

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

SECRETOMA DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA
Xanthomonas citri subsp. *citri*

Rafael Marini Ferreira

Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Novembro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

SECRETOMA DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Rafael Marini Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Novembro de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL MARINI FERREIRA – nascido em Monte Alto, SP no dia 04 de maio de 1984, graduou-se em Ciências Biológicas (Modalidade Licenciatura e Bacharelado) na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal em 2005. Estagiou desde o primeiro semestre de 2002 até o presente momento no Departamento de Tecnologia da Unesp de Jaboticabal, atuando na área de pesquisas proteômicas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Desenvolveu ainda o projeto nos anos de 2005 e 2006 intitulado “Correlação entre método de captura-recaptura e predação de ninhos artificiais para a estimativa populacional de *Didelphis albiventris*” no Departamento de Zootecnia da Unesp de Jaboticabal.

EPÍGRAFE

Não escreverei poemas, pois poemas tendem a cair no esquecimento como sombras vazias. Nem tampouco me ligarei a versos para descrever seus olhares. Não lembrarei de minha própria modéstia e da minha falta de palavras. Aqui só será encontrado verdade e ciência para explicar meus atos e defeitos. Em minha psique não consigo encontrar explicação plausível para o fascínio que seu olhar gerou em mim em um primeiro momento, e o motivo de minha hipnose constante por seu perfume desconheço.

Conheço mistérios profundos de interações entre moléculas, de partículas longínquas da aurora dos tempos geradas pelo próprio universo. Mistérios revelados sob a luz das estrelas diante de meus olhos. Aprendi a duvidar de tudo, a questionar o dogma e a ser motivo de olhares desdenhosos sem me envergonhar. E ainda assim, não aprendi a questionar sua repreensão e a viver longe de ti.

Ah, o que eu daria para conhecer os segredos ainda intocados deste universo... sacrificaria anos de minha vida, bens materiais, o tempo... mas não perderia um minuto longe de você. Não consigo entender o porquê, e já tentei experimentos em triplicata, repetições infinitas e testes estatísticos, e nada me deu indícios de qual o tipo de energia que me liga a você. Contigo cada novo gesto que observo em detalhes me extasia mais que descobertas de um prêmio Nobel. Apenas não sei. Será magnetismo, ou outro tipo de interação forte e desconhecida, que vaga pelas galáxias e ocasionalmente liga duas pessoas? Como uma força intocável e paradoxal como Schrödinger descreveria.

Talvez a resposta esteja nas profundezas de gigantes adormecidos ou em luzes aleatórias sem comprimentos de onda mensuráveis, não importa. Você existe para meus olhos, e a eletricidade que sua imagem causa em meu cérebro é o suficiente para que eu ignore qualquer sinal de resposta a quaisquer perguntas fascinantes.

Um sábio postulou que a dor constante e infinita do homem é diretamente proporcional a seu conhecimento em relação à toda filosofia e aos elementos a que estamos todos submetidos. Um homem com tal dor pondera o suicídio em algum lampejo de sua existência. Essa mesma dor me desperta em sonhos, me atormenta no cotidiano, e encerra meu apetite. E ainda assim, uma despedida fria de seus lábios é o que mais me faz desejar inconscientemente a morte. Isso não explico, nem pondero e experimento, apenas sinto.

Em meu caminho derradeiro não há deus no horizonte, nem anjos e espíritos em meu encalço, tudo que espero é sua presença e calor a meu lado. E assim me sinto feliz.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação principalmente a meus pais, que me amaram, educaram e ampararam mesmo quando eu acreditava não precisar. Dedico a meu irmão, meus grandes amigos, meus colegas de trabalho e a todos cujos nomes não preciso citar, pois sabem que são especiais para mim. Dedico a meus professores, que me deram a oportunidade de mostrar meu trabalho e a todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento do mesmo. Dedico a todos que acreditam que o mundo deva ser moldado pela ciência e não pela religião. Dedico ao amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Jesus Aparecido Ferro pela orientação e ao Professor Doutor Julio Cezar Franco de Oliveira pela co-orientação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida ao autor.

A FAPESP por parte do auxílio financeiro concedido a este trabalho.

Ao Professor Doutor Leandro Márcio Moreira e à Professora Doutora Maria Teresa Marques Novo pelas correções e sugestões dedicadas a este trabalho.

A Professora Doutora Márcia Soares da UFRJ que tornou possível a identificação das proteínas descritas nesta dissertação.

Ao Professor Doutor Jesus Aparecido Ferro e a Professora Doutora Maria Inês Tiraboschi Ferro pela utilização do laboratório de bioquímica e biologia molecular do departamento de Tecnologia da FCAV UNESP de Jaboticabal para a realização dos experimentos e utilização dos reagentes.

Ao Professor Doutor João Martins Pizauro Júnior e ao Doutor João Carlos Campanharo pelo auxílio na resolução de problemas relacionados à metodologia de extração de proteínas da dissertação.

A Doutora Agda Paula Facincani pelos conselhos e atenção.

A Professora Doutora Márcia Justino Rossini Mutton pela utilização de equipamentos necessários à realização de parte dos experimentos aqui descritos.

A todas as pessoas maravilhosas que trabalham no LBM pela amizade e atenção.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	10
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
III.1. Condições de cultivo.....	18
III.2. Centrifugação e filtração das amostras.....	19
III.3. Precipitação de proteínas e eletroforese SDS/PAGE.....	20
III.4. Tripsinização das amostras e espectrometria de massas.....	21
III.5. Processamento dos espectros gerados e predição de peptídeo sinal....	22
IV. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	24
IV.1. Proteínas secretadas por <i>Xac</i> e seu mutante 02H02 sob condição infectante.....	30
IV.2. Proteínas secretadas exclusivamente por <i>Xac</i> sob condição infectante.....	34
V. CONCLUSÕES.....	41
VI. REFERÊNCIAS.....	43

SECRETOMA DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas citri* subsp. citri

RESUMO - O cancro cítrico está entre as principais doenças que afetam a produção de laranjas no Brasil e é causado pela bactéria fitopatogênica gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. citri (*Xac*). O presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão diferencial de proteínas secretadas pela bactéria selvagem e por um mutante (02H02) assintomático, que teve a proteína HrpB4, que participa de seu sistema de secreção tipo III (SSTT) inativada, em condição de cultivo em meio rico CN e em meio XAM1 indutor de hipersensibilidade e patogenicidade (genes *hrp*). As proteínas secretadas em meio de cultura foram extraídas pela ação do ácido tricloroacético (TCA) e identificadas através de espectrometria de massas. Tais análises identificaram 55 proteínas diferentes secretadas em ambos os meios de cultura, tanto para *Xac* quanto para 02H02, de modo que 13 destas proteínas são comuns entre a *Xac* e seu mutante cultivados em XAM1 e 14 são exclusivas para *Xac* cultivada em XAM1, as quais deixaram de ser secretadas no 02H02. Proteínas relacionadas aos genes reguladores do SSTT foram detectadas em condição infectante para ambas as bactérias, demonstrando a eficácia do meio de cultura XAM1 em induzir Hrp. Foi observado que diversas proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo II (SSTD) em condição infectante para *Xac* e seu mutante possuem um papel ativo na degradação das paredes celulares do hospedeiro e podem ser reguladas por proteínas controladoras do SSTT. Fatores de sinalização difusíveis produzidos por *Xac* aparentemente sofreram alteração em sua secreção no mutante devido à inativação do *pilus* do SSTT, demonstrando a relação dessa molécula com o SSTT. A não detecção de proteínas secretadas diretamente pelo SSTT denota que as mesmas podem estar sendo secretadas no interior de vesículas lipídicas de membrana externa, assim como ocorre em *Xanthomonas campestris*.

Palavras-Chave: interação planta-patógeno, meio indutor de patogenicidade, proteínas secretadas, proteoma cancro-cítrico, sistema de secreção tipo III

Xanthomonas citri subsp. *citri* **SECRETOME**

SUMMARY - Citrus canker is among the major diseases which affect citrus production in Brazil and is caused by the gram-negative phytopathogenic bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*). This work aimed to analyze the differential expression of secreted proteins by the wild bacterium and by an asymptomatic mutant (02H02), lacking the type III secretion system (TTSS) protein HrpB4, in rich cultivation medium NB and in the *hrp* inducing medium XAM1. The proteins secreted in all culture media have been extracted by trichloroacetic acid based protocols (TCA) and identified using mass spectrometry. The analysis identified 55 different proteins secreted in both culture medium for *Xac* and 02H02, of which 13 are common among *Xac* and its mutant cultivated in XAM1 and 14 proteins are exclusively secreted by *Xac* cultivated in XAM1. Proteins related to the TTSS regulatory genes have been detected in infecting condition in both bacteria, showing the effectiveness of XAM1 *hrp* inducing medium. It has been observed that several type II secretion system's secreted proteins showed an active role in host cell wall degradation and may be regulated by type III secretion system's proteins in *Xac* and 02H02 in infecting condition. Diffusible signal factors produced by wild *Xac* apparently suffered an altered secretion in the mutant due the inactivation of the type three secretion system's *pilus*, showing the relationship of this molecule with this secretion system. The lack of detection of proteins secreted by the TTSS denote that these proteins may be secreted in the interior of outer membrane lipid vesicles, just like it was verified in *Xanthomonas campestris*.

keywords: plant-pathogen interactions, pathogenicity inducing medium, secreted proteins, citrus canker proteome, type III secretion system (TTSS)

I. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes culturas especiais do planeta (“specialty crop”), com uma produção global de 50,9 milhões de toneladas de laranjas frescas e 2,25 milhões de toneladas de suco concentrado nos anos de 2008 a 2009 (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2009). As principais áreas de cultivo são encontradas nas Américas, no Mediterrâneo, no Sul e no Leste Asiático, sendo que o Brasil lidera o “ranking” de produção e exportação mundial, tanto de frutas frescas como de suco concentrado (TALON & GMITTER, 2008).

O cancro cítrico está entre as principais doenças que representam uma grande ameaça ao cultivo em larga escala de laranja (KOLLER et al., 1994; GOTTWALD et al., 2002). No estado de São Paulo, que é o maior exportador de suco de laranja processado do mundo e um dos maiores produtores de frutas frescas, a progressão do cancro cítrico tem levado a um aumento significativo no número de focos da doença nos últimos anos. O comércio mundial impõe restrições à importação de cítricos originários de países ou regiões com cancro cítrico, sendo esta uma doença quarentenária nos principais países produtores (GOTTWALD et al., 2002). Não existem métodos de controle eficiente para este patógeno, nem mesmo variedades de citros resistentes, logo o procedimento padrão para a eliminação da doença em talhões é a erradicação do material contaminado e o controle através de pulverizações cúpricas pouco eficientes. Dados do Fundo de Defesa da Citricultura registraram que de janeiro a outubro de 2008, 165.397 plantas foram erradicadas em talhões e 49.753 em pomares domésticos (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2009) apenas no estado de São Paulo e ao sul do triângulo mineiro, o que indica a forte presença da doença nos pomares comerciais da região sudeste.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O agente etiológico do cancro cítrico é a bactéria fitopatogênica gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*). Uma vez depositada sobre a planta cítrica, o patógeno penetra nos tecidos jovens por meio de aberturas naturais, tais como estômatos e hidatódios, ou por meio de ferimentos em tecidos maduros (BROWN, 2001). Os sintomas do cancro cítrico são verificados nas folhas (em ambos os lados), ramos e frutos como lesões circulares, corticosas, eruptivas, de coloração parda e circundadas por um halo amarelo (KOLLER et al., 1993). A doença em estágio avançado é capaz de intensa desfolha, depreciação e queda de frutos. Um sintoma característico e essencial para o diagnóstico do cancro cítrico é a indução da formação de tecido hiperplásico, causado por divisões mitóticas excessivas que resulta em lesões do tipo cancro. A hiperplasia é resultado da atividade do gene *pthA* da bactéria, que gera uma proteína de sinalização de divisão celular, que é secretada através do sistema de secreção tipo III (SSTT) do patógeno e causa divisões celulares excessivas no hospedeiro (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). Além desses fatores, um desequilíbrio hormonal provocado pela produção excessiva de etileno pela planta, ocasiona a queda prematura do fruto, ainda não suficientemente maduro (CROZIER et al., 2001). Essa característica torna os frutos impróprios tanto para a produção de suco concentrado como para o mercado de frutas frescas, gerando grandes prejuízos para os produtores.

