

**PAULA MARIA MOREIRA MARTINS**

**LOCALIZAÇÃO SUB-CELULAR DE PROTEÍNAS MARCADAS COM GFP EM  
*Xanthomonas axonopodis* pv. citri POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Microbiologia  
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro  
2009

576            Martins, Paula Maria Moreira  
M386Lo        Localização sub-celular de proteínas marcadas com  
GFP em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri por microscopia  
de fluorescência / Paula Maria Moreira Martins. – Rio Claro :  
[s.n.], 2009  
              93 f. : il., figs., tabs.  
  
              Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
              Orientador: Henrique Ferreira  
  
              1. Microorganismos. 2. Microbiologia. 3. Xac proteínas  
              hipotéticas cancro cítrico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*Dedico este trabalho aos meus pais, que carinhosamente sempre me deram apoio e incentivo nos mais diversos momentos de minha vida.*

## Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma deram apoio à conclusão deste trabalho, em especial ao Prof. Henrique Ferreira que durante os últimos dois anos mostrou-se paciente e companheiro no dia-a-dia do laboratório. Também agradeço à sua esposa, Msc. Ivy Lau, que nos passou parte de seu conhecimento e experiência ao longo do desenvolvimento deste projeto, especialmente na etapa de microscopia.

Aos Profs. Maucício Bacci (UNESP –Rio Claro), Roberto da Silva e. Eleni Gomes (UNESP – S. J. Rio Preto) por nos terem recebido e cedido parte de seus laboratórios onde este trabalho se desenvolveu.

Pelo uso do microscópio de fluorescência: Profa. Sanae Kasahara (UNESP –Rio Claro), Prof. Sebastião Taboga (UNESP – S. J. Rio Preto), Prof. F. Gueiros-Filho (USP- São Paulo) e especialmente ao Dr. Marcos Machado do Centro de Citricultura APTA Sylvio Moreira (Cordeirópolis – SP), que de portas abertas nos recebeu, permitindo a realização da maior parte deste projeto.

Ao Dr. Alexandre do Amaral (Centro de Citricultura) pela realização de testes e por nos ceder informações valiosas de seus experimentos. Ao Dr. Takita (Centro de Citricultura) agradeço pelo auxílio no uso do microscópio e pela disponibilidade em nos ajudar sempre que necessário.

Aos Profs. Fernando Pagnocca e Jonas Contiero (UNESP- Rio Claro) pelos estágios concedidos durante a graduação, os quais serviram de base à minha formação e de estímulo para prosseguir na vida acadêmica.

À FAPESP que financiou inteiramente este projeto, concedendo bolsa de estudo e financiando a compra de equipamentos e reagentes.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer imensamente à minha família, especialmente aos meus pais (Ivoni e Carlos Martins) e ao meu noivo João M. Caldeirelli que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis ao longo destes dois anos. Aos colegas de trabalho Joaquim, Cynara, Flávia, Marcelo e André por alegrar os dias de trabalho e discutir temas pertinentes. Um agradecimento especial fica registrado às estagiárias: Aline H., Talitha K. e Tássia Liberato que contribuíram em parte da realização deste trabalho.

## Resumo

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac), e que afeta plantas de citros por todo o mundo. O genoma de Xac foi completamente sequenciado, o que revelou grandes quantidades de ORFs (~30%) codificando para produtos com função desconhecida (proteínas hipotéticas). Baseando-se no princípio de que muitos eventos bioquímicos acontecem em sítios específicos no interior celular, a localização de proteínas em fusão com GFP tem sido amplamente utilizada para a obtenção de informações valiosas a respeito de suas funções. Para iniciarmos estudos de localização de proteínas hipotéticas em Xac, construímos um vetor integrativo capaz de expressá-las em fusão com o polipeptídio GFP, pPM2a. O vetor de expressão para Xac carrega um cassete promotor/repressor de xilose (*xyIR/pxyl*), o gene *gfp*, um RBS sintético e um fragmento do gene de  $\alpha$ -amilase de Xac, para direcionar a integração do sistema de expressão no locus *amy* do cromossomo bacteriano. Mostramos aqui a integração estável do vetor no locus *amy* de Xac. Além disso, mutantes de Xac expressando o polipeptídio GFP não apresentam nenhuma alteração em seu fenótipo de patogenicidade para o hospedeiro (laranja doce). Mutantes de Xac expressando versões marcadas com GFP para as proteínas ParB e ZapA, ambas codificadas por Xac, foram utilizadas para a padronização dos estudos de localização subcelular. GFP-ZapA<sup>Xac</sup> apresentou um padrão de localização análogo ao de seu ortólogo presente em *Bacillus subtilis*: uma estrutura semelhante a uma barra, posicionada no meio do bacilo, onde o septo se desenvolve, orientado perpendicularmente com relação ao eixo longitudinal da célula. Este é o primeiro relato de um estudo de localização realizado em Xac. Ao contrário de GFP-ZapA<sup>Xac</sup>, ParB<sup>Xac</sup>-GFP não mostrou nenhum padrão de localização, apesar de a fusão ParB<sup>Xac</sup>-GFP ter sido detectada em experimentos de Western Blot. A possibilidade de que ParB não é uma proteína funcional em Xac é discutida aqui em detalhes. Finalmente, realizamos estudos de localização de proteínas em uma seleção de produtos hipotéticos de Xac, codificados pelas ORFs XAC1223, XAC315 e XAC1508, assim como XAC1991, que aparentemente codifica para uma histidina quinase envolvida na patogenicidade. Somente 1508-GFP apresentou focus de localização indicando uma possível compartimentalização dentro da célula. As demais fusões apresentaram somente fluorescência dispersa. Nossos resultados corroboram o uso desse sistema para a análise de localização protéica em Xac e constitui uma ferramenta valiosa para a expressão de proteínas e sua caracterização em *Xanthomonas*.

Palavras-chave: GFP, Xac, Localização subcelular, proteínas hipotéticas

## Abstract

Citrus canker is a disease caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), which affects citrus plants worldwide. The genome of Xac was completely sequenced, which unveiled an expressive amount of ORFs (~30%) coding for products of unknown function (hypothetical proteins). Based on the principle that many biochemical events happen at specific sites within the cells, protein localization studies have been extensively used to gather valuable information about function. In order to start subcellular localization studies of hypothetical proteins encoded by Xac using fluorescent microscopy, we constructed an integrative expression vector for GFP-tagging of proteins in this bacterium, pPM2a. The expression vector for Xac carries a xylose repressor/promoter cassette (*xylR/pxyl*), the *gfp* gene, a synthetic Ribosome Binding Site (RBS), and a fragment of the  $\alpha$ -amylase gene of Xac, to drive the integration of the whole expression system into the *amy* locus of the bacterial chromosome. We show here stable integration of the expression vector into the *amy* locus of Xac. Furthermore, Xac mutants expressing the polypeptide GFP do not exhibit any alteration in pathogenicity to the host plant sweet orange. Mutants of Xac expressing GFP-tagged versions of ParB and ZapA proteins, both encoded by Xac, were used to standardize the subcellular localization studies. GFP-ZapA<sup>Xac</sup> showed a localization pattern analogous to its ortholog encoded by *Bacillus subtilis*: a bar-like structure positioned in the middle of the rods, where the septum develops, oriented perpendicularly to the longitudinal axis of the cell. This is the first report of a protein localization study performed in Xac. Unlike GFP-ZapA<sup>Xac</sup>, ParB<sup>Xac</sup>-GFP did not display any detectable localization pattern, despite the fact that we were able to detect the production of the fusion ParB<sup>Xac</sup>-GFP in Western blot experiments. The possibility that ParB is not a functional protein in Xac is discussed in details. Finally, we performed protein localization studies to a selection of hypothetical factors of Xac, the products of ORFs XAC1223, XAC315 and XAC1508, as well as of XAC1991, which apparently encodes for a histidine kinase, all of them implicated with pathogenicity. Only 1508-GFP displayed a localization focus indicative of compartmentalized function within the cell. The remaining fusions produced only dispersed fluorescence equivalent to that observed for our negative control, a Xac mutant expressing the polypeptide GFP. Taken together these data corroborate the use of our GFP expression vector for protein localization analyses in Xac and constitute a valuable tool for protein expression and protein characterization in *Xanthomonas*.

Keywords: GFP, Xac, subcellular localization, hypothetical protein.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 - INTRODUÇÃO.....                                                                                                            | 8      |
| 1.1 - A citricultura e o cancro cítrico.....                                                                                   | 8      |
| 1.2 - O genoma de <i>Xanthomonas</i> .....                                                                                     | 9      |
| 1.3 - Caracterização de ORFs hipotéticas.....                                                                                  | 10     |
| 2 - JUSTIFICATIVA.....                                                                                                         | 14     |
| 3 – OBJETIVOS.....                                                                                                             | 14     |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                    | 15     |
| 4.1 - Linhagens bacterianas e cultivo.....                                                                                     | 15     |
| 4.2 - Plasmídeos e primers.....                                                                                                | 15     |
| 4.3 - Biologia Molecular.....                                                                                                  | 16     |
| 4.4 - Sequenciamento de DNA.....                                                                                               | 16     |
| 4.5 - Purificação dos DNAs.....                                                                                                | 16     |
| 4.6 - Eletrotransformação.....                                                                                                 | 17     |
| 4.7 - PCR de colônia.....                                                                                                      | 17     |
| 4.8 -PCRs para amplificação de ORFs e cassetes.....                                                                            | 17     |
| 4.9 - Expressão de proteínas.....                                                                                              | 18     |
| 4.10 - SDS-PAGE e Western Blotting.....                                                                                        | 18     |
| 4.11 - Microscopia de fluorescência.....                                                                                       | 18     |
| 4.12 – Teste de patogenicidade em linhagens mutantes de Xac.....                                                               | 19     |
| 4.13 – Curva de crescimento de Xac selvagem e mutantes.....                                                                    | 19     |
| 5 - O SISTEMA DE EXPRESSÃO DE GFP PARA XAC.....                                                                                | 20     |
| 5.1 - Introdução.....                                                                                                          | 21     |
| 5.2 - Resultados.....                                                                                                          | 21     |
| 5.2.1 - Integração do vetor de expressão pPM2a no genoma de Xac.....                                                           | 21     |
| 5.2.2 - Expressão de GFP a partir do vetor pPM2a em Xac.....                                                                   | 22     |
| 5.2.3 - Integração do vetor de expressão em <i>amy</i> não altera fenótipo de patogenicidade de Xac<br><i>amy::pPM2a</i> ..... | 22     |
| 5.3 - Conclusão.....                                                                                                           | 23     |
| 6 - PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXPRESSÃO.....                                                                                  | 24     |
| 6.1 - Introdução.....                                                                                                          | 25     |
| 6.2 - Resultados.....                                                                                                          | 25     |
| 6.2.1 - Marcação do septo de divisão celular em Xac.....                                                                       | 25     |
| 6.2.2 - ParB <sup>Xac</sup> -GFP pode não ser funcional em Xac.....                                                            | 26     |
| 6.3 - Discussão.....                                                                                                           | 27     |
| 7 - ATRIBUIÇÃO DE FUNÇÃO A PRODUTOS HIPOTÉTICOS.....                                                                           | 30     |
| 7.1 - Introdução.....                                                                                                          | 31     |
| 7.2 - Resultados.....                                                                                                          | 32     |
| 7.3 - Discussão.....                                                                                                           | 33     |
| 8 - O SISTEMA DE EXPRESSÃO TAP PARA XAC.....                                                                                   | 37     |
| 9 - CONCLUSÃO.....                                                                                                             | 71     |
| 10 - REFERÊNCIAS.....                                                                                                          | 72     |
| 11 - APÊNDICE 1: TABELAS.....                                                                                                  | 79     |
| 12 - APÊNDICE 2: FIGURAS.....                                                                                                  | 81     |

## 1 - Introdução

### 1.1 - A citricultura e o cancro cítrico

O Brasil é atualmente o maior produtor de laranjas do mundo. A previsão de produção para a safra 2007/08 é de 360 milhões de caixas, um volume 1,6% menor do que a safra anterior, mas ainda assim, cerca de 15% maior do que o previsto para os EUA (ECONOMIC RESEARCH SERVICE, 2008; INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2000). Este é um mercado que proporciona a entrada de mais de US\$ 1 bilhão/ano no Brasil, já que grande parte da produção destina-se à exportação. O maior destaque vai para produção de suco concentrado de laranja, já que a fruta *in natura* dificilmente atinge os parâmetros fitossanitários necessários para a entrada nos mercados estrangeiros. Esta dificuldade decorre do fato de que o Brasil ainda não é considerado um país livre de doenças importantes e potencialmente devastadoras, como o cancro cítrico (NEVES, 2001).

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac) e que ataca, em maior ou menor grau, todas as variedades e espécies de citros, representando um dos mais graves problemas para esta cultura ao redor do mundo. Introduzida no Brasil em 1957 na região de Presidente Prudente, esta bactéria é altamente contagiosa, podendo resistir no ambiente como epífita, sendo dispersa naturalmente pelo vento ou chuva e podendo penetrar na planta por qualquer tipo de abertura, inclusive pelos estômatos. Um dos fatores que pode favorecer a disseminação do cancro cítrico a partir de plantas doentes é a larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariida), cuja constatação deu-se em março de 1996, na região de Limeira (SP) e que rapidamente espalhou-se pelo país (CHAGAS, 1999).

Os sintomas do cancro cítrico constituem-se por lesões circulares, corticosas e salientes, de coloração marrom e aspecto eruptivo, ocorrendo em folhas, ramos e frutos (Figura 1). Nas folhas e frutos é comum o aparecimento de um halo amarelo circundando a área necrosada. Em estágios mais avançados, pode ocorrer perda de folhas, queda de frutos e ressecamento dos ramos (DAS, 2003; STALL, 1983).

Como medida de controle da doença faz-se a erradicação de plantas doentes e suspeitas de contaminação, já que não existe um controle químico eficaz que elimine completamente o agente etiológico da doença.

## 1.2 - O genoma de *Xanthomonas*

Devido à importância econômica do cancro cítrico, e num esforço para se acelerar o conhecimento da biologia do agente etiológico desta doença, *Xac* teve seu genoma completamente seqüenciado. A bactéria possui um cromossomo circular com aproximadamente 5.2 Mb e dois plasmídeos: pXAC33 e pXAC64 contendo 33.699 e 64.920 bases, respectivamente. Isto equivale a praticamente o dobro do genoma da primeira bactéria fitopatogênica a ser seqüenciada *Xylella fastidiosa* (Xf-CVC), um patógeno de citros aparentado à *Xanthomonas*, ambos pertencentes à subdivisão  $\gamma$  das proteobactérias. Ainda assim, cerca de 40% dos genes de *Xac* têm ortólogos em  $\alpha$ -proteobactérias cujos hospedeiros são plantas (como *Agrobacterium tumefaciens*), indicando que, talvez, esses genes tenham alguma atividade na interação microorganismo-hospedeiro (DA SILVA et al., 2002; SIMPSON et al., 2000)

A anotação do genoma de *Xac* revelou 4.313 ORFs das quais 2.710 são homólogas a proteínas já conhecidas. Muitas destas proteínas estariam relacionadas à patogenicidade, como os genes que codificam para enzimas extracelulares (celulases, pectinases e hemicelulases) as quais são liberadas pelo sistema de secreção do tipo II (em duplicata no genoma de *Xac*). Também foram encontrados genes que codificam para o sistema de secreção do tipo III (genes *hrp* que injetam as proteínas de avirulência no interior da célula hospedeira) e para o sistema secretório do tipo IV (relacionado a processos de conjugação), além de genes para produção e resistência a toxinas, síntese de exopolissacarídeos (EPS), proteínas de membrana e outras relacionadas a processos de adaptação a condições adversas, como choque térmico. Além deste arsenal para produção de doença, 1.601 ORFs anotadas permanecem sem função conhecida (proteínas hipotéticas) e, dentre elas, 1.272 (cerca de 30% do genoma) apresentam homologia a proteínas hipotéticas de outros organismos, sendo consideradas, portanto, proteínas hipotéticas conservadas.

A categoria de ORFs codificando para produtos desconhecidos em bactérias perfaz, sem sombra de dúvidas, uma das classes mais numerosas de ORFs, onde se espera encontrar uma vasta quantidade de informações referentes à adaptação e até mesmo à patogenicidade, em se tratando de microorganismos causadores de doenças. Existem atualmente mais de 1000 espécies bacterianas com seus genomas disponíveis em bancos de dados mundiais e o número de proteínas hipotéticas a serem caracterizadas é crescente (em torno de 30-40% dos

genomas). Bactérias possuem genomas compactos e apresentam normalmente redução/perda de regiões codificadoras seguindo-se adaptação a nichos restritos (OCHMAN; DAVALOS, 2006). Seria realmente admirável que bactérias pudessem dedicar praticamente metade de seus genomas a seqüências desnecessárias e seria igualmente interessante se toda diferença entre espécies e gêneros fosse concentrada em regiões conhecidas.

### 1.3 - Caracterização de ORFs hipotéticas

Estudos diversos têm sugerido que ORFs sem função atribuída possam ser expressas, respondendo a estímulos do meio externo. Experimentos de microarray demonstraram que ORFs hipotéticas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) são induzidas em resposta a um fator chamado “DSF” (“diffusible signal factor”) (HE et al, 2006). DSF coordena inúmeras atividades na bactéria, dentre elas, a produção de fatores de virulência (enzimas extracelulares e EPS) e a dispersão de biofilme em Xcc. Já foi relatada também a expressão de ORFs hipotéticas pelo patógeno de citros *Xylella fastidiosa* (Xf-CVC) comparando-se dois grupos desta bactéria: um recentemente isolado de planta (potencialmente patogênica) e outro que havia sido repicado em laboratório por 46 vezes (e que teria perdido ou atenuado sua patogenicidade) (DE SOUZA et al., 2003).

Devemos, entretanto, salientar que muitas das ORFs hipotéticas provavelmente não serão expressas sob certas circunstâncias e análises como as descritas acima (utilizando-se microarrays) poderiam contribuir com uma pré-seleção de alvos desconhecidos que são realmente utilizados pelo microorganismo e que mereceriam uma caracterização mais detalhada. Além do mais, análises de microarray podem auxiliar na inferência de função de produtos hipotéticos uma vez que indicam a co-expressão/repressão de genes e ORFs, e esta expressão em conjunto poderia sugerir funcionamento em vias metabólicas determinadas, como foi recentemente demonstrado por (GONÇALVES et al., 2006) em estudos de degradação de compostos aromáticos por *Rhodococcus* sp. RHA1.

Análises de co-expressão/repressão gênica como forma indicativa de associação entre proteínas tem sido também relatada em inúmeros estudos que utilizaram géis de proteínas de duas dimensões (géis 2D) (STELZER et al., 2006; JUNGBLUT et al., 2000; SHIN et al., 2007; WANG et al., 2005a). Entretanto, o conjunto de ORFs/produtos hipotéticos identificados por experimentos de microarray e géis 2D (poucas dezenas) representam uma parcela muito pequena das possibilidades realmente presentes nos genomas.

A dificuldade em se caracterizar ORFs/produtos hipotéticas, bem como a inviabilidade de se fazê-lo com o uso de métodos clássicos para estudos funcionais (como a disrupção gênica e bioquímica de proteínas), tem sido um problema comum da era pós-genômica. Métodos tradicionais não foram desenvolvidos para análises de centenas de milhares de alvos de uma só vez e, além do mais, são geralmente laboriosos e requerem fenótipos de fácil observação, os quais são desconhecidos para ORFs/proteínas hipotéticas.

As técnicas existentes para a atribuição de função para produtos hipotéticos e em larga escala baseiam-se, sem exceção, no estudo de relações e/ou interações diretas entre proteínas. A interação entre uma proteína hipotética e proteínas conhecidas é utilizada como informação para se identificar e estudar a função da primeira. Dentre estas metodologias, podemos citar variações diversas de cromatografia de afinidade, sendo o TAP-tag uma das mais promissoras para análises em larga escala (RIGAUT et al., 1999; PUIG et al., 2001). O TAP-tagging consiste em expressar a proteína de interesse dentro da célula que normalmente a produz, embora em fusão com um polipeptídeo TAP em suas porções N- ou C-terminal (Figura 2A). Dentro da célula, esta proteína poderá interagir com fatores celulares de maneira similar à de uma proteína nativa, formando complexos protéicos que podem ser separados por cromatografia de afinidade utilizando-se a cauda TAP (Figura 2B). Na seqüência, fatores interagindo com a proteína de fusão podem ser identificados por espectrometria de massas fornecendo, em muitos casos, indícios de função.

O que difere o TAP-tag de uma cromatografia de afinidade padrão são as características do peptídeo TAP que a proteína expressa carrega. A cauda TAP é composta por dois domínios distintos os quais estão separados por um sítio de clivagem para a protease TEV (Figura 2A): 1) Proteína A de *Staphylococcus aureus* (ProtA), que se liga a IgGs, e 2) um peptídeo de ligação a calmodulina. No primeiro passo de purificação, os complexos protéicos formados no interior das células são resgatados, mesmo que em concentrações muito pequenas, graças à altíssima afinidade entre ProtA e IgGs ligadas à primeira matriz cromatográfica. No segundo passo, após a eluição dos complexos da primeira resina por clivagem com TEV, os contaminantes são removidos por lavagens em matriz contendo calmodulina imobilizada.

A técnica de Tap-tagging foi adaptada com sucesso para diversos organismos (BURCKSTUMMER et al., 2006; BUTLAND et al., 2005; DAWSON et al., 2008; GULLY et al., 2003; KAMIL; COEN, 2007; MAYER et al., 2005; MEIMA et al., 2007; NAKAGAWA et al., 2007; ROHILA et al., 2004; VAN LEENE et al., 2008; ZHOU et al., 2004), e em bactérias, foi utilizado pela primeira vez para a purificação de complexos envolvendo a

proteína carreadora acyl (ACP) de *E. coli* (GULLY et al., 2003). Posteriormente, o método de TAP-tag foi aplicado em um amplo estudo, cobrindo praticamente 25% do genoma desta bactéria (BUTLAND et al., 2005). Neste trabalho, os autores produziram marcações C-terminais de ~1000 ORFs, o que resultou na identificação de mais de 500 complexos protéicos e possibilitou a construção de uma rede de interações de proteínas, revelando a potencial função de diversos produtos antes desconhecidos.

Outra técnica de grande sucesso para a obtenção e caracterização de complexos protéicos é o duplo-híbrido em leveduras, e mais recentemente em bactérias (FIELDS; SONG, 1989; KARIMOVA et al., 1998). O primeiro relato de seu uso em procariotos foi na construção de mapas de interações protéicas em *Helicobacter pylori* (RAIN et al., 2001). Posteriormente, um banco genômico de Xac foi construído em sistema de duplo-híbrido para leveduras e explorado na caracterização de fatores envolvidos nos sistemas de secreção dos tipos III e IV desta bactéria (ALEGRIA et al., 2005; ALEGRIA et al., 2004). Dos pontos negativos deste método, podemos citar a necessidade de construção de bancos genômicos, expressão heteróloga das proteínas em análise (que nem sempre irão produzir interações reais em ambientes não-nativos), geração de grande quantidade de resultados falso-positivos, além de diversas outras limitações inerentes à técnica (FIELDS, 2005).

Outra metodologia candidata a ensaios de triagem de interações protéicas em larga escala é a localização subcelular de proteínas em fusão com GFP (Green Fluorescent Protein). Esta técnica que possibilita o estudo *in vivo* da atividade de diversas proteínas, tem sido utilizada em estudos funcionais de organismos procarióticos e eucarióticos. Como grande vantagem, esta técnica permite a expressão da proteína em estudo no seu ambiente natural e a possibilidade de sua observação em atividade e em tempo real. Tal observação ocorre sem a necessidade de fixação celular, a qual pode alterar a localização de um fator, ou mesmo destruir estruturas que poderiam fornecer valiosas informações quanto à atividade e possíveis interações de uma proteína. O uso da localização subcelular de proteínas tem possibilitado desvendar diversos aspectos do funcionamento e estrutura das células de microorganismos. Como exemplos, podem ser citados os estudos da forma e organização do citoesqueleto bacteriano (ainda pouco conhecido em procariotos), os mecanismos de deposição de precursores da parede celular em crescimento, o acompanhamento dos processos de segregação cromossômica e divisão celular em procariotos (MARSTON; ERRINGTON, 1999; LAU et al., 2003; LEWIS, 2004; AUTRET et al., 2001; WANG et al., 2005b; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

A observação da dinâmica e localização de proteínas no interior das células permite a inferência de funções, já que diversos processos celulares ocorrem em locais bem estabelecidos. Um exemplo recente do emprego desta técnica foi realizado em larga escala com proteínas de *Bacillus subtilis* em um levantamento de interações protéicas envolvidas na replicação e segregação cromossômica nesta bactéria (MEILE et al., 2006). Das limitações ao emprego desta técnica podemos citar: 1) a necessidade de que haja manipulação genética estabelecida para o organismo em estudo, 2) a existência de um sistema que permita a expressão de proteínas em fusão a GFP *in vivo* para tal organismo, e 3) o tamanho do microrganismo a ser observado [lembrando que *E. coli*, tal como Xac, possuem em torno de um micrômetro de comprimento, o que equivale dizer que elas possuem praticamente o tamanho de um comprimento de onda de luz visível; ainda assim, *E. coli* é hoje um modelo para estudo de dinâmica de segregação cromossômica em bactérias, mesmo sendo cinco vezes menor que um dos microrganismos mais bem caracterizados por tal método, *B. subtilis* (WANG et al., 2005b; LAU et al., 2003)].

## **2 - Justificativa**

Dentre os métodos classicamente utilizados para a investigação de função de produtos desconhecidos pode-se citar a disrupção gênica com conseqüente análise de alterações fenotípicas de mutantes das células alvo de interesse. Entretanto, tal estratégia além de laboriosa, limita a gama de análise aos fenótipos que podem ser realmente investigados em laboratório. Considerando-se esta problemática, métodos de análise proteômica, como duplo-híbrido em leveduras, e mais recentemente em bactérias, têm sido explorados, os quais permitem a atribuição de função para produtos desconhecidos pela detecção de interação destes com outras moléculas conhecidas. Uma restrição ao uso de duplo-híbrido seria a necessidade de construção de bancos genômicos em vetores específicos para a técnica (leveduras ou bactérias) e o uso de sistemas que podem gerar grande quantidade de resultados imprecisos, os quais são indesejáveis e inerentes ao procedimento. O presente trabalho pretendeu desenvolver e adaptar um métodos de biologia molecular para a caracterização de produtos desconhecidos (proteínas hipotéticas) de Xac em larga escala, utilizando-se para isso a localização sub-celular de proteínas marcadas com GFP por microscopia de fluorescência.

## **3 - Objetivos**

Adaptar e padronizar o uso da microscopia de fluorescência para a localização sub-celular de proteínas fluorescentes (fundidas a GFP) em Xac; posteriormente, pretendemos utilizar esta técnica para a determinação de função de proteínas de interesse em larga escala.

## 4 - Material e Métodos

### 4.1 - Linhagens Bacterianas e Cultivo.

A linhagem Xac 306 (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri) utilizada no presente estudo foi a seqüenciada por (DA SILVA et al, 2002). Xac foi cultivada a 30° C em meio NYG com ou sem ágar (DANIELS et al., 1984). *E. coli* DH10B (*F<sup>-</sup> mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZAM15  $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 ara $\Delta$ 139  $\Delta$  (ara, leu)7697 galU galK  $\lambda$ - rpsL (Str<sup>R</sup>) nupG*) foi utilizada para as clonagens e cultivada em meio LB com ou sem ágar (SAMBROOK et al., 1989) a 37° C. Os antibióticos foram utilizados, quando necessário, conforme a Tabela I.

| Antibiótico   | Concentração (µg/ml) |
|---------------|----------------------|
| Ampicilina    | 20                   |
| Kanamicina    | 20                   |
| Cloranfenicol | 34                   |

**Tabela I:** Antibióticos e suas concentrações de uso

### 4.2 - Plasmídeos e primers.

Todos os plasmídeos utilizados estão listados na Tabela II e os primers na Tabela III.

Para a construção do sistema de expressão, inicialmente foi produzido um espaçador a partir do anelamento de dois oligonucleotídeos sintéticos:

RBS top

5'- AGC TTG GGA AAA GGA GGT GAG GAT CCA TGG ACA CAC TAG TTC TAG  
AAT GAC CCG GGA

RBS bottom

5'- AGC TTC CCG GGT CAT TCT AGA ACT AGT GTG TCC ATG GAT CCT CAC CTC  
CTT TTC CCA

Ambos foram dissolvidos em Tris-HCl 10mM para concentrações finais de 1,7µg/µL cada e, posteriormente, quantidades equimolares foram misturadas e aquecidas a 70°C em banho seco durante 1 hora. Após este período, o banho foi desligado e a mistura resfriou lentamente no bloco, para o anelamento das duas fitas por complementaridade de bases. O dsDNA resultante deste procedimento contém um RBS baseado em sequencia consenso de *Bacillus subtilis* e apresenta extremidades coesivas *Hind*III. Este fragmento foi ligado a

pUC18/HindIII (figura 3A) originando pTAS1, o qual após digestão parcial com *HindIII* e total com *EcoRI* foi ligado ao cassete *xy/R-pxyl/HindIII/EcoRI* extraído de pEA18 (Figura 3B), resultando em pTAS3. Na sequência, pTAS3/*XbaI/BamHI* foi ligado a *gfp/XbaI/BamHI*, resultando no vetor pTAS3-*gfp*, (sendo *gfp* proveniente de reação de PCR a partir vetor pEA18 com os primers GFP-F/GFP-R). Na etapa seguinte, uma reação de PCR isolou o cassete de expressão de pTAS3-*gfp* utilizando os primers M13F/R (NEB) e outra reação, a partir do par de primers M13F<sub>to vector</sub>/M13R<sub>to vector</sub>, amplificou o vetor comercial pCR2.1-TOPO, eliminando seu MCS (figura 4A). Ambos esses produtos de PCR possuem sequências de sobreposição nas suas extremidades e ao serem misturados em quantidade equimolar em uma segunda reação de PCR (sem primers) estas regiões foram aneladas e estendidas em dois ciclos de 94°C/1min, 50°C/1min e 70°C/15min (figura 4B e C) gerando o vetor final pPM2. Ao vetor pPM2 linearizado com *EcoRI* foi ligado o fragmento *amy* tratado com esta mesma enzima (sendo *amy* um trecho de DNA compreendido entre as bases 106 e 914 do gene de  $\alpha$ -amilase e obtido por PCR a partir dos primers amy5F/amy5R). O resultado desta reação foi o vetor de expressão, pPM2a (figura 4D), que da mesma maneira que pPM2 pode ser utilizado para inserir ORFs nos sítios de *BamHI* ou *XbaI/NotI*, resultando na expressão de proteínas em fusão a GFP N-terminal ou C-terminal, respectivamente (figura 5).

### 4.3 - Biologia Molecular.

Técnicas básicas de biologia molecular de DNA e proteínas seguiram (SAMBROOK et al., 1989). Extração de DNA total de Xac e *E. coli* seguiram (FERREIRA et al, 1995). As digestões, reações de ligação de DNA e os passos de clonagem nos quais foram utilizados os vetores comerciais pJET1.2 e pCR2.1-TOPO seguiram as instruções de cada fabricante.

### 4.4 - Sequenciamento de DNA.

O sequenciamento das ORFs foi realizado pela *MacroGen Corporation* ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### 4.5 - Purificação dos DNAs.

As reações de PCR e bandas isoladas de gel foram purificadas pelo kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

#### 4.6 - Eletrotransformação.

Para a eletrotransformação de *Xac*, seguiu-se (FERREIRA et al., 1995; AMARAL et al., 2004) com modificações. As células foram crescidas em meio NYG até DO ~0,4, centrifugadas a 4000xg por 10 min e lavadas por duas vezes em água destilada autoclavada. Pellets celulares foram subsequentemente dissolvidos em água autoclavada e mantidos em banho de gelo. Eletrotransformações foram realizadas adicionando-se 300ng de DNA plasmidial a 100µl de suspensão de células, que foram submetidas a descargas elétricas de 2,4kV por aproximadamente 5ms, utilizando-se cubetas (BioRad) com espaçamento de 0,2cm entre eletrodos. Seguindo-se eletroporações, células foram resgatadas mediante adição de 900µl de meio NYG às cubetas e transferidas para tubos de polipropileno (50ml) e mantidas sob agitação (150rpm) a 28°C por 2h. A seleção de mutantes foi conduzida semeando-se todo o volume das eletrotransformações (1ml) em meio NYG-kanamicina.

#### 4.7 - PCR de colônia.

Com o auxílio de palitos de dentes autoclavados, 2 a 3 colônias isoladas da linhagem teste foram dissolvidas em uma solução contendo: tampão da Taq para 1X final (Taq DNA polimerase, Fermentas), 100µM cada dNTP, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1U Taq, 0,5µM cada primer e água para 20µl finais. O ciclo de PCR utilizado foi: 94°C/3min, seguido por 30 ciclos de 94°C/30'', 50°C/30'' e 70°C/1min.

#### 4.8 - PCRs para amplificação de ORFs e cassetes para clonagem.

Cinco nanogramas de DNA genômico de *Xac* (linhagem 306), tampão da enzima *Pfu* DNA polimerase para 1X final (Fermentas, já contendo 2mM de MgCl<sub>2</sub>), 100µM de cada dNTP, 1U *Pfu*, 1µM de cada primer e água para 20µl finais. PCR "touch down": desnaturação inicial a 94°C/3min, seguido de 15 ciclos de 94°C/30'', A°C/30'' e 70°C/2min por cada 1000bp de DNA a ser amplificado (A= 65°C até 51°C; a temperatura de anelamento inicial foi de 65°C com diminuição de um grau a cada ciclo num total de 15 ciclos). Finalmente, realizou-se mais 30 ciclos de 94°C/30'', 50°C/30'' e 70°C/2min por cada 1000bp de DNA a ser amplificado para multiplicação das bandas inicialmente isoladas no touch down. A amplificação de *parB*<sup>*Xac*</sup> requer a adição de formamida desionizada na concentração de 5% final.

#### 4.9 - Expressão de proteínas.

Os testes de expressão realizados em *E. coli* DH10B transformadas com plasmídeos de interesse iniciaram-se com o cultivo das linhagens em 3ml de meio LB contendo antibióticos apropriados. Após 16 horas de crescimento a 30°C e 180rpm, as culturas bacterianas foram re-inoculadas, na proporção 1:100, em frascos erlenmeyer contendo 20ml LB e crescidas a 37°C com agitação de 180rpm até D.O.<sub>600nm</sub>~0,5. Neste ponto, o indutor xilose foi adicionado para a concentração final de 0,5% e as culturas foram incubadas por mais 4h a 30°C e 180rpm para expressão de proteínas. Ao final da indução, células foram resgatadas através de centrifugação a 9000xg por 1min e a massa celular foi congelada a -80°C para processamento posterior. Para testes de expressão de proteínas em Xac, as células foram inicialmente cultivadas em erlenmeyers contendo 10ml de meio NYG, a 28°C e 200rpm. Após 16 horas de crescimento, as culturas foram re-inoculadas na proporção 1:10 em frascos erlenmeyer contendo 20ml NYG e novamente submetidas a crescimento nas mesmas condições citadas acima. Ao atingirem a D.O.<sub>600nm</sub>~0,5 adicionou-se o indutor xilose (0,5% final) para as culturas contendo vetores de expressão integrados em *amy*. Após mais 4 horas de crescimento, as células foram coletadas da mesma maneira que *E. coli* DH10B, mas antes que o pellet fosse processado, o mesmo foi lavado em água destilada autoclavada para remoção de goma.

#### 4.10 - SDS-PAGE e Western Blotting

Extrato de proteínas totais foi preparado dissolvendo-se 20mg de massa celular em 90µl de tampão de amostra contendo SDS; amostras foram fervidas a 100°C por 5min e centrifugadas para remoção de restos celulares (SAMBROOK et al, 1989). SDS-PAGE, coloração com coomassie e transferência de proteínas para membrana de PVDF seguiram Sambrook et al (1989). Para detecção do GFP na membrana de PVDF (GE), utilizou-se anticorpo primário policlonal anti-GFP gentilmente cedido por Dr. Frederico Gueiros-Filhos (Depto. de Bioquímica, IQ, USP, SP). Utilizou-se como anticorpo secundário anti-IgG de coelho (acoplado a HRP) do kit “Amersham ECL Western Blotting System” (GE). Reação de quimioluminescência foi realizada segundo recomendações contidas no kit. O filme utilizado para revelação do Western foi Hyperfilm (GE).

#### 4.11 - Microscopia de Fluorescência

As linhagens foram cultivadas a 30°C e observadas em D.O ~ 0,4 após imobilização em lâminas contendo agarose 1% em PBS 1X. Preparação das lâminas: cerca de 1000µl da

solução de agarose foi dispensada em lâminas de microscopia óptica e sobre as quais foi colocada outra lâmina para que o gel de agarose formasse um filme fino e de altura homogênea. As lâminas foram secas na bancada, à temperatura ambiente, por aproximadamente 40min e abertas somente no momento do uso, quando 10µl da suspensão de células foram depositadas no centro destas e cobertos com lamínula. Células foram visualizadas utilizando-se o microscópio óptico BX-61-III (Olympus), equipado com cubo para fluorescência GFP, excitação BP460-480 e filtro barreira BA495-540 (Centro de Citricultura APTA, Cordeirópolis-SP). Imagens foram capturadas por câmera de vídeo digital refrigerada de alta resolução (Olympus DP-71) através do software Image Pro MC Versão 6.0.

#### **4.12 - Teste de patogenicidade de linhagens mutantes de Xac**

No teste de patogenicidade, realizado pelo Dr. Alexandre do Amaral (Centro de Citricultura APTA, Cordeirópolis-SP) utilizou-se como hospedeiro a laranja doce *Citrus sinensis* cv. Bahia. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 28°C com fotoperíodo de 12h. As células a serem testadas foram cultivadas até que atingissem O.D.<sub>600nm</sub> ~0,6, seguindo-se infiltração de ~100 µl de suspensão de células em regiões entre nervuras das folhas nas superfícies abaxiais, com a utilização de seringas hipodérmicas (1ml) contendo agulhas. Sintomas de lesão foram identificados por alterações nos locais de inóculo em comparação com sintomas causados pela linhagem selvagem (controle positivo). Observações foram realizadas por três semanas.

#### **4.13 – Curva de crescimento de Xac selvagem e mutantes**

Para avaliação do padrão de crescimento das linhagens de Xac, 2 a 3 colônias foram inoculadas em erlenmeyers contendo 10ml de meio NYG e mantidas a 30°C, e 200rpm por 16 horas. Após este período, as culturas foram re-inoculadas (diluição 1:10) em erlenmeyers contendo 30ml de meio NYG e mantidas sob as mesmas condições de crescimento mencionadas acima. Ao longo das 12 horas seguintes alíquotas das culturas foram retiradas periodicamente para leitura de D.O.<sub>600nm</sub> e contagem de UFC (realizada dois dias após a semeadura de diluições seriadas em meio NYG-agar)

## **O sistema de expressão de GFP para Xac**

## 5.1 - Introdução

O sistema de expressão de proteínas em fusão a GFP para Xac é composto por um cassete contendo um repressor e promotor de xilose (*xylR*, *pxyl*, respectivamente), seguido pelo gene *gfp*, que codifica para a proteína fluorescente verde (“green fluorescent protein”-GFP). Tais fragmentos encontram-se separados por um dsDNA sintético que contém um RBS baseado em sequências consenso encontradas em *B. subtilis* e *E. coli* (ROCHA et al., 1999). Ao vetor de expressão básico, pPM2, adicionou-se a 5’ do promotor de xilose um fragmento do gene para  $\alpha$ -amilase (“*amy*”) de Xac, dando origem a pPM2a. Ambos pPM2 e pPM2a são vetores integrativos que podem ser utilizados para a expressão de proteínas contendo GFP em suas porções C- ou N-terminais (veja os mapas na figura 5). O vetor pPM2a tem como diferencial a alternativa de integração do sistema de expressão no locus *amy* da bactéria, ocasionando disrupção do gene de  $\alpha$ -amilase. Tal alteração possibilita a fácil detecção de mutantes de Xac carregando o sistema de expressão integrado ao genoma, mediante perda da capacidade de degradação de amido. Além disto, integrações no locus *amy* favorecem o estudo de ORFs que não acomodariam perturbações por inserção do vetor de expressão em seu locus.

## 5.2 – Resultados

### 5.2.1 – Integração do vetor de expressão pPM2a no genoma de Xac

A estratégia adotada para a expressão de proteínas em Xac baseou-se na manutenção do sistema de expressão em cópia única, integrado ao genoma da bactéria. Tal procedimento visa um controle mais fino da expressão de proteínas, a partir da indução do promotor *pxyl*. Para aferirmos a eficiência de integração e manutenção de pPM2a no genoma de Xac, foram realizados testes de degradação de amido com mutantes desta bactéria resistentes a kanamicina, os quais foram obtidos após a transformação deste vetor em Xac. Conforme demonstrado na figura 6A, todos os mutantes selecionados foram incapazes de degradar amido com a mesma eficiência observada para a linhagem selvagem (compare o halo de degradação formado ao redor de Xac selvagem com aqueles dos mutantes). Tal resultado comprova a integração do vetor no locus *amy* de Xac (Figura 6B). Estas linhagens, mesmo após dez repiques sucessivos, não apresentaram sinais de perda do vetor (continuaram a

crescer em meio seletivo), tampouco recuperaram a capacidade de degradar amido, o que demonstra a estabilidade da integração no locus de inserção (*amy*).

### 5.2.2 - Expressão de GFP a partir do vetor pPM2a em Xac

Comprovada a integração estável do vetor pPM2a no cromossomo de Xac, realizamos testes de expressão a partir do promotor *pxyl* com o intuito de aferir se os mutantes Xac *amy::pPM2a* eram capazes de produzir GFP. A detecção da produção deste polipeptídeo foi avaliada por experimentos de Western Blot. Observamos o aparecimento de sinal com tamanho compatível a GFP (27kDa) nas preparações de *E. coli* DH10B/pPM2a (Figura 7; canaletas 1 e 2) e da linhagem mutante Xac *amy::pPM2a* (canaletas 4 e 5). Nenhum sinal equivalente foi detectado para o controle Xac selvagem (canaleta 3). Repare na responsividade do promotor *pxyl* à presença do seu indutor, aumentando a taxa de expressão após a adição de xilose ao meio de cultura (canaleta 2). A produção de menor quantidade de GFP pela linhagem Xac *amy::pPM2a*, quando comparada a *E. coli* DH10B, deve-se à presença do vetor em cópia única no cromossomo da linhagem mutante e em multicópia na linhagem de *E. coli*. Note também, que há produção de GFP para as células cultivadas sem a adição do indutor xilose (canaletas 1 e 4), o que provavelmente reflete um vazamento do promotor *pxyl*.

### 5.2.3 – A integração do vetor de expressão em *amy* não altera fenótipo de patogenicidade de Xac *amy::pPM2a*

Para que o sistema de expressão GFP para Xac possa ser utilizado na caracterização de produtos protéicos potencialmente envolvidos com patogenicidade, era de nosso interesse averiguar se a disrupção do locus *amy* e a presença do vetor de expressão em Xac alterariam por si o fenótipo de patogenicidade da bactéria em planta. Para tal, avaliamos a capacidade de mutantes de Xac *amy::pPM2a* em produzir sintomas de doença em plantas de citros. Nenhum dos mutantes avaliados mostrou diminuição na habilidade de colonizar e produzir sintomas de doença no hospedeiro quando comparado ao fenótipo selvagem (dados não mostrados).

A seguir, comparamos as taxas de crescimento de Xac selvagem e de um mutante representativo através de cultivo em meio líquido por 12h. Neste teste, realizamos um acompanhamento do crescimento a partir de inóculo inicial com  $DO_{600nm} \sim 0,1$  e contagem de unidades formadoras de colônias a cada 2h (dados não mostrados). Os resultados mostraram

que o mutante Xac *amy::pPM2a* apresenta as mesmas taxas de crescimento observadas para Xac selvagem, atestando que tanto a presença do vetor e quanto a disrupção do gene de  $\alpha$ -amilase não alteram de forma detectável a viabilidade desta bactéria.

### 5.3 - Conclusão

pPM2 e pPM2a são vetores de expressão integrativos destinados à expressão de proteínas em fusão com GFP em Xac. Exemplos do uso destes vetores para a localização subcelular de proteínas *in situ* serão apresentados no próximo capítulo. A funcionalidade do sistema de expressão foi comprovada em experimentos para imuno-deteção de GFP a partir de Xac. Verificou-se, ainda, que a integração neste locus ocorreu de forma estável sem que alterações nos padrões de crescimento e patogenicidade da bactéria tenham sido detectados.

## **Padronização do sistema de expressão**

## 6.1 – Introdução

Para que pudéssemos padronizar o sistema de expressão GFP em *Xac*, foram selecionadas ORFs apresentando homologia a genes já caracterizados por microscopia de fluorescência em outros microrganismos. As ORFs escolhidas foram XAC3906 (anotada como *parB*) e XAC3408 que, apesar de estar anotada como hipotética, apresenta homologia a *zapA* de *Bacillus subtilis* [*ZapA*<sup>Bsu</sup>; (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002)] (figura 8). Daqui por diante estas ORFs serão referidas como: *parB*<sup>Xac</sup> e *zapA*<sup>Xac</sup>.

ZapA é uma proteína comum a várias espécies de bactérias e que está relacionada à formação do septo durante o processo de divisão celular. Embora não seja essencial a este processo, ZapA tem a função de promover a ligação entre protofilamentos de FtsZ em estruturas de alta ordem, sendo que GFP-ZapA<sup>Bsu</sup> apresenta padrão de localização subcelular já definido (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

As proteínas do tipo ParB, estão relacionadas à segregação plasmidial e cromossômica durante a divisão celular bacteriana (BIGNELL; THOMAS, 2001). Inicialmente caracterizadas pelos seus papéis na manutenção estável de plasmídeos em bactérias, as proteínas da superfamília ParB parecem organizar regiões centroméricas em cromossomos bacterianos (como Spo0J em *B. subtilis*), as quais acredita-se estarem envolvidas em processos de partição de material genético, de modo análogo ao que ocorre nas células eucarióticas durante os eventos de mitose e meiose (LIN; GROSSMAN, 1998; MARSTON; ERRINGTON, 1999; MURRAY; ERRINGTON, 2008).

## 6.2- Resultados

### 6.2.1 – Marcação do septo de divisão celular em *Xac*

Para a padronização dos experimentos de localização subcelular de proteínas, produzimos um mutante de *Xac* (*Xac amy::pPM2a-zapA*<sup>Xac</sup>; figura 9) capaz de expressar a fusão GFP-ZapA<sup>Xac</sup>. A produção desta fusão foi averiguada em experimentos de Western Blot. Note a presença de banda de 38kDa consistente com o tamanho esperado para a fusão GFP-ZapA<sup>Xac</sup> (seta) produzida pela linhagem mutante (Figura 10; canaletas 1 e 2). Observe também que nenhuma banda de tamanho equivalente foi observada para o controle negativo,

Xac selvagem (canaleta 3). Estes dados comprovam a produção de GFP-ZapA<sup>Xac</sup> a partir do mutante Xac *amy::pPM2a-zapA*<sup>Xac</sup>.

Na seqüência, o mutante Xac *amy::pPM2a-zapA*<sup>Xac</sup> foi cultivado em meio NYG para visualização ao microscópio de fluorescência (Figura 11). As colunas I, II e III representam, respectivamente, a imagem das células em campo claro, através de filtro para GFP e uma sobreposição de I e II (destacando o contorno celular). O padrão de localização observado neste mutante foi semelhante ao de uma barra posicionada na região mediana da célula, em orientação perpendicular ao seu eixo longitudinal (Figura 11A). Tal padrão é semelhante ao observado para a proteína GFP-ZapA<sup>Bsu</sup>, que co-localiza com o septo de divisão celular em *B. subtilis* (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

Tendo em vista a natureza dinâmica dos componentes protéicos que participam da formação do septo bacteriano (LUTKENHAUS, 2007), seria esperado que a inibição da síntese protéica pudesse perturbar a localização de GFP-ZapA<sup>Xac</sup>. Para averiguarmos tal possibilidade, adicionou-se o inibidor de síntese protéica cloranfenicol (34µg/ml) ao meio de cultivo das células para posterior observação. As células foram mantidas nas mesmas condições de cultivo (30°C e 200rpm) por 40 minutos adicionais antes de serem novamente observadas ao microscópio. Note na figura 11B o desaparecimento do septo em todas as células, demonstrando que o processo no qual ZapA<sup>Xac</sup> atua, em analogia ao já descrito para ZapA<sup>Bsu</sup> (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002), não deva ser estático. Além disto, a perda da localização de GFP-ZapA<sup>Xac</sup> na presença do antibiótico indica que o padrão de localização observado anteriormente não constitui um artefato de técnica.

Em suma, o padrão de localização observado para GFP-ZapA<sup>Xac</sup> indica seu envolvimento com a formação do septo e confirma sua homologia funcional a ZapA<sup>Bsu</sup>.

### 6.2.2 – ParB<sup>Xac</sup>-GFP pode não ser funcional em Xac

Prosseguindo com os testes de localização, produzimos um segundo mutante de Xac (Xac *parB*<sup>Xac</sup>::pPM2-*parB*<sup>Xac</sup>) para a expressão de ParB<sup>Xac</sup>-GFP, agora obtido pela integração do vetor de expressão diretamente no locus da ORF em estudo. A produção da fusão ParB<sup>Xac</sup>-GFP pelo mutante foi averiguada por Western Blot. Observe a presença de banda de aproximadamente 61kDa, o tamanho esperado para ParB<sup>Xac</sup>-GFP, em todos os quatro mutantes independentes avaliados (Figura 12; canaletas 4, 5, 6 e 7). Esta banda foi igualmente detectada para a linhagem de *E. coli* portando o vetor de expressão pPM2-*parB*<sup>Xac</sup> (controle positivo). Nenhum sinal equivalente foi observado para o controle negativo Xac selvagem

(canaleta 3). Devemos ressaltar que a indução de ParB<sup>Xac</sup>-GFP com xilose não foi testada nesses mutantes, pois os mesmos resultam de eventos de integração do vetor no locus *parB*<sup>Xac</sup>, onde *parB*<sup>Xac</sup>-*gfp* está sob controle do promotor nativo de *parB*<sup>Xac</sup> (Figura 13). Estes resultados apontam para uma correta integração do vetor em Xac no locus *parB*<sup>Xac</sup> e também para a produção da fusão de interesse nesta bactéria.

Confirmada a expressão de ParB<sup>Xac</sup>-GFP em Xac, procedeu-se à visualização dos mutantes ao microscópio de fluorescência. Xac *parB*<sup>Xac</sup>::pPM2-*parB*<sup>Xac</sup> foi cultivado em meio LB a 30°C 180rpm durante 12h, onde alíquotas de 10µl foram retiradas a cada 2h para visualização (Figura 14A). Nesta imagem é possível notar a existência de prováveis foci de localização protéica nas extremidades das células. Entretanto, em nenhum momento das observações eles assumem o posicionamento característico observado no modelo Spo0J-GFP de *B. subtilis*, uma proteína do tipo ParB [Figura 14B; (GLASER et al., 1997)]. Observe os pontos verdes correspondentes aos foci de Spo0J-GFP, os quais se posicionam a ¼ e ¾ dos bastonetes, podendo, inclusive, sofrer duplicação com o decorrer do crescimento celular (setas). Os dados de localização de ParB<sup>Xac</sup>-GFP em Xac obtidos neste estudo não são, portanto, conclusivos.

### 6.3 – Discussão

O sistema de expressão desenvolvido no presente trabalho foi utilizado com sucesso para a clonagem e expressão de proteínas de Xac nesta bactéria. Tal sistema constitui uma valiosa ferramenta para estudos funcionais de proteínas neste fitopatógeno não só por demonstrar ser possível a expressão nativa de proteínas em Xac, a partir de um promotor induzível, mas principalmente por comprovar que é possível realizar neste microrganismo experimentos de localização subcelular de proteínas em fusão com GFP.

Para que pudéssemos padronizar o uso do nosso sistema de expressão para GFP, marcamos o produto da ORF hipotética XAC3408, que em Xac acreditamos codificar para um homólogo da proteína ZapA<sup>Bsu</sup> (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Conforme demonstrado neste trabalho, GFP-ZapA<sup>Xac</sup> apresentou perfil de localização idêntico àquele observado para GFP-ZapA<sup>Bsu</sup>, resultados estes que confirmam ser o produto da ORF XAC3804 uma proteína funcional do tipo ZapA. ZapA<sup>Xac</sup>, assim como ZapA<sup>Bsu</sup>, apresenta um domínio conservado considerado característico de uma superfamília de proteínas, cuja função é promover a montagem e empacotamento de protofilamentos de FtsZ durante a formação do

septo divisional (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). A polimerização da proteína FtsZ no momento e local adequados depende de fatores que regulam positiva e negativamente sua associação, e dentre as proteínas capazes de controlar tal processo, podemos citar MinC (inibe a polimerização de FtsZ) e ZapA (promove a associação de FtsZ) (DE BOER et al., 1989; SCHEFFERS, 2008).

O desaparecimento da estrutura tipo septo formada por GFP-ZapA<sup>Xac</sup> em nossos mutantes *Xac amy::pPM2a-zapA<sup>Xac</sup>* após o tratamento destes com cloranfenicol demonstrou que tal perfil não era devido a artefatos de técnica. A formação do septo é um evento dinâmico e dependente da atuação sequencial de várias proteínas, as quais são requisitadas na região mediana da célula, tão logo proteínas de localização prematura (e que formam o arcabouço septal como FtsZ), estejam posicionadas (LUTKENHAUS, 2007; GOEHRING; BECKWITH, 2005). Sendo a localização de ZapA dependente da presença de FtsZ (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002), com a parada da síntese protéica, ZapA<sup>Xac</sup> pode ter ficado sem seu alvo de atuação, permanecendo dispersa no citoplasma. Existe também a possibilidade de que ZapA<sup>Xac</sup> possa ser uma proteína de rápida metabolização, onde a interrupção da atividade dos ribossomos na célula poderia ter ocasionado seu desaparecimento. A primeira opção nos parece mais adequada, pois apesar do desaparecimento da estrutura de septo, ainda foi possível observar a presença de fluorescência difusa pelo citoplasma após tratamento com cloranfenicol.

Com relação aos experimentos realizados com os mutantes *Xac parB<sup>Xac</sup>::pPM2-parB<sup>Xac</sup>*, que expressam a fusão ParB<sup>Xac</sup>-GFP, não observamos um padrão de localização característico do grupo protéico ParB (GLASER et al., 1997). Proteínas do tipo ParB, codificadas por cromossomos bacterianos (BIGNELL; THOMAS, 2001), são fatores que reconhecem e se ligam especificamente ao DNA na região que compreende a origem de replicação do cromossomo, formando estruturas centroméricas que podem atuar na segregação de replicons (LIN; GROSSMAN, 1998; MURRAY et al., 2006). Um exemplo é a proteína Spo0J de *B. subtilis*, cuja função é organizar complexos núcleo-protéicos de alta ordem *in vivo* e *in vitro*, atuando no empacotamento das origens para segregação cromossômica (MURRAY et al., 2006). Complexos Spo0J-GFP-DNA podem ser facilmente observados ao microscópio de fluorescência como dois foci compactos, um marcando cada origem de um cromossomo em replicação, ocupando as posições de ¼ e ¾ da célula (GLASER et al., 1997; MARSTON; ERRINGTON, 1999). Tal padrão não é estático, podendo apresentar variações como quatro pontos em um bastonete, onde células em crescimento e prestes a se dividir apresentam quatro origens, ou quatro foci de Spo0J-GFP-

DNA (figura 14 B). Em nossas análises observamos sempre duas estruturas fluorescentes e de localização polar, sem nunca termos observado mais do que dois foci por bastonete, nem mesmo quando estes eram bastonetes em divisão e que, em teoria, deveriam possuir quatro foci (referentes a quatro regiões *ori* marcadas). Tais observações apontam para um artefato. Novos mutantes de Xac, carregando o vetor de expressão pPM2a-*parB*<sup>Xac</sup> integrado no locus *amy*, e não em *parB*<sup>Xac</sup>, estão sendo produzidos para investigação.

Outra possibilidade para a ausência de localização característica do grupo ParB em Xac expressando ParB<sup>Xac</sup>-GFP seria a de que esta proteína não é naturalmente funcional nesta bactéria, ou ainda de que sua fusão a GFP tenha prejudicado sua conformação e afetado sua atividade. O sistema de partição ParA/B está presente em plasmídeos, mas também em diversas bactérias ele compõe o sistema que auxilia no processo de segregação dos cromossomos bacterianos para as células filhas (BIGNELL; THOMAS, 2001; LIN; GROSSMAN, 1998; LEONARD et al., 2005; MARSTON; ERRINGTON, 1999). Em diversos genomas, dentre eles o de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* e *Streptomyces coelicolor*, os genes *parA* e *parB* estão localizados nas proximidades da região *ori* do cromossomo (BIGNELL e THOMAS, 2001), diferentemente do que é observado em Xac, cujos genes *parA* encontram-se em mais de uma cópia em várias regiões do genoma e a única cópia de *parB* está a uma distância de aproximadamente 600kb da região de início de replicação. Além disso, o operon *parAB* apresenta-se com a disposição dos genes invertida em comparação àquela comumente observada nos cromossomos bacterianos. Nestes últimos, o gene *parB* é sempre observado a 5' do início do gene de *parA*, disposição contrária àquela observada em Xac, e que pode ter função regulatória importante ao funcionamento adequado do sistema.

Estes fatores, juntamente com o padrão apresentado por ParB<sup>Xac</sup>-GFP em nossos mutantes, levam-nos a acreditar que, talvez, este sistema de partição não seja funcional em Xac. Possivelmente o mesmo deve ocorrer em outras espécies deste gênero como Xcv e Xcc, já que nestas também é observada a inversão dos genes *parAB*, assim como seu grande distanciamento da região *ori* do cromossomo.

## **Atribuição de função a proteínas hipotéticas**

## 7.1 - Introdução

Dentre as diversas ORFs hipotéticas de Xac, nosso interesse foi selecionar aquelas que pudessem ter algum tipo de envolvimento com patogenicidade (comprovada mediante ensaios de expressão gênica em presença de estímulos da planta e/ou disrupção gênica). Carvalho (2006) enumera 11 ORFs hipotéticas de Xac com expressão diferencial durante o processo de infecção (0315, 2902, 1223, 1536, 2827, 3933, 1508, 1563, 1566, 1817, 2490). Além destas, outras sete foram identificadas recentemente em experimentos de disrupção gênica e que, quando alteradas, provocam modificações no potencial virulento de Xac: 0618, 1991, 2434, 1503, 3097, 1230 e 3380 (Dr. A. M. do Amaral, Centro de Citricultura APTA Citros Sylvio Moreira, IAC Cordeirópolis, SP; comunicação pessoal).

As seqüências de aminoácidos codificadas pelas ORFs acima citadas foram analisadas quanto à presença ou não de domínios transmembrânicos utilizando-se o aplicativo DAS (CSERZO et al., 1997) (Figura 15) visando descartar, a princípio, proteínas de difícil purificação, pois na seqüência dos ensaios de microscopia, pretende-se expressá-las e purificá-las para caracterizações bioquímicas *in vitro*. Nestas análises, seqüências de aminoácidos foram comparadas com um grupo de proteínas padrão contendo domínios hidrofóbicos conhecidos e dois scores/cutoffs foram gerados: um de 1,7, referente ao tamanho e localização do segmento hidrofóbico encontrado e um de 2,2, que sinaliza o número de resíduos similares encontrados dentro da seqüência. Exemplo: a provável proteína 0618 (Figura 18) possui um segmento de 22 aminoácidos (score 1,7) e dentre estes, 14 apresentam similaridade com aminoácidos das proteínas padrão (linhas 1 e 2 abaixo do gráfico). Considerando-se que hélices transmembrânicas em proteínas integrais são compostas de segmentos de 15-30 resíduos predominantemente hidrofóbicos, foram detectadas 5 proteínas com altas chances de possuir pelo menos um destes domínios (0618, 1230, 3380, 2827 e 3933). Outras 7 apresentaram *prováveis* segmentos hidrofóbicos, variando de 9-12 resíduos (1503, 3097, 1536, 1566, 1817, 2490 e 2902) e 5 apresentaram regiões muito curtas com 7 ou menos resíduos (2434, 0315, 1223, 1508 e 1563). Deste último grupo, com exceção das ORFs 1563 e 2434, as demais foram selecionadas para este estudo.

Para que se tivesse certeza de que as ORFs 0315, 1223 e 1508 ainda estavam classificadas como hipotéticas, ou pelo menos com função não caracterizada, submetemos suas prováveis seqüências nucleotídicas e protéicas para alinhamento utilizando-se o aplicativo BLAST (Blastn e Blastp) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A análise comprovou que todas essas ORFs ainda permanecem sem função, sendo XAC1223

considerada uma proteína hipotética conservada e XAC315, assim como XAC1508, proteínas hipotéticas.

Outras análises foram realizadas pelos seguintes algoritmos disponíveis publicamente: Psortb (<http://www.psort.org/psortb>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>), CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), COG ([www.ncbi.nlm.nih.gov/COG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG)) e CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>). Todos os resultados confirmaram que para nenhuma dessas ORFs há identificação de qualquer tipo de estrutura, motivo protéico ou ortólogos que possam levar a alguma informação sobre sua possível atividade, sendo atualmente impossível prever sua função desta maneira.

Além das ORFs codificantes para produtos hipotéticos, XAC1991, anotada como uma histidina quinase (HK), foi também selecionada para ser submetida à visualização por microscopia de fluorescência. Sua seleção, como já mencionado anteriormente, deve-se a estudos de interrupção gênica aleatória (Dr. A. M. do Amaral, comunicação pessoal) nos quais foram identificadas ORFs cuja interrupção provocou a perda ou alteração severa na virulência de *Xac*.

## 7.2 – Resultados

Quatro mutantes de *Xac* foram construídos para a expressão de 315-GFP, 1223-GFP, 1508-GFP e 1991-GFP (respectivamente: *Xac amy::pPM2a-315*, *Xac amy::pPM2a-1223*, *Xac amy::pPM2a-1508*, *Xac XAC1991::pPM2a-1991*). A produção destas fusões, como descrito anteriormente, foi averiguada por Western Blot no qual detectamos sinais de tamanho compatível a 1223-GFP, 1508-GFP e 1991-GFP em *Xac* (Figura 16, canaletas, 2-3, 4-5 e 6, respectivamente). A produção de 315-GFP não foi detectada em western blot (dados não mostrados).

Na sequência, submetemos todos os mutantes supracitados, além de um mutante controle para a produção de GFP (*Xac amy::pPM2a*), a observações ao microscópio de fluorescência. Veja o padrão de fluorescência dispersa produzido pelo controle, devido à presença do peptídeo GFP homogeneamente distribuído pelo citoplasma de *Xac* (Figura 17 A). Dos demais mutantes, somente em *Xac amy::pPM2a-1508* (figura 17 B) observa-se a presença de um ponto de localização protéica por célula (setas brancas), posicionado predominantemente em seus pólos. Tais pontos parecem ocupar regiões entre o pólo e ¼ do bastonete, fenótipo observado em 62% das células que apresentavam foci de GFP em seu

interior. Tal resultado suporta a possibilidade de que o produto da ORF XAC1508 deva exercer alguma atividade (compartimentalizada) em Xac.

As imagens seguintes (figura 17 C, D e E), representam, respectivamente, imagens produzidas para os mutantes Xac *amy*::pPM2a-1223, Xac *amy*::pPM2a-315, Xac XAC1991::pPM2a-1991. O perfil de localização observado é semelhante ao do controle Xac *amy*::pPM2a (figura 17 A), havendo apenas fluorescência dispersa pelo citoplasma das células. Não é possível, portanto, inferir o local de atividade específica dessas proteínas, ao menos nas condições experimentais adotadas.

### 7.3 – Discussão

A observação da dinâmica e localização de proteínas no interior das células permite a inferência de função, já que diversos processos celulares ocorrem em locais bem estabelecidos. Um exemplo recente do emprego da técnica de localização subcelular de proteínas em fusão com GFP para inferência de função protéica foi o estudo em larga escala realizado com proteínas de *Bacillus subtilis* (MEILE et al., 2006). Neste trabalho, autores fizeram um levantamento de interações protéicas envolvidas na replicação e segregação cromossômica nesta bactéria mediante análises de padrões de localização de uma centena de proteínas carregando fusões a GFP em suas extremidades N- ou C-terminais.

Em nossas análises, marcamos quatro proteínas de Xac com GFP C-terminal e obtivemos localização subcelular para uma delas, 1508-GFP. As demais proteínas em estudo, 315-GFP, 1223-GFP e 1991-GFP apresentaram padrão de fluorescência difuso semelhante ao apresentado pela linhagem controle, expressando somente GFP. Duas possibilidades podem ser aventadas para se explicar tais resultados: 1) as proteínas 315, 1223 e 1991 são realmente citoplasmáticas e por isto apresentam padrão de localização difuso, e 2) fusões C-terminais destas a GFP não são funcionais, onde o fenótipo de localização observado é falso. No segundo caso, a não funcionalidade seria um reflexo da disrupção de algum motivo catalítico ou direcional e até mesmo pela instabilidade ou má-conformação da proteína de fusão a GFP (MEILE et al., 2006). No momento não dispomos de subsídios para adotar uma destas possibilidades e devem ser preparados novos mutantes de Xac expressando fusões destas proteínas com GFP N-terminal para investigações seqüenciais necessárias.

O padrão de localização apresentado por 1508-GFP nos mutantes Xac *amy*::pPM2a-1508 é constituído por foci, apenas um por bastonete, posicionados aproximadamente a  $\frac{1}{4}$  do

eixo longitudinal da célula (Figura 17B; setas). Observamos que 41% das células que continham foci, 62% apresentavam disposição dos pontos em área polar e o restante na região mediana da célula. Se considerarmos que os cromossomos bacterianos estão organizados dentro das células num padrão altamente estruturado, mantendo a orientação dos genes com relação a um referencial fixo (GITAI et al., 2005; WU; ERRINGTON, 2003), tal padrão seria consistente com a marcação de uma região cromossômica, caso 1508 fosse, por exemplo, uma proteína de ligação ao DNA, proposição que precisa ser experimentalmente avaliada.

Para eliminarmos a possibilidade de que os foci de localização observados eram um artefato de técnica, tratamos o mutante de Xac expressando 1508-GFP com cloranfenicol. Observamos, entretanto, um desaparecimento dos foci mediante tratamento com este antibiótico (dados não mostrados), confirmando o envolvimento de 1508-GFP na formação dos pontos visualizados.

A ORF XAC1508 já teve sua expressão analisada em experimentos de macroarranjos realizados por Carvalho (2006). Neste trabalho, foi constatada sua repressão a partir de 3 dias de infecção na planta hospedeira. Além disso, o contexto genômico no qual XAC1508 está inserida contribui para a suspeita de que seu produto deva estar de alguma forma, envolvido na virulência de Xac. Esta ORF está presente em uma ilha genômica (com conteúdo GC divergente do característico para Xac) e rodeada por regiões codificadoras para integrases (XAC1510 e XAC1598), transposases (XAC1504 e XAC1505) além de proteínas de mobilização de plasmídeos (XAC1507) e de virulência (XAC1495) (CHEN, 2006). Nesta ilha de patogenicidade, com 30 ORFs, também há a presença de outras proteínas hipotéticas, como XAC1503, que também já foi implicada no processo de infecção em análises de mutação gênica aleatória de Xac (Dr. A. M. do Amaral, Centro de Citricultura APTA Citros Sylvio Moreira, IAC Cordeirópolis, SP; comunicação pessoal).

A ORF XAC1991, anotada como uma histidina quinase (HK), faz parte de um conjunto de proteínas sensoriais pertencentes ao chamado Sistema de Dois-Componentes. Necessários à maioria dos organismos procariotos para que possam responder às alterações ambientais à sua volta, este sistema funciona por meio de proteínas que realizam uma autofosforilação em seus resíduos de histidina ou aspartato. Em sua maioria, estes sistemas coordenam as respostas bioquímicas da célula alterando a regulação da expressão gênica, pela ligação direta ao DNA. Sendo o meio mais utilizado na transmissão de sinais no interior celular bacteriano, esses sistemas regulam diversas atividades, como osmorregulação, quimiotaxia, esporulação, produção de antibióticos e patogenicidade (FALKE et al., 1997; STOCK et al., 2000; WEST; STOCK, 2001; BEIER; GROSS, 2006).

A maior parte das HKs ficam ancoradas à membrana da célula, local onde estão aptas a receber sinais do ambiente externo, como variações de temperatura e pH. No entanto, a presença de HKs no citoplasma é possível, onde estas fariam o monitoramento das condições intracelulares. O padrão disperso no citoplasma já foi descrito para inúmeras HKs e dentre bactérias, podemos citar CheA (*Salmonella typhimurium*), NtrB (*Klebsiella pneumoniae*) e FlgS (*Campylobacter jejuni*) (JOSLIN; HENDRIXSON, 2009; STOCK et al., 2000).

As previsões de localização do produto de XAC1991 realizadas através do algoritmo PsortB indicaram sua provável ancoragem à membrana da célula. No entanto, quando esta mesma análise foi realizada com a sequência de FlgS, uma HK sabidamente citoplasmática, este mesmo algoritmo também indicou uma provável ligação desta proteína à membrana celular. Portanto, não é possível determinar o padrão de localização destas proteínas através das ferramentas de análise *in silico* disponíveis atualmente.

O padrão de localização disperso de 1991-GFP observado no mutante Xac XAC1991::pPM2a-1991 (figura 17E) pode, de fato, refletir a realidade desta HK, como o é para tantas outras HKs já descritas. No entanto, devido ao fato de que os domínios de atividade catalítica nestas proteínas são localizados em suas porções C-terminais, a mesma região de fusão a GFP, existe a possibilidade de que sua atividade possa ter sido comprometida. Isto poderia alterar seu funcionamento e, conseqüentemente, seu posicionamento no interior celular. O padrão de localização de uma nova fusão, desta vez com GFP na porção N-terminal da proteína, será analisado por nós na sequência dos estudos com 1991. Somente assim poderemos afirmar com segurança a natureza dispersa do produto de XAC1991.

Dentre as quatro ORFs selecionadas para este estudo, somente XAC1223 está anotada como hipotética conservada. Apesar desta ORF não ser conservada apenas neste gênero, em todas as *Xanthomonas* analisadas (algoritmo Blastp) os ortólogos dessa ORF são encontrados no mesmo contexto genômico observado em Xac. Nessas bactérias, tal ORF encontra-se sempre a 3' do gene *minE*, em uma região claramente relacionada à divisão celular. No caso específico de Xac, as três ORFs que antecedem XAC1223 são integrantes do operon *minCDE*, indicando uma possível correlação e sugerindo a participação desta proteína no processo de divisão celular (DE BOER et al., 1992).

As proteínas MinCDE são fatores desestabilizantes da formação do anel Z divisional, impedindo sua formação fora da região mediana da célula, o que resultaria na formação de células-filhas desprovidas de uma cópia do genoma (DE BOER et al., 1989; DE BOER et al., 1992; LUTKENHAUS, 2007). Por ser uma atividade basal no metabolismo celular, essas

proteínas são conservadas entre diversas espécies bacterianas. A localização genômica de XAC1223 corrobora a suspeita de que seu produto possa atuar no processo de controle de divisão celular.

Finalmente, XAC315 foi a única ORF selecionada a apresentar um aumento em sua síntese após o contato da bactéria com a planta, segundo dados de Carvalho (2006). Esta indução foi observada 20h após o inóculo em planta e seguiu num crescendo até o final das medições, com 5 dias de infecção. Tal resultado indica que, por ser requerida em um dado momento do processo de infecção, talvez o produto da ORF315 participe de um processo bioquímico estruturado em etapas, o que pode tornar sua localização dependente da existência de fatores celulares previamente sintetizados, de maneira análoga ao que ocorre com ZapA<sup>Bsu</sup> na ausência de FtsZ (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Pelas condições de cultivo dos mutantes observados ao microscópio não terem buscado mimetizar um meio indutor de patogenicidade, este produto hipotético pode ter ficado sem seu alvo de atuação, o que explicaria o padrão de localização disperso de 315-GFP no interior de *Xac amy::pPM2a-315*. É importante ressaltar que, nessas mesmas condições de cultivo, não foi possível detectar a produção da fusão 315-GFP em Western blot.

## **O sistema de expressão TAP para Xac**

O presente capítulo encontra-se em formato de artigo, estando nos mesmos moldes em que foi submetido à para publicação.

# A Protein Expression System for Tandem Affinity Purification in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

Paula M. M. Martins <sup>1</sup>, Alexandre M. do Amaral <sup>2,3</sup>, Tássia L. Oehlmeyer <sup>1</sup>, Henrique Ferreira

<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> *Depto. de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São Jose do Rio Preto, SP, 15054-000, and Depto. de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, Rua 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, 13500-900, Brazil*

<sup>2</sup> *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil*

<sup>3</sup> *Laboratório de Biotecnologia, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira", Rod. Anhangüera, km 158, CP 04, Cordeirópolis, SP, 13490-970, Brazil*

Keywords: Citrus canker, expression vectors, TAP-tag

\* Corresponding author.

Tel. +55 17 3221 2511; FAX +55 17 3221 2390

E-mail address: [henrique.ferreira@linacre.oxon.org](mailto:henrique.ferreira@linacre.oxon.org)

## ABSTRACT

Citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), is a severe disease that affects all the varieties and species of citrus, and control is based solely on the elimination of infected plants in the field. Attempting to boost the understanding of the pathogenicity of Xac its genome was completely sequenced. Several biochemical traits were identified based on gene homology searches, but approximately 37% of the annotated ORFs did not display similarities with anything known (hypothetical). In order to start a systematic characterisation of novel factors codified by Xac we constructed two integrative vectors for protein expression in this bacterium. The expression vectors contain a xylose promoter for fine-tuned induction in Xac, an optimized RBS sequence based on consensus described for *B. subtilis* and *E. coli*, TAP-tag coding sequences for the expression of C- or N-terminal TAP-tagged protein fusions, and a fragment of the alpha-amylase gene of Xac for vector integration into its chromosome. Here we show that the expression vectors can be stably integrated into the *amy* locus of the bacterium, where Xac *amy::pHF5Ca* mutants did not exhibit any alteration in their pathogenicity phenotypes when inoculated in the host plant sweet orange. Furthermore, we show that the polypeptide TAP can be successfully expressed in Xac by detecting the production of functional Protein A, a constituent of the TAP-tag, in Western blotting assays. Finally, we overproduced the TAP-tag in Xac and purified it from the soluble phase of a Xac *amy::pHF5Ca* mutant cell extract. Our results corroborate the use of our TAP expression vectors in the production of TAP-tagged proteins in Xac, and constitute a novel tool for the characterisation of protein and protein complexes generated *in vivo* in this bacterium.

## A Protein Expression System for Tandem Affinity Purification in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

### Introduction

Xac is a Gram-negative, plant-pathogenic bacterium that affects most citrus cultivars and is the causal agent of citrus canker, a very economically important disease of citrus worldwide. Although the complete genome sequence of Xac [1] has stimulated a number of molecular studies towards the understanding of its biology [2-5], yet little information is available regarding strategies that enhance its proteome exploration [2, 3, 6, 7]. Xac has 4,313 Open Reading Frames (ORFs) of which ~63% exhibit homology to genes of known function in other organisms, and the remaining 37% correspond to hypothetical ORFs, which might code for novel polypeptides [1]. This distribution of ORFs is apparently a common feature of microbial genomes, where it is expected that a considerable amount of information regarding adaptation, and even pathogenicity, depending on the microorganism, might still be hidden within hypothetical proteins. The difficulty to characterize such a category of ORFs is mainly due to the fact that the phenotypes of their products are not known, and attempts to investigate their functions are generally based on analogies of their behaviour with respect to other already characterized proteins.

Among the techniques that could be potentially used to characterize hypothetical proteins and uncover their functions are the two dimensional (2-D) protein gels, allied to mass spectrometry, and DNA microarrays [8-14]. Both methods allow high-throughput processing of candidate genes/proteins and inference of function, which could be obtained by the pattern of co-expression and co-repression exhibited by a particular gene/polypeptide during different growth and/or development conditions. Alternatively, protein localization *in vivo* carried out by fluorescence microscopy has proven to be a powerful tool for suggesting function to

unknown protein factors [15]. However, the most promising techniques are those able to show direct contact between a hypothetical protein and (an) other cell factor(s). One of such methods is the yeast-two-hybrid (YTH), and its variation bacterial-two-hybrid (BTH) [16, 17]. The YTH system was first used in bacteria to build a complex protein-protein interaction map of the human pathogen *Helicobacter pylori* [18]. This method has also been applied for the screening and characterization of several proteins that are components of type III and IV secretion systems found in Xac [2, 3]. Despite its value, the YTH technique has some disadvantages, which include: the need to construct a genomic/cDNA expression library of the organism under study, protein expression and protein-protein interactions take place within an organism/cell different from that where factors are normally encoded (heterologous expression), there is need for extensive DNA sequencing to identify coding DNA for positive interactants, besides the large number of false positive results. Another technique, which is an interesting alternative for the YTH/BTH methods, is the Tandem Affinity Purification strategy (TAP-tagging) [19, 20]. TAP-tagging was developed to purify active macromolecular complexes from yeast, and different from the two-hybrid systems, it does not require the construction of protein expression libraries to be screened with baits. The method of TAP-tagging consists in expressing a protein containing the TAP-tag fused to its C- or N-terminal end, inside a cell/organism that normally encodes for this polypeptide; within the cell, the TAP-protein fusion may interact with other cellular factors as an untagged protein would do. After cell propagation, protein complexes involving TAP-protein fusions and cellular factors can be purified and identified by mass spectrometry. The Tap-tagging technique has successfully been adapted to various organisms [21-31], and in bacteria, it was first used to purify protein complexes containing the tagged acyl carrier protein (ACP) of *E. coli* [24]. Subsequently, the TAP-tag method was applied for a comprehensive analysis of nearly one-quarter of the *E. coli* genome [22]. In this study, authors targeted DNA cassettes into the *E.*

*coli* chromosome and created carboxy-terminal, affinity-tagged alleles of 1,000 ORFs, which resulted in the identification of several protein complexes, and guided the construction of a network of protein interactions, many of which involving previously uncharacterized polypeptides.

Here, we describe a protein expression system for tandem affinity purification in Xac. First, we show two new protein expression vectors dedicated to Xac. Second, we demonstrate by *in vivo* assays that the expression cassette carried by such vectors can be stably integrated into a genomic region (the *amy* locus) not related to pathogenicity, which is essential for studies regarding bacterial virulence. Additionally, the disruption of the *amy* locus shows an easy and reliable phenotype for selection on plate. Finally, we expressed and purified the TAP-tag from Xac, which supports the utility of our expression vectors for protein studies in this bacterium. Taken together, the experiments described show a simple and reliable method of protein expression in Xac and should help exploring potential pathogenicity-related complexes and identifying essential mechanisms during bacterial infection.

## Materials and methods

### *Bacterial strains and growth conditions*

The *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac) used in this study was the sequenced strain 306 [1]. *E. coli* strain DH10B (*F*<sup>+</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *ara* $\Delta$ 139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK*  $\lambda$ -*rpsL* (*Str*<sup>R</sup>) *nupG*) was used as a host for all the plasmids and protein purification procedures. *E. coli* was cultivated at 37°C in LB/LB-agar medium [32]; Xac was cultivated at 30°C in NYG/NYG-agar medium [33]. The antibiotics ampicillin and kanamycin were added to the media, when required, at 20 µg/mL and 10 µg/mL, respectively. For the alpha-amylase tests, NYG-agar medium was supplemented with soluble starch at 0.2%; development of halos was carried out by exposing the medium, after bacterial growth, to iodine vapours, which are produced by iodine crystals placed on the lid of the plates (with the plates upside-down).

### *General methods*

PCR, DNA manipulation, *E. coli* transformation, and electrophoresis of DNA were carried out using standard techniques [32]. Electrotransformation of Xac was performed essentially as described by [34]. Chromosomal DNA was purified from *E. coli* and Xac following [35]. All the oligonucleotides used are listed in Table 1. DNA polymerases (Taq, *Pfu*, and T4), restriction and modifying enzymes were all obtained from Fermentas.

### *Construction of the expression vectors*

All the plasmids used are listed in Table 2. The TAP expression vectors for Xac are integration vectors, which were constructed by the orderly ligation of several DNA cassettes from different sources (Fig. 1A). First, we produced a 57bp double-stranded DNA by the annealing of two synthetic oligonucleotides: RBS top and bottom (Table 1). This dsDNA was

an auxiliary cloning segment, since it carries the ribosome binding-site (RBS) that is present in the final expression vectors, and several restriction enzyme sites (*Bam*HI, *Nco*I, *Hind*III, *Spe*I, *Xba*I, and *Sma*I/*Xma*I) that were used to ligate the DNA components of the expression systems. The two synthetic oligos RBS top and bottom were mixed in equimolar amounts in a microcentrifuge tube, and heated for 1h at 70°C using a dry bath block; afterwards, the mixture was left to cool down slowly inside the block. Upon annealing, the dsDNA formed carries cohesive ends compatible with terminals left by *Hind*III cuts on DNA. This dsDNA was then ligated into pUC18 previously digested with *Hind*III, giving rise to the intermediary of cloning pTAS1. In the next step, pTAS1 was partially digested with *Hind*III and totally digested with *Eco*RI to receive the DNA fragment carrying the xylose promoter and its repressor (*xylR-pxyl*) extracted from the *B. subtilis* integration vector pEA18 (digested with *Eco*RI and *Hind*III). The product of this ligation, pTAS3, was further treated with two different sets of restriction enzymes in order to receive the tap-coding DNA sequences. The first and common step was to digest pTAS3 with *Xba*I, and treat the products with T4 DNA polymerase to generate blunt ends; pTAS3/blunt was subsequently digested with *Bam*HI and *Nco*I independently, generating pTAS3/blunt/*Bam*HI and pTAS3/blunt/*Nco*I, in preparation to receive the DNA fragments *tap1479* and *tap1761*, respectively. The two tap-coding sequences were removed from the yeast vectors pBS1479 and pBS1761 as follows: *tap1479* was obtained from pBS1479 by a double digest using *Bam*HI-*Eco*RV, while the *tap1761* was removed from pBS1761 using first *Dra*III and afterwards *Nco*I (prior to the second restriction digest with *Nco*I, pBS1761/*Dra*III was treated with T4 DNA polymerase to repair the *Dra*III cohesive ends to blunt so it could ligate to pTAS3/blunt/*Nco*I). The combinations pTAS3/blunt/*Bam*HI + *tap1479*/*Eco*RV/*Bam*HI and pTAS3/blunt/*Nco*I + *tap1761*/blunt/*Nco*I were then ligated generating pTAS4C and pTAS4N, respectively. In order to be used in Xac, the expression cassettes present in pTAS4C and pTAS4N had to be linked to a molecule

carrying a selectable marker different from ampicillin, since *Xac* is naturally resistant to this antibiotic. To accomplish that, the whole expression cassettes (*xylR-pxyl-RBS-tap1479* or *tap1761*) were moved from pUC18 to pCR2.1-TOPO, which carries a kanamycin-resistance gene along with the cassette for ampicillin resistance. The strategy used was PCR ligation, taking advantage of the fact that both pUC18 and pCR2.1-TOPO have identical DNA segments flanking their polylinkers. In a first PCR set, the expression cassettes were removed from pTAS4C and pTAS4N using *Pfu* DNA polymerase and the sequencing primers M13F and M13R, which anneal just outside of pUC18 polylinker; the backbone of pCR2.1-TOPO was also obtained by a long PCR reaction using *Pfu* DNA polymerase and primers (M13F-TOPO and M13R-TOPO) designed to anneal outside of the polylinker of pCR2.1-TOPO, but pointing towards its backbone. The amplification products generated (two expression cassettes, one carrying the *tap1479* and another the *tap1761*, plus the pCR2.1-TOPO backbone) had complementary ends, so that in two following PCRs, without primers, it was possible to ligate them by mixing pCR2.1-TOPO backbone + expression cassette *tap1479* and pCR2.1-TOPO backbone + expression cassette *tap1761*, giving rise to pHF5C and pHF5N, respectively (in the ligation PCR we used only one cycle of denaturation, annealing and extension). Finally, a DNA fragment corresponding to bases 106-914 of the *amy* gene of *Xac* was ligated to pHF5C and pHF5N at *Xma*I, generating the integration vectors pHF5Ca (GenBank FJ562210) and pHF5Na (GenBank FJ573043), respectively; *amy*<sub>106-914</sub> was obtained by PCR from *Xac* using primers Xamy4F and Xamy4R, which carry recognition sequences for *Xma*I. All the plasmid constructs were checked by DNA sequencing.

### *Protein expression*

Strains of *E. coli*/pHF5Ca and *Xac amy::pHF5Ca* were activated by the inoculation of 2-3 isolated colonies in 3mL of LB or NYG, respectively, plus the required antibiotics, and

cultivated for 8h at 30°C and 180rpm. By the end of the day, cultures were diluted 1:50 (*E. coli*) or 1:10 (Xac) in Erlenmeyer flasks containing 50mL LB or NYG and antibiotics, and incubated for 14h at 30°C and 180rpm. In the next day, strains were diluted again 1:50 (*E. coli*) or 1:10 (Xac) in Erlenmeyer flasks containing: 50mL LB or NYG (for Western blotting), or 500mL LB or NYG (for protein purification); cultures were incubated at 30°C and 180rpm. Upon reaching the O.D.<sub>600</sub> of 0.5, xylose was added to the media to the final concentration of 0.5% and induction took place for 1h (*E. coli*) or 4h (Xac) in the same growth conditions. After this period, cells were rescued by centrifugation at 4.000 xg for 10 min and washed once in cell wash buffer (30mM Tris-HCl + 200mM NaCl); cell pellets were kept frozen at -80°C for further processing.

#### *Western blotting*

Total protein extracts were prepared by dissolving 20mg of each cell pellet in 100µL of SDS-sample buffer. Sample processing, SDS-PAGE, and transfer to PVDF membrane were carried out using standard methods [32]. Detection of the TAP-tag immobilised on PVDF was performed by washing the membrane with PBS-tween containing 5% skimmed milk and a secondary antibody coupled to HRP (rabbit Anti-Horse IgG; SIGMA A6917) in a dilution of 1:3.000. After the antibody reaction, the Western blotting was developed by immersing the membrane in ECL detection reagents from the Amersham ECL Western Blotting System kit (GE); the chemiluminescence produced was captured on X-ray film (Hyperfilm, GE) for further analysis.

#### *Protein purification*

Buffers utilised are listed in Table 3. Cell pellets from 500mL cultures were dissolved in pre-chilled 10mL TST (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20)

containing a fourth of tablet of EDTA-free protease inhibitors (Roche 1.873.580). Cells were lysed by sonication using a Vibra-Cell VCX 130 (Sonics) (10 pulses of 10 sec each with intervals of 1 min), then subjected to centrifugation at 48,000 xg for 30 min at 4°C. Binding of proteins to the affinity resin was done in batch by incubating the clarified suspensions with 500µL of IgG-sepharose (previously equilibrated in TST; GE 17-0969-01) on an ice bath with gentle agitation on a rotary shaker (120rpm). Following incubation of 2h, resin was transferred to a 10mL disposable column (Poly-prep BioRad 731-1550) and washed for 3-4 times with 20 column-volumes of TST using gravity flow. Samples of 100µL were collected throughout the process for SDS-PAGE analysis. The TAP-tag was released from the resin by acid elution using 0.5M acetic acid (pH 3.4; adjusted with 10M ammonium acetate). Eluate fractions of 1mL each were precipitated using TCA (3% final) and centrifugation for 10 min using a microcentrifuge at maximum speed; protein pellets were washed once with absolute ethanol, and dissolved in 100µL of SDS sample buffer for SDS-PAGE.

#### *Pathogenicity tests*

The plant host used was Bahia sweet orange (*Citrus sinensis*), a very susceptible cultivar to citrus canker. Orange trees were cultivated under green-house conditions at 28°C with photoperiod of 12h. Cells to be tested were cultivated in the appropriate medium until the O.D.<sub>600</sub> ~0.6. Following growth, cell suspensions were used to inoculate leaves on the abaxial surface with the help of hypodermic syringes (1mL) fitted with needles. Symptoms were observed in the course of three weeks from the day of inoculation.

## Results

### *Construction of the TAP expression vectors for Xac*

The two TAP expression vectors built for Xac (pHF5Ca and pHF5Na) carry the xylose promoter (*pxyl*) together with its repressor DNA (*xyIR*), and the TAP coding sequences *tap1479* or *tap1761* (Fig. 1A). These components are separated by a short synthetic DNA segment that contains a Ribosome Binding Site (RBS) based on the consensus RBS suggested for *B. subtilis* and *E. coli* [36]. The xylose promoter is known for its fine-tuned control of protein expression levels, which exhibit in general low leakage, and it has been extensively used in GFP expression vectors designed for *B. subtilis* [37, 38]. The TAP sequences code for tags used in Tandem Affinity Purification of protein complexes from several organisms and could themselves be broken into three components (Fig. 1C): a) two domains of Protein A (ProtA) from *Staphylococcus aureus*, which has a strong affinity for IgGs, b) a peptide that binds calmodulin (CBP), c) both separated by a short peptide stretch containing a recognition sequence for the protease TEV (Tobacco Etch Virus) [19, 20]. The expression vectors pHF5Ca and pHF5Na differ only in the TAP-tags that they encode: pHF5Ca carries *tap1479* and can be used for the expression of protein fusions containing the TAP1479 at their C-termini; pHF5Na carries *tap1761* and produces fusions of the TAP1761 to the N-termini of proteins of interest. Both expression systems were built on a pCR2.1-TOPO backbone, so that they carry two cassettes conferring resistance to the antibiotics ampicillin and kanamycin (the last one is a selectable mark for Xac), and a pUC-like origin of replication; therefore, these expression vectors do not replicate in Xac, and can be used for site-directed mutagenesis, a key strategy to study gene functions. Finally, pHF5Ca and pHF5Na harbour a fragment of the alpha-amylase gene from Xac (*amy106-914*), intended to allow the integration of the expression vectors into the chromosome of the bacterium. This integration guarantees that the

expression cassettes will be as single copies per each cell, allowing better control of protein expression from the xylose promoter.

*The expression system shows stable integration into the chromosome of Xac*

The integration of the vectors pHF5Ca and pHF5Na into the chromosome of Xac is necessary to keep and propagate the expression cassettes (expression system + ORF/gene to be characterised) in the bacterium. Integration occurs by at least a single homologous recombination event involving as targets either the ORF to be characterised plus its native copy on the chromosome or the *amy106-914* fragment present in the vectors and the *amy* gene in the chromosome. Recombination between *amy106-914* and the chromosomal *amy* locus should disrupt the intact chromosomal copy of the gene and produce Xac mutants unable to degrade soluble starch on agar-medium. In order to test for that, we inserted pHF5Ca into Xac by electrotransformation and searched for mutant strains on kanamycin-containing NYG-agar plates. Several kan<sup>R</sup> Xac putative mutants were selected and subsequently inoculated on NYG-agar supplemented with starch, so that their ability to degrade this substrate could be monitored (Fig. 2). Note that apart from the wild type strain (white arrows) all mutant colonies were deficient in starch degradation, which suggested that pHF5Ca could be stably integrated into the *amy* locus of Xac. Alongside the starch degradation test, we also performed a diagnostic PCR for a selection of six kan<sup>R</sup> Xac colonies to certify that pHF5Ca was really present into these mutants (Fig. 3). We detected the diagnostic DNA fragment of ~640bp in length, corresponding to the *tap1479*, in all mutants analysed (compare lanes 2-7 with the positive control at lane 8, in which we used pHF5Ca as DNA template in the PCR). No bands were detected in the negative control (wild type Xac), which indicates that the expression vector pHF5Ca was stably integrated into the chromosome of Xac.

*Xac mutants harbouring the expression vector do not exhibit altered pathogenicity*

Before we could address the functionality of the expression system in *Xac*, it was necessary to check if the *Xac amy::pHF5Ca* mutants could still produce disease symptoms *in planta*, i.e., evaluate if alpha-amylase could play a role as a colonisation and/or pathogenicity/virulence factor. To test for that, we inoculated a selection of *Xac amy::pHF5Ca* mutants shown in Fig. 2 in leaves of sweet orange (the natural host for *Xac*) alongside the wild type strain. The appearance of symptoms was followed for a period of three weeks from the day of inoculation and photographed on the sixth and on the thirteenth days (Fig. 4). As a result, no variation from the wild type phenotype could be detected on our tests, and all the mutants inoculated were as competent as the wild type strain to produce lesions in leaves of the host plant. Besides, we did not detect alterations in the pattern of disease development, where lesions were all detected at the same time scale. We also measured the viability of the mutants by analysing their relative doubling times during growth in liquid media along with colony counting on agar-plates, and again, no variations were observed (data not shown). Taking together, these results show that the ability to cause disease is not affected in *Xac amy::pHF5Ca* mutants and the TAP expression vectors can be used for the characterisation of ORFs suspected to be involved in pathogenicity.

*Protein expression in Xac*

The functionality of the TAP expression vectors for *Xac* was tested by Western blotting. The production of a functional TAP-tag can be detected by the ability of ProtA to bind any IgG antibody in Western blotting assays [39]. A strain of *E. coli* carrying pHF5Ca (multicopy) and two *Xac amy::pHF5Ca* mutant strains (harbouring a single copy of the expression cassette integrated into the *amy* locus of *Xac*) were cultivated and induced with xylose as indicated in materials and methods. Total protein extracts were separated in SDS-PAGE (Fig. 5A) and

transferred to a PVDF membrane so we could attempt to detect the TAP1479 by an antibody reaction. The immobilised proteins were then exposed to a secondary antibody coupled to HRP, following the detection of potentially bound ProtA-Anti-IgG/HRP complexes by standard methods. Bands of the size expected for the TAP1479 (~21kDa) were detected for the two mutant strains of *Xac*, as well as for the *E. coli* transformed with pHF5Ca (Fig. 5B, lanes 1-2, and 5-8). We did not detect any band of the same size for the wild type strain (lane 3-4). Note that the production of the TAP1479 was responsive to the inductor xylose (compare lanes 1 and 2, 5 and 6, 7 and 8). The fact that *E. coli* seems to produce more of the tag than the *Xac* mutants is consistent with the multicopy condition of pHF5Ca in *E. coli*. These results show that the expression system is functional in both bacteria, and demonstrate that an intact and active ProtA moiety was produced in *Xac*.

#### *Purification of the TAP1479 from Xac*

The TAP-tag detected in the previous section seems a rather resistant polypeptide that retains its function of IgG-binding even after treatment with SDS and boiling during the preparation of the samples for SDS-PAGE. However, there was no guarantee that the function suggested by a positive result in Western blotting was not only a residual activity of ProtA. Besides, to be of any use in the investigation of protein complexes produced in *Xac*, which is the main application these expression vectors were developed for, we needed to check if the TAP1479 could be produced in larger amounts and in a soluble form. In order to evaluate this, we attempted to purify the TAP1479 by affinity separation. Again, an *E. coli* strain carrying pHF5Ca and a *Xac amy::pHF5Ca* mutant were cultivated and induced with xylose; following expression of the TAP-tag, cells were broken by sonication and clarified cell extracts were subjected to chromatography using an IgG-immobilised resin. The TAP1479 was successfully obtained from both bacteria, from the soluble phase of the cell extracts (Fig. 6; see arrows).

As observed in the Western blotting experiments, *E. coli* produced a relative higher amount of the tag (a tag concentration of ~1.4mg/mL was estimated for the sample in lane 8) in comparison with the yield exhibited by Xac (~0.2mg/mL, lane 7). However, the amount of tag produced by Xac should suffice for mass spectroscopy identification. The contaminant bands above the TAP1479 represent denatured human IgG, which was probably stripped out from the matrix by the acid elution, together with other bacterial proteins that might interact with the resin. These contaminants would probably be retained if we had carried out an enzymatic non-denaturing elution using the protease TEV, which cleaves in between ProtA and the calmodulin-binding domain of the TAP-tag. Finally, these results corroborate the use of the expression vectors pHF5Ca and pHF5Na as integration/protein expression systems for TAP-tagging in Xac.

## Discussion

We showed here the construction and test of two new protein expression vectors (pHF5Ca and pHF5Na) dedicated to *Xac*. Both vectors are integrative and can be used for the expression of C- and N-terminal fusions of a tag known as TAP [19, 20] to proteins of interest in this bacterium. Integration of the expression vectors into the chromosome of the bacterium may occur site-specifically (into the ORF under investigation) or into the *amy* locus of the bacterium. The integration into the *amy* locus is the preferable site from where ORFs can be expressed, since it avoids perturbation of genes/chromosomal regions that might produce undesirable effects and that could also lead to altered phenotypes. The alpha-amylase gene is not essential for *Xac* neither was found to play any role during infection of the host plant, which was expected since in many bacteria alpha amylase is essential for growth on starch but dispensable for growth on other carbon sources such as glucose [40, 41]. Besides, integration in *amy* has the advantage of allowing the characterization of essential genes, which may not accommodate changes of their coding-sequences, by ectopic expression of a second copy of this essential gene from the *amy* locus (this copy is under control of the xylose promoter contained in the expression vectors). This strategy of work has been extensively used in the Gram-positive bacterium *B. subtilis*, where several GFP expression vectors are integrative and carry fragments of the *amyE* gene, which allows the integration of the whole expression cassettes into the *amyE* locus [37, 38]. Finally, the disruption of the *amy* locus produces a phenotype of easy detection on plate and enables the identification of insertions that had occurred in *amy* from those in the gene being under study.

Our TAP expression vectors, which are intended for the characterization of hypothetical proteins encoded by *Xac*, will be utilized for the expression of TAP-protein fusions inside this bacterium. We showed here that the TAP-tag can be stably expressed in *Xac* and subsequently purified from the soluble phase. At the moment, we are testing a

number of TAP-protein fusions in Xac (hypothetical and some control, already characterized factors) in an attempt to carry out functional assignments using the TAP-tagging strategy. Apart from its use in TAP-tagging experiments, the expression vectors pHF5Ca and pHF5Na can also be applied for protein expression and purification from *Xanthomonas* spp., which eliminates the need for heterologous expression in *E. coli*. An example of this is the purification of the TAP1479 shown above. Another feasible application would be in genetic complementation tests *in vivo*. In such experiments, the TAP coding DNA may be removed during the cloning steps, where the polypeptide to be produced in Xac will not carry any tag.

Although largely explored in eukaryotes, only a few reports are available about the use of tandem affinity purification, and related strategies, in prokaryotes [22, 24, 42-46]. TAP-tag has been used mainly in *E. coli* to explore the biological roles of components of several protein complexes involving ACP and other cellular factors, as well as for the characterization of YbdB (EntH), a thioesterase produced in *E. coli* under iron starvation conditions [24, 42, 44, 45]. A broader high-throughput protein interaction study using TAP-tag was also performed in *E. coli* in which 857 proteins were tagged [22]; more than six hundred proteins were successfully purified, and among those, 530 were found engaged in protein-protein complexes. Protein interactants were subsequently identified by mass spectrometry, and data were used to build a network of protein-protein associations covering a vast gamma of biological activities, besides the possibility to allocate uncharacterized factors to some function.

So far, large scale proteome studies of Xac have been restricted to 2D protein gels and YTH analyses [2, 3, 6, 7]. Most of this limitation is probably due to a complete lack of a protein expression system adapted to this bacterium. Xac has a repertoire of more than 1,600 hypothetical ORFs, and probably a considerable part of these might be somehow found involved with pathogenicity and adaptation to its host plant. Therefore, the expression vectors

described here represent valuable tools that may be used in the isolation of several protein complexes, formed by factors including hypothetical proteins, which can lead to the attribution of function to a number of novel/hypothetical polypeptides.

#### Acknowledgments

PMMM received a graduate scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2006/59494-9). We would like to thank M. Bacci Jr. (UNESP-Rio Claro) for helpful discussions and to the free access to his laboratory and equipments during the course of most of this work. This work was funded by FAPESP grant number 2004/09173-6.

Table 1. Oligonucleotides

| Oligonucleotides   | Sequence                                                       |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| RBS top            | 5' - AGCTTGGGAAAAGGAGGTGAGGATCCATGGACACACTAGTTCTAGAATGACCCGGGA |
| RBS bottom         | 5' - AGCTTCCCGGGTCATTCTAGAACTAGTGTGTCCATGGATCCTCACCTCCTTTTCCCA |
| M13F (NEB* S1224S) | 5' - CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC                                  |
| M13R (NEB S1233S)  | 5' - AGCGGATAACAATTTACACAGG                                    |
| M13F-TOPO          | 5' - GTTTTACAACGTCGTGACTGGG                                    |
| M13R-TOPO          | 5' - AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG                                  |
| Xamy4F             | 5' - CACCCGGGGATGTCATCCTGCACGCCTTCAACTG                        |
| Xamy4R             | 5' - GTCCCGGGAGCTGCTGCATGCTGGCGCCAATG                          |
| pxyl               | 5' - GTACTTACTATATGAAATAAAATG                                  |
| 1479R              | 5' - ATCAAGCTTCAGGTTGACTTCCCCG                                 |

\* NEB: New England Biolabs

Table 2. Plasmids

| Plasmids    | Relevant characteristics                                                                                                                           | Source                       |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| pUC18       | Cloning vector; Ap <sup>R</sup>                                                                                                                    | New England Biolabs<br>(NEB) |
| pCR2.1-TOPO | Cloning vector; Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>                                                                                                  | Invitrogen                   |
| pEA18       | <i>Bacillus subtilis</i><br>integration vector                                                                                                     | [37]                         |
| pBS1479     | Vector for TAP-tagging in<br>yeast; source of <i>tap1479</i>                                                                                       | Euroscarf*, [19]             |
| pBS1761     | Vector for TAP-tagging in<br>yeast; source of <i>tap1761</i>                                                                                       | Euroscarf, [19]              |
| pTAS1       | pUC18 + synthetic dsDNA<br>carrying RBS (see text)                                                                                                 | This work                    |
| pTAS3       | pTAS1 + <i>xylR-pxyl</i> cassette<br>from pEA18                                                                                                    | This work                    |
| pTAS4C      | pTAS3 + <i>tap1479</i>                                                                                                                             | This work                    |
| pTAS4N      | pTAS3 + <i>tap1761</i>                                                                                                                             | This work                    |
| pTAS4Ca     | pTAS4C + <i>amy4</i> (Xac <i>amy</i> bases<br>106-914)                                                                                             | This work                    |
| pHF5C       | pCR2.1-TOPO backbone + TAP<br>expression cassette from<br>pTAS4C ( <i>xylR-pxyl-tap1479</i> )                                                      | This work                    |
| pHF5N       | pCR2.1-TOPO backbone + TAP<br>expression cassette from<br>pTAS4N ( <i>xylR-pxyl-tap1761</i> )                                                      | This work                    |
| pHF5Ca      | pCR2.1-TOPO backbone + TAP<br>expression cassette from<br>pTAS4Ca ( <i>xylR-pxyl-tap1479</i> )<br>+ <i>amy4</i> (Xac <i>amy</i> bases 106-<br>914) | This work                    |

|        |                                            |           |
|--------|--------------------------------------------|-----------|
| pHF5Na | pCR2.1-TOPO backbone + TAP                 | This work |
|        | expression cassette from                   |           |
|        | pTAS4N ( <i>xylR-pxyl-tap1761</i> ) +      |           |
|        | <i>amy4</i> (Xac <i>amy</i> bases 106-914) |           |

---

Euroscarf: Institute of Microbiology, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Marie-Curie-Strasse 9,  
Building N250, D-60439 Frankfurt, Germany

Table 3. Buffers used for western blotting and protein purification

| Buffer         | Composition                                                                                                                                                              |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cell wash      | 30mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl                                                                                                                                          |
| PBS-tween      | 58mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,<br>68mM NaCl; adjusted to pH 7.4 with<br>NaOH; Tween-20 added just before use to<br>0.2% |
| TST            | 50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl,<br>0.05% Tween-20                                                                                                                       |
| Elution buffer | 0.5M CH <sub>3</sub> COOH pH 3.4; adjusted with<br>10M NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COOH                                                                              |

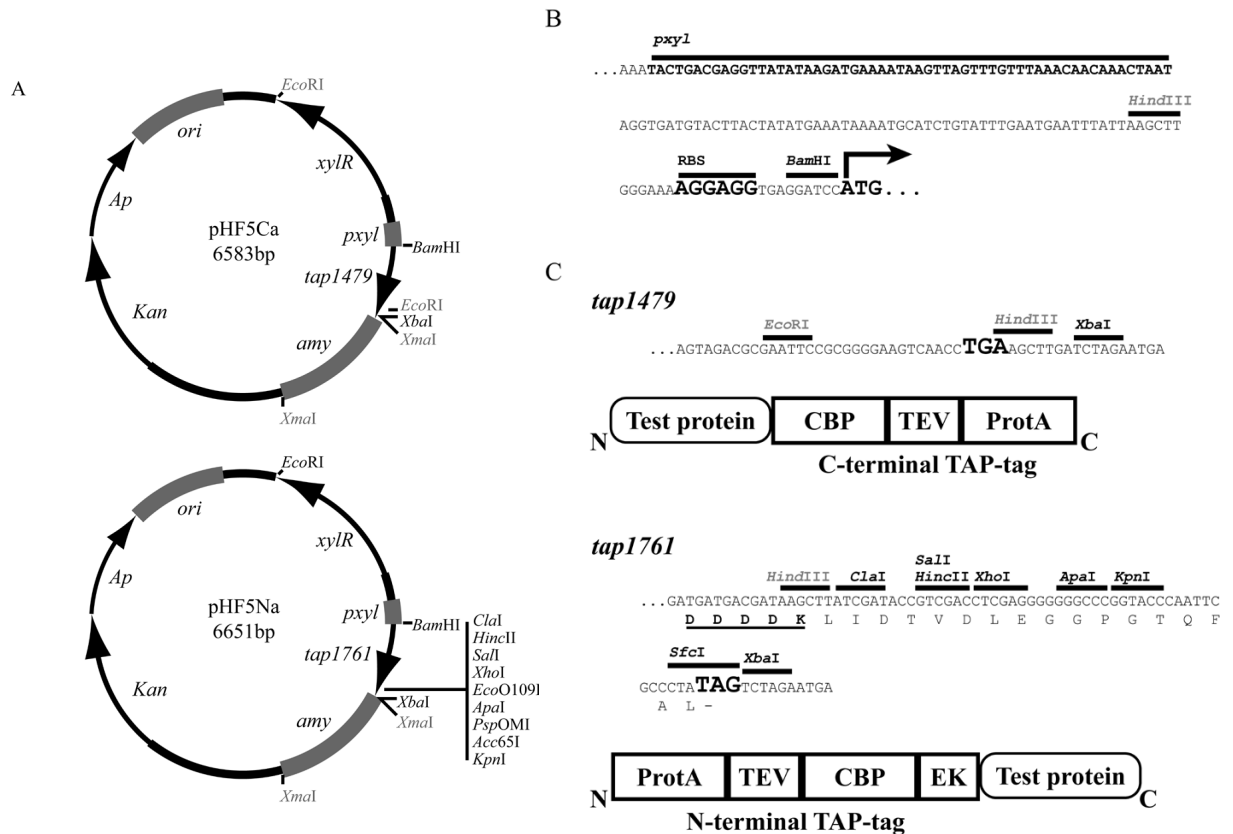


Fig. 1. Expression vectors for Tandem Affinity purification in *Xac*. A) Schematic representation of pHF5Ca and pHF5Na, the two protein expression vectors for TAP-tagging in *Xac*. Each vector carries a different TAP-coding DNA: *tap1479* and *tap1761*, which produce TAP fusions to the C- or N-terminal ends of proteins, respectively. Both vectors are based on the pCR2.1-TOPO backbone, which carries a pUC replication origin and DNA cassettes for ampicillin (Ap) and kanamycin (kan) resistance. B) DNA sequence of the xylose promoter region, common to pHF5Ca and pHF5Na, showing the ribosome binding-site (RBS) and the start codon (ATG). C) The DNA sequences of the 3'-ends of *tap1479* and *tap1761*. Underneath each sequence there is a schematic view of the protein fusion that can be produced using the tag. Note that the organisation of the modules that compose the TAP-tags (CBP, TEV, and ProtA) differ between TAP1479 and TAP1761 (see text); for the C-terminal fusions, the TAP1479 has ProtA located at the extreme C-terminus of the polypeptide, while ProtA is at the beginning of the protein in N-terminal fusions. Unique restriction enzymes for DNA cloning are shown in black. CBP, calmodulin binding-protein, TEV, Tobacco Etch Virus Protease recognition sequence, ProtA, Protein A from *Staphylococcus aureus*, and EK, enterokinase recognitions sequence (DDDDK, present only in TAP1761), *pxyl*, xylose promoter, *xylR*, the xylose repressor gene, *amy*, an 800bp fragment of the alpha-amylase gene from *Xac*.

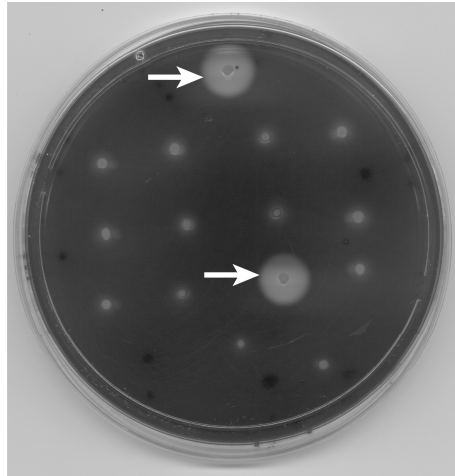


Fig. 2. Mutant strains of *Xac* harbouring the expression vector pHF5Ca integrated into its chromosome. The vector was inserted into *Xac* by electrotransformation being kept into the bacterium upon a single homologous recombination event that integrates it into the *amy* locus. This integration produces a disruption of the *amy* gene, which can be detected by plating the kanamycin resistant candidates on agar-medium containing soluble starch (0.2%). *Xac* mutants deficient for alpha-amylase fail to degrade the starch around the colonies and do not form halos like the wild-type strain (white arrows). Halos were visualised by exposing the medium to Iodine vapour. In order to allow the growth of the wild type strain, the NYG-agar plate shown did not contain kanamycin.

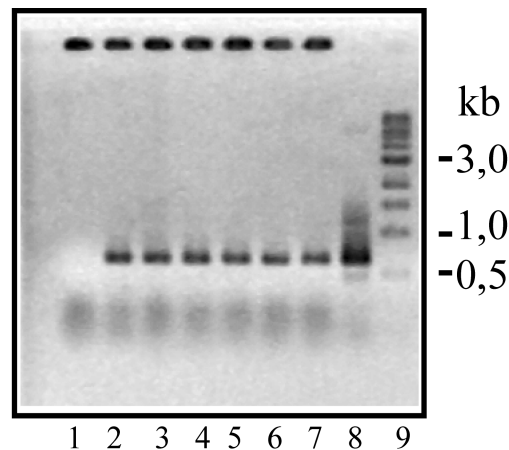


Fig. 3. Colony PCR to detect the presence of pHF5Ca into the chromosome of *Xac*. Six  $\text{kan}^R$  mutants were selected after electrotransformation of *Xac* with the expression vector pHF5Ca and subjected to colony PCR using the primers pxyl/1479R specific for the amplification of the *tap1479* (approximately 640bp). The PCR products were visualised after migration through a 0.7% agarose gel. Lanes: 1, WT *Xac* (negative control), 2-7, the six mutants selected, 8, PCR using pHF5Ca as DNA template (positive control), and 9, DNA molecular weight marker (1kb DNA ladder, NEB).

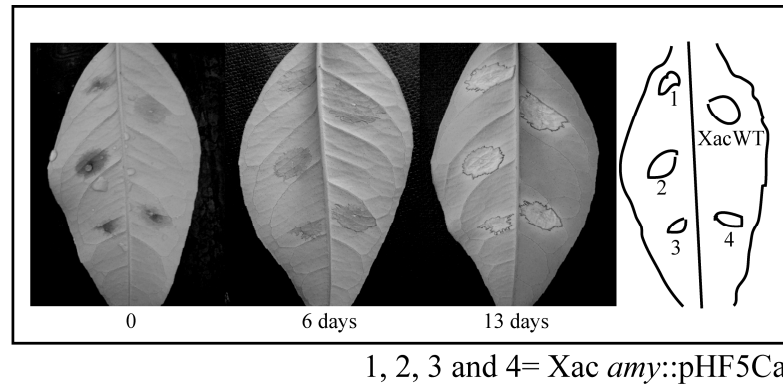


Fig. 4. The integration of the TAP expression system into the chromosome of *Xac* does not alter its pathogenicity. Four independently selected mutants of *Xac amy::pHF5Ca* were inoculated in leaves of sweet orange trees and the development of symptoms was observed during a period of three weeks. The position of the mutants relative to the control wild type strain (WT) is shown on the right panel. Pictures were taken immediately after inoculation (0), and 6 and 13 days later. Above, a representative test is displayed; tests were carried out in triplicates.

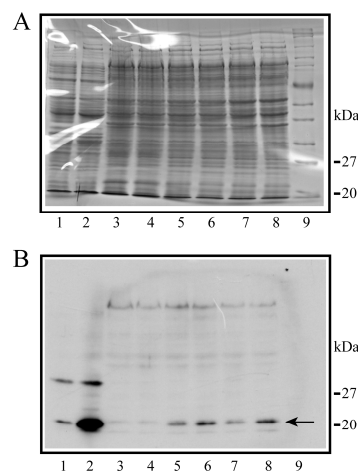


Fig. 5. Western blotting analysis to detect the production of the TAP1479 by *Xac amy::pHF5Ca* mutants. The functionality of the TAP expression system was verified by the ability of an *E. coli* DH10B strain carrying *pHF5Ca* and *Xac kan<sup>R</sup>* mutants having the vector integrated in their chromosomes to produce the TAP1479 (approximately 21kDa); see details of the induction procedure in materials and methods. A) Coomassie blue-stained 10% SDS-PAGE showing the separation of proteins from cell extracts of *E. coli* and *Xac*; lanes: 1, *E. coli/pHF5Ca*, 2, *E. coli/pHF5Ca* + 0.5% xylose, 3, *Xac* (WT), 4, *Xac* WT + 0.5% xylose, 5, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 1, 6, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 1 + 0.5% xylose, 7, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 2, 8, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 2 + 0.5% xylose, and 9, protein molecular weight marker. B) X-ray film displaying the bands detected by the Western blotting analysis. Proteins in a replica of the gel shown in A were transferred to a PVDF membrane and exposed to a secondary antibody coupled to HRP. Lanes are the same as in A. The position of the TAP1479 is marked with a black arrow on the right hand side of the film.

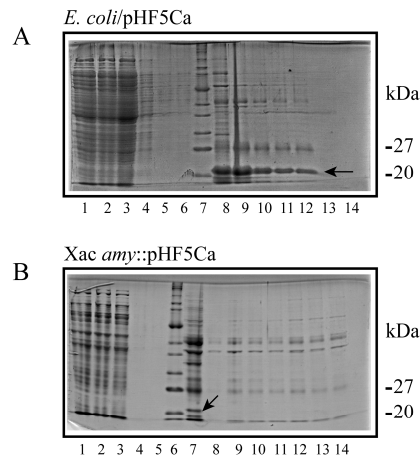


Fig. 6. Purification of the TAP1479 from *E. coli/pHF5Ca* and *Xac amy::pHF5Ca*. *E. coli* DH10B carrying pHF5Ca and a kan<sup>R</sup> mutant of *Xac* harbouring pHF5Ca into its chromosome were induced for the production of the TAP1479. Following the expression, cells were lysed and protein extracts subjected to affinity chromatography through IgG-sepharose (details of the induction and chromatography purification are described in materials and methods). In A), *E. coli/pHF5Ca*, and B), *Xac amy::pHF5Ca*, coomassie blue-stained 10% SDS-PAGE showing the separation of proteins from the fractions collect throughout the process. A) lanes: 1, clarified lysate, 2, flow through, 3-6, washes (20 column-volumes each), 7, protein molecular weight marker, 8-14, elution fractions. B) lanes: 1, clarified lysate, 2, flow through, 3-5, washes, 6, protein molecular weight marker, 7-14, elution fractions. The position of the TAP1479 is marked with black arrows in both gels.

## References

- [1] A.C. da Silva, J.A. Ferro, F.C. Reinach, C.S. Farah, L.R. Furlan, R.B. Quaggio, C.B. Monteiro-Vitorello, M.A. Van Sluys, N.F. Almeida, L.M. Alves, A.M. do Amaral, M.C. Bertolini, L.E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chamberg, L.P. Ciapina, R.M. Cicarelli, L.L. Coutinho, J.R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J.B. Faria, A.J. Ferreira, R.C. Ferreira, M.I. Ferro, E.F. Formighieri, M.C. Franco, C.C. Greggio, A. Gruber, A.M. Katsuyama, L.T. Kishi, R.P. Leite, E.G. Lemos, M.V. Lemos, E.C. Locali, M.A. Machado, A.M. Madeira, N.M. Martinez-Rossi, E.C. Martins, J. Meidanis, C.F. Menck, C.Y. Miyaki, D.H. Moon, L.M. Moreira, M.T. Novo, V.K. Okura, M.C. Oliveira, V.R. Oliveira, H.A. Pereira, A. Rossi, J.A. Sena, C. Silva, R.F. de Souza, L.A. Spinola, M.A. Takita, R.E. Tamura, E.C. Teixeira, R.I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S.M. Tsai, F.F. White, J.C. Setubal, J.P. Kitajima, Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417 (2002) 459-463.
- [2] M.C. Alegria, C. Docena, L. Khater, C.H. Ramos, A.C. da Silva, C.S. Farah, New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. *J Bacteriol* 186 (2004) 6186-6197.
- [3] M.C. Alegria, D.P. Souza, M.O. Andrade, C. Docena, L. Khater, C.H. Ramos, A.C. da Silva, C.S. Farah, Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol* 187 (2005) 2315-2325.
- [4] R.A. Cernadas, L.R. Camillo, C.E. Benedetti, Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii. *Mol Plant Pathol* 9 (2008) 609-631.

- [5] L.M. Galvao-Botton, A.M. Katsuyama, C.R. Guzzo, F.C. Almeida, C.S. Farah, A.P. Valente, High-throughput screening of structural proteomics targets using NMR. *FEBS Lett* 552 (2003) 207-213.
- [6] A. Mehta, Y.B. Rosato, Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. *Proteomics* 1 (2001) 1111-1118.
- [7] A. Mehta, Y.B. Rosato, A simple method for in vivo expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Curr Microbiol* 47 (2003) 400-403.
- [8] P.R. Jungblut, D. Bumann, G. Haas, U. Zimny-Arndt, P. Holland, S. Lamer, F. Siejak, A. Aebischer, T.F. Meyer, Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 36 (2000) 710-725.
- [9] N.R. Shin, D.Y. Lee, H.S. Yoo, Identification of quorum sensing-related regulons in *Vibrio vulnificus* by two-dimensional gel electrophoresis and differentially displayed reverse transcriptase PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50 (2007) 94-103.
- [10] S. Stelzer, S. Egan, M.R. Larsen, D.H. Bartlett, S. Kjelleberg, Unravelling the role of the ToxR-like transcriptional regulator WmpR in the marine antifouling bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Microbiology* 152 (2006) 1385-1394.
- [11] J. Wang, T. Ying, H. Wang, Z. Shi, M. Li, K. He, E. Feng, J. Yuan, T. Li, K. Wei, G. Su, H. Zhu, X. Zhang, P. Huang, L. Huang, 2-D reference map of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R proteins. *Proteomics* 5 (2005) 4488-4495.
- [12] E.R. Goncalves, H. Hara, D. Miyazawa, J.E. Davies, L.D. Eltis, W.W. Mohn, Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol* 72 (2006) 6183-6193.
- [13] Y.W. He, M. Xu, K. Lin, Y.J. Ng, C.M. Wen, L.H. Wang, Z.D. Liu, H.B. Zhang, Y.H. Dong, J.M. Dow, L.H. Zhang, Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol.* 59 (2006) 610-622.

[14] A.A. de Souza, M.A. Takita, H.D. Coletta-Filho, C. Caldana, G.H. Goldman, G.M. Yanai, N.H. Muto, R.C. de Oliveira, L.R. Nunes, M.A. Machado, Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 867-875.

[15] J.C. Meile, L.J. Wu, S.D. Ehrlich, J. Errington, P. Noirot, Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics.* 6 (2006) 2135-2146.

[16] S. Fields, O. Song, A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (1989) 245-246.

[17] G. Karimova, J. Pidoux, A. Ullmann, D. Ladant, A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 5752-5756.

[18] J.C. Rain, L. Selig, H. De Reuse, V. Battaglia, C. Reverdy, S. Simon, G. Lenzen, F. Petel, J. Wojcik, V. Schachter, Y. Chemama, A. Labigne, P. Legrain, The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409 (2001) 211-215.

[19] O. Puig, F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, B. Seraphin, A. Shevchenko, M. Mann, The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification: A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Methods.* 24 (2001) 218-229.

[20] G. Rigaut, A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, B. Seraphin, A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 17 (1999) 1030-1032.

- [21] T. Burckstummer, K.L. Bennett, A. Preradovic, G. Schutze, O. Hantschel, G. Superti-Furga, A. Bauch, An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* 3 (2006) 1013-1019.
- [22] G. Butland, J.M. Peregrin-Alvarez, J. Li, W. Yang, X. Yang, V. Canadien, A. Starostine, D. Richards, B. Beattie, N. Krogan, M. Davey, J. Parkinson, J. Greenblatt, A. Emili, Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 433 (2005) 531-537.
- [23] S.C. Dawson, J.K. Pham, S.A. House, E.E. Slawson, D. Cronembold, W.Z. Cande, Stable transformation of an episomal protein-tagging shuttle vector in the piscine diplomonad *Spironucleus vortens*. *BMC Microbiol* 8 (2008) 71.
- [24] D. Gully, D. Moinier, L. Loiseau, E. Bouveret, New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett* 548 (2003) 90-96.
- [25] J.P. Kamil, D.M. Coen, Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. *J Virol* 81 (2007) 10659-10668.
- [26] D. Mayer, S. Baginsky, M. Schwemmle, Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. *Proteomics* 5 (2005) 4483-4487.
- [27] M.E. Meima, K.E. Weening, P. Schaap, Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium*. *Protein Expr Purif* 53 (2007) 283-288.
- [28] T. Nakagawa, T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo, T. Kimura, Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104 (2007) 34-41.

- [29] J.S. Rohila, M. Chen, R. Cerny, M.E. Fromm, Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* 38 (2004) 172-181.
- [30] J. Van Leene, E. Witters, D. Inze, G. De Jaeger, Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci* 13 (2008) 517-520.
- [31] D. Zhou, J.X. Ren, T.M. Ryan, N.P. Higgins, T.M. Townes, Rapid tagging of endogenous mouse genes by recombineering and ES cell complementation of tetraploid blastocysts. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) e128.
- [32] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [33] M.J. Daniels, C.E. Barber, P.C. Turner, M.K. Sawczyc, R.J. Byrde, A.H. Fielding, Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *Embo J.* 3 (1984) 3323-3328.
- [34] A.M. do Amaral, C.P. Toledo, J.C. Baptista, M.A. Machado, Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by eletroporation. *Fitopatologia Brasileira* 30 (2005) 292-294.
- [35] H. Ferreira, J. Rodrigues Neto, E.R. Goncalves, Y.B. Rosato, A simplified subtractive hybridization protocol used to isolate DNA sequences specific to *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* 145 (1999) 1967-1975.
- [36] E.P. Rocha, A. Danchin, A. Viari, Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 3567-3576.
- [37] F.J. Gueiros-Filho, R. Losick, A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 16 (2002) 2544-2556.

- [38] P.J. Lewis, A.L. Marston, GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene*. 227 (1999) 101-110.
- [39] S. Weser, M. Gerlach, D.M. Kwak, M. Czerwinska, A. Godecke, Detection of TAP-tagged proteins in Western blot, confocal laser scanning microscopy and FACS using the ZZ-domain. *J Biochem Biophys Methods*. 68 (2006) 189-194. Epub 2006 Jun 2015.
- [40] P. Worthington, V. Hoang, F. Perez-Pomares, P. Blum, Targeted disruption of the alpha-amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 185 (2003) 482-488.
- [41] Y. Xia, Y. Kong, P.H. Nielsen, In situ detection of starch-hydrolyzing microorganisms in activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol* 66 (2008) 462-471.
- [42] A. Battesti, E. Bouveret, Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol* 62 (2006) 1048-1063.
- [43] A. Battesti, E. Bouveret, Improvement of bacterial two-hybrid vectors for detection of fusion proteins and transfer to pBAD-tandem affinity purification, calmodulin binding peptide, or 6-histidine tag vectors. *Proteomics* 8 (2008) 4768-4771.
- [44] D. Gully, E. Bouveret, A protein network for phospholipid synthesis uncovered by a variant of the tandem affinity purification method in *Escherichia coli*. *Proteomics* 6 (2006) 282-293.
- [45] D. Leduc, A. Battesti, E. Bouveret, The hotdog thioesterase EntH (YbdB) plays a role in vivo in optimal enterobactin biosynthesis by interacting with the ArCP domain of EntB. *J Bacteriol* 189 (2007) 7112-7126.
- [46] M. Zeghouf, J. Li, G. Butland, A. Borkowska, V. Canadien, D. Richards, B. Beattie, A. Emili, J.F. Greenblatt, Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J Proteome Res* 3 (2004) 463-468.

## 9 - Conclusão

No presente trabalho, construímos pela primeira vez um sistema de expressão de proteínas específico para *Xac*, o qual permite a produção de polipeptídeos em fusão a GFP ou TAP em suas extremidades N- ou C-terminais. Pelos testes que realizamos, concluímos que:

1) a manutenção da virulência e do padrão de crescimento das linhagens mutantes, em comparação à *Xac* selvagem, corrobora seu uso no estudo de suas proteínas, inclusive daquelas ligadas ao fenótipo de patogenicidade. Além disso, o vetor pPM2a manteve-se estávelmente integrado no locus *amy*;

2) a expressão de ZapA<sup>Xac</sup>-GFP e GFP-ParB<sup>Xac</sup>, em mutantes de *Xac* contendo o sistema de expressão desenvolvido, comprovou o uso desta técnica como ferramenta no estudo do padrão de localização de proteínas nesta bactéria. Embora os dados obtidos com mutantes expressando GFP-ParB<sup>Xac</sup> não serem conclusivos, comprovamos que ZapA<sup>Xac</sup>-GFP apresenta o mesmo padrão de localização observado em seus homólogos presentes em outras bactérias. Por isso, propomos a re-anotação da ORF XAC3408 de hipotética conservada para *zapA*;

3) Também estudamos três produtos hipotéticos de *Xac*, dos quais um, codificado por XAC1508, apresentou foci predominante localizados nos pólos das células. Este é um forte indício de que tal ORF seja realmente expressa, pressupondo a existência de fatores celulares reconhecidos por esta proteína, um indício de sua real atividade em *Xac*;

4) Também estudamos o perfil de localização de uma histidina quinase (XAC1991), sendo possível observar seu padrão difuso no citoplasma. Embora estes dados ainda precisem ser confirmados, são os provavelmente os primeiros obtidos para uma proteína do sistema de dois-componentes por localização *in vivo*.

5) Para o prosseguimento do estudo das interações protéicas em *Xac*, desenvolvemos outro vetor de expressão, capaz de produzir fusões de proteínas ao peptídeo TAP, permitindo a purificação dos complexos protéicos produzidos *in vivo*. Além da construção deste sistema, comprovamos a purificação do peptídeo TAP por linhagens de *Xac* mutantes contendo este vetor, o que atesta a possibilidade de futuras purificações de complexos protéicos nesta bactéria.

Estes dados, em conjunto, comprovam o funcionamento dos dois sistemas de expressão desenvolvidos, fornecendo embasamento suficiente para o prosseguimento desta linha de pesquisa e do estudo das interações protéicas em *Xac*. A técnica desenvolvida por este trabalho abrirá, sem dúvidas, uma nova frente no estudo do proteoma de *Xac*.

## 10 - Referências

- ALEGRIA, M. C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.; DA SILVA, A. C.; FARAH, C. S. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, n.18, p. 6186-6197, 2004.
- ALEGRIA, M. C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.; DA SILVA, A. C.; FARAH, C. S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, n.7, p.2315-2325, 2005.
- AMARAL, A. M.; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J.C.; MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p292-294, 2004.
- AUTRET, S.; NAIR, R.; ERRINGTON, J. Genetic analