensaio de inibição por açúcares da ligação J-Dps/jacalina.** Jacalina biotinizada foi avaliada quanto à reatividade com J-Dps imobilizada (1µg/poço) na presença dos açúcares α-metil-D-galactose 0,1M (Jac-αgal), β-metil-D-galactose 0,1 M (Jac-βgal), e D-galactose 0,1 M (Jac-α/βgal). O anômero “α” inibiu totalmente a ligação, demonstrável pela leitura próxima do controle negativo. O anômero “β” não inibe essa interação, proporcionando leitura de absorvância muito próxima a do controle positivo (jacalina). Como esperado, a solução 0,1 M de D-galactose, que corresponde a uma mistura de anômeros α e β, inibiu parcialmente a ligação. Os resultados representam a leitura da densidade ótica e foram expressos em absorvância de luz a 492 nm. Os dados de significância foram avaliados pelo test “t-student” através do programa GraphPad InStat© (ACD Systems, Ltd.), sendo considerados significantes quando  $p < 0,01$ , ou não-significantes quando  $p > 0,01$ .

### III - Produção de anticorpos murinos anti-J-Dps

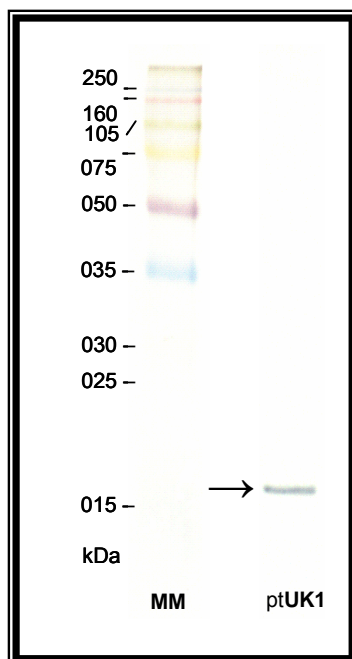
A preparação J-Dps foi utilizada para a produção de anticorpos em camundongos Balb/c. Soros de animais imunizados foram reunidos em “pool” único, aliquotados e ensaiados quanto à reatividade com o antígeno, imobilizado em fase sólida (J-Dps 1µg/poço de uma microplaca). O soro apresentou reatividade até a diluição 1:128.000, apresentado leituras de absorvância notavelmente superiores à proporcionada pelos controle negativos, e foram dose-dependentes (figura 7). Tais

resultados demonstraram a efetividade do processo de imunização, e a diluição 1:5000 foi escolhida para a realização de experimentos posteriores.



**Figura 7. Reatividade de soros de camundongos anti-J-Dps com o antígeno J-Dps.** O “pool” de soros foi seriadamente diluído de 1:1000 a 1:256000 (p1000 a p256mil) e incubado em microplacas revestidas do antígeno J-Dps (1 µg/poço). A leitura proporcionada até a diluição 1:128000 foi pelo menos 2 vezes superior à dos controles negativos. Os resultados representam a média de leituras e os desvios padrões da densidade ótica (D.O.) obtidas nas triplicatas, e são expressos em absorvância de luz a 492 nm. **control1:** soro pré-imune diluído 1:1000; **control2:** tampão PBS.

Esses anticorpos foram analisados quanto à reatividade com constituintes de *S. enterica* Typhimurium UK-1 após eletrotransferência em papel de nitrocelulose (“Western blot”) de materiais provenientes de corrida eletroforética (SDS-PAGE 12,5%) de proteínas totais bacterianas. Os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer especificamente a banda de aproximadamente 18 kDa, referente à proteína J-Dps (figura 8).

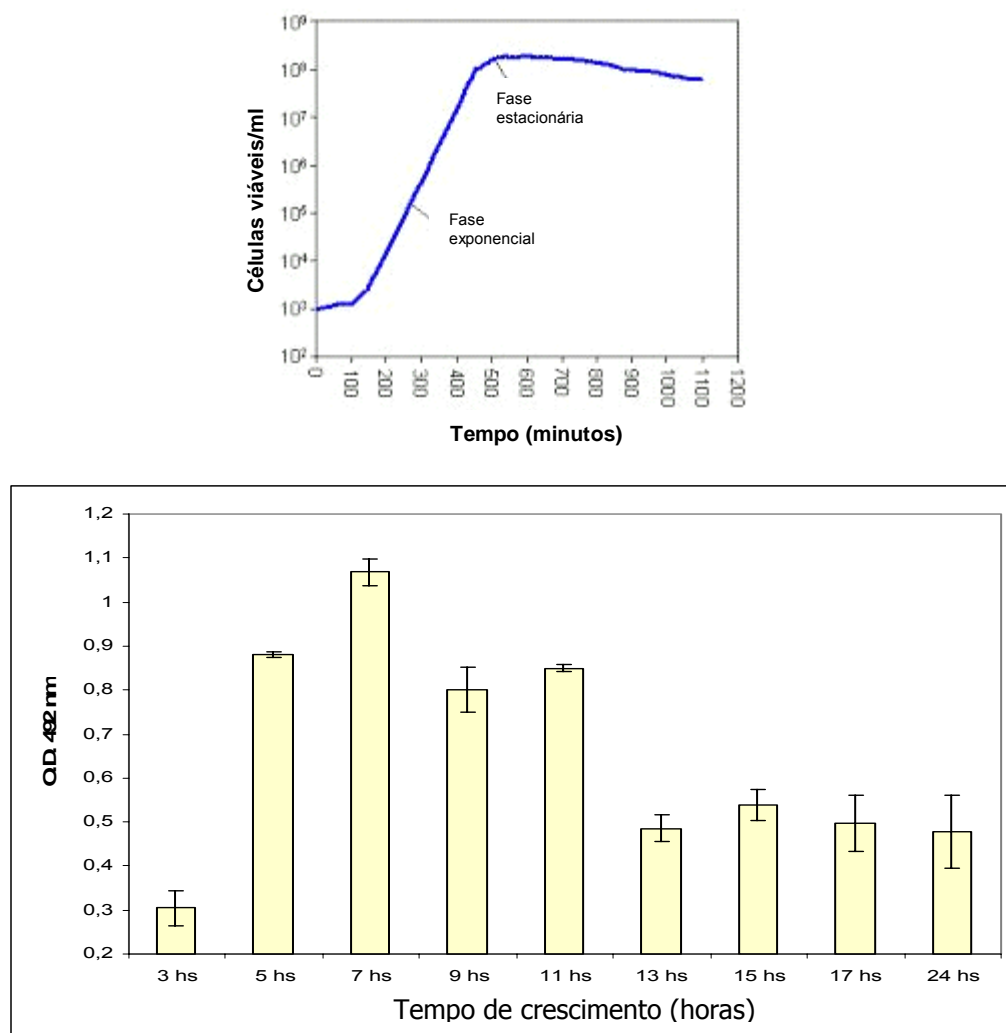


**Figura 8. Western blot utilizando os anticorpos murinos anti-J-Dps.** Proteínas totais de *S. enterica* Typhimurium UK-1 (ptUK1) foram separadas por SDS-PAGE 12,5%, eletrotransferidas em papel de nitrocelulose, e analisadas quanto a reatividade com os anticorpos anti-J-Dps produzidos em camundongos Balb/c. Um constituinte de aproximadamente 18 kDa foi revelado especificamente por este método (seta). **MM** - mistura de marcadores moleculares Rainbow® (Amersham Itnl – Buckinghamshire/UK).

#### IV – Curva de crescimento bacteriano e interação com jacalina

A célula bacteriana acumula grandes quantidades de Dps em fase estacionária de crescimento, ou em ambientes de estresses oxidativo e/ou nutricional. Isso se deve ao fato de que Dps é rapidamente degradada durante os estágios iniciais de cultura bacteriana (Stephani *et al.*, 2003). Além disso, o mecanismo pelo qual Dps forma multímeros para que haja ligação ao DNA ainda é pouco conhecido. Como a glicosilação em Dps pode acrescentar dados para a elucidação desse mecanismo, buscamos avaliar o padrão de interação da jacalina com extratos de culturas de *S. enterica* UK-1 em diversos tempos de crescimento. Em geral, uma cultura de enterobactérias atinge a fase estacionária de crescimento por volta de 8 a 10 horas de incubação (Hicks *et al.*, 2005). Surpreendentemente, a interação com jacalina

imobilizada foi maior com extratos de culturas de fases pré-estacionárias de crescimento (figura 9). Ainda que meramente especulativo, esses resultados indicam que a glicosilação em Dps pode estar envolvida em possíveis mecanismos de produção, degradação, formação de dodecâmeros ou ligação ao DNA.



**Figura 9. Interação de extratos bacterianos de diferentes tempos de cultura à jacalina imobilizada em microplacas.** Extratos protéicos de *S. enterica* UK-1 ( $10 \mu\text{g}/\text{poço}$ ) de diferentes tempos de crescimento em caldo LB foram avaliados quanto a interação com jacalina imobilizada em placas de ELISA ( $1 \mu\text{g}/\text{poço}$ ). Após lavagem, os poços foram preenchidos com anticorpos murinos anti-J-Dps diluídos 1:5000 e, posteriormente, revelados através da utilização de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase eqüina. Os resultados representam a média de leitura e o desvio padrão de triplicatas, e são expressos em absorvância de luz a  $492 \text{ nm}$ . O gráfico acima representa a curva de crescimento de uma cultura de *E. coli* (Hicks *et al.*, 2005).

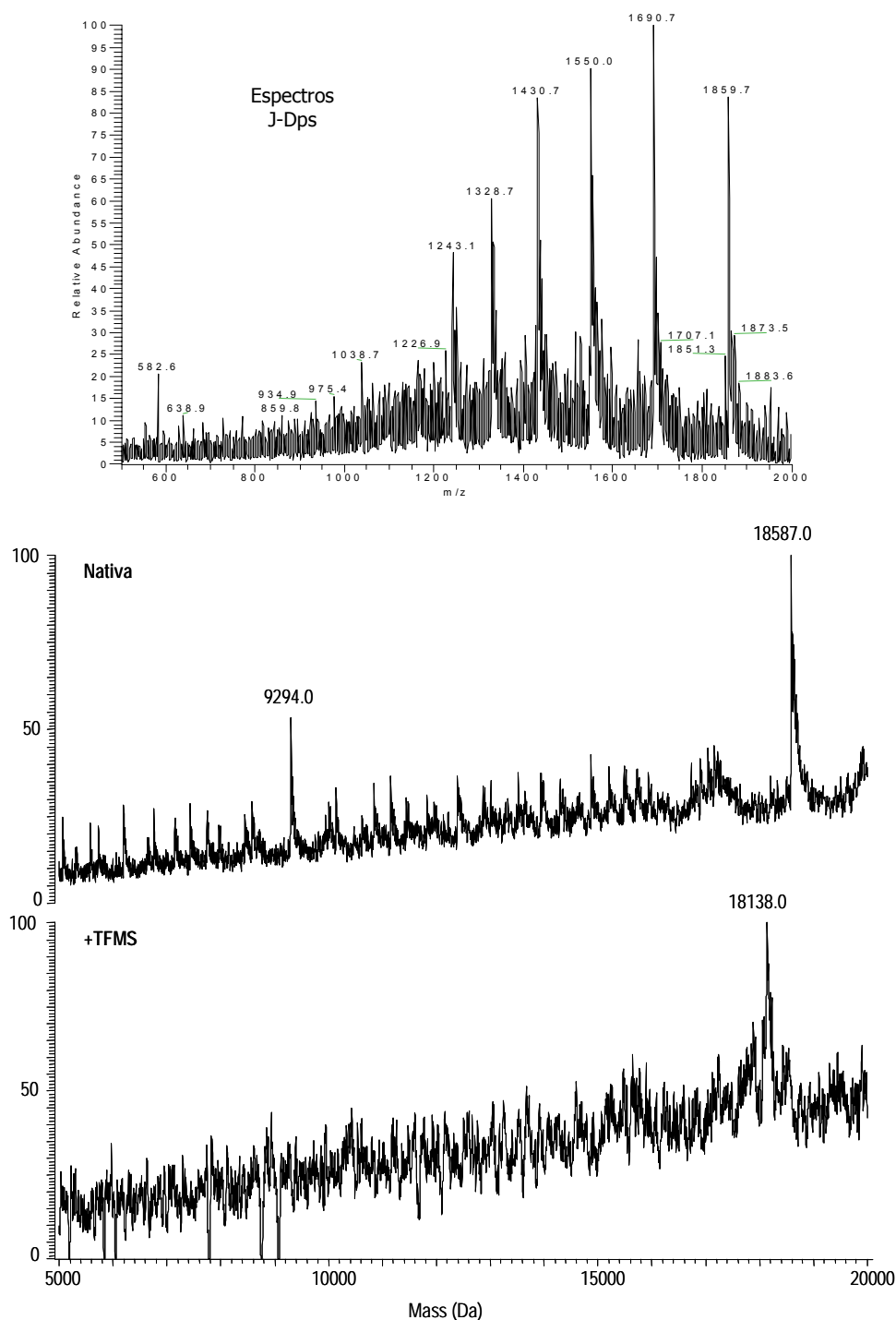


## V – Caracterização de oligossacarídeos contidos em J-Dps

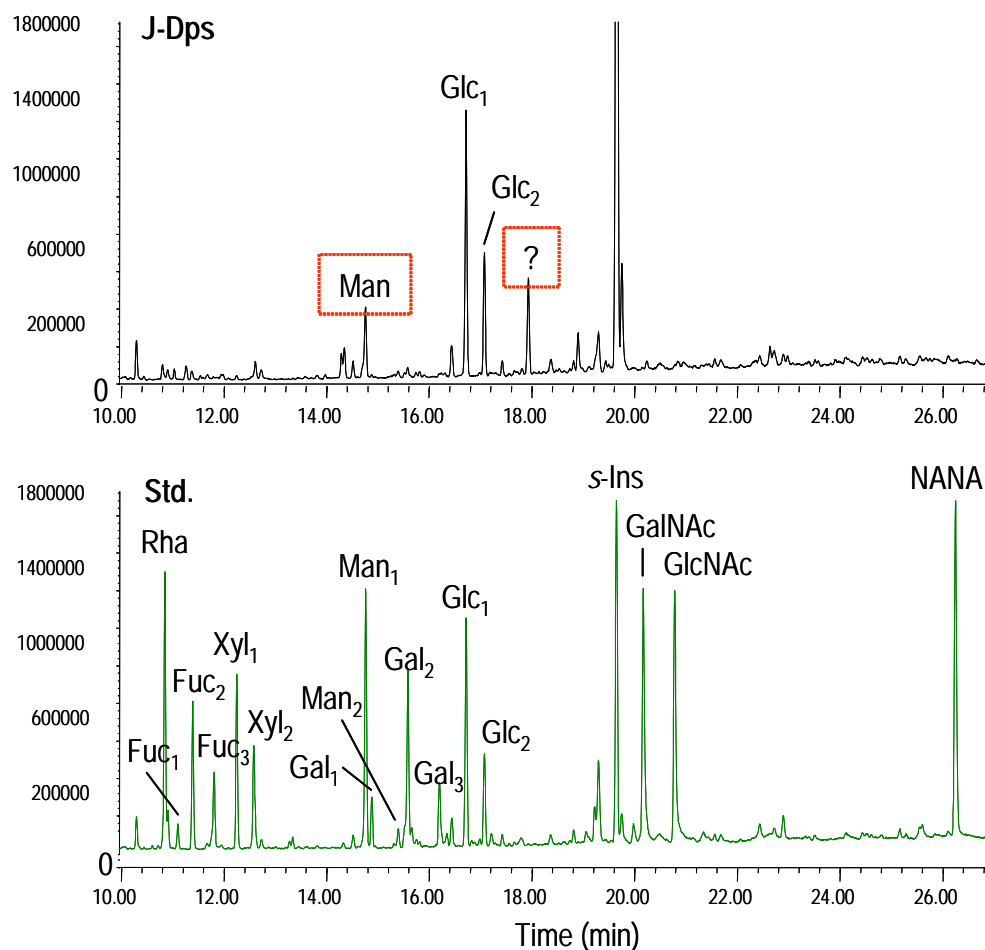
Com intuito de comprovar a existência de oligossacarídeos ligados covalentemente à sua estrutura polipeptídica, alíquotas da J-Dps foram secas por centrifugação a vácuo e analisada por espectrometria de massa por pulverização ionizante (ESI-MS - “electrospray ionization – mass spectrometry”). O perfil em espectro de massa de J-Dps, após desconvolução de massa, é mostrado na figura 10 (nativa). Foram observados um pico majoritário, correspondente ao íon molecular ( $M = 18.587$ ), e um minoritário, que, possivelmente, corresponde à molécula bivalente ( $[M+2H]^{2+}=9.294$ ). O valor obtido de 18.587 Daltons é coerente com os resultados obtidos por eletroforese (SDS-PAGE).