A análise do perfil de proteínas sintetizadas num determinado momento celular pelo patógeno pode possibilitar uma melhor correlação entre as alterações de fenótipo observadas no hospedeiro em função das ações de *Xac* em diferentes situações, já que não se verifica uma boa correlação entre a abundância de RNA mensageiro produzido e a quantidade de proteínas existentes na célula (GREENBAUM et al., 2003), tornando as análises proteômicas mais fidedignas que análises transcriptômicas ou genéticas quanto à identificação de agentes efetivos da ação biológica em questão.

A análise de proteínas diferencialmente expressas tem sido utilizada em *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Sclerotinia sclerotiorum* para a

identificação de proteínas induzidas por respostas adaptativas devido a variações ambientais, principalmente à temperatura e estresse (YURA et al., 1993; JONES & INOUE, 1994; VOLKER et al., 1994; NOUWENS et al., 2003; YAJIMA & KAV, 2006).

A análise do genoma através das proteínas expressas leva à obtenção de informações importantes sobre a regulação gênica e à expressão de proteínas e modificações pós-traducionais (JUNGBLUT & WITTMAN-LIEBOLD, 1995). O interesse no estudo de proteomas tem aumentado recentemente com o aumento de sequências disponíveis resultantes de análises de seqüenciamento de genomas, devido à modernização dos métodos de detecção e quantificação de proteínas e ao fato de que os pesquisadores podem trabalhar diretamente com os agentes da ação biológica. Porém a análise das proteínas presentes dentro da bactéria não engloba aquelas secretadas pelo patógeno quando em contato com o hospedeiro.

As proteínas secretadas por bactérias são conhecidas por várias funções importantes, tais como provisão de nutrientes, comunicação célula-célula, detoxificação do meio e a inibição de potenciais competidores. De um modo mais específico, as proteínas extracelulares de bactérias patogênicas desempenham um papel crítico na virulência do organismo (JUNGBLUT et al., 1999; LEI et al., 2000; ROSENKRANDS et al., 2000; GHOSH, 2004; GOTTIG et al., 2009).

A patogenicidade de *Xac* deve-se principalmente à sua capacidade de colonização do hospedeiro e subsequente produção e secreção de enzimas e proteínas que degradam constituintes da parede celular do hospedeiro para penetrar nas células causando danos à planta. Tais enzimas de degradação, quando em conjunto com os diversos sistemas de secreção de toxinas e proteínas de virulência/avirulência presentes no patógeno, estruturas de adesão bacteriana e enzimas com capacidade de neutralizar espécies ativas de oxigênio geradas pela planta hospedeira, são capazes de desenvolver a patogênese, apesar dos esforços da planta hospedeira em combater a infecção (KAZEMI-POUR et al., 2004). É importante frisar que grande parte destas características são conservadas em bactérias gram-negativas (BUTTNER & BONAS, 2002).

O estudo do secretoma de um organismo consiste na análise das proteínas que este organismo produz e secreta para o exterior da célula em resposta a uma variação ambiental. Diversos estudos têm sido realizados utilizando-se a técnica do secretoma, tanto em procariotos como em eucariotos, com o objetivo de se identificar as proteínas secretadas por patógenos quando na presença de seu hospedeiro. KAZEMI-POUR e colaboradores (2004) desenvolveram um estudo de modo a criar um mapa de referência de proteínas secretadas da bactéria *Erwinia chrysanthemi*, que tal como a *Xac*, é capaz de produzir e secretar enzimas que degradam constituintes da parede celular do hospedeiro. O estudo demonstrou diversas proteínas relacionadas a vários sistemas de secreção, que só eram secretadas quando em contato com indutores específicos presentes em extrato de folhas do vegetal. WATT e colaboradores (2004) estudaram o perfil de proteínas extracelulares secretadas em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e obtiveram como resultado 97 proteínas presentes em géis bidimensionais (2D), e dentre elas, 11 proteínas eram enzimas degradativas diretamente envolvidas na patogenicidade da bactéria em questão. Pode-se citar ainda o estudo de YAJIMA & KAV (2006) que detectou 52 proteínas secretadas em géis 2D pelo fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, dentre as quais 18 foram identificadas por espectrometria de massas, sendo que dentre estas os autores encontraram algumas proteínas que não haviam sido encontradas anteriormente por estudos de ESTs (Expressed Sequence Tags) e que possivelmente possuem um papel importante no desenvolvimento do organismo no hospedeiro.

Assim como outras bactérias gram-negativas patogênicas de animais ou plantas, a *Xac* possui um sistema secretório especializado na injeção de proteínas essenciais para os processos de patogenicidade e virulência diretamente no citoplasma de células vegetais infectadas pelo patógeno. Este aparato, denominado sistema de secreção tipo III ou SSTT é conservado entre bactérias patogênicas de plantas e de hospedeiros animais (HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; YEN et al, 2007). Em bactérias fitopatogênicas, o SSTT é codificado por um agrupamento de genes classificados como *hrp* (*Hypersensitive Response And Pathogenicity*), os quais são essenciais para a patogenicidade e conseqüente multiplicação bacteriana no

hospedeiro, desencadeando sintomas típicos nas respectivas plantas suscetíveis (ALFANO & COLLMER, 1997). Além das proteínas estruturais que compõe o duto secretório propriamente dito, este composto por uma estrutura basal e um *pilus*, conservados entre as diferentes espécies de patógenos, os genes do SSTT codificam ainda proteínas efetoras de virulência, muitas vezes espécie específicas, secretadas através deste sistema.

Estudos com mutantes de *Xac* empreendidos por nosso grupo, utilizando uma biblioteca de mutantes produzida por mutagênese aleatória através da inserção de transposon TN:KAN, permitiram a identificação de vários genes que podem estar associados com a virulência da *Xac*. Dentre estes um mutante não patogênico de *Xac* cujo gene nocauteado codifica para uma proteína do SSTT (LAIA et al., 2009) foi selecionado. A ORF (Open Read Frame) XAC0410 nocauteada codifica a proteína HrpB4, uma provável proteína de membrana interna presente na estrutura do *pilus*, que no entanto não possui peptídeo sinal e nem é predita como secretada por vias não clássicas de secreção. O caráter essencial para a patogenicidade e virulência do SSTT é comprovado pelo mutante dessa ORF XAC0410 (02H02), o qual não é capaz de crescer *in planta*, mas se desenvolve normalmente em meios de cultura ricos. O nocaute da proteína HrpB4 parece inativar o SSTT, ou seja, a translocação de efetores de virulência da bactéria diretamente para o citoplasma da célula vegetal hospedeira, efeito este refletido na ausência de sintomas de cancro em plantas suscetíveis inoculadas com o mutante 02H02 e na incapacidade do mutante em multiplicar-se no hospedeiro. WEBER et al. (2005) empreendeu um estudo em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, e chegou à conclusão de que não só este patógeno possui um SSTT funcional, como qualquer alteração nos genes *hrp* e *hrc* (*Hypersensitive Response Conserved*) (com excessão de *hrpF*) resultava em um mutante que não utilizava o *pilus* do SSTT, e que não era capaz de secretar quaisquer proteínas relacionadas ao SSTT. O fato de que um mutante para o gene *hrpB4* em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria também não utilizava o *pilus* reforça a teoria de que o mutante de *Xac* com o gene *hrpB4* interrompido (02H02) também não foi capaz de utilizar o *pilus* do SSTT, e desta maneira não foi capaz de injetar efetores protéicos no citoplasma das células do

hospedeiro através da parede celular, explicando deste modo a ausência de sintomas do mutante 02H02 quando inoculado no hospedeiro cítrico.

A *Xac* possui ainda outro sistema de secreção de proteínas altamente conservado em bactérias gram-negativas, denominado sistema de secreção tipo II (SSTD) (Figura 1). A secreção através desse sistema ocorre em dois passos: a maquinaria Sec (Sistema Secretório Geral Conservado) exporta as proteínas possuindo o peptídeo sinal através da membrana interna de bactérias gram-negativas e as proteínas do SSTD as secretam através da membrana externa. Os sistemas bacterianos do tipo II secretam diversos tipos de proteínas, tais como celulases, pectato liases, toxinas, proteases e alcalino fosfatases (BRUNINGS & GABRIEL, 2003), as quais desempenham um papel importante na patogenicidade de bactérias gram-negativas. Esse sistema é mais conhecido por sua importância na patogenicidade de organismos como *Erwinia chrysanthemi*, que causa a podridão-mole em diversas plantas através da secreção de uma bateria de enzimas degradadoras da parede celular (KAZEMI-POUR et al., 2004). Porém, estudos recentes demonstram que a *Xac* não só possui genes preditos para a secreção via SSTD, como de fato secreta celulases ativas que são responsáveis por degradar a parede celular do hospedeiro cítrico (BAPTISTA, 2006). Essa característica, apesar de não ser imprescindível para o desenvolvimento da doença, possui um papel importante na patogênese, de modo que mutantes que tiveram interrompidos genes para celulases do SSTD, apresentaram sintomas atenuados de cancrose quando comparados à bactéria selvagem (BAPTISTA, 2006). WANG e colaboradores (2008) citam que algumas proteínas do SSTD são diretamente controladas pelos genes *hrpX* e *hrpG*, que são controladores do SSTD, demonstrando que ocorre interação entre esses dois sistemas.

É importante ressaltar um último sistema que pode ter importância para a patogenicidade de *Xac*: o Sistema de Secreção Tipo IV (SSTQ). Esse sistema é similar ao encontrado em *A. tumefaciens* codificado pelos genes *virB/D*, os quais codificam proteínas que formam uma estrutura que injeta proteínas ligadas a DNA no interior do hospedeiro. A função dessa estrutura em bactérias gram-negativas não é bem

conhecida, mas sabe-se que esse sistema é importante para a conjugação bacteriana e colonização do hospedeiro no caso de *A. tumefaciens* (FRONZES et al., 2009).

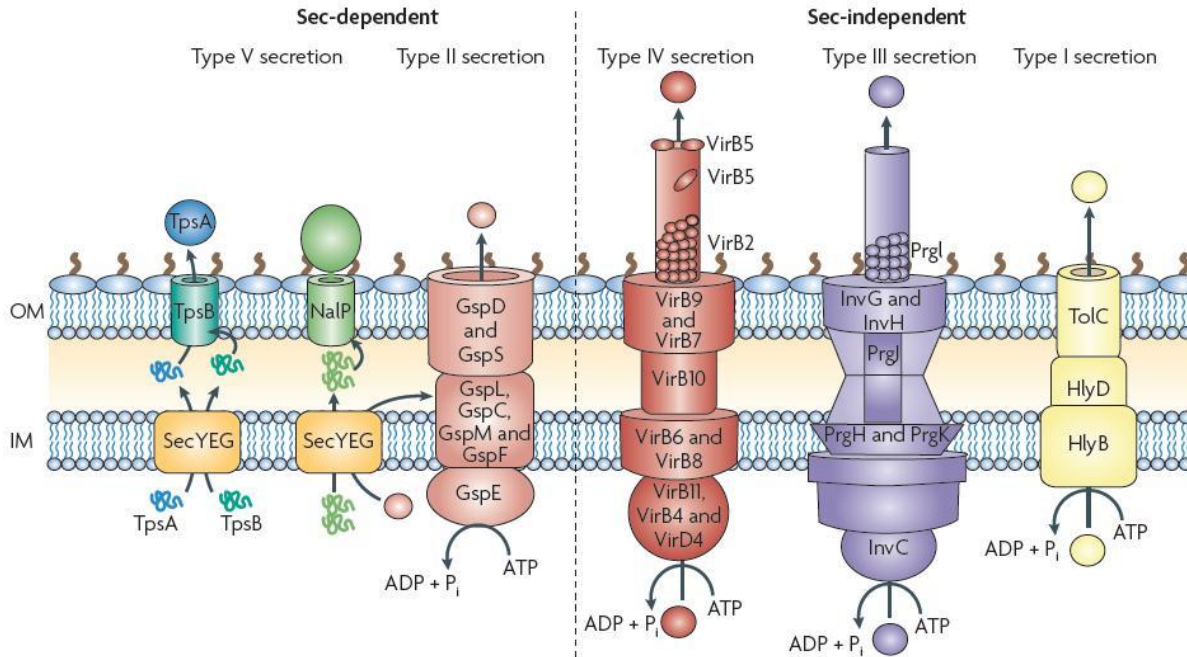


Figura 1. Representação esquemática dos diversos sistemas de secreção presentes em bactérias gram-negativas, divididos por linha tracejada, à esquerda como sistemas dependentes de sec e à direita como sistemas independentes de sec. OM: membrana externa, IM: membrana interna. Adaptado de FRONZES et al., 2009.

