



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**RESISTÊNCIA A COBRE EM *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.
ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE
GENES E PROTEÍNAS**

Elaine Cristina Teixeira

ARARAQUARA

2006

ELAINE CRISTINA TEIXEIRA

**RESISTÊNCIA A COBRE EM *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. ESTUDOS
DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE GENES E PROTEÍNAS**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

ARARAQUARA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

T266r Teixeira, Elaine Cristina
Resistência a cobre em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. : estudos de
caracterização molecular e bioquímica de genes e proteínas / Elaine Cristina
Teixeira. -- Araraquara : [s.n], 2006
167 f. il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Célia Bertolini

1. Biologia molecular. 2. Cancro cítrico. 3. Genes de resistência à cobre.
I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de
Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dados curriculares

Elaine Cristina Teixeira

1. Dados pessoais

Nascimento: 21 de abril de 1978

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: Porto Ferreira - SP

Estado civil: solteira

Filiação: Luiz Carlos Furlan Teixeira

Marlene Mercedes Silva Teixeira

Profissão: Química

Documento de Identidade: 28.244.838-X

Cadastro de Pessoa Física: 269.616.188-71

Endereço: Rua dos Guaianases, 174 – Jd. N. Sra. Fátima

CEP: 13607-081 – Araras, SP

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n

CEP: 14800-900 – Araraquara, SP

2. Formação acadêmica

Doutorado Direto em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, concluído em 28 de abril de 2006, Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

Bacharel em Química Tecnológica, concluído em 08 de dezembro de 1999, Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

3. Atividades de pesquisa

3.1. Trabalhos apresentados em congressos internacionais

Teixeira, E.C.; Oliveira, J.C.F.; Bertolini, M.C. Functional analysis of the *copA* gene from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by gene knock-out. XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Mérida, México, 2005.

3.2. Trabalhos apresentados em congressos nacionais

Teixeira, E.C.; Hojo, O. Estudo da Produção de Penicilina G-acilase em meio contendo soro de Leite. XI Congresso de Iniciação Científica - Área de Ciências Exatas, Araraquara-SP, 1999.

Teixeira, E.C.; Novo, M.T.M.; Bertolini, M.C. Cloning of copper resistance genes from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and preliminary studies of their role in the copper resistance mechanism. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 2002.

Teixeira, E.C.; Bertolini, M.C. Recombinant copper resistance proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Production in *E. coli* and purification. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 2003.

Teixeira, E.C.; Oliveira, J.C.F.; Bertolini, M.C. Functional analysis of the copper resistance *copA* gene from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by gene knock-out. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 2004.

Teixeira, E.C.; Oliveira, J.C.F.; Bertolini, M.C. Functional analysis of the copper resistance *copA* gene from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by gene knock-out. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP, 2005.

Teixeira, E.C.; Assis, P.A.; Farah, S.C.; Bertolini, M.C. Protein-protein interactions identified for the copper resistance proteins CopA, CopB and CutC from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP, 2005.

3.3. Publicações

da SILVA, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, n.6887, p.459-463, May. 2002.

Hilario, E.; Teixeira, E. C.; Pedroso, G. A.; Bertolini, M. C., Medrano, F. J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of XAC1151, a small heat shock protein from *Xanthomonas axonopodis* p. citri, belonging to the α -crystallin family. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v.62, n. 5, p.446-448, Apr. 2006.

Teixeira, E.C.; Novo, M.T.M.; Oliveira, J.C.F.; Bertolini, M.C. The copper resistance genes *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. Involvement of CopA protein in the

mechanism of copper resistance. Manuscrito em fase final de preparação, a ser submetido a Molecular Microbiology.

3.4. Participação em congressos

XI Congresso de Iniciação Científica - Área de Ciências Exatas, ano de 1999.

XXXI a XXXIV Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, anos de 2002 a 2005.

XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, ano de 2005.

Dedico este trabalho a Deus, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, segurando em minhas mãos com seu infinito amor e, principalmente, pelo Dom da Vida!

Aos meus Pais Luiz Carlos e Marlene, por todo apoio, incentivo, força, ensinamentos, diálogo, por estarem sempre presentes e pelo imenso amor a mim transmitidos. Meu muito obrigada!

Ao Márcio, por fazer parte da minha vida, por estar sempre por perto, me apoiando, me incentivando, me inspirando, sempre me ouvindo, pelas nossas conversas, pelo colo, pela paciência e por todo amor!

A toda minha família, por todo apoio e incentivo!

Amo vocês!!!

Agradecimentos

É difícil descrever, em palavras, os sentimentos ao finalizar a tese de doutorado, o qual foi um processo de amadurecimento pessoal, profissional e acadêmico. Em meio a muitas sensações vivenciadas nesta fase está a certeza da conquista de mais um ideal, o qual só foi possível com muita determinação, perseverança e apoio de muitas pessoas importantes, sem as quais este trabalho não seria concluído.

Desta forma, gostaria de deixar aqui os meus mais sinceros agradecimentos, em especial, a minha orientadora, Prof. Dr. Maria Célia Bertolini, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, conselhos, pelas valiosas discussões, sugestões, pela amizade e pela sua preocupação em formar profissionais capacitados e éticos.

Ao Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira, Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, pela oportunidade de trabalharmos em colaboração, pelo espaço cedido para os estudos em mudas de limão cravo e de laranja, pela amizade, por compartilhar seu conhecimento, pelas discussões e sugestões ao longo do trabalho e no Exame Geral de Qualificação.

A Prof. Dr. Maria Inês T. Ferro, Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, pelo espaço cedido em seu laboratório para os estudos funcionais em planta.

A Prof. Dr. Maria Teresa Marques Novo, pela amizade, pelas nossas conversas, por sempre me ouvir, pelos preciosos conselhos, pelo ombro amigo, pela agradável convivência, não só na época do Projeto Genoma em que trabalhávamos juntas, mas até hoje. Agradeço também por estar presente durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof. Dr. Maria José M. S. Giannini, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, por permitir o uso do biotério para a produção de anticorpos e à Rosângela e Elaine por ajudar com as sangrias dos coelhos.

A Prof. Dr. Leila Maria Beltramini e a Andressa, Instituto de Física, USP, São Carlos pela colaboração neste trabalho com as análises de CD e fluorescência.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah por ceder a linhagem de levedura, plasmídeos e a biblioteca de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* para a realização do ensaio de duplo híbrido de leveduras e por toda atenção.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, em especial o Prof. Dr. José Roberto Ernandes pela participação no Exame Geral de Qualificação e pelas sugestões.

A toda minha família por todo amor, carinho e incentivo.

A Sr. Claudinet, Sra. Maria Inês, Marcelo e Rosângela e a toda família do Márcio que também me apoiaram e incentivaram muito.

As minhas amigas Carla e Margareth pelos anos de convivência, pelas conversas, por estarem sempre por perto nas horas alegres e também naquelas em que sempre precisamos de um ombro amigo. Pelos “puxões” de orelha que nos fazem crescer e até recolocar os pés no chão. Pelas risadas e também por chorarmos juntas, pela confiança, enfim, por serem minhas amigas. Obrigada por vocês fazerem parte da minha vida. Grande Marga, obrigada também por toda ajuda no laboratório, na correria diária!

Aos amigos Ana Paula Felício, Eduardo Hilário, Fernanda Zanolli, Renato Magalhães de Paula e Rosana Inácio dos Reis e pela amizade, discussões, ensinamentos, pelos bons momentos que passamos juntos, pela ótima convivência. Vocês são muito especiais.

A Patrícia Aparecida de Assis, sempre disposta a me ajudar, pela vontade de aprender, pela amizade, pela sua valiosa ajuda, principalmente no final da Tese.

Ao pessoal do laboratório, Juliana, Luiz Carlos, Flávia, Gisele e ao Messias e ao Rodrigo que estão ingressando agora, pela amizade, conversas e bons momentos.

Ao pessoal que passou pelo laboratório, em especial, ao Rômulo, Sandra Cruz, Luciano Apponi, Alessandra Jim, Patrícia Maida, Mary Helen, Mônica, Evelyn, Keyte, Viviane, Marcelo e Denis.

Ao Tarcísio, Fátima, Waldenir, Fernando e Zilda por toda ajuda, amizade e convivência.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, UNESP, Jaboticabal, Agda, Flávia, Juliana Vantini, Juliana Dezajacomo, Júlio Bortolossi, Thiago, Rafael Homem, Rafael Marini, Gustavo, Marcelo Laia, Joice, Letícia, Daniele e Cristiano.

Aos amigos Ana Maria Veronezi, Patrícia Suegama, Patrícia Carneiro, Sergio, Victor, Neto, Renata, Willian, Saulo e Helen por todo o carinho.

As funcionárias da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação.

A todos os funcionários do Instituto de Química.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigada!

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver caridade, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, não sou nada. Ainda que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver caridade, de nada valeria! A caridade é paciente, a caridade é bondosa. Não tem inveja. A caridade não é orgulhosa. Não é arrogante. Nem escandalosa. Não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. A nossa ciência é parcial, a nossa profecia é imperfeita. Quando chegar o que é perfeito, o imperfeito desaparecerá. Quando eu era criança, falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Desde que me tornei homem, eliminei as coisas de criança. Hoje vemos como por um espelho, confusamente; mas então veremos face a face. Hoje conheço em parte; mas então conhecerei totalmente, como eu sou conhecido. Por ora subsistem a fé, a esperança e a caridade - as três. Porém, a maior delas é a caridade.”

1COR, 13, 1-13

Resumo

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) é a bactéria responsável pelo cancro cítrico no Brasil e em todo o mundo. Esta doença provoca lesões salientes nas folhas, frutos e ramos e, conseqüentemente, a queda dos frutos, folhas e da produção de culturas de citros. Tendo em vista os prejuízos econômicos causados por *Xac* em culturas de citros, a conclusão do sequenciamento do seu genoma representou uma contribuição em potencial para a agricultura de vários países, entre eles o Brasil, pois possibilitará um grande avanço no conhecimento do microrganismo e das interações moleculares com o hospedeiro.

Como conseqüência da participação do nosso laboratório no sequenciamento e anotação do genoma da bactéria *Xac*, estudos funcionais com esta bactéria foram iniciados. Iniciamos os estudos de caracterização dos genes potencialmente envolvidos na resistência a cobre (*copA*, *copB* e *cutC*) em *Xac*, uma vez que a aplicação de compostos à base de cobre ainda constitui o principal recurso para o controle da doença no campo.

O presente trabalho teve como principal objetivo realizar estudos funcionais na bactéria *Xac*, estudando o possível envolvimento dos genes *copA*, *copB* e *cutC* no mecanismo de resistência a cobre nesta bactéria. Estes estudos funcionais envolveram: análise da expressão dos genes durante o crescimento na presença de cobre por *Northern* e *Western blots* e por eletroforese bi-dimensional, produção e purificação das proteínas recombinantes e produção de anticorpos, inativação de um dos genes (*copA*) para avaliar a participação da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre e análise da interação das proteínas de resistência a cobre com outras proteínas de *Xac* através do ensaio de duplo híbrido de leveduras.

Através da análise por *Northern* foi possível verificar que os genes *copA* e *copB* estão organizados em um operon e sua transcrição foi induzida na presença de cobre, sendo específica deste metal. A presença do transcrito do gene *cutC* não foi detectada em células crescidas na ausência e na presença de cobre. Os experimentos de expressão protéica confirmaram os resultados obtidos por *Northern blot*, onde foram detectados baixos níveis das proteínas CopA e CopB antes da adição de cobre e níveis aumentados após exposição das células ao cobre. Através de eletroforese bidimensional, algumas proteínas foram diferencialmente expressas nas células de *Xac* crescidas na presença do metal. A identificação dessas proteínas será feita por espectrometria de massas.

As proteínas CopA, CopB e CutC foram produzidas na forma recombinante e estudos preliminares de caracterização estrutural através de dicroísmo circular (CD) foram realizados.

Para avaliarmos o papel da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre, uma linhagem da bactéria contendo o gene inativado pela inserção de um transposon foi construída. Células desta linhagem não foram capazes de crescer *in vitro* na presença de cobre mesmo em concentrações de cobre muito baixas. A capacidade das células desta linhagem de induzir os sintomas típicos do cancro cítrico foi avaliada em folhas de limão cravo e laranja. Os resultados obtidos mostraram que a linhagem mutante infecta a planta, mas os sintomas são mais retardados na presença do metal, quando comparada à linhagem selvagem. O crescimento das células mutantes na ausência e presença de cobre *in planta* indicou maior sensibilidade ao cobre pelas células mutantes. Na tentativa de verificar se as proteínas CopA, CopB e CutC interagem com outras proteínas de *Xac*, um ensaio de duplo híbrido de leveduras foi realizado. Através deste ensaio, algumas proteínas foram identificadas, as quais necessitam de estudos de caracterização adicionais.

Abstract

Xanthomonas axonopodis pv. citri (*Xac*) is the causal agent of the citrus canker, a serious disease that affects the most commercial citrus cultivars causing serious economic impacts. Symptoms include canker lesions, leading to abscission of fruit and leaves and general tree decline. By sequencing the genome of this bacterium (ONSA Network, FAPESP, Brazil), a better knowledge of this microorganism and its molecular interactions with the host might be elucidated.

After sequencing the genome of *Xac*, genes encoding proteins related to copper resistance (*copA*, *copB*, *cutC*) were identified and the involvement of the proteins in the copper resistance mechanism in *Xac* has been investigated. Copper compounds have been used to control plant bacterial diseases and the effectiveness of the process has been reduced by the appearance of copper resistant bacterial strains. For this, we analyzed the gene expression during growth in the presence of copper by Northern and Western blots, 2D-electrophoresis, production and purification of the CopA, CopB, and CutC recombinant proteins, inactivation of the *copA* gene to evaluate the participation of CopA protein in the copper resistance mechanism, and protein-protein interactions assays by the yeast two-hybrid assay.

Northern blot analysis showed that the *copA*, and *copB* genes was organized in an operon, and that gene transcription was induced in the presence of copper and was specific to copper. The presence of *cutC* transcript wasn't detected in cells growing neither in the absence nor in the presence of copper. Protein expression experiments confirmed the gene transcription results; the levels of CopA and CopB proteins were very low before copper addition, and the proteins were strongly induced in the presence of copper. Some proteins were differentially expressed in cells grown in the presence of copper, as analyzed by 2D-electrophoresis. These proteins will be identified by mass spectrometry. The CopA, CopB, and CutC recombinant proteins were produced and preliminary structural assays by circular dichroism (CD) were performed.

In order to evaluate the role of CopA protein in the copper resistance mechanism, a strain carrying the inactivated gene by transposon insertion was constructed. Cells from this strain weren't able to grow in the presence of copper *in vitro* even at low copper concentrations. The ability of this strain to induce the typical canker symptoms was evaluated on lemon or orange leaves. Results showed that the mutant strain infects the plant, but the lesions formation was retarded in the presence of copper. The mutant strain showed more sensitivity to copper than the wild type strain during growth *in planta*. In order to verify whether the CopA, CopB, and CutC proteins interact with other

proteins of *Xac*, a yeast two-hybrid assay was performed. By this assay, some proteins were identified, which need further characterizations.

Lista de Abreviaturas

2D-PAGE, eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida contendo SDS
3-AT, 3-aminotriazol
BCIP, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fostato
BSA, soroalbumina bovina
CD, dicroísmo circular
C-terminal, região carboxi-terminal da proteína
D.O., densidade óptica
DEPC, dietil pirocarbonato
DNA, ácido desoxiribonucleico
dNTPs, desoxiribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DTT, ditioneitol
EDTA, ácido etilendiaminotetracético
GST, glutationa S-transferase
IPTG, isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kb, kilobase
kDa, kilodalton
M, molar
mg, miligramas
mL, mililitros
mM, milimolar
MOPS, ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NBT, "nitro blue tetrasolium"
nm, nanômetros
N-terminal, região amino terminal da proteína
ORF, "Open Reading Frame"
pb, pares de bases
PBS, salina tamponada com fosfato
PCR, "Polimerase Chain Reaction"
PM, peso molecular
PMSF, fluoreto de fenilmetilsulfonil
rDNA, DNA que codifica o RNA ribossômico
RNA, ácido ribonucleico
RNase, ribonuclease pancreática A
rpm, rotações por minuto
rRNA, RNA ribossômico

SDS, dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TAE, tampão Tris-acetato-EDTA

TEMED, tetrametiletilenodiamina

Tris, hidroximetilaminometano

X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

$\Delta copA$, linhagem de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri contendo o gene *copA* inativado

ϵ , coeficiente de extinção molar

μFa , micro Faraday

μg , microgramas

μL , microlitros

Sumário

Introdução	22
I. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri e ação fitopatogênica	22
II. Mecanismos de resistência a cobre nos diferentes organismos	25
III. Genes relacionados à resistência a cobre em <i>Xac</i>	40
Objetivos	43
Materiais e Métodos	45
I. Linhagens de <i>Xac</i> e manutenção	45
II. Amplificação dos genes <i>copA</i> , <i>copB</i> e <i>cutC</i>	45
III. Avaliação do crescimento e análise da expressão dos genes e das proteínas na presença de cobre	46
III.1. Influência da concentração de cobre no crescimento de <i>Xac</i>	47
III.2. Análise da expressão gênica por RT-PCR e por <i>Northern blot</i>	47
III.2.1. Extração e análise de RNA total	48
III.2.2. Ensaio de RT-PCR	48
III.2.3. Ensaio de <i>Northern blot</i>	50
III.2.4. Preparo e purificação das sondas radioativas	51
III.3. Análise da expressão protéica por <i>Western blot</i>	51
III.3.1. Extração das proteínas totais de <i>Xac</i>	51
III.3.2. Ensaio de <i>Western blot</i>	51
III.4. Análise das proteínas diferencialmente expressas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	52
III.4.1. Extração e preparação das proteínas totais	52
III.4.2. Ensaio de 2D-PAGE	53
IV. Produção das proteínas CopA, CopB e CutC recombinantes em <i>E. coli</i>	53
IV.1. Subclonagem dos genes e produção das proteínas	53
IV.2. Purificação das proteínas recombinantes	55
IV.2.1. Proteínas fusionadas a GST	55
IV.2.2. Proteínas fusionadas a cauda de poli-His	56
IV.3. Análise das proteínas recombinantes por dicroísmo circular e fluorescência	56

IV.4. Produção de anticorpos em coelhos	57
IV.4.1. Imunização de coelhos	57
IV.4.2. Análise da produção por <i>Western blot</i>	58
V. Inativação do gene <i>copA</i>	58
V.1. Subclonagem do gene <i>copA</i> no vetor pUC18	58
V.2. Inativação <i>in vitro</i> do gene	59
V.3. Preparo e transformação de células de <i>Xac</i>	61
V.4. Extração e análise do DNA genômico de <i>Xac</i>	61
V.4.1. Análise por PCR	62
V.4.2. Análise por <i>Southern blot</i>	63
V.4.3. Análise por sequenciamento de DNA	63
V.5. Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> das células mutantes na presença de cobre	63
V.6. Avaliação das células mutantes <i>in vivo</i>	65
V.7. Avaliação do crescimento <i>in vivo</i>	66
VI. Análise da interação das proteínas CopA, CopB e CutC com proteínas de <i>Xac</i> através do ensaio de duplo híbrido de leveduras	66
VI.1. Subclonagem dos genes <i>copA</i> , <i>copB</i> e <i>cutC</i> no vetor pOBD2	67
VI.2. Preparo e transformação de células competentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
VI.3. Teste de auto-ativação do gene repórter <i>HIS</i> com as iscas	69
VI.4. Transformação da linhagem de levedura com a biblioteca de <i>Xac</i> e seleção dos clones	70
VI.5. Análise dos clones e seleção das presas	72
VII. Preparo e transformação de células competentes de <i>E.coli</i>	73
VII. 1. Método Cloreto de Cálcio	73
VII. 2. Eletroporação	74
VIII. Extração e análise de DNA plasmidial	74
IX. Outros métodos moleculares	75
Resultados	78
Parte I. Amplificação dos genes <i>copA</i> , <i>copB</i> e <i>cutC</i> . Sequências polipeptídicas das proteínas	78
Parte II. Avaliação do crescimento e análise da expressão dos genes e das proteínas na presença de cobre	85
II.1. Influência da concentração de cobre no crescimento de <i>Xac</i>	85
II.2. Análise da expressão gênica por RT-PCR	85

II.3. Análise da expressão gênica por <i>Northern blot</i>	87
II.4. Análise da expressão protéica por <i>Western blot</i>	90
II.5. Análise das proteínas diferencialmente expressas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	92
Parte III. Organização genômica dos genes <i>copA</i> , <i>copB</i> e <i>cutC</i>	99
Parte IV - Produção e purificação das proteínas CopA, CopB e CutC recombinantes em <i>E. coli</i> . Análises estruturais das proteínas recombinantes. Produção de anticorpos	106
IV.1. Subclonagem dos genes e produção das proteínas CopA, CopB e CutC	106
IV.2. Purificação das proteínas	108
IV.3. Análise das proteínas por dicroísmo circular e fluorescência	110
IV.4. Análise da produção de anticorpos por <i>Western blot</i>	113
Parte V. Inativação do gene <i>copA</i> com transposon	118
V.1. Subclonagem do gene <i>copA</i> no vetor pUC18 e inativação <i>in vitro</i> do gene	118
V.2. Obtenção de uma linhagem $\Delta copA$ e análise do DNA genômico das células mutantes	118
V.3. Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> das células mutantes na presença de cobre	122
V.4. Avaliação das células mutantes <i>in vivo</i>	125
V.5. Avaliação do crescimento <i>in vivo</i>	126
VI. Análise da interação das proteínas CopA, CopB e CutC com proteínas de <i>Xac</i> através do ensaio de duplo híbrido de leveduras	132
VI.1. Subclonagem dos genes <i>copA</i> , <i>copB</i> e <i>cutC</i> no vetor pOBD2	132
VI.2. Teste de auto-ativação do gene repórter <i>HIS</i> com as iscas	132
VI.3. Análise dos clones e seleção das presas	132
 Discussão	 137
 Referências	 148

Introdução

I. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e ação fitopatogênica

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) é uma bactéria gram-negativa, possui morfologia de bastonete reto com 1,5 a 2,0 micrometros de comprimento e 0,5 a 0,7 micrometros de largura, flagelada, respiração aeróbica e não exigente nutricionalmente (GALLI, 1980). Esta bactéria é cosmopolita, o aspecto da colônia é mucóide de cor amarela, devido à produção do pigmento xanthomonadina e a produção de exopolissacarídeos ou goma xantana. A Figura 1 mostra uma microscopia eletrônica de varredura desta bactéria.

A *Xac* é a bactéria causadora do cancro cítrico, uma doença que ataca as culturas de citros no Brasil e em todo o mundo, causando sérios prejuízos econômicos. Esta bactéria, bem como outras espécies do gênero, têm sido objeto de crescente interesse devido a sua ação fitopatogênica em culturas economicamente importantes. Tendo em vista os prejuízos econômicos causados pela bactéria em culturas de citros, a conclusão do sequenciamento do seu genoma (da SILVA *et al.*, 2002) representa uma contribuição em potencial para a agricultura de vários países, pois possibilita um grande avanço no conhecimento do microrganismo e das interações moleculares com o hospedeiro. Estes conhecimentos são indispensáveis para o desenvolvimento de produtos e/ou métodos que possam controlar o cancro cítrico.

O cancro cítrico parece ter origem no sul da Ásia ou Índia entre os anos de 1827 e 1844 (FAWCETT and JENKINS, 1933). O primeiro relato da ocorrência da doença na Flórida foi em 1913, onde se acredita que o fitopatógeno foi introduzido no local pela importação de árvores contaminadas (*Poncirus trifoliata*) do Japão, em 1910 (DOPSON, 1964). No Brasil, a *Xac* foi introduzida, em 1957, na região de Presidente Prudente, S.P. (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2006). Recentemente, diferentes formas do fitopatógeno foram encontradas na Arábia Saudita (VERNIERE *et al.*, 1998) e Irã (KHODAKARAMIAN and SWINGS, 2002). O cancro cítrico é uma doença que ataca todas as variedades e espécies de citros, desde as mais resistentes, como a poncan e mexerica do rio, por exemplo, até as mais susceptíveis, como limão siciliano e limão galego (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2006).

A bactéria pode sobreviver fora do hospedeiro, mas uma vez em contato com estômatos, poros de água ou lesões no tecido da planta, ela ganha acesso e coloniza o mesófilo da planta, causando o cancro cítrico (GOTTWALD and GRAHAM, 2000). Ao contrário de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, a qual também teve seu genoma

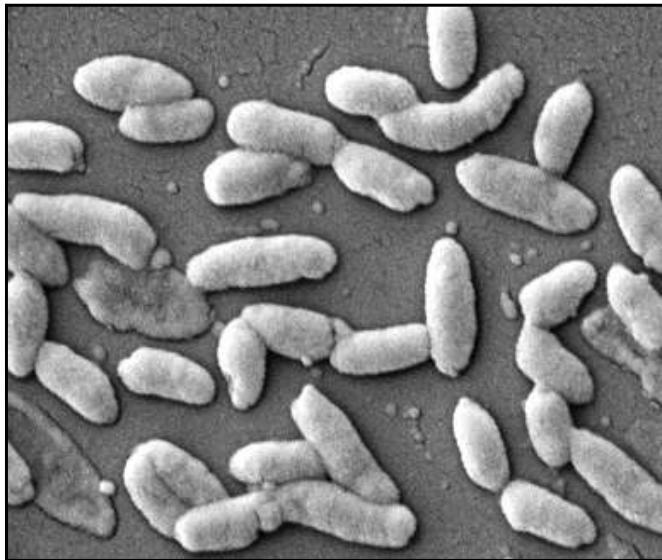


Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de *Xac*. Cortesia do Prof. Dr. E. W. Kitajima, NAP/MEPA – ESALQ/USP.

seqüenciado (da SILVA *et al.*, 2002) e infecta as plantas sistemicamente, a infecção de *Xac* é local, com alta proliferação celular e subseqüentes necroses, sem mover-se sistemicamente pela planta. Portanto, a *Xac* não é um patógeno sistêmico, causando lesões claramente delimitadas em folhas, frutos e ramos, nos quais há uma alta concentração do patógeno. Nas folhas, o primeiro sintoma visível do cancro cítrico é o aparecimento de pequenas lesões salientes, que surgem nos dois lados das folhas, sem deforma-las. As lesões aparecem na cor amarela e logo se tornam marrons. Nos frutos, a doença se manifesta pelo surgimento de pequenas manchas amarelas, com um ponto marrom no centro, que aos poucos vão crescendo e podem ocupar grande parte da casca do fruto, levando ao rompimento desta. Nos ramos, as lesões também são salientes, na forma de crostas de cor parda. Num estágio mais avançado da doença, há a queda dos frutos e folhas e, conseqüentemente, da produção (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2006).

Esta bactéria se alastra de forma muito fácil, e um dos maiores agentes dessa disseminação é o homem, por meio do trânsito indiscriminado de pessoas pelos pomares, materiais de colheita, veículos, mudas e outros materiais cítricos contaminados. Em folhas, ramos e frutos jovens, os quais são mais facilmente contaminados pela doença, a bactéria coloniza a planta através de aberturas naturais, como estômatos. Para que a bactéria penetre em folhas, frutos e ramos mais velhos e provoque os sintomas da doença, é preciso haver ferimentos, causados normalmente por material de colheita (escadas, por exemplo) ou veículos. Outros agentes disseminadores da doença são: a natureza, onde a bactéria pode ser levada pelo vento associado com chuvas, caracterizando uma disseminação de curta distância, ou seja, dentro do próprio pomar, ou mesmo de médias a longas distâncias, entre pomares e propriedades vizinhas; as mudas contaminadas também contribuem para disseminar o cancro cítrico, levando a bactéria de uma propriedade para outra, ou para regiões distantes até então livres da doença. A larva minadora de citros, *Phyllocnistis citrella*, também é um agente disseminador do cancro, uma vez que forma galerias nas folhas, as quais facilitam a penetração e o desenvolvimento da bactéria na planta (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2006).

Como não existe um controle químico eficaz para a doença, a medida atualmente tomada para eliminar o cancro cítrico é a erradicação de plantas contaminadas. Para isso, se em uma área cultivada houver mais de 0,5% de árvores contaminadas, toda ela dever ser erradicada. Se o número de plantas contaminadas for

menor ou igual a 0,5%, são eliminadas a(s) planta(s) foco e as que estão num raio de 30 metros. Esta é uma lei estadual cuja execução, na prática, está a cargo da Fundecitrus (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2006). Dados da Fundecitrus demonstraram que, somente em 2005, 456 plantas em áreas comerciais estavam contaminadas pelo cancro cítrico na zona rural e 174.484 plantas foram erradicadas devido à ocorrência desta doença (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2005).

II. Mecanismos de resistência a cobre nos diferentes organismos

O cobre, em baixas concentrações, é um elemento essencial para ambos os organismos procariotos e eucariotos, sendo constituinte de muitas metaloenzimas envolvidas no processo de óxido-redução nas células. Em altas concentrações, ou livre na célula, o cobre é tóxico, gerando radicais livres, os quais causam danos ao DNA e membranas lipídicas e, também, pode alterar sítios ativos de enzimas. Devido a este efeito tóxico do metal, tanto os organismos eucariotos como os procariotos têm desenvolvido sistemas de detoxificação para manter a homeostase de cobre e, assim, se protegerem das altas concentrações deste metal e assegurar os níveis nutricionais de cobre necessários a sua sobrevivência.

O processo de detoxificação de cobre em eucariotos tem sido bem caracterizado, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo entre estes organismos. Estudos de captura de cobre nesta levedura mostraram que o metal é reduzido de Cu(II) a Cu(I) por metaloredutases localizadas na superfície celular, antes de serem transportados para dentro da célula (HASSETT and KOSMAN, 1995). A homeostase de cobre em leveduras é mantida, em parte, pela expressão de genes regulados por cobre envolvidos com a captura e seqüestro de Cu(I). Em baixas concentrações de cobre, uma família de genes, cujos produtos estão envolvidos com a captura celular de íons cobre, é transcrita. Dois desses genes codificam proteínas de membrana citoplasmática de alta afinidade por cobre, Ctr1 e Ctr3 (DANCIS *et al.*, 1994). Um terceiro gene codifica a metaloredutase Fre1, a qual mobiliza íons cobre de complexos carregando o íon metálico oxidado (GEORGATSOU *et al.*, 1997). A transcrição desses genes é uma resposta celular a níveis inadequados de cobre intracelular. Em células repletas de cobre, a expressão de *CTR1*, *CTR3* e *FRE1* é inibida (DANCIS *et al.*, 1994), portanto, prevenindo o acúmulo de cobre em condições

de alta exposição, mas a captura de cobre ainda pode ocorrer pelos transportadores de baixa afinidade, como Ctr2, Fet4 e Smf1 (LIU *et al.*, 1997).

A proteína Ctr1 possui 406 aminoácidos, é altamente glicosilada e carrega oito seqüências repetidas, características de regiões de ligação a metal (MX₂MXM) no domínio N-terminal extracelular (DANCIS *et al.*, 1994). Essas regiões são repetidas duas vezes nas prováveis proteínas transportadoras de cobre em humanos (hCtr1) e camundongos (mCtr1) e cinco vezes na proteína Ctr4 de *Schizosaccharomyces pombe* (LABBE and THIELE, 1999). A proteína Ctr3 não possui esta região, mas tem vários resíduos de cisteína ao longo da proteína (11 Cys de um total de 241 aminoácidos) em seus prováveis domínios transmembranas. Desde que os resíduos de metionina e cisteína são potenciais sítios de ligação a cobre (KOCH *et al.*, 1997), esses resíduos são importantes para a captura deste metal.

Resumidamente, em células de levedura deficientes em cobre, as proteínas Ctr1 e Ctr3 ligam Cu(I), após redução na superfície celular e transportam o metal através da membrana citoplasmática. Após isso, o cobre é distribuído a compartimentos secretórios, mitocôndria e enzimas citosólicas por proteínas chaperonas específicas de cobre: Atx1/Atx1, Cox17 e Ccs (PUFAHL *et al.*, 1997). A metalochaperona Atx1 media a entrega de cobre a proteínas localizadas na via secretória como Fet3, uma multicobre oxidase essencial na captura de íons ferro. A proteína Ccs é uma chaperona específica responsável pela entrega de cobre à Sod1, uma superóxido dismutase de cobre e zinco (CULOTTA *et al.*, 1997) e a proteína Cox17 direciona cobre à mitocôndria, onde o metal será utilizado pelo citocromo c (GLERUM *et al.*, 1996). Já em células repletas de cobre a transcrição dos genes que codificam os transportadores de alta afinidade por este metal, é inibida (DANCIS *et al.*, 1994). A expressão dos genes que codificam proteínas de alta afinidade é mediada por um fator de transcrição sensível a cobre Mac1, o qual funciona como um ativador transcricional em células deficientes em cobre, mas é inibido em células repletas do metal, uma vez que sua atividade de ligação ao DNA e de ativação da transcrição são reprimidas (SERPE *et al.*, 1999). Além dos genes discutidos anteriormente, um conjunto diferente de genes é transcricionalmente ativado em altas concentrações de cobre, as quais codificam proteínas metalotioneínas (MT): *CUP1* e *CRS5*.

Nos organismos procariotos o mecanismo de resistência a cobre também é bem conhecido, principalmente nas bactérias patogênicas. Nestes organismos, a resistência a metais pesados pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo do organismo

e pode ser resultante da ação, independente ou não, de genes localizados em plasmídeos ou no DNA cromossômico. Alguns fatores determinam como é a resistência em um microrganismo: o tipo e o número de mecanismos de captura do metal, o papel que cada metal desempenha no metabolismo normal e a presença de genes localizados em plasmídeos, cromossomos ou transposons que controlam a resistência a metais (SILVER and JI, 1994). Os possíveis mecanismos de resistência incluem: seqüestro físico, exclusão e/ou efluxo e detoxificação (SUMMERS and SILVER, 1978). Com base nos sistemas atualmente conhecidos, sabe-se que genes relacionados com o metabolismo normal de cobre em bactérias usualmente se localizam no cromossomo, enquanto genes de resistência ao metal se concentram em plasmídeos. Entretanto, a resistência a cobre determinada por genes cromossomais (ou não claramente ligados a DNA plasmidial) foi encontrada em bactérias Gram-negativas mutantes (BROWN *et al.*, 1992). Os mecanismos de resistência a metal encontrados em plasmídeos são, geralmente, de efluxo, uma vez que eles podem ser rapidamente mobilizados em resposta a uma concentração tóxica de metal (SILVER and WALDERHAUG, 1992).

A homeostase de cobre em *Escherichia coli*, uma bactéria patogênica, onde o mecanismo é amplamente conhecido, é feita por um processo múltiplo que não apenas regula a captura e efluxo, mas também o seqüestro periplasmático de cobre, de modo a manter constante o nível do metal na célula. Os genes participantes neste processo são regulados diferentemente de acordo com a demanda de metal no meio (RENSING and GRASS, 2003).

Estudos recentes nesta bactéria identificaram dois sistemas cromossomais envolvidos na resistência e tolerância a cobre, os quais catalisam a remoção do excesso de cobre da célula. O sistema *cue* (para *Cu efflux*) consiste de uma proteína metaloregulatória responsiva a cobre, CueR, a qual regula a expressão de dois genes, *copA* e *cueO* (OUTTEN *et al.*, 2000). A proteína CopA é uma ATPase tipo P de efluxo de cobre com significativa homologia aos transportadores de cobre eucarióticos em leveduras e humanos (RENSING *et al.*, 2000) e a proteína CueO é uma provável oxidase que apresenta similaridade a uma grande família de multicobre oxidases, incluindo ascorbato oxidase, ferroxidases Fet3 de levedura e ceruloplasmina de mamíferos (OUTTEN *et al.*, 2000). Grass and Rensing (2001) demonstraram que a proteína CueO é uma multicobre oxidase periplasmática, a qual protege enzimas periplasmáticas, como fosfatase alcalina, da ação tóxica do cobre, ligando 4 átomos de cobre por molécula. Neste sistema a resistência e o transporte de cobre foram

relacionados com ATPases do tipo P, sendo que essas enzimas constituem uma família de bombas transportadoras de cátions, localizadas na membrana, com significativa conservação de seqüência, encontradas tanto em procariotos como em eucariotos (SILVER *et al.*, 1993). A ATPase tipo P de translocação de Cu^+ em *E. coli* (CopA) tem 834 resíduos de aminoácidos e mostra indução por quantidades elevadas de cobre do meio. Ao analisar a região regulatória do gene *copA* de *E. coli*, Outten *et al.* (2000) encontraram elementos característicos de promotores controlados por proteínas metaloregulatórias da família MerR.

Um outro sistema de resistência cromossomal a cobre encontrado em *E. coli*, onde os genes estão organizados em um operon, foi descrito por Lee *et al.* (1990). Os autores isolaram mutantes de *E. coli* alterados no transporte de cobre, identificando dois sistemas de captação deste metal, designados CutA e CutB (*copper uptake and transport*). Também foram descritas, por esses mesmos autores, duas proteínas de transporte e estocagem intracelular de cobre, CutE e CutF, provavelmente, responsáveis por proteger a célula bacteriana da toxicidade do Cu (I), o qual é produzido pela redução do Cu (II) citoplasmático. O gene *cutE* codifica para uma proteína de 512 aminoácidos, com uma provável região de ligação a cobre (ROGERS *et al.*, 1991). Os genes *cutC* e *cutD*, os quais estão relacionados com o efluxo de cobre, codificam proteínas, provavelmente, ATPases de efluxo do metal. CutC é uma proteína citosólica de 248 resíduos de aminoácidos e a construção de uma linhagem deletada neste gene mostrou sensibilidade a altas concentrações de cobre (GUPTA *et al.*, 1995). O operon *cut* é regulado pelo gene *cutR* (BROWN *et al.*, 1992). Os produtos do operon *cut* interagem com o sistema de resistência plasmidial a cobre, (descrito a seguir) para regular a homeostase do metal na célula (LEE *et al.*, 1990). Portanto, resistência a cobre em *E. coli* é um sistema complexo, composto de proteínas codificadas por genes plasmidiais desempenhando funções acopladas a proteínas codificadas por genes cromossomais (COOKSEY, 1993).

Um sistema independente de efluxo de cobre e também localizado no cromossomo de *E. coli*, o sistema *cus* (para *Cu-sensing*) foi descrito por Munson *et al.* (2000). Este sistema é formado pelo operon *cusCFBA* e é regulado por um sistema de transdução de sinal de dois componentes formado pelos genes *cusR* e *cusS*. A proteína CusS é uma histidina quinase localizada na membrana citoplasmática, age como um sensor da presença de íons cobre no periplasma e CusR age como um regulador da resposta ativando a transcrição dos genes *cusCFBA*. Assim, CusRS ativa

a expressão do operon *cusCFBA* em resposta a concentrações elevadas de cobre. A proteína CusC possui 457 resíduos de aminoácidos e é uma proteína de membrana externa formadora de canais com homologia a TolC, uma proteína de resposta a stresse (KORONAKIS *et al.*, 2000). A proteína CusB possui 407 resíduos de aminoácidos e pertence à família das proteínas de fusão à membrana, as quais são tipicamente ancoradas na membrana interna com um longo domínio periplasmático (ZGURSKAYA and NIKAIDO, 1999) e a proteína CusA, de 1047 resíduos de aminoácidos, é a proteína central do sistema *cus*, responsável pelo transporte de cobre. Esta proteína é parte da família RND (*resistance nodulation cell division*), as quais são transportadores secundários, exportando numerosos substratos variando de metais pesados até proteínas (SAIER *et al.*, 1999). Juntas estas três proteínas formam um complexo de transporte que atravessa ambas as membranas e o espaço periplasmático. A proteína CusF foi recentemente caracterizada (RENSING and GRASS, 2003) e foi demonstrada ligar um átomo de cobre por molécula. CusF é uma metalochaperona periplasmática que transporta cobre para o complexo de efluxo CusCBA, facilitando a detoxificação de cobre no periplasma. Um modelo funcional do complexo de efluxo Cus é mostrado na Figura 2.

A resistência a cobre mediada por genes localizados em plasmídeo também foi bem estudada em *E. coli*, entretanto diferentes resultados foram descritos por diferentes autores. O plasmídeo conjugativo pRJ1004, que confere resistência a cobre, foi isolado de uma linhagem de *E. coli* da flora intestinal de suínos alimentados com dieta suplementada com sulfato de cobre (TETAZ and LUKE, 1983). A resistência a cobre especificada por este plasmídeo envolve o conjunto de genes *pco* (*plasmid-borne copper resistance*), constituído por sete genes, *pcoABCDRSE* (BROWN *et al.*, 1995), os quais se encontram em um operon, com exceção do gene *pcoE*, o qual se encontra mais afastado do restante dos genes (SILVER and PHUNG, 1996). Experimentos de captura de cobre radioativo sugeriram que um mecanismo de efluxo de cobre está associado com os genes *pco* (BROWN *et al.*, 1995) e um modelo de resistência a cobre do determinante *pco* é ilustrado na Figura 3. A proteína PcoA (605 aminoácidos) é a proteína central do determinante *pco*, sendo uma proteína da família das multicobre oxidases. Huffman *et al.* (2002) mostraram que a fração periplasmática da proteína PcoA mostrou atividade oxidase induzível por cobre, como anteriormente demonstrado para CueO (GRASS and RENSING, 2001). Similar a CueO, PcoA também possui um motivo formado por dois resíduos de arginina consecutivos no

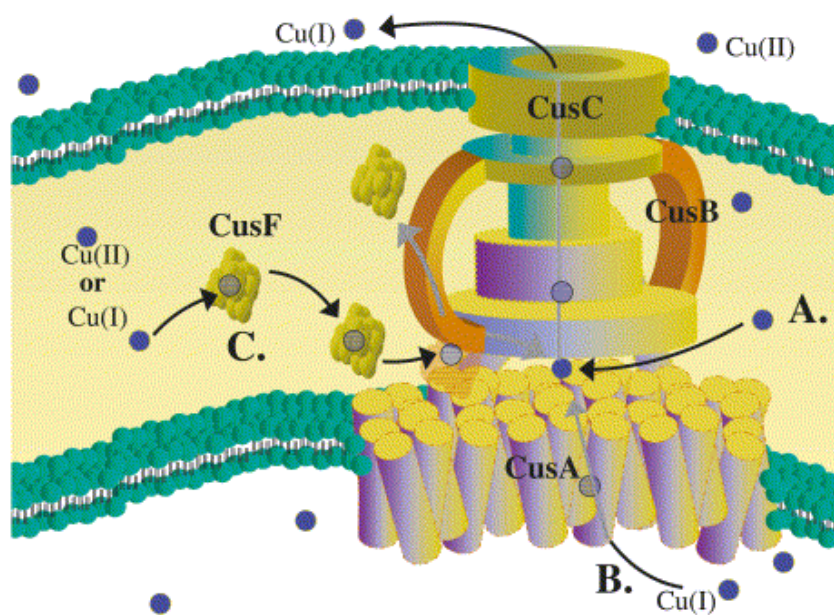


Figura 2 – Modelo funcional do complexo de efluxo Cus de *E. coli*. O complexo consiste de uma bomba CusA de membrana interna, uma proteína periplasmática CusB e a proteína CusC de membrana externa formando um canal ligando o espaço periplasmático. A entrada de cobre pode ocorrer do periplasma (A), do citoplasma (B) ou via a chaperona CusF, do periplasma (C). (RENSING and GRASS, 2003).

peptídeo do sinal e é, provavelmente, translocada pela via TAT (*twin-arginine translocation*) (BERKS *et al.*, 2000) com cobre ligado em seus sítios ativos. A proteína PcoB é uma proteína de 296 resíduos de aminoácidos e, provavelmente, localizada na membrana externa, PcoC contém 126 resíduos de aminoácidos e foi demonstrada ligar um átomo de cobre por molécula, podendo atuar como um dímero (LEE *et al.*, 2002) e PcoD, uma proteína integral de membrana, possui 309 resíduos de aminoácidos. No modelo proposto (Figura 3), PcoC transfere cobre periplasmático para o citoplasma via PcoD, o qual liga à PcoA. O outro gene, *pcoE* é requerido, também, para uma resistência máxima. A sua expressão é regulada por seu próprio promotor, o qual é induzível por cobre e está sob o controle do sistema de dois componentes CusRS (MUNSON *et al.*, 2000). A expressão apenas de PcoE levou a um acúmulo de cobre no periplasma, indicando um papel na ligação de cobre no periplasma.

Mecanismos de resistência a cobre também são encontrados em outras bactérias patogênicas, como *Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis*. Em *B. subtilis* a resistência a cobre é mediada por uma ATPase tipo P, CopA, e uma chaperona de cobre, CopZ (GABALLA *et al.*, 2003). Recentes estudos indicam que CopZ transfere Cu(I) para CopA (BANCI *et al.*, 2003). A região regulatória do operon *copAZ* contém um promotor que é reconhecido por reguladores transcricionais tipo MerR, os quais são responsáveis por regular a transcrição de operons de resistência a mercúrio, tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas (HELMANN *et al.*, 1989). *E. hirae*, uma bactéria gram-positiva, tem sido muito estudada e seu sistema de homeostase de cobre é bem compreendido. Ele consiste de quatro genes *copYZAB* arranjados em um operon. Os produtos dos genes *copA* e *copB* são ATPases transportadoras de cobre, *copY* codifica um repressor responsivo a cobre e *copZ* codifica uma chaperona, a qual pode catalisar o tráfego intracelular de cobre (ODERMATT *et al.*, 1993; ODERMATT and SOLIOZ, 1995). Um modelo para a homeostase de cobre nesta bactéria pode ser observado na Figura 4. De acordo com o modelo, CopA captura cobre quando este é limitante na célula e transfere para CopZ, CopB elimina cobre quando concentrações tóxicas do metal são atingidas e CopZ transfere cobre para CopY. Como a maioria das ATPases, CopA possui um sítio de ligação ao metal na extremidade N-terminal, CxxC, o qual não é encontrado em CopB. A ATPase CopB, diferentemente de CopA, possui uma região N-terminal rica em histidina, a qual também pode constituir um sítio de ligação a metal. O operon *cop* de *E. hirae* é regulado pelo repressor responsivo a cobre CopY.

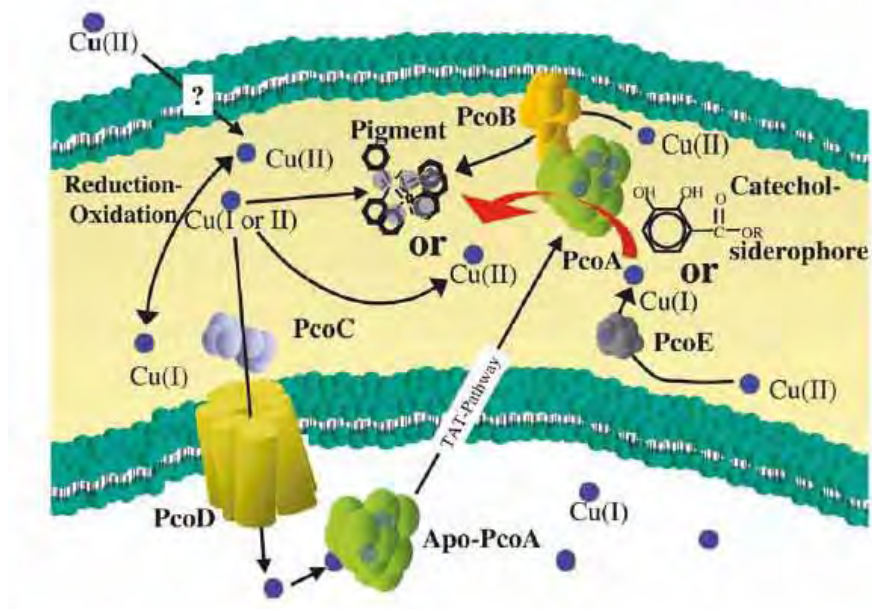


Figura 3 – Modelo proposto para a detoxificação de cobre mediada pelo sistema Pco em *E. coli*. Cobre entra no periplasma por um mecanismo desconhecido, possivelmente através de OmpC e OmpF. A função da proteína de membrana externa PcoB não foi elucidada. Conseqüentemente, cobre poderia ser detoxificado por seqüestro em sideróforos oxidados ou Cu(I) poderia ser oxidado a Cu(II) , o qual é menos tóxico, pela multicobre oxidase PcoA. Para transferir cobre para PcoA, as proteínas, PcoC e PcoD devem transportar cobre através da membrana citoplasmática com PcoC entregando cobre a PcoD. PcoE liga cobre no periplasma e, possivelmente, transfere o metal para PcoA (RENSING and GRASS, 2003).

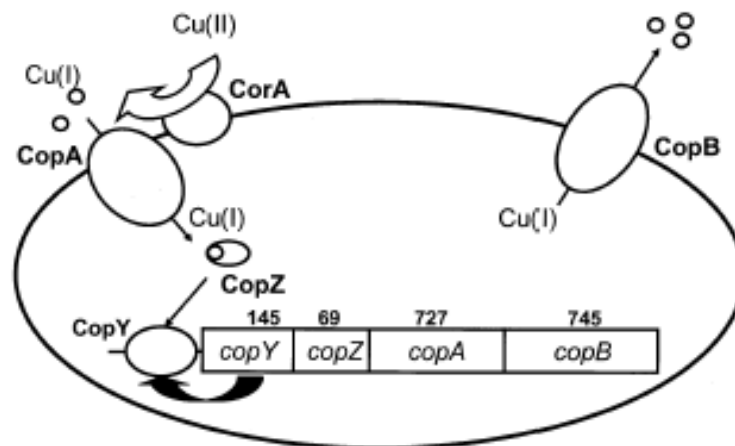


Figura 4 – Modelo do operon *cop* e homeostase de cobre em *E. hirae*. Uma redutase CorA gera Cu(I) para que possa ser capturado por CopA. No interior da célula, cobre é direcionado da ATPase CopA ao repressor CopY pela chaperona de cobre CopZ. A forma CopY-Cu(I) é liberada do promotor, permitindo, assim, a expressão dos genes *cop*. No caso de excesso de cobre, CopZ entrega cobre para CopB, onde ele é exportado da célula. Os números indicam o número de aminoácidos das respectivas proteínas (SOLIOZ and STOYANOV, 2003).

Multhraup *et al.* (2001), demonstraram através de estudos de interação proteína-proteína que CopZ interage com CopA, como resultado sendo o doador de cobre para CopZ. Se CopA, de fato, doa cobre para CopZ, este metal poderia ser transferido de CopA para CopZ por um mecanismo de transferência de ligante, como ilustrado na Figura 5.

H. pylori, uma bactéria que coloniza a mucosa gástrica humana, causando sérias doenças gástricas, controla a concentração citoplasmática de cobre por efluxo, via uma ATPase tipo P, CopA, a qual transporta cobre do citoplasma para o periplasma (GE *et al.*, 1995). Íons cobre acumulados são detoxificados via os determinantes de resistência a cobre CrdA, CrdB (*copper resistance determinants*) e CzcB (sistema *cobalt, zinc, and cadmium*), os quais formam, juntamente, com CzcA um sistema de exportação de metal (WAIDNER *et al.*, 2002). Através de análises de transcrição foi mostrado que *H. pylori* responde ativamente a mudanças na concentração de cobre do meio e que CrdA é fortemente induzido por cobre em nível de transcrição (WAIDNER *et al.*, 2002). A ativação da transcrição de *crdA* por íons cobre é regulada por CrdRS, um sistema regulatório de dois componentes, sendo CrdS um membro da família histidina quinase e CrdR, uma proteína reguladora de resposta (WAIDNER *et al.*, 2005).

Um gene *tcrB*, localizado em um plasmídeo de *E. faecium* foi identificado ser parte de um operon *tcrYAZB*, o qual tem uma organização genética similar ao operon *copYZAB* de *E. hirae* (HASMAN, 2005) e atua no mecanismo de resistência a cobre nesta bactéria. Um operon de resistência a cobre (*lco*) também foi encontrado em um plasmídeo da bactéria gram-positiva *L. lactis* (LIU *et al.*, 2002). O operon *lco* consiste de três genes estruturais *lcoABC*, os produtos de *lcoA* e *lcoB* são homólogos a poliproteínas diacilglicerol transferases e duas proteínas hipotéticas, respectivamente, e o produto de *lcoC* é similar a multicobre-oxidases. Os três genes são co-transcritos por um promotor induzível por cobre, o qual é controlado pelos genes *lcoRS*, codificando um regulador de resposta e uma proteína sensora. Mutagênese por transposon indicou que os três genes são requeridos para a resistência a cobre nesta bactéria.

Os mecanismos de resistência a cobre em bactérias fitopatogênicas vêm sendo muito estudados, considerando a grande importância do ponto de vista biotecnológico. Os compostos de cobre têm sido extensivamente usados na agricultura como medida para tentar controlar doenças de plantas, devido à alta toxicidade aos fitopatógenos e baixa toxicidade aos mamíferos. Mas o efeito do cobre tem diminuído por causa do

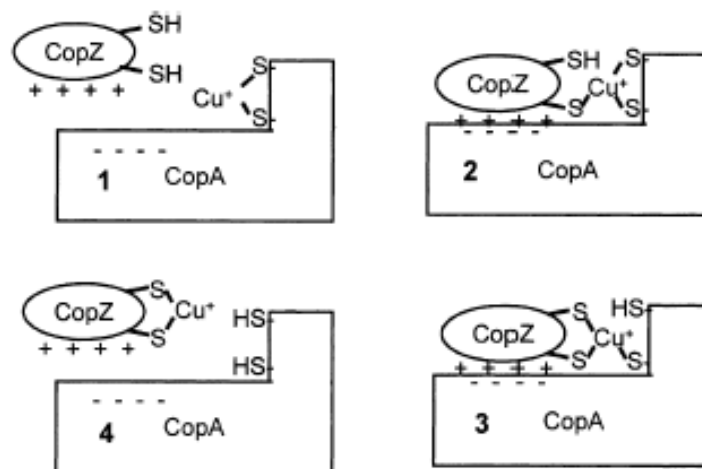


Figura 5 – Mecanismo hipotético para a transferência de cobre de CopA para CopZ em *E. hirae*. Cobre poderia ser transferido de CopA para a chaperona CopZ por sucessivas ligações tióis, como mostrado pela seqüência de eventos 1-4. A superfície positivamente carregada de CopZ poderia interagir com a superfície negativamente carregada de CopA, estabelecendo um contato entre as proteínas (SOLIOZ and STOYANOV, 2003).

aparecimento de linhagens de bactérias resistentes a cobre (CHA and COOKSEY, 1991). A aquisição de resistência a cobre por bactérias fitopatogênicas, é atualmente um problema sério, visto que a aplicação em larga escala de bactericidas contendo cobre é ainda a base do controle de doenças bacterianas em muitas culturas economicamente importantes; a existência de tais patógenos resistentes ao metal pode explicar porque a incidência da doença é alta apesar da aplicação desses compostos.

O primeiro sistema melhor estudado de resistência a cobre nestas bactérias foi o plasmídeo pPT23D, encontrado em uma linhagem de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, um fitopatógeno que ataca culturas de tomate (COOKSEY, 1987). Este plasmídeo apresenta o sistema *cop*, no qual os genes estão organizados em um operon consistindo de quatro genes, *copABCD*, sob o controle de um promotor induzível por cobre e regulados por três genes, *copR* e *copS* (cujos produtos são homólogos aos produtos PcoR e PcoS do determinante de resistência plasmidial a cobre de *E. coli*, descrito por Silver *et al.*, 1993), mais um terceiro gene cromossomal que codifica uma proteína que liga ao DNA, chamada de CopM (CERVANTES and CORONA, 1994). Os genes *copA* e *copC* codificam proteínas periplasmáticas capazes de se ligar a íons cobre, o gene *copB* codifica uma proteína de membrana externa e o gene *copD* codifica uma proteína de membrana interna (CHA and COOKSEY, 1991). A proteína periplasmática CopA é rica em resíduos de metionina e é capaz de ligar até 11 átomos de cobre, sendo homóloga a multicobre oxidases, como a ceruloplasmina, encontrada no soro humano (DWULET and PUTNAM, 1981), e a Fet3 ferroxidase, envolvida na captura de ferro em leveduras. Ouzounis and Sander (1991) mostraram que as oxidases multicobre, grandes complexos de proteínas que se caracterizam por ligarem muitos átomos de cobre por molécula de proteína, contém, pelo menos, um provável sítio de ligação a cobre tipo-1 na extremidade C-terminal, com a seguinte estrutura geral: His-X₄₈-Cys-X₄-His-X₄-Met. Na proteína CopA de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, este sítio se encontra nas posições His-542, Cys-591, His-596 e Met-601 e, na proteína codificada pela ORF 1 de *Xanthomonas campestris* pv. juglandis, outro fitopatógeno resistente a cobre descrito a seguir, nas posições His-568, Cys-617, His-622 e Met-627. Os domínios de ligação a cobre constituem, provavelmente, o sítio catalítico nas multicobre oxidases. A proteína CopB, também rica em resíduos de metionina, é uma proteína de membrana externa, para a qual não existem evidências de ligação a cobre. A proteína CopC, pertencente a classe das

chaperonas de cobre, é uma pequena proteína solúvel encontrada no espaço periplasmático que mostrou ligar 1 átomo de cobre por molécula (COOKSEY, 1993).

As chaperonas de cobre, pertencentes à classe das metalochaperonas, atuam no tráfego intracelular de íons metálicos, essenciais para a célula, guiando e protegendo o metal, enquanto facilitam sua doação para enzimas específicas, dependentes de cobre (HARRISON *et al.*, 2000). Os resultados de estudos genéticos suportam a hipótese de que as proteínas periplasmáticas CopA e CopC e, talvez, a proteína de membrana externa CopB conferem resistência a cobre, enquanto CopC e CopD atuam no transporte de cobre em *P. syringae* (COOKSEY, 1993). Estas observações sugerem que o mecanismo de resistência a cobre nesta bactéria é dependente do seqüestro de cobre e acúmulo no periplasma e na membrana externa. De fato, células de *P. syringae* expostas a altas concentrações de cobre tornam-se azuis, acumulando cobre no espaço periplasmático (COOKSEY, 1993).

Recentemente, uma das proteínas do operon *cop*, a proteína CopC, teve sua estrutura tridimensional resolvida (ARNESANO *et al.*, 2002). Os dados de RMN e espectroscopia eletrônica confirmaram que CopC liga 1 átomo de cobre por molécula. Isto implica que, ao contrário de CopA, a qual liga 11 átomos de cobre, CopC funciona não no seqüestro de cobre, mas no tráfego intracelular do metal. O espectro de EPR de CopC-Cu(II) prediz que o átomo de Cu(II) é ligado a átomos de nitrogênio e oxigênio numa geometria tetragonal. Quatro resíduos altamente conservados na família CopC, His1, His91, Glu27 e Asp89, formam o sítio de ligação ao Cu(II) (HUFFMAN *et al.*, 2002). CopC é formada por 9 folhas β que se arranjam em uma estrutura β barril similar as cobredoxinas, pequenas proteínas capazes de ligar cobre. Um modelo para a homeostase de cobre em *P. syringae* é ilustrado na Figura 6.

Em *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*, fitopatógeno que ataca plantações de nozes, um fragmento de 4,9 kb foi isolado do cromossomo de linhagens resistentes a cobre, o qual apresenta quatro ORFs orientadas na mesma direção (ORFs 1, 2, 3 e 4), sendo todas requeridas para a expressão da resistência a cobre (LEE *et al.*, 1994). A seqüência de aminoácidos prevista para as ORFs 1 a 4 apresentou identidade de 40 a 65% com *copA*, *copB*, *copC* e *copD*, respectivamente, de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Apesar da significativa identidade entre as proteínas de *X. campestris* pv. *juglandis* (ORFs 1 a 4) e de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (CopA a CopD), dois aspectos distintos entre os dois sistemas podem ser mencionados. Primeiro, octapeptídeos altamente conservados (Asp-His-Ser-Gln/Lys-Met-Gln-Gly-Met) foram

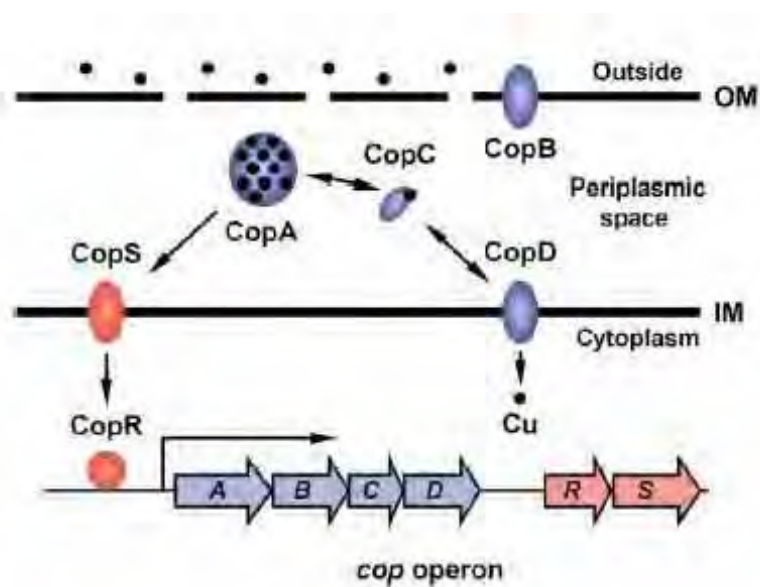


Figura 6 – Modelo para a homeostase de cobre em *P. syringae*. Cobre extracelular alcança o espaço periplasmático através de poros na membrana externa (OM). CopA, homóloga a multicobre oxidases, poderia atuar na resistência a cobre devido a sua alta capacidade de ligar cobre. CopB e CopC também contribuem para a proteção contra o efeito tóxico do cobre. CopC pode transferir cobre de CopA para o transportador de membrana interna (IM) CopD, onde o cobre é importado para o citoplasma. A proteína de membrana interna CopS percebe o excesso de cobre no periplasma, talvez via interações com CopA ou CopC. O sinal de cobre pode ser transmitido a CopR, a qual, por sua vez, induz a expressão do operon *copABCD*. Os genes *copR* e *copS*, localizados *downstream* do operon, são constitutivamente expressos. O papel preciso para esses componentes na homeostase de cobre e a transferência de cobre por CopC, ainda é uma questão não definida (PUIG *et al.*, 2002).

encontrados nas proteínas CopA e CopB de *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Essas seqüências foram propostas serem domínios de ligação a cobre responsáveis pela exclusão do cobre do citoplasma (MELLANO and COOKSEY, 1988). No entanto, esse padrão de seqüências não foi encontrado nas proteínas codificadas pelas ORFs 1 e 2 de *X. campestris* pv. juglandis, indicando que elas podem funcionar de maneira diferente, tal como no seqüestro ou na compartimentalização de cobre. Segundo, os perfis de hidrofobicidade da ORF1 a ORF4 são similares àqueles de CopA a CopD, exceto para a região N-terminal da ORF2 e CopB, o N-terminal da ORF2 tem uma região hidrofílica, mas é hidrofóbica em CopB. As ORFs 1, 3 e 4 possuem peptídeos de sinais característicos, indicando que a localização dessas proteínas pode ser na membrana ou no periplasma. Em adição, CopB também possui um peptídeo de sinal associado com a membrana externa (CHA and COOKSEY, 1991), ao contrário da ORF2, a qual falta um peptídeo de sinal comum, sugerindo uma localização celular diferente de CopB.

A resistência a cobre em fitopatógenos foi também descrita em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (MARCO and STALL, 1983), bactéria que ataca culturas de tomate e pimenta, sendo determinada por grandes plasmídeos conjugativos (pXVCu) de ~200 kb, em linhagens da Flórida e Oklahoma. A transferência do plasmídeo conjugativo pXV10A entre patovares de *X. campestris*, mas não para fitopatógenos de outros gêneros, foi demonstrada por Bender *et al.*, (1990), portanto, a associação de genes de resistência a cobre com plasmídeos autotransferíveis pode ter contribuído para a disseminação dessa característica no decorrer dos anos. *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, renomeada *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria, mostrou carregar genes de resistência a cobre em plasmídeo, os quais são relacionados aos operons *cop* e *pco* de *P. syringae* e *E. coli*, respectivamente. No entanto, ao contrário, dos sistemas de dois componentes (*copRS* e *pcoRS*) regulando a expressão dos operons em *P. syringae* e *E. coli*, um gene *copL*, *upstream* ao gene *copA* foi encontrado regular a expressão induzida por cobre da proteína CopA em *X. axonopodis* pv. vesicatoria. O gene *copL* codifica uma proteína de 122 resíduos de aminoácidos, a qual é rica em resíduos de histidina e cisteína, sugerindo uma possível interação direta com cobre. Deleções ou mutações em *copL* levaram à perda da ativação transcricional de *copA*. A inserção de um gene de resistência a kanamicina em *copL* resultou em uma sensibilidade a cobre na linhagem selvagem. Análises de seqüências genômicas mostraram que existem homólogos a *copL upstream* aos genes

copA e *copB* em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, *Xanthomonas campestris* pv. campestris e *Xyllela fastidiosa* (VOLOUDAKIS *et al.*, 2005).

III. Genes relacionados à resistência a cobre em *Xac*

Durante a fase de anotação dos genes no Projeto Genoma da bactéria *Xac*, foram encontrados alguns genes potencialmente envolvidos com a resistência a cobre nesta bactéria.

As ORFs (*Open Reading Frames*) XAC3630 e XAC3631, presentes no DNA cromossomal de *Xac* apresentaram alta identidade (62%) com o gene *copA* e uma homologia significativa (ϵ -value= $2e^{-79}$) com o gene *copB* (47%), respectivamente, da bactéria *Pseudomonas syringae* pv tomato (MELLANO and COOKSEY, 1988). Essas mesmas ORFs (XAC3630 e XAC3631) também apresentaram alta identidade com as ORFs 1 (64%) e 2 (45%), respectivamente, presentes no operon de resistência a cobre de *Xanthomonas campestris* pv. juglandis (LEE *et al.*, 1994). As ORFs XAC3630 e XAC3631 estão próximas no genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv citri, na posição 4304624 a 4307493 e codificam proteínas de 594 e 365 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

Não foram encontrados durante a fase de anotação genes homólogos aos genes *copC* e *copD* de *Pseudomonas syringae* pv. tomato e às ORFs 3 e 4 de *Xanthomonas campestris* pv. juglandis. Mellano and Cooksey (1988) demonstraram que os genes *copA* e *copB* são essenciais para resistência, enquanto os genes *copC* e *copD* são requeridos para uma resistência máxima em *Pseudomonas syringae* pv. tomato.

Em *Xac* foi localizada, na posição ~3630000, a ORF XAC3091, a qual apresentou similaridade com uma proteína de homeostase de cobre de *Xyllela fastidiosa* e com a proteína CutC, uma proteína citoplasmática envolvida no transporte de cobre em *E. coli* (GUPTA *et al.*, 1995).

Algumas ORFs de *Xac* apresentaram homologia considerável com os genes regulatórios *copRS* do operon de *P. syringae*. Todas as proteínas pertencem à família de proteínas sensoras do sistema regulatório de dois componentes em bactérias. As proteínas PcoR e PcoS em *E. coli* constituem um exemplo de sistema regulatório de dois componentes para a resistência de metais, sendo que o PcoS é uma quinase sensora de membrana, enquanto o PcoR é uma proteína que se liga ao DNA que, provavelmente, sofre fosforilação por PcoS (SILVER, 1996). É possível que algumas

dessas ORFs estejam envolvidas na regulação da resistência a cobre em *Xac*. Não foram encontradas no genoma de *Xac*, proteínas ortólogas às proteínas de alta afinidade por cobre, Ctr1 e Ctr3, e nem as proteínas de baixa afinidade, Ctr2 e Fet4, descritas na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A ORF XAC0757, anotada como uma ATPase transportadora de potássio (subunidade B), apresentou similaridade com ATPases tipo P contendo seqüências ricas em histidinas, similares a ATPases de translocação de cobre em *Enterococcus hirae* (TRENOR *et al.*, 1994). Essa mesma ORF também é similar a ATPases transportadoras de cobre de *Helicobacter pylori* (BAYLE *et al.*, 1998) e *Candida albicans* (RIGGLE and KUMAMOTO, 2000). Também foram encontradas as ORFs XAC0756 e XAC0758, anotadas como ATPases transportadoras de potássio, subunidades A e C, respectivamente. Essas ORFs, juntamente com a XAC0757, formam um operon, consistindo, possivelmente, de genes que codifiquem para ATPases, as quais estejam envolvidas com transporte e/ou resistência a cobre em *Xac*.

Finalmente, algumas ORFs identificadas correspondem a genes que codificam proteínas relacionadas ao sistema *czc* (*cobalt*, *zinz*, and *cadmium*), um sistema constituído de proteínas de membrana que atuam no transporte de cátions do citoplasma, através do espaço periplasmático para fora da célula (SILVER, 1996). Tais proteínas podem também estar envolvidas no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*.

Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo a caracterização funcional dos genes de resistência a cobre, *copA*, *copB* e *cutC*, na bactéria *Xac*, através de estudos de caracterização dos genes e das proteínas codificadas por estes genes. Especificamente, os principais objetivos foram:

- 1 - Analisar a expressão dos genes durante o crescimento na presença de cobre, através de análises de *Northern* e *Western blots* e eletroforese bi-dimensional.
- 2 - Produzir as proteínas recombinantes para a realização de estudos estruturais e produção de anticorpos.
- 3 - Inativar o gene *copA* para avaliar a participação da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre.
- 4 - Analisar a interação das proteínas CopA, CopB e CutC com outras proteínas de *Xac* através do ensaio de duplo híbrido de leveduras, para saber se essas proteínas interagem com outras proteínas de *Xac* no mecanismo de resistência a cobre e quem são essas proteínas.

Ao ingressar no Programa de Pós-Graduação, o laboratório estava envolvido no sequenciamento e anotação do Projeto Genoma *Xanthomonas*, assim os meus dois primeiros anos foram exclusivamente dedicados ao Projeto Genoma. O presente trabalho é resultado de três anos de atividade de pesquisa.

Materiais e Métodos

I. Linhagens de *Xac* e manutenção

As linhagens de *Xac* utilizadas neste trabalho foram: linhagem 306 selvagem, a mesma utilizada no sequenciamento do genoma (da SILVA *et al.*, 2002) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. J. A. Ferro (FCAV, UNESP, Jaboticabal) e a linhagem 306 $\Delta copA$, obtida após inativação do gene *copA*. As células foram estocadas de duas maneiras: em água ultrapura estéril à temperatura ambiente e em meio TSA (triptona 1%, sacarose 1% e glutamato de sódio 0,1%) contendo 16% de glicerol a -80°C .

II. Amplificação dos genes *copA*, *copB* e *cutC*

Para a amplificação dos genes *copA* e *copB* foram utilizados os clones 6205G06 e 6704A03 (subclones da biblioteca genômica de *Xac* construída para o sequenciamento do genoma), respectivamente. O gene *cutC* foi amplificado por PCR a partir de uma suspensão bacteriana de *Xac*. Um volume da suspensão bacteriana obtido após 24 horas de crescimento (28°C , 250 rpm), foi centrifugado (10 minutos a $18.000 \times g$, temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas no volume original em água ultrapura estéril.

Para a amplificação dos três genes foram desenhados oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R) baseados nas seqüências nucleotídicas obtidas durante a anotação dos genes de *Xac*. Abaixo estão representadas as seqüências polinucleotídicas dos oligonucleotídeos.

CopA-F (5'-CGGAATTCATGTCTTTTCGATCCC-3')

CopA-F1 (5'-GGAATTCATATGTCTTTTCGATCCCCGTTTTTC-3')

CopA-R (5'-CGGAATTCATGCTTCCACCCG-3')

CopB-F (5'-CGGAATTCATGAGCCGCTTTTCGC-3')

CopB-F1 (5'-GGAATTCATATGAGCCGCTTTTCGCATGCAGGC-3')

CopB-R (5'-CGGAATTCATAAACCACGCG-3')

CutC-F (5'-CGGGATCCGTGCGACGCGCAGCG-3')

CutC-F1 (5'-GGAATTCATATGGTGGCGACGCGCAGCGGCAGG-3')

CutC-R (5'-CGGGATCCTCACGCTTGCTGCAA-3')

Todos os oligonucleotídeos contêm nas extremidades 5', sítios de restrição (bases sublinhadas), para as endonucleases *EcoRI* (oligonucleotídeos nomeados como F e R), *NdeI* (oligonucleotídeos nomeados como F1) e *BamHI* (oligonucleotídeos nomeados como CutC-F e CutC-R), os quais foram importantes para a subclonagem dos fragmentos amplificados nos vetores de expressão pET28a e pGEX-4T-1, e no vetor de clonagem pUC18.

Diferentes reações de amplificação tiveram que ser usadas para amplificar os três genes. A mistura de reação para a amplificação do gene *copB*, a partir do clone 6704A03, continha: 200 ng de DNA plasmidial, 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 100 pmols dos oligonucleotídeos direto e reverso, 5,0 µL de tampão específico da enzima (10X), 1,0 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/µL, Gibco/BRL) e água ultrapura estéril de modo a completar o volume da reação para 50 µL. A PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos seguida de 34 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

A amplificação do gene *copA*, a partir do clone 6205G06 e do gene *cutC*, a partir de suspensão bacteriana foi baseada na reação de PCR usada no sequenciamento, e continha: 400 ng de DNA plasmidial para a amplificação do gene *copA* ou volumes variando de 1,5 a 4,0 µL de suspensão bacteriana para a amplificação de *cutC*, 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 6,4 pmols dos oligonucleotídeos direto e reverso, 1,9 µL de tampão específico da enzima (10X), 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,3 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/µL) e água ultrapura estéril de modo a completar o volume da reação para 20 µL. A PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos seguida de 39 ciclos de 96°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

III. Avaliação do crescimento e análise da expressão dos genes e das proteínas na presença de cobre

A análise da expressão dos genes em células de *Xac* 306 foi realizada por RT-PCR, *Northern* e *Western blots* e eletroforese bidimensional. Para isto, duas condições de crescimento de *Xac* foram analisadas. Numa primeira condição as células foram crescidas em 100 mL de meio de cultivo Agar Nutriente (extrato de carne 0,2%, peptona 0,5% e NaCl 0,5%, pH 6,8) tamponado, na ausência de cobre durante 12 horas. Em seguida, solução de sulfato de cobre estéril foi adicionada para uma

concentração final de 1 mM. Amostras de 10 mL foram removidas antes da adição de sulfato de cobre e nos tempos de 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre. Em uma outra condição, realizada apenas para análise por eletroforese bidimensional, as células foram crescidas em 50 mL de meio de cultivo Agar Nutriente tamponado na ausência e na presença de 1 mM de cobre. As células foram coletadas após 24 horas de crescimento. As células coletadas a partir das duas condições descritas foram utilizadas para a extração de RNA e para a obtenção de extratos totais de proteínas celulares.

III.1. Influência da concentração de cobre no crescimento de *Xac*

Antes de analisar a expressão dos genes de resistência a cobre em *Xac* uma avaliação prévia do efeito do cobre no crescimento desta bactéria foi realizada. Uma alça de células rejuvenescidas foi inoculada em 50 mL do meio Agar Nutriente e as células crescidas a 28°C, sob agitação, durante aproximadamente 15 horas (pré-inóculo). Um volume desse pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do mesmo meio na ausência e na presença de concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. O pH dos meios foi mantido ao redor de 7,0 com a adição de tampão fosfato (K_2HPO_4 0,1 M e KH_2PO_4 0,1 M, pH 7,0). Foi utilizado, também, como controle células crescidas em meio Agar Nutriente não tamponado. As culturas foram crescidas a 250 rpm e 28°C. O crescimento foi acompanhado através de medidas de turbidimetria a 550 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640 em diferentes tempos até 32 horas de cultivo.

III.2. Análise da expressão gênica por RT-PCR e por *Northern blot*

A análise da transcrição dos genes foi realizada por RT-PCR e por *Northern blot* utilizando as condições de crescimento descritas anteriormente. Uma outra condição de experimento foi realizada para analisar a transcrição dos genes na presença de outros metais. Para isso, as células foram crescidas em 100 mL de meio Agar Nutriente tamponado, na ausência de metal, durante 12 horas. Neste tempo, foi retirado um volume de 10 mL, as células foram coletadas por centrifugação e armazenadas (-80°C). Em seguida, solução de sulfato de cádmio, sulfato de cobre, sulfato de zinco ou

nitrito de prata foi adicionada a uma concentração final de 1 mM. Amostras de 10 mL foram removidas 0,5 hora após a adição dos diferentes metais.

As amostras de células coletadas antes e depois da adição de metal foram tratadas com fenol gelado antes de serem estocadas a baixa temperatura (-80°C). Para isto, o volume da suspensão removido foi misturado com 1,25 mL de uma solução gelada de fenol 5% (fenol saturado com NaAc 20 mM e EDTA 1 mM, pH menor que 7) em etanol absoluto.

III.2.1. Extração e análise de RNA total

O RNA total das células foi extraído utilizando fenol quente seguindo a metodologia descrita em www.microarrays.org/pdfs/total_RNA_from_E.coli.pdf. Para isso, as células coletadas por centrifugação (descrito anteriormente) foram ressuspensas em 800 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0, contendo 0,5 mg/mL de lisozima e a suspensão vigorosamente agitada em Vortex. Um volume de 80 µL de SDS 10% foi adicionado e a mistura foi incubada a 64°C por 2 minutos. A seguir, adicionou-se 88 µL de NaAc 1 M, pH 5,2. Um igual volume (1 mL) de fenol saturado em NaAc 20 mM e EDTA 1 mM foi adicionado e a mistura foi incubada a 64°C por 6 minutos, misturando por inversão os tubos, a cada 40 segundos. Os tubos foram colocados em gelo e, a seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 20.000 x g, 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos limpos contendo o mesmo volume de clorofórmio, agitou-se e centrifugou-se por 5 minutos a 20.000 x g, a 4°C. A um volume de, aproximadamente, 400 µL da fase aquosa foi adicionado 40 µL de NaAc 3M, pH 5,2 contendo EDTA 1 mM e o RNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado por 30 minutos a -80°C. Os RNAs foram coletados através de centrifugação por 30 minutos a 20.000 x g e baixa temperatura, lavados com etanol 80 % e secos a vácuo, por 5 minutos.

O precipitado foi dissolvido em 60 µL de água tratada com DEPC, quantificado em espectrofotômetro Beckman nos comprimentos de onda 260 e 280 nm e estocado a -80°C.

III.2.2. Ensaio de RT-PCR semi-quantitativo

Para a reação de RT-PCR, 1 µg dos RNAs totais foram, primeiramente, tratados com 1 µL de DNase RQ1 (1 U/µL, Promega), 1 µL de tampão RQ1 10X e água tratada com DEPC de modo a completar o volume da reação para 10 µL. A digestão com DNase foi feita a 37°C por 30 minutos, seguida por uma extração fenol/clorofórmio (1:1). Em seguida, os RNAs foram precipitados com 1/10 do volume de NaAc 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado a -80°C. Os RNAs foram coletados através de centrifugação por 25 minutos a 20.000 x g e baixa temperatura, lavados com etanol 70% e secos a vácuo, por 5 minutos. O precipitado foi dissolvido em 10 µL de água tratada com DEPC, dos quais 5 µL foram utilizados para a reação de RT-PCR.

Para o ensaio, foi utilizado o kit SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen Life Technologies), o qual permite que se realize a síntese de cDNA e a amplificação em um único programa. Para a reação foram utilizados 5 µL de RNA total de cada amostra, 1 µL de uma solução 10 µM dos oligonucleotídeos copB-F, copA-F ou cutC-F e 16-F (5'-AAAGGAGGTGATCCA-3') e copB-R, copA-R ou cutC-R e 16R (5'-TAAGTGAAGAGTTTG-3'), 25 µL de 2X Reaction Mix, contendo íons Mg⁺², dNTPs e estabilizadores, 1 µL do RT/Platinum[®] Taq Mix e água tratada com DEPC para um volume final de 50 µL de reação. O rDNA 16S foi utilizado para a normalização dos experimentos de RT-PCR. A síntese de cDNA foi realizada a 50°C por 30 minutos, seguida por uma pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos. Imediatamente, após a pré-desnaturação, seguiu-se 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 40°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. Um volume de 25 µL das reações finais foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

Após eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de Nylon positivamente carregada (Hybond XL, Amersham) por capilaridade, com uma solução de NaOH 0,4 M. Após transferência, a membrana foi pré-hibridizada com uma solução do kit Alkaphos Direct (Amersham Biosciences) a 57°C por 2 horas. Após o período de pré-hibridização foram adicionados 100 µL da sonda marcada (³²P-copA, ³²P-copB ou ³²P-rDNA 16S) à solução de pré-hibridização. A hibridização ocorreu durante a noite (aproximadamente 15 horas), a 57°C. Após hibridização, a membrana foi lavada, da seguinte maneira:

- 1 - SSPE 1x; SDS 0,1%, 60°C, 30 minutos;
- 2 - SSPE 0,5x; SDS 0,1%, 60°C, 30 minutos;
- 3 - SSPE 0,1x; SDS 0,1%, 60°C, 30 minutos;
- 4 - SSPE 0,1x; SDS 0,1%, 65°C, 30 minutos;

Após as lavagens, a membrana foi exposta ao filme radiográfico Kodak T-Mat G/RA durante a noite, a -80°C .

III.2.3. Ensaio de *Northern blot*

O procedimento seguido para a eletroforese e para as reações de hibridização por *Northern blot* foi o mesmo descrito por Sambrook and Russell (2001). Uma quantidade de 10 μg de cada uma das amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 2% de formaldeído em tampão MOPS 1X (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico 0,02 M, NaAc 2,0 mM e EDTA 1,0 mM, pH 8,0). Antes de aplicar no gel, as amostras de RNA foram tratadas, adicionando-se ao RNA 1 μL de brometo de etídeo 10 mg/mL e 16 μL de RNA mix [2 μL de tampão 10X (glicerol 50%, EDTA 10 mM, pH 8,0 e azul de bromofenol 0,25%), 2 μL de formaldeído e 10 μL de formamida deionizada]. As amostras foram desnaturadas a 65°C por 10 minutos e aplicadas no gel. As condições da eletroforese foram de 60 V durante aproximadamente 5 horas.