Para comprovar a presença de glicanas em sua molécula, 1 mg da J-Dps foi submetida ao protocolo de desglicosilação química com TFMS (Glyko, Inc. Novato-CA, USA), que cliva inespecificamente oligossacarídeos covalentemente ligados a proteínas, sem alterar a estrutura primária protéica. Assim, o material resultante de tratamento com TFMS apresentou massa molecular inferior ao da proteína nativa. A figura 10 mostra o espectro de J-Dps nativa e tratada com TFMS. Uma espécie com massa molecular equivalente a 18.138 Da, o qual é 449 Da inferior ao pico da J-Dps nativa, foi observada. Estes resultados mostram que o processo de desglicosilação foi capaz de retirar constituintes glicídicos ligados ao esqueleto polipeptídico da J-Dps. A pequena alteração de massa molecular sugere a presença de estruturas sacarídicas minoritárias ligadas covalentemente na molécula, tais como um trissacarídeo ou dissacarídeo ligado a algum outro substituinte. Porém, faz-se necessário um estudo mais aprofundado para o determinação e seqüenciamento dos resíduos monossacarídicos ligados à molécula de J-Dps.

Análises posteriores do conteúdo de carboidratos contido na molécula de J-Dps, por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS), revelaram a manose como um provável constituinte de sua glicana (figura 11). Nota-se, também, que a glicose foi revelada por esse método, porém, a presença desse constituinte glicídico na molécula de J-Dps desperta suspeitas de contaminação, que é muito comum nesse tipo de análise. Além da manose, outro resíduo foi identificado, porém sua estrutura não fora ainda caracterizada. Esse resíduo corresponde ao sinal de interrogação mostrado na figura 11.



**Figura 10. Massa molecular de J-Dps antes e após desglicosilação química.** J-Dps (1  $\mu$ M), nativa ou tratada com TFMS, foi analisada por ESI-MS (modo positivo). Os picos da proteína nativa representam a massa molecular média das espécies multiplamente carregadas (vide gráfico "Espectros J-Dps"), determinada após desconvolução de massa (*mass deconvolution*) utilizando o software Xcalibur (Finnigan). J-Dps desglicosilada com TFMS (+TFMS) apresenta um pico 449 Da inferior ao da proteína nativa. A espécie iônica com massa molecular de 9294 Da, observada na J-Dps (nativa), pode corresponder à espécie duplamente carregada ( $[M+2H]^{2+}$ ) do íon molecular com massa 18587 Da.

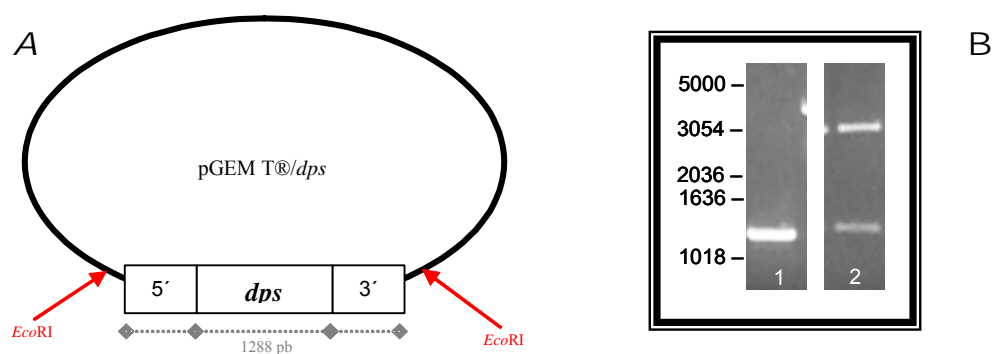


**Figura 11. Análise do conteúdo de carboidratos de J-DPS por GC-MS.** J-Dps (200 pmol) foi hidrolisado com 0,5 N HCl metanólico por 4h, a 85°C, re-N-acetilado e analisado por GC-MS, como derivados trimetil-silil (TMS). *s*-Ins, *scyllo*-inositol (padrão interno, 1 nmol); Std., solução padrão contendo carboidratos 500 pmol cada Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc, e 1 nmol cada GalNAc, GlcNAc e NANA. Os isômeros de Fuc, Xyl, Man, Gal e Glc são indicados por números sublinhados. O derivado 1-O-methyl-Man $\beta$ -TMS<sub>4</sub> da amostra de DPS foi confirmado após "electron impact fragmentation". Íons característicos de  $m/z = 73, 133, 147, 204$  and  $128$ , similares em intensidade aos obtidos da fragmentação de um autêntico 1-O-methyl-Man $\beta$ -TMS<sub>4</sub> padrão, fora observado.

## VI – Construção de linhagens recombinantes

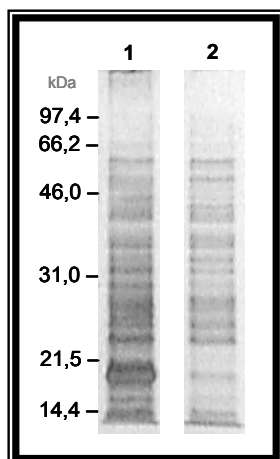
Nossos resultados demonstraram, até então, que a eluição do antígeno adsorvido em coluna de jacalina com solução de D-galactose 0,4 M proporcionou bom rendimento de preparação J-Dps, provenientes de aproximadamente 1 ( $\mu$ m)

grama de mistura de antígenos bacterianos. Novas tentativas de purificação não foram capazes de reproduzir os mesmos resultados, sendo a quantidade de Dps purificada em coluna de jacalina inferior à obtida anteriormente. Como a proteína Dps, descrita por vários autores, é expressa na célula bacteriana sob diversas condições de crescimento (Almirón et al., 1992; Martinez & Kolter, 1997), e a provável glicosilação em sua molécula adicione um fato novo em seu mecanismo de síntese, buscamos estudar algumas variáveis no sentido de padronizar sua purificação em coluna de jacalina. Uma vez que a construção de um mutante nulo para a produção de Dps era etapa a ser cumprida em nosso projeto inicial, procuramos construir uma linhagem de *Salmonella* recombinante, contendo um vetor que orientasse a expressão de altos níveis de Dps, independentemente da fase de crescimento bacteriano. Assim, a construção dessa linhagem foi baseada na amplificação de uma região de 1288 pares de base (figura 12), contendo o gene *dps* (504 pb), e posterior clonagem em plasmídeo comercial de alto número de cópias (pGEM T® *easy vector*). O vetor recombinante (pGEM T/*dps*) foi introduzido em *S. enterica* Typhimurium UK-1 por eletroporação, e as linhagens recombinantes foram selecionadas em meio LB contendo ampicilina.



**Figura 12. Construção do vetor recombinante pGEM-T/*dps*.** O gene selvagem *dps* de *S. entérica* UK-1 foi amplificado, juntamente com regiões anterior (5') e posterior (3'), para construção do vetor recombinante pGEM T/*dps* (A). O quadro B mostra as bandas, em gel de agarose 1%, referentes ao fragmento contendo o gene *dps* amplificado por PCR (linha 1), e o vetor recombinante digerido com a enzima *EcoRI*, liberando um fragmento de tamanho semelhante ao amplificado por PCR (linha 2). As marcações de massa estão em pares de bases (pb) – GIBCO, BRL - USA

As linhagens recombinantes, contendo o vetor para expressão de Dps, foram denominadas de *S. enterica* UK-1 pGEM T/*dps*. A figura 13 mostra que a preparação de proteínas totais a partir dessas linhagens produz um perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) com uma banda visivelmente predominante, de aproximadamente 18 kDa.

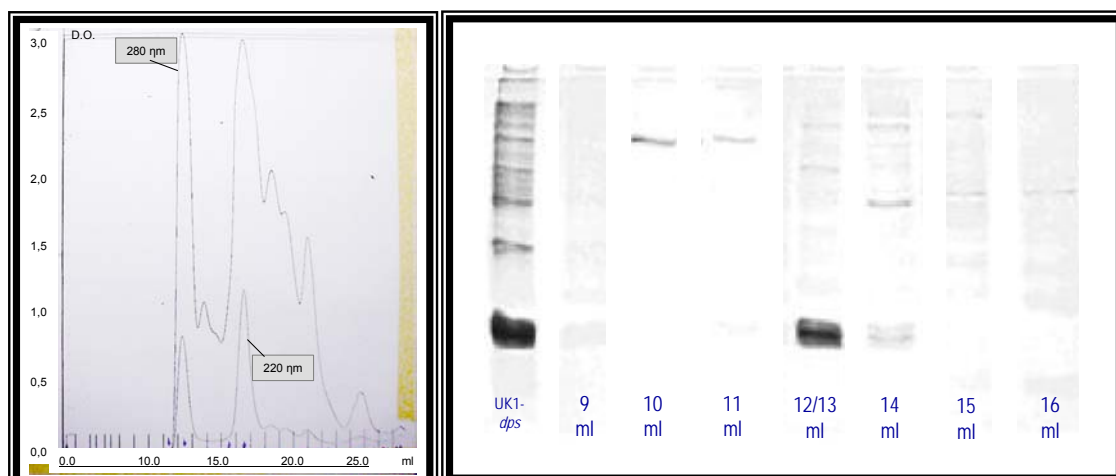


**Figura 13. Perfil eletroforético da linhagem recombinante de *Salmonella*.** Proteínas totais de *S. enterica* Typhimurium UK-1 transformada pGEM T *easy/dps* (linha 1), e da linhagem selvagem (linha 2) foram separadas por SDS-PAGE 12,5%, e coradas com Coomassie Blue®. Nota-se uma banda majoritária de aproximadamente 18 kDa na linhagem recombinante. As marcações moleculares estão em KiloDaltons (kDa), provenientes dos padrões de baixo peso BIO-RAD™.

## VII – Purificação de Dps da linhagem recombinante

### VIIa – Fracionamento protéico em sistema FPLC

Na tentativa de estudarmos a grande quantidade produzida pela linhagem UK-1 pGEM T/*dps*, procuramos purificar Dps baseado na metodologia descrita por Almirón e colaboradores (1992), efetuando algumas modificações. O procedimento de sonicação, seguida de centrifugação da suspensão do clone *S. enterica* UK-1 pGEM T/*dps*, produziu cerca de 1,2 grama de uma mistura de constituintes solúveis, que foi denominada de antígeno bruto recombinante. Esse material, dialisado em tampão de dissociação DNA-Dps (NaCl 2 M), cromatografado em coluna Sepharose G-100, foi separado em 7 frações diferentes, cujo perfil eletroforético corado pelo “Coomassie Blue” (SDS-PAGE 12,5%) é mostrado na figura 14. As bandas correspondentes a Dps são melhores visualizadas nas frações denominadas 12/13, e em menores proporções nas demais frações. Nota-se que os processos de precipitação, diálise em tampão NaCl 2M e fracionamento protéico produziram duas bandas muito próximas correspondentes a Dps. Esse perfil foi observado em todos os experimentos posteriores.

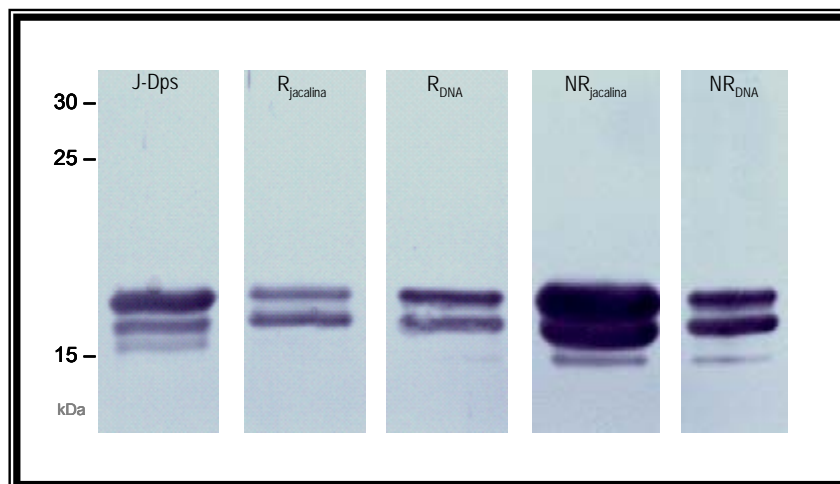


**Figura 14. Fracionamento protéico por filtração em gel.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%), corado com Coomassie Blue, das frações protéicas de *S. enterica* Typhimurium UK-1 pGEM T/*dps*, precipitadas com sulfato de amônio, dialisadas contra tampão B (dissociação DNA-Dps com NaCl 2 M), e separadas por filtração em gel (Sephacrose G-100) em sistema FPLC. Tubos plásticos de eluição foram coletados e alíquotados por ml. A fração correspondente a 12 e 13 ml (12/13 ml) apresentou bandas similares às bandas majoritárias vistas na preparação do antígeno bruto da bactéria transformada (coluna UK1-*dps*). Demais colunas representam, em mililitros (ml), as outras frações eluídas por FPLC.

#### VIIIb – Purificação de Dps por cromatografia de afinidade

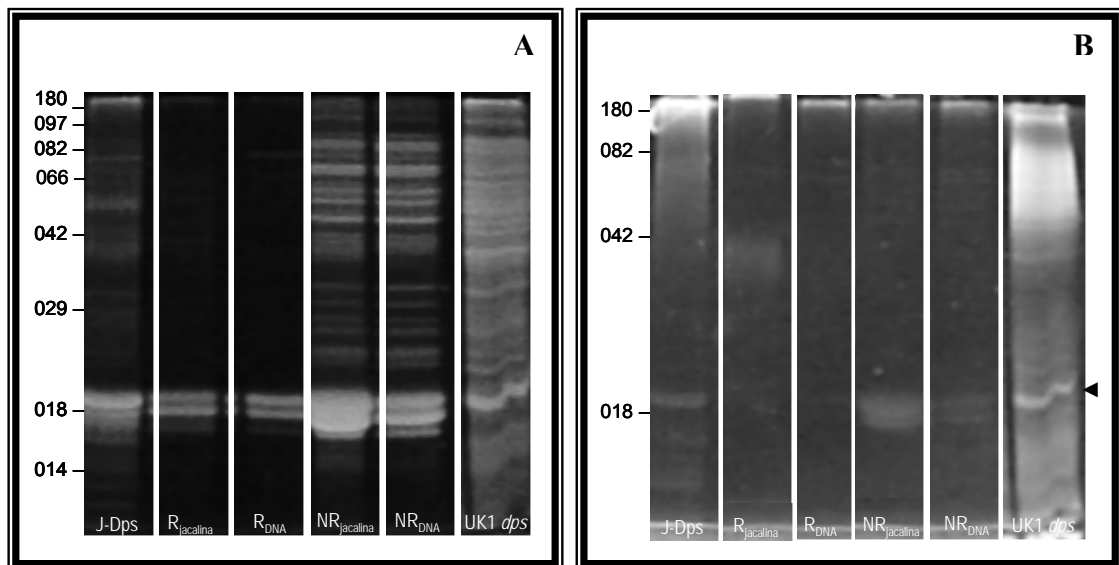
As frações obtidas por filtração em gel que apresentaram bandas correspondentes a Dps (12/13 ml) foram submetidas a cromatografia de afinidade em colunas de DNA imobilizado em matriz de celulose (DNA-celulose), e de jacalina imobilizada em matriz de Sepharose. Uma parte do material aplicado na coluna DNA-celulose foi retardada e eluída com Tampão B, contendo NaCl 2,0 M. Por outro lado, apenas uma pequena parte do material aplicado na coluna de jacalina foi retardada e eluída com tampão D-galactose 0,2 M, tendo que ser concentrado para ser visualizado. A figura 15 mostra o ensaio de eletrotransferência em papel de nitrocelulose (Western blot) de materiais provenientes de corrida eletroforética (SDS-PAGE). Todas as frações de ambas as colunas revelaram bandas de aproximadamente 18 kDa, correspondentes a Dps. Nota-se que J-Dps (ver figuras 3 e 14 também), após um período de estoque a

20°C negativos, passou a apresentar um padrão eletroforético semelhante ao do fracionamento por filtração em gel.



**Figura 15. Ensaio de purificação de Dps recombinante em colunas cromatográficas.** As frações 12 e 13 da purificação por FPLC foram submetidas a ensaios de ligação em colunas cromatográficas, contendo DNA ou jacalina imobilizada. Após separação por SDS-PAGE e eletrotransfência em papel de nitrocelulose, esses materiais foram analisados quanto a reatividade com anticorpos murinos anti-Dps (Western Blot). As referências de massa molecular (em kDa) são baseadas no marcador Rainbow®. **J-Dps**: provável glicoproteína de *S. enterica* purificada em coluna de jacalina (ver figura 3); **R<sub>jacalina</sub>**: material retardado em coluna jacalina-sepharose®4B e concentrado em “speed-vac” após diálise contra água; **R<sub>DNA</sub>**: material retardado na coluna DNA-celulose®; **NR<sub>jacalina</sub>**: material que não foi retardado em coluna jacalina-sepharose®4B; **NR<sub>DNA</sub>**: material não retardado da coluna DNA-celulose®.

A fração 12/13 correspondente à purificação de Dps por afinidade ao DNA e jacalina foram, também, comparadas quanto seus padrões de coloração utilizando os “kits” para glicoproteínas ProQ™ Emerald 300, e para proteínas totais SYPRO® (figura 16). Na coloração para glicoproteínas (painel B), nota-se, ainda que fracamente, as bandas referentes a J-Dps e Dps recombinante não retardada nas colunas de DNA e jacalina (painel B, colunas NR). De maneira notável, uma banda que confere com o padrão de Dps destacou-se dentre as proteínas da linhagem recombinante (figura 16 A – linha UK1 *dps*), e parece ter sido corada para glicoproteínas (figura 16 B – linha UK1 *dps*).

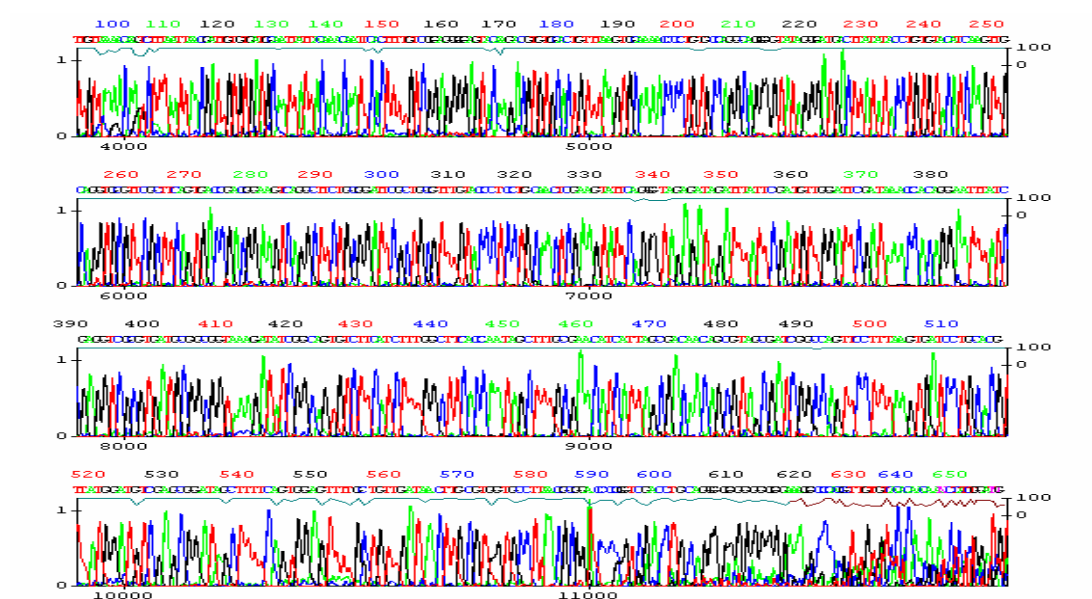


**Figura 16. Ensaio comparativo entre colorações de antígenos de *S. enterica*.** Perfil eletroforético (SDS PAGE 12,5 %) de frações protéicas de *S. enterica*. Os géis foram corados com “kits” da “Molecular Probes” para proteínas totais (painel A) e glicoproteínas (painel B). As leituras foram feitas em “Scanner IP Eraser BAS - FLA-3000 (FujiFilm Medical Systems USA, Inc.)” em comprimento de onda de excitação em 280 nm para glicoproteínas, e 473 nm para proteínas totais; captação de imagens em comprimento de onda em 530 nm para glicoproteínas, e 610 nm para proteínas totais. Os marcadores moleculares são do próprio “kit”. **J-Dps**: provável glicoproteína de *S. enterica* purificada em coluna de jacalina (ver figura 3); **R<sub>jacalina</sub>**: fração 12/13 retardada em coluna jacalina-sepharose e concentrado em “speed-vac” após diálise contra água; **R<sub>DNA</sub>**: fração 12/13 do FPLC retardada na coluna DNA-celulose®; **NR<sub>jacalina</sub>**: material que não foi retardado em coluna jacalina-sepharose; **NR<sub>DNA</sub>**: material não retardado da coluna DNA-celulose®. **UK1 dps**: proteínas totais da linhagem recombinante *S. enterica* UK-1 pGEM T/*dps*.



## VIII – Seqüenciamento do gene *dps*

O seqüenciamento e análises do genoma de *S. enterica* Typhimurium já foram inteiramente executados para a linhagem LT-2 (McClelland *et al.*, 2001). O mapa de restrição, a seqüência de aminoácidos e a determinação da “ORF” (“open reading frame”) da Dps foram avaliados utilizando-se o programa “Clone Manager®”, baseados nos dados publicados para essa linhagem. Procuramos, então, seqüenciar todo o fragmento contendo o gene *dps* da linhagem utilizada em nossos trabalhos (UK-1), no sentido de comparar as seqüências. A partir da comparação de diversas leituras de seqüências produzidas pelo MegaBACE®, concluímos que o gene *dps* da linhagem UK-1 obteve homologia de 99,8% ao da LT-2, apresentando um único nucleotídeo diferente dos outros 504 para esse gene. Nesse caso, na posição 364 intragênica, ao invés de citosina, registramos a leitura de uma guanina, e esta diferença está associada à mudança de uma alanina por uma prolina. O fragmento de clonagem inteiro continha 1288 nucleotídeos, e nossos resultados puderam cobrir 1147 destes nucleotídeos (89,053%). Além do nucleotídeo intragênico, diferente entre as duas linhagens, observamos outro na região que antecede (“upstream”) o gene *dps* (-228). A figura 17 mostra um dos poços (iniciador *dps1*) de uma microplaca analisada por eletroforese em capilar (MegaBACE™), com extensa área com índice de confiabilidade alto (linha retilínea abaixo dos nucleotídeos), bem como as seqüências obtida (LT-2) pelo “Blastn” e a montada (UK-1) através das leituras dos espectros produzidos pelo MegaBACE™.



**LT-2**

```

-394          C CTG GCC CTG TGC      GCCATCATTGCCGCCTCAAT  G
-360 GGT TCT ACC CTA ACG ATT CGA CGC GAA CCC GCA AAT TAA ACA AGT
-315 TGA CGT AAA ATA GTT TCT TAT TCT GCA TGA TGT GCA TAA TCA TGC
-270 AGA ATA TCA CCT CGT TAT TCA CCT TTT ATT ATT GCG CTA TTA GTT
-225 CGT CAT TTT TTG TCA TAT TTT TTC TCA TTT TTT ACA TTA AAA TGA
-180 GAA TTA TTA CCC ACC AAA CAG CAA ACT CGT CTA ACC AAT TGA TTT
-135 TTA ATC AAA ATA AAT ATT AAA TCT TGT CTG TAC TAT TAA AGT GAT
-90  AGG TAA ATT CAA AAA AGC AAA GTT AAA AAC CGG TGC TAT ACT TAT
-45  TNT CGT TAA TTA CCT GGG ACA CAA ACA TCA AGA GGA TAT GAG ATT
1-   ATG AGT ACC GCT AAA CTG GTA AAA ACA AAA GCG TCT AAT CTG CTT
46-  TAT ACC CGT AAC GAT GTA TCA GAG AGC GAT AAA AAA GCG ACG GTT
91-  GAG TTG CTT AAT CGT CAG GTG ATC CAG TTC ATT GAC CTG TCG CTG
136- ATC ACG AAA CAG GCC CAC TGG AAC ATG CGC GGT GCT AAC TTT ATT
181- GCC GTT CAT GAG ATG CTG GAT GGC TTC CGT ACC GCA CTG ACC GAT
226- CAT CTG GAT ACT ATG GCC GAG CGC GCC GTA CAG CTT GGC GGT GTG
271- GCG TTA GGC ACC ACG CAA GTT ATC AAC AGC AAA ACT CCA CTG AAA
316- AGC TAT CCG CTC GAC ATC CAT AAC GTG CAG GAT CAC TTA AAA GAA
361- CTG CCC GAT CGC TAC GCT GTT GTC GCT AAT GAT GTT CGC AAA GCT
406- ATT GGT GAA GCC AAA GAT GAA GAC ACT GCC GAT ATC TTT ACC GCC
451- GCA TCA CGC GAC CTC GAT AAA TTC CTG TGG TTT ATC GAA TCC AAC
496- ATC GAA TAA ATC TAT CTC TAC CCT GAA TAC TTC GAG TTG CAG GAA
+37  GGT ACA AAC GCA GCG AAT CCG CAG AAG CCT GAC TTC CGT CGG TCA
+82  CTG AAG CGA ACG CAC CTG CAA CTT GAT GTA CAC AGG TAT ATA AGT
+127 CAT CCC TAT ACC CCT GCC TGG CAC AGG GGT TTT GCA CTT AAA TAG
+172 TGC ACA CGT CTT GTA CTC CCC TCC GAC AAA AGT GAA TTA TTT GTA
+217 ATA ATT ACA TCA CAC AAT CGT TAA TTA AAG ATT GTT TTA ACA ACG
+262 ATT TTT ACG CTA AAT AGA CCC TGT ATC TCT ACT TTG TTA TTC ATG
+307 CAC TAA ATC AGT GCC CCA AAA CGG TGC GGC ATA CTG GTT TTG CCC
+352 GAC TTA TTG      TGCACAGGAATGTTACAGC  T TCT GTT AAA

```

**UK-1**

```

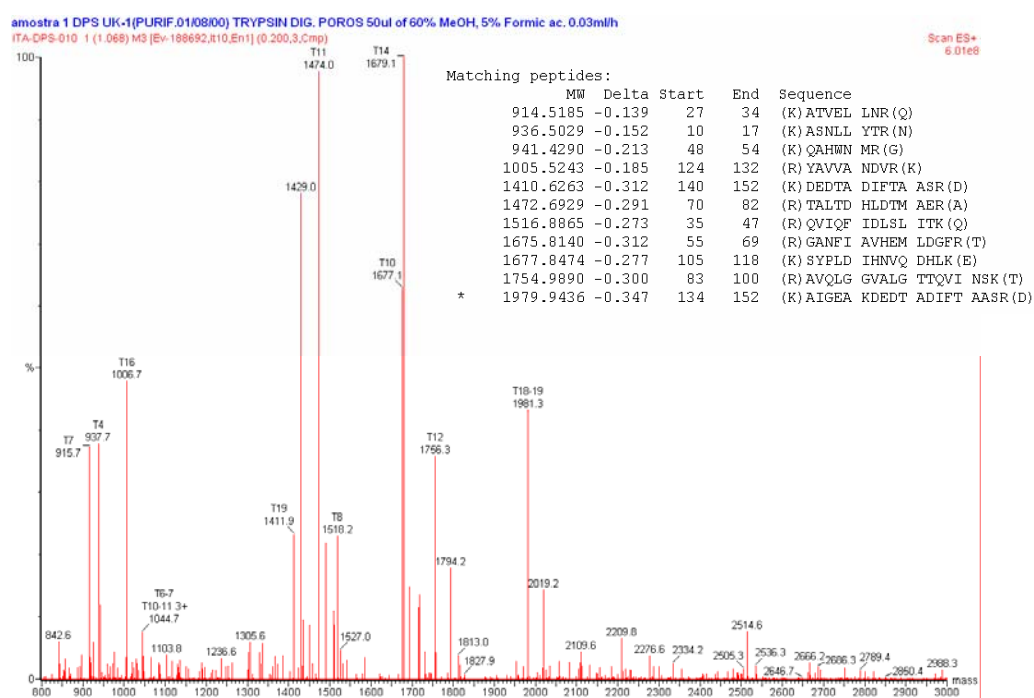
-394          TCT ACC CTA ACG ATT CGA CGC GAA CCC GCA AAT TAA ACA AGT
-360          TCT ACC CTA ACG ATT CGA CGC GAA CCC GCA AAT TAA ACA AGT
-315 TGA CGT AAA ATA GTT TCT TAT TCT GCA TGA TGT GCA TAA TCA TGC
-270 AGA ATA TCA CCT CGT TAT TCA CCT TTT ATT ATT GCG CTA TTA CTT
-225 CGT CAT TTT TTG TCA TAT TTT TTC TCA TTT TTT ACA TTA AAA TGA
-180 GAA TTA TTA CCC ACC AAA CAG CAA ACT CGT CTA ACC AAT TGA TTT
-135 TTA ATC AAA ATA AAT ATT AAA TCT TGT CTG TAC TAT TAA AGT GAT
-90  AGG TAA ATT CAA AAA AGC AAA GTT AAA AAC CGG TGC TAT ACT TAT
-45  TTT CGT TAA TTA CCT GGG ACA CAA ACA TCA AGA GGA TAT GAG ATT
1-   ATG AGT ACC GCT AAA CTG GTA AAA ACA AAA GCG TCT AAT CTG CTT
46-  TAT ACC CGT AAC GAT GTA TCA GAG AGC GAT AAA AAA GCG ACG GTT
91-  GAG TTG CTT AAT CGT CAG GTG ATC CAG TTC ATT GAC CTG TCG CTG
136- ATC ACG AAA CAG GCC CAC TGG AAC ATG CGC GGT GCT AAC TTT ATT
181- GCC GTT CAT GAG ATG CTG GAT GGC TTC CGT ACC GCA CTG ACC GAT
226- CAT CTG GAT ACT ATG GCC GAG CGC GCC GTA CAG CTT GGC GGT GTG
271- GCG TTA GGC ACC ACG CAA GTT ATC AAC AGC AAA ACT CCA CTG AAA
316- AGC TAT CCG CTC GAC ATC CAT AAC GTG CAG GAT CAC TTA AAA GAA
361- CTG CCC GAT CGC TAC GCT GTT GTC GCT AAT GAT GTT CGC AAA GCT
406- ATT GGT GAA GCC AAA GAT GAA GAC ACT GCC GAT ATC TTT ACC GCC
451- GCA TCA CGC GAC CTC GAT AAA TTC CTG TGG TTT ATC GAA TCC AAC
496- ATC GAA TAA ATC TAT CTC TAC CCT GAA TAC TTC GAG TTG CAG GAA
+37  GGT ACA AAC GCA GCG AAT CCG CAG AAG CCT GAC TTC CGT CGG TCA
+82  CTG AAG CGA ACG CAC CTG CAA CTT GAT GTA CAC AGC TAT ATA AGT
+127 CAT CCC TAT ACC CCT GCC TGG CAC AGG GGT TTT GCA CTT AAA TAG
+172 TGC ACA CGT CTT GTA CTC CCC TCC GAC AAA AGT GAA TTA TTT GTA
+217 ATA ATT ACA TCA CAC AAT CGT TAA TTA AAG ATT GTT TTA ACA ACG
+262 ATT TTT ACG CTA AAT AGA CCC TGT A
+307
+352

```

**Figura 17. Sequências 5'→3' contendo o gene *dps* de linhagens de *S. enterica*.** O fragmento de clonagem da linhagem UK-1 foi seqüenciado e apresentou homologia de 99,827% com uma região de 1147 nucleotídeos da linhagem LT-2 (McClelland *et al.*, 2001). O espectro de uma das leituras é mostrado na página anterior. Os dois nucleotídeos diferentes estão sublinhados em vermelho (quadro UK-1). O fragmento de clonagem foi subdividido em 3 regiões: a acima do gene (verde ► de -381 a -1); o gene *dps* (preto ► de 1 a 504); e a abaixo do gene (azul ► de +1 a +380). Os nucleotídeos onde os iniciadores são pareados estão sublinhados nas regiões acima e abaixo do gene (quadro LT-2).

## IX – Mapa tripsínico de J-Dps

A digestão de J-Dps com tripsina produziu os espectros observados na figura 18. O mapa peptídico por massa, quando comparado com Dps de *Salmonella typhimurium* LT2 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - programa Blastx [BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)], representou 74% de cobertura da sequência (figura 19). Salienta-se que, a partir dessas análises, não foi possível observar espectros que comprovassem a presença de modificações pós-traducionais.



**Figura 18.** “Peptide mass fingerprint” de J-Dps. Após a digestão tripsínica de J-Dps, seus peptídeos resultantes foram submetidos ao espectrômetro de massa. Os picos dos peptídeos representam as massas moleculares média das espécies multiplamente carregadas, determinadas após desconvolução de massa (*mass deconvolution*). As massas monoisotópicas dos íons observados foram anotadas e utilizadas para comparação (“matching peptides”) com os peptídeos produzidos por uma digestão simulada de Dps de *S. enterica* LT-2.

**DPS-  
Salmonella typhimurium LT2**

```

1   STAKLVKTKA SNLLYTRNDV SESDKKATVE LLNRQVIQFI DLSLITKQAH WNMRSANFIA VHEMLDGFRT ALTDHLDTMA ERÄVQLGGVA
91  LGTTQVINSK TPLKSYPLDI HNVQDHLKEL ADRYAVVAND VRKAIGEAKD EDTADIFTAA SRDLDKFLWF IESNIE

```

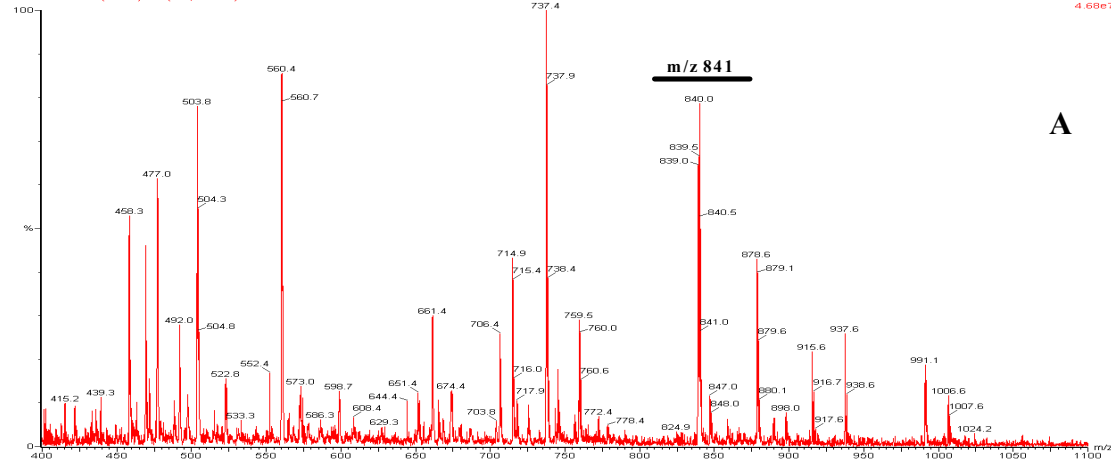
↑

**Figura 19. Comparação da seqüência de peptídeos de J-Dps com Dps de *S. enterica* LT-2.** A seqüência dos 167 aminoácidos da molécula de Dps de *S. enterica* Typhimurium, linhagem LT-2, foi obtida do programa Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Os peptídeos produzidos pela digestão tríptica de J-Dps (linhagem UK-1) foram alinhados com essa seqüência (destacados em azul), e representaram 74% da molécula inteira. No seqüenciamento do gene *dps* da linhagem UK-1 foi identificada uma alteração que resultaria na substituição por prolina, ao invés da alanina apontada pela seta vermelha.

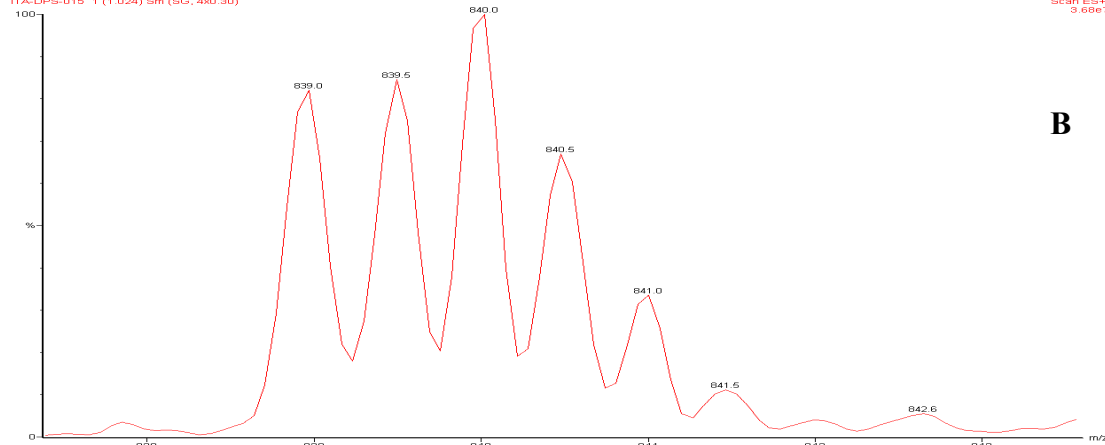
### X – Detecção de íons oxônio

A detecção de íons oxônio derivados de Hex ( $m/z = 163$ ), HexNAc ( $m/z = 204$ ) e HexHexNAc ( $m/z = 366$ ) foi feita através de rastreamento de íons precursores em espectrômetro de massa (“Parent Ion Scanning”), para os peptídeos tripsínicos de J-Dps (figura 20). A energia de colisão foi ajustada para 60 eV e a pressão parcial de argônio para  $3,0 \times 10^{-5}$  mTorr. O instrumento foi otimizado para fornecer os maiores sinais possíveis para os íons parentais. O(s) íon(s)  $m/z = 841$  [M+2H<sup>+</sup>] foi(ram) detectados em “parent ion scanning” como íon precursor  $m/z$  163, 204 e 366, sugerindo a presença de íons oxônio para HexNAc e HexHexNac. No entanto, a fragmentação por CID-MS/MS (“daughter ion scanning”) apresentou valores de massa em concordância com os peptídeos T10 (55-69) - GANFIAVHEMLDGFR ( $M_R = 1675$  Daltons) e T14 (105-118) - SYPLDIHNVQDHLK ( $M_R = 1677$  Daltons). Embora os íons de fragmentação dos peptídeos T10 e T14 permitiram um sequenciamento de aminoácidos parcial deduzidos no mesmo espectro de massa, esses peptídeos, quando submetidos a CID-MS/MS, não apresentaram íons “daughter”  $m/z$  equivalente a 163, 204 ou 366 (figura 20 D e E), o que não justificaria suas detecções em “parent ion scanning” (figura 20 C). Assim, é possível que o sinal observado de  $m/z$  841 seja o de um glicopeptídeo, e que os sinais da fragmentação desse íon tenham sido suprimidos pela justaposição dos dois outros peptídeos (T10 e T14).

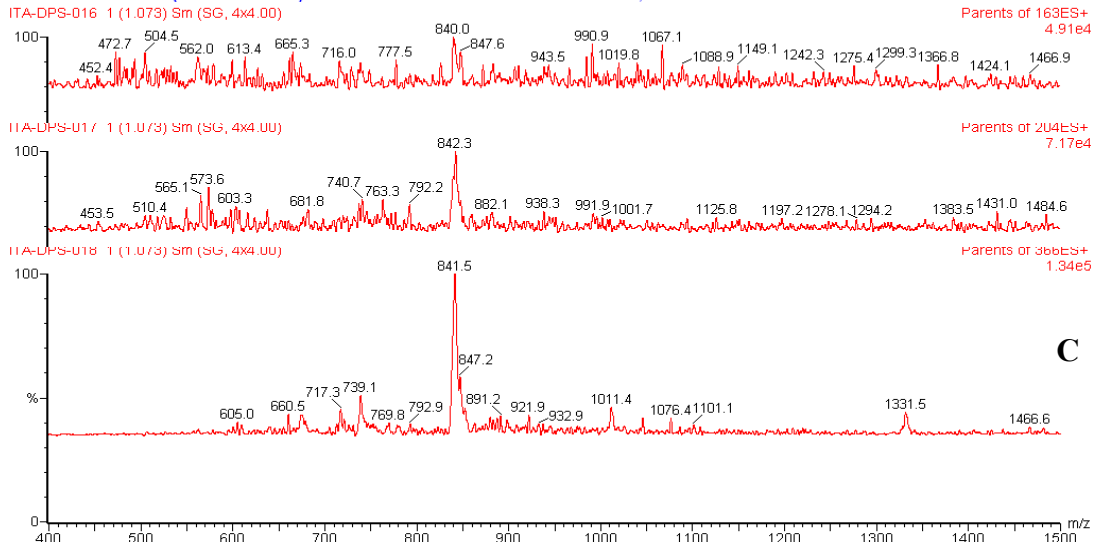
amostra 1 DPS UK-1(PURIF.01/08/00) TRYP SIN DIG. POROS 50ul of 60% MeOH, 5% Formic ac. 0.03ml/h

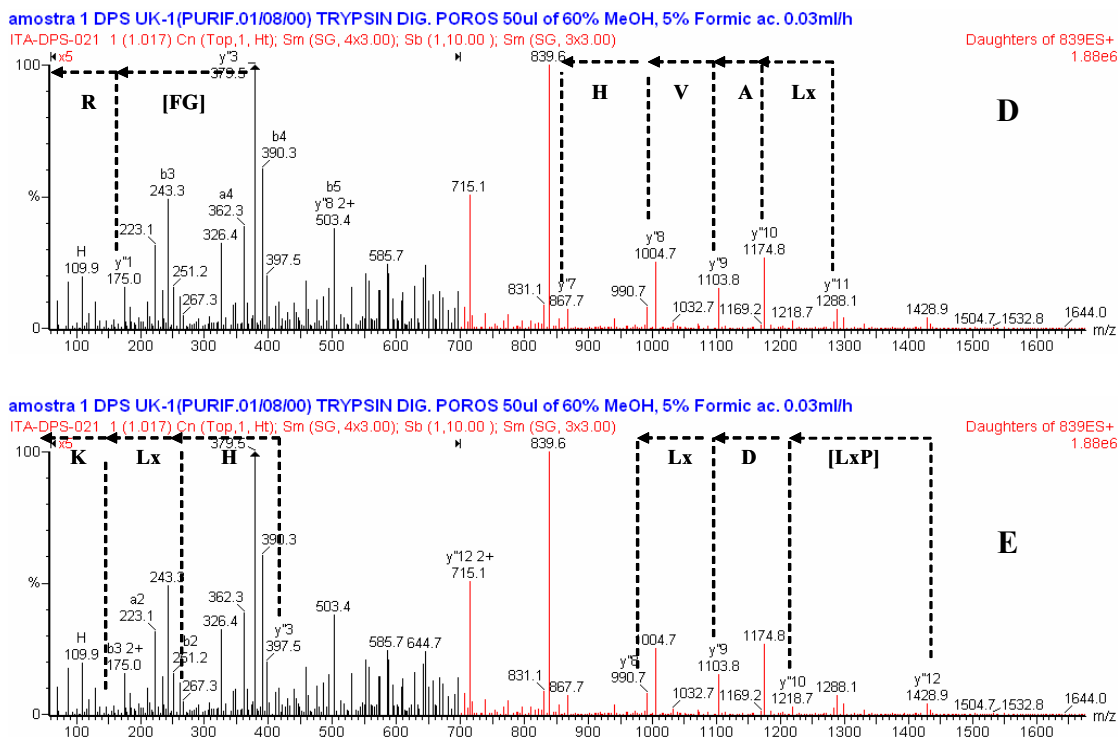


ITA-DPS-015 1 (1.024) Sm (SG, 4x0.30)



amostra 1 DPS UK-1(PURIF.01/08/00) TRYP SIN DIG. POROS 50ul of 60% MeOH, 5% Formic ac. 0.03ml/h





**Figura 20. Espectros de massa dos peptídeos tripsínicos obtidos de J-Dps purificada por jacalina.** Peptídeos tripsínicos de J-Dps foram submetidos ao rastreamento de íons precursores ("parent ion scanning") para detecção de íons oxônio derivados de uma Hexose [ $m/z$  163]; N-acetil-hexosamina [ $m/z$  204] e Hesosil-N-acetil-hesosamina [ $m/z$  366]. A energia de colisão foi estabelecida para 60 eV, e a pressão parcial de argônio para  $3,0 \times 10^{-5}$  mTorr. **A** - Mapa peptídico por massa quando comparado a Dps de *Salmonella typhimurium* LT2 representou 74% de cobertura da seqüência, destacando as espécimes iônicas  $m/z$  841; **B** - Expansão do espectro de massa em A demonstrando a distribuição isotópica na região de  $m/z$  841, que é compatível com a presença de pelo menos dois íons duplamente carregados 839,0 e 839,5; **C** - Detecção de glicopeptídeo via "parent ion scanning" de íons oxônios. Os espectros de massa obtidos a partir da mistura de peptídeos tripsínicos, como demonstrado em A, foram seletivamente monitorados para íons oxônios  $m/z$  163;  $m/z$  204 e  $m/z$  366 correspondentes a Hexose +  $H^+$ , HexNAc +  $H^+$  e HexHexNAc +  $H^+$ , respectivamente. O íon detectado corresponde a região de  $m/z$  841, sugerindo que um peptídeo presente nessa região do espectro de massa pode conter uma glicana composta por HexHexNAc. Para confirmação os íons da região de  $m/z$  841 foram submetidos a CID-MS/MS ("daughter ion scanning") descritos em D e E dessa figura; **D** - Espectro de massa "daughter ion scanning" do íon  $m/z$  839 [ $M+2H^+$ ]  $Mr= 1676,91$  Da. A dedução parcial da seqüência de aminoácidos através dos íons da série b e y correspondem ao peptídeo tripsínico T10 (55-69) – **GANFIAVHEMLDGFR**; **E** - Espectro de massa "daughter ion scanning" do íon  $m/z$  839 [ $M+2H^+$ ]  $Mr= 1678,86$ . A dedução parcial da seqüência de aminoácidos através dos íons da série b e y correspondem ao peptídeo tripsínico T14 (105-118) **SYPLDIHNVQDHLK**.

# 5

## Discussão

### I – Purificação de antígenos de *S. enterica*

As adesinas são moléculas expressas na estrutura fimbrica bacteriana relacionadas à adesão do microrganismo a uma determinado local. Nossos trabalhos iniciais foram motivados pela purificação da adesina F18ac da linhagem Enterotoxigênica de *E. coli* (ETEC), através de cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose CL 4B (Amorim *et al.*, 2000). Além disso, os mecanismos moleculares pelos quais *Salmonella* adere ao epitélio intestinal eram totalmente desconhecidos. Giannasca e colaboradores (1996) mostraram que o padrão de adesão *Salmonella enterica* Typhimurium em linhagens cultivadas de células intestinais (Caco-2) era muito semelhante ao da lectina vegetal PNA. Com esses resultados ele sugeriu que essa

sorovariedade de *S. enterica* continha uma adesina ligante de D-galactose terminal em glicocomplexos. No entanto, as adesinas de *S. enterica* Typhimurium devem ter especificidade fina de reconhecimento de carboidratos extremamente definida, uma vez que a tentativa de isolamento de uma adesina proporcionou resultados não satisfatórios. Como o teste de triagem com açúcares imobilizados em matriz polissacarídica não evidenciou nenhuma banda protéica relevante (dados não mostrados), nossa estratégia foi tentar purificar algum antígeno através da utilização de lectinas imobilizadas, em um raciocínio inverso baseado na idéia de que *Neisseria meningitidis* apresentava pilina glicosilada com caracterização bem avançada (Virji, 1997). Os resultados de citometria de fluxo, através do estudo de ligações de lectinas biotiniladas às células bacterianas, deram-nos noções preliminares de como seria o perfil de purificação de extratos antigênicos em colunas de jacalina e PNA imobilizados (figura 1). Coerente com o resultado de citometria de fluxo, a coluna Hi-Trap®-PNA retardou uma série de antígenos, produzindo um padrão de migração eletroforética bem diversificado, ao passo que, com o material retardado na coluna Sepharose-jacalina mostrou um padrão bem menos diversificado, sendo possível sugerir a presença de uma banda situada entre os marcadores de 14 e 20 kDa no gel gradiente (figura 2). Assim, como o ensaio com coluna de PNA imobilizado poderia ter retardado glicocomplexos variados, incluindo estruturas da parede celular bacteriana, decidimos investigar o(s) constituinte(s) retardado(s) na coluna de jacalina.

A observação de que um constituinte de *S. enterica* liga-se à coluna de Sepharose-jacalina suscitou a hipótese de que havíamos purificado uma glicoproteína do extrato bruto da linhagem bacteriana analisada (figura 3). Tal proteína apresentou 100% de identidade em sua porção N-terminal (20 aminoácidos) com Dps de *S. enterica* Typhimurium UK-1. Em *Escherichia coli*, Dps é uma proteína que se liga de maneira não específica ao DNA. Sua expressão é controlada pelo fator  $\sigma^S$ , codificado pelo gene *rpoS*, em fase estacionária de crescimento bacteriano, ou pelo ativador transcricional *oxyR*, quando a população bacteriana em fase logarítmica de crescimento encontra-se em ambiente de injúria oxidativa (Altuvia *et al.*, 1994). Crescendo “in vitro”, a população bacteriana tende a esgotar os nutrientes, fazendo com que haja mudanças morfofisiológicas, no sentido de adaptar-se a um novo ambiente cuja fonte de carbono (energia) já não é abundante. Assim, as células bacterianas em fase estacionária de crescimento são menores, reduzem o número de ribossomos e a síntese protéica, alteram a composição das camadas interna e externa da membrana, bem como

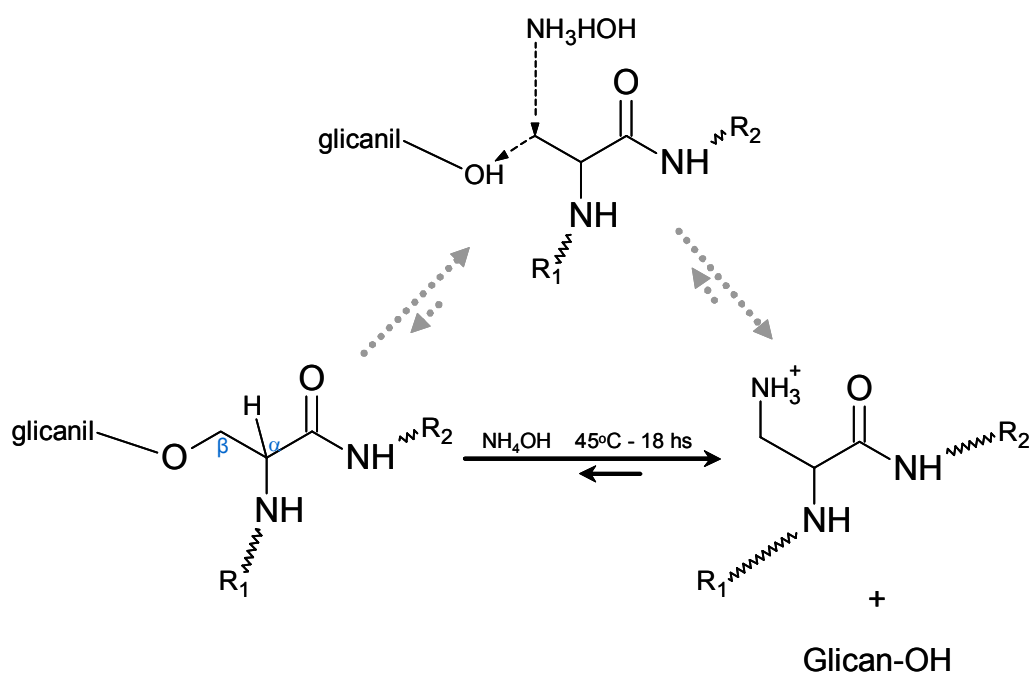


condensam o DNA cromossomal, que passa a ser ligado e protegido por proteínas produzidas para cumprir tal finalidade (Frenkiel-Krispin e Minsky, 2002). Enfim, a produção de Dps pelos mais variados gêneros bacterianos traz mudanças profundas, promovendo um estado que pode ser chamado de “standby”, onde o gasto de energia é quase nulo até que as condições do meio tornem-se mais favoráveis (Frenkiel-Krispin e Minsky, 2002).

A análise eletroforética do material de *S. enterica* ligante de jacalina, feita a partir de géis corados para detectar proteínas ou carboidratos, suscitou a hipótese de haver uma natureza glicoprotéica do antígeno isolado (figura 3). Alguns aspectos dos métodos de coloração empregados merecem considerações: i) as proteínas foram reveladas pelo nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987), ao passo que carboidratos foram revelados através da oxidação de grupamentos glicídicos com ácido periódico de Schiff (PAS), seguido de coloração com nitrato de prata (PAS-AgNO<sub>3</sub>) em meio alcalino (Tsai e Frasch, 1982); ii) o protocolo que utiliza PAS-AgNO<sub>3</sub> pode corar proteínas em alguns casos, mas com sensibilidade muito inferior a da primeira metodologia; iii) tratando-se de glicoproteínas, PAS e AgNO<sub>3</sub> podem ter dupla ação, reforçando a coloração de componentes glicídicos e polipeptídicos de uma dada amostra (Tsai e Frasch, 1982); iv) no sentido de comprovar a eficiência comparativa entre os dois métodos de coloração, a ovalbumina, glicoproteína presente na mistura de marcadores, corou por ambos. Já a albumina bovina, sabidamente não glicosilada, só foi evidenciada pelo primeiro método (dados não mostrados); v) PAS-AgNO<sub>3</sub> revelou, ainda, outros prováveis glicocomplexos, que devem ser constituintes da parede celular bacteriana presentes na preparação do antígeno bruto, como lipopolissacárides (LPS), entretanto, não se pode descartar a existência de outras glicoproteínas no antígeno bruto. Ainda que Dps já tenha sido caracterizada em enterobactérias e *Salmonella* (Almirón *et al.*, 1992; Grant *et al.*, 1998; Halsey *et al.*, 2004), não há dados de literatura indicando glicosilação nessa molécula e, muito menos, sobre processos de purificação da Dps por cromatografia de afinidade em coluna com lectinas imobilizadas. A observação de que J-Dps liga-se à coluna de Sepharose-jacalina abriu perspectivas no estudo da glicosilação em Dps de *S. enterica*, e em outros gêneros bacterianos.

## II – Reação de beta-eliminação

A reação de beta-eliminação é a retirada de grupamentos (em nosso caso seria um resíduo oligossacaril) ligados à cadeia polipeptídica (Rademaker *et al.*, 1998). A reação procede de maneira que, sob determinadas condições, o carbono beta associado à ligação glicosídica do resíduo de aminoácido é substituído por um grupamento  $\text{-NH}_3^+$ , liberando o grupamento glicídico (ver figura 21). Os resultados observados na figura 4 mostraram que J-Dps, quando submetida à reação de beta-eliminação, passa a não ser visualizada pela coloração com PAS- $\text{AgNO}_3$ , indicando que um componente glicídico tenha sido removido, e reforçando a idéia de glicosilação. Além disso, a comparação entre as duas metodologias de coloração, utilizadas também na figura 3, fortaleceu a idéia de que ambas são eficientes para o discernimento entre estruturas glicoconjugadas ou não.



**Figura 21. Reação de beta-eliminação** (Rademaker *et al.*, 1998). Esquema mostrando a reação de remoção de grupamentos oligossacarídicos da cadeia polipeptídica com hidróxido de amônio (ACD/ChemSketch 5.12). Os carbonos alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) da cadeia polipeptídica estão anotados em azul. O aminoácido representado é um resíduo de serina, e as cadeias R1 e R2 representam as continuações da cadeia polipeptídica.

### III – Afinidade jacalina/J-Dps

Apesar de não haver descrição da interação proteína-proteína entre lectinas e polipeptídeos, esta hipótese não foi totalmente descartada, uma vez que a glicosilação em J-Dps era um fenômeno surpreendente. Através de ensaios lectino-enzimáticos, pode-se comprovar a ligação da jacalina à J-Dps (figura 5), e que essa ligação era totalmente inibida na presença de  $\alpha$ -metil-D-galactose (figura 6). Os resultados de inibição obtidos são coerentes com a reconhecida especificidade de ligação da jacalina (Ahmed e Chatterjee, 1989), indicando que o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) esteja envolvido na interação jacalina/J-Dps. As outras lectinas vegetais utilizadas, ligantes de  $\alpha$ -galactosídeos terminais, mostraram resultados próximos aos do controle negativo (lectina ausente). GSIB4 reconhece epitopos  $\alpha$ -galactosil terminais (Koma *et al.*, 2000) e a euforbina, cuja especificidade fina ainda não foi bem determinada, parece ligar-se à N-acetil-galactosamina, além de epitopos  $\alpha$ -galactosil terminais (Dias-Baruffi *et al.*, 2000). Importante ressaltar que lectinas ligantes de manose (KM+ e concanavalina A) também apresentaram capacidade de ligação ao material J-Dps, e que D-manose inibiu as ligações dessas lectinas, bem como da jacalina (dados não mostrados). Jacalina apresenta reconhecida capacidade de ligação a um resíduo galactosil subterminal,  $\alpha$ -O-ligado ao arcabouço protéico, como no antígeno T (Ahmed e Chatterjee, 1989). Entretanto, existem relatos que indicam afinidade à manose e manoconjugados (Bourne *et al.*, 2002). Assim, esse conjunto de informações apontou para a manose como um dos prováveis constituintes da glicana de J-Dps.

### IV – Curva de crescimento e produção de Dps

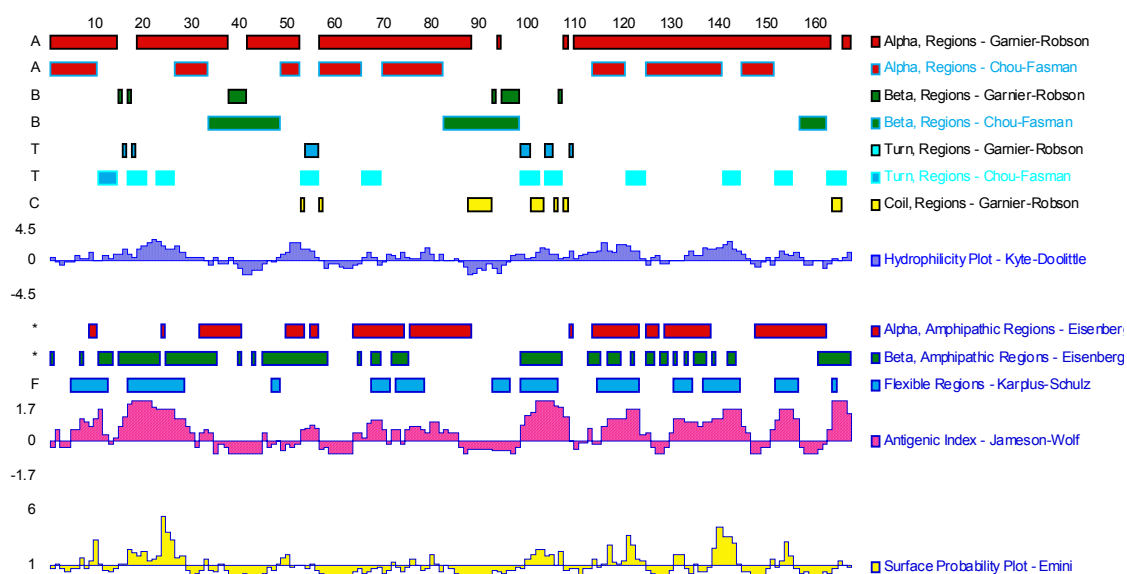
Diversos trabalhos apontam que a célula bacteriana acumula grandes quantidades de Dps durante a fase estacionária de crescimento (Almirón *et al.*, 1992; Altuvia *et al.*, 1994; Spector, 1998; Wolf *et al.*, 1999; Frenkiel-Krispin *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2003 e Halsey *et al.*, 2004). Em uma cultura típica de uma enterobactéria em meio LB, as células bacterianas em fase de crescimento exponencial acumulam pequena quantidade de Dps (cerca de 5000 moléculas por célula), ao passo que, após um tempo de incubação de aproximadamente 9 horas (37°C), as células começam a

entrar em fase estacionária de crescimento, acumulando taxas de 23 a 25 vezes maiores de Dps, chegando 178 mil moléculas/célula em fase estacionária plena (Azam *et al.*, 1999). Na realidade, esse é o componente mais abundante das células bacterianas nessa fase de crescimento. Outrossim, a concentração de Dps intracelular parece ser regulada por um mecanismo de proteólise, através de um balanço entre as fases exponencial e estacionária, orquestrado pelas enzimas ClpXP e ClpAP (Stephani *et al.*, 2003). Sob condições onde os nutrientes são escassos, existe um mecanismo que cessa a proteólise, e a molécula de Dps é estabilizada. Associado ao aumento da síntese, esse constituinte passa a acumular em grandes quantidades na célula bacteriana. Um dado interessante observado a partir dos resultados mostrados na figura 9 é que antígenos presentes em extratos de culturas em fase exponencial de crescimento são mais adsorvidos pela jacalina imobilizada em microplacas, especialmente em períodos pré-estacionários (figura 9 – cultura de 7 horas), originando uma curva de afinidade inversa ao que se espera da concentração de Dps. Destaca-se que esses antígenos foram revelados através da utilização de anticorpos murinos anti-J-Dps (ver figuras 7). Como a preparação em coluna de jacalina poderia conter pequenas quantidades de outros constituintes, é possível que esses anticorpos estivessem reconhecendo não apenas J-Dps. No entanto, nota-se que a eletrotransferência de proteínas totais de *S. enterica*, revelada com o mesmo anticorpo (“Western blot”), evidenciou banda singular correspondente a J-Dps (figura 8). Dessa maneira, acreditamos que a glicosilação em sua molécula possa ter um papel importante na manutenção dos níveis intracelular desse constituinte, e no seu mecanismo de interação com o DNA.

## V – Constituição da glicana de J-Dps

Segundo Grant e colaboradores (1998), a molécula de Dps de *E. coli* é constituída por 167 aminoácidos, e possui massa molecular de 18712 Daltons. Nós utilizamos o programa Protean™ (DNASTAR Inc., Madison/WI – USA) para estimar a massa molecular de Dps, calculada através da somatória das massas da seqüência de seus resíduos de aminoácidos obtidas para a linhagem de *S. enterica* utilizada (UK-1). Algumas características são apresentadas na figura 22, e o resultado do cálculo empírico de sua massa molecular foi um pouco mais elevada (18742,31) que o obtido

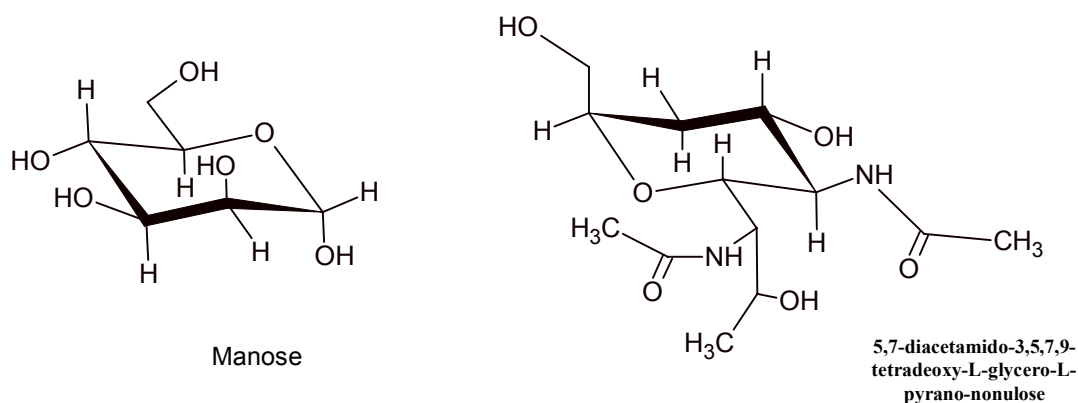
para *E. coli*. Isto ocorre devido a pequenas diferenças entre alguns resíduos de aminoácidos que provavelmente existam entre esses dois gêneros bacterianos.



**Figura 22. Dps de *S. enterica* Typhimurium LT-2 segundo o programa Protean™.** As análises pelo Protean™ (DNASTAR Inc., Madison/WI – USA) comprovaram algumas das características gerais observadas para Dps apontadas na literatura (Grant *et al.*, 1998), inclusive que sua carga relativa é negativa (-3,24). A massa molecular para os 167 aminoácidos foi 18742,31.

Nas análises por ESI-MS, J-Dps apresentou massa molecular equivalente a 18587 Daltons (figura 10). Considerando que a metionina tem massa residual em torno de 131,20 Daltons, e a massa de Dps calculada pelo Protean™, corrigida com a retirada da metionina N-terminal, passaria a 18611,11 Daltons, a diferença deduzida da comparação entre as massas moleculares de J-Dps (ESI-MS) e Dps (Protean™) passa a ser de 24 Daltons. As análises espectrométricas mostraram que J-Dps, supostamente glicosilada, apresentava-se com valor de massa molecular menor que o valor empírico da sequência de aminoácidos inserida no programa. A diferença de 24 Daltons pode parecer, de certa forma, desprezível, porém, a espectrometria de massa é um método de análise muito preciso, capaz de fornecer resultados comparativos da ordem de 1 Da. Nesse sentido, buscou-se submeter a J-Dps a um protocolo eficiente de desglicosilação, e comparar resultados da espectrometria de massa da preparação submetida ou não a tal protocolo. A desglicosilação foi procedida utilizando-se o TFMS, um ácido orgânico forte, comparável aos ácidos minerais, que, em determinadas condições, remove as

cadeias glicídicas das glicoproteínas, sem alterar sua estrutura primária, através de um mecanismo ainda não muito bem conhecido, mas que deve envolver a protonação de átomos de oxigênio dos resíduos de açúcar ligados à cadeia polipeptídica (Sojar & Bahl, 1987). Notavelmente, a J-Dps submetida ao protocolo de desglicosilação com TFMS apresentou redução de sua massa molecular da ordem de 449 Daltons (figura 10). Esta alteração não é detectável na análise eletroforética, e indica que houve remoção de pequena(s) estrutura(s) glicídica(s), constituída(s) de duas ou três hexoses, podendo haver outros substituintes (e.g. grupamentos fosfato) associados à sua glicana. Outro dado interessante foi que resultados de GC-MS assinalaram a presença de manose, glicose, e um outro componente glicídico que não confrontou com nenhum dos padrões utilizados, e foi identificado por um sinal de interrogação (figura 11). O fato de a glicose ser uma habitual contaminante nesse tipo de análise fez-nos afastar a hipótese de esta ser um dos constituintes da glicana de J-Dps. Por outro lado, a contaminação com manose é muito improvável, e consideramos sua presença como relevante, sendo assim um dado inicial na caracterização estrutural dessa(s) glicana(s). Ainda, os relatos da presença de resíduos incomuns em glicoproteínas bacterianas tem sido cada vez mais comuns (Gil-Serrano et al., 1999; Benz & Schimidt, 2001; Thibault et al., 2001; e Schirm *et al.*, 2003). Assim, refletimos sobre a possibilidade da interrogação observada pelo GC-MS ser correspondente a um resíduo nonassacarídeo, como o encontrado na flagelina de *C. jejuni* (Thibault *et al.*, 2001). Curiosamente, se projetarmos os açúcares desenhados a seguir como os prováveis componentes da glicana de J-Dps, nós obteríamos um valor de massa residual da ordem de 448 Daltons, o que é apenas 1 Dalton inferior a diferença entre a proteína nativa e a desglicosilada (figura 10).



Na tentativa de obter uma alíquota do ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-L-glicero-L-manononolônico, para compararmos com nossa amostra em GC-MS, entramos em contato o grupo da Dra. Susan Logan (Schirm *et al.*, 2003) e, como esse açúcar ainda não é produzido como fruto de síntese laboratorial, a obtenção de qualquer quantidade deste componente seria uma prática irrealizável. Ainda que seja muito prematuro concluir que esses resíduos comporiam uma glicana em J-Dps, a justaposição entre esses valores sinaliza para investigações futuras que comprovem essa constituição.

## VI – Produção de Dps recombinante

Em nossos trabalhos iniciais, a eluição do antígeno adsorvido em coluna de jacalina proporcionou rendimento altamente satisfatório, de maneira que cerca de 20 miligramas de preparação J-Dps foram obtidas a partir de aproximadamente 1 grama de antígeno bruto. No entanto, como a expressão de Dps é finamente regulada na célula bacteriana, sua purificação através dessa metodologia forneceu resultados heterogêneos, e muitas vezes insatisfatórios. Além disso, o nível de rendimento observado anteriormente não fora mais reproduzido, o que nos levou a supor que a glicosilação em Dps seja um evento crítico, e altamente pontual. Ressalta-se que as análises pormenorizadas de extratos em diferentes tempos de crescimento bacteriano também não produziram resultados satisfatórios (dados não mostrados). Desse modo, nossa estratégia foi construir uma linhagem de *S. enterica* recombinante, que expressasse Dps independentemente da sua fase de crescimento, estando sob controle transcricional dos promotores de um vetor de alto número de cópias. O nosso projeto visava também a construção de uma linhagem de *S. enterica* mutante (*dps*-nula), para estudos de atenuação da virulência, no entanto, durante a construção da linhagem *dps*-nula, Halsey *et al.* (2004) publicaram um artigo mostrando, através de uma construção semelhante, que as linhagens  $\Delta$ *dps* eram mais sensíveis a agentes oxidativos, possuíam menor capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos, e eram atenuadas na virulência. Valendo-se das ferramentas disponíveis, prosseguimos, então, com a clonagem de *dps* em pGEM-T® easy, que mostraram resultados satisfatórios (figura 12), e pode-se comprovar que as linhagens recombinantes produziam quantidades eminentes da proteína recombinante (figura 13). Apesar da grande quantidade, sua purificação

através da coluna de jacalina continuou sem sucesso, e resolvemos utilizar o método convencional de purificação (Almirón *et al.* 1992), efetuando algumas modificações, no sentido de isolar esse antígeno dos diversos constituintes celulares, inclusive de sua provável ligação com o DNA (figura 14). As frações correspondentes à Dps (12 e 13) determinaram cerca de 9,8 miligramas de proteínas, originárias de 100 mililitros do cultivo da linhagem recombinante, que, em proporção, corresponderam a mais de 5 vezes à obtida na preparação de J-Dps da linhagem selvagem. Entretanto, o perfil eletroforético da nova preparação (FPLC-Dps) exibiu um padrão de bandas duplas (figuras 14 e 15) e até triplas (figura 15). Da mesma forma, a preparação J-Dps, estocada desde os experimentos iniciais, apresentou-se com padrão de três bandas. Existem relatos apontando que a Dps está sujeita a perder, espontaneamente, até os seis primeiros resíduos de aminoácido (Almiron *et al.*, 1992), mas esse fato parece não ser caracterizável através de ensaios de migração eletroforética. Um fato notável é que o processo de preparação, utilizado para FPLC-Dps, parece acelerar algum processo que só é observado para J-Dps após um determinado período em estoque a  $-20^{\circ}$  C.

Através de análises semiquantitativas, foi possível observar que uma pequena fração da preparação FPLC-Dps foi retardada em coluna de jacalina, ao passo que, quando se analisa o ensaio de cromatografia em coluna de DNA imobilizado, as frações retardada e não-retardada apresentaram resultados mais equilibrados. Um fato importante é que, entre os resultados mostrados na figura 15, o material retardado na coluna de jacalina foi concentrado por centrifugação a vácuo. Ressalta-se que esses resultados são, aparentemente, reproduzidos com certa facilidade nas condições previstas para esses ensaios. Assim, apesar de não invalidar a hipótese de glicosilação, levantada a partir dos dados obtidos da preparação inicial de J-Dps, esses resultados apontam para a necessidade de uma investigação minuciosa relacionada à produção da molécula glicosilada, e sua associação ao processo de purificação em coluna de jacalina imobilizada.

Como já apresentado inicialmente, a jacalina é uma lectina vegetal que normalmente interage com resíduos subterminais de alfa-galactose em glicoproteínas (Sastry *et al.*, 1986). Galactose é um açúcar que não fora detectado em nossas análises de GC-MS (figura 11). Apesar da demonstração de sua possibilidade de interação com manoproteínas, esse fenômeno é observado sob condições específicas, como na utilização de extratos de semente de jacalina recém-preparados, sem que tenha havido processos de congelamento ou liofilização (Bourne *et al.* 2002). Se acreditarmos que a



interação de jacalina com Dps é crítica em razão da presença de resíduos de manose (e ausência de resíduos alfa-galactosil), seria possível explicarmos o motivo dos resultados ambíguos de rendimento entre a preparação de J-Dps e as demais preparações, inclusive com a linhagem recombinante. A utilização de colunas com lectinas ligantes de manose, como KM+ e Concanavalina A, não alteram, porém, os resultados de purificação de Dps por cromatografia com essas lectinas imobilizadas (dados não mostrados), restando-nos sugerir que a glicana em Dps deva assumir um estado conformacional não acessível aos CRDs dessas lectinas.

A coloração fluorescente de glicoproteínas (figura 16), através de uma metodologia desenvolvida pela “Molecular Probes (Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit)”, merecem algumas considerações: i) foi possível evidenciar, como esperado, a banda correspondente a J-Dps, de maneira que sua intensidade de coloração, semelhante a avidina no controle (ver tabela I em materiais e métodos), parece ter sido proporcional ao conteúdo glicídico em sua molécula; ii) quantidade seria a provável razão pela qual a fração da linhagem recombinante, retardada em coluna de jacalina, não seja visualizada nesse processo de coloração; iii) observou-se, também, a suposta existência de uma fração glicosilada, dentre a grande quantidade de Dps não retardada na coluna de jacalina, e entre as proteínas totais da linhagem *S. enterica* pGEM-T/*dps*; iv) surpreendentemente, a fração retardada na coluna de DNA não foi visualizada, em oposição à coloração da não-retardada, indicando que haja uma correlação inversa entre glicosilação e ligação ao DNA. Em estudos com as denominadas formas L de *E. coli*, Freestone e colaboradores (1998) comprovaram a fosforilação em Dps. Aliado ao fato de que fosfoproteínas nucleares, que formam multímeros e controlam a expressão de genes em eucariotos, apresentam uma certa dinâmica entre glicosilação e fosforilação (Comer e Hart, 1999 e Iyer e Hart, 2003), a glicosilação em Dps de *S. enterica*, e possivelmente de outros gêneros bacterianos, exibe um dado importante no estudo funcional dessa molécula tão relacionada com preservação do material genético de procariotos. Assim, a célula bacteriana em fase exponencial manteria um estoque de Dps glicosilada para uma eventual situação de estresse onde, ao invés da síntese “de novo”, Dps já existente seria deglicosilada e estaria pronta para ligar ao DNA, permitindo sobrevivência para a bactéria, até que novos mecanismos de adaptação fossem induzidos, como a produção de mais Dps.

## VII – Sequências do gene *dps* e da cadeia polipeptídica de J-Dps

Entre as enterobactérias em geral, o gene *dps* apresenta uma certa identidade. No entanto, é em *Escherichia coli* e *Shigella flexnerii* que se encontra maior grau de similaridade. Em ensaios preliminares de purificação de Dps em coluna de jacalina, obtivemos resultados positivos com *S. flexnerii* (dados não mostrados). Entre as linhagens de *S. enterica*, além da UK-1 registrada em nossos resultados, LT-2 e SR-11 também apresentaram triagem de purificação positiva. Assim, frações correspondentes a Dps de *E. coli*, *S. flexnerii* e das linhagens SR-11 e LT-2 de *S. enterica* foram reconhecidas pelo anticorpo anti-J-Dps, ao passo que, entre as bactérias mais distantes filogeneticamente, a proteína análoga a Dps de *Staphylococcus aureus* (Dpr) não foi reconhecida (dados não mostrados). No entanto, os dados referentes à sequência genômica de *dps* derivam da linhagem LT-2 de *S. enterica* Typhimurium. Assim, ao seqüenciarmos o gene proveniente da linhagem UK-1 notamos modificação em apenas um nucleotídeo (figura 17), que orientaria a troca dos resíduos, de alanina para prolina, na posição 121 da cadeia polipeptídica. Ambos os aminoácidos são apolares e, de certo modo, essa modificação não aparenta estar relacionada com a glicosilação em Dps. Prolina pode estar relacionada à determinação de curvatura na molécula polipeptídica. No entanto, desconhecemos os reflexos estruturais e funcionais dessa alteração na molécula de Dps.

O mapa trípsínico de J-Dps forneceu dados que permitiram a sobreposição de 74% da sequência polipeptídica com Dps (prevista para a linhagem LT-2), não restando dúvidas de que se tratavam da mesma molécula (figuras 18 e 19). No entanto, a região onde se encontra o resíduo de aminoácido supostamente alterado não foi coberta nas análises em espectrômetro de massa. Além disso, a cobertura desses resíduos excluiu regiões da molécula onde pudesse haver alguma glicosilação. Por outro lado, esses resultados não permitiram a identificação de glicopeptídeos que pudessem comprovar a presença de uma glicana de massa residual indicada na figura 10 (449 Daltons). Se considerarmos que a reação de beta-eliminação ocorre em glicanas O-ligadas, e que os alvos característicos para tal ligação seriam os resíduos de serina ou treonina, ainda restariam 7 posições da molécula onde essa glicana poderia estar ligada.

Em uma posterior reavaliação por ESI-MS, a preparação J-Dps apresentou-se, como esperado, com o pico majoritário de 18587 Da, observado na figura 10. Além deste, foi possível observar, com menor abundância relativa, um pico de 18628 Da, que

seria o valor mais próximo do calculado para Dps da linhagem UK-1 (18611 Da), sem considerar a glicosilação. Nas análises com a proteína recombinante (FPLC-Dps), independentemente da fração analisada, o pico majoritário apresentou-se, entretanto, com 18200 Da. Esse valor não confrontou com nenhum dos valores elaborados a partir da massa calculada de Dps, mesmo sem considerar a alteração do aminoácido na posição 121. Em nossos cálculos, nós examinamos a combinação da perda de até 6 aminoácidos iniciais (STAKLV), com a presença ou não da suposta glicana. Os picos de 18587 e 18628 Da também foram observados, em proporções menores, em todas as preparações com a proteína recombinante. Os gráficos do anexo 1 (pág. 90) apresentam as massas espectrais de uma análise recente de J-Dps e da fração recombinante (FPLC-Dps).

### VIII – Pesquisa de glicopeptídeos

A técnica de “parent ion scanning” envolve a observação de íons oxônio derivados da fragmentação de glicopeptídeos nas colisões em triplo quadrupolo de um espectômetro de massa (Carr *et al.*, 1993). Os glicopeptídeos são detectados através da análise de íons precursores apresentados na faixa de relação massa/carga ( $m/z$ ) em torno de 163 (hexose), 204 (N-acetil-hexose) e 366 (hexosil-N-acetil-hexose). A técnica de “parent ion scanning” dos peptídeos tripsínicos de J-Dps detectou o íon  $m/z$  841  $[M+2H^+]$  para HexNAc e HexHexNAc (figura 20), que, então, foi submetido à fragmentação induzida por colisão [CID-MS/MS (“daughter ion scanning”)]. Em geral, glicopeptídeos podem ter sua visualização suprimida por outros íons peptídicos não glicosilados, tornando sua caracterização mais difícil e, algumas vezes, incompleta. Assim, o íon  $m/z$  841, selecionado para a fragmentação por CID-MS/MS, foi compatível com as seqüências de aminoácidos dos peptídeos tripsínicos T10 e T14. No entanto, essa fragmentação não apresentou íons “daughter” em  $m/z$  163, 204 e 366. Como não se justificou estruturalmente a detecção de íon precursor  $m/z$  841 como glicopeptídeo, sugerimos que haja um terceiro componente de íon  $m/z$  841 presente na amostra de digestão tripsínica de J-Dps que foi detectado sob as condições de “parent ion scanning” (energia de colisão = 60 eV; pressão parcial de argônio =  $3,0 \times 10^{-5}$  mTorr), mas quando esse íon foi analisado sob as condições de “daughter ion scanning”, somente T10 e T14 foram identificados.

## IX – Considerações finais

Proteínas de eucariotos que se ligam ao DNA, e exercem função de regulação da expressão gênica, foram descritas como O-glicosiladas (Berk, 1989). São vários fatores transcricionais também O-glicosilados, como proteínas da cromatina e RNA polimerase II. Na maioria dos casos, a função das cadeias glicídicas na atividade destas proteínas não foi completamente elucidada, havendo suposições de que desempenhem um papel biológico importante (Comer e Hart, 1999). Nossos resultados indicam que Dps seja o primeiro exemplo de uma glicoproteína bacteriana ligante de DNA. A ligação da Dps ao DNA, embora inespecífica, associa-se a alterações no padrão da expressão de várias proteínas, sugerindo que Dps possa exercer papel na regulação gênica. Apesar dos dados estruturais derivados de espectrometria de massas não confirmarem a presença de glicopeptídeo em J-Dps diretamente, evidências indiretas via íons oxônios, ligação a jacalina dependente de carboidrato e negatividade da coloração por PAS depois de reação de beta-eliminação corroboram para que existam formas de Dps glicosilada. Além disso, é possível que alguns procariotos tenham adquirido a capacidade de glicosilar proteínas através da transferência lateral de genes de eucariotos, o que suscita a suposição de que a linhagem de *S. enterica* estudada tenha adquirido a capacidade de glicosilar a Dps a partir da transferência de material genético de células eucarióticas hospedeiras. No entanto, investigações mais minuciosas serão necessárias para esclarecer se outros reguladores transcricionais ou proteínas bacterianas ligantes de DNA também sejam glicosilados, e para definir o verdadeiro papel desempenhado por tal glicosilação. Por fim, a glicosilação em Dps abre perspectivas no estudo de novos mecanismos de síntese de glicoproteínas em procariotos, e dos papéis eventualmente desempenhados por ela na patogenia de infecções bacterianas.

# 6

## Conclusões

- O isolamento de uma fração protéica da linhagem UK-1 de *Salmonella enterica* Typhimurium em coluna com jacalina imobilizada suscitou a hipótese de glicosilação em um de seus constituintes;
- a análise diferencial do material de *S. enterica* ligante de jacalina, feita a partir de coloração para glicoconjugados, documentou a natureza glicoprotéica do antígeno isolado;
- a interação desse ligante em extratos brutos com jacalina parece ser maior em materiais provenientes de crescimento em fase exponencial do que na fase estacionária;
- essa interação foi inibida na presença de açúcares;
- essa preparação apresentou seqüência peptídica parcial idêntica à Dps de *S. enterica*, e foi identificada como J-Dps;
- a reação de desglicosilação com TFMS reduziu a massa de J-Dps em 449 Daltons;
- manose e um segundo componente, ainda não caracterizado, foram detectados nas análises de constituição glicídica;
- a linhagem recombinante *S. enterica* pGEM-T/*dps* expressa grandes quantidades de Dps em qualquer fase de crescimento, porém, apenas uma mínima parcela foi purificada em coluna de jacalina;
- o seqüenciamento do gene *dps* da linhagem de *S. enterica* utilizada apontou uma alteração de tradução na posição 121 da cadeia polipeptídica (A→P), em relação à linhagem referência LT-2;
- o mapa tripsínico de J-Dps reforçou sua identidade com Dps, e excluiu 74% da molécula onde poderia haver glicanas associadas;
- a técnica de “parent ion scanning” apontou a presença de um íon m/z 841 para N-acetil-hexose e hexosil-N-acetil-hexose.

# 7 Resumo

Microrganismos são comumente expostos a ambientes de carência nutricional, e desenvolveram um novo sistema de resistência independente de energia, onde formam estruturas intracelulares muito organizadas, na qual moléculas de DNA são seqüestradas e estruturalmente protegidas. Esse mecanismo foi bem caracterizado em *Escherichia coli*, que produz uma proteína ligante de DNA denominada Dps (DNA binding protein from starved cells). Uma proteína de 18 kDa, purificada do antígeno bruto de *S. enterica* Typhimurium, com seqüenciamento parcial apresentando 100% de homologia com Dps, foi isolada e caracterizada por sua habilidade de ligar-se à jacalina imobilizada. Dps é uma proteína presente em altas concentrações no citosol de células bacterianas em fase estacionária de crescimento e/ou injúria oxidativa, com o intuito de manter a integridade do microrganismo através de um processo denominado de biocristalização do DNA. A fração homóloga à Dps de *S. enterica* Typhimurium (J-Dps) mostrou afinidade e especificidade de ligação à jacalina em ensaios lectino-enzimáticos, e essa interação foi inibida por alfa-metil-galactose, indicando que o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) esteja envolvido nesse processo. Análises de espectrometria de massa (ESI-MS) reforçaram a idéia de que a fração purificada seja glicosilada e que contenha manose como um dos constituintes de sua glicana. Além disso, a busca de um glicopeptídeo de digestão tripsínica de J-Dps, por “parent ion scanning”, revelou um íon m/z 841 que foi objeto de investigação, mas não produziu resultados conclusivos. Ressalta-se que a glicosilação em Dps nunca fora descrita anteriormente, e a descrição da presença de cadeias glicídicas ligadas à Dps abre novas perspectivas ao estudo de glicoproteínas bacterianas.

# 8 Summary

## **Evidence for glycosylation on a DNA-binding protein of a strain of *Salmonella enterica*.**

All organisms living in aerobic atmosphere have powerful mechanisms to protect macromolecules from oxygen reactive specimens. Thus, microorganisms developed biomolecule-protecting systems in response to starvation and/or oxidative stress. DNA biocrystallisation with Dps (DNA-binding protein from starved cells) is one example among these systems. Dps is a protein produced in large amounts when bacterial cell faces harm. An 18 kDa protein was purified from the crude extract of *Salmonella enterica* Typhimurium and characterised for its jacalin-binding property. N-terminal sequencing revealed 100% homology with the Dps of *Salmonella enterica* Typhimurium. Furthermore, alpha-methyl-galactose inhibited the binding of Dps to jacalin in enzyme-linked lectin assay, suggesting that the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) is involved in this interaction. Chemical deglycosylation with TFMS reduced the molecular mass slightly from 18587 to 18138 Daltons (449 Daltons), indicating that a small oligosaccharide branch must be associated with its molecule. Results from GC-MS showed that mannose is one possible constituent of the Dps glycan. Even though jacalin is known as a galactoside-binding lectin, there are some pieces of evidence that it might bind mannose as well. Finally, the search of glycopeptides from tripsinic digestion of J-Dps by parent ion scanning revealed an ion  $m/z$  841. However, its characterization did not produce conclusive results. Further investigations are needed so that the structure and function of the Dps glycan(s) might be assessed.

Ebert Seixas Hanna

E-mail: itahanna@usp.br



# 9

## **Referências Bibliográficas**

- AHMED, H. & CHATTERJEE, B. P. (1989). Further characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*). *J. Biol. Chem.* 264(16): 9365-9372.
- ALMIRÓN, M.; LINK, A. J.; FURLONG, D.; KOLTER, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Gen. Develop.* 6: 2646-2654.
- ALTUVIA, S.; ALMIRÓN, M.; HUISMAN, G.; KOLTER, R.; STORZ, G. (1994). The *dps* promoter is activated by *OxyR* during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol. Microbiol.* 13(2): 265-272.
- AMORIM, C. R.; MATSUURA, M. S.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; LEITE, D. S.; YANO, T. (2000). Purification and characterization of the fimbria F18ac (2134P) isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vet. Microbiol.* 76(1): 41-9.
- AZAM, T. A.; IWATA, A.; NISHIMURA, A.; UEDA, S.; ISHIHAMA, A. (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181(20): 6361-70.
- BENZ, I. & SCHIMIDT, M. A. (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57(5): 1506-11.
- BENZ, I. & SCHIMIDT, M. A. (2001). Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesion. *Mol. Microbiol.* 40: 1403-13.
- BENZ, I.; SCHIMIDT, M. A. (2002). Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 45(2): 267-276.
- BERK, A. J. (1989). Regulation of eukaryotic transcription factors by post-translational modification. *Biochim. Biophys. Acta.* 1009(2):103-9.
- BODDICKER, J. D.; LEDEBOER, N. A.; JAGNOW, J.; JONES, B. D.; CLEGG, S. (2002). Differential binding to and biofilm formation on, HEP-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. *Mol. Microbiol.* 45(5): 1255-65.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8: 93-99.
- BOURNE, Y.; ASTOUL, C. H.; ZAMBONI, V.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P. (2002). Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. *Biochem. J.* 364: 173-180.

- BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. (2001). *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38(7): 2465-67.
- BROCCHI, M.; SPERANDIO, V.; SILVEIRA, W.D. (1998). Mecanismos moleculares de patogenicidade em *Salmonella sp.* Em: *Série Monografias – Sociedade Brasileira de Genética.* 8: 5-35.
- BRÖCKL, G.; BEHR, M.; FABRY, S.; HENSEL, R.; KAUDEWITZ, H.; BIENDL, E.; KÖNIG, H. (1991). Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermobacter ferredoxinus* and *Methanothermobacter sociabilis*. *Eur.J. Biochem.* 199: 147-152.
- CARDOSO, M. L. G. (2000). Paracoccina: lectina de *Paracoccidioides brasiliensis*, ligante de N-acetil-glicosamina interage com componente da matriz celular. Tese de Doutorado apresentada à FMRP-USP. Pgs. 83-85.
- CARR, S. A.; HUDDLESTON, M. J.; BEAN, M. F. (1993). Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci.* 2: 183-96.
- COLTRI, K. C. (2002). Imunoestimulação pela lectina KM+: efeito sobre o curso da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de Mestrado apresentada à FMRP-USP. Pgs. 23-24.
- COMER, F. I. & HART, G. W. (1999). O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1473: 161-171.
- CORBEAU, P.; PASQUALI, J. L.; DEVAUX, C. (1995). Jacalin, a lectin interacting with O-linked sugars and mediating protection of CD4+ cells against HIV-1, binds to the external envelope glycoprotein gp120. *Immunol. Lett.* 47(1-2): 141-3.
- CHUNG, T. W.; KIM, K. S.; KIM, C. H. (2003). Reduction of the Gal-alpha1,3-Gal epitope of mouse endothelial cells by transfection with the N-acetylglucosaminyltransferase III gene. *Mol. Cells.* 16(3):368-76.
- DARWIN, K. H. & MILLER, V. L. (1999). Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(3): 405-28.
- DIAS-BARUFFI, M.; SAKAMOTO, M.; ROSSETTO, S.; VOZARI-HAMPE, M. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. (2000). Neutrophil migration and aggregation induced by euphorbin, a lectin from the latex of *Euphorbia milii*, var. *milii*. *Inflamm. Res.* 49(12):732-6.
- DO, S. I.; LEE, K.Y. (1998). Jacalin interacts with Asn-linked glycopeptides containing multi-antennary oligosaccharide structure with terminal alpha-linked galactose. *FEBS Lett.* 421(2): 169-73.

- DOBOS, K. M.; KHOO, K. ; SWIDEREK, K. M.; BRENNAN, P. J.; BELISLE, J. T. (1996). Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 178(9): 2498-2506.
- DOYLE, R. J. (1994). Introduction to lectins and their interactions with microorganisms. Em: *Lectin-microorganisms interaction*. Editora. Doyle & Slifkin, Marcel Dekker, Inc. pgs. 1-65.
- FASMAN, G. D. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33(3): 151-208.
- FORTUNATO, A. S. C. (2000). Avaliação da identidade imunológica entre componentes protéicos da fração lectínica de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de Mestrado apresentada à FMRP-USP. Pgs. 43-44.
- FORTUNATO, A. S. C. (2004). Efeito da paracoccina sobre macrófagos: um possível mecanismo de supressão da imunidade mediada por células na paracoccidioidomicose. Tese de Doutorado apresentada à FMRP-USP. Pgs. 33-34.
- FREESTONE, P.; GRANT, S.; TRINEI, M.; ONODA, T.; NORRIS, V. (1998). Protein phosphorylation in *Escherichia coli* L. form NC-7. *Microbiol.* 144: 3289-3295.
- FRENKIEL-KRISPIN, D.; LEVIN-ZAIDMAN, S.; SHIMONI, E.; WOLF, S. G.; WACHTEL, E. J.; ARAD, T.; FINKEL, S. E.; KOLTER, R.; MINSKY, A. (2001). Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection. *EMBO J.* 20(5): 1184-1191.
- FRENKIEL-KRISPIN, D. & MINSKY, A. (2002). Biocrystallization: a last-resort strategy in bacteria. *ASM News.* 68(6): 277-83.
- GIANNASCA, K. T.; GIANNASCA, P. J.; NEUTRA M. R. (1996). Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 cells: Identification of a glycoconjugate receptor. *Inf. Immun.* 64(1): 135-145.
- GIL-SERRANO, A. M.; RODRI, M. A. *et al.* (1999). Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biochem. J.* 342: 527-35.
- GRANT, R. A.; FILMAN, D. J.; FILKEL, S. E.; KOLTER, R.; HOGLE, J. M. (1998). The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Biol.* 5(4): 294:303.

- HALSEY, T. A.; VAZQUEZ-TORRES, A.; GRAVDAHL, D. J.; FANG, F. C.; LIBBY, S. J. (2004). The Ferritin-Like Dps Protein Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Oxidative Stress Resistance and Virulence. *Infect. Immun.* 72(2): 1155–1158.
- HAMADEH, R. M.; ESTABROOK, M.M.; AHO, P.; JARVIS, G. A.; GRIFFISS, J. M. (1995). Anti-Gal binds to pili of *Neisseria meningitidis*: the immunoglobulin A isotype blocks complement-mediated killing. *Infect.Immun.* 63: 4900-4906.
- HARTMANN, E.; KÖNIG, H. (1989). Uridine and dolichol phosphate activated oligosaccharides are intermediates in biosynthesis of the S-layer glycoprotein of *Methanothermus fervidus*. *Arch. Microbiol.* 151: 274-281.
- HICKS, W. M.; KOTLAJICH, M. V.; VISICK, J. E. (2005). Recovery from long-term stationary phase and stress survival in *Escherichia coli* require the L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase at alkaline pH. *Microbiology.* 151(Pt 7):2151-8.
- IVANOVA, A. B.; GLINSKY, G. V.; EISENSTARK, A. (1997). Role of *rpoS* regulon in resistance to oxidative stress and near-UV radiation in  $\Delta$ oxyR suppressor mutants of *Escherichia coli*. *Free Rad. Biol. Med.* 23(4): 627-636.
- IYER, S. P. N. & HART, G. W. (2003). Dynamic Nuclear and Cytoplasmic Glycosylation: Enzymes of O-GlcNAc Cycling. *Biochem.* 42(9): 2493-9.
- JAISON, P. L.; KANNAN, V. M.; GEETHA, M.; APPUKUTTAN, P. S. (1993). Epitopes recognised by serum anti- $\alpha$ -galactoside antibody are present on brain glycoproteins in man. *J. Biosci.* 18: 187-93.
- JOHANSEN, K.; GRANQVIST, L.; KARLEN, K.; STINTZING, G.; UHNOO, I.; SVENSSON, L. (1994). Serum IgA immune response to individual rotavirus polypeptides in young children with rotavirus infection. *Arch. Virol.* 138(3-4):247-59.
- JOHNES, B. D. (2005). *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J. Microbiol.* 43(S): 110-7.
- KOBATA, A. & FURUKAWA, K. (1992). Methods of carbohydrate analysis and structural determination: chemical and enzymatic methods. Em: Glycoconjugates: composition, structure and function – Howard J. Allen & Edward C. Kisailus. Marcel Dekker, Inc. New York – USA. 3: 33-69.
- KOMA, M.; MIYAGAWA, S.; HONKE, K.; IKEDA, Y.; KOYOTA, S.; MIYOSHI, S.; MATSUDA, H.; TSUJI, S.; SHIRAKURA, R.; TANIGUCHI, N. (2000). Reduction of the major xenoantigen on glycosphingolipids of swine endothelial cells by various glycosyltransferases. *Glycobiol.* 10(7):745-51.

- KUO, C.; TAKAHASHI, N.; SWANSON, A. F.; OZEKI, Y.; HAKOMORI, S. (1996). An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J. Clin. Invest.* 98(12): 2813-8.
- LECHNER, J.; WIELAND, F. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu.Rev.Biochem.* 58: 173-194.
- LINDENTHAL, C. & ELSINGHORST, E. A. (1999). Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67(8) :4084-91.
- LINDENTHAL, C. & ELSINGHORST, E. A. (2001). Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect. Immun.* 69(1): 52-7.
- LIS, H.; SHARON, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98: 637-674.
- LIS, H.; SHARON, N. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14(11): 53R-62R.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.V.; FARR, R.V.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- MARTINEZ, A.; KOLTER, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* 179(16): 5188-5194.
- McBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. (2000). Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Infect Immun.* 68(1): 13-8.
- McCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E. *et al.* (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* Oct 25;413(6858): 852-6.
- MESCHER, M.F.; STROMINGER, J.L. (1976). Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *J.Biol.Chem.* Apr. 10;251(7): 2005-14.
- MESSNER, P.; BOCK, K.; CHRISTIAN, R.; SCHULZ, G.; SLEYTR, U. B. (1990). Characterization of the surface layer glycoprotein of *Clostridium symbiosum*. *J.Bacteriol.* 172: 2576-2583.
- MESSNER, P. (1997). Bacterial glycoproteins. *Glycoconj. J.* 14(1): 3-11.
- MESSNER, P. (2004). Prokaryotic Glycoproteins: Unexplored but Important. *J. Bacteriol.* 186(9): 2517-19.

- MIRONOVA, R.; NIWA, T.; HAYASHI, H.; DIMITROVA, R.; IVANOV, I. (2001). Evidence for non-enzymatic glycosylation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39(4):1061-8.
- MIRONOVA, R.; NIWA, T.; DIMITROVA, R.; BOYANOVA, M.; IVANOV, I. (2003). Glycation and post-translational processing of human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278(51): 51068-74.
- MOENS, S.; VANDERLEYDEN, J. (1997). Glycoproteins in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 168: 169-175.
- MUTHUKUMAR, G.; NICKERSON, K. W. (1987). The glycoprotein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* indicates a lectin-like receptor in the larval mosquito gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2650-2655.
- OHL, M. E. & MILLER, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* 52: 259-74.
- OLSEN, O.; THOMSEN, K. K. (1991). Improvement of bacterial  $\beta$ -glucanase thermostability by glycosylation. *J. Gen. Microbiol.* 137: 579-585.
- PETERS, J.; RUDOLF, S.; OSCHKINAT, H.; MENGELE, R.; SUMPER, M.; KELLERMANN, J.; LOTTSPREICH, F.; BAUMEISTER, W. (1992). Evidence for tyrosine linked glycosaminoglycan in a bacterial surface protein. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 373: 171-176.
- PEUMANS, W. J. e VAN DAMME, E. J. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109(2): 347-52.
- PEVZNER, I. B.; AGAPOV, I. I. *et al.* (2004). Differences in amino acid sequences of mistletoe lectin I and III B-subunits determining carbohydrate binding specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1675(1-3): 155-64.
- PLUMMER, T. H. Jr.; TARENTINO, A. L.; HAUER, C. R. (1995). Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. *J. Biol. Chem.* 270(22): 13192-13196.
- RADEMAKER, G.J.; PERGANTIS, S.A.; BLOK-TIP, L.; LANGRIDGE, J.I.; KLEEN, A.; THOMAS-OATES, JE. (1998). Mass spectrometric determination of the sites of O-glycan attachment with low picomolar sensitivity. *Anal. Biochem.* 257(2): 149-60.
- REN, B.; TIBBELIN, G.; KAJINO, T.; ASAMI, O.; LADENSTEIN, R. (2003). The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center. *J. Mol. Biol.* 329: 467-77.
- ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAMPOS-NETO, A. (1985). Jacalin: an IgA-binding lectin. *J. Immunol.* 134(3): 1740-43.

- ROSE, M. C.; VOTER, W. A.; SAGE, H.; BROWN, C. F.; KAUFMAN, B. (1984). Effects of deglycosylation on the architecture of ovine submaxillary mucin glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 259: 3167-3172.
- SANDERCOCK, L. E.; MACLEOD, A. M.; ONG, E.; WARREN, R. A. (1994). Non-S-layer glycoproteins in eubacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 118(1-2): 1-7.
- SASTRY, M. V.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, M. J.; SWARNALATHA, G.V.; SUROLIA, A. (1986). Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen [ $\beta$ -D-Gal(1-3)D-GalNAc]. *J. Biol. Chem.* 261(25): 11726-33.
- SCHAFFER, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P. (2001). Prokaryotic glycosylation. *Proteomics.* 1(2):248-61.
- SCHAFFER, C. & MESSNER, P. (2004). Surface-layer glycoproteins: an example for the diversity of bacterial glycosylation with promising impacts on nanobiotechnology. *Glicobiol.* 14(8):31R-42R.
- SCHIRM, M.; SOO, E. C.; AUBRY, A. J.; AUSTIN, J.; THIBAUT, P.; LOGAN, S. M. (2003). Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 48(6): 1579-92.
- SEARS, P. & WONG, C. (2001). Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science* 291: 2344-50.
- SMITH, H.; COLE, J. A.; PARSONS, N. J. (1992). The sialylation of gonococcal lipopolysaccharide by host factors: a major impact on pathogenicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 287-292.
- SMITH, H.; PARSONS, N. J.; COLE, J. A. (1995). Sialylation of neisserial lipopolysaccharide: a major influence on pathogenicity. *Microb. Pathog.* 19(6):365-77.
- SPECTOR, M. P. (1998). The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. *Adv. Microb. Physiol.* 40: 233-279.
- STEPHANI, K.; WEICHART, D. & HENGGE, R. (2003). Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2003. 49(6):1605-14.
- STILLMARK, H. (1888). Über Ricin, ein giftiges ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und. Einigen anderen Euphorbiaceae. *Inaug. Diss.* Dorpat.
- STIMSON, E.; VIRJI, M. *et al.* (1995). Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol. Microbiol.* 17: 1201-1214.

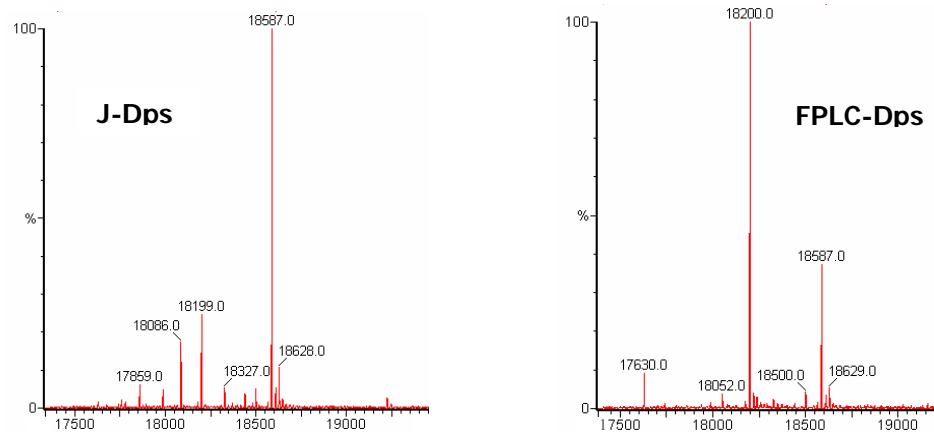


- SUHR, M.; BENZ, I.; SCHIMIDT, M. A. (1996). Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA<sub>c</sub> and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* 22(1): 31-42.
- SUMPER, M. (1987). Halobacterial glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 906(1) :69-79.
- SWANSON, A. F. & KUO, C. (1990). Identification of lectin-binding proteins in *Chlamydia species*. *Infect Immun.* 58(2): 502-7.
- SWANSON, A. F. & KUO, C. (1994). Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 62(1): 24-8.
- SZYMANSKI, C. M.; YAO, R.; EWING, C. P.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol.* 32(5):1022-30.
- SZYMANSKI, C. M. & WREN, B. W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 225-37.
- THIBAUT, P.; LOGAN, S. M. *et al.* (2001). Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem.* 276(37): 34862-70.
- TOMOEDA, M.; INUZUKA, M.; DATE, T. (1975). Bacterial sex pili. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 30(1): 23-56.
- TSAI, C-H.; FRASCH, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolisaccharides in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.
- UPRETI, R. J.; KUMAR, M.; SHANKAR, V. (2003). Bacterial glycoproteins: Functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* 3: 363-379.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R. *et al.* (1999). Protein-Glycan interactions. Em: Essentials of Glycobiology. The Consortium of Glycobiology Editors – Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York – USA. 4: 41-56.
- VIRJI, M. (1997). Post-translational modifications of meningococcal pili. Identification of common substituents: glycans and  $\alpha$ -glycerophosphate – a review. *Gene* 192: 141-147.
- WACKER, M.; LINTON, D. *et al.* (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science.* 298(5599): 1790-3.
- WALLIS, T.S.; GALYOV, E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* 36(5): 997-1005.

- WOLF, S. G.; FRENKIEL, D.; ARAD, T.; FINKEL, S. E.; KOLTER, R.; MINSKY, A. (1999). DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature*. 400: 83-85.
- YOUNG, M. N.; BRISSON, J. *et al.* (2002). Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 277(45): 42530-9.
- ZHU, B. C.; DRAKE, R. R.; SCHWEINGRUBER, H.; LAINE, R. A. (1995). Inhibition of glycosylation by amphomycin and sugar nucleotide analogs PP36 and PP55 indicates that *Haloferax volcanii* beta-glucosylates both glycoproteins and glycolipids through lipid-linked sugar intermediates: evidence for three novel glycoproteins and a novel sulfated dihexosyl-archaeol glycolipid. *Arch. Biochem. Biophys.* 319(2) :355-64.

**10**

**Material anexo**



**Anexo 1. Espectros de massa de J-Dps e Dps recombinante .** J-Dps e Dps recombinante purificada (FPLC-Dps) foram submetidos ao espectômetro de massa. Os picos dos peptídeos representam as massas moleculares médias das espécies multiplamente carregadas, determinadas após desconvolução de massa (*mass deconvolution*).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)