Devido à dificuldade de se recuperar proteínas secretadas pelo patógeno e seu mutante quando inoculados *in vivo*, optou-se pela utilização de dois meios de cultura diferentes para análises *in-vitro*: o meio de cultura rico em nutrientes denominado Caldo Nutritivo (CN) e o meio definido XAM1 indutor de genes *hrp*, que mimetiza o contato inicial da bactéria com a planta hospedeira, e permite a extração das proteínas secretadas para posterior identificação.

O meio de cultura XVM2 é sabidamente um meio indutor de patogenicidade em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pelo fato de mimetizar as condições encontradas nos espaços apoplásticos da planta hospedeira, induzindo a síntese de genes ligados ao SSTT, como *hrp* (WENGELNIK et al., 1996). O meio indutor XAM1

corresponde ao meio XVM2 com modificações que o tornam mais adaptado para indução de virulência em *Xac*. Tal fato obteve comprovação experimental para o fitopatógeno *Xac* por CARVALHO (2006) e FACINCANI (2007).

A estratégia utilizada para a detecção das proteínas secretadas nas diferentes condições no presente estudo é denominada MudPIT (Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas), e consiste da separação de extrato protéico complexo tripsinizado por cromatografia líquida de fase reversa seguida de identificação por espectrometria de massas, de peptídeos que compõe o extrato. Esta tecnologia é « livre de gel » pois abole a necessidade de fracionamento do extrato por eletroforese bidimensional (2D) em géis de poliacrilamida. É também mais sensível que a estratégia 2D mas não possibilita uma quantificação de variações de expressão de maneira tão precisa quanto esta técnica. A estratégia de MudPIT foi descrita pela primeira vez por WASHBURN et al. (2001) que identificou 1486 proteínas (24% do genoma) de levedura. Dois anos depois, PENG et al (2003) usando a mesma estratégia encontraram 1504 proteínas (25%) na análise do proteoma do mesmo organismo. KOLKER et al (2003), ao analisar o proteoma do microorganismo *Haemophilus influenzae* identificaram 414 proteínas (25% do genoma). XIA et al. (2008) analisaram o proteoma do patógeno *Toxoplasma gondii*, identificando 2.252 proteínas de um total de 8.000 ORFs anotadas no genoma do organismo (28,1% do genoma).

A análise de proteínas secretadas pelo patógeno constitui-se em uma poderosa ferramenta para o acúmulo de conhecimentos que possam guiar o estabelecimento de novas estratégias de combate ao cancro cítrico e para o desenho de drogas de ação específica sobre o patógeno, capazes de associar o controle racional do cancro cítrico a ganhos de produtividade e minimização do impacto ambiental.

O estudo do secretoma do fitopatógeno proposto neste trabalho visou repertoriar a secreção de proteínas no meio de cultura rico não indutor CN (caldo nutriente) e no meio indutor de virulência XAM1, pela *Xac* selvagem (patogênica) e pelo mutante 02H02 defectivo para o SSTT de *Xac* (não-patogênico), com o objetivo de identificar as proteínas que deixaram de ser secretadas pelo mutante 02H02, quando comparado com as proteínas secretadas pela *Xac* selvagem, em meio de cultura indutor.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Condições de cultivo.

A bactéria *Xac* estirpe 306 e seu mutante 02H02 foram mantidas sempre em estoques de tampão fosfato à temperatura ambiente, sendo utilizadas conforme a necessidade. As mesmas bactérias foram cultivadas em meio de cultura sólido PSA anteriormente ao pré-inóculo. Todas as culturas de manutenção foram mantidas a 25°C, com a adição de Canamicina 100 µg/mL para meios de cultura sólidos e 50 µg/mL para meios de cultura líquidos, no caso de culturas do mutante 02H02.

A *Xac* selvagem e o mutante 02H02 foram cultivados primeiramente em um pré-inóculo de 15 mL de meio líquido CN (Caldo nutriente - composto por 5 g/L de peptona; 3 g/L de extrato de carne dissolvidos em água destilada), independente do meio de cultura a ser utilizado para o inóculo. O pré-inóculo foi cultivado (200 rpm, 28°C) até que as culturas atingissem a fase de crescimento logarítmico da bactéria ($D.O_{600nm} = 1$), quando foi então centrifugado a 3100 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado bacteriano foi lavado em água bidestilada autoclavada e ressuscitado no meio de cultura desejado. Tanto o fitopatógeno selvagem quanto o mutante foram então cultivados em 500 mL de meio de cultura CN (200 rpm, 28°C) até que o cultivo alcançasse uma densidade óptica a 600nm ($D.O_{600nm}$), de no máximo 1,4, de modo que a bactéria encontrava-se ainda em fase logarítmica de crescimento, evitando desse modo proteínas resultantes de lise celular liberadas no meio de cultura e gerando assim um perfil acurado de proteínas secretadas (WATT et al., 2004). O meio indutor de patogenicidade utilizado foi o XAM1, que é um meio sabidamente indutor de genes *hrp*. Neste caso foram utilizados 2 L (4x 500 mL) deste meio para cada bactéria. O XAM1 é composto de 7,5 mM $(NH_4)_2SO_4$, 33 mM KH_2PO_4 , 60 mM K_2HPO_4 , 1,7 mM citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$), 0,9 mM $MgSO_4$, 9,9 mM frutose, 9,9 mM sacarose e 0,03% de Casaminoácidos (caseína hidrolisada) em uma solução de água destilada com pH final igual a 5,4. A este meio XAM1 não foi adicionado BSA (soroalbumina

bovina), já que esta proteína impossibilitava a obtenção das proteínas secretadas pelo patógeno. A temperatura foi mantida constante em 28°C e sob agitação a 200 RPM até que o cultivo alcançasse uma densidade ótica D.O.₆₀₀ de no máximo 0,57, de modo que a bactéria encontrava-se ainda em fase log. de crescimento.

A *Xac* selvagem foi cultivada por 16 horas em meio de cultura líquido CN, alcançando uma D.O.₆₀₀ igual a 1,0. O mutante 02H02, cultivado no mesmo meio de cultura por 23 horas, alcançou uma D.O.₆₀₀ equivalente a 1,4. A *Xac* selvagem e o mutante 02H02 foram cultivados ainda em meio indutor líquido XAM1 por 24 horas, equivalente aos estágios iniciais de infecção *in vivo*. A bactéria selvagem alcançou uma D.O.₆₀₀ igual a 0,57 e o mutante alcançou uma D.O.₆₀₀ igual a 0,24. A diferença de crescimento bacteriano entre os meios de cultura CN e XAM1 se deve ao fato de que o primeiro é um meio rico em nutrientes, e o segundo é um meio definido. Não foi possível chegar a uma D.O. maior que 0,57 e 0,24 quando a *Xac* e o mutante foram cultivados em meio XAM1, respectivamente, mesmo que o período de cultivo fosse maior que 24 horas. Desse modo optou-se por manter um tempo de cultivo (24 horas) correspondente a um estágio inicial de infecção, onde foi alcançado a maior quantidade possível de células mantendo-se a integridade estrutural das mesmas.

III.2. Centrifugação e filtração das amostras.

As culturas foram centrifugadas em duas etapas de 60 minutos: na primeira etapa as amostras foram centrifugadas a 3.100 g, o sedimentado bacteriano foi descartado e o sobrenadante contendo as proteínas secretadas foi transferido para tubos limpos; na segunda etapa as mesmas amostras foram centrifugadas a 11.000 g e novamente o sobrenadante foi recuperado e o precipitado bacteriano descartado. Ambas as etapas de centrifugação ocorreram a uma temperatura de 4 °C. No caso das bactérias (*Xac* e 02H02) cultivadas em meio líquido CN, o sobrenadante foi recuperado e então filtrado logo em seguida à segunda centrifugação através de uma membrana de nitrocelulose (Millipore™) com poros de 0,2 µm, de modo a remover eventuais bactérias residuais não retiradas durante a centrifugação.

Já para as bactérias cultivadas em meio definido XAM1, a filtração do sobrenadante não foi possível, devido a uma produção em grande quantidade do que se acredita ser goma xantana, que entupia a membrana de nitrocelulose, impedindo a filtração. Todas as amostras foram então congeladas sob a ação de nitrogênio líquido e liofilizadas até a completa secagem. Cada amostra seca correspondente a 500 mL de sobrenadante foi ressuspensa em 50 mL de água bidestilada autoclavada.

Neste ponto, apenas as amostras cultivadas em meio XAM1 foram submetidas à ação de álcool etílico absoluto 3:1 (150 mL de álcool para 50 mL de amostra ressuspensa em água) à 30°C e centrifugadas a 3.000 g durante 5 minutos. Esse processo precipitava grande parte da goma xantana que impedia a filtração do sobrenadante e a temperatura utilizada minimizava perdas de proteínas que pudessem sofrer precipitação. Só então as amostras Xac e 02H02 cultivadas em XAM1 foram filtradas através da membrana de 0,22 µm e foram novamente liofilizadas até completa secagem e ressuspensas em 50 mL de água bidestilada autoclavada.

III.3. Precipitação de proteínas e eletroforese SDS/PAGE.

As proteínas foram precipitadas com Ácido Tricloroacético (TCA) utilizando o protocolo descrito por HIROSE et al. (2000) com modificações. Esse método consistiu em adicionar uma concentração final por amostra ressuspensa de 10% de TCA, misturando vigorosamente cada amostra e deixando descansar durante 16 horas a uma temperatura de 4°C. Em seguida procedia-se à centrifugação a 20.000 g durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado três vezes com metanol absoluto a -20 °C para remover resíduos de TCA. O precipitado protéico foi então liofilizado até completa secagem e armazenado em alíquotas de 100 mg por tubo do tipo “ependorf”.

Essas alíquotas liofilizadas foram dissolvidas em tampão de amostra e submetidas à eletroforese SDS/PAGE em gel 12,5% (LAEMMLI, 1970) para verificar a presença de proteínas e permitir a normatização entre as amostras que seguiriam para a cromatografia de fase reversa e finalmente para a espectrometria de massas.

III.4. Tripsinização das amostras e espectrometria de massas.

Cada uma das alíquotas foram ressuspensas em tampão 25 mM NH_4HCO_3 , 500 mM de Uréia, pH 8.0. As proteínas foram reduzidas adicionando-se 1 μg de DTT para cada 50 μg de proteínas e incubadas durante 1 hora a 37°C. As proteínas foram alquiladas, através da adição de 5 μg de iodoacetamida para cada 50 μg de proteína e incubadas à temperatura ambiente no escuro por 1 hora, e finalmente foram tripsinizadas adicionando-se 20 μg da enzima tripsina modificada de grau de seqüenciamento da Promega (Madison, EUA) (1:50) durante 20 horas a uma temperatura de 37°C. A reação de hidrólise foi interrompida através da adição de 2 μL de ácido fórmico.

As amostras foram carregadas no sistema de cromatografia capilar Waters® nanoACQUITY UPLC® System (Waters, Milford, MA). As proteínas digeridas foram desalinizadas “on line” usando a coluna Opti-Pak C18 trap Waters. O volume da amostra injetada foi de 10 μL e a cromatografia líquida foi realizada numa coluna de fase reversa Ease C18 150 mm \times 2,1 mm (Waters, Milford, MA) com eluição em 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$, usando um gradiente linear variando de 5 a 50% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

O sistema de cromatografia líquida capilar (nLC) estava acoplado ao espectrômetro de massas com fonte de ionização eletrospray ESI com analisadores quadrupolo/tempo de vôle em série (Q-Tof Micro da Waters, Milford, MA) (UPLC-MS/MS), o que permitiu a análise direta dos peptídeos eluídos através do gradiente de acetonitrila no Q-Tof. Para a formação do “spray”, foi aplicada no capilar uma voltagem de 3000 v e a temperatura foi de 80 °C. O controle do instrumento e a aquisição dos dados foram realizados pelo sistema de dados MassLynx (Versão 4.1, Waters) e os experimentos foram executados pela varredura da razão massa/carga (m/z) de 200 a 2000 usando um tempo de varredura de 1 segundo, aplicado durante todo o processo cromatográfico. Os espectros de massa correspondentes a cada sinal do total de cromatogramas de íons correntes (TIC) tiveram suas médias calculadas, permitindo uma determinação acurada da massa molecular

Os valores exatos das massas foram obtidos usando-se uma fonte LockSpray™ (Waters, Milford, MA). Este sistema consiste de uma segunda fonte de ESI que injeta uma substância de massa conhecida a cada 5 segundos. Essa massa de referência foi usada para corrigir a massa do analito (amostra) durante toda a corrida. A referência usada neste estudo foi o íon m/z 588.8692 do ácido fosfórico.

A aquisição de dados dependentes do MS/MS foram executados em precursores com estados de carga de 2 ou 3 sobre um levantamento de amplitude m/z de 50-2000 e um intervalo abaixo de 2 m/z . No máximo 3 íons foram selecionados para MS/MS de uma única análise MS. As massas apresentadas de Na^+ e K^+ foram automaticamente excluídas. Os espectros de MS/MS de dissociação excluídos por colisão (CID) foram obtidos usando argônio como o gás de colisão a uma pressão de 13 PSI e a voltagem de colisão variando entre 18 e 45 volts, dependendo da massa do precursor. A razão de escaneamento foi de 1 segundo.

III.5. Processamento dos espectros gerados e predição de peptídeo sinal.

Todos os dados foram processados usando o servidor Global ProteinLynx (versão 2.0, Waters). O processamento inclui a correção automática dos valores de m/z dos espectros MS e MS/MS segundo a massa do íon de referência do “lock spray”.

A identificação das proteínas foi feita a partir do banco de dados da *Xac* através do programa MASCOT (Version: 2.2.1 - Licensed to Brazilian Synchrotron Light Laboratory). Na pesquisa foram usados os valores de massas monoisotópicos dos espectros MS/MS (MS/MS Ion Search), considerando carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação da metionina como modificação variável. Na hidrólise, por tripsina, foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de $\pm 0,05$ Da.

As sequências de aminoácidos das proteínas identificadas foram submetidas à ferramenta de bioinformática PrediSi (PREDiction of Signalpeptides), que é capaz de

prever através de algoritmos matemáticos a presença e posição de clivagem do peptídeo sinal e determinar, com exatidão, se a proteína em questão é de fato uma proteína secretada (HILLER et al., 2004). O peptídeo sinal presente no N-terminal das proteínas determina se elas serão secretadas através da via sec e uma vez fora da membrana celular, esses peptídeos são clivados por uma peptidase sinal extracelular. O fato de uma proteína não possuir o peptídeo sinal para sec, não significa que esta não seja secretada por outro sistema. As proteínas detectadas neste trabalho que não possuíam o peptídeo sinal para a via de secreção geral tiveram suas sequências de aminoácidos submetidas à ferramenta de bioinformática SecretomeP 2.0, disponível no endereço eletrônico <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>>. Esta ferramenta é baseada em vias não clássicas de secreção bacteriana descritas extensivamente na literatura (BENDTSEN et al., 2005), e atribui um valor de 0 até 1,0 para a sequência submetida, de modo que sequências que atingem valores acima de 0,5 são consideradas proteínas secretadas de forma não clássica, ou seja, não possuem um peptídeo sinal, mas ainda assim estão presentes no periplasma e no meio extracelular.

As comparações entre proteínas de organismos diferentes foram feitas baseadas na ferramenta de bioinformática BLASTp disponível no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

IV. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram identificadas no total 55 proteínas diferentes secretadas para as quatro condições propostas. 37 destas proteínas possuem o peptídeo sinal responsável pelo transporte através da membrana interna da célula (sec) predito pelo software PrediSi e 18 não o possuem, porém apenas 5 destas proteínas foram consideradas como não secretadas pela ferramenta de bioinformática SecretomeP 2.0 (Tabela 1).

Todas as proteínas consideradas secretadas neste trabalho, que não possuem um peptídeo sinal para sec obtiveram valores entre 0,9 e 1,0 na ferramenta SecretomeP 2.0, já descrita no Material e Métodos.

Tabela 1. Proteínas secretadas por *Xac* e seu mutante 02H02 cultivadas em meio de cultura CN e em meio de cultura indutor de patogenicidade XAM1, identificadas por espectrometria de massas. Em preto encontram-se as proteínas secretadas por *Xac* e pelo 02H02 em condições individuais de cultivo ou secretadas de modo comum em todas as condições. Em verde encontram-se as proteínas comuns secretadas por *Xac* e seu mutante 02H02 sob condição infectante. Em vermelho encontram-se as proteínas que deixaram de ser secretadas em condição de indução de patogenicidade e virulência, pelo mutante do sistema tipo III. As proteínas marcadas em negrito são aquelas que serão descritas no decorrer deste trabalho.

Nº ORF	Proteína	Categoria	Bactéria e meio de cultura				Peptídeo Sinal sec
			02H02 CN	Xac CN	02H02 XAM1	Xac XAM1	
XAC0753	Hipotética	VIII	+	+	-	-	+
XAC0868	Hipotética	VIII	+	+	+	+	+
XAC2992	Endoproteinase Arg-C	III	+	+	-	+	+
XAC0798	Alfa-amilase	I	+	-	-	-	+
XAC2763	Protease extracelular	III	+	-	-	+	+
XAC0542	Chaperonina 60 KDa	III	+	+	-	-	-
XAC3354	Proteína de membrana externa W	IV	+	-	-	+	+
XAC3545	Protease	III	+	-	-	-	+
XAC4199	Polivinil Álcool Desidrogenase	I	+	-	+	+	-*
XAC3514	Serina Protease	III	+	+	-	-	+
XAC1012	Proteína de membrana externa MopB	IV	+	+	-	-	+
XAC1349	Serina Protease	III	+	-	-	-	+
XAC1550	Peptidil-proil cis-trans isomerase tipo FKBP	III	+	-	-	-	-*
XAC2665	Proteína PiiY1	IV	-	+	-	-	+
XAC0957	Fator de Elongação Tu TufA	III	-	+	-	+	-
XAC1975	Proteína Flagelar FlIC	V	-	+	-	-	-*
XAC3314	Hipotética Conservada	VIII	-	+	-	-	-*
XAC1974	Proteína Flagelar FlID	V	-	+	-	-	-*
XACb0007	Transglicosilase lítica de Mureína Mlt	IV	-	-	+	-	+
XAC0223	Hipotética Conservada	VIII	-	-	+	+	+
XAC1466	Lipoproteína de membrana externa associada a peptidoglicana	IV	-	-	+	+	+
XAC2853	Cisteíno Protease	III	-	-	+	+	+
XAC2504	Fator Regulador de Patogenicidade RpfN	VII	-	-	+	+	-*
XAC1113	Proteína de Membrana Externa Slp	IV	-	-	+	+	-*
XAC4344	Lipoproteína VacJ	III	-	-	+	-	+
XAC2562	Hipotética Conservada	VIII	-	-	+	+	+
XAC3664	Proteína de Membrana Externa OmpW	IV	-	-	+	-	+
XAC0677	Hipotética Conservada	VIII	-	-	+	+	+
XAC3141	Precursor da Proteína P6 de Membrana Externa OmpP6	IV	-	-	+	+	-*
XAC0552	Proteinase	III	-	-	+	+	+
XAC1761	Hipotética	VIII	-	-	+	-	+
XAC0661	Endopoligalacturonase Peh-1	VII	-	-	+	+	+
XAC2781	leucil-tRNA sintetase	III	-	-	+	-	-
XAC0541	Chaperonina 10 KDa	III	-	-	+	-	-*
XAC3647	Corismato mutase/ pferenato desidratase PheA	II	-	-	+	+	+
XAC1479	Proteína da Família OmpA	IV	-	-	+	-	+
XAC0232	Hipotética	VIII	-	-	+	+	-*
XAC1585	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	III	-	-	+	+	+
XAC4342	Proteína de Resistência ao Tolueno	VII	-	-	+	-	+

* Proteínas secretadas por vias não clássicas previstas pelo software SecretomeP 2.0.

Tabela 1. Continuação.

Nº ORF	Proteína	Categoria	Bactéria e meio de cultura				Peptídeo Sinal sec
			02H02 CN	Xac CN	02H02 XAM1	Xac XAM1	
XAC2328	Proteína de membrana de biogênese do citocromo tipo C CycK	I	-	-	+	-	+
XAC0645	Aminopectidase PepN	III	-	-	+	-	-*
XAC3472	Porina O seletiva para polifosfato OprO	IV	-	-	-	+	+
XAC0678	Hipotética Conservada	VIII	-	-	-	+	+
XAC3605	Proteína de Membrana Externa UptE	IV	-	-	-	+	+
XAC0435	Proteína VirK	VII	-	-	-	+	+
XAC0974	Proteína Ribossomal L23 50S RplW	III	-	-	-	+	-*
XAC1497	Hipotética	VIII	-	-	-	+	+
XAC0029	Celulase Egl	VII	-	-	-	+	+
XAC1081	Proteína do tipo Histona	III	-	-	-	+	-*
XAC0989	Proteína Ribossomal S5 30S	III	-	-	-	+	-
XAC3380	Hipotética	VIII	-	-	-	+	+
XAC0028	Celulase Egl	VII	-	-	-	+	+
XAC2682	Hipotética Conservada	VIII	-	-	-	+	+
XAC0612	Celulase EngXCA	VII	-	-	-	+	+
XAC0988	Proteína Ribossomal L18 50S RplR	III	-	-	-	+	-

* Proteínas secretadas por vias não clássicas previstas pelo software SecretomeP 2.0.

As 55 proteínas identificadas como secretadas no meio de cultura foram classificadas de acordo com suas categorias funcionais descritas na anotação do genoma de *Xac* (Figura 2).

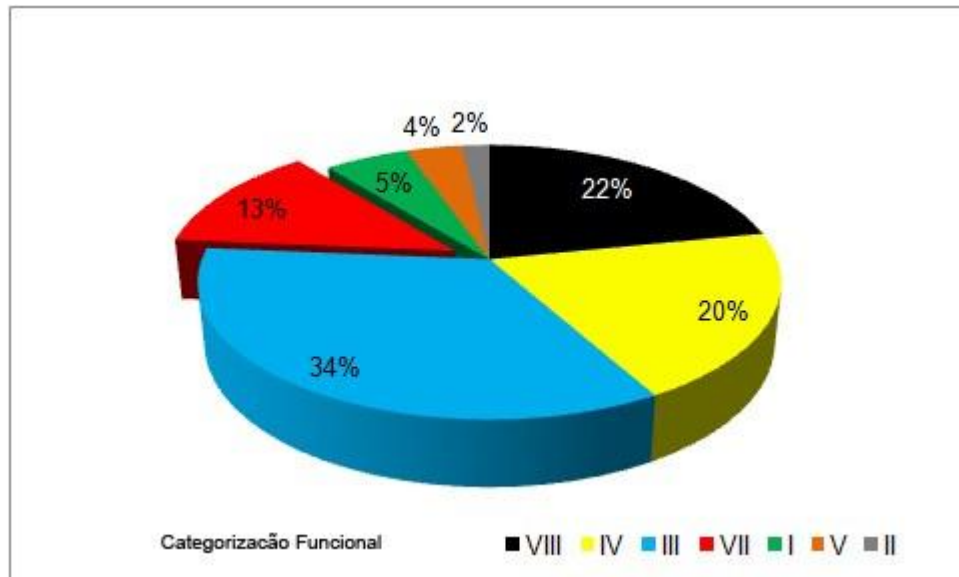


Figura 2. Categorização funcional (em porcentagem) de todas as proteínas secretadas pela *Xac* selvagem e pelo mutante 02H02. As categorias funcionais utilizadas foram as mesmas descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. Descrição das categorias: VIII, proteínas hipotéticas; IV, proteínas de estrutura celular; III, proteínas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas; VII, proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação; I, proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário; V, proteínas relacionadas à quimiotaxia e mobilidade; II, proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos.

Do total de 55 proteínas encontradas em todas as condições estudadas, 13 proteínas foram secretadas apenas em condição infectante, ou seja, foram detectadas tanto para a bactéria selvagem *Xac*, quanto para seu mutante 02H02 cultivadas em meio de cultura líquido indutor de patogenicidade XAM1. São as proteínas marcadas na cor verde (Tabela 1).

As 13 proteínas secretadas tanto por *Xac* como pelo seu mutante em condições indutoras de patogenicidade foram classificadas de acordo com as categorias funcionais descritas na anotação do genoma de *Xac* (Figura 3).

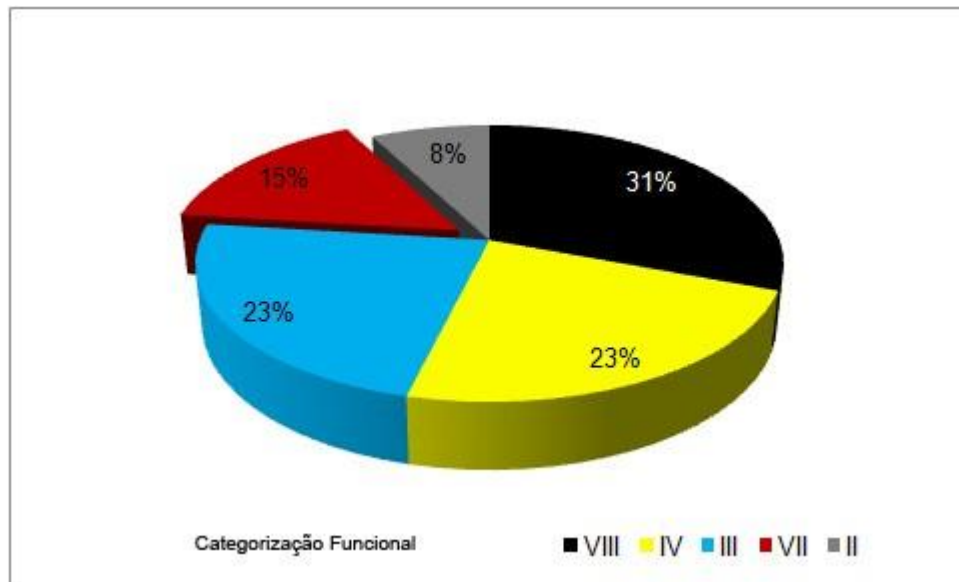


Figura 3. Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas secretadas tanto por *Xac* como pelo seu mutante 02H02, em condições indutoras de patogenicidade. As categorias funcionais utilizadas foram as mesmas descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. Descrição das categorias: VIII, proteínas hipotéticas; IV, proteínas de estrutura celular; III, proteínas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas; VII, proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação; II, proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos.

Observando-se a Figura 3 pode-se notar que 15% das proteínas secretadas por ambas as bactérias em meio indutor são proteínas pertencentes à categoria funcional VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) e são as seguintes: XAC2504 (VirK) e XAC0661 (Peh1). Esta porcentagem é relativamente pequena, já que o mutante 02H02 possui uma baixa quantidade de proteínas secretadas relacionadas diretamente à patogênese quando comparado à *Xac* selvagem cultivada em meio indutor.

Do total de proteínas encontradas para todas as condições analisadas, foram detectadas ainda 14 proteínas que estavam presentes apenas em condição infectante (meio XAM1) e secretadas exclusivamente por *Xac* selvagem (Tabela 1 – proteínas marcadas na cor vermelha).

Essas 14 proteínas secretadas exclusivamente pela *Xac* selvagem (proteínas que o mutante deixou de secretar) foram também classificadas de acordo com as categorias funcionais já descritas (Figura 4).

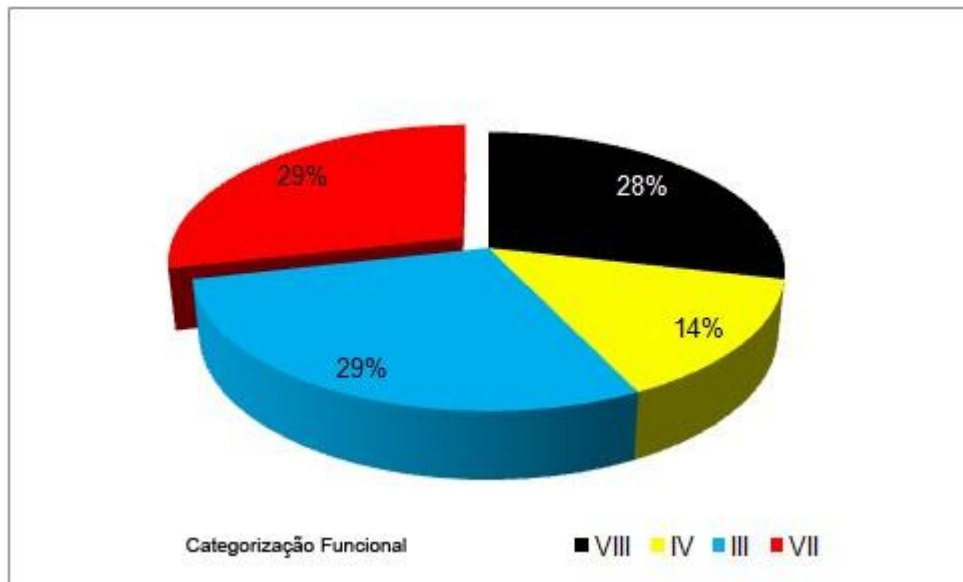


Figura 4. Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas secretadas exclusivamente pela *Xac* em condição infectante. As categorias funcionais utilizadas foram as mesmas descritas no sequenciamento do genoma da *Xac*. Descrição das categorias: VIII, proteínas hipotéticas; IV, proteínas de estrutura celular; III, proteínas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas; VII, proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação.

A porcentagem de proteínas da categoria VII (patogenicidade, virulência e adaptação) aumenta em quase duas vezes (de 15 para 29%) quando considera-se apenas as proteínas secretadas pela bactéria selvagem em meio indutor de patogenicidade e virulência, em relação ao mutante que não possui o *pilus* funcional do SSTT no mesmo meio de cultura. Essas proteínas que deixaram de ser secretadas pelo mutante são as seguintes: XAC0435 (VirK), XAC0029 (Egl), XAC0028 (Egl) e XAC0612 (EngXCA).

As proteínas secretadas mais importantes relacionadas à interação *Xac*-citrus serão discutidas em detalhe no decorrer deste trabalho para as seguintes condições infectantes: *Xac* e 02H02 cultivadas em XAM1 (proteínas comuns entre as duas condições) e *Xac* cultivada em XAM1 (proteínas exclusivas de *Xac* – proteínas que deixaram de ser secretadas pelo mutante).

IV.1. Proteínas secretadas por *Xac* e seu mutante 02H02 sob condição infectante.

De modo geral, pode-se dizer que as proteínas secretadas tanto pela bactéria selvagem *Xac* como pelo seu mutante 02H02 representam o arsenal do qual ambos os organismos se utilizam para sobreviver em um meio de cultura com características que induzem a transcrição de genes *hrp* responsáveis por regular um dos principais sistemas de secreção deste patógeno: o SSTT. Deste modo, analisando quais as proteínas que são expressas e secretadas para o meio extracelular pelo patógeno sob esta condição de estresse, pode-se observar não só eventuais proteínas envolvidas nesse sistema de secreção específico, como as demais proteínas responsáveis por manter a integridade celular da *Xac*, captando nutrientes necessários para manter a homeostase da célula, ou mesmo enzimas responsáveis por degradar as paredes celulares do hospedeiro, utilizando os compostos resultantes da hidrólise como fonte de alimento. A seguir serão descritas as principais proteínas que tanto a *Xac* selvagem como seu mutante, com o *pilus* do SSTT inativo, secretaram quando cultivados em meio de cultura definido XAM1.

A ORF XAC1466, que codifica para a Lipoproteína de membrana externa associada ao peptidoglicano Pcp em *Xanthomonas citri*, corresponde à proteína SlyB em *Xanthomonas campestris*. Essa proteína é regulada diretamente pelo sistema de dois componentes bacteriano conservado PhoPQ presente em diversos patógenos bacterianos, tanto de animais quanto de vegetais, como *Erwinia carotovora*, *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, dentre outros (PEREZ et al., 2009). A *Xac* também possui esse sistema de dois componentes composto pelos genes XAC4023 e XAC4022, porém não existe nenhum estudo a respeito da ação desse gene no gênero *Xanthomonas*. Em *Erwinia* a proteína Pcp/SlyB é expressa quando há baixas concentrações de Mg^{2+} , ambientes ácidos e condições de estresse para o patógeno e reprimida em altas concentrações de Mg^{2+} (PEREZ et al., 2009). Estudos a respeito da implicação desta proteína na patogenicidade bacteriana foram inconclusivos, porém a mesma denota ter certa implicação em processos patológicos animais e vegetais (PLESA et al., 2006). A proteína Pcp foi detectada em *Xac* e em seu mutante 02H02

cultivadas em meio indutor XAM1. Este fato condiz com a característica de que o meio indutor XAM1 é um meio definido, levemente ácido (pH 5,4) e contendo uma baixa concentração de Mg^{2+} , enquanto que o meio de cultura CN é um meio rico em nutrientes, e essa característica reprimiu a expressão dessa proteína quando o patógeno *Xac* e seu mutante foram cultivados em CN.

A ORF XAC0661 codifica uma enzima de degradação da parede celular da planta, denominada Peh1 (ORF XCC0705 codificando a proteína PghAxc em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) com ação de endo-poligalacturonase, responsável por hidrolisar randomicamente o ácido poligalacturônico presente nos polímeros pécticos, os principais componentes da lamela média de plantas superiores, liberando cadeias polissacarídicas de tamanho variável e deste modo destruindo a parede celular da planta e liberando fontes de carbono para nutrir o patógeno. Esta proteína é secretada pelo SSTD da *Xac*, e parece ser regulada por HrpX, já que seu gene carrega um *motif* conservado denominado “promotor induzido por planta” (PIP box). De modo geral, genes que possuem este motivo são regulados por HrpX (XAC1167 em *xanthomonas campestris* – XAC1266 HrpXct em *Xanthomonas citri*), que é um dos genes reguladores do SSTT (WANG et al., 2008). O gene *hrpX* codifica para uma proteína ativadora de transcrição do tipo Ara-C, que é responsável por controlar a transcrição dos operons *hrpB* até *hrpF*, controlando dentre estes o gene inativado do mutante 02H02 (*hrpB4*) (FURUTANI et al., 2004). O gene *hrpXct* já foi descrito como induzido em *Xac* em meio XAM1 em estudos de transcriptoma por LAIA (2007). Este gene *hrpX* continua ativado mesmo no mutante 02H02, e isso pode explicar a presença da proteína secretada Peh1 tanto na bactéria selvagem quanto em seu mutante. Segundo WANG (2008), Peh1 é uma proteína importante no estágio inicial da infecção, por ser responsável por hidrolisar as primeiras barreiras da planta, das quais a parede celular é a mais importante. Mutantes de *Xanthomonas campestris* com o gene codificando para a proteína PghAxc (Peh1 em *Xac*) inativados demonstraram virulência atenuada quando o patógeno foi pulverizado no hospedeiro *Arabidopsis*, demonstrando a importância dessa proteína para tais estágios da infecção. A presença de Peh1 em *Xac* indica a eficácia do meio de cultura XAM1 em induzir a ativação do gene *hrpX*.

Pode-se constatar ainda que apesar de o mutante não possuir o *pilus* do SSTT ativo, por lhe faltar a proteína HrpB4, os demais genes *upstream* controladores deste sistema aparentemente ainda encontram-se funcionais e possuem um papel ativo no controle de algumas proteínas de degradação que foram encontradas como secretadas neste trabalho e que serão descritas abaixo.

A ORF XAC2853 que codifica a proteína Cisteíno-protease correspondente à proteína CysP2 em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, possui um PIP-BOX imperfeito segundo estudo realizado por FURUTANI et al. (2004). Este estudo comprovou que esta Cisteíno-protease secretada pelo SSTT é também regulada por HrpX juntamente com HrpG. As cisteíno-proteases são consideradas importantes fatores de virulência para os patógenos de um modo geral, e sua ação consiste na hidrólise de peptídeos das células do hospedeiro, gerando fontes de carbono indispensáveis para o desenvolvimento da doença. O estudo com um mutante deficiente para a Cisteíno-protease realizado *in-vivo* por SANTOS (2007) demonstrou que a inativação do gene XAC2853 resultou em uma linhagem menos virulenta de *Xac*, quando inoculada no hospedeiro cítrico. Este fato indica a importância desta proteína secretada para a patogenicidade da bactéria em questão.

A ORF XAC2504 codifica para a proteína RpfN (Fator Regulador de Patogenicidade), que possui um domínio oprB. Esta proteína é correspondente à proteína OprB (Porina Seletiva para Carboidratos) em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV2682). Esta porina constitui um canal específico para glicose, mas também é responsável por transportar para o interior da membrana outros monossacarídeos (WYLIE & WOROBEK, 1995). Segundo NIKAIDO (2003), mutantes defectivos para esta proteína de *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram reduzida capacidade em utilizar diversos tipos de monossacarídeos, demonstrando sua importância para a importação de diversos açúcares para o interior da célula. Estudos realizados pelo mesmo autor demonstraram que valores de pH ácidos produzem um forte aumento na transcrição de oprB. O fato de que esta proteína foi detectada apenas em meio de cultura XAM1 remonta às características deste meio: pH ácido (5,4) e presença do monossacarídeo frutose, que é um açúcar muito semelhante à glicose,

apresentando a mesma composição química $C_6H_{12}O_6$. Este resultado é condizente com a revisão de NIKAIDO (2003) para *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria e também com o estudo proteômico empreendido pelo autor do presente trabalho (FERREIRA, 2006), que demonstrou a super-expressão da proteína RpfN por *Xac* quando cultivada em meio de cultura XAM1 e sua presença em menor escala em meio de cultura CN, utilizando diferentes estratégias de detecção. Esta proteína não é predita como secretada via sec, porém é predita como secretada por vias não clássicas pela ferramenta de bioinformática SecretomeP 2.0. Levando-se em conta a sensibilidade do método de detecção utilizado neste estudo, somado à grande indução dessa proteína na membrana externa da bactéria quando cultivada em XAM1, a mesma deve ter se despreendido para o referido meio de cultura e foi detectada através da espectrometria de massas. Possivelmente esta proteína também estava presente na membrana da *Xac* e seu mutante 02H02 quando cultivada em CN, porém em quantidade muito menor. Desse modo, tal proteína não deve ter se despreendido em quantidade, e assim não foi detectada. A implicação desta proteína na patogenicidade da *Xac* é pouco conhecida, mas segundo BARBER et al. (1997), mutantes de *Xanthomonas campestris* que tiveram esse gene inativado apresentaram aumento da síntese enzimática e patogenicidade. O gene rpfN não faz parte do grupo de genes *rpfA-I* (*Xac* não possui *rpfH* e *rpfL*) responsáveis por regular a síntese e a secreção de enzimas e polissacarídeos extracelulares importantes para a patogenicidade bacteriana, mas parece ter um papel na regulação negativa destes fatores. A alta concentração de enzimas extracelulares só é obtida durante o fim da fase exponencial, na fase estacionária de crescimento bacteriano e no desenvolvimento da doença e é controlada globalmente pelo grupo *rpfA-I* (ANDRADE et al., 2006). O fato de que o gene *rpfN* é fortemente expresso em 24 horas de cultivo no meio de cultura XAM1 pela *Xac* e seu mutante 02H02 pode indicar a função de regulador negativo de enzimas extracelulares nos tempos iniciais de infecção, já que segundo trabalhos anteriores esse gene tem uma queda acentuada em sua expressão após 3 dias de cultivo da bactéria na planta hospedeira (FERREIRA, 2006). Esse gene pode ser um indício do motivo de não haver uma maior quantidade de enzimas extracelulares detectadas no presente trabalho.

A ORF XAC1113 codifica para uma lipoproteína de membrana externa Slp induzida por deficiência de carbono. Em *E. coli* esta proteína é induzida quando a disponibilidade de glicose é limitante no meio de cultura e quando o organismo encontra-se na transição da fase de crescimento logarítmico para a fase estacionária. Mutantes deficientes na produção da proteína Slp demonstraram uma diminuição da resistência frente a antibióticos como o cloranfenicol, o que pode demonstrar um papel para esta proteína na captação de nutrientes quando o patógeno encontra-se sob uma condição de estresse, devido à baixa disponibilidade de fontes de carbono (PRICE & JOHN, 2000). Esta lipoproteína é secretada para a membrana externa da *Xac* através de uma via não clássica de secreção, já que não possui um peptídeo sinal em seu N-terminal. O fato de que esta proteína foi detectada apenas quando a *Xac* e o mutante 02H02 foram cultivados em meio definido indutor XAM1 demonstra que o mutante, apesar de ser assintomático quando inoculado *in planta*, ainda é capaz de sobreviver no hospedeiro sem causar a doença. No entanto, o fato de que o mutante 02H02 apresenta um crescimento menor em meio de cultivo definido e um crescimento comparável ao selvagem em meio de cultura rico, pode indicar que a inativação do gene *hrpB4* deve ter influenciado outros mecanismos de captação de fontes de carbono, que podem ser responsáveis pelo crescimento diminuído em meio de cultura definido.

IV.2. Proteínas secretadas exclusivamente por *Xac* sob condição infectante.

As proteínas secretadas identificadas exclusivamente em *Xac* selvagem quando cultivada em meio indutor XAM1 são as mais importantes para se determinar o impacto da mutação do gene que codifica uma proteína de estrutura do *pilus* do SSTT no mutante 02H02 e sua repercussão nas funções moleculares na *Xac* selvagem. Com os dados apresentados até o momento pode-se observar que o mutante 02H02 ainda conserva alguns mecanismos relacionados à captação de nutrientes e mesmo à patogenicidade, como controladores negativos de enzimas degradadoras da parede celular do hospedeiro e mesmo uma cisteína protease que desempenha papel

importante na patogenicidade de *Xac*. Porém, diversas proteínas de ataque ao hospedeiro e de resistência ao estresse nutricional imposto pelo mesmo foram detectadas de modo exclusivo para a *Xac* selvagem, proteínas estas que podem estar sendo reguladas indiretamente pelo gene mutado *hrpB4* ausente no mutante 02H02. Dentre as proteínas exclusivas de *Xac* em meio XAM1 pode-se citar algumas a seguir.

A proteína OprO (XAC3472) é uma porina O de membrana externa seletiva para polifosfatos também regulada por PhoPQ e tem por função permitir a passagem de polifosfatos advindos da degradação das células do hospedeiro e do meio ambiente em que a bactéria se encontra para o interior da célula do patógeno, permitindo que a *Xac* utilize tal fosfato para gerar a energia necessária para sobreviver e produzir efetores capazes de subjugar as defesas geradas pelas células do hospedeiro e assim desenvolver a doença. Em *Pseudomonas aeruginosa* a OprO é uma porina ânion-específica, com maior afinidade para ligar pirofosfato do que ortofosfato. Estudo efetuado por SIEHNEL et al. (1992) em *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou que esta proteína era expressa apenas sob condições de cultivo pobres em fosfato conjuntamente com a fase estacionária de crescimento da bactéria. No caso de *Pseudomonas* isso ocorre porque a disponibilidade de fosfato no solo muitas vezes é limitada, já que diversos microorganismos lançam mão de mecanismos de sequestro de fosfato e o armazenam na forma de polifosfatos. Desse modo, uma vez que a *Pseudomonas* utiliza seu arsenal de compostos microbicidas para inibir estes competidores, a presença da OprO na membrana externa da célula é responsável por capturar o polifosfato e enviar ao periplasma. Em *Xac*, o meio indutor XAM1 é um meio de cultura pobre em fosfato, assim como o meio intercelular do hospedeiro cítrico. Assim, é esperado que a proteína OprO seja expressa para capturar o fosfato liberado pela degradação das paredes celulares do hospedeiro pela *Xac* selvagem produzindo suas enzimas degradadoras. O fato de que o mutante 02H02 não possui a OprO presente para captar o fosfato necessário para auxiliar no desenvolvimento da patogênese, pode indicar que a falta do gene *hrpB4* e a má formação do *pilus* do SSTT impediu de alguma forma a expressão de diversas outras proteínas secretadas pela *Xac* selvagem, responsáveis por auxiliar nos processos de virulência que acarretam o

pleno desenvolvimento da doença e mesmo o desenvolvimento adequado do mutante no meio definido XAM1. Isto condiz novamente com as características de meio de cultura definido indutor de patogenicidade do XAM1 e o fato de que o mutante 02H02 é assintomático quando inoculado *in planta* e apresenta crescimento reduzido quando cultivado em meio de cultura definido, haja visto que a bactéria mutada não possui um arsenal ativo de degradação para levar a cabo os processos relacionados ao desenvolvimento da doença.

Outra proteína secretada exclusivamente pela *Xac* selvagem quando cultivada em meio indutor foi a VirK (XAC0435). Esta proteína possui um peptídeo sinal em seu N-terminal, logo é secretada para o periplasma do patógeno através da via de secreção geral – sec, e parece fazer parte do sistema de secreção do tipo quatro (SSTQ), responsável por exportar T-DNA e outras proteínas para a planta hospedeira no caso de *Agrobacterium tumefaciens* (FACINCANI, 2007). Em *Xac* esse sistema é descrito como um sistema não completo por alguns autores, pelo fato de que alguns genes anotados para este sistema não estão presentes, porém a observação cuidadosa feita por BRUNINGS & GABRIEL (2003) demonstra que existem alguns genes homólogos para este sistema em *Xac* que podem desempenhar o papel dos genes ausentes. ROMMAIS et al. (2008) descreve VirK como uma proteína de função desconhecida em *Agrobacterium tumefaciens*, no entanto um homólogo desta proteína foi também encontrado em *Ralstonia solanacearum* e neste organismo, a proteína VirK é regulada pela proteína HrpG. O fato de que HrpX é funcional em *Xac* e regulou diversas proteínas comuns entre *Xac* e seu mutante, indica que *hrpG*, que é um gene “upstream” a *hrpX*, também codifica para uma proteína funcional, mesmo no mutante. O gene *hrpB4* que foi interrompido por ação do transposon no 02H02 parece desempenhar um papel relacionado à presença da proteína secretada VirK exclusivamente na *Xac* selvagem. Estudos baseados em macro arranjos empreendidos por ASTUA-MONGE et al. (2005) em *Xac* cultivada em meio indutor XVM2 demonstram que esta proteína apresentou um aumento de expressão de mais de duas vezes em comparação com o meio de cultura rico não indutor. O fato de que esta proteína é predita como sendo parte integrante do SSTQ levanta questões a respeito da interação que pode ocorrer

entre esse sistema e o SSTT, já que a má formação do *pilus* do SSTT no mutante 02H02 parece ter relação com a presença dessa proteína exclusivamente na *Xac* selvagem cultivada em meio indutor. Talvez no caso de *Xac* o gene *virK* não seja regulado diretamente por *hrpG*, e sim por alguma das proteínas diretamente reguladas por este gene. Já que a inativação do gene *hrpB4* inativou quase todos os outros constituintes do *pilus*, pode ser que não necessariamente *virK* seja controlada diretamente por *hrpB4*, mas por qualquer um dos genes desativados.

A ORF XAC0678 codifica para uma proteína anotada como hipotética putativa conservada para *Xac* e foi detectada exclusivamente para este patógeno cultivado em meio indutor. Uma nova comparação de sua sequência de aminoácidos (BLASTP), realizada em agosto de 2009, revelou que esta proteína hipotética de *Xac* apresenta uma alta homologia com a lipoproteína da família de antígeno de superfície de 17 kDa de *Rickettsia* (17 kDa surface antigen family) em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, com uma identidade de 96% e e-value de 4×10^{-63} . Segundo ANDERSON & TZIANABOS (1989) esta proteína é altamente conservada dentro do gênero *Rickettsiae*. Este gênero possui algumas espécies patogênicas responsáveis por doenças como o tifo e a febre das montanhas rochosas que ocorre nos Estados Unidos. Segundo CARVALHO (2006) esta proteína hipotética possui um PIP-BOX perfeito em sua sequência de nucleotídeos, revelando sua relação com a proteína de regulação do SSTT, HrpX. Análises de bioinformática revelam que esta proteína possui um peptídeo sinal para sec, sendo exportada para o periplasma do patógeno. DAVIS et al. (1998) foi o primeiro grupo a relatar uma *Rickettsia* como um possível patógeno de mamão papaia utilizando PCR e a lipoproteína de membrana de 17 KDa comum a este gênero por metodologia. FRÁNOVÁ et al. (2008), utilizando microscopia eletrônica de varredura, também observaram organismos semelhantes a *Rickettsia* nos tubos do floema de cenouras apresentando sintomas de doença. A implicação deste antígeno de superfície de 17 KDa para *Rickettsia* não é conhecida. Em *Xac*, o fato dessa proteína possuir um PIP-BOX pode indicar que a mesma tem relação na patogenicidade de *Xac*, já que está relacionada com um dos principais mecanismos conhecidos elicitadores de doença em animais e plantas (SSTT), porém o mecanismo de ação implicado nesta relação ainda

não foi descrito. Julgando pela sua expressão exclusiva na bactéria selvagem sob indução de patogenicidade, pode-se dizer que esta proteína pode ser diretamente secretada via SSTT, já que a mesma não foi detectada no mutante deficiente para este sistema.

O meio XVM2 (XAM1 modificado) já foi demonstrado por ASTUA-MONGE et al. (2005) como responsável pela indução da secreção de diversas enzimas degradadoras de parede celular, dentre elas as celulases Egl (XAC0028 e XAC0029). Ambas as celulases descritas foram novamente detectadas como secretadas apenas no meio indutor XAM1 pela bactéria selvagem *Xac* e não pelo seu mutante 02H02. Estas proteínas são preditas como transportadas via *sec* para o periplasma e em seguida secretadas pelo SSTD, de modo que a presença destas apenas na bactéria selvagem indica que a inativação do SSTT no mutante pode ter reprimido algumas enzimas de degradação da parede celular do hospedeiro, que são secretadas pelo SSTD. Ou seja, o SSTT pode ter relação direta na regulação também dessas proteínas secretadas pelo SSTD.

A ORF XAC0612 codifica para uma celulase EngXca com ação Endo-1,4-beta-glucanase, supostamente responsável por auxiliar na degradação da celulose da parede celular do hospedeiro cítrico. Esta proteína parece ser controlada indiretamente por *rpfF* em *Xanthomonas campestris*, já que um mutante deficiente nesta proteína apresentou considerável diminuição em sua ação enzimática (POPLAWSKY et al., 1998). BAPTISTA (2006) chegou à conclusão de que em *Xac* esta proteína não apresenta ação enzimática celulósica considerável, ao contrário do que sua anotação prevê, portanto não desempenha um papel importante na patogenicidade de *Xac* frente a hospedeiros cítricos. Porém a regulação alterada desta proteína no mutante 02H02 pode indicar que as vias indiretas de secreção de enzimas de degradação de parede celular controladas por fatores difusíveis (DSF – Fator de Sinalização Difusível) codificados por *rpfF* descritos por POPLAWSKY (1998) podem ter sido alteradas pela má formação do *pilus* do SSTT. As moléculas DSF são encontradas no sobrenadante das culturas utilizando-se ensaios baseados em acetato etílico, logo, segundo os resultados obtidos neste trabalho, pode-se supor que as DSFs controladas por *rpfF*

podem ter relação com a má formação do *pilus* do SSTT, dado o fato de que o mutante 02H02 para este sistema simplesmente deixou de secretar diversas enzimas de degradação da parede celular do hospedeiro (XAC0028, XAC0029 e XAC0612). SICILIANO e colaboradores (2006) descrevem ainda que mutantes de *Xac* para o gene *rpfF* e *rpfC* apresentaram produção fortemente diminuída de enzimas de degradação da parede celular do hospedeiro e uma menor produção de goma xantana, resultado observado indiretamente neste trabalho quando o mutante 02H02 foi cultivado em meio de cultura XAM1. Meios de cultura XAM1 livres de células eram mais facilmente filtrados em membranas de 0,2 µm quando o 02H02 era cultivado nos mesmos, em detrimento ao selvagem *Xac* – a goma xantana obstruía os poros da membrana de modo mais evidente em *Xac*, e a quantidade de goma precipitada por álcool etílico absoluto em meio XAM1 livre de células era visivelmente maior quando a *Xac* era cultivada neste meio indutor. Os mutantes para os genes *rpfF* e *rpfC* feitos por SICILIANO et al. (2006) apresentaram sintomas diminuídos quando inoculados em hospedeiro cítrico (Limão). A presença de mais duas celulases Egl (XAC0028 e XAC0029) exclusivas para a *Xac* selvagem corroboram ainda mais a hipótese de que possivelmente a má formação do *pilus* do SSTT e a ausência de suas proteínas secretadas alteraram a secreção de DSF no mutante e seus efeitos para a produção de enzimas degradadoras e goma xantana no mutante 02H02.

BAPTISTA (2006), em seu estudo em *Xac*, descreve os genes XAC0028 e XAC0029 (*egl*) como celulases responsáveis por hidrolisar compostos celulósicos da parede do hospedeiro. Ambas as proteínas citadas foram descritas entre as cinco principais proteínas diretamente ligadas à degradação de compostos celulósicos em *Xac*. Mutantes feitos pelo mesmo autor para os referidos genes demonstram alteração na patogenicidade mesmo que branda, e o autor sugere que um sinalizador difusível alternativo possa ser responsável pelo controle destas celulases (DSF). ASTUA-MONGE et al. (2005) sugeriu a existência deste mesmo sinalizador em *Xanthomonas citri*. Apesar do fato de que não foi possível detectar diretamente tal sinalizador DSF, a presença das principais proteínas e alteração na produção de goma xantana sabidamente reguladas por ele, indicam que a mutação no gene *hrpB4* teve ação na

secreção dos fatores de sinalização, já que a má formação do *pilus* no mutante desativou a expressão das enzimas já descritas e modificou a produção de goma xantana pela bactéria não patogênica (ensaios para detectar diretamente esta molécula deverão ser empreendidos no futuro).

Estudos proteômicos e de microscopia eletrônica realizados por SIDHU et al. (2008) em *Xanthomonas campestris* chegaram à conclusão de que diversas bactérias gram-negativas liberam vesículas lipídicas de suas membranas externas, contendo compostos envolvidos na sinalização célula a célula, assim como proteínas associadas à virulência. O referido estudo encontrou particularmente proteínas secretadas relacionadas ao SSTT, como proteínas de avirulência AvrBs1 e AvrBs2, HrpF e mesmo a proteína correspondente ao mutante do presente artigo, HrpB4. Foram detectadas ainda algumas proteínas do SSTD como XpsH e celulases. Estas proteínas, em particular as proteínas relacionadas ao SSTT foram encontradas apenas na fração secretada das vesículas de membrana externa, e não nas proteínas extraídas diretamente da membrana externa do patógeno. A metodologia utilizada para extrair as vesículas do sobrenadante dos meios de cultura utilizados nos estudos de SIDHU et al. (2008) foi baseada em ultracentrifugação, o que pode explicar o fato de que não foram encontradas proteínas diretamente relacionadas ao SSTT nos experimentos de secreção utilizados neste estudo, logo tais vesículas devem ter sido descartadas juntamente com o sobrenadante da centrifugação responsável por precipitar as proteínas livres nos diferentes meios de cultura. A ausência de proteínas de avirulência sabidamente secretadas pelo SSTT de *Xac* como AvrBs1 e AvrBs2 e proteínas efetoras diversas do SSTT como Hrc e Hrp em todas as condições analisadas no presente artigo, pode indicar que *Xac* também produz vesículas de membrana externa com tais proteínas em seu lúmen, as quais não foram detectadas simplesmente devido à metodologia utilizada que excluiu tais vesículas. Porém a real constatação da existência dessas vesículas para *Xac* ainda requer estudos diretos mais aprofundados.

V. CONCLUSÕES

Foram identificadas no total 55 proteínas secretadas para as quatro condições analisadas neste artigo: *Xac* cultivada em meio CN, *Xac* cultivada em meio XAM1, 02H02 cultivada em meio CN e 02H02 cultivada em meio XAM1. Destas, 13 proteínas foram secretadas tanto por *Xac* como pelo seu mutante 02H02 quando cultivados em meio de indução XAM1, e 14 proteínas foram secretadas exclusivamente quando *Xac* selvagem se encontrava em meio de cultura XAM1.

Dentre as 55 proteínas identificadas neste estudo, apenas 18 não possuíam o peptídeo sinal predito para secreção através do sistema secretório geral (sec). Entretanto, das 18 proteínas que não possuem o peptídeo sinal, apenas 5 foram preditas como não secretadas por vias não clássicas. Isto demonstra que a grande maioria (50) das proteínas aqui detectada não foram proteínas contaminantes e nem proteínas liberadas através de lise celular.

A porcentagem de proteínas secretadas relacionadas à categoria VII do genoma de *Xac* (Patogenicidade, virulência e adaptação) aumenta em quase duas vezes (de 15 para 29%) quando são consideradas apenas as proteínas secretadas pela bactéria selvagem *Xac* em relação àquelas secretadas pelo seu mutante 02H02. Este fato já demonstra a natureza das proteínas que deixaram de ser secretadas pelo mutante que possui o *pilus* do SSTT inativo, ou seja, proteínas diretamente relacionadas com o desenvolvimento da doença no hospedeiro.

O meio de cultura XAM1, mesmo sem a adição de soroalbumina bovina, induziu a secreção de diversos genes regulados por *hrpX* e *hrpG* e secretados pelo SSTD, tanto no selvagem quanto no mutante 02H02, indicando que os genes reguladores do SSTD não foram inativados pela mutação do gene *hrpB4* no mutante.

A presença da proteína RpfN expressa tanto na *Xac* selvagem quanto em seu mutante pode explicar o fato de que não foram identificadas maiores quantidades de enzimas extracelulares, já que esta proteína é conhecida por ser um regulador negativo destas enzimas nos tempos iniciais de infecção.

A presença da lipoproteína Slp induzida por deficiência de carbono tanto na *Xac* quanto em seu mutante cultivados em XAM1 indica que este meio definido tornou-se limitante para o crescimento das culturas, que possivelmente se encontravam no final da fase exponencial de crescimento, já entrando na fase estacionária, mesmo no caso do mutante, que apresentou uma D.O_{600 nm} menor que a *Xac* selvagem. Este fato indica que a falta da proteína HrpB4 no mutante influenciou em seu crescimento em meios de cultura definidos, mas não em meios ricos. Não foi possível determinar os mecanismos responsáveis por este comportamento do mutante.

A expressão de diversas proteínas do SSTD parece ser controlada pelo SSTT, demonstrando que este fato também ocorre em *Xac*.

O perfil de proteínas secretadas exclusivamente pela bactéria selvagem *Xac* e a quantidade aumentada de goma xantana produzida em meio indutor XAM1 indica que os DSFs (Fator de Sinalização Difusível) responsáveis pelo controle destes fatores podem ter relação com a ausência de expressão da proteína HrpB4, já que o mutante 02H02 deficiente na produção dessa proteína foi incapaz de secretar diversos desses fatores.

A não detecção de proteínas diretamente secretadas pelo SSTD, como AvrBs1 e 2, HrpF e outros fatores de virulência nos experimentos aqui descritos, pode indicar que em *Xac* essas proteínas estejam sendo secretadas no interior de vesículas lipídicas liberadas das membranas externas do patógeno e que provavelmente se ligam às membranas do hospedeiro, onde o conteúdo dessas vesículas são liberados, como ocorre em *Xanthomonas campestris* (SIDHU et al., 2008).

Estudos mais aprofundados devem ser empreendidos para a observação direta da ausência de DSFs no mutante 02H02 e da presença de proteínas secretadas diretamente pelo SSTD no interior de vesículas lipídicas de membrana em *Xac* selvagem.

VI. REFERÊNCIAS

ALFANO, J.R. & COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.5655-5662, 1997.

ANDERSON, B. E.; TZIANABOS, T. Comparative Analysis of a Genus-Common Rickettsial Antigen Gene. **Journal of Bacteriology**, v.171, n.9, p.5199-5201, 1989.

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S. A.; MACHADO, M. A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p.1201-1205, 2005.

BAPTISTA, J. C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. 2006. 93f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, 2006.

BARBER, C. E.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; PAN, M. Q.; WILSON, T. J. G.; SLATER, H.; DOW, J. M.; WILLIAMS, P.; DANIELS, M. J. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, Norwich, v.24, n.3, p.555-566, 1997.

BENDTSEN, J. D.; KIEMER, L.; FAUSBØLL, A.; BRUNAK, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **Biomedcentral Microbiology**, Lyngby, v.5, n.58, 2005.

BESPALHOK-FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Laranja TRANSGÊNICA: Transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia**, v.4, n.23, p.62-66, 2001.

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

BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, v.292, p.2275-2278, 2001.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, Florida, v.4, p. 141-157, 2003.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **European molecular biology organization**, v. 21, p.5313–5322, 2002.

CARVALHO, F. M. S., **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 2006. 170f. Dissertação (Doutorado em genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2006.

CORNELIS, G. R.; Van GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.735-774, 2000.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Maryland USA: American Society of Plants Physiologists, p.850-829, 2001.

DAVIS, M. J.; YING, Z.; BRUNNER, B. R.; PANTOJA, A.; FERWERDA, F. H. Rickettsial Relative Associated with Papaya Bunchy Top Disease. **Current Microbiology**, v. 36, n.2, p.80-84, 1998.

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

ESTADOS UNIDOS, United States Department of Agriculture. **Citrus: world markets and trade**. 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/currwmt.asp>>. Acesso em: 13 abr. 2009.

FACINCANI, A. P. **Análise proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. Jaboticabal, 2007. 153p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FERREIRA, R. M. **Análise proteômica em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri durante indução de patogenicidade e virulência**. Jaboticabal, 2006. 71p. Monografia (Trabalho de Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 26-33, 2001.

FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. The structural biology of type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p.703-714, 2009.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Estatísticas – Cancro Cítrico**. 2009
Disponível em: <http://fundecitrus.com.br/est_cancro_br.html#i2007_rural>. Acesso em: 13 abr. 2009.

FURUTANI, A.; TSUGE, S.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; INOUE, Y.; OCHIAI, H.; KAKU, H.; KUBO, Y. Evidence for HrpXo-Dependent expression of type

II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n.5, p.1374-1380, 2004.

GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. **Microbiology and molecular biology reviews**, California, v. 68, n. 4, p. 771-795, 2004.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. **Public library of science (PLoS) One**, Rosario, v. 4, n. 2, e. 4358, p. 1-13, 2009.

GOTTWALD, T. R.; SUN, R.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v.92, p.361-377, 2002.

GREENBAUM, D.; COLANGELO, C.; WILLIAMS, K.; GERSTEIN, M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome Biology**, v. 4, issue 117, 2003.

HAMMOND-KOSAK, K, E.; JONES, J. D, G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, p.1773-1791, 1996.

HASSE, C. H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal Of Agricultural Research**, v.4, n.1, p.97-100, 1915.

HILLER, K.; GROTE, A.; SCHEER, M.; MUNCH, R.; JAHN, D. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.375-379, 2004.

HIROSE, I.; SANO, K.; SHIODA, I.; KUMANO, M.; NAKAMURA, K.; YAMANE, K. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. **Microbiology**, v. 146, p.65-75, 2000.

HOMMAIS, F.; OGER-DESFEUX, C.; GIJSEGEN, F. V.; CASTANG, S.; LIGORI, S.; EXPERT, D.; NASSER, W.; REVERCHON, S. PecS Is a Global Regulator of the Symptomatic Phase in the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937†. **Journal of Bacteriology**, Paris, v.190, n.22, p.7508-7522, 2008.

HUECK, C.J. Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.379-433, 1998.

JUNGBLUT, P.; WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **Journal Biotechnology**, v. 41, p.111-120, 1995.

JUNGBLUT, P. R.; SCHAIBLE, U. E.; MOLLENKOPF, H. J.; ZIMNY-ARNDT, U.; RAUPACH, B.; MATTOW, J.; HALADA, P.; LAMER, S.; HAGENS, K.; KAUFMANN, S. H. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 1103–1117, 1999.

KAZEMI-POUR, N., CONDEMINE, G., HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. **Proteomics**, v. 4, 2004.

KOLLER, O. L.; SOPRANO, E.; BONAS, U. **Normas técnicas para a cultura de citros em Santa Catarina**. Santa Catarina: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.A - EPAGRI, 1993. (Sistemas de Produção, 14).

KOLKER, E.; PURVINE, S.; GALPERIN, M. Y.; STOLYAR, S.; GOODLETT, D. R.; NESVIZHSHKII, A. I.; KELLER, A.; XIE, T.; ENG, J. K.; YI, E.; HOOD, L.; PICONE, A. F.; CHERNY, T.; TJADEN, B. C.; SIEGEL, A. F.; REILLY, T. J.; MAKAROVA, K. S.; PALSSON, B. O. AND SMITH, A. L. Initial Proteome Analysis of Model Microorganism *Haemophilus influenzae* Strain Rd KW20. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.15, p. 4593-4602, 2003.

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

LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri implicados na patogênese**. 2007. 322f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. IT.; SILVA, A. CR.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. CF. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **Biomedcentral (BMC) Microbiology**, London, v. 9, n. 12, 2009.

LEI, B., S. MACKIE, S. LUKOMSKI, and J. M. MUSSER. Identification and immunogenicity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins. **Infection and Immunity**, v.68, p.6807–6818, 2000.

LINDGREN, P.B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p.129-152, 1997.

MACHADO, M. **Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a new destructive citrus disease in Brazil, and the xylem limited bacteria, *Xylella fastidiosa***. <<http://www.dcc.unicamp.br/genoma/xylella.html>>. (1997).

METHA, A., ROSATO, Y. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by representational difference analysis of cDNA. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.140-149, 2005.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, California, v.67, n.4, p.593-656, 2003.

NOUWENS, A. S.; BEATSON, S. A.; WHITCHURCH, C. B.; WALSH, B. J.; SCHWEIZER, H. P.; MATTICK, J. S.; CORDWELL, S. J. **Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the las and rhl quorum sensing systems in Pseudomonas aeruginosa PAO1**. *Microbiology*, 149, p. 1311-1322, 2003

O`FAREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v.250, p.4007-4021, 1975.

PENG, J., ELIAS J.E., THOREEN C.C., LICKLIDER L.J. & GYGI S.P. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC-MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. **Journal of Proteome**, v.2, n.1, p.43-50, 2003.

PEREZ, J. C.; SHIN, D.; ZWIR, I.; LATIFI, T.; HADLEY, T. J.; GROISMAN, E. A. Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and Mg²⁺ homeostasis. **Plos genetics**, Sevilla, v.5, n.3, e1000428, 2009.

PLESA, M.; HERNALSTEENS, J. P.; VANDENBUSSCHE, G.; RUYSSCHAERT, J. M.; CORNELIS, P. The SlyB outer membrane lipoprotein of *Burkholderia multivorans* contributes to membrane integrity. **Research in Microbiology**, Brussels, v.157, p.582-592, 2006.

POPLAWSKY, A. R.; CHUN, W.; SLATER, H.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. Synthesis of Extracellular Polysaccharide, Extracellular Enzymes, and Xanthomonadin in *Xanthomonas campestris*: Evidence for the Involvement of Two Intercellular Regulatory Signals. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.11, n.1, p.68-70, 1998.

PRICE, G. P.; JOHN, A. C. S. Purification and analysis of expression of the stationary phase-inducible Slp lipoprotein in *Escherichia coli* : role of the Mar system. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology letters**, New Jersey, v.193, n.2000, p.51-56, 2000.

ROSENKRANDS, I., K. WELDINGH, S. JACOBSEN, C. V. HANSEN, W. FLORIO, I. GIANETRI, and P. ANDERSEN. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. **Electrophoresis**, v.21, p.935–948, 2000.

SANTOS, G. R. R. M. **Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SICILIANO, F.; TORRES, P.; SENDÍN, L.; BERMEJO, C.; FILIPPONE, P.; VELLICE, G.; RAMALLO, J.; CASTAGNARO, A.; VOJNOV, A.; MARANO, M. R. Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri pathogenesis in Citrus limon. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.3, p.199-204, 2006.

SIDHU, V. K.; VORHÖLTER, F. J.; NIEHAUS, K.; WATT, S. A. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. campestris. **BioMed Central Microbiology**, Bielefeld, v.8, n.87, 1471-2180/8/87, 2008.

SIEHNEL, R. J.; EGLI, C.; HANCOCK, R. E. W. Polyphosphate-selective porin OprO of *Pseudomonas aeruginosa*: expression, purification and sequence. **Molecular Microbiology**, Vancouver, v.6, n.16, p.2319-2326, 1992.

TALON, M.; GMITTER JR, F.G. Citrus Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, ID 528361, 17p, 2008.

WANG, L.; RONG, W.; HE, C. Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, PghAxc and PghBxc, are regulated by Type III Secretion Regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Beijing, v. 21, n.5, p.555-563, 2008.

WATT, S. A., WILKE, A., PATSCHKOWSKI, T., NIEHAUS, K., Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100. **Proteomics**, v.4, 2004.

WASHBURN, M.P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R., III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v.19, p.242-247, 2001.

WEBER, E.; OJANEN-REUHS, T.; HUGUET, E.; HAUSE, G.; ROMANTSCHUK, M.; KORHONEN, T.; BONAS, U.; KOEBNIK, R. The Type III-Dependent Hrp *Pilus* Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with Pepper Host Plants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, n.7, p.2458-2468, 2005.

WENGELNIK, K.; Van den ACKERVEKEN, G. & BONAS, U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.9, p.704-712, 1996.

WYLIE, J. L.; WOROBEK, E. A. The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Winnipeg, v.177, n.11, p.3021-3026, 1995.

XIA, D.; SANDERSON, S. J.; JONES, A. R.; PRIETO, J. H.; YATES, J. R.; BROMLEY, E.; TOMLEY, F. M.; KALPANA, L.; SINDEN, R. E.; BRUNK, B. P.; ROOS, D. S.; WASTLING, J. M. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. **Genome Biology**, v.9, R116, 2008.

YAJIMA, W., KAV, N. N. V. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Proteomics**, v.6, p.5995-6007, 2006.

YEN, Y. T.; BHATTACHARYA, M.; STATHOPOULOS, C. Genome-wide *in-silico* mapping of the secretome in pathogenic *Yersinia pestis* KIM. **FEMS Microbiology Letters**, v.279, p.56-63, 2007.

YURA, T., NAGAI, H. MORI, H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 321-350, 1993.