Após eletroforese, os RNAs foram transferidos para uma membrana de Nylon neutra (Hybond, Amersham) por capilaridade, com uma solução de 2X SSC (NaCl 0,3 M e citrato de sódio 0,03 M) e fixados à membrana através de *crosslinking* (Ultraviolet Crosslynker UVP, modelo CL-1000). Após fixação, as membranas foram pré-hibridizadas a 42°C durante 8 horas, numa solução composta por formamida 50%, 5X SSPE (NaCl 0,36 M, Na_2PO_4 0,02 M e EDTA 2,0 mM, pH 7,4), 5X solução de Denhardt (Ficoll 0,00125 M, polivinilpirrolidona 0,0012 M e BSA 5,0 mg/mL), EDTA 1 mM, SDS 0,5%, e 80 μL de uma solução de DNA esperma de salmão (10 mg/mL, Gibco, BRL), previamente desnaturado a 100°C . Após o período de pré-hibridização foram adicionados 200 μL da sonda marcada ($^{32}\text{P-copA}$, $^{32}\text{P-copB}$ ou $^{32}\text{P-cutC}$) à solução de pré-hibridização. A hibridização ocorreu durante a noite, a 42°C . Após hibridização, a membrana foi lavada da seguinte maneira:

- 1 - SSPE 1x; SDS 0,1%, 42°C , 30 minutos;
- 2 - SSPE 0,5x; SDS 0,1%, 42°C , 30 minutos;
- 3 - SSPE 0,1x; SDS 0,1%, 42°C , 30 minutos;
- 4 - SSPE 0,1x; SDS 0,1%, 65°C , 30 minutos;

Após as lavagens, a membrana foi exposta ao filme radiográfico Kodak T-Mat G/RA por dois dias, a -80°C .

III.2.4. Preparo e purificação das sondas radioativas

Foram utilizadas como sondas para análise de transcrição gênica os genes *copB* (1095 pb ou um fragmento de 570 pb), *copA* (1782 pb) e o gene *cutC* (798 pb) e o rDNA 16S (1547 pb). As sondas foram marcadas por *random priming*, utilizando o NEBlot™ kit (New England Biolabs) e purificadas por filtração em uma coluna contendo resina Sephadex-G50 (Sigma) equilibrada em tampão NT (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 10 mM e EDTA 20 mM, pH 8,0). Após purificação as sondas foram coletadas em um volume final de 200 µL.

III.3. Análise da expressão protéica por *Western blot*

III.3.1. Extração das proteínas totais de *Xac*

As células de *Xac* coletadas como descrito anteriormente (item III) foram utilizadas para a extração das proteínas totais. Para isso, as células foram ressuspensas em 20 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM e benzamidina-HCl 1 mM e lisadas por sonicação (sonicador SONICS, Vibra Cell), com pulsos de 9 segundos durante 4 minutos. As proteínas totais foram quantificadas segundo método descrito por Hartree (1972) e 80 µg do extrato total de proteínas foram fracionados através de eletroforese SDS-PAGE gel 12% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, com uma diferença de potencial de 100 V no sistema de eletroforese Mini-Protean II (Bio-Rad).

III.3.2. Ensaio de *Western blot*

O extrato total das células, após fracionamento por eletroforese, foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicina 150 mM e metanol 20%, 100V, durante 2 horas utilizando o sistema TransBlot (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%). Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (anti-CopA ou anti-CopB nas diluições específicas) em TBST contendo leite durante 2 horas, lavadas com TBST três vezes, dez minutos cada lavagem, e incubadas com

anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:5.000). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBST e procedeu-se a revelação incubando as membranas durante 1 minuto e 30 segundos com 5 mL de uma solução tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, contendo ácido p-cumárico 0,2 mM e luminol 1,25 mM e 1,5 µL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Em seguida, as membranas foram expostas ao filme radiográfico Kodak T-Mat G/RA por 15 segundos, à temperatura ambiente.

III.4. Análise das proteínas diferencialmente expressas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

III.4.1. Extração e preparação das proteínas totais

A análise de proteínas induzidas ou reprimidas nas células crescidas na presença de cobre foi realizada por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Para esta análise duas condições de crescimento foram utilizadas, como descrito anteriormente: numa primeira condição as células foram crescidas na ausência de cobre durante 12 horas. Em seguida, solução de sulfato de cobre estéril foi adicionada para uma concentração final de 1 mM e amostras foram removidas antes da adição de sulfato de cobre e nos tempos de 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre. Em uma outra condição, as células foram crescidas na ausência e na presença de 1 mM de cobre e as células foram coletadas após 24 horas de crescimento. As células foram coletadas, lavadas duas vezes em tampão fosfato pH 7,2, contendo NaCl 150 mM e utilizadas para a extração de proteínas totais, conforme método descrito por Mehta and Rosato (2001). Para isso, as células foram ressuspensas em tampão de extração contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, 0,7 M de sacarose, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0,1 M e DTT 40 mM e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, o mesmo volume de fenol (saturado com Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) foi adicionado e a mistura foi agitada por 15 minutos em Vortex. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante (fase fenólica) foi recuperado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. No final desta etapa, as proteínas foram precipitadas pela adição de 5 volumes de NH₄Ac 0,1 M em metanol durante 2 horas a -20°C. As proteínas foram coletadas a 5.200 x g, durante 15 minutos, a 4°C. A seguir, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de uma solução de NH₄Ac 0,1 M em metanol e uma vez com 1

mL de acetona 80%. O precipitado foi seco e solubilizado em 100 μ L de Tris 40 mM, pH 8,0, uréia 9,0 M, Triton X-100 4% e. As proteínas foram quantificadas pelo Bio-Rad Protein Kit Assay e, aproximadamente, 200 μ g foram tratadas com o kit 2D Clean-Up (Amersham Biosciences), conforme indicações do fabricante. No final as proteínas foram ressuspensas em 250 μ L de tampão de rehidratação (uréia 8 M, Triton X-100 2% e traços de azul de bromofenol) contendo 0,5% de IPG buffer (de acordo com o gradiente de pH da fita utilizada para a focalização isoeletrica) e DTT 20 mg.

III.4.2. Ensaio de 2D-PAGE

As proteínas foram, primeiramente, submetidas à focalização isoeletrica em um sistema IPGPhor (Amersham Biosciences). Para isso, uma quantidade de, aproximadamente, 200 μ g das proteínas em IPG buffer e DTT foram aplicadas sobre tiras IPG (Immobiline DryStrip, Amersham Biosciences). Foram utilizadas tiras de 13 cm com gradientes de pH de 3 a 10 e de 4 a 7. As tiras foram colocadas em um suporte próprio (sarcófago de porcelana) e a focalização foi realizada da seguinte maneira: reidratação por 10 horas a 20°C, 500V por 1 hora, 1.000V por 1 hora e 15.000 Vh até atingir 17.500 Vh.

Após a focalização isoeletrica, as tiras foram reduzidas em 3 mL de uma solução contendo Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, traços de azul de bromofenol e DTT 200 mM, e alquiladas em 3 mL desta mesma solução contendo iodoacetamida 600 mM, sem DTT. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, as proteínas foram submetidas à segunda dimensão em gel SDS-PAGE 12% (16x18 cm). Para isso, as tiras, previamente equilibradas foram colocadas sobre os géis de poliacrilamida e seladas com uma solução de agarose 0,5% e traços de azul de bromofenol em tampão (10X: Tris 250 mM, pH 8,0, glicina 1,92 M e SDS 1%). A eletroforese foi mantida a 45 mA/gel.

Após eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e as proteínas diferencialmente expressas foram detectadas visualmente.

IV. Produção das proteínas CopA, CopB e CutC recombinantes em *E. coli*

IV.1. Subclonagem dos genes e produção das proteínas

Para a produção das proteínas recombinantes, os genes *copA*, *copB* e *cutC* foram subclonados nos vetores de expressão pET28a, para a produção da proteína fusionada a uma cauda de poli-His ou pGEX-4T-1, para a produção da proteína fusionada a glutathione S-transferase (GST). O gene *cutC* foi subclonado somente no vetor pET28a. Para a subclonagem, os produtos das reações de amplificação, assim como os vetores foram digeridos com as enzimas *NdeI/EcoRI* para a subclonagem dos genes *copA* e *copB*, ou *NdeI/BamHI* para a subclonagem do gene *cutC* em pET28a, ou com a enzima *EcoRI* para a subclonagem dos genes *copA* e *copB* em pGEX-4T-1. Os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 0,8%, purificados (kit *GeneClean*[®] II, Bio 101) e utilizados em diferentes reações de ligação. Os produtos das reações de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli*, linhagem DH10B. Clones de cada construção plasmidial foram isolados, o DNA plasmidial foi extraído e analisado através de digestão com enzimas de restrição de modo a liberar os fragmentos de tamanho correspondentes aos genes subclonados nos vetores de expressão. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8%.

Para a produção das proteínas recombinantes foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para uma análise inicial da produção, células competentes de *E. coli* foram transformadas com os plasmídeos (pET28a ou pGEX-4T-1) contendo os genes *copA*, *copB* e *cutC*. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT (triptona 1,6%, extrato de levedo 1,0%, NaCl 0,5% e glicose 0,2%), contendo kanamicina 30 µg/mL (pET28a) ou ampicilina 100 µg/mL (pGEX-4T-1) e cloranfenicol 200 µg/mL (pLysS) e deixadas crescer a 37°C, 250 rpm, por uma noite. Um volume de 100 µL dessa solução foi transferido para um Erlenmeyer contendo 10 mL do mesmo meio e incubados a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,6 a 0,8. Um volume de 1 mL de cada cultura foi retirado para análise das amostras antes da indução e às soluções restantes foram adicionados volumes de IPTG de modo a atingir concentrações finais variando de 0,1 a 0,5 mM. As culturas foram incubadas a 37°C e 250 rpm por mais 4 horas. Ao final deste período, volumes de 1 mL foram retirados e analisados, através de SDS-PAGE 12%, quanto à produção das referidas proteínas recombinantes.

Para a análise da solubilidade das proteínas recombinantes, clones expressando as diferentes proteínas foram inoculados em Erlenmeyers com 50 mL de meio e a produção das proteínas foi analisada em um volume de 500 mL do mesmo meio, sendo

que a indução foi feita com IPTG na concentração de 0,1 mM e um tempo de 6 horas. Ao final deste período, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 25 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, benzamidina-HCl 1 mM, lisozima 0,1 mg/mL e Triton X-100 1%). As células foram lisadas através de 3 passagens em French Press (Aminco) ajustada para 18.000 PSI. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C, o sobrenadante foi reservado e o precipitado ressuspenso em 25 mL do mesmo tampão de lise. Proteínas das amostras do precipitado e sobrenadante foram quantificadas pelo Bio-Rad Protein Kit Assay e analisadas através de SDS-PAGE para verificar se as proteínas eram solúveis (presente no sobrenadante) ou insolúveis (presente no precipitado).

IV.2. Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas foi realizada a partir de células de um clone positivo, previamente selecionado (quanto à produção e solubilidade da proteína recombinante) e crescidas em 1L de meio de cultivo, obedecendo à relação entre volume de pré-inóculo e volume de cultivo usada na análise da solubilidade. As células foram ressuspensas em 25 mL de tampão de lise (item IV.1), lisadas por French Press, o extrato celular foi centrifugado e o sobrenadante utilizado na purificação das proteínas.

IV.2.1. Proteínas fusionadas a GST

As proteínas fusionadas a GST foram purificadas por meio de cromatografia de afinidade utilizando a coluna glutationa sepharose 4B GSTrap de 5 mL (Amersham Pharmacia), seguindo instruções do fabricante. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão PBS 1X (NaCl 0,14 M, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, KH₂PO₄ 2 mM), contendo PMSF 1 mM e benzamidina-HCl 2 mM. Após o equilíbrio da coluna, foram aplicados 25 mL da amostra a um fluxo de 0,5 mL/min, recolhendo-se a fração que passou pela coluna (lavagem I). A coluna foi em seguida lavada com o mesmo tampão de equilíbrio e a lavagem foi monitorada por medidas de absorbância a 280 nm até valores próximos de zero. Esta fração (lavagem II) também foi recolhida para análise. A proteína foi então eluída com tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 e glutationa reduzida 10 mM), recolhendo-se frações de 5 mL. A coluna foi regenerada conforme instruções do fabricante e as frações coletadas durante a purificação foram analisadas por SDS-PAGE gel 12%.

IV.2.2. Proteínas fusionadas a cauda de poli-His

As proteínas foram purificadas por meio de cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel HiTrap Chelating de 5 mL (Amersham Pharmacia). A ativação e equilíbrio da coluna foram realizados conforme instruções do fabricante.

Após o equilíbrio da coluna, foram aplicados 25 mL da amostra a um fluxo de 0,5 mL/min, recolhendo-se a fração que passou pela coluna (lavagem I). A coluna foi em seguida lavada com tampão de lavagem (tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,5 M, imidazol 50 mM), recolhendo-se também essa fração (lavagem II). Foram feitas lavagens adicionais com tampão de lavagem, contendo 100 (lavagem III), 150 (lavagem IV) e 200 mM (lavagem V) de imidazol. As proteínas foram eluídas com tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,5 M, imidazol 300 ou 400 mM). A coluna foi regenerada conforme instruções do fabricante e as frações coletadas durante a purificação foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

Após a eluição das proteínas, duas diálises de 12 horas a 4°C foram realizadas em tampão Tris-HCl 4 mM, pH 7,6, para a proteína CopB e Tris-HCl 10 mM, pH 9,0 e NaCl 150 mM, para a proteína CutC. Após diálise, as proteínas foram liofilizadas, ressuspensas em água ultrapura e quantificadas para posterior produção de anticorpos em coelho. Para a análise por dicroísmo circular e fluorescência as proteínas não foram liofilizadas.

IV.3. Análise das proteínas recombinantes por dicroísmo circular e fluorescência

As proteínas purificadas e dialisadas foram quantificadas ou pelo Bio-Rad Protein Kit Assay ou usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,416 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a proteína CopB e $\epsilon = 0,326 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a proteína CutC) para análise por dicroísmo circular (CD), como uma análise estrutural preliminar. A concentração da proteína utilizada variou de 0,2 a 0,3 mg/mL. As análises de CD foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos, USP, laboratório da Profa. Dr. Leila M. Beltramini, utilizando o espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japan) e cubeta cilíndrica de quartzo de 1 cm. O espectro foi obtido num intervalo de 190 a 250 nm, a 25°C, após 16 corridas.

A proteína CutC também foi analisada por fluorescência. Esta análise também foi feita no mesmo local, utilizando o fluorímetro ISS K2 (ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation) e uma cubeta quartzo de 1 cm. A amostra contendo a proteína (0,3 mg/mL) foi excitada em 295 nm, para análise de triptofano e em 280 nm para analisar tirosina e triptofano e o espectro foi coletado na faixa de 280 a 460 nm.

IV.4. Produção de anticorpos em coelhos

A proteína CopB e CutC, fusionadas a cauda de poli-His, após purificação e diálise, foram liofilizadas, quantificadas e utilizadas para inocular coelhos. Como a proteína CopA recombinante foi produzida na forma insolúvel, o que dificultou a obtenção da proteína pura para a produção de anticorpos, um outro procedimento com este objetivo foi realizado. Para isto, o extrato total de *E. coli* contendo a proteína CopA recombinante, fusionada a cauda de poli-His ou a GST foi fracionado em gel SDS-PAGE gel 9% utilizando todas as canaletas do mesmo gel. Após eletroforese, as proteínas foram precipitadas no gel por incubação com KCl 0,25 M gelado por, aproximadamente, 5 minutos. A região do gel contendo a proteína foi removida e dialisada contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante a noite. A seguir, o gel foi macerado em N₂ líquido, o pó solubilizado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e a solução homogeneizada em adjuvante completo (para a primeira injeção) ou incompleto de Freund, e utilizadas para inocular coelhos. O procedimento utilizado foi descrito por Wengelnik *et al.* (1996).

IV.4.1. Imunização de coelhos

Para produzir os anticorpos em coelhos foram utilizados coelhos machos jovens. Esta parte do trabalho foi realizada nas dependências do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, o qual possui uma infraestrutura adequada para este fim. Para a primeira injeção no coelho, 500 µL contendo 250 µg da proteína CopB ou CutC ou o gel macerado contendo a proteína CopA diluída em tampão Tris-HCl, pH 7,5 (~500 µL) foram emulsificados em 500 µL de adjuvante de Freund completo e aplicado, via intradérmica, em diferentes locais no dorso do animal. Após o período de três semanas, uma nova injeção foi realizada utilizando a proteína CopA processada, como descrito acima, ou 150 µg das proteínas CopB e CutC, e

adjuvante de Freund incompleto. As injeções posteriores foram feitas com intervalo de quinze dias, nestas condições. Uma semana após a terceira injeção um pequeno volume de sangue foi colhido da orelha para verificar a produção de anticorpos (sangria de prova). Se necessário, novas injeções foram realizadas quinzenalmente. A sangria total foi realizada através de punção cardíaca.

IV.4.2. Análise da produção por *Western blot*

A produção dos anticorpos foi analisada por *Western blot*. Para a análise da produção do anticorpo anti-CopB e anti-CutC, o extrato total de *E. coli* produzindo essas proteínas recombinantes (aproximadamente 20 µg/canaleta) ou o extrato total de *Xac* (aproximadamente 130 µg de proteína/canaleta) crescida na ausência de cobre foram fracionados através de eletroforese SDS-PAGE gel 12%. Para a análise da produção do anticorpo anti-CopA, células de *Xac* foram coletadas 0,5 hora após a adição de 1 mM de cobre. O extrato protéico de *Xac* foi preparado conforme método descrito por Mehta and Rosato (2001) e fracionado através de eletroforese SDS-PAGE gel 12% (aproximadamente 75 µg/canaleta). As proteínas totais (extrato de *E. coli* e de *Xac*) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão Tris 20 mM, glicina 150 mM e metanol 20%, 100V, durante 2 horas. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%). A seguir, as membranas foram incubadas com várias diluições dos anticorpos em TBST contendo leite (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000) durante 2 horas, lavadas com tampão TBST três vezes, dez minutos cada lavagem, e incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (Bio-Rad). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBST e procedeu-se a revelação com NBT e BCIP.

V. Inativação do gene *copA*

Com o objetivo de comprovar o papel do gene *copA* no mecanismo de resistência a cobre, a inativação do gene foi realizada pela inserção de um transposon. Para isso, o gene *copA* foi, primeiramente, subclonado no vetor pUC18 e inserido de um transposon. A inativação *in vivo* foi realizada pela transformação de *Xac* com o plasmídeo contendo o gene inserido pelo transposon.

V.1. Subclonagem do gene *copA* no vetor pUC18

O gene *copA* foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos contendo nas extremidades 5' sítios de restrição para a enzima *EcoRI*. O fragmento amplificado foi digerido com esta mesma enzima, purificado e subclonado no mesmo sítio do vetor pUC18, após transformação da linhagem de *E. coli* DH10B com os produtos das reações de ligação.

Oito clones foram isolados, os DNAs plasmidiais foram extraídos (descrito no item VIII) e digeridos com a enzima *EcoRI*, para confirmar a subclonagem. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8%.

V.2. Inativação *in vitro* do gene

A reação de inserção *in vitro* do transposon (*KAN*) no gene *copA* foi realizada com o kit EZ:TN™ <KAN-2> (Epicentre) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Tecnologia (FCAV, UNESP, Jaboticabal) com a colaboração do Dr. Julio Cezar F. de Oliveira, Jovem Pesquisador no referido departamento. O esquema resumido da inserção *in vitro* pode ser observado na Figura 7. Para a reação, 0,2 µg do DNA plasmidial foram adicionados a 1,0 µL do tampão do kit (10 X), 0,1 pmol/µL do transposon EZ:TN <KAN-2>, 1,0 µL de transposase EZ:TN e água ultra pura estéril para um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. Ao final deste período, 1,0 µL da reação foi utilizado para a transformação por eletroporação de *E. coli* DH10B (método descrito em VII.2), utilizando o eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1500 Volts, capacitância de 25 µF e resistência de 300 Ω. Após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio 2YT e incubou-se a 37°C por 1 hora. As células foram plaqueadas em meio 2YT contendo 30 µg/mL de kanamicina, marca de resistência do transposon.

Quatro clones foram isolados, os DNAs plasmidiais foram extraídos, digeridos com a enzima *EcoRI* e os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8%. Para confirmar se o transposon foi inserido na seqüência do gene *copA*, os clones positivos foram, primeiramente, utilizados na amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos que anelam no gene *copA* (CopA-F e CopA-R). Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 0,8% e os insertos apresentando

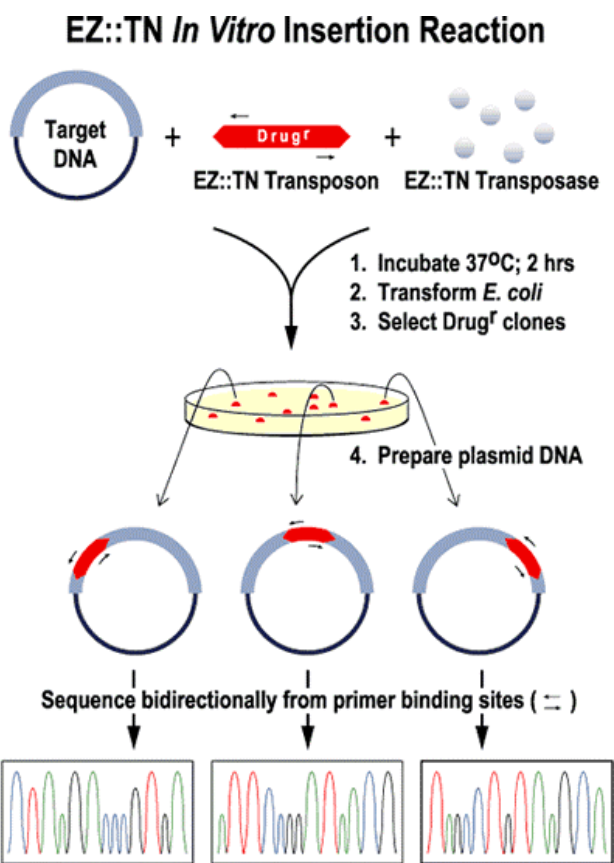


Figura 7 - Esquema resumido da inserção *in vitro* do transposon (Kit Epicentre).

tamanhos maiores que o gene *copA* (> 2.000 pb) foram seqüenciados para checar a posição do transposon dentro do gene. Apenas os plasmídeos contendo insertos carregando o transposon foram selecionados e utilizados para transformar células de *Xac*.

V.3. Preparo e transformação de células de *Xac*

Células de *Xac*, linhagem 306 foram preparadas para serem transformadas, de acordo com o método descrito por Sun *et al.* (2003), da seguinte maneira: inoculou-se a bactéria em placa contendo meio TSA. Após crescimento (48-72 horas a 28°C), uma alça da bactéria foi transferida para 20 mL de meio 210 (sacarose 0,5%, hidrolisado enzimático de caseína 0,8%, extrato de levedo 0,4%, K₂HPO₄ 0,3% e de MgSO₄.7H₂O 0,03%, pH 7,0) e após crescimento durante a noite, transferiu-se todo o volume da cultura para 500 mL do mesmo meio. As células foram crescidas a 28°C até atingir uma densidade óptica entre 0,5-0,6 a 600 nm, e em seguida, as células foram incubadas em gelo por 20 minutos e separadas por centrifugação durante 15 minutos a 4.000 rpm em centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810R. As células foram lavadas com 50 mL de glicerol 10% gelado, a seguir, com 20 mL e, em seguida, com 10 mL. No final, as células foram ressuspensas em 300 µL de glicerol e utilizadas na transformação.

Quantidades de 5, 10, 15 e 20 µg da construção plasmidial contendo o transposon na posição 408 pb do gene foram homogeneizadas com 50 µL de células em uma cubeta de eletroporação estéril em gelo. As células foram transformadas nas seguintes condições: 2400 Volts, capacitância de 25 µFa e resistência de 300 Ω em um eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad). Após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio TSA e incubou-se a 28°C por 2 horas, sob agitação moderada. As células foram plaqueadas em meio TSA contendo 50 µg/mL de kanamicina (seleção para o transposon).

V.4. Extração e análise do DNA genômico de *Xac*

Cinco clones foram isolados após transformação e os DNAs genômicos foram extraídos da seguinte maneira: colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio TSA contendo 50 µg/mL de kanamicina e crescidas por, aproximadamente, 20 horas a 28°C. As células foram coletadas em tubos Eppendorf por centrifugação e

ressuspensas em 560 μL de uma solução contendo Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 e EDTA 10 mM. Adicionou-se 5 μL de RNase 10 mg/mL e 75 μL de SDS 10% e a mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C. A seguir, um volume de 80 μL de NaAc 3 M, pH 6,8 foi adicionado e a mistura foi homogeneizada. Um volume de 400 μL de fenol saturado com tampão foi adicionado à solução, seguido de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e um volume de 400 μL de clorofórmio foi adicionado à solução, seguido de homogeneização e centrifugação. Um volume de, aproximadamente, 400 μL da fase aquosa foi transferido para tubos Eppendorf e o DNA genômico foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol, coletado por centrifugação e lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. O DNA foi dissolvido em 80 μL de água ultrapura.

O DNA genômico dos diferentes clones foi analisado em gel de agarose 0,8%, quantificado por leitura de absorbância a 260 nm e a presença do transposon interrompendo o gene *copA* foi analisada por PCR, *Southern blot* e sequenciamento de DNA.

V.4.1. Análise por PCR

A presença do transposon interrompendo o gene *copA* no DNA genômico dos clones foi primeiramente analisada por PCR. Para a amplificação foram utilizados oligonucleotídeos direto (CopA-F1), o qual anela na extremidade 5' da seqüência nucleotídica do gene *copA* e reverso (CopA-R), o qual anela na extremidade 3' do gene. Foram utilizados, como controles, o DNA genômico de *Xac* não transformada e o DNA plasmidial da construção contendo o gene *copA* inserido do transposon. A mistura de reação para a amplificação do gene *copA* continha: 200 ng de DNA plasmidial ou 5 μg de DNA genômico, 2,0 μL de MgSO_4 50 mM, 100 pmols dos oligonucleotídeos direto e reverso, 5,0 μL de tampão específico da enzima (10 X), 1,5 μL de dNTPs 10 mM, 0,5 μL de Platinum *Pfx* DNA Polimerase (2,5 U/ μL , Invitrogen) e água ultrapura estéril de modo a completar o volume da reação para 50 μL . A PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 96°C por 6 minutos seguida de 39 ciclos de 96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 68°C por 3 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

V.4.2. Análise por Southern blot

Para esta análise, 10 µg de DNA genômico foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*. As amostras foram separadas em gel de agarose 1% em tampão 1X TAE e transferidas para uma membrana de Nylon positivamente carregada (Hybond XL, Amersham) por capilaridade, com uma solução de NaOH 0,4 M. A pré-hibridização, a hibridização e a lavagem da membrana foram feitas como descrito no item III.2.2. Após as lavagens, a membrana foi exposta ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA) por quatro horas, a -80°C. Foram utilizados como sonda o fragmento *XhoI-SalI* de 1000 pb do transposon (Figura 8) e o gene *copA* (1782 pb), marcados radioativamente (item III.2.4).

V.4.3. Análise por sequenciamento de DNA

Uma vez confirmada a presença do transposon interrompendo o gene *copA* por PCR e *Southern blot*, foi necessário conhecer em que posição do gene o transposon foi inserido após os eventos de recombinação homóloga. Para isso, os fragmentos de DNA genômico, amplificados por PCR, foram separados em gel de agarose e purificados utilizando o kit *GeneClean*[®] II (Bio 101) e, aproximadamente, 400 ng foram utilizados para a reação de sequenciamento de DNA. Paralelamente, a construção plasmidial contendo o gene *copA* interrompido pelo transposon também foi seqüenciada para a confirmação da localização do transposon no gene. Para o sequenciamento utilizamos os oligonucleotídeos específicos para o transposon: KAN-2F (5'-ACCTACAACAAGCTCTCATCAACC-3') e KAN-2R (5'-GCAATGTAACATCAGA GATTTTGAG-3'), os quais anelam nas extremidades do transposon, como indicado na Figura 8. As seqüências obtidas foram analisadas por Blastn contra a seqüência genômica de *Xac* (<http://genoma4.iq.usp.br>).

V.5. Avaliação do crescimento *in vitro* das células mutantes na presença de cobre

As células dos clones contendo o transposon inserido no gene *copA* (linhagens $\Delta copA$) foram avaliadas em relação ao crescimento na ausência e na presença de várias concentrações de cobre. Para isso, as células mutantes ($\Delta copA$) e as células da

EZ::TN™ <KAN-2> Transposon
(1221 bp.)

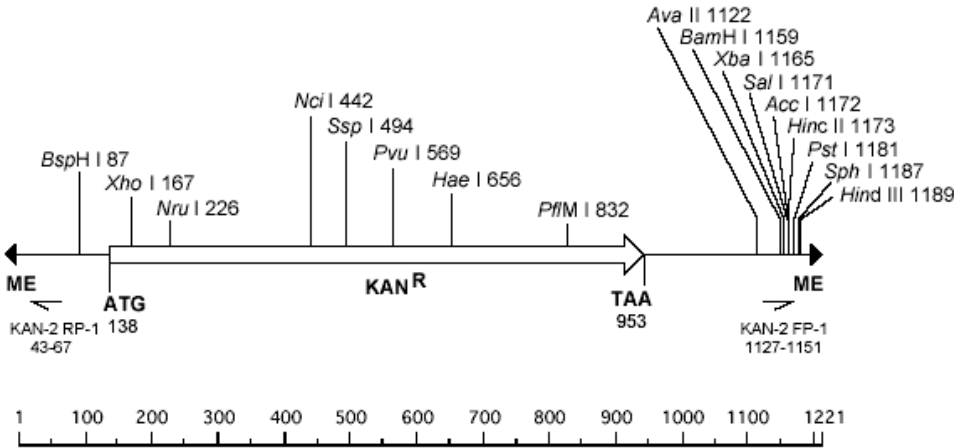


Figura 8 - Representação esquemática do transposon EZ:TN <KAN-2>.

linhagem selvagem (controle) foram rejuvenescidas em meio TSA sólido contendo ou não kanamicina 50 µg/mL (para as células mutantes) e, após o crescimento, uma alça das células foi inoculada em 50 mL de meio Agar Nutriente e crescidas a 28°C, durante a noite, a 250 rpm.

Um volume deste pré-inóculo (suficiente para uma densidade óptica de aproximadamente 0,5 a 550 nm) foi transferido para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio Agar Nutriente na ausência ou na presença de CuSO₄·5H₂O 1,0 mM em uma avaliação inicial e, em outra avaliação na presença de CuSO₄·5H₂O nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mM. O pH dos meios foi mantido ao redor de 7,0 com a adição de tampão fosfato ao meio de cultura. As culturas foram crescidas a 250 rpm e 28°C. O crescimento das células na ausência e na presença de cobre foi acompanhado através de medidas de turbidimetria a 550 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU640, após 24 horas de cultivo.

V.6. Avaliação das células mutantes *in vivo*

As células mutantes também foram avaliadas *in vivo* em relação à capacidade de induzirem os sintomas do cancro cítrico em folhas jovens de limão cravo e de laranja, na ausência e na presença de cobre. Este experimento foi realizado em uma casa de vegetação específica para o trabalho com *Xac*, localizada na FCAV, UNESP, Jaboticabal, com a colaboração do Dr. Julio C. F. de Oliveira. Para isso, as células mutantes e as células selvagem (controle) foram rejuvenescidas em meio TSA sólido contendo ou não 50 µg/mL de kanamicina (para as células mutantes). Após o crescimento (42 horas), uma pequena quantidade das células foi ressuspensa em 200 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e a concentração bacteriana foi ajustada para uma densidade óptica de 0,3 a 600 nm. Foram utilizados como controles: água ultrapura estéril, tampão fosfato de potássio 0,1 M, soluções de 1 mM e 10 mM de CuSO₄·5H₂O em tampão fosfato, para analisar o efeito do cobre na planta e células de *Xac* selvagem e mutante na ausência de cobre.

Para avaliar a capacidade de infecção da bactéria na planta, na presença e ausência de cobre, foram adicionados às células volumes de uma solução 200 mM de CuSO₄·H₂O de modo a obter concentrações finais de 0,25, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 e 2,0 mM de cobre. As suspensões bacterianas foram utilizadas para inocular folhas de mudas de limão cravo e laranja, as quais foram selecionadas de modo a trabalhar com folhas

jovens e sãs. O inóculo foi feito no dorso da folha, onde, primeiramente, foi feita uma injúria (pequena lesão) na cutícula da folha com a ponta de uma agulha de 1 mL e, posteriormente, as células foram inoculadas no local da injúria, através de compressão, usando uma seringa sem agulha, até que fosse observada uma região úmida ao redor da injúria. Em cada folha foram aplicadas as células mutantes e selvagem, na ausência e na presença das diferentes concentrações de cobre. As plantas foram mantidas no laboratório de plantas (FCAV, UNESP, Jaboticabal), com luz artificial, temperatura de 28°C e equipamento para filtragem do ar (filtro HEPA).

V.7. Avaliação do crescimento *in vivo*

O crescimento das células mutantes e selvagem na presença de cobre também foi avaliado *in vivo* através da contagem do número de células presentes em folhas de limão cravo. Para isso, as células foram rejuvenescidas em meio TSA contendo ou não 50 µg/mL de kanamicina, colônias isoladas foram ressuspensas em tampão fosfato e a concentração bacteriana foi ajustada para uma densidade óptica de 0,01 a 600 nm. A seguir, as células foram diluídas 10X e um volume de uma solução 200 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado de modo a obter uma concentração final de 1 mM de cobre. As células na presença de cobre foram utilizadas para infectar folhas jovens de limão cravo, como descrito no item anterior. O experimento foi feito em triplicata, sendo que para cada variável foram retirados 3 discos de 0,9 cm de diâmetro da região da folha infectada com as células. Os discos foliares foram removidos nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 após a infecção das folhas com as suspensões bacterianas. A seguir, os discos foram macerados em 1 mL de água ultra-pura estéril e diluições variando entre 10^{-1} a 10^{-12} foram plaqueadas em meio contendo ou não kanamicina. Após 48 horas, foi feita a contagem do número de colônias resultantes do crescimento celular.

VI. Análise da interação das proteínas CopA, CopB e CutC com proteínas de Xac através do ensaio de duplo híbrido de leveduras

O ensaio de duplo híbrido de leveduras, foi utilizado com o objetivo de investigar se as proteínas CopA, CopB e CutC interagem com alguma proteína da bactéria e quem são essas proteínas. O plasmídeo pOBD2, a linhagem de levedura, bem como a biblioteca genômica de Xac, construída no plasmídeo pOAD foram cedidos pelo Prof.

Dr. S. C. Farah, Instituto de Química, USP, São Paulo. Para este estudo os genes foram subclonados no vetor pOBD2 e as proteínas utilizadas como iscas na busca de proteínas que interagem com as mesmas.

VI.1. Subclonagem dos genes *copA*, *copB* e *cutC* no vetor pOBD2

Os genes *copB* e *cutC* foram retirados do vetor de expressão pET28a (construção utilizada para produção das proteínas recombinantes em *E. coli*) através da digestão com as enzimas *NdeI* e *NotI*, purificados e subclonados nos mesmos sítios do vetor pOBD2 (Figura 9) *in frame* ao domínio de ligação do fator de transcrição Gal4. Este vetor foi previamente modificado no laboratório do Dr. Farah, pela introdução dos sítios de restrição *NdeI*, *SmaI* e *NotI* entre os sítios *SalI* e *PstI*. Para a subclonagem do gene *copA* uma outra estratégia foi utilizada. O plasmídeo pET28a contendo o gene foi digerido inicialmente com a enzima *NdeI* (a qual apresenta um sítio na seqüência do gene), o fragmento de DNA foi purificado e subclonado no mesmo sítio do vetor pOBD2 desfosforilado. Plasmídeos do vetor pOBD2 contendo o inserto na orientação correta e do vetor pET28a foram novamente digeridos com *KpnI* e *NotI*, o inserto isolado do vetor pET28a foi purificado e subclonado no vetor pOBD2, reconstituindo a seqüência codificadora inteira do gene *copA*.

A linhagem de *E. coli* DH10B foi transformada com os produtos das reações de ligação, os clones foram isolados, os DNAs plasmidiais foram extraídos e digeridos com as enzimas *SalI* e *NotI*. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8%. A subclonagem dos genes também foi checada por sequenciamento de DNA.

VI.2. Preparo e transformação de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*

A linhagem PJ694-a (*MATa trp leu ura his gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met::GAL7-lacZ*) (JAMES *et al.*, 1996) foi utilizada no ensaio de duplo-híbrido. Células competentes de *S. cerevisiae* foram preparadas para serem transformadas com os plasmídeos pOBD2 de acordo com o método que utiliza acetato de lítio (ITO *et al.*, 1983), da seguinte maneira: inoculou-se uma colônia isolada da levedura em 5 mL de meio YAPD (extrato de levedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e

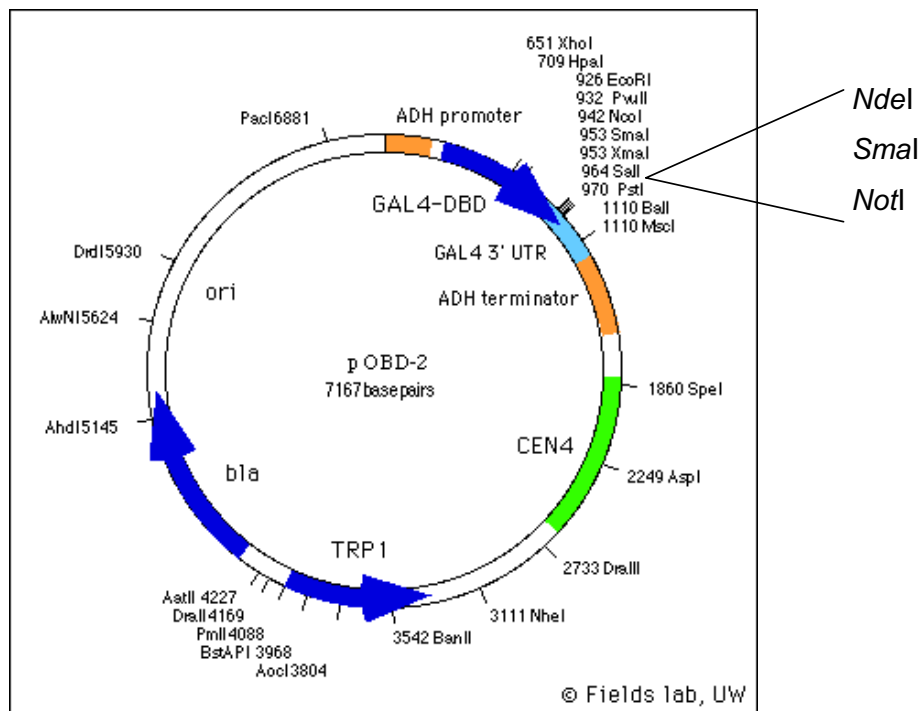


Figura 9 - Mapa físico do vetor pOBD2. O plasmídeo contém o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4 e mostra o sítio de policonagem modificado (HUDSON, *et al.*, 1997).

adenina 0,008%). Após crescimento durante a noite a 30°C, transferiu-se 1 mL da cultura para tubo Falcon de 50 mL contendo 20 mL de meio YAPD e as células foram incubadas a 30°C e 250 rpm até uma densidade óptica entre 1,0 e 2,0 a 600 nm. Atingindo essa densidade óptica, as células foram coletadas em centrífuga refrigerada Eppendorf a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com 15 mL de tampão LITE (acetato de lítio 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4 e EDTA 0,001 M, pH 8,0) gelado estéril. Em seguida, o precipitado celular foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão LITE, incubado primeiro a 30°C e 250 rpm durante 1h e depois em banho de gelo até o momento da transformação.

Aproximadamente 1 µg de cada um dos plasmídeos contendo os genes *copA*, *copB* e *cutC* foi utilizado para transformar alíquotas de 100 µL de células competentes de *S. cerevisiae*, na presença de 10 µL de DNA esperma de salmão (10 µg/mL) desnaturado como carreador. A suspensão foi homogeneizada cuidadosamente e incubada a 30°C por 30 minutos sem agitação. Em seguida, foi adicionada uma solução 40% de PEG 8000 em tampão LITE, a mistura foi incubada sem agitação a 30°C por 1 h e transferida para 42°C, durante 15 minutos. Após o choque térmico, a solução contendo PEG 8000 foi removida por centrifugação, o precipitado celular foi ressuspenso em água ultrapura estéril, semeado em placas contendo meio mínimo SC-Trp (Yeast Nitrogen Base 0,67% sem sulfato de amônio e sem aminoácidos, glicose 2% e drop-out-Trp 0,15%) e incubado a 30°C até o aparecimento de colônias.

VI.3. Teste de auto-ativação do gene repórter *HIS* com as iscas

Os clones contendo as iscas de interesse foram crescidos em meio SC-Trp líquido a 30°C por 24 horas. Após o crescimento, 10 µL da suspensão foram diluídos em 1 mL de água e contadas em câmara de Neubauer. A partir dos valores obtidos calculou-se a diluição que continha, aproximadamente, 10 células/µL e 50 µL desta diluição foram depositados na superfície de placas contendo meio SC-Trp-His (drop-out-Trp-His) na ausência e na presença de 3-aminotriazol (3-AT) nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 25 e 50 mM. As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e a concentração inibitória de 3-AT foi determinada para cada clone. A presença do 3-AT é necessária para inibir a ativação do gene repórter *HIS* pelas iscas.

VI.4. Transformação da linhagem de levedura com a biblioteca de *Xac* e seleção dos clones

A biblioteca de *Xac* utilizada no ensaio de duplo-híbrido foi construída utilizando uma mistura de fragmentos de 500-1500 pb e de 1500-3000 pb, obtidos por nebulização, fusionados ao domínio de ativação do fator de transcrição *GAL4* no vetor pOAD (Figura 10). As células de levedura contendo os diferentes plasmídeos de interesse foram transformadas com a biblioteca genômica de *Xac*. Para isso, essas células foram inoculadas em 50 mL de meio SC-Trp a 30°C, sob agitação por 16 horas (pré-inóculo). Após crescimento, as células foram contadas em câmara de Neubauer e calculou-se o volume de pré-inóculo necessário para um total de $7,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas e inoculadas em 150 mL de meio YAPD. As células foram novamente incubadas a 30°C sob agitação até atingir uma densidade óptica de, aproximadamente, 0,8 a 600 nm. As células foram coletadas em 3 tubos Falcon de 50 mL a 4.000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada, lavadas com 25 mL de água ultrapura estéril e ressuspensas em um único tubo com 3 mL de tampão LITE. A suspensão foi incubada a 30°C por 15 minutos, em banho-maria, centrifugada e o sobrenadante foi desprezado.

Ao precipitado foram adicionados os seguintes componentes na ordem em que são citados: 8,3 mL de PEG 8000 40% em tampão LITE, 300 µL de DNA esperma de salmão (10 mg/mL), 30 µL da biblioteca genômica de *Xac* (1 mg/mL) e 2,15 mL de água ultra pura estéril. A mistura foi homogeneizada em Vortex e incubada a 30°C por 30 minutos em banho-maria, agitando-se gentilmente os tubos a cada 10 minutos. Após este período, a mistura foi submetida a choque térmico a 42°C por 45 minutos em banho-maria, agitando-se os tubos a cada 5 minutos. A seguir, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos e as células foram ressuspensas em 5 mL de água ultra pura estéril e 500 µL desta suspensão foram plaqueadas em 10 placas com meio SC-Trp-Leu-His-Ade (drop-out-Trp-Leu-His-Ade) contendo 3-AT 3 mM. Em 3 placas contendo SC-leu, foram plaqueados 50 µL de uma diluição 1:100 das misturas (controle do número de transformantes totais). As placas foram incubadas a 30°C durante, aproximadamente, 20 dias, no decorrer dos quais realizamos a contagem de colônias e repiques dos clones positivos para novas placas SC-Trp-Leu-His-Ade contendo 3 mM de 3-AT devidamente identificadas. As marcas *TRP* e *LEU* são as marcas de seleção dos vetores e *HIS* e *ADE* são genes repórteres.

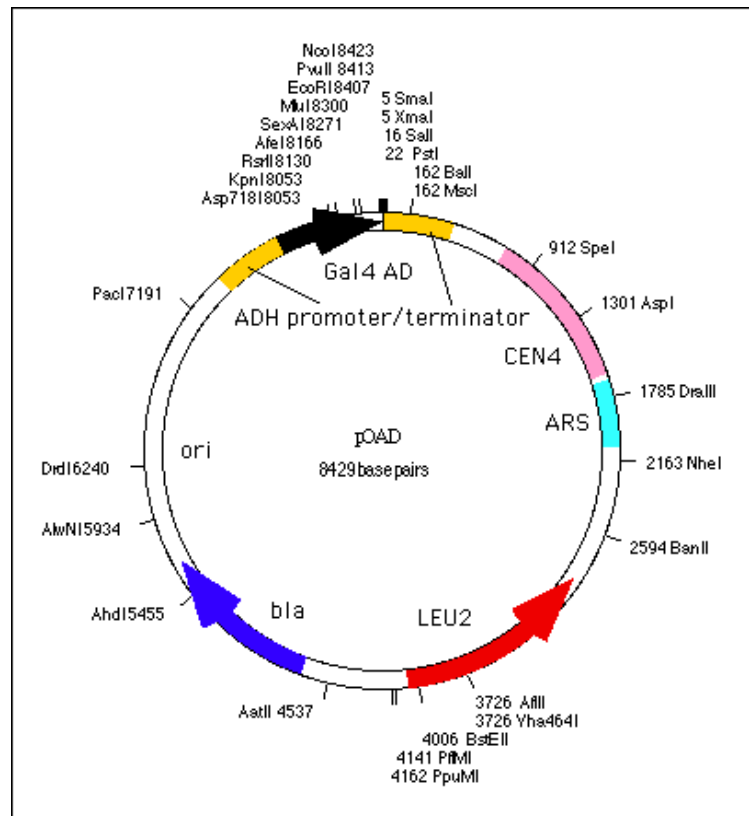


Figura 10 - Vetor pOAD contendo o domínio de ativação do fator de transcrição Gal4. A biblioteca foi construída através da clonagem dos fragmentos de DNA genômico no sítio *PvuII* (HUDSON, *et al.*, 1997).

As colônias que novamente cresceram em meio seletivo foram avaliadas em relação à atividade β -galactosidase, um outro gene repórter. O ensaio de atividade qualitativo foi realizado nas células transferidas para membranas de nitrocelulose. Primeiramente, foi preparada uma solução contendo 100mL de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,61%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,55%, KCl 0,075% e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0246%, pH 7,0), 270 μL de β -mercaptoetanol e 1,67 mL da solução estoque de X-Gal (20 mg/mL em N,N-dimetilformamida). Esta solução foi utilizada para umedecer discos de papel Whatmann 3MM mantidos em placas de Petri fechadas até seu uso. Em seguida, as células dos transformantes foram transferidas para as membranas de nitrocelulose (replica plate) e congeladas durante 10 segundos em nitrogênio líquido. As membranas foram descongeladas à temperatura ambiente, e em seguida, foram depositadas sobre os discos de filtro umedecidos e deixadas à temperatura ambiente até o desenvolvimento da cor azul. O aparecimento da cor foi considerado dentro do tempo de 30 min a 30 h. O procedimento utilizado foi descrito por Rose and Botstein (1983).

VI.5. Análise dos clones e seleção das presas

Os clones que apresentaram atividade β -galactosidase foram utilizados para a recuperação dos plasmídeos e sequenciamento do DNA. O DNA foi extraído das células de levedura de acordo com o método descrito por Hoffman and Winston (1987): cerca de 1,5 mL das culturas de células crescidas em meio SC-trp-leu a 30°C e 250 rpm durante a noite foram transferidos para tubos Eppendorf, centrifugados por 1 minuto a 18.000 x g em centrifuga Eppendorf e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200 μL de uma solução contendo Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, e EDTA 1 mM. A esta mistura foi adicionado 200 μL de uma solução contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e 0,3 g de contas de vidro (450-600 μm). As células foram lisadas em Vortex com ciclos de 2 minutos, os quais foram repetidos 3 vezes. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para novo tubo Eppendorf. O DNA foi precipitado pela adição de igual volume de isopropanol, coletado por centrifugação, lavado 2 vezes com 500 μL de etanol 70%, ressuspenso em 50 μL de água ultra pura e analisado em gel de agarose 0,8%.

Após a extração de DNA, os plasmídeos pOBD2 e pOAD foram recuperados pela transformação de células de *E. coli* DH10B por eletroporação. As células foram

plaqueadas em meio 2YT contendo 100 µg/mL de ampicilina (marca de seleção dos dois plasmídeos). Nesta etapa foram isolados os dois plasmídeos. Quatro colônias de cada clone inicial foram analisadas (devido à possibilidade de que cada colônia deve carregar apenas um dos dois plasmídeos). Os DNAs plasmidiais foram extraídos e, aproximadamente, 400 ng foram utilizados para a reação de sequenciamento. Para o sequenciamento utilizou-se um oligonucleotídeo específico para o vetor pOAD, o qual anela no domínio de ativação do fator de transcrição *GAL4* (5'-GCGTTTGGGAATCACTACAGG-3'). Desta maneira, apenas as colônias que carregam o plasmídeo pOAD com o inserto de interesse foram selecionados.

Após eliminar a seqüência do vetor, as seqüências obtidas foram analisadas pelo programa Blastx contra a seqüência genômica de *Xac* (<http://genoma4.iq.usp.br>). Após o sequenciamento e identificação das seqüências, as ORFs foram analisadas quanto a sua possível relação fisiológica e regiões de interação com as proteínas CopA, CopB e CutC e, então, selecionadas para confirmar as interações com estas proteínas.

VII. Preparo e transformação de células competentes de *E.coli*

VII. 1. Método Cloreto de Cálcio

Células competentes de *E. coli*, linhagem DH10B, foram preparadas para serem transformadas, de acordo com Sambrook and Russell (2001), da seguinte maneira: a partir de um estoque de *E. coli* DH10B mantido a -80°C, inoculou-se a bactéria em 5 mL de meio 2YT. Após crescimento (12-14 horas a 37°C), transferiu-se 3 mL desta cultura para 100 mL de meio 2YT e aguardou-se até esta atingir densidade óptica de, aproximadamente, 0,7, medida a 600 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU640. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm em centrífuga de bancada refrigerada e lavadas com 25 mL de cloreto de cálcio 100 mM (gelado). No final as células foram ressuspensas em 4 mL de cloreto de cálcio 100 mM e, a elas, foi adicionado 80% de glicerol. As células foram aliquotadas e estocadas a -80°C.

Para a transformação, um volume do produto da reação de ligação ou plasmídeo foi adicionado a 100 µL de células de *E. coli* DH10B competentes e a mistura incubada em gelo por 30 minutos. A seguir, submeteu-se a mistura a choque térmico à 42°C por

2 minutos e, logo após, adicionou-se 400 μ L de meio 2YT. Incubou-se a 37°C por 1 hora e as células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

VII. 2. Eletroporação

Células competentes de *E. coli*, linhagem DH10B, foram preparadas para serem transformadas por eletroporação da seguinte maneira: a partir de um estoque de *E. coli* DH10B mantido a -80°C, inoculou-se a bactéria em 50 mL de meio 2YT. Após crescimento (12-14 horas a 37°C), transferiu-se 15 mL desta cultura para 500 mL de meio 2YT e as células foram crescidas até esta atingir densidade óptica de, aproximadamente, 0,6, a 600 nm. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm em centrífuga de bancada refrigerada e lavadas duas vezes com 200 mL de glicerol 10% (gelado). A seguir, as células foram sucessivamente lavadas com 20 mL e 2 mL de glicerol 10%. No final, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% e estas foram aliqotadas (40 μ L) e estocadas a -80°C. As células foram homogeneizadas com o DNA a ser transformado em uma cubeta de eletroporação estéril com 0,2 cm de espessura (Bio-Rad), em gelo. As células foram transformadas por eletroporação utilizando o eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1500 Volts, capacitância de 25 μ Fa e resistência de 300 Ω . Após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio 2YT e incubou-se a 37°C por 1 hora. As células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

VIII. Extração e análise de DNA plasmidial

A extração plasmidial foi realizada pelo método descrito por Holmes and Quigley (1981), como descrito a seguir. Cerca de 1,5 mL da cultura de células foram transferidos para tubos Eppendorf, centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensão em 350 μ L de uma solução contendo 8,0% de sacarose, 0,5% de Triton X-100, 50 mM de EDTA pH 8,0 e 10 mM de Tris pH 8,0, e 25 μ L de 10 mg/mL de lisozima. A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 40 segundos, resfriada imediatamente em congelador por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos.

O precipitado foi retirado e descartado, sendo os ácidos nucléicos precipitados com 40 μ L de 3 M de acetato de sódio e 420 μ L de isopropanol. A seguir, o material foi

centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 100 μ L de água ultrapura. Um volume de 100 μ L de Fenol saturado com tampão foi adicionado à solução, homogeneizada e centrifugada. Um volume de 80 μ L da fase aquosa foi transferido para tubos Eppendorf e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 μ L de 7,5 M de acetato de amônia e 300 μ L de 95% de etanol gelado. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 500 μ L de 70% de etanol gelado. O DNA foi dissolvido em 10 μ L de água ultrapura.

A análise das amostras de DNA plasmidial foi feita em gel de agarose 0,8% em tampão 1X TAE (40 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 19 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA), contendo 0,5 μ g/mL brometo de etídeo. Antes da aplicação das amostras no gel, foram adicionados 3 μ L de tampão 80 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 40% de sacarose e 0,1% de azul de bromofenol. Foi utilizado como marcador de massa molecular o DNA 1 kb ladder (Gibco), para as reações de digestão. O gel foi analisado em transiluminador de luz UV.

IX. Outros métodos moleculares

Todas as enzimas de restrição utilizadas foram as enzimas New England Biolabs e os protocolos de digestão foram específicos para cada enzima, de acordo com instruções do fabricante. Os produtos das reações de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão 1X TAE (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0, ácido acético 19 mM e EDTA 1 mM), contendo brometo de etídeo 0,5 μ g/mL.

As reações para sequenciamento automático do DNA foram realizadas em termociclador, utilizando-se o kit *Big Dye* (Perkin Elmer). A metodologia utilizada foi baseada na reação de Sanger *et al.* (1977), através da utilização de trifosfatos de didesoxinucleosídeos marcados com corantes fluorescentes derivados da rodamina. Durante o sequenciamento foi utilizado o seqüenciador automático ABI PRISM-377 DNA SEQUENCER (Perkin Elmer). Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 400 ng de DNA, 3,2 pmols de oligonucleotídeos direto ou reverso, 2 μ L de tampão Tris-HCl 200 mM, pH 9,0 e $MgCl_2$ 5 mM e 2 μ L do kit *Big Dye* (Perkin Elmer). A reação em termociclador consistiu de 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos, após desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos. O DNA foi precipitado pela adição de 80 μ L de isopropanol 70%, lavado com 1 mL de

etanol 70% por 2 vezes e, após secagem à temperatura ambiente, estocado a -20°C até o momento do uso.

Resultados

Para facilitar o acompanhamento, os resultados foram subdivididos em seis partes diferentes.

Parte I. Amplificação dos genes *copA*, *copB* e *cutC*. Seqüências polipeptídicas das proteínas

Uma suspensão bacteriana foi utilizada para a amplificação de *cutC* e para a amplificação dos genes *copA* e *copB* foram utilizados os clones 6205G06 e 6704A03, respectivamente, contendo as seqüências codificadoras inteiras dos genes. Para isso, diferentes protocolos de amplificação tiveram que ser usados, como descritos em Materiais e Métodos. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 0,8% e a Figura 11 mostra os fragmentos amplificados. De acordo com as seqüências dos genes *copA*, *copB* e *cutC*, eram esperadas bandas em torno de 2000, 1000 e 800 pb, respectivamente e a figura mostra a presença de bandas únicas correspondentes aos pesos moleculares esperados.

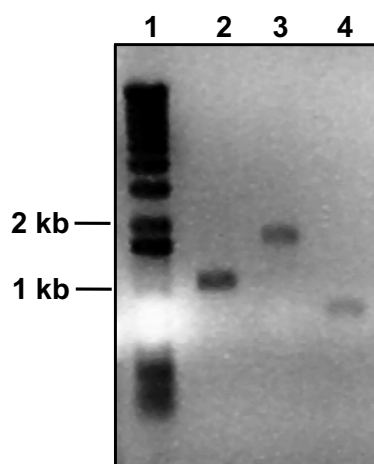


Figura 11- Amplificação dos genes *copA*, *copB* e *cutC* de *Xac*. 1 - padrão de Peso Molecular 1 kb Ladder, 2, 3 e 4 - fragmentos amplificados de *copB*, *copA* e *cutC*, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pMOSBlue, seqüenciados para a confirmação das suas seqüências nucleotídicas e subclonados em diferentes vetores de acordo com os experimentos descritos nesta parte.

As seqüências polipeptídicas das proteínas, deduzidas a partir das seqüências nucleotídicas, foram utilizadas na comparação com as mesmas proteínas de outras bactérias patogênicas. A Figura 12 mostra um alinhamento de seqüências da proteína CopA com outras bactérias fitopatogênicas. Através do alinhamento é possível observar uma alta identidade entre a proteína CopA de *Xac* e a mesma proteína de outros fitopatógenos, as quais possuem identidade variando de 60% (*P. pv. tomato*, *P. pv. syringae*, *X. pv. juglandis* e *X. pv. vesicatoria*) a 84% (*X. pv. oryzae* e *X. pv. campestris*). Também observamos pela figura, duas regiões distintas de alta homologia, uma compreendendo a região N-terminal até grande parte da proteína e a região C-terminal, indicando um provável arranjo estrutural de dois domínios diferentes para a função de CopA. Esta proteína contém um provável sítio de ligação ao cobre tipo-1 na extremidade C-terminal similar ao sítio tipo-1 presente nas multicobre oxidases, cuja estrutura geral é His-X₄₈-Cys-X₄-His-X₄-Met. Na proteína de *Xac* este sítio está presente nos resíduos de aminoácidos His-526, Cys-575, His-580 e Met-585.

A Figura 13 mostra um alinhamento de seqüências da proteína CopB com a mesma proteína de outros fitopatógenos, as quais possuem uma boa homologia com identidade variando de 40% (*P. pv. tomato*, *P. pv. syringae*, *X. pv. juglandis* e *X. pv. vesicatoria*) a 60% (*X. pv. oryzae* e *X. pv. campestris*). Podemos observar uma grande extensão de aminoácidos na região N-terminal da proteína CopB de *X. pv. campestris* que não existe nas outras proteínas. Embora a região N-terminal da proteína tenha baixa homologia, a região C-terminal é bem conservada entre os diferentes fitopatógenos.

Um alinhamento de seqüências da proteína CutC com a mesma proteína de *E. coli* e com uma proteína envolvida na homeostase de cobre em *Xyllela fastidiosa* foi feito e é mostrado na Figura 14. CutC de *Xac* possui 44% de identidade com a proteína CutC de *E. coli* e 72% de identidade com a proteína de *Xyllela fastidiosa*. Embora seja uma proteína pequena, podemos observar pela figura que a região central da proteína é bem conservada entre as bactérias.

X.citri 1 -----MSFDPPFESHGSTASGLSRRRFVQGLALGGI
X.orysae 1 MAVIGPARALRGFSQLCDASVLTMTERTGDVMSFDSPCSDASSNGLSRRRFVQGLALGGI
X.campestris 1 -----MSFDPLSNGLARRRFVHGLALGGV
X.juglandis 1 -----MSFDSSDSRNGGPRHVSRRHFVQGLASGGA
X.vesicatoria 1 -----MSHDDFRGPHGGPLLPSRRRFVQGLALGGA
P.tomato 1 -----MESRTRRRTFVKGLAAAGV
P.syringae 1 -----MPTRTRRRTFVKGLAASGL

X.citri 31 AASG-LWRNDARA~~AAQANTPVLR~~-GSSQSLQIGRLPVNFTGRPRSAITVNO~~SLPAPTLRW~~
X.orysae 61 AVAGGLWRRDARA~~AATPANTPVLR~~-GSSQSLQIGRMPVDFTRTRPAITVNO~~RLPAPILRW~~
X.campestris 26 AAATGLWRSEARA~~TAPAYATPAVLR~~GAAALQIGRMPVNL~~TGRARS~~AITVNO~~SLPAPTLRW~~
X.juglandis 31 VATLGLWPQLSWALKGSGQSNVLSGTEFDLAIGETPVNFTGRARPAITVNGS~~IPAPLLRW~~
X.vesicatoria 31 VAGLGFWPKASWALKGCPQANVLSGTEFDLITGETPVNFTGKTRTAITVNGSV~~PAPLLRW~~
P.tomato 20 LGGLGLWRSPSWAASGSPALSVLSGTEFDLSIGEMPVNI~~TGRRRTAMAINGL~~CP~~LLRW~~
P.syringae 20 LGGLGLWRSPAWAVANPQPNGLSGTEFDLYIGETQVNI~~TGNAKTAQTINGG~~IP~~LLRW~~

X.citri 89 REGDTVSVRVR-----NALTDQPTSVHWHGILLPANMDGVP~~PGMSFDGIAPGQBYHYRFAL~~
X.orysae 120 REGDTVSVRVR-----NALTDQPTSVHWHGILLPANMDGVP~~PGMSFDGIAPGQBYHYRFAL~~
X.campestris 86 REGDTVSVRVR-----NALADQPTSVHWHGILLPANMDGVP~~PGMSFDGIAPGQBYLYRFAL~~
X.juglandis 91 REGTIVNLRVSNVLPAESIHGHETS~~IHWGILLPANMDGVP~~GLSFAGIGR~~EDTYHYRFTV~~
X.vesicatoria 91 REGTIVNLRVSNALPANS~~LHGTDTSIHWGILLPANMDGVP~~GLSFDGIGR~~ETTYHYRFTL~~
P.tomato 80 KEGDVTILRVRN-----RLDAATS~~IHWGILLPANMDGVP~~GLSFAGIEPG~~GVVYVYQFKV~~
P.syringae 80 REGDVTILRVKN-----RLDEATS~~IHWGILLPANMDGVP~~GLSFDGIAP~~DCMYVYRFKV~~

X.citri 144 RQSGTYWYHSHSMFQEQSGLYGAI~~VIDPLVPPPYRH~~DREHVLLS~~DWTDLDPAALF~~RRLK
X.orysae 175 RQSGTYWYHSHSMFQEQAGLYGAI~~VIDPLTPPPYRH~~DREHVLLS~~DWTDLDPAALF~~RRLK
X.campestris 141 RQSGTYWYHSHSMFQEQAGLYGAI~~VIDPLAPPPYR~~DREHVLLS-~~DWTDLDPAALF~~RRLK
X.juglandis 151 QGGTYWYHSHSAFQEQAGLYG~~LVIDPTEPEPFS~~DRDYV~~VMLSDWTDLDPAALF~~ARLK
X.vesicatoria 151 HQGGTYWYHSHSGFQEQAGLYG~~LVIDPLEPEPFS~~DRDYV~~VMLSDWTDLDPTALE~~DRLK
P.tomato 134 QONGTYWYHSHSGFQEQGVYGP~~LVIDPKEPEPF~~YDREHV~~TMLSDWTDLE~~PV~~QLMKT~~LK
P.syringae 134 RQHGTYWYHSHSGFQEQSGVYGP~~LVIDPKEPEPF~~YDREHV~~TMLSDWTDLE~~PV~~QLMKT~~LK

X.citri 204 QMPSHDNYAQR~~TVGDFLRDARDDGLRATLADRGMWGR~~MRMTP~~TDLS~~SDVNANTY~~TYLLNGV~~
X.orysae 235 QMPSHDNDAQR~~TVGDFLRDARDDGLRATLADRGMWGR~~MRMTP~~TDLS~~SDVNANTY~~TYLLNGV~~
X.campestris 200 QMPSHDNYAQR~~TVGDFVRDAREDDGLRATLADRGMWGR~~MRMTP~~TDLS~~SDVNANTY~~TYLLNGV~~
X.juglandis 211 KMGHDNYYRR~~TVGDFVRDAREDDGLRATLADRGMWGR~~MRMTP~~TDLS~~SDVNANTY~~TYLLMNGT~~
X.vesicatoria 211 KMPGHDNYKR~~TVGDFARDVQRNGLSATLEDRKMWGR~~MRMTP~~TDLS~~SDVNANTY~~TYLLMNGT~~
P.tomato 194 KQSDYYNF~~HKRTVGDFVNDVADKWAATVADRKMWAEM~~KNMPT~~DLADVS~~GATY~~TYLLNGQ~~
P.syringae 194 KQSDYYNNN~~QR~~TVGDF~~INDVGEKGWSEITRDRMWA~~QMRMD~~P~~TDLADVS~~GATY~~TYLL~~MNGQ~~

X.citri 264 APAGNWTGLFKPGEKVLLRFINGSSMTYFD~~IRIPGLRMTVVAADGQYVHPVS~~DELRIAA
X.orysae 295 APAGNWTGLFKPGEKVLLRFINGSSMTYFD~~IRIPGLRMTVVAADGQYVHPVS~~VDQLRIAA
X.campestris 260 APAGNWTGLFKPGEKVLLRFINGSSMTYFD~~LRIPGLRMTVVAADGQYVHPVS~~DELRIAA
X.juglandis 271 TSLGNWTGLFRSGEKVRLRFINGSSMTYFD~~VRIIPGLKMTVVAADGQYVHPVS~~DEFRIAV
X.vesicatoria 271 TSLGNWTGLFRSGEKVRLRFINGSSMTYFD~~VRIIPGLKMTVVAADGLYVHPVS~~DEFRIAV
P.tomato 254 APNMNWTGLFRPGEKIRLRFINGSSMTYFD~~IRIPGLKMTVVASDGFVNPV~~DELRIAV
P.syringae 254 APNMNWTGLFKPGERIRLRLINGSSMTYFD~~VRIIPGLKMTVVASDGLHV~~KPV~~TV~~DELRIAV

X.citri 324 AETFDVIVEPILGQDAFTLFAQDMGR~~TGFACGTLAVQHGLQAP~~IPALD~~PRAILTMQDMGHG~~
X.orysae 355 AETFDVIVEPILGQDAFTLFAQDMGR~~TGFACGTLAVQHGLQAP~~IPALD~~PRAILTMQDIGHG~~
X.campestris 320 AETFDVIVEPILGQDAFTLFAQDMGR~~TGFACGTLAVRHGLQAP~~IPAQD~~PRAILTMQDMGHG~~
X.juglandis 331 AETFDVIVEPSGQDAFTIFAQDSGR~~TGYISGTLAVREGLRAPVPS~~VDP~~PRILTMADMGMD~~
X.vesicatoria 331 AETFDVIVEPSGQDAFTIFAQDSGR~~TGYVSGTLAVREGLRAPLPS~~VDP~~PRILTMADMGMD~~
P.tomato 314 AETFDVIVEP-TAEAYTVFAQSM~~DR~~TGYAR~~GTLAVREGLVAQV~~PLD~~PRPLVTMDDMGMG~~
P.syringae 314 AETFDVIVEP-ABGAYTLFAQSM~~DR~~TGYAR~~GTLASRPGLQA~~AV~~PLDPRPLSSMDDMGMA~~

X.citri 384 DGM~~DHALPAMHG~~-----APGMLAAHGMHTM
X.orysae 415 DGMGHCDHAMHG~~DGTTQGDGTTQ~~-----GDAHAHAMAMPPEM
X.campestris 380 DGM~~AHCAMHDMPAQHG~~--ASPAD-----THAGHTVQHDPSAHAL
X.juglandis 391 HCGMSGMSMSASDSSDSSSNK~~PAMAMMAGMAHEPG~~QRSPAGAD~~PHAGHD~~MSGMQS
X.vesicatoria 391 HCSMDMSGGSKGMEGGCGAAMG~~MPG~~MTPPAS-----G-NEASAHAGHAMPAGD
P.tomato 373 GMDHGSMDGMSGMD~~SGADDGMQ~~TMSMG-----GDSMPAMDH~~SKM~~STMQ
P.syringae 373 GMEHGSMN-HA~~A~~APATHDMSGMD~~H~~SKMG-----HDAMP~~GMDHA~~QTPAQK

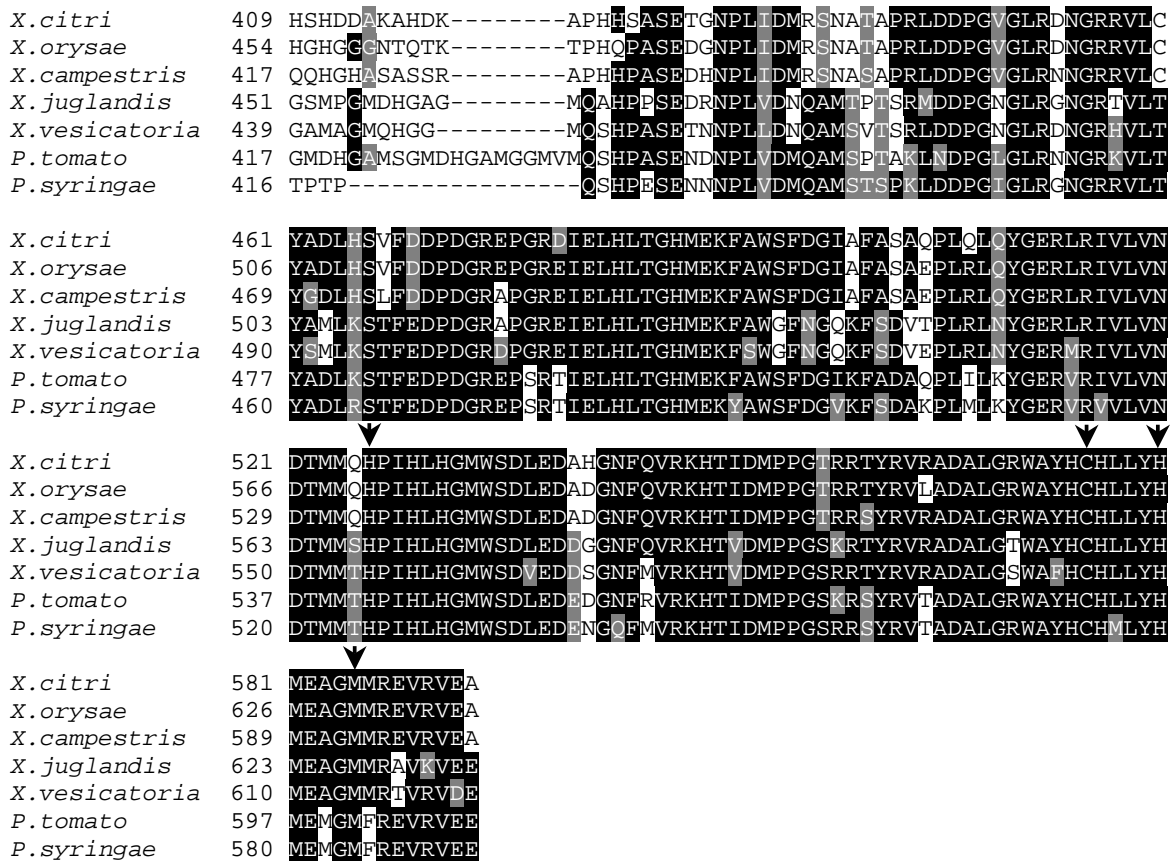


Figura 12 – Alinhamento de seqüências entre diferentes proteínas CopA e a seqüência de aminoácidos de CopA de *Xac* deduzida da anotação. O alinhamento da proteína CopA de *Xac* (AAM38473) foi feito contra a mesma proteína de: *P. syringae* pv. tomato (P12374), *P. syringae* pv. syringae (AA36619), *X. campestris* pv. juglandis (AAA72013), *X. axonopodis* pv. vesicatoria (AAT07754), *X. oryzae* pv. oryzae (AAW74010) e *X. campestris* pv. campestris (AAM39893). Os resíduos de aminoácidos que participam do provável sítio de ligação ao cobre estão indicados por setas. Alinhamento realizado com o programa ClustalW.

X. juglandis 1 -----MPQAPTTD
X. vesicatoria 1 MNINRRNTTLLTALTLAISLALANAASAQSMQHGSMPMEQGAQTQAQDHS**SHQA**PTSKPAP
P. tomato 1 -----MTVLNR
P. syringae 1 -----MRT
X. citri 1 -----MSRFRMQAWFAAA**FL**ASASAVAQ
X. oryzae 1 -----MSRFRTQAWLAA**ALL**ASASAVAQ
X. campestris 1 -----MNAMQTAHVLLVA**II**ASATATAQ

X. juglandis 9 SDRQTTGPAKPSQKHKAAPT**N**-----
X. vesicatoria 61 APKPTTPAKTSEAT**LD**HAAMGH-----
P. tomato 7 **LH**VCSLLAVSSLG**ML**PVGVFAA-----
P. syringae 4 LMLSRTLNSPRL**PL**LLAAGLT-----
X. citri 24 **BHQ**HDAMEEAPQDM**QE**QAMQMA-----
X. oryzae 24 **BHQ**HDAMQDAPQDM**QD**HAMQMT-----
X. campestris 24 **DH**AHQMHAA**TA**VQ**VD**SAQ**AV**ERPALKRMDVDEAAVGAASAPTPTS**V**SS**S**TSVSASTS

X. juglandis 31 ---N**AS**DQ**Q**SPSP**S**ME**AM**DHT**AM**GH**AM**PA**D**SP**P**SD**P**MP**P**GM**S**-----
X. vesicatoria 83 ---A**AP**PA**Q**AA**E**P**AM**Q**G**MD**H**S**Q**MG**H**SS**PA**ST**PA**AP**K**A**Q**T**Q**PM**Q**GM**D**HS**Q**MA**Q**PAASDASS
P. tomato 29 ---E**A**AMP**G**V**D**HS**Q**MG**M**D**H**SK**Q**MG**D**HS**Q**MG**M**D**H**SK**Q**MG**M**D-----
P. syringae 26 ---AT**P**W**AS**T**LA**AG**ME**GM**DH**-----DSH-----
X. citri 46 ---D**GA**H**ET**P**AS**S**Q**AA**P****ID**H**T**M**S**H**A**E**M****C**S**N**AM**D**H**E**S**M**K-----
X. oryzae 46 ---D**G**A**Q**K**AP**SS**S**Q**AA**H**MD**H**A**H**M**S**H**A**AM**ET**G**T**T**E**Q**E**AM**K-----
X. campestris 84 **TS**AS**SL**Q**AA**T**Q**A**AP**V**EM**D**H**A**HM**Q**HT**E**Q**A**H**V**H**D**M**Q**H**S**DD**AA**AV**HA**HA**AA**PA**T**DA**AST**VD**

X. juglandis 71 -----R**P**G
X. vesicatoria 140 **TS**-----TP**AM**Q**G**MD**H**S**Q**MG**H**G
P. tomato 69 -----
P. syringae 46 -----
X. citri 82 -----Q**G**
X. oryzae 82 -----H**G**
X. campestris 144 **SA**H**Q**T**Q**TH**V**H**G**AG**S**A**Q**PH**AT**PA**T**Q**T**MD**N**ADR**Q**H**AM**H**D**MP**H**AD**P**AS**AP**M**Q**E**H**A**HS**AG**G**

X. juglandis 74 **S**G**T**K**P**D**S**S**Q**GM**T**EG**M**D**H**A**AM**G**H**S-----ATT**S**E**P**R**T**P**I**P**K**V
X. vesicatoria 157 **S**P**AS**AT**PE**AG**M**Q**S**ME**G**M**D**H**S**Q**M**G**H**G**P**-----V**A**P**T**Q**P**R**T**P**I**P**AV**
P. tomato 69 ---H**S**---Q**M**Q**G**M**D**S**D**M**T**T**MA**PS**K**P-----A**A**P**T**Q**S**R**T**P**I**A**P**V
P. syringae 46 ---A**M**H**M**N**AG**D**S**E**D**T**P**S**T**Q-----A**A**P**N**Q**S**R**T**P**I**P**PI**
X. citri 84 **S**M**DD**A**AM**H**H**Q**AM**D**H**AS**M**D**H**SK**M**H**H**T**Q**P**TH**AA**Q**AP**AS**LT-----E**T**R**T**N**P**L**P**R**AP**I**P**P**T**
X. oryzae 84 **S**M**DD**A**AM**S**H**Q**AM**D**H**SK**M**D**H**M**Q**ST**NA**A**Q**I**P**AS**P**T**N**T**T**I**T**G**N**L---A**D**T**R**S**T**A**L**P**R**T**P**I**P**T**P**
X. campestris 204 **T**P**PH**A**AP**AT**Q**AM**D**H**AS**V**QH**H**D**M**H**D**M**D**L**H**AD**P**AS**T**AA**Q**AA**H**Q**H**T**AP**AA**T**R**S**P**R**E**P**I**P**T**P

X. juglandis 112 **TD****ID**R**AA**AV**PP**SD**HP**V**H**D**N**T**I**O**H**Y**V**L**FN**R**LE**A**W**N**AD**P**GT**Q**AW**E**G**Q**S**W**IG**T**D**L**N**R**L**C**V**R
X. vesicatoria 196 **TE**A**D**R**Q**AA**I**AP**A**H**HP**V**H**D**NS**I**K**S**V**L**LN**R**LE**A**W**D**AD**P**GT**I**GL**G**W**E**G**Q**G**W**IG**T**D**L**N**R**V**W**F**R
P. tomato 101 **TD**A**N**R**AA**V**Y**R**S**A**K**G**H**T**V**H**D**E**AA**N**Y**F**L**L**FD**Q**LE**W**Q**D**AN**G**S**V**LN**W**D**V**N**G**W**V**GG**D**I**D**R**L**W**I**R**
P. syringae 75 **TD**A**D**R**AA**V**Y**T**SH**A**GH**Q**V**H**D**S**A**I**NS**Y**FL**A**D**K**LE**W**Q**D**AN**D**G**S**AL**A**W**D**LS**G**W**I**GG**D**I**D**R**L**L**L**R**
X. citri 137 **T**A**DD**I**AAA**F**AP**L**R**T**H**T**M**H**S**A**G**I**N**H**V**L**L**D**R**L**E**A**S**N**T**N**R**G**S**Q**AW**E**S**R**AW**I**GG**D**V**D**R**L**W**L**R**
X. oryzae 141 **T**A**EE**I**AAA**F**AP**L**Q**A**HT**M**H**S**A**G**I**N**H**V**L**L**D**R**ME**A**SK**T**ER**G**S**Q**AW**E**S**R**AW**I**GG**D**I**D**R**L**W**L**R**
X. campestris 264 **T**A**DD**I**AAA**F**AP**L**R**S**H**A**M**H**G**A**G**I**N**H**V**L**L**D**R**L**E**A**S**D**N**H**T**G**S**Q**D**W**E**A**R**A**W**I**GG**D**I**D**R**L**W**L**R**

X. juglandis 172 **SE**G**ER**N**D**G**R**T**E**A**AD**L**EV**L**Y**G**R**S**V**A**P**W**W**D**L**V**AG**I**R**Q**D**F**K**P**G**S**S**Q**T**Y**AA**F**G**V**Q**L**AP**M**K**F**EV**
X. vesicatoria 256 **SE**G**ER**T**D**G**Q**T**E**S**AD**L**EV**L**Y**G**R**S**IS**T**W**W**D**V**V**A**G**V**R**H**D**F**K**P**G**A**S**Q**N**F**AA**I**G**V**Q**L**AP**M**K**F**EV**
P. tomato 161 **SE**G**ER**T**NG**K**T**E**S**A**EL**Q**AL**W**G**H**AI**S**P**W**W**D**L**V**GG**V**R**Q**D**F**K**P**G**S**P**Q**T**W**AA**F**L**Q**L**G**L**A**L**Y**N**F**E**A
P. syringae 135 **SE**G**ER**T**NG**K**T**E**E**A**RI**Q**AL**W**G**H**AI**S**P**W**W**D**V**V**AG**A**R**Q**D**F**K**P**G**A**P**Q**T**W**AA**F**L**Q**Q**A**L**S**D**L**DI**
X. citri 197 **SE**G**ER**H**D**G**R**T**E**S**AS**L**E**A**F**Y**G**H**AI**S**P**W**W**D**V**L**V**G**A**R**Q**D**I**G**A**G**E**H**R**S**W**A**A**F**G**V**Q**L**AP**Y**K**F**ET**
X. oryzae 201 **SE**G**ER**H**D**G**R**T**E**P**AS**L**E**T**F**Y**G**H**AI**S**P**W**W**D**L**L**V**G**A**R**Q**Y**I**G**T**C**D**H**R**S**W**A**A**F**G**V**Q**L**AP**Y**K**F**ET**
X. campestris 324 **SE**G**ER**R**R**D**Q**T**H**D**AS**L**E**A**F**Y**G**H**AI**S**P**W**W**D**V**L**L**G**A**R**Q**D**L**A**P**C**OR**Q**S**W**AA**I**G**V**Q**L**AP**Y**K**F**ET**

<i>X. juglandis</i>	232	AATAYIGERGQTAAARLEAEYELLLTNRWILQPLAEIIEIFCKDDPARGIGSGLSTAEIGLR
<i>X. vesicatoria</i>	316	SATAYLGEGGQTAAANVEAEYELLLTNRLILQPLVEVTAYGKNDPLRGIGSGLSTAEAGLR
<i>P. tomato</i>	221	EATAFLGEGGQTCRLREGDYDILLTNRLILOPTAEVNFYQSDPQRGIGSGLSETEVGVR
<i>P. syringae</i>	195	EATAFIGEAGQTAAARLEADYDLQLTNRLVLOPTAELNFYGKNDPQRGNGSGLSTSEFGLR
<i>X. citri</i>	257	EATLYVGTGSRAALRLAGEYEVLLTNRLILOPRVEADIALTDDNRRGIGSGLSQVELGLR
<i>X. oryzae</i>	261	EATLYVGDGSRAALRLAGEYEVLLTNRLILOPHVEADIALTDDNRRGMSRGLSEETELGLR
<i>X. campestris</i>	384	EATLYLGS GGRAAFRLAEAYDVLLTNRLILOPRVEADVALTDDDRRGIGSGLSEVEAGLR
<i>X. juglandis</i>	292	LRYEFTRQFAPYIGLVYERAFGNTADLRRESESRVDDTRIVVGIRTF
<i>X. vesicatoria</i>	376	LRYEFTRKFAPYIGVYERAFGNTADMRRHEHGESFEDTRLVIGLRTWF
<i>P. tomato</i>	281	LRYEIRREFAPYIGVTWNRSYGNTADFAREEGEDRSEARLVLGVRMWF
<i>P. syringae</i>	255	LRYEITPQFAPYIGVSWNRSYGKTADYAREDDTQDARLVVGVRMWF
<i>X. citri</i>	317	LRYEITRRFAPYIGWVHRSRFGDSAQRAMDDIRARDSRFVAGVRVWF
<i>X. oryzae</i>	321	LRYEITRRFAPYIGVWVHRRRFGDSAARAAMEDAPARDSRLVAGVRLWF
<i>X. campestris</i>	444	LRYEITRKFPAPYIGVWVHRRRFGDSAQRADGDDTPARESRFVAGVRVWF

Figura 13 - Alinhamento de seqüências entre diferentes proteínas CopB. O alinhamento da proteína CopB de *Xac* (AAM38474) foi feito contra a mesma proteína de: *P. syringae* pv. tomato (P12375), *P. syringae* pv. syringae (AA36618), *X. campestris* pv. juglandis (AAA72014), *X. axonopodis* pv. vesicatoria (AAT07755), *X. oryzae* pv. oryzae (AAW74009) e *X. campestris* pv. campestris (AAM39892). Alinhamento realizado com o programa ClustalW.

```

X.citri      1 MRRAAGSAGAWREPLHQKAGSMSAVGLEVAADSVASALAAQAGGAMRVELCGGLDGGGL
X.fastidiosa 1 MSFDVYVIRVFGKSRGSREAGMSVSAAGLEVAAGSVASALAAQEGGAMRVELCHGLGGGGL
E.coli      1 -----MALLEITCCYSMECALTAQQNGADRVELCAAPKEGGL

X.citri      61 TPSEGITLAVVRERLEIPLYVLIIRPRVGFVFDAAEVEVMRRDVEQCVRLGCDGVVLGALD
X.fastidiosa 61 TPSYGMLAVVRERLEIPLYVLIIRPRGGDFVFSSEEMEVMCCDVECCVRLGCDGVVLGALD
E.coli      37 TPSLGVLKSVRQRVTIPVHPIIRPRGGDFCYSDGEFAALLEDVVRTVRELGFPGIVTGVLD

X.citri      121 RHGOVDLATMRVLMQAAGSLGVTFHRAIDVSADPSRVLEDAIALGCERVLTSGARASALE
X.fastidiosa 121 PAGEVDMGMMRVLIAVAGSLGVTFHRAIDVSADPGRTLEDVIALGCERVLTSGRSSALE
E.coli      97 VDCNVDMPRMEKIMAAAGPLAVTFHRAFDMCANPLYTLNLAELGIARVLTSCKSDALQ

X.citri      181 GIDTIAALVRQAAGRIQIMPGAGLSEHNIRALRQHTGAHEFHASARGVIAAQV-----P
X.fastidiosa 181 GATITIAALVAQAAGRIVVMPGAGVSAGNVLELRVRTGAHEFHASARSVVAARR-----L
E.coli      157 GLSKIMELIAHRD-APTIMAGAGVRAENLHHF-LDAGVLEVHSSAGAWQASPVRYNQGL

X.citri      235 SPHPYIRDLGGDYQRTDITARVQRMVDALQQA---
X.fastidiosa 235 GPHPDIDHDLGGDYDCTDVKVRQLVRLLSQCAS-
E.coli      215 SMSSDEHHADEYSRYIVDGAAVAEMKGIERHQAK

```

Figura 14 - Alinhamento de seqüências entre diferentes proteínas CutC. O alinhamento da proteína CutC de *Xac* (AAM37936) foi feito contra a mesma proteína de: *E. coli* (NP_416388) e uma proteína envolvida na homeostase de cobre em *Xyllela fastidiosa* (NP_298630). Alinhamento realizado com o programa ClustalW.

Parte II. Avaliação do crescimento e análise da expressão dos genes e das proteínas na presença de cobre

II.1. Influência da concentração de cobre no crescimento de *Xac*

Antes de analisar a expressão dos genes de resistência a cobre em *Xac* uma avaliação prévia do efeito do cobre no crescimento desta bactéria foi realizada. O crescimento foi realizado na ausência e na presença de diferentes concentrações de cobre em meio tamponado ou não com tampão fosfato. Sabe-se que *Xac* cresce em meio a pH 6,8 ou valores próximos a este, portanto, a adição de tampão fosfato foi necessária, uma vez que a adição de cobre provoca um abaixamento do pH e, conseqüentemente, o não crescimento da bactéria. O tampão fosfato foi usado, uma vez que este também é usado na manutenção das linhagens no laboratório. Amostras foram retiradas em diferentes tempos e o crescimento das células foi acompanhado por leituras de turbidimetria. Foram realizados vários experimentos para obtermos um perfil característico da curva de crescimento desta bactéria, e os resultados estão mostrados na Figura 15. Como controles, a bactéria foi crescida em meio não tamponado e meio tamponado na ausência de cobre, para analisar a influência do tampão fosfato no crescimento da bactéria. Pelas curvas de crescimento observou-se que a adição de tampão fosfato causa um ligeiro retardo no crescimento quando comparado ao crescimento em meio não tamponado. Entretanto, a bactéria cresceu bem no meio tamponado até uma concentração de cobre de 1,0 mM. Na concentração de cobre de 2,0 mM, observou-se uma inibição do crescimento, enquanto que em concentrações de cobre a partir de 3,0 mM o crescimento foi totalmente inibido. Baseando-se nas curvas de crescimento, podemos dizer que a Mínima Concentração Inibitória (MIC) de cobre para esta bactéria é de 2,0 mM. Decidimos fixar a concentração de cobre de 1 mM para a realização dos experimentos de expressão gênica.

II.2. Análise da expressão gênica por RT-PCR

A análise da expressão dos genes em células crescidas na ausência e na

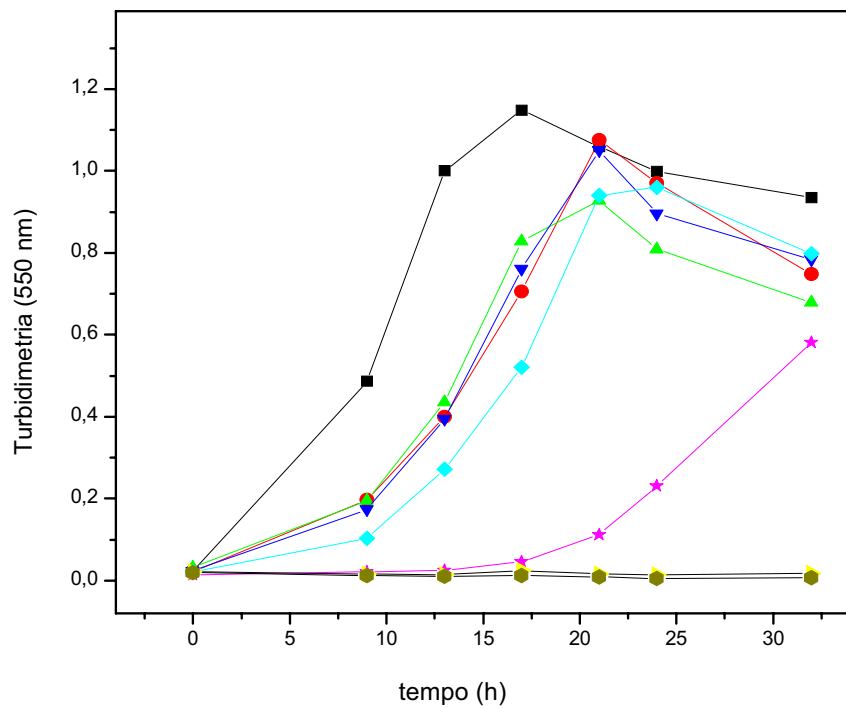


Figura 15 - Curva de crescimento de *Xac*, linhagem 306, em diferentes concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. (■) meio não tamponado sem cobre; (●) meio tamponado sem cobre; (▲) 0,25 mM de cobre; (▼) 0,5 mM de cobre; (◆) 1,0 mM de cobre; (★) 2,0 mM de cobre; (►) 3,0 mM de cobre; (●) 4,0 mM de cobre. O crescimento foi realizado a 28°C , com agitação de 250rpm.

presença de cobre foi inicialmente realizada por RT-PCR. Para isso, as células foram crescidas na ausência de cobre até 12 horas, neste tempo uma alíquota foi removida e sulfato de cobre foi adicionado para uma concentração final de 1 mM. Amostras de células foram retiradas nos tempos de 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre. Os RNAs totais das amostras foram extraídos, tratados com DNase e a transcrição dos genes *copA* e *copB* foi analisada através de RT-PCR. A Figura 16 mostra um resultado representativo desta análise. Não foi possível detectar a presença do transcrito do gene *cutC*. Como mostrado na figura, a presença dos transcritos foi observada nas células crescidas na ausência de cobre (Fig. 16A e B, linhas 1). Entretanto, a adição de cobre levou a um aumento na presença dos transcritos (Fig. 16A e B, linhas 2), o qual foi mais pronunciado para o gene *copA* (Fig. 16A, linha 2, 0,5 hora após adição do metal). A presença do transcrito do gene *copA* diminuiu após 1 hora da adição de cobre (Fig. 16A, linha 3) e parece ter se mantido constante até 4 horas após a adição do metal (Fig. 16A linhas 3 a 5). Para o gene *copB*, uma diminuição na presença do transcrito foi observada após 4 horas de adição do metal (Fig. 16B, linha 5). Foi utilizado como controle para a normalização dos estudos de RT-PCR a análise do transcrito do rDNA 16S (Figura 16C).

II.3. Análise da expressão gênica por *Northern blot*

A expressão dos genes também foi analisada por *Northern blot* e os resultados obtidos foram mais conclusivos que aqueles obtidos por RT-PCR. A expressão dos genes *copA* e *copB* está apresentada na Figura 17 e, semelhante à análise de RT-PCR, não foi possível observar a presença do transcrito do gene *cutC*. Como mostrado na figura não foi observado o transcrito dos genes *copA* e *copB* nas células crescidas na ausência de cobre (Fig. 17A e D, linhas 1). Entretanto, a presença dos transcritos foi claramente detectada logo após a adição de cobre (0,5 hora) (Fig. 17A e D, linhas 2). Após adição de cobre, a transcrição do gene *copA* parece ter se mantido constante até 4 horas após a adição de cobre (Fig. 17A, linhas 3 a 5) e a transcrição do gene *copB*, no entanto, se manteve em 1 hora após a adição de cobre (Fig. 17D, linha 3), mas diminuiu após 2 e 4 horas após a adição do metal (Fig. 17D, linhas 4 e 5).

Os resultados mostraram claramente que a expressão dos genes, em nível de transcrição foi induzida por cobre. Além disso, os transcritos dos genes *copA* e *copB* apresentaram um tamanho de aproximadamente 2,9 kb, o qual corresponde à soma

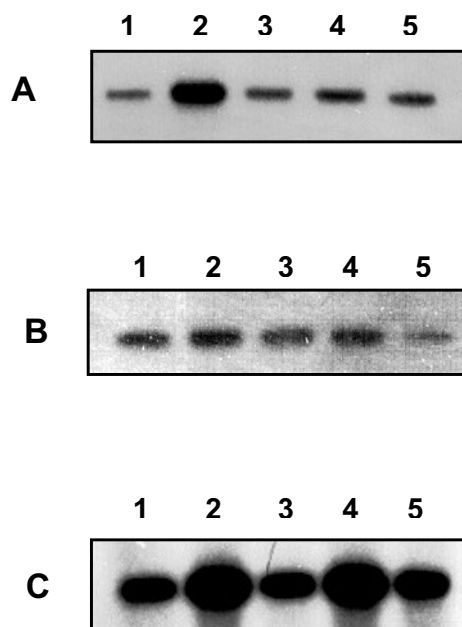


Figura 16 – Análise da expressão gênica por RT-PCR durante o crescimento de *Xac* na ausência de cobre e na presença de 1 mM de cobre. Expressão dos genes *copA* (A) e *copB* (B). Como controle do experimento foi utilizado o RNAr 16S (C). 1 – RNA total extraído de células após 12 horas de crescimento na ausência de cobre. 2 a 5 – RNA total extraído de células 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de 1 mM de cobre, respectivamente. Para a análise por RT-PCR os produtos da amplificação foram fracionados em gel de agarose 1 %, transferidos para membrana de Nylon e hibridizados nas condições descritas em Materiais e Métodos.

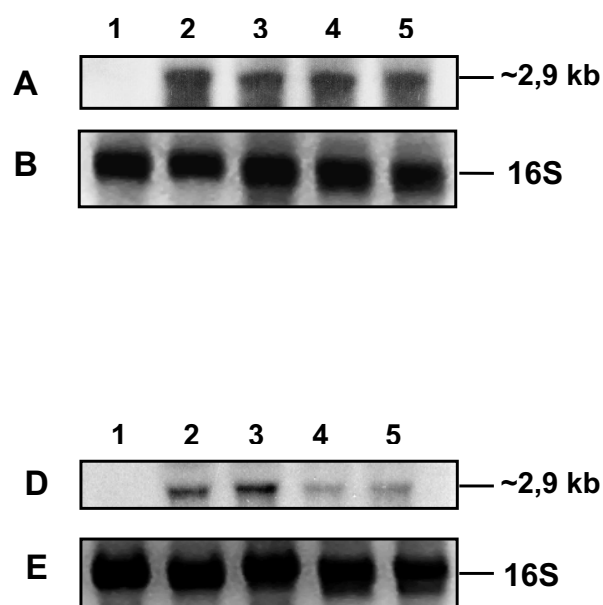


Figura 17 – Análise da expressão gênica por *Northern blot* durante o crescimento de *Xac* na ausência de cobre e na presença de 1 mM de cobre. O RNA total de *Xac* foi utilizado para a análise da expressão dos genes *copA* (A) e *copB* (D). Como controle de *loading* foi utilizado o RNAr 23S (B e E). 1 – RNA total extraído de células após 12 horas de crescimento na ausência de cobre. 2 a 5 – RNA total extraído de células 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de 1 mM de cobre, respectivamente. Quantidades de 10 µg de RNA total foram fracionadas em gel de agarose-formaldeído. Os RNAs foram transferidos para membrana de Nylon e hibridizados nas condições descritas em Materiais e Métodos. Os genes *copA* e *copB*, radioativamente marcados com ^{32}P , foram usadas como sondas.

do tamanho dos genes *copA* (1.782 pb) e *copB* (1.095 pb). O tamanho dos transcritos foi o mesmo quando utilizamos o gene *copA* inteiro e diferentes fragmentos do gene *copB* (1.095 pb e 570 pb) como sondas. Portanto, este resultado mostrou que os dois genes, localizados seqüencialmente no genoma, estão organizados na forma de um operon.

Sabendo que a transcrição dos genes *copA* e *copB* foi induzida por cobre, um outro tipo de experimento foi realizado com o objetivo de analisar se a indução dos genes é específica ou não por cobre. No experimento as células foram crescidas durante 12 horas na ausência do metal, amostras foram coletadas e diferentes metais foram adicionados: CdSO₄, CuSO₄, ZnSO₄ ou AgNO₃. As células foram coletadas 0,5 hora após a adição dos metais. Podemos observar pela Figura 18, quando utilizamos o gene *copA* como sonda, que a presença do transcrito foi detectada apenas na presença de cobre, indicando assim uma especificidade da resposta em relação a cobre (Fig. 18, linha 4).

II.4. Análise da expressão protéica por *Western blot*

A análise da expressão das proteínas CopA e CopB nas células de *Xac* crescidas na ausência e na presença de cobre foi realizada por *Western blot*. Para isso, as células foram crescidas na ausência de cobre durante 12 horas. Após este período, cobre foi adicionado a uma concentração final de 1 mM e alíquotas de células foram coletadas 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre. A expressão da proteína CopB foi analisada a partir de 80 µg de proteína total/canaleta, enquanto para a análise da expressão da proteína CopA, foram utilizadas 40 µg de proteína total/canaleta. Como pode ser observada pela Figura 19A, a proteína CopB de, aproximadamente, 45 kDa está presente nas células crescidas na ausência de cobre, após 12 horas de crescimento e a expressão de CopB aumenta gradativamente após 0,5, 1, 2 e 4 horas da adição de cobre ao meio de cultura. Da mesma maneira, a expressão da proteína CopA de, aproximadamente, 66 kDa é gradativamente aumentada após a adição de cobre (Figura 19B, linhas 2 a 5). Estes resultados indicam que a expressão das proteínas CopA e CopB foi induzida por cobre, confirmando os resultados obtidos por *Northern blot*, os quais mostraram que a expressão dos respectivos genes, em nível de transcrição, foi induzida por este metal.

A análise da expressão dessas proteínas também foi realizada na linhagem

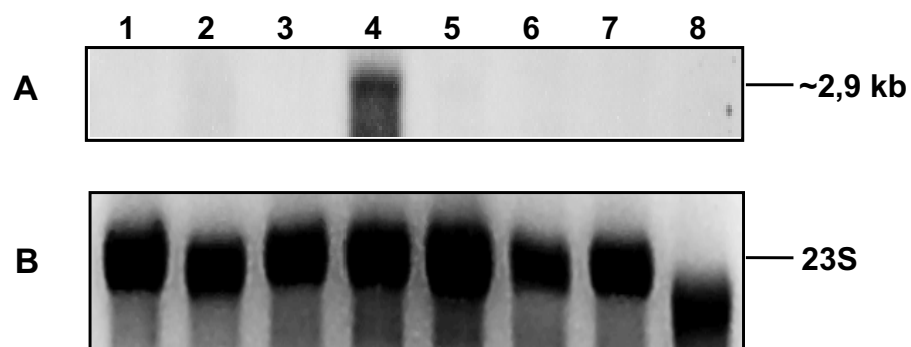


Figura 18 - Análise da expressão gênica por *Northern blot* na ausência e na presença de diferentes metais. O RNA total de *Xac* foi utilizado para a análise da expressão dos genes *copA* e *copB* (A). Como controle de *loading* foi utilizado o RNAr 23S (B). Linhas 1, 3, 5 e 7 – RNA total extraído de células após 12 horas de crescimento na ausência de metal. Linhas 2, 4, 6 e 8 – RNA total extraído de células 0,5 hora após a adição de 1 mM de CdSO₄, CuSO₄, ZnSO₄ e AgNO₃, respectivamente. Quantidades de 10 µg de RNA total foram fracionadas em gel 1,5% de agarose contendo formaldeído, os RNAs transferidos para membrana de Nylon e hibridizados com o gene *copA*, radioativamente marcado com ³²P.

$\Delta copA$, na qual o gene *copA* foi interrompido por um transposon (item V). As células foram crescidas da mesma maneira e a expressão de CopA e de CopB foi comparada com a das células selvagens. Como mostrado pela Figura 20B, a proteína CopB não foi expressa em células mutantes crescidas na ausência de cobre e nem após a adição de cobre, enquanto que esta proteína foi expressa nas células selvagens (Figura 20A). O mesmo foi observado para a proteína CopA (Figuras 21A e B). Como os genes *copA* e *copB* estão organizados em um operon, a inativação do gene *copA*, pelo transposon, não permitiu a expressão da proteína CopA, e nem de CopB.

A expressão da proteína CutC não foi possível ser analisada, pois não conseguimos o anticorpo contra esta proteína.

II.5. Análise das proteínas diferencialmente expressas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

A análise de proteínas induzidas ou reprimidas em células de *Xac* crescidas na presença de cobre foi realizada por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Para esta análise duas condições de crescimento da bactéria foram utilizadas. Numa primeira condição, as células foram crescidas na ausência de cobre e na presença de 1 mM de cobre ao longo do crescimento. As amostras foram coletadas após 24 horas de crescimento. Numa segunda condição, as células foram crescidas sem cobre durante 12 horas e uma amostra foi retirada neste tempo. Em seguida, cobre foi adicionado numa concentração final de 1 mM e uma amostra foi removida após 1 hora de adição de cobre. As proteínas totais foram extraídas a partir de células crescidas nas duas condições descritas acima e, aproximadamente 300 μ g das proteínas foram focalizadas em tiras com um gradiente linear de pH de 3 a 10. Após realização da segunda dimensão, a maioria das proteínas ficou concentrada na região central do gel (resultados não mostrados). Com o objetivo de conseguir uma melhor separação das proteínas, estas foram focalizadas em tiras com um gradiente linear de pH de 4 a 7.

Os resultados da análise nas duas condições estão mostrados nas Figuras 22 e 23. De uma maneira geral, quando cobre foi adicionado no início do crescimento e as células foram coletadas após 24 horas, o perfil protéico observado foi de repressão da maioria das proteínas diferencialmente expressas em relação às células crescidas na ausência de cobre (Figura 22). Entretanto, nas células crescidas sem cobre durante 12

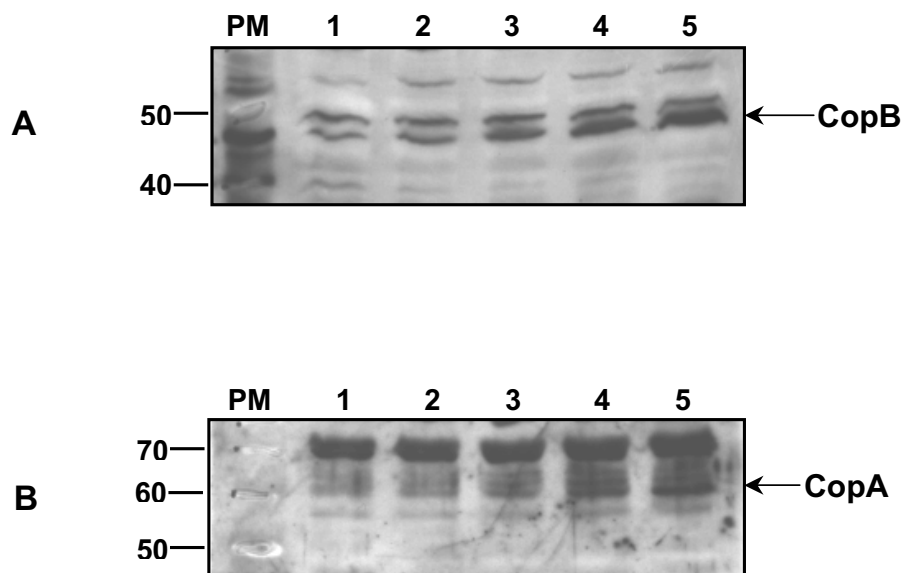


Figura 19 - Análise da expressão das proteínas CopB e CopA por *Western Blot*. Quantidades de 80 (A) e 40 (B) μg de proteína total/canaleta foram usadas. (A) – expressão da proteína CopB. (B) - expressão da proteína CopA. PM - Peso Molecular (kDa), 1- células crescidas durante 12 horas, 2 a 5 – células crescidas na presença de 1 mM de cobre 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre, respectivamente. O extrato protéico total de *Xac* foi fracionado em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, gel 12% (A) e gel 9% (B). As condições para o *Western* foram descritas em Materiais e Métodos. As bandas correspondentes as proteínas CopA e CopB estão indicadas pelas setas.

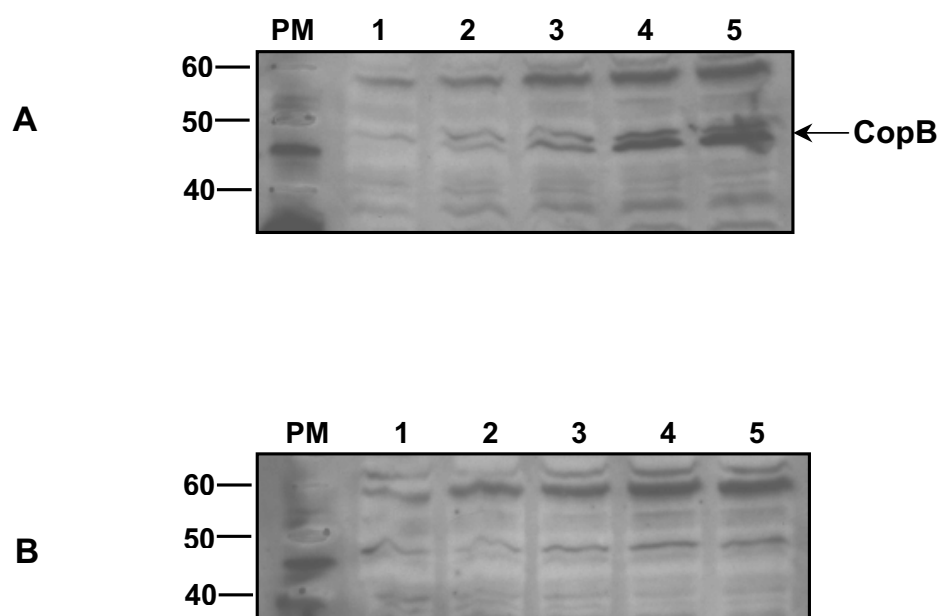


Figura 20 - Análise da expressão da proteína CopB nas células selvagem (A) e mutante (B) por *Western Blot*. Quantidade de 80 μ g de proteína total/canaleta foram usadas. PM - Peso Molecular (kDa), 1 - células crescidas durante 12 horas, 2 a 5 – células crescidas na presença de 1 mM de cobre 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre, respectivamente. O extrato protéico total de *Xac* foi fracionado em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, gel 12%. As condições para o *Western* foram descritas em Materiais e Métodos. As bandas correspondentes a proteína CopB estão indicadas pela seta.

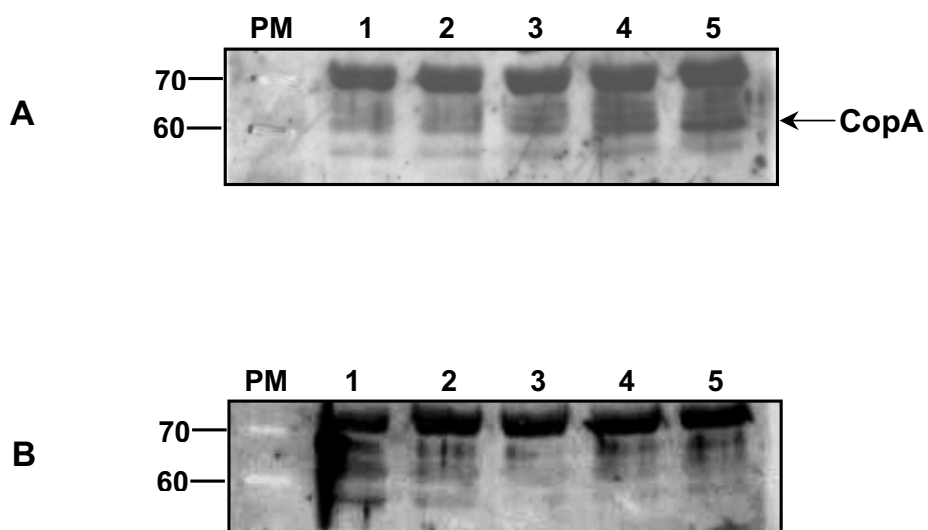


Figura 21 - Análise da expressão da proteína CopA nas células selvagem (A) e mutante (B) por *Western Blot*. Quantidade de 40 μg de proteína total/canaleta foram usadas. PM - Peso Molecular (kDa), 1 - células crescidas durante 12 horas, 2 a 5 – células crescidas na presença de 1 mM de cobre 0,5, 1, 2 e 4 horas após a adição de cobre, respectivamente. O extrato protéico total de *Xac* foi fracionado em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, gel 9%. As condições para o *Western* foram descritas em Materiais e Métodos. As bandas correspondentes a proteína CopA estão indicadas pela seta.

horas e coletadas após 1 hora de adição de 1 mM de cobre, o perfil protéico foi de indução da maioria das proteínas diferencialmente expressas na presença de cobre (Figura 23). Os resultados apresentados são preliminares, novos experimentos terão que ser realizados e submetidos a uma análise mais criteriosa pelo software ImageMaster 2D Platinum (Amersham Biosciences). As regiões dos géis contendo as proteínas diferencialmente expressas serão removidas dos géis e digeridas com tripsina para uma futura análise por espectrometria de massas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, com o objetivo de identificar as proteínas diferencialmente expressas na presença de cobre. Os experimentos de eletroforese bidimensional não foram continuados, pois, apesar de termos uma proposta aceita para a identificação das proteínas diferencialmente expressas no LNLS, o equipamento (Applied Biosystems Tof/Tof) apresentou problemas técnicos no final do ano de 2004 e as atividades ainda não foram retomadas no LNLS (março/2006).

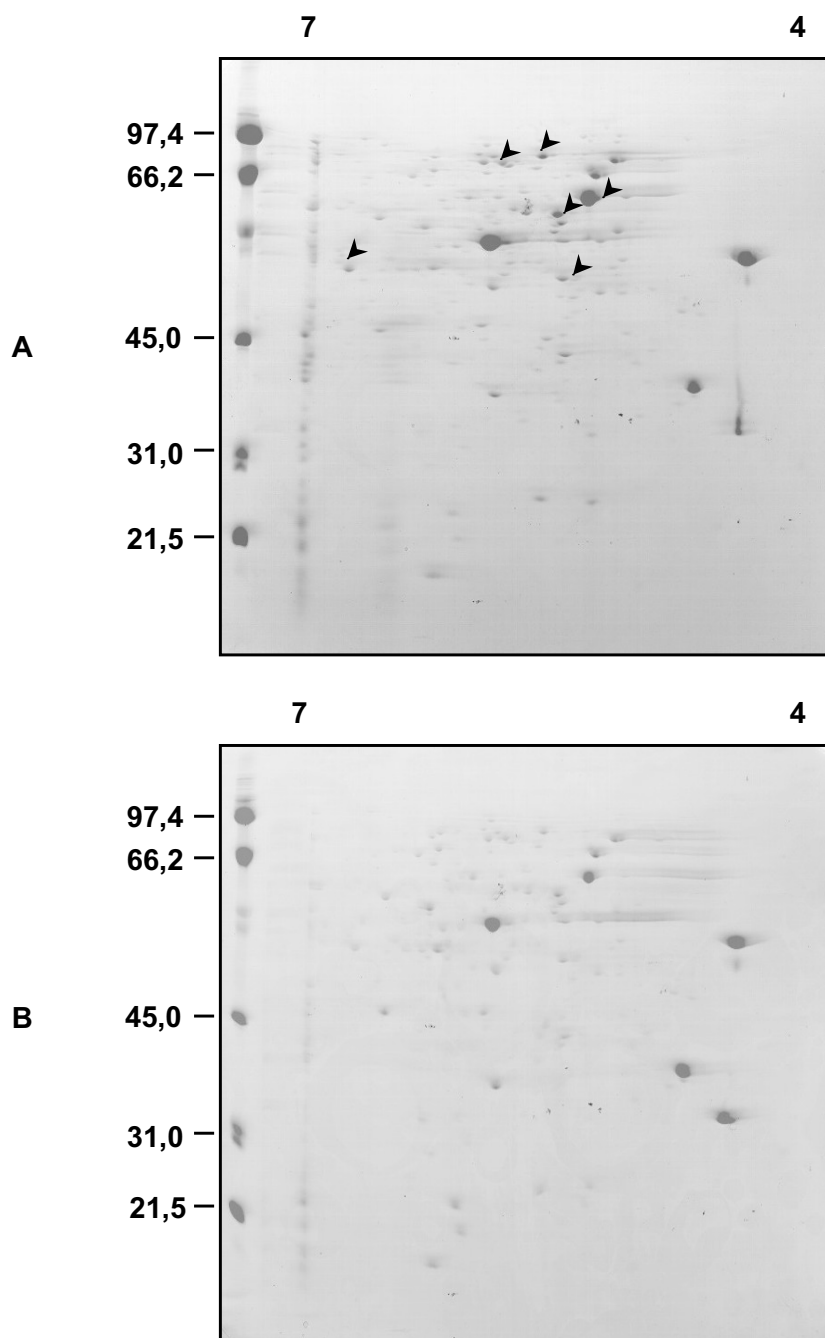


Figura 22 - Análise da expressão diferencial de proteínas de *Xac* na presença de cobre por 2D-PAGE. A – células de *Xac* crescidas na ausência de cobre por 24 horas (controle), B – células de *Xac* crescidas na presença de 1 mM de cobre por 24 horas. As setas indicam as proteínas reprimidas em relação ao controle. O peso molecular (kDa) está indicado ao lado dos géis. A focalização das proteínas foi feita em um gradiente de pH entre 4 e 7. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

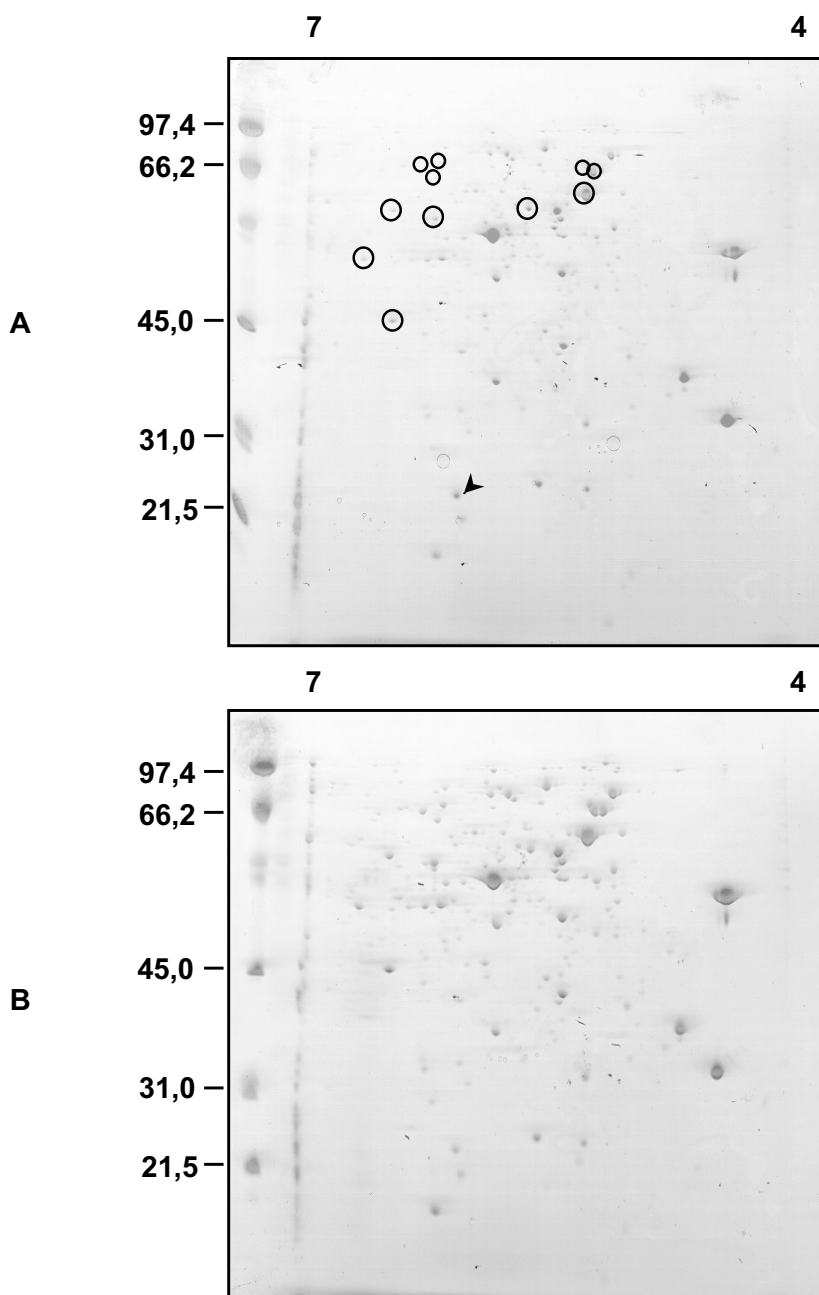


Figura 23 - Análise da expressão diferencial de proteínas de *Xac* na presença de cobre por 2D-PAGE. A – células de *Xac* crescidas na ausência de cobre durante 12 horas (controle), B – células de *Xac* coletadas 1 hora após a adição de 1 mM de cobre. As setas indicam as proteínas reprimidas e as esferas indicam as proteínas induzidas, em relação ao controle. O peso molecular (kDa) está indicado ao lado dos géis. A focalização das proteínas foi feita em um gradiente de pH entre 4 e 7. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Parte III. Organização genômica dos genes *copA*, *copB* e *cutC*

A ORF XAC3630, a qual corresponde ao gene *copA* (1.782 pb) se encontra na posição 4304624 até 4306402 e a ORF XAC3631, correspondente ao gene *copB* (1.095 pb) se encontra na posição 4306402 à 4307493 do genoma. Os dois genes se encontram um ao lado do outro no genoma e, como descrito anteriormente, estão organizados em uma estrutura tipo operon. A ORF XAC3091, correspondente ao gene *cutC* (798 pb) se encontra na posição 3630380 à 3629586 do genoma. A Figura 24 mostra um esquema da disposição dos genes no genoma de *Xac* e a Figura 25 mostra uma análise comparativa da organização dos genes de resistência a cobre em diferentes bactérias fitopatogênicas.

Analisando a seqüência nucleotídica do operon *copAB* em *Xac* foi observado que, como resultado da anotação, o ATG do gene *copB* se sobrepõe ao *stop codon* do gene *copA*, como mostrado na Figura 26. Entretanto, um alinhamento de seqüências da proteína CopB realizado com as proteínas de *P. syringae* pv. tomato, *P. syringae* pv. syringae, *X. campestris* pv. juglandis, *X. axonopodis* pv. vesicatoria, *X. oryzae* pv. oryzae e *X. campestris* pv. campestris mostrou que a proteína de *Xac* apresenta uma extensão de 15-20 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal (Figura 13). Esta mesma seqüência está também presente nas proteínas de *X. oryzae* pv. oryzae e *X. campestris* pv. campestris, nas quais a anotação foi realizada em comparação à *Xac*.

Por este motivo, uma análise da seqüência nucleotídica do operon foi realizada na tentativa de encontrar prováveis sítios de ligação ao ribossomo no final da região codificadora do gene *copA*, baseando-se no trabalho de Hampson e Kibler, 2002 (www.ics.uci.edu/~kibler/pubs/TR03). Segundo estes autores a seqüência *core* desses sítios é AGGA. Examinando a provável região intergênica *copA-copB* e o início da região codificadora do gene *copB*, prováveis sítios de ligação ao ribossomo não foram encontrados no final da região codificadora do gene *copA*, mas foram encontrados quando consideramos outros possíveis *start codons* para o gene *copB* (Figura 26). A possibilidade de que o *start codon* para o gene *copB*, definido na anotação seja incorreto, deve ser considerada. Analisando a figura e os aminoácidos da porção N-terminal das proteínas CopB de *X. pv. juglandis*, *P. pv. tomato* e *P. pv. syringae* apresentados na Figura 13, sugerimos que o *start codon* verdadeiro para a proteína CopB de *Xac* seja aquele que codifica a metionina da posição 30 na Figura 13.

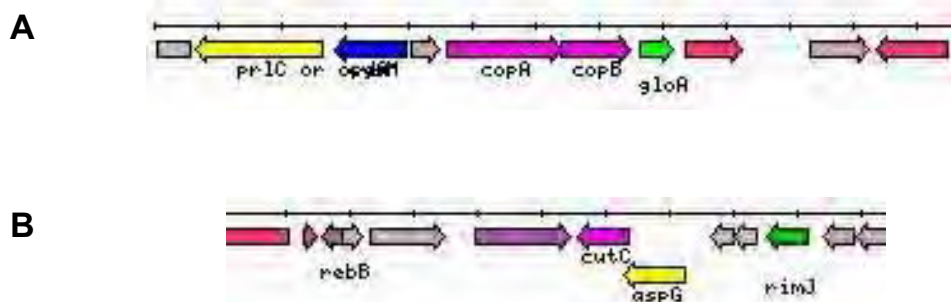


Figura 24 - Detalhe das regiões do mapa genômico de *Xac* mostrando a localização dos genes em estudo. A – região do genoma contendo os genes *copA* e *copB*, os quais se localizam na posição 4304624 a 4307493. B – região do genoma contendo o gene *cutC*, o qual se localiza na posição 3630380 a 3629586 (www.genoma4.iq.usp.br).

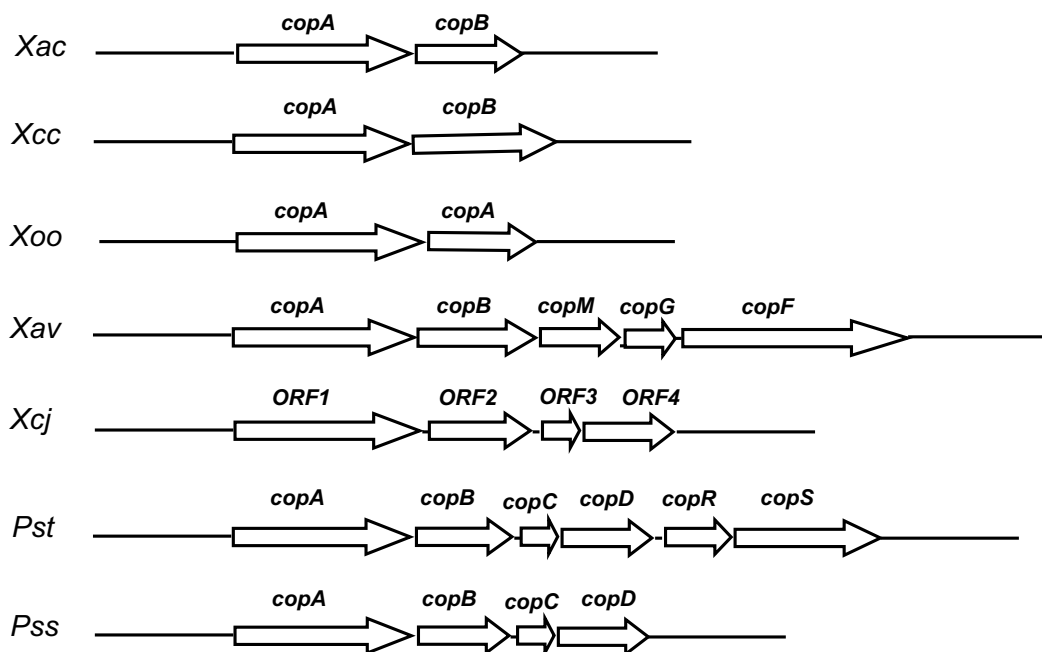


Figura 25 – Análise comparativa da organização dos genes de resistência a cobre em diferentes bactérias fitopatogênicas. O operon de resistência a cobre de *Xac* (NC_003919) foi comparado aos operons de *X. campestris* pv. *campestris*, *Xcc* (NC_007086), *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo* (AE013598), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xav* (AY536748), *X. campestris* pv. *juglandis*, *Xcj* (L19222), *P. syringae* pv. *tomato*, *Pst* (NC_004578) e *P. syringae* pv. *syringae*, *Pss* (NC_007005). As setas indicam a direção de transcrição dos genes organizados em operons nas diferentes bactérias.

Parte da região *usptream* (600 pb) ao operon *copAB* também foi analisada e apenas um provável sítio de ligação ao ribossomo foi encontrado e está destacado na Figura 27. Foi encontrada uma ORF (XAC3629) *upstream* ao gene *copA* (112 pb de região intergênica), a qual codifica para uma proteína hipotética de 152 resíduos de aminoácidos e apresenta identidade de 26% com a proteína CopL de *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria (*Xav*), a qual também se localiza *upstream* ao gene *copA* desta bactéria (113 pb de região intergênica). Um alinhamento de seqüências entre a proteína codificada pela ORF XAC3629 e a proteína CopL de *X. pv. vesicatoria* está mostrado na Figura 28. Embora a identidade entre as duas proteínas seja baixa, comparando a seqüência das duas proteínas é possível observar a alta quantidade dos aminoácidos cisteína e histidina, sugerindo um provável papel desta proteína na ligação a cobre.

Esta região também foi analisada em relação às prováveis regiões -10 e -35, característicos de regiões promotoras de genes de organismos procariotos, baseando-se nos trabalhos de Katzen *et al.* (1996) e Voloudakis *et al.* (2005). De acordo com os autores, a seqüência consensus dessas regiões em *Xanthomonas campestris* é TTGTNN (-35) e G(T)ATNAT(A) ou TAAAGT (-10). Essas regiões, ou similares, foram encontradas *upstream* ao gene *copA* e estão indicadas na Figura 27. Esses elementos não foram encontrados na região intergência *copA-copB*, sendo mais uma evidência de que estes genes estão organizados em um operon.

5'*copA*.....GTATCACTGCCATCTGCTGTACCACATGGAAGCGGGCATGATGCGCGAAGTG
CGGGTGGAAGCATGAgccgctttcgcaATGcaggcctggttcgcggctgcgcttcttggcgagcgc
atctgcggttgcgcaggagcatcagcacgatgcgATGGAGGAGGCACCGCAGGACATGCAGGAA
CAGGCGATGCAAATGGCCGATGGCGCACATGAGACCCCGGCATCATCTCAGGCCGCACCCATCG
ACCACACTCACATGT.....*copB*.....3'

Figura 26 - Análise da região entre as seqüências codificadoras dos genes *copA* e *copB* no genoma de *Xac*. O *stop codon* do gene *copA* (delineado) e o *start codon* do gene *copB* (sublinhado) proveniente da anotação do genoma estão representados em letras maiúsculas, em negrito e se sobrepõem. Outros prováveis *start codon* estão em negrito e sublinhados. A região intergênica proposta por nós está representada em letras minúsculas. Os prováveis sítios de ligação ao ribossomo (www.ics.uci.edu/~kibler/pubs/TR03) estão destacados em cinza na figura.

-883 5'.....**genoma**.....tcaccgggcgcccggcgagccagccattggtgagcgcg
 -842 tacaggaatagcgagcgccagggcgggtgcttgaggctgccggtcgggtggctggactcgtcct
 -778 tgaagtacaggtcgatgcccggatagcccggcagttccatcggaatcaggtgggtgctggccga
 -714 ccgattgaaatcggcttcgatcttctggatggcggcggccaccactggcgctgcgacatggca
 -650 ggacttggctgcaaaagtagcgtaattctaccgccgctgcctgcccgcctacgcagccagcg
 -586 atcgggcgacagctggggccg**ATGCTATGCTCGCCGCACCTGTC**ACTGCCTCGACTGTCCGTG
 -522 CTGCATCGCCTGCTCCGCCTGCTGCTGTGCCTGTGCCTGGTTGCCAACACGGCCACCGGCGCGT
 -458 GGGCGTCGGTGGGCATGGCCATGCCGGAATGGCGTCGGGCAC**GATGCCCGCCGCGCCCATGGC**
 -394 GGGCACTGCCGCGACCACGCAGACGGAGCAGCCGGCTGCCCTGCCGTGCCATGAGGCG**GATGCC**
 -330 CCGCCGACTGCCATGCAGGTGCACGATAAGGCCACGCATGCGCACGCGCCGACTGCTG**CAAAC**
 -266 **TGGGCAGCTGCGATTGCCTGCAGCACTGCAGCCTCGCCTTGTGACCTTGCCGTGCCGTACCCGC**
 -202 GGGCCTGCTCGGCCACCCGGCGCTGCCGGACACCTTGACCGAGGGGCGCAGCAGCCCGCTGCC
 -138 GACCAACCGGTGCGACCTCCCATCGCCT**TGA**gcgcccggcggccctgccttggcggctcctcggccc
 -74 cgcgcgctgcttgcgcggggtccctcagttggtgcgctgcgcccattctcttgccgatggagcgcg
 -10 **aggag**atgtc**ATG**.....**copA**.....3'

Figura 27 - Análise da região *upstream* ao gene *copA* no genoma de *Xac*. Os *start codons* do gene *copA* (sublinhado) e da ORF XAC3629 (duplamente sublinhado) proveniente da anotação do genoma estão representados em letras maiúsculas e em negrito. O stop codon da ORF XAC 3639 está representado em letras maiúsculas, em negrito e a sua seqüência nucleotídica, em letras maiúsculas e não estão em negrito. A região intergênica está representada em letras minúsculas. O provável sítio de ligação ao ribossomo (www.ics.uci.edu/~kibler/pubs/TR03) está destacado em cinza na figura e os prováveis elementos conservados da região promotora estão sublinhados (-10) ou duplamente sublinhados (-35). A numeração foi definida considerando o nucleotídeo A do codon ATG como +1.

```

X.citri      1  MLCSPHLSLPRLSVLHRLRLRLLLCLCLVANTATGAWASVGMAMPAMASGTMPPAAPMAGTA
X.vesicatoria 1  -----MLVLNGAWSAFASVSMNP-----VMEEQASEVAA

X.citri      61  ATTQTEQPAALPCHEAMPPTAMQVHDKATHAHA-PDCCKLGSC--DCLQHCSLALLT-L
X.vesicatoria 30  AVQVDEDCVAHHSAEHHFDATSIIEKAGTCHGDHAGPDCCCKSSACRCACVHACASALPARL

X.citri      117  PAVPAGLLGHPALPDTLTFGRSSPLPDQVVRPPIA
X.vesicatoria 90  HVSVQLALGLDVMP--LPLGHPAPALPHLIRPPIG

```

Figura 28 - Alinhamento de seqüências entre proteínas *upstream* ao gene *copA*. O alinhamento da proteína codificada pela ORF XAC3629 de *Xac* (AAM38472) foi feito contra a proteína CopL de *X. pv. vesicatoria* (AAT07753). Alinhamento realizado com o programa ClustalW.

Parte IV - Produção e purificação das proteínas CopA, CopB e CutC recombinantes em *E. coli*. Análises estruturais das proteínas recombinantes.

Produção de anticorpos

IV.1. Subclonagem dos genes e produção das proteínas CopA, CopB e CutC

Os genes *copA*, *copB* e *cutC* foram amplificados por PCR, purificados e digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* (para os genes *copA* e *copB*), ou *NdeI* e *BamHI* (para o gene *cutC*) e subclonados no vetor pET28a, para a produção das proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de poli-His. Os genes *copA* e *copB* também foram subclonados no vetor de expressão pGEX-4T-1 no sítio *EcoRI*, para a produção das proteínas fusionadas a GST. Os plasmídeos recombinantes foram digeridos com o par de enzimas *NdeI* e *EcoRI* para a confirmação da subclonagem. Essas construções plasmidiais foram utilizadas para transformar *E. coli*, linhagem DH10B e amostras de DNA plasmidial dos clones recombinantes foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição *BglII* e *EcoRI* (para plasmídeos contendo genes *copA* e *copB* no vetor pET28a) e com a enzima *BamHI* (para plasmídeos contendo o gene *cutC* no vetor pET28a), ou com a enzima *EcoRI* (para plasmídeos contendo os genes *copA* ou *copB* no vetor pGEX-4T-1). Após digestão, as amostras foram analisadas em gel de agarose. Amostras de DNA plasmidial dos clones positivos apresentaram 2 fragmentos: o vetor (pET28a de ~5,4 kb e pGEX-4T-1, de ~5,0 kb) e fragmentos de, aproximadamente 2000, 1000 e 800 pb correspondente aos genes *copA*, *copB* e *cutC*, respectivamente, subclonados (dados não mostrados). Amostras de DNA plasmidial de clones considerados positivos foram confirmadas através de seqüenciamento de DNA e armazenados a -80°C para a continuidade do trabalho.

Para a produção em *E. coli* das proteínas CopA, CopB e CutC, plasmídeos contendo os respectivos genes foram utilizados para transformar a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. As culturas celulares foram induzidas com IPTG e amostras foram coletadas antes e depois de 4 h de indução. Uma análise inicial da produção das proteínas, fusionadas a cauda de poli-His, pode ser observada na Figura 29. Bandas de alta intensidade correspondentes às proteínas CopA (aproximadamente 66 kDa), CopB (aproximadamente 55 kDa) e CutC (aproximadamente 30 kDa) estão presentes nos extratos celulares dos clones analisados após indução com IPTG. A

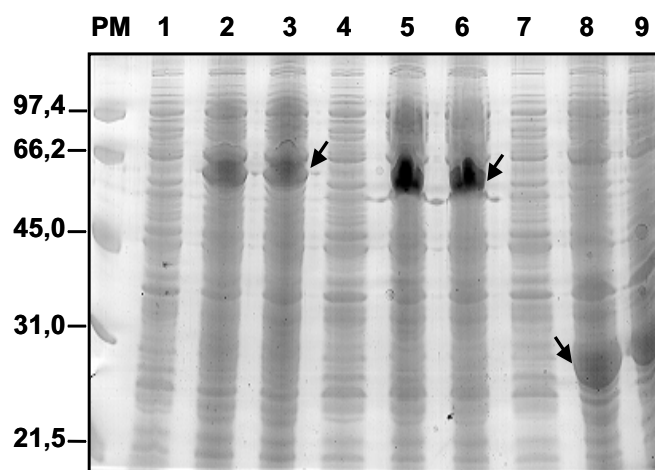


Figura 29 - Análise da expressão em *E. coli* das proteínas CopA, CopB e CutC. Um volume de 20 μ L de cada amostra foi aplicado em gel. PM - Peso Molecular (kDa), 1, 4 e 7 - extratos de células transformadas com os plasmídeos pET28a-CopA, pET28a-CopB e pET28a-CutC, respectivamente, antes da indução com IPTG, 2 e 3 - extratos de células transformadas com o plasmídeo pET28a-CopA, 5 e 6 - extratos de células transformadas com o plasmídeo pET28a-CopB, 8 e 9 - extratos de células transformadas com o plasmídeo pET28a-CutC, após indução com IPTG. As setas indicam as bandas correspondentes as proteínas CopA, CopB e CutC. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

análise da produção das proteínas CopA e CopB, fusionadas a GST também foi realizada e, após análise por SDS-PAGE foi possível visualizar a presença de bandas de alta intensidade correspondentes a essas proteínas nos extratos celulares dos clones analisados (resultados não mostrados).

O próximo passo foi analisar a solubilidade das proteínas recombinantes CopA e CopB fusionadas a GST e comparar com as mesmas proteínas recombinantes fusionadas a cauda de poli-His. A solubilidade de CutC fusionada a cauda de poli-His também foi analisada. Os resultados comparativos estão mostrados na Figura 30.

Podemos observar pelas figuras que embora as proteínas recombinantes foram produzidas em grande quantidade a maior parte das proteínas estava insolúvel, estando presente no precipitado. Pequenas quantidades das proteínas foram observadas no sobrenadante. Apenas a proteína CopA fusionada a GST apresentou um leve aumento na solubilidade quando comparada à proteína fusionada à cauda de poli-His. Tentativas de melhora da solubilidade alterando as concentrações de IPTG, temperatura e tempo de indução não levaram a melhora nos resultados obtidos.

IV.2. Purificação das proteínas

Com o objetivo de obtermos proteínas puras para a produção de anticorpos e estudos estruturais, uma tentativa de purificação das proteínas recombinantes foi realizada. As proteínas CopB e CutC fusionadas a cauda de poli-His e a proteína CopA fusionada a GST foram purificadas através de cromatografia de afinidade. Para isso, as proteínas foram produzidas através da indução a 30°C com 0,1 mM de IPTG durante 6 horas e purificadas como descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 31 estão apresentadas as diferentes etapas de purificação da proteína CopA. As frações foram eluídas em volumes de 5 mL e podemos observar que a proteína foi obtida em pequena quantidade e com um baixo grau de pureza (Figura 31, linha 5). Nas Figuras 32A e 32B, estão apresentadas as diferentes etapas de purificação das proteínas CopB e CutC fusionadas a cauda de poli-His. A proteína CopB foi eluída em 300 mM de imidazol, fração correspondente ao eluato na Figura 32A (linhas 7 e 8). A proteína CopB foi obtida com um bom grau de pureza, mas em quantidade muito baixa e, após diálise e quantificação protéica, foi utilizada para inocular coelhos e para análise de CD. A proteína CutC foi eluída em 400 mM de imidazol, fração correspondente ao eluato I na Figura 32B (linha 6). Como ainda havia a presença de uma proteína contaminante,

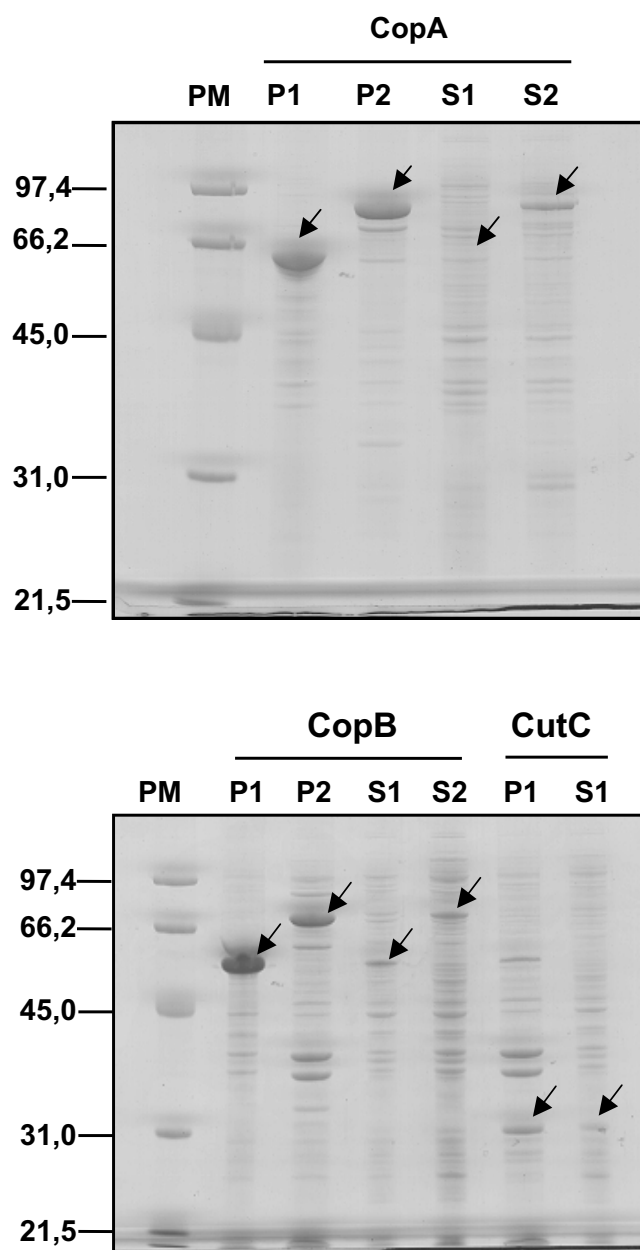


Figura 30 - Análise comparativa da solubilidade das proteínas CopA, CopB e CutC recombinantes produzidas em *E. coli*. Condições de indução: 0,1 mM de IPTG a 30°C por 6 horas. PM – Peso Molecular (kDa), 1 – proteínas fusionadas a cauda de poli-His, 2 – proteínas fusionadas a GST. S - sobrenadante, P - precipitado. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas CopA, CopB e CutC. Uma quantidade de 15 µg de proteínas totais foram aplicados no gel. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

esta fração foi diluída e novamente cromatografada na coluna de níquel e o eluato II foi recolhido em frações de 1,5 mL (Figura 32C). Nesta segunda purificação a proteína CutC foi obtida com alto grau de pureza e em grande quantidade.

IV.3. Análise das proteínas por dicroísmo circular e fluorescência

A proteína CopB purificada, dialisada e quantificada foi utilizada para a análise de dicroísmo circular (CD), como uma análise estrutural preliminar. O espectro de CD mostrou dois mínimos negativos em 210 e 219 nm e um máximo em 192 nm, como pode ser observado na Figura 33. Este espectro de CD é típico de proteínas contendo estruturas em α -hélice com mínimo e máximo próximos das transições para α -hélice (mínimo negativo ao redor de 210 e 222 nm, e um máximo positivo ao redor de 192 nm). Este resultado mostrou que esta proteína recombinante está adequada aos estudos estruturais.

A proteína CutC purificada foi também utilizada para análise de CD. Apesar da concentração da proteína CutC ser um pouco maior, não foi possível traçar um espectro para esta proteína. Ao contrário, o espectro obtido foi similar ao do tampão. Na tentativa de explicar o resultado de CD obtido para esta proteína, foi feita uma análise de fluorescência. Para isso a amostra de proteína, na mesma concentração foi excitada em 280 e 295 nm. Podemos observar pelo espectro de fluorescência da proteína excitada em 280 nm (Figura 34A), a presença de dois picos correspondentes à tirosina e ao triptofano. A emissão do triptofano foi ao redor de 360 nm, o que fica mais nítido quando observamos o espectro da proteína excitada em 295 nm (Figura 34B). Desta análise concluímos (juntamente com a Dra. Leila Beltramini, IF, USP, São Carlos) que a proteína está desenovelada, pois, se estivesse corretamente enovelada a emissão do triptofano teria que estar abaixo de 340 nm. A emissão do triptofano em comprimento de onda mais alto sugere que o mesmo está exposto, uma característica de proteínas estruturalmente desarranjadas.

Também podemos observar pelas Figuras 34A e B que o pico correspondente à emissão do triptofano é largo, o que indica a presença de diferentes conformações da proteína não enovelada. Isto poderia explicar porque não se obteve sinal na análise de CD, pois o espectro de um estado poderia estar anulando o do outro.

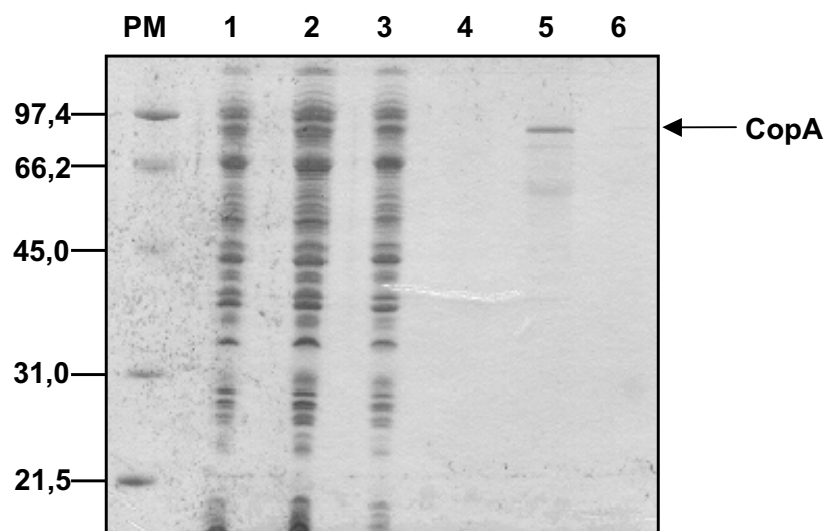


Figura 31 - Purificação da proteína recombinante CopA produzida em *E. coli* fusionada a GST. PM - Peso Molecular (kDa), 1 – sobrenadante, 2 – lavagem I (fração que passou pela coluna após aplicação da amostra), 3 – lavagem II (lavagem com tampão de equilíbrio antes da eluição da amostra), 4 – 6, frações do eluato. 20 μ L das diferentes frações foram aplicados no gel. A seta indica a banda correspondente a proteína CopA. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

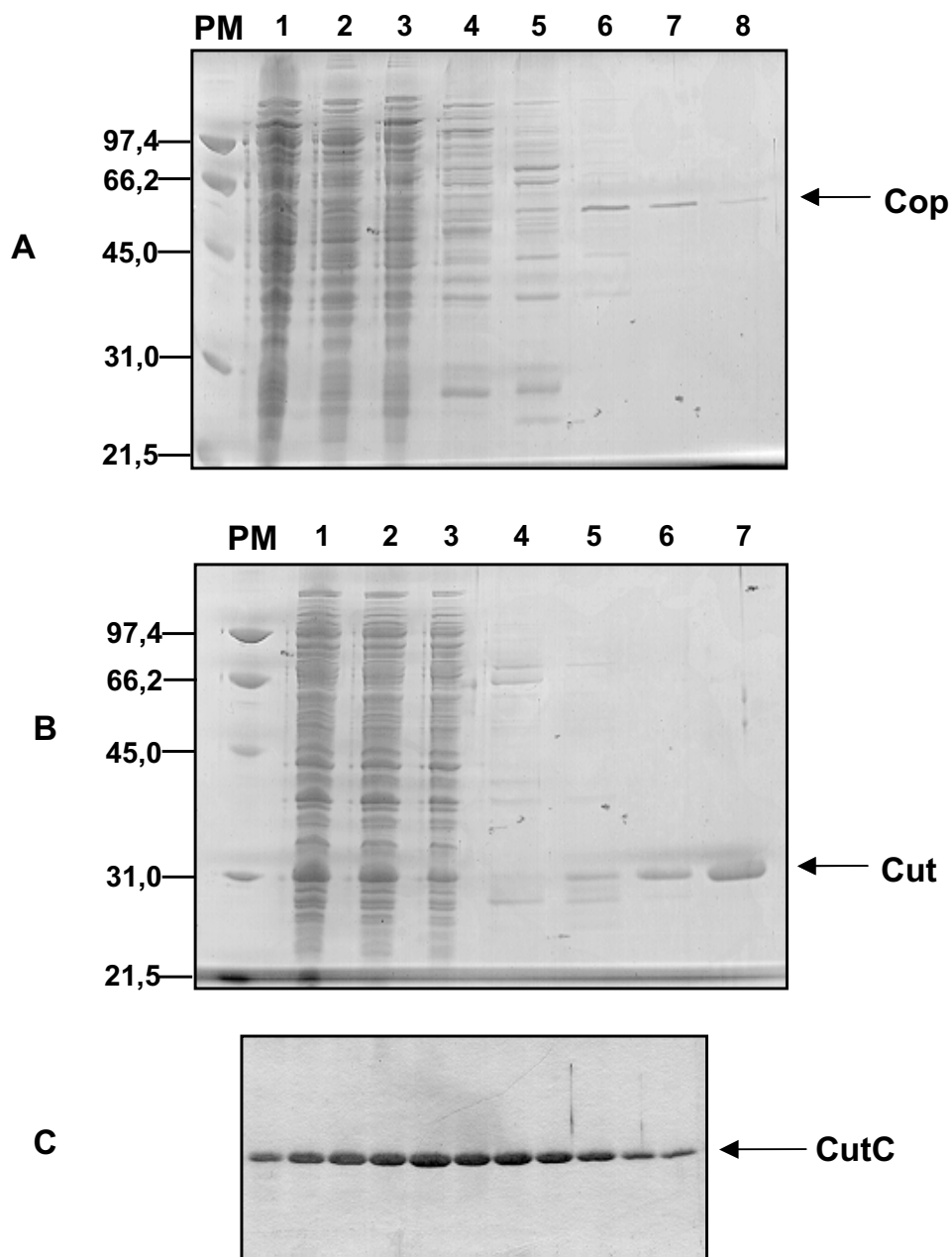


Figura 32 - Purificação das proteínas recombinantes CopB (A) e CutC (B e C) produzidas em *E. coli* fusionadas a cauda de poli-His. PM - Peso Molecular (kDa), 1 – sobrenadante, 2 – lavagem I (fração que passou pela coluna após aplicação da amostra), 3 – lavagem II (tampão de lavagem contendo 50 mM de imidazol), 4 – lavagem III (tampão de lavagem contendo 100 mM de imidazol), 5 – lavagem IV (tampão de lavagem contendo 150 mM de imidazol), 6 – lavagem V (tampão de lavagem contendo 200 mM de imidazol) (A) e eluato I (B), 7 – eluato (A) e eluato II (B), 8 – eluato (A). (C) Frações de 1,5 mL eluato II em destaque. 20 μ L de proteínas totais foram aplicados no gel. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas CopB e CutC. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

IV.4. Análise da produção de anticorpos por *Western blot*

As proteínas CopB e CutC após purificação e diálise, foram quantificadas e utilizadas para inocular coelhos. A análise da produção de anticorpos foi realizada por *Western blot* utilizando o extrato total de *E. coli* produzindo essas proteínas recombinantes e extrato total de *Xac*, crescida na ausência de cobre (Figura 35B) para titular o anticorpo. A proteína CopB nativa de *Xac* tem, aproximadamente, 45 kDa (365 aminoácidos), enquanto que a recombinante fusionada à cauda poli-His tem 386 aminoácidos e migra com uma massa molecular de aproximadamente 55 kDa (Figura 35A). Utilizando aproximadamente 130 µg/canaleta de proteína total do extrato de *Xac* obtivemos um título de 1:1000 para o anticorpo, como mostrado na Figura 35B. Após várias tentativas, não foi possível a obtenção de anticorpos contra a proteína CutC.

Como descrito anteriormente, a proteína CopA foi produzida na forma insolúvel em *E. coli* quando fusionada a cauda de poli-His ou a GST. Por causa disso, o anticorpo contra esta proteína foi produzido através da remoção das bandas do gel contendo CopA-His ou CopA-GST, maceradas em N₂ líquido, homogeneizadas em adjuvante de Freund e utilizadas para inocular coelhos. A análise da produção de anticorpos foi realizada por *Western blot* utilizando o extrato total de *Xac* crescida na presença de cobre durante 0,5 hora (Figura 36) para titular o anticorpo. A proteína CopA nativa de *Xac* tem, aproximadamente, 65 kDa (594 aminoácidos) e utilizando, aproximadamente, 75 µg/canaleta de proteína total do extrato de *Xac* obtivemos um título de 1:500 para o anticorpo produzido contra a proteína CopA fusionada a GST, como mostrado na figura. Nenhuma resposta de produção de anticorpo foi obtida quando utilizamos a proteína CopA fusionada a cauda de poli-His.

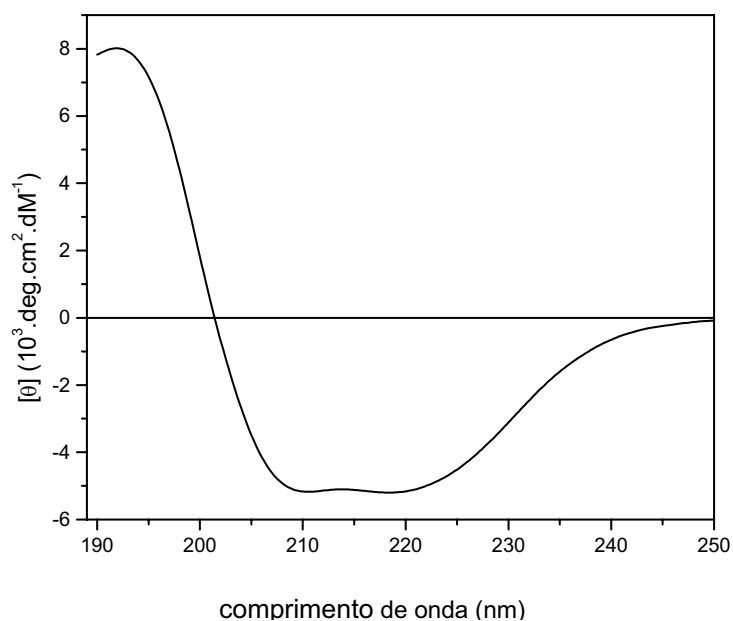


Figura 33 - Espectro de Dicroísmo Circular da proteína recombinante CopB. Espectro de CD foi obtido entre 190 to 250 nm a 25°C em um espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japan) em cubeta cilíndrica de quartzo de 1 cm, utilizando 0,2 mg/ml de proteína em tampão Tris-HCl pH 7,6. O espectro total foi resultado do acúmulo de 16 corridas.

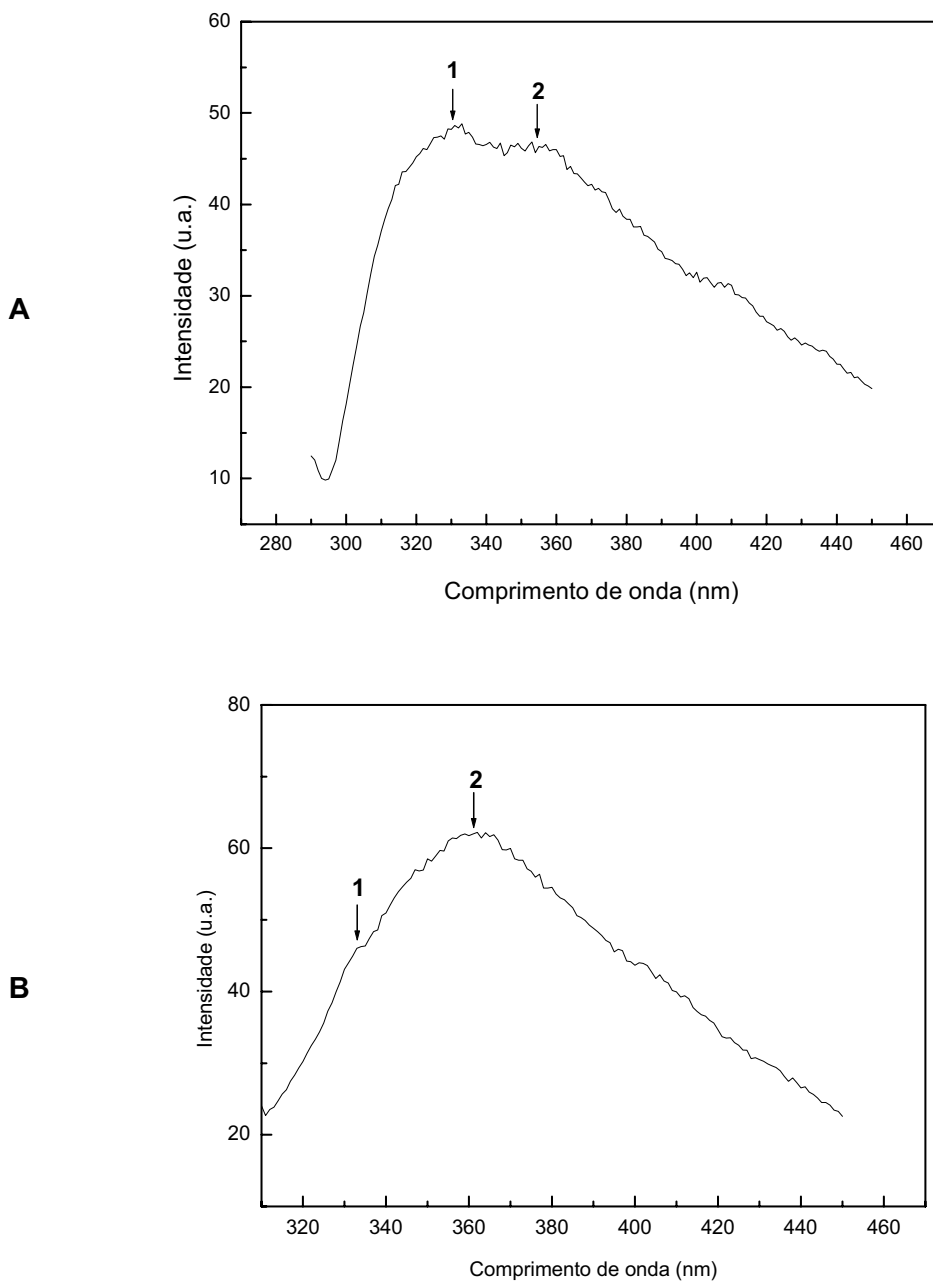


Figura 34 - Espectro de fluorescência para a proteína recombinante CutC. Amostra excitada em 280 nm (A) e em 295 nm (B). 1 – máximo da tirosina ao redor de 330 nm, 2 – máximo do triptofano ao redor de 360 nm. Espectro de fluorescência foi obtido em Fluorímetro ISS K2 (ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation – Illinois/USA), utilizando cubeta de quartzo de 1 cm e 0,3 mg/mL de proteína em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 9,0.

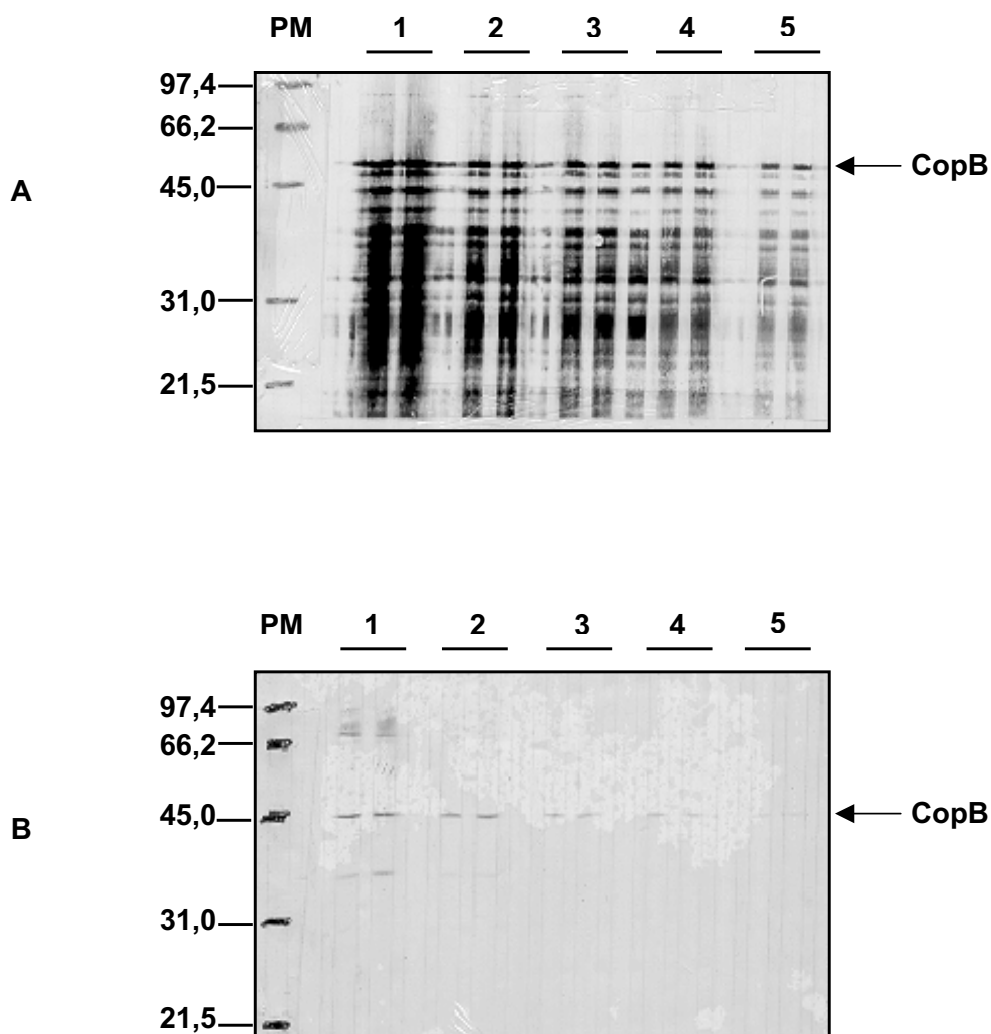


Figura 35 – Análise da produção de anticorpo anti-CopB por *Western Blot*. 20 μ g da proteína CopB recombinante purificada (A) e 130 μ g de proteínas totais do extrato de *X. citri*, linhagem 306 (B) foram aplicados por canaleta do gel. PM - Peso Molecular (kDa), 1 a 5 – diluições do soro, sendo 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000, respectivamente. As setas indicam as bandas esperadas.

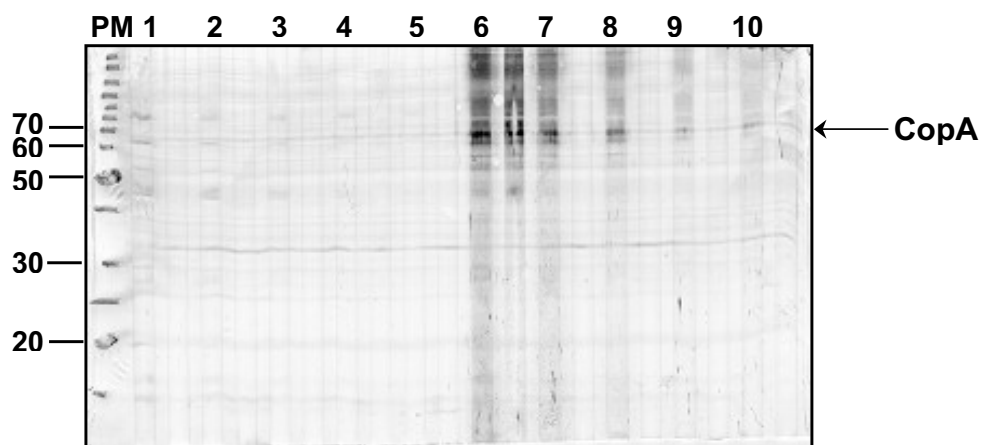


Figura 36 - Análise da produção de anticorpo anti-CopA por *Western blot*. 75 μ g de proteínas totais do extrato de *Xac* foram aplicados por canaleta do gel. PM - Peso Molecular (kDa), 1 a 5 – soro pré imune nas diluições de 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2000, respectivamente, 6 a 10 – soro contendo anti-CopA nas diluições de 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2000, respectivamente. A seta indica a banda esperada.

Parte V. Inativação do gene *copA* com transposon

V.1. Subclonagem do gene *copA* no vetor pUC18 e inativação *in vitro* do gene

Como o objetivo de comprovar o papel da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*, o gene que codifica para esta proteína foi inativado pela inserção de um transposon. Para isso, o gene *copA* foi, primeiramente, subclonado no vetor pUC18 e o DNA plasmidial dos clones obtidos após transformação foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *EcoRI* e analisados em gel de agarose. Amostras de DNA plasmidial dos clones positivos liberaram um fragmento de DNA de, aproximadamente, 1800 pb referente ao gene *copA*. Os clones positivos foram checados, também, por sequenciamento de DNA.

Um plasmídeo contendo o gene *copA* foi utilizado para a reação *in vitro* de inserção do transposon, o produto desta reação foi utilizado para a transformação de *E. coli* DH10B e os clones transformantes selecionados na presença de kanamicina. Muitos clones após transformação foram analisados, apenas cinco deles mostraram a presença de DNA plasmidial. Amostras de DNAs plasmidiais foram analisadas por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *copA*. Foram amplificados fragmentos de, aproximadamente, 3000 pb referentes ao gene *copA* (1782 pb) contendo o transposon (1221 pb), indicando a presença do transposon interrompendo a seqüência do gene em dois de três clones analisados (dados não mostrados). As duas construções plasmidiais foram seqüenciadas para verificar o local da inserção do transposon dentro da seqüência do gene. O sequenciamento foi realizado com os oligonucleotídeos CopA-F e CopA-R, os quais anelam nas extremidades do gene *copA*. Em um dos clones o transposon está localizado na posição 72 pb do gene *copA*, portanto, interrompe o gene logo no início da seqüência, e no outro se encontra na posição 408 pb, interrompendo o gene em uma posição um pouco mais central.

V.2. Obtenção de uma linhagem $\Delta copA$ e análise do DNA genômico das células mutantes

A construção plasmidial, contendo o transposon na posição 408 pb do gene *copA*, em diferentes concentrações, foi utilizada para a transformação de *Xac*.

Eventos de recombinação homóloga, entre os DNAs plasmidial e o genômico permitiram a obtenção de uma linhagem mutante ($\Delta copA$) de *Xac* contendo o gene *copA* inativado pela inserção do transposon. Desta transformação foram obtidos 5 clones após plaqueamento em meio seletivo, dos quais foram extraídos os DNAs genômicos para a análise da inserção do transposon no locus *copA*. Para isso, os DNAs genômicos foram, primeiramente, digeridos com a enzima *EcoRI*, a qual cliva em regiões adjacentes ao gene *copA*, de acordo com esquema ilustrado na Figura 37A e analisados através de *Southern blot*, utilizando o fragmento do transposon, ou o próprio gene *copA* como sonda.

A digestão com esta enzima libera fragmento de 8,1 kb do DNA genômico das células mutantes. Como podemos observar pela Figura 37B, apenas três dos clones mutantes mostraram a presença de um fragmento deste tamanho e, portanto, foram por nós considerados como clones mutantes, ou seja, contendo o gene *copA* interrompido pelo transposon (Figura 37B, linhas 3, 6 e 7). Dois clones mostraram conter o transposon inserido no genoma, mas provavelmente em uma outra região. Um outro experimento de *Southern* foi realizado utilizando o gene *copA* como sonda, para confirmar se o fragmento de 8,1 kb era realmente o gene *copA*. Como mostrado pela Figura 37C, os três clones considerados mutantes realmente contém o gene *copA* interrompido pelo transposon (Figura 37C, linhas 3, 6 e 7). O DNA genômico da linhagem selvagem, digerido com a mesma enzima, foi usado como controle (linhas 2), o qual migra como um fragmento de menor peso molecular.

Para confirmar a inserção do transposon no gene *copA* nos três clones detectados através de *Southern blot*, o gene *copA* foi amplificado a partir do DNA genômico destes clones utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene (Figura 38). Uma banda de aproximadamente 3000 pb referente ao tamanho do gene *copA* contendo o transposon (1782 pb do gene e 1220 pb do transposon) deveria ser amplificada. Através da figura podemos verificar a presença de um fragmento deste tamanho nos três clones analisados (Figura 38, linhas 3, 4 e 5), confirmando a inserção do transposon no gene *copA*.

Uma vez confirmada a presença do transposon no DNA genômico dos três clones, foi necessário saber em que posição do gene o transposon foi inserido após os eventos de recombinação homóloga. Para isso, os fragmentos amplificados dos clones

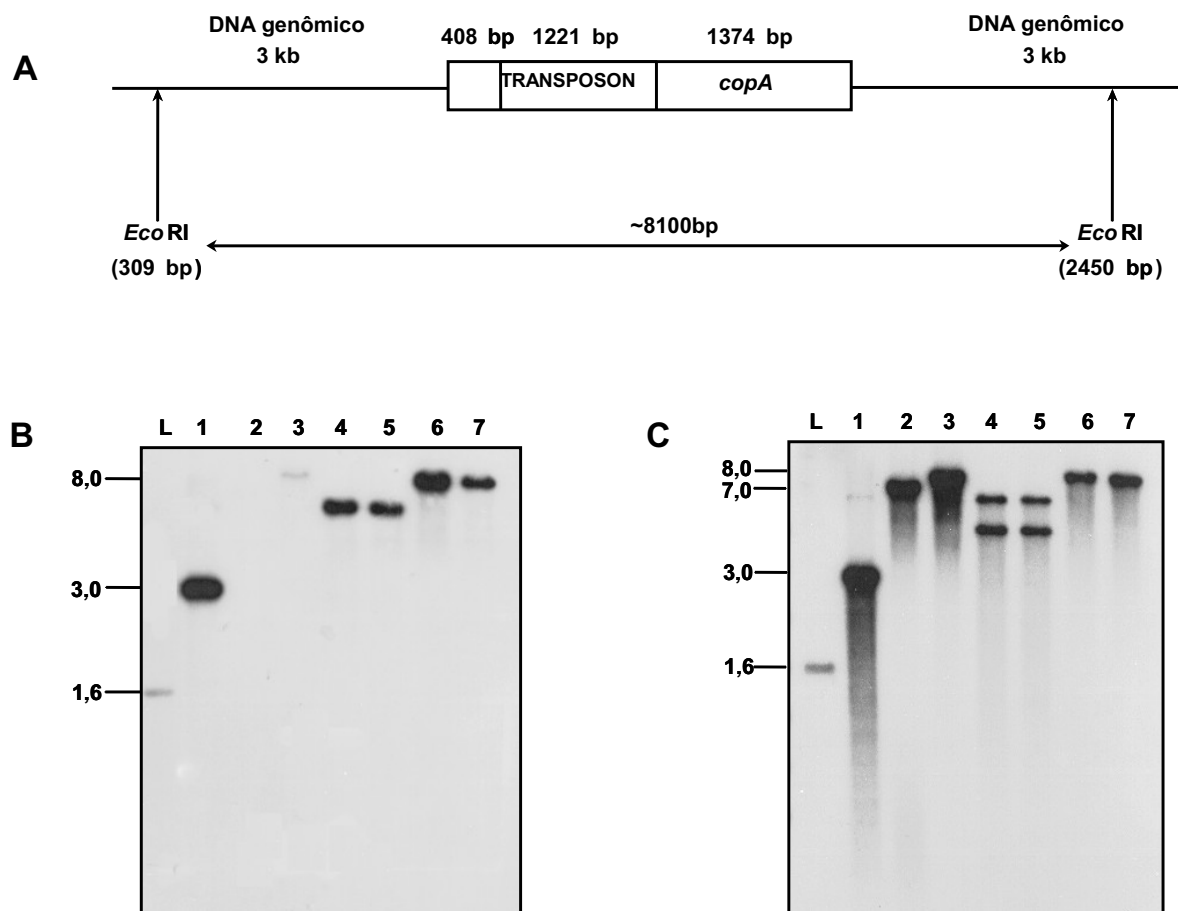


Figura 37 - Análise do DNA genômico dos clones mutantes por *Southern blot*. A - Representação esquemática do gene *copA* e regiões extragênicas no DNA genômico de *Xac*. O sítio de clivagem da enzima *EcoRI* está representado. B - *Southern blot*. L - 1 kb ladder, 1 - plasmídeo pUC-*copA*-transposon (produto da inserção *in vitro*), 2 - DNA genômico de *Xac* 306 (linhagem selvagem), 3-7 - DNA genômico dos diferentes clones. Os DNAs genômicos foram digeridos com *EcoRI*, separados em gel de agarose 1%, transferidos para membrana de Nylon e hibridizados com o fragmento do transposon (B) ou com o gene *copA* (C) radioativamente marcados com ^{32}P .

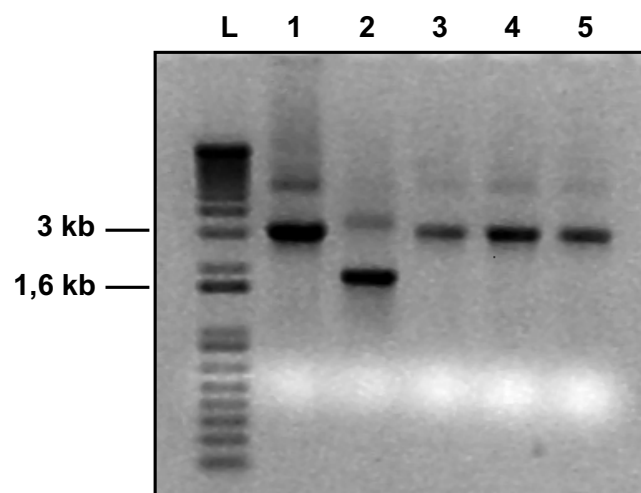


Figura 38 - Amplificação do gene *copA* a partir do DNA genômico das células mutantes. L - padrão de Peso Molecular 1 kb Ladder, 1 – plasmídeo pUC-*copA*-transposon (produto da reação *in vitro*), 2 – DNA genômico de *Xac* 306 (selvagem), 3 – 5 – DNA genômico dos diferentes clones mutantes. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, gel corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

contendo o transposon e a construção plasmidial utilizada para a transformação de *Xac* foram sequenciados utilizando oligonucleotídeos específicos para o transposon. Após análise das seqüências por Blastn contra a seqüência genômica de *Xac*, observamos que nos três clones analisados e na construção plasmidial, a extremidade 5' do transposon interrompeu o gene *copA* na posição 408 pb e a extremidade 3' do transposon na posição 399 pb (Figura 39). O sequenciamento de DNA com oligonucleotídeos internos do gene *copA* confirmou as regiões de inserção. Este resultado não era esperado e foi interpretado como um possível evento de recombinação homóloga nas células de *E. coli* durante a amplificação das cópias plasmidiais da reação de inserção *in vitro* do transposon no gene *copA*, uma vez que no plasmídeo utilizado para transformar células de *Xac* o mesmo resultado foi observado. Embora o resultado de sequenciamento tenha sido inesperado, todos os resultados indicaram que as células mutantes apresentam o transposon inserido no *locus* genômico.

V.3. Avaliação do crescimento *in vitro* das células mutantes na presença de cobre

Uma vez isoladas as linhagens de *Xac* contendo o gene *copA* interrompido pelo transposon, a próxima etapa foi analisar o crescimento das células mutantes na presença de cobre. Para isso, as células mutantes e selvagem foram crescidas *in vitro* na ausência e na presença de 1 mM de cobre durante 24 horas. Foram analisados os clones correspondentes às linhas 3, 6 e 7 da Figura 37B e C. Após esse período, o crescimento foi quantificado por medidas de turbidimetria a 550 nm. Como pode ser observado pela Figura 40A, o crescimento das células mutantes foi semelhante ao da linhagem selvagem na ausência de cobre e, na presença de 1 mM de cobre, o crescimento das células mutantes foi muito baixo, praticamente nulo, quando comparado ao das células selvagem. Analisando este resultado, foi necessário saber qual a menor concentração de cobre capaz de inibir o crescimento das células mutantes. Para isso, as células mutantes e selvagem foram crescidas na ausência e na presença de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM de cobre durante 24 horas. Como pode ser observado pela Figura 40B, o crescimento das células mutantes foi praticamente igual ao da linhagem selvagem na ausência de cobre. Entretanto, baixas concentrações de cobre (0,25 mM) foram suficientes para inibir o crescimento das células mutantes na presença de cobre.

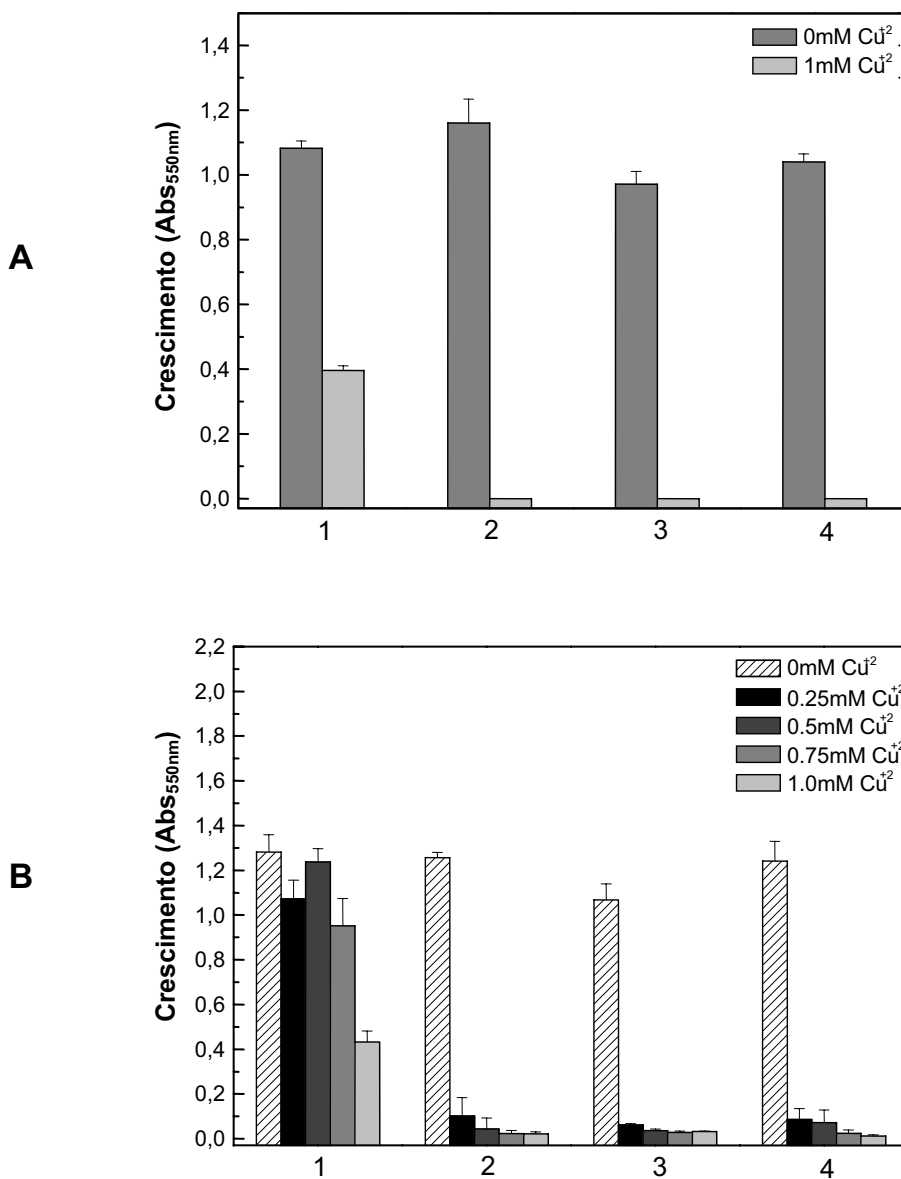


Figura 40 - Crescimento das células mutantes e selvagem de *Xac in vitro*. 1 – *Xac*, linhagem 306 selvagem; 2–4 – células mutantes. O crescimento foi analisado na ausência e na presença de 1 mM de CuSO₄ (A) e na ausência e na presença de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mM de CuSO₄ (B), a 28°C, 250 rpm. Amostras foram coletadas após 24 horas e o crescimento foi medido por turbidimetria a 550 nm. Este resultado é a média de pelo menos três experimentos independentes.

V.4. Avaliação das células mutantes *in vivo*

Foi avaliada também a capacidade das células mutantes e selvagem de induzirem os sintomas do cancro cítrico na ausência e na presença de diferentes concentrações de cobre, através da inoculação das células em folhas jovens de citros, como uma análise qualitativa. Para isso, suspensões das células sem cobre (controle) e suspensões contendo 0,25, 0,5, 0,7, 1 e 2 mM de cobre, em tampão fosfato, foram utilizadas para inocular folhas jovens de limão cravo e laranja. Alguns controles foram realizados: inóculo de água ultrapura estéril, tampão fosfato de potássio, soluções contendo 1 mM e 10 mM de cobre em tampão fosfato para analisarmos o efeito do cobre na folha e células selvagem e mutantes na ausência de cobre. Células de *Xac* infectam as folhas levando ao aparecimento de sintomas iniciais do cancro (*water soaking*), os quais evoluem para o processo infeccioso tardio característico do cancro cítrico (lesão amarelo ferrugem no local do inóculo). Os resultados destes experimentos estão mostrados nas Figuras 41, 42 e 43.

Após cinco dias da inoculação das folhas de limão, o sintoma de *water soaking* foi visível para as células selvagem e mutantes, como pode ser observado pela Figura 41. Quando analisamos os controles utilizados no experimento, verificamos apenas uma região de necrose no local onde foram inoculadas as soluções de cobre (1 e 10 mM), sendo o efeito mais proeminente em concentração alta (10 mM). Ambos tipos de células desenvolveram os sintomas iniciais do cancro na ausência de cobre (Figura 41B) e de forma semelhante na presença de 0,25 mM de cobre (Figura 41C). Entretanto, em 0,5 mM de cobre (Figura 41D), os sintomas no hospedeiro foram reduzidos pelas células mutantes e o efeito é claramente visível quando as células foram inoculadas na presença de 0,7 mM de cobre (Figura 41E), onde é possível visualizar os sintomas de *water soaking* apenas nas células selvagens. Células inoculadas na presença de 1 e 2 mM de cobre não foram capazes de infectar a planta (Figura 41F e G) e, como pode ser observado na figura, apenas uma área de necrose correspondente ao cobre pode ser observado.

O efeito do cobre sobre as células mutantes no desenvolvimento do cancro cítrico foi mais fortemente evidenciado após 20 dias de infecção, como mostrado na Figura 42. Em um estágio mais avançado da doença, as células mutantes foram capazes de induzir o cancro na presença de 0,25, 0,5 e 0,7 mM de cobre, semelhante à linhagem selvagem (Figura 42B, C e D), o que não foi observado com 5 dias de infecção (Figura 41E). Na presença de 1 mM de cobre apenas a linhagem selvagem

induziu o cancro após 20 dias de infecção (Figura 42E), mas ambos tipos de células não causaram sintomas do cancro cítrico em 2 mM de cobre (Figura 42F).

A capacidade das células mutantes e selvagem de induzir os sintomas do cancro cítrico na ausência e na presença de cobre também foi avaliado através da inoculação de folhas jovens de laranja. Para isso, suspensões das células sem cobre (controle) e suspensões contendo 0,7, 1, 1,5 e 2 mM de cobre foram utilizadas para inocular folhas jovens de laranja. Semelhante aos resultados obtidos em folhas de limão, após cinco dias da inoculação, o sintoma de *water soaking* foi visível para as células selvagem e mutantes, como pode ser observado pela Figura 43. Ambos tipos de células desenvolveram os sintomas iniciais do cancro na ausência e na presença de 0,7 mM de cobre (Figura 43A e B). As células mutantes, ao contrário das células selvagens, não foram capazes de induzir o sintoma de *water soaking* na presença de 1 mM de cobre (Figura 43C), com exceção do mutante 3. Células mutantes inoculadas na presença de 1,5 e 2 mM de cobre não foram capazes de infectar a planta (Figura 43D e E). Apenas as células selvagens causaram os sintomas iniciais do cancro nestas concentrações e, como mostrada na figura, uma área de necrose correspondente ao cobre, pode ser observada.

Todos os resultados descritos acima indicaram, a participação da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*. Isto pôde ser deduzido, uma vez que ocorre um aumento da sensibilidade ao cobre quando este gene foi inativado e, portanto, a proteína não foi produzida nas células mutantes.

V.5. Avaliação do crescimento *in vivo*

Para complementar os resultados de infecção da bactéria em folhas de limão cravo e laranja, curvas de crescimento *in planta* das células selvagem e mutante, na ausência e na presença de 1 mM de cobre foram realizadas, como uma análise quantitativa. Para isso, as células selvagem e do mutante 4 (Figuras 41, 42 e 43), foram preparadas para serem inoculadas em folhas jovens de limão cravo, como descrito em Materiais e Métodos, e discos das folhas contendo as células foram removidos em 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias após a inoculação, macerados e diferentes diluições foram plaqueadas. A contagem do número de colônias foi feita após 48 horas. Como podemos observar pela Figura 44, o crescimento das células mutantes foi similar ao da selvagem na ausência de cobre, enquanto que na presença de 1 mM de cobre, o crescimento das células mutantes foi, aproximadamente, 100 vezes menor que o da selvagem.

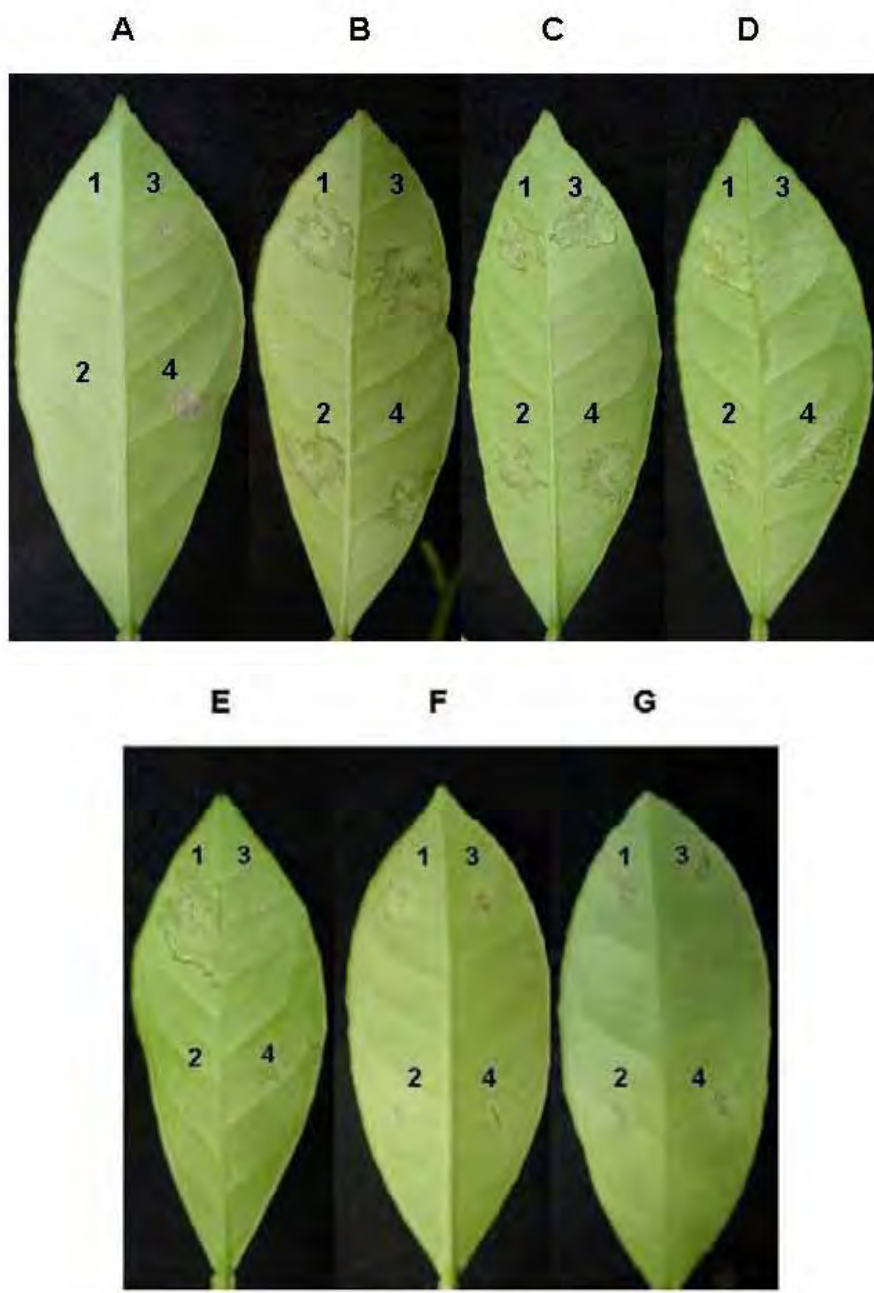


Figura 41 - Capacidade das células mutantes e selvagem de *Xac* de induzir os sintomas iniciais do cancro cítrico em folhas de limão cravo. A – controle: 1 - água ultrapura estéril, 2 - tampão fostato, 3 – 1mM de CuSO_4 e 4 – 10 mM de CuSO_4 ; B – células selvagem (1) e mutantes (2, 3 e 4) na ausência de cobre; C, D, E, F e G – células selvagem (1) e mutantes (2, 3 e 4) na presença de 0,25, 0,5, 0,7, 1 e 2 mM de cobre, respectivamente. Folhas de limão cravo após cinco dias de infecção.

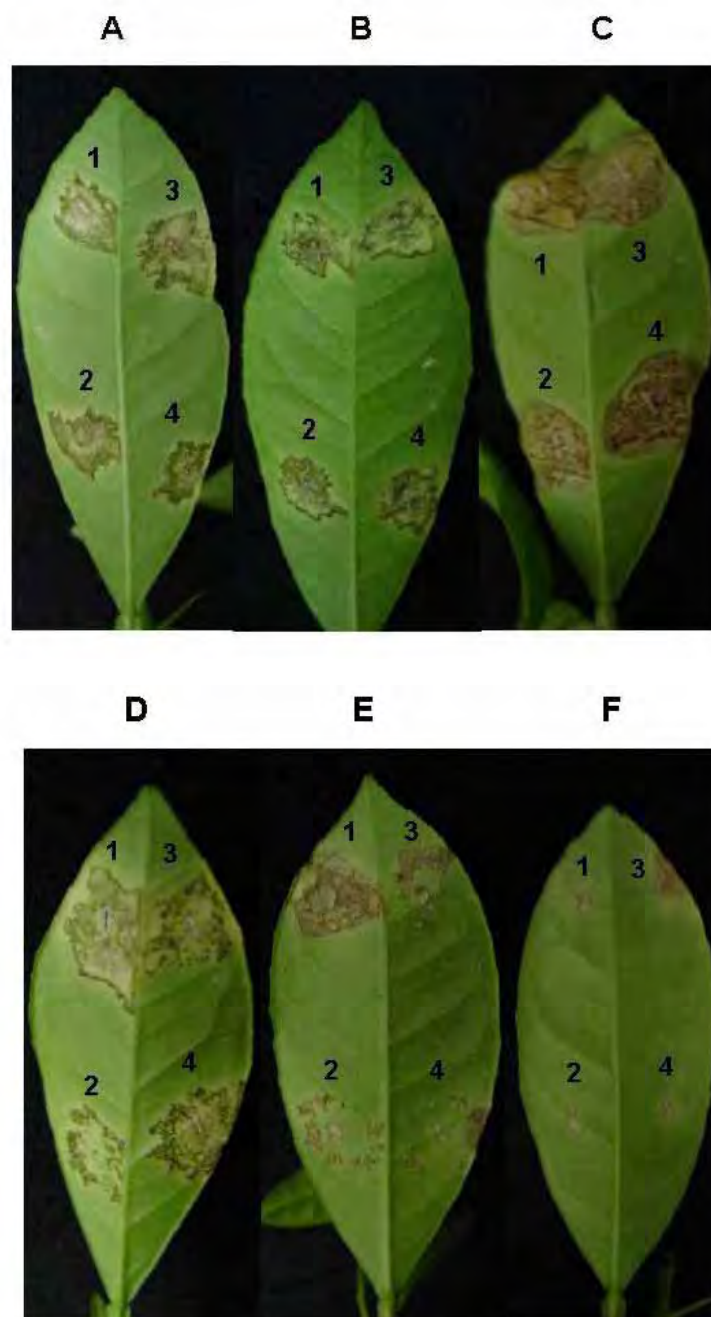


Figura 42 - Capacidade das células mutantes e selvagem de *Xac* de induzir os sintomas do cancro cítrico em folhas de limão cravo. A – células selvagem (1) e mutantes (2, 3 e 4) na ausência de cobre; B, C, D, E e F – células selvagem (1) e mutantes (2, 3 e 4) na presença de 0,25, 0,5, 0,7, 1 e 2 mM de cobre, respectivamente. Folhas de limão cravo após vinte dias de infecção.

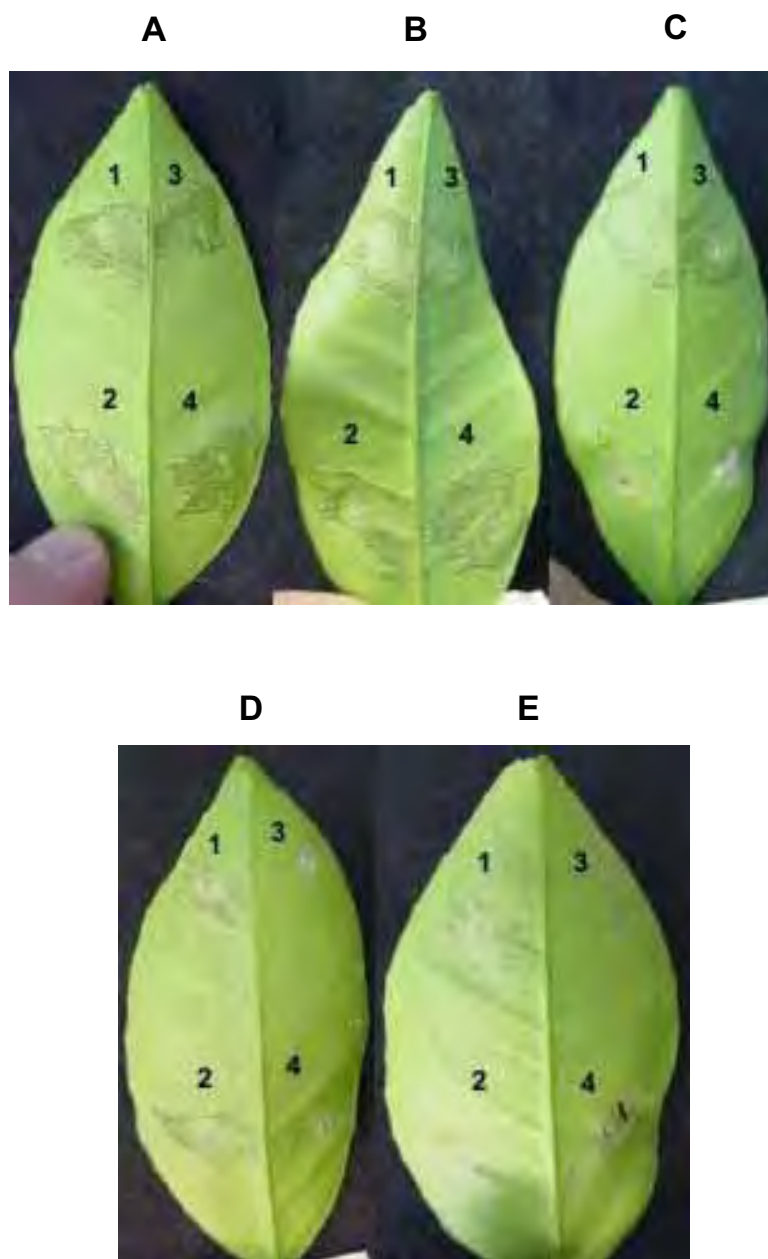


Figura 43 - Capacidade das células mutantes e selvagem de *Xac* de induzir os sintomas iniciais do cancro cítrico em folhas de laranja. A – células selvagem (1) e mutantes (2, 3 e 4) na ausência de cobre; B, C, D e E – células selvagem (1) e mutantes (2, 3 e 4) na presença 0,7, 1, 1,5 e 2 mM de cobre, respectivamente. Folhas de laranja após cinco dias de infecção.

Estes resultados de infecção na planta (folhas de limão cravo e de laranja), mostraram claramente um envolvimento do gene *copA* no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*. Isto pode ser deduzido, uma vez que ocorreu um aumento da sensibilidade ao cobre quando este gene foi inativado. Os resultados *in vivo* confirmam aqueles obtidos nos experimentos *in vitro* sobre a participação do gene no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*.

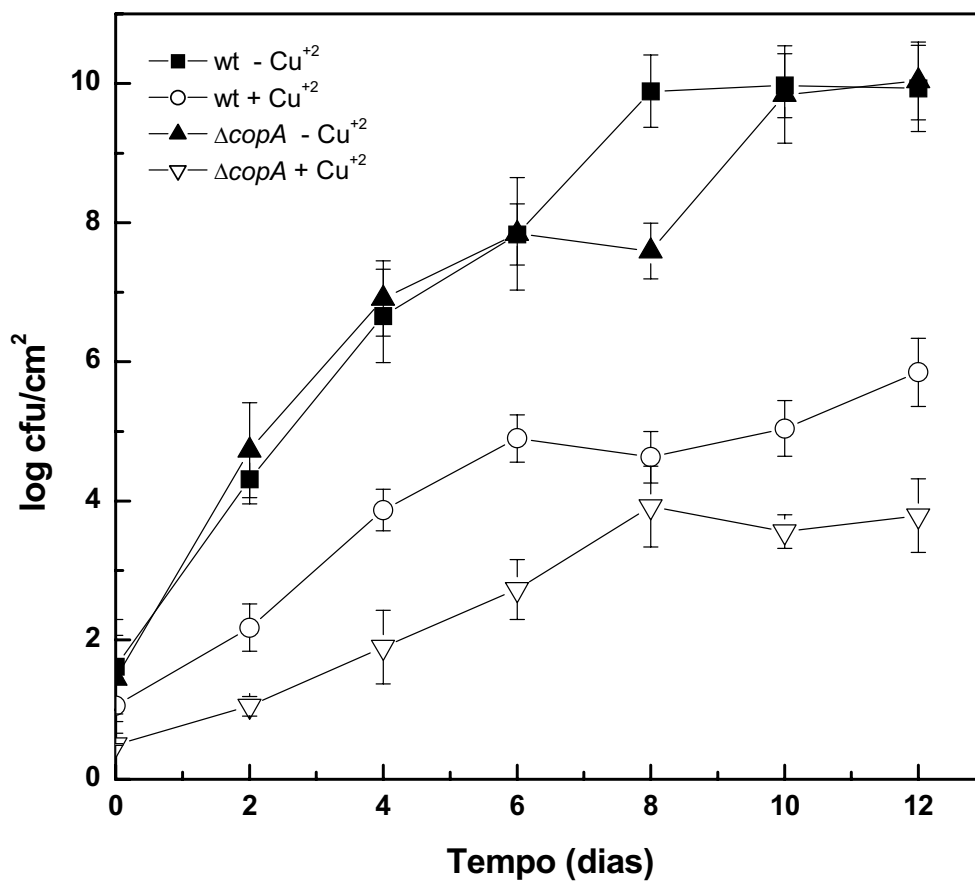


Figura 44 - Crescimento das células selvagem e mutante *in planta*. O crescimento das células selvagem (WT) e mutante ($\Delta copA$) foi avaliado na ausência e na presença de 1mM de $CuSO_4$ após 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias da inoculação das suspensões bacterianas em folhas de limão cravo. Este resultado é a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

VI. Análise da interação das proteínas CopA, CopB e CutC com proteínas de *Xac* através do ensaio de duplo híbrido de leveduras

VI.1. Subclonagem dos genes *copA*, *copB* e *cutC* no vetor pOBD2

Os genes *copA*, *copB* e *cutC*, subclonados no vetor de expressão pET28a, foram transferidos para o vetor pOBD2. Essas construções plasmidiais foram utilizadas para transformar *E. coli*, linhagem DH10B e amostras de DNA plasmidial dos clones recombinantes foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição *Sall* e *NotI*. Após digestão, as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%. Amostras de DNA plasmidial dos clones positivos liberaram um fragmento de DNA de 2000 e 1000 pb referentes aos genes *copA* e *copB*, respectivamente e para o gene *cutC* um fragmento de 800 pb foi liberado (resultados não mostrados). Os insertos de dois clones de cada construção foram seqüenciados para confirmar as devidas seqüências nucleotídicas.

As construções no plasmídeo pOBD foram utilizadas para transformar células da linhagem PJ694-a de *Saccharomyces cerevisiae*.

VI.2. Teste de auto-ativação do gene repórter *HIS* com as iscas

Após a transformação de *S. cerevisiae*, os clones contendo as iscas de interesse foram crescidos em meio SC-Trp a 30°C por 24 horas. Após o crescimento, as células foram diluídas e depositadas na superfície de placas contendo meio SC-Trp-His (drop-out-Trp-His) em concentrações crescentes de 3-aminotriazol (3-AT). As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e a concentração inibitória de 3-AT foi determinada para cada clone. Nenhuma das iscas foram capazes de auto-ativar o gene mesmo na ausência de 3-AT. Por precaução passamos a utilizar 3-AT nas placas na concentração de 3 mM, no decorrer do trabalho.

VI.3. Análise dos clones e seleção das presas

Células contendo as três construções plasmidiais foram transformadas com a biblioteca genômica de *Xac* construída no vetor pOAD. A interação proteína-proteína pôde ser detectada pela ativação dos genes repórteres *HIS*, *ADE* e *lacZ*. Após

transformação, clones apresentando possíveis interações protéicas foram selecionados em meio SC-Trp-Leu-His-Ade + 3-AT. Clones que cresceram em até 20 dias, após transformação em meio seletivo, foram isolados, transferidos para novas placas contendo o mesmo meio seletivo para a confirmação do crescimento, e em seguida, reservados. Cerca de 115 clones foram isolados inicialmente e após transferência para o mesmo meio, cerca de 111 clones foram selecionados, correspondendo a 85 clones oriundos da transformação com pOBD-*copA*, 06 clones da transformação com pOBD-*copB* e 20 clones da transformação com pOBD-*cutC*.

Para confirmar as possíveis interações, os clones isolados foram analisados qualitativamente para a atividade β -galactosidase para confirmar a ativação do terceiro gene repórter. Como podemos observar pela Figura 45, todos os clones apresentaram atividade, mostrando a coloração azul durante a incubação com o substrato X-Gal, confirmando as interações protéicas. Estes clones foram utilizados para a recuperação dos vetores pOAD e pOBD em bactéria a fim de sequenciarmos os insertos existentes nos plasmídeos pOAD da biblioteca. Para isso, os plasmídeos foram recuperados em *E. coli* e os insertos seqüenciados com o oligonucleotídeo específico do vetor pOAD. As seqüências de DNA obtidas foram utilizadas na pesquisa contra a seqüência genômica de *Xac* por Blastx. Na Tabela 1 estão relacionadas as proteínas que foram encontradas interagir com as iscas.

Algumas ORFs foram selecionadas para a confirmação das interações físicas através da produção das proteínas na linhagem de levedura (em destaque na Tabela 1). A seleção dessas ORFs foi baseada principalmente em suas funções, localização e regiões de interação com as proteínas CopA, CopB e CutC. As ORFs selecionadas, as proteínas correspondentes e regiões de interação com as três proteínas utilizadas como isca, estão relacionadas na Tabela 1. Para algumas proteínas codificadas por ORFs diferentes, mas envolvidas nas mesmas funções (como por exemplo, proteínas receptoras dependentes de TonB), foram selecionadas as que apresentaram o maior número de interações com as iscas.

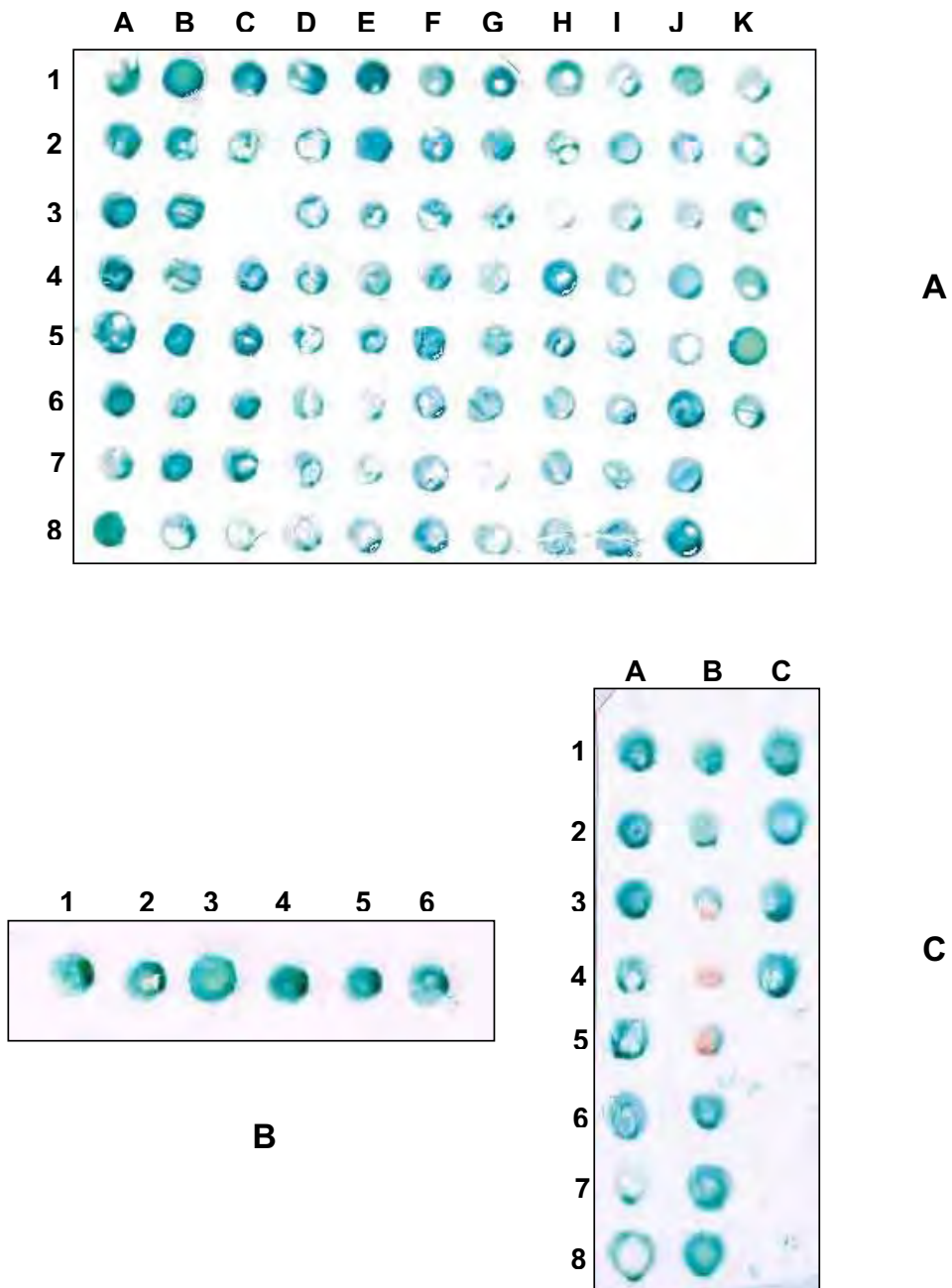


Figura 45 - Determinação da atividade β -galactosidase dos clones selecionados pelo ensaio de duplo híbrido. O ensaio foi realizado em filtro de nitrocelulose, utilizando o X-Gal como substrato cromogênico para a β -galactosidase. A – clones oriundos da interação com CopA, B – clones oriundos da interação com CopB e C – clones oriundos da interação com CutC.

Tabela 1 – Proteínas que interagiram com as iscas*

Iscas	Presas	Proteína	Gene	Total	aa	Região de interação (aa)
CopB	XAC1151	Proteína choque-térmico de baixo PM	<i>hspA</i>	3	159	1-83/1-63/1-139
	XAC1759	Represor transcricional do sistema de clivagem de glicina	<i>gcvR</i>	2	209	29-115/1-72
CutC	XAC3463	Proteína TolC	<i>tolC</i>	12	461	140-319/165-314/140-279/221-438
	XAC1023	Receptor TonB-dependente	<i>fecA</i>	3	807	86-258/52-146/86-254
	XAC1143	Receptor TonB-dependente	<i>fyuA</i>	2	805	113-278/113-258
	XAC3366	Receptor TonB-dependente	<i>cirA</i>	10	959	330-493/281-476/505-578/277-357
	XAC1304	Proteína hipotética	----	5	895	473-568/501-676/433-526/581-675
	XAC2529	Proteína RhsD	<i>rhsD</i>	3	1593	937-1087/851-946/826-1016
	XAC1305	Proteína associada à parede	<i>wapA</i>	9	1200	675-829/512-664/520-735/624-718
	XAC0716	Receptor TonB-dependente	<i>fyuA</i>	2	850	369-504/233-445
	XAC1866	Proteína associada à parede	<i>wapA</i>	9	1533	892-995/886-980/598-692
	XAC3166	Receptor enterobactina férrico	<i>bfeA</i>	2	796	240-295/223-316
	XAC3207	Receptor enterobactina férrico	<i>bfeA</i>	1	812	49-239
	XAC2810	Proteína hipotética	----	4	357	5-98/5-133/5-99/5-128
CopA	XAC1813	Proteína HmsH	<i>hmsH</i>	1	681	140-230
	XAC1435	Receptor de ferro	<i>fhuA</i>	1	713	212-344
	XAC3756	Receptor ferro-ferricromo 3	----	4	715	121-214/121-251/36-115/122-263
	XAC1146	Receptor TonB -dependente	<i>fecA</i>	2	935	163-282/406-586
	XAC4368	Receptor TonB -dependente	<i>fecA</i>	1	779	223-316
	XAC2742	Receptor TonB-dependente	<i>btuB</i>	1	997	554-712
	XAC0291	Proteína Oar	<i>oar</i>	3	998	188-281/410-503/25-118
	XAC2600	Receptor TonB -dependente	<i>btuB</i>	1	945	168-286
	XAC3077	Receptor TonB -dependente	<i>cirA</i>	3	1023	195-300/195-339/195-384
	XAC3489	Receptor TonB-dependente	<i>fyuA</i>	1	825	329-437
	XAC0074	Receptor TonB-dependente	<i>cirA</i>	2	872	288-370/178-262
	XAC2412	Proteína hipotética	----	1	661	56-122
	XAC2996	Proteína hipotética	----	1	351	58-152
	XAC4274	OmpA	<i>ompA</i>	1	1012	574-781
	XAC2255	Proteína hipotética	----	1	255	39-186
XAC2312	Proteína hipotética	----	1	993	572-729	

* As ORFs selecionadas estão mostradas em destaque.

Discussão

Cobre é um cofator essencial de um grande número de enzimas envolvidas em respiração, como oxigenases e proteínas de transporte de elétrons. No entanto, em certas concentrações este metal é tóxico para as células, por isso seu nível intracelular deve ser severamente controlado. Íons cobre geram radicais livres, os quais causam danos ao DNA e membranas lipídicas. Como consequência, as bactérias desenvolveram sistemas de detoxificação para protegê-las do efeito tóxico do cobre e assegurar níveis do metal requeridos como nutriente. Esses sistemas podem ser encontrados tanto em plasmídeos como em cromossomos (ROSEN, 2002).

Mecanismos de resistência a cobre foram demonstrados em algumas bactérias patogênicas como *E. coli* (ROUCH *et al.*, 1995) e *Enterococcus hirae* (WUNDERLI-YE and SOLIOZ, 2001) e fitopatogênicas, como *Pseudomonas syringae* (BENDER and COOKSEY, 1986) e *Xanthomonas campestris* (STALL *et al.*, 1986). Estes mecanismos incluem seqüestro em *Pseudomonas* (CHA and COOKSEY, 1991) e efluxo de cobre em *E. coli* (ROUCH *et al.*, 1989), por exemplo. A aquisição de resistência a cobre por bactérias fitopatogênicas, é um problema sério, visto que a aplicação em larga escala de bactericidas contendo cobre é ainda a base do controle de doenças bacterianas em muitas culturas economicamente importantes: a existência de tais patógenos resistentes ao metal pode explicar porque a incidência da doença é alta apesar da aplicação desses compostos.

Durante a fase de anotação do genoma de *Xac*, alguns genes potencialmente envolvidos no mecanismo de resistência a cobre foram identificados: *copA*, *copB* e *cutC*. Resultados de estudos funcionais relacionados a estes genes e as proteínas codificadas por eles foram realizados neste trabalho e serão discutidos a seguir.

A proteína CopA, codificada pelo gene *copA*, tem um pI e peso molecular teóricos de 6,46 e 65,7 kDa, respectivamente, calculados pelo programa ProtParam (www.expasy.ch/cgi-bin/protparam). Através da análise computacional (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), foi visto que esta proteína não possui um provável peptídeo do sinal, estando, provavelmente localizada no periplasma (www.psort.org). Esta proteína parece se arranjar estruturalmente em dois domínios, observados pelo alinhamento de seqüências da proteína CopA de *Xac* com a mesma proteína de outros fitopatógenos, um na região N-terminal se estendendo até grande parte da proteína e o outro na região C-terminal. A proteína CopA desta bactéria contém um provável sítio de ligação a cobre tipo-1 na extremidade C-terminal similar ao encontrado nas multicobre oxidases, o qual envolve os aminoácidos His-526, Cys-575, His-580 e Met-585. Este

sítio é homólogo ao encontrado na proteína CopA de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, a qual foi demonstrado ligar 11 átomos de cobre por molécula de proteína (CHA and COOKSEY, 1991). A proteína CopB, codificada pelo gene *copB*, tem um pl e peso molecular teóricos de 5,74 e 40,3 kDa, respectivamente (ProtParam). Através de análise computacional, foi visto que esta proteína possui um provável peptídeo do sinal com sítio de clivagem entre os aminoácidos Ala22 e Gln23, sendo uma proteína não citoplasmática, mas de localização desconhecida (www.psort.org). A proteína CutC, codificada pelo gene *cutC*, tem um pl e peso molecular teóricos de 7,10 e 27,8 kDa, respectivamente. Através de análise computacional, foi visto que esta proteína não possui um provável peptídeo do sinal, sendo uma proteína não secretória, provavelmente localizada no citoplasma (www.psort.org).

Essas três proteínas foram produzidas na forma recombinante em *E. coli* visando a realização de estudos estruturais e produção de anticorpos. Para a realização de estudos estruturais, como por exemplo, análise por dicroísmo circular (CD) e cristalização, a proteína deveria ser solúvel e ser purificada em um alto grau de pureza e em boa quantidade. As proteínas em estudo foram produzidas em grande quantidade, entretanto, na forma insolúvel com apenas pequenas quantidades das proteínas CopB e CutC sendo encontradas produzidas na forma solúvel. A proteína CopB foi purificada com um bom grau de pureza e em pequena quantidade, mas foi possível a obtenção do traçado de CD, o qual mostrou um espectro típico de proteínas contendo estruturas em α -hélices com dois mínimos negativos em 210 e 219 nm e um máximo positivo em 192 nm (WALLACE *et al.*, 2003). Para a proteína CutC, embora tenha sido purificada em um alto grau de pureza e em alta quantidade, não foi possível a obtenção do seu anticorpo e nem de um espectro de CD. Os espectros de fluorescência mostraram uma proteína estruturalmente desarranjada. Talvez seja esse o motivo pelo qual não conseguimos o anticorpo contra esta proteína após várias tentativas e, também, ela pode ser anti-imunogênica.

Os estudos funcionais foram iniciados analisando a expressão dos genes *copA*, *copB* e *cutC* e das proteínas codificadas por eles em células crescidas na presença de cobre. Para isso, inicialmente, foi feita uma avaliação do efeito do cobre no crescimento de *Xac*, cultivando a bactéria na ausência e na presença de várias concentrações de cobre. A bactéria cresceu bem, em meio tamponado, até uma concentração de 1 mM de cobre e a MIC (Mínima Concentração Inibitória) de cobre encontrada para esta bactéria foi de 2,0 mM. A MIC de cobre para *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria,

atualmente renomeada *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (VAUTERIN *et al.*, 2000) também foi determinada como sendo 2,4 mM (BENDER *et al.*, 1990). Para a realização dos experimentos de expressão gênica, a concentração de cobre foi fixada em 1 mM, valor abaixo da MIC de cobre determinada e uma concentração onde a bactéria foi capaz de desenvolver um bom crescimento.

Inicialmente, a expressão gênica foi analisada em nível de transcrição. Devido a dificuldades iniciais na realização da técnica de *Northern blot*, esses estudos foram realizados, primeiramente, por RT-PCR. Os resultados obtidos mostraram a presença dos transcritos dos genes *copA* e *copB* em células crescidas na ausência de cobre e, um aumento na transcrição desses genes, principalmente do gene *copA*, após 0,5 hora da adição de cobre. Os resultados foram melhor definidos pela análise da expressão dos genes por *Northern blot*, onde, diferentemente dos resultados obtidos por RT-PCR, não foram observados os transcritos dos genes nas células crescidas na ausência de cobre. Entretanto, a presença dos transcritos foi observada logo após a adição de cobre. A presença de uma banda fraca na amostra antes da adição de cobre no ensaio de RT-PCR pode ser explicada pelo fato de ser um experimento de amplificação, portanto, uma baixa quantidade do transcrito presente, não detectada no experimento de *Northern* pode ter sido amplificada.

O tamanho dos transcritos observados por *Northern blot* quando utilizamos tanto o gene *copA* inteiro como diferentes fragmentos do gene *copB* como sondas, foi de, aproximadamente, 2,9 kb, o qual corresponde a soma do tamanho dos genes *copA* e *copB*, indicando que esses genes estão organizados em um operon no genoma de *Xac*. A organização dos genes como um operon é similar a genes de resistência a cobre encontrados em outras bactérias, tal como o operon *copABCDRS* presente no fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, descrito por Mellano and Cooksey (1988). Entretanto, em *Xac* não foram encontrados durante a anotação do genoma, genes homólogos aos genes *copC* e *copD* de *P. pv. tomato*. Esses autores mostraram que os genes *copA* e *copB* são essenciais para resistência, enquanto os genes *copC* e *copD* são requeridos para uma resistência máxima em *P. pv. tomato*. Além disso, Rensing and Grass (2003) descreveram que, freqüentemente, somente homólogos de CopA e CopB são codificados por genes cromossomais. É importante enfatizar que a ausência dos genes *copC* e *copD* foi observada na bactéria utilizada para o sequenciamento do genoma, a qual foi isolada de pomares brasileiros e não podemos extrapolar para as demais linhagens isoladas de diferentes locais. Além disso, a

linhagem em estudo não é tolerante a altas concentrações de cobre, como observado através da avaliação da influência do cobre no seu crescimento *in vitro*, e talvez não precise de uma resistência máxima. Esta linhagem pode ter perdido os genes *copC* e *copD* ao longo do tempo por não ser necessário a sua sobrevivência.

Os resultados de expressão gênica mostraram, também, que a transcrição do operon *copAB* foi induzida por cobre e foi específica deste metal, uma vez que a presença do transcrito não foi observada quando as células foram crescidas na ausência de cobre e quando expostas aos íons Cd^{+2} , Zn^{+2} e Ag^+ . Mellano and Cooksey (1988), demonstraram que o operon de resistência a cobre de *P. pv. tomato* também foi induzido por cobre. Neste trabalho, os autores mostraram que nenhuma indução desses genes foi observada em culturas crescidas na presença de cloreto de mercúrio, sulfato de zinco, nitrato de cádmio e citrato de chumbo. A especificidade do mecanismo em relação ao metal também foi descrita para os operons de resistência a mercúrio encontrados nos transposons *Tn21* e *Tn501* de *Escherichia coli*, os quais são especificamente induzidos por mercúrio (MISRA *et al.*, 1984) e os genes que codificam metalotioneínas de cobre de *Saccharomyces cerevisiae*, os quais são induzidos por cobre (BUTT *et al.*, 1984). Em contraste, os operons de resistência a arsênio de *Staphylococcus aureus* e de *E. coli* são induzidos por arsenato, arsenito, antimônio (III) e bismuto (III) (SILVER *et al.*, 1981). Em *P. pv. tomato*, a presença do transcrito do operon foi observada em 0,5 hora após a adição de cobre, como em *Xac*, tendo uma expressão máxima em 4 horas.

Não foi observada a presença do transcrito *cutC* em células de *Xac* crescidas na ausência e nem na presença de cobre durante o período de 0,5 a 4 horas de exposição das células ao metal. Este resultado nos sugere que este gene não deve estar envolvido no mecanismo de resistência em *Xac* como a proteína CutC de *E. coli*, por exemplo, a qual é uma proteína citosólica envolvida na via de efluxo de cobre. Um fenótipo de sensibilidade a cobre foi observado em células de *E. coli* mutadas nos genes *cutC* e *cutF* (GUPTA *et al.*, 1995). O fato de que o gene não foi detectado nas duas condições pode sugerir que o gene não é expresso em *Xac*, pelo menos nas condições experimentais utilizadas.

Recentemente, foi descrito na bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria* a existência de um gene, *copL*, localizado *upstream* ao gene *copA* (113 pb de região intergênica), o qual codifica uma proteína de 122 resíduos de aminoácidos e rica nos aminoácidos cisteína e histidina, sugerindo um papel na ligação a cobre

(VOLOUDAKIS *et al.*, 2005). Embora a ligação a cobre não tenha sido demonstrada, a seqüência do gene *copL* inteiro foi mostrada ser importante para a resistência a cobre utilizando a análise de promotor mínimo. Segundo os autores, ORFs semelhantes a *copL* estariam também presentes nos genomas das bactérias *Xac* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (da SILVA *et al.*, 2002) e da bactéria *Xyllela fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000) recentemente seqüenciados. Entretanto, a ORF XAC3629 localizada 112 pb *upstream* ao gene *copA* em *Xac* foi anotada como uma proteína hipotética de 152 resíduos de aminoácidos e quando analisada em um alinhamento de seqüências mostrou uma baixa identidade (26%) à proteína CopL de *X. pv. vesicatoria*. Se esta proteína está direta ou indiretamente envolvida no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*, possivelmente atuando na regulação do operon *copAB*, merece ser investigado.

A região *upstream* ao operon *copAB* (600 pb) foi investigada de modo a encontrar prováveis regiões -10 e -35, baseados em regiões consensus de *Xanthomonas campestris*. Várias regiões foram encontradas ao longo da seqüência analisada, mas as prováveis regiões somente poderão ser definidas após a determinação do sítio de início da transcrição do operon. A região intergênica do operon também foi analisada e não foram encontrados prováveis sítios de ligação ao ribossomo no final da seqüência codificadora do gene *copA*, mas estes foram encontrados no início da seqüência de *copB*, sugerindo que o *start codon* definido na anotação esteja posicionado incorretamente. Baseado em alinhamento de seqüências da proteína CopB de *Xac* com a mesma proteína de outros fitopatógenos, sugerimos a troca do *start codon* deste gene para a metionina na posição 30.

A análise de expressão protéica foi realizada por *Western blot* e os resultados obtidos mostraram um aumento gradativo da produção das proteínas CopA e CopB durante a exposição a cobre (0,5 a 4 horas), indicando uma indução da expressão protéica por este metal, semelhante ao observado em nível de transcrição. Quando analisamos a expressão das proteínas CopA e CopB na presença de cobre em uma linhagem mutante de *Xac* ($\Delta copA$), onde o gene *copA* foi interrompido pelo transposon, verificamos que não houve expressão de CopA, como era esperado, mas também não foi observado a presença de CopB. A expressão desta proteína seria esperada, pois se os genes *copA* e *copB* formam um operon, a inativação do gene *copA* não impediria, teoricamente, a expressão de CopB. Isto pode ser atribuído, talvez, ao fato de que a inserção do transposon no locus genômico tenha alterado o *frame* da seqüência

codificadora do gene *copB*. Odermatt *et al.* (1994) mostraram que a expressão das ATPases CopA e CopB de *Enterococcus hirae* também foram induzidas por cobre em células expostas durante 1 hora na presença do metal (CuSO₄). Esses mesmos autores mostraram que em células mutantes, onde o gene *copA* foi inativado (linhagem $\Delta copA$), não houve expressão de CopA, na linhagem $\Delta copB$, não houve expressão de CopB e no duplo mutante ($\Delta copA\Delta copB$) não houve expressão das duas proteínas.

O gene *copA* desta bactéria foi inativado para avaliar a participação da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre. Esta proteína foi escolhida por possuir na região C-terminal um provável sítio de ligação a cobre tipo-1, homólogo ao encontrado nas multicobre oxidases (OUZONIS and SANDER, 1991) e na mesma proteína de *P. pv. tomato* (CHA and COOKSEY, 1991). A técnica de inativação de um gene com um transposon ou um gene de resistência a antibióticos tem sido muito utilizada para determinar a participação da proteína codificada por este gene em um determinado mecanismo. Rensing *et al.* (2000), por exemplo, inativaram o gene *copA* de *E. coli* que codifica para a proteína CopA, uma ATPase tipo P, envolvida no efluxo de cobre nesta bactéria, com um gene de resistência a kanamicina e mostraram que a linhagem mutada foi mais sensível a cobre que a linhagem selvagem quando o crescimento foi avaliado, *in vitro*, na presença deste metal, indicando, portanto, uma participação direta desta proteína no mecanismo de resistência a cobre nesta bactéria. Da mesma forma, o gene *copA* de *Bacillus subtilis* também foi inativado, levando a um aumento da sensibilidade a cobre da linhagem mutante (GABALLA and HELMANN, 2003).

A inativação do gene *copA* de *Xac* também levou a um aumento da sensibilidade a cobre na linhagem mutada ($\Delta copA$) comparada à linhagem selvagem quando o crescimento foi avaliado *in vitro*. As células não foram capazes de crescer na concentração mais baixa de cobre avaliada (0,25 mM), enquanto as células selvagem cresceram bem até 1 mM de cobre. Esta sensibilidade a cobre das células mutantes também foi verificada quando analisamos a capacidade dessas células de induzir os sintomas do cancro cítrico em folhas jovens de limão cravo e de laranja, nas quais foi visto que em concentrações de 1 mM de cobre, apenas as células selvagem foram capazes de induzir os sintomas iniciais do cancro cítrico em folhas de laranja e sintomas tardios em folhas de limão cravo. Ao contrário do crescimento *in vitro*, as células mutantes, *in vivo*, mostraram ser mais resistentes a concentrações de 0,25, 0,5 e 0,7 mM de cobre. Isto pode ser devido ao fato de que, na planta, algumas células, provavelmente, “escaparam” do cobre e foram capazes de se multiplicar e induzir os

sintomas da doença. Uma avaliação do crescimento das células mutantes e selvagem *in planta* também mostrou um aumento da sensibilidade a cobre quando este gene foi inativado, confirmando, assim, a participação da proteína CopA no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*.

Com o objetivo de entender como as proteínas CopA, CopB e CutC de *Xac* poderiam estar atuando no mecanismo de resistência a cobre nesta bactéria, um ensaio de duplo híbrido de leveduras foi realizado para saber se elas interagem com outras proteínas de *Xac* e quem são estas proteínas. Após co-transformação das células de levedura já contendo as iscas com a biblioteca de *Xac* e seleção dos clones positivos, as presas inseridas no vetor pOAD foram recuperadas, seqüenciadas e as proteínas foram identificadas por análise de Blastx contra a seqüência genômica de *Xac*. Algumas proteínas foram selecionadas para confirmação da interação física e estão indicadas na Tabela 1. A seleção dessas proteínas foi baseada principalmente em suas funções, localização e regiões de interação com as proteínas CopA, CopB e CutC. Para algumas proteínas codificadas por ORFs diferentes, mas envolvidas nas mesmas funções (como por exemplo, proteínas receptoras dependentes de TonB), foram selecionadas as que apresentaram o maior número de interações com as iscas.

Algumas das proteínas selecionadas foram consideradas como falso-positivos por Alegria *et al.* (2004) por serem obtidas em alta frequência nos clones analisados, como por exemplo, a proteína TolC, proteínas receptoras dependentes de TonB e produtos dos genes *wapA* (XAC1866 e XAC1305). Esses mesmos autores mostraram que a proteína TolC tende a interagir com o domínio de ligação ao DNA de Gal4, sendo esta tendência inibida ou aumentada dependendo da isca fusionada. Em *E. coli* esta proteína, a qual mostrou interação apenas com a proteína CutC de *Xac*, é uma proteína de membrana externa com um grande domínio periplasmático (KORONAKIS *et al.*, 2004) que interage com uma proteína do sistema de efluxo de antibiótico (GERKEN & MISRA, 2004). Como a proteína CutC de *Xac* é homóloga a proteína CutC de *E. coli*, a qual foi demonstrada estar envolvida no efluxo de cobre (GUPTA *et al.*, 1995), interessou-nos, inicialmente, confirmar se TolC interage mesmo com CutC. Porém, sabendo que esta proteína é um forte candidato a falso-positivo, e que a proteína CutC demonstrou não estar diretamente envolvida no mecanismo de resistência a cobre em *Xac* como observado através dos ensaios de expressão gênica, optamos por não confirmar sua interação proteína-proteína com TolC.

Da mesma forma a família de receptores TonB-dependentes e os genes *wapA* que também foram considerados falso positivos por Alegria *et. al.* (2004) foram isolados, pois apenas interagiram com CopA. Como a maioria desses genes codifica para proteínas receptoras localizadas na membrana externa, como por exemplo, o gene *fhuA*, o qual codifica para uma proteína receptora de ferro, em *E. coli* (FERGUSON *et al.*, 1998), a confirmação da interação destas proteínas com CopA pode ser relevante para a identificação da localização celular de CopA. A Figura 46 mostra os receptores dependentes de TonB localizados na membrana externa. Se a interação proteína-proteína com algum desses receptores for confirmada e se CopA realmente liga átomos de cobre por possuir um provável sítio de ligação a cobre tipo-1, poderíamos extrapolar um modelo onde o cobre atingisse o periplasma via esses transportadores e se ligaria a CopA no periplasma, localização indicada pelo programa Psort (www.psort.org). A comprovação da ligação do metal cobre pela proteína CopA através de técnicas físicas (tal como Ressonância Paramagnética Eletrônica, EPR) poderia nos fornecer informações mais definidas da função desta proteína no mecanismo de resistência a cobre em *Xac*.

A proteína CopB mostrou interação com um repressor transcricional do sistema de clivagem de glicina e com uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular. Esta última pertence à família das pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs), as quais são expressas em resposta a alterações ambientais quando os organismos são expostos a condições de estresse, como choque térmico, umidade, estresse químico e exposição a metais pesados, por exemplo (LAKSANALAMAI and ROBB, 2004). Recentemente, a proteína codificada pelo gene *hspA* de *Xac* foi cristalizada a 1,65 Å (HILARIO *et al.*, submetido à publicação) e sua estrutura tridimensional está sendo resolvida. Se a interação proteína-proteína com esta proteína de choque térmico, a qual é citoplasmática, for confirmada podemos supor que a proteína CopB possa estar localizada na membrana citoplasmática, uma vez que ela contém um provável peptídeo de sinal. Entretanto, nenhum domínio transmembrana foi encontrado (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0).

Os estudos realizados neste trabalho foram importantes, uma vez que *Xac*, fitopatógeno causador do cancro cítrico, apresenta, no campo, resistência a agrotóxicos a base de cobre, o qual ainda é utilizado para controlar a doença, e nossos estudos mostraram o envolvimento de dois genes, *copA* e *copB*, no mecanismo de resistência a cobre nesta bactéria. Este envolvimento ficou claro, principalmente,

através dos estudos de expressão gênica e quando um dos genes (*copA*) foi inativado, levou a linhagem mutante a apresentar um fenótipo de sensibilidade a cobre. No entanto, não podemos dizer com clareza como seria este mecanismo de resistência a cobre e como outras proteínas poderiam estar envolvidas neste mecanismo. A confirmação da interação física das proteínas CopA e CopB com as proteínas de *Xac* selecionadas através do ensaio de duplo híbrido de leveduras e a identificação, por espectrometria de massas, das proteínas diferencialmente expressas através de 2D-PAGE, nos permitirá uma melhor compreensão, ou até nos dar mais informações para propormos um modelo para a resistência a cobre nesta bactéria.

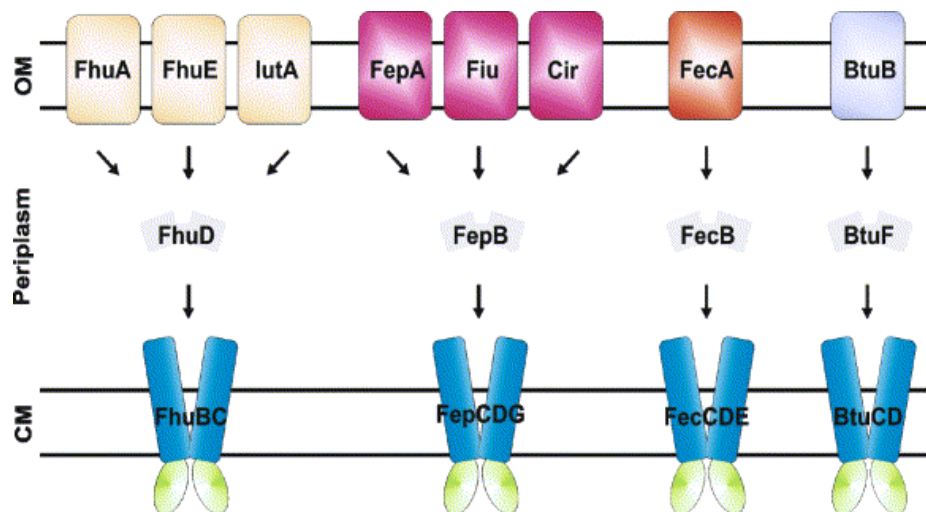


Figura 46 – Sistemas de importação de *E. coli*. Os transportadores de membrana externa (OM) são: FhuA, FhuE e IutA, os quais transportam hidroxamatos, FepA, Fiu e Cir, os quais transportam catecolatos, FecA, o qual transporta carboxilatos-sideróforos e BtuB, o qual transporta vitamina B12. A importação de metais através da membrana externa é dependente do complexo TonB, o qual está embebido na membrana citoplasmática (CM). As proteínas periplasmáticas FhuD, FepB e BtuF transferem metais através do periplasma para os transportadores ABC, localizado na membrana citoplasmática; FhuBC, FepCDG, FecCDE e BtuCD bombeiam metais para o citoplasma seguido da ligação e hidrólise de ATP (FERGUSON and DESINHOFFER, 2004).

Referências

ALEGRIA, M. C. et al. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 18, p. 6186-6197, Sept. 2004.

ARNESANO, F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; THOMPSETT, A. R. Solution structure of CopC: a cupredoxin-like protein involved in copper homeostasis. **Structure**, v. 10, n. 10, p. 1337-1347, Oct. 2002.

BANCI, L. et al. Understanding copper trafficking in bacteria: interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase CopA from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1939-1949, Feb. 2003.

BAYLE, D. et al. Properties of the P-type ATPases encoded by the copAP operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 2, p. 317-329, Jan. 1998.

BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance. **J. Bacteriol.**, v. 165, n. 2, p. 534-541, Feb. 1986.

BENDER, C. L. et al. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 170-175, Jan. 1990.

BERKS, B. C.; SARGENT, F.; PALMER, T. The Tat protein export pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 260-274, Jan. 2000.

BROWN, N. L.; ROUCH, D. A.; LEE, B. T. Copper resistance determinants in bacteria. **Plasmid**, v. 27, n. 1, p. 41-51, Jan. 1992.

BROWN, N. L. et al. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. **Mol. Microbiol.**, v. 14, n. 6, p. 1153-1156, Sept. 1995.

BUTT, T. R. et al. Cloning and expression of a yeast copper metallothionein gene. **Gene**, v. 27, n. 1, p. 23-33, Jan. 1984.

CERVANTES, C.; CORONA, F. G. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 121-137, June 1994.

CHA, J. S.; COOKSEY, D. A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 20, p. 8915-8919, May 1991.

COOKSEY, D. A. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *pseudomonas syringae* pv. tomato. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 454-456, Feb. 1987.

COOKSEY, D. A. Copper uptake and resistance in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 1-5, Jan. 1993.

CULOTTA, V. C. et al. The copper chaperone for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 38, p. 23469-23472, Sept. 1997.

DANCIS, A. et al. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 393-402, Jan. 1994.

DANCIS, A. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 41, p. 25660-25667, Oct. 1994.

DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-463, May 2002.

DOPSON, R. N. The eradication of citrus canker. **Plant Disease Reporter**, v. 48, p. 30-31, 1964.

DWULET, F. E.; PUTNAM, F. W. Internal duplication and evolution of human ceruloplasmin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 5, p. 2805-2809, May 1981.

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus citrus in England and the United States. **Phytopathology**, v. 23, p. 820-824, 1933.

FERGUSON, A. D.; DEISENHOFER, J. Metal import through microbial membranes. **Cell**, v. 116, n. 1, p. 15-24, Jan. 2004.

FERGUSON, A. D. et al. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2215-2220, Dec. 1998.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Cancro cítrico. Disponível em:
<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>. Acesso em: 12 mai. 2006.

GABALLA, A.; HELMANN, J. D. *Bacillus subtilis* CPx-type Atases: characterization of Cd, Zn, Co and Cu efflux systems. **Biometals**, v. 16, n. 4, p. 497-505, Dec. 2003.

GABALLA, A.; CAO, M.; HELMANN, J. D. Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* copZA operon. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3413-3421, Dec. 2003.

GALLI, F. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 14.

GE, Z.; HIRATSUKA, K.; TAYLOR, D. E. Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. **Mol. Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 97-106, Jan. 1995.

GEORGATSOU, E. et al. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 21, p. 13786-13792, May 1997.

GERKEN, H.; MISRA, R. Genetic evidence for functional interactions between TolC and AcrA proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 620-631, Nov. 2004.

GLERUM, D. M.; SHTANKO, A.; TZAGOLOFF, A. Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 24, p. 14504-14509, June 1996.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. **In compedium of citrus diseases: bacterial diseases**. St. Paul: LW Timmer, 2000.

GRASS, G.; RENSING, C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 286, n. 5, p. 902-908, Sept. 2001.

GUPTA, S. D. et al. Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 15, p. 4207-4215, Aug. 1995.

HAMPSON, S.; KIBLER, D. **Evaluating representations for the Shine-Dalgarno site in *Escherichia coli***. Disponível em: <<http://www.ics.uci.edu/~kibler/pubs/TR03>>. 2002. Acesso em: 17 mar. 2006.

HARRISON, M. D. et al. Copper uptake and resistance in bacteria. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 1, p. 29-32, Jan. 2000.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.

HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M. Relationship between copper, glycopeptide, and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, n. 1, p. 454-456, Jan. 2005.

HASSETT, R.; KOSMAN, D. J. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 1, p. 128-134, Jan. 1995.

HELMANN, J. D. et al. Homologous metalloregulatory proteins from both Gram-positive and Gram-negative bacteria control transcription of mercury resistance operons. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 1, p. 222-229, Jan. 1989.

HILARIO, E. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of XAC1151, a small heat shock protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, belonging to the α -crystallin family. **Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.**, v. 62, n. 5, p. 446-448, Apr. 2006.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation for yeast and efficiently releases autonomous plasmids for transformations of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, n. 2/3, p. 267-272, 1987.

HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal. Biochem.**, v. 114 n. 1, p. 193-197, June 1981.

HUDSON JR., J. R. et al. The complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form. **Genome Res.**, v. 7, n. 12, p. 1169-1173, Dec. 1997.

HUFFMAN, D. L. et al. Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli pco* copper resistance operon. **Biochemistry**, v. 41, n. 31, p. 10046-10055, Aug. 2002.

ITO, H. et al. Transformation of intact cells treated with alkali cations. **J. Bacteriol.**, v. 153, n. 1, p. 163-168, Jan. 1983.

JAMES, P.; HALLADAY, J.; CRAIG, E. A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 1425-1436, Dec. 1996.

KATZEN, F. et al. Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 14, p. 4313-4318, July 1996.

KHODAKARAMIAN, G.; SWINGS, J. AFLP fingerprinting of the strains of *Xanthomonas axonopodis* inducing citrus canker disease in southern Iran. **J. Phytopathology**, v. 150, p. 227-231, 2002.

KOCH, K. A.; PENA, M. M.; THIELE, D. J. Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. **Chem. Biol.**, v. 4, n. 8, p. 549-460, Aug. 1997.

KORONAKIS, V. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. **Nature**, v. 40, n. 6789, p. 914-919, June 2000.

KORONAKIS, V.; ESWARAN, J.; HUGHES, C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 467-489, 2004.

LABBE, S.; THIELE, D. J. Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 500-505, Dec. 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAKSANALAMAI, P.; ROBB, F. T. Small heat shock proteins from extremophiles: a review. **Extremophiles**, v. 8, n. 1, p. 1-11, Feb. 2004.

LEE, B. T. O. et al. Bacterial response to copper in the environment: copper resistance in *Escherichia coli* as a model system. **NATO ASI. Ser. G.**, v. 23, p. 625-632, 1990.

LEE, Y. A. et al. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 1, p. 173-188, Jan. 1994.

LEE, S. M. et al. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 295, n. 3, p. 616-620, July 2002.

LIU, C. et al. Genetic and transcriptional analysis of a novel plasmid-encoded copper resistance operon from *Lactococcus lactis*. **Gene**, v. 297, n. 1/2, p. 241-247, Sept. 2002.

LIU, X. L. et al. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 18, p. 11763-11769, May 1997.

MARCO, G. N.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Dis.**, v. 67, p. 779-781, 1983.

MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**, v. 1, n. 9, p. 1111-1118, Sept. 2001.

MELLANO, M. A.; COOKSEY, D. A. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 6, p. 2879-2883, June 1988.

MISRA, T. K. et al. Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn50: the beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, n. 19, p. 5975-5979, Oct. 1984.

MULTHAUP, G. et al. Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 288, n. 1, p. 172-177, Oct. 2001.

MUNSON, G. P. et al. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 20, p. 5864-5871, Oct. 2000.

ODERMATT, A.; SOLIOZ, M. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 9, p. 4349-4354, Mar. 1995.

ODERMATT, A.; KRAPP, R.; SOLIOZ, M. Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 202, n. 1, p. 44-48, July 1994.

ODERMATT, A. et al. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 17, p. 12775-12779, June 1993.

OUTTEN, F. W. et al. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 40, p. 31024-31029, Oct. 2000.

OUZOUNIS, C.; SANDER, C. A structure-derived sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. **FEBS Lett.**, v. 279, n. 1, p. 73-78, Feb. 1991.

PUFAHL, R. A. et al. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. **Science**, v. 278, n. 5339, p. 853-856, Oct. 1997.

PUIG, S.; REES, E. M.; THIELE, D. J. The ABCDs of periplasmic copper trafficking. **Structure**, v. 10, n. 10, p. 1292-1295, Oct. 2002.

RENSING, C.; GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 2/3, p. 197-213, June 2003.

RENSING, C. et al. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 2, p. 652-656, Jan. 2000.

RIGGLE, P. J.; KUMAMOTO, C. A. Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 17, p. 4899-4905, Sept. 2000.

ROGERS, S. D. Cloning and characterization of *cutE*, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 6742-6748, 1991.

ROSE, M.; BOTSTEIN, D. Construction and use of gene fusions *laZ* (β -galactosidase) which are expressed in yeast. **Methods Enzymol.**, v. 101, p. 167-180, 1983.

ROSEN, B. P. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. **Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.**, v. 133, n. 3, p. 689-693, Nov. 2002.

ROUCH, D. A.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T. O. Copper transport in *Escherichia coli*. In: HAMER, D. H.; WINGE, D. R. **Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry**. New York: Alan R. Liss, 1989. p. 469-477.

ROUCH, D. A.; LEE, B. T. O.; MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: a model form mechanism of choice in bacterial metal resistance. **J. Bacteriol.**, v. 14, n. 2, p. 132-141, Feb. 1995.

SAIER JR., M. H. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1422, n. 1, p. 1-56, Feb. 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning. A laboratory manual: expression of cloned genes in *Escherichia coli***. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour, 2001. v. 3.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.

SERPE, M.; JOSHI, A.; KOSMAN, D. J. Structure-function analysis of the protein-binding domains of Mac1p, a copper-dependent transcriptional activator of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 41, p. 29211-29219, Jan. 1999.

SILVER, S. Bacterial resistance to toxic metal ions – a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 9-19, Nov. 1996.

SILVER, S.; JI, G. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, n. 3, p. 107-113, Sept. 1994.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annu. Rev. Bacteriol.**, v. 50, p. 753-789, 1996.

SILVER, S.; WALDERHAUG, M. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 1, p. 195-228, Mar. 1992.

SILVER, S. et al. Bacterial plasmid resistances to copper, cadmium and zinc. In: WELCH, A. J. (Ed.). **Chemistry of Copper and Zinc Triads**. London: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 38-53.

SILVER, S. et al. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 146, n. 3, p. 983-996, June 1981.

SIMPSON, A. J. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, n. 6792, p. 151-157, July 2000.

SOLOZ, M.; STOYANOV, J. V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 2/3, p. 183-195, June 2003.

STALL, R. E.; LOSCHKE, D. C.; JONES, J. B. Linkage of copper resistance and virulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Phytopathology**, v. 76, p. 240-243, 1986.

SUMMERS, A. O.; SILVER, S. Microbial transformations of metals. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 32, p. 637-672, 1978.

SUN, Q. et al. High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 226, n. 1, p. 145-150, Sept. 2003.

TETAZ, T. J.; LUKE, R. K. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 154, n. 3, p. 1263-1268, June 1983.

TRENOR, C.; LIN, W.; ANDREWS, N. C. Novel bacterial P-type ATPases with histidine-rich heavy-metal-associated sequences. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 205, n. 3, p. 1644-1650, Dec. 1994.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 90, p. 677-682, 2000.

VERNIERE, C. et al. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri from Southwest Asia. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 104, p. 477–485, 1998.

VOLOUDAKIS, A. E.; REIGNIER, T. M.; COOKSEY, D. A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 782-789, Feb. 2005.

W Aidner, B. et al. Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327), and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 23, p. 6700-6708, Dec. 2002.

W Aidner, B. et al. The *Helicobacter pylori* CrdRS two-component regulation system (HP1364/HP1365) is required for copper-mediated induction of the copper resistance determinant CrdA. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 13, p. 4683-4688, July 2005.

WALLACE, B. A. et al. Analysis of circular dichroism spectra of membrane proteins. **Protein Science**, v. 12, n. 4, p. 875-884, Apr. 2003.

WENGELNIK, K. et al. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 4, p. 1061-1069, Feb. 1996.

WUNDERLI-YE, H.; SOLIOZ, M. Purification and functional analysis of the copper ATPase CopA of *Enterococcus hirae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, n. 3, p. 713-719, Jan. 2001.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, n. 13, p. 7190-7195, June 1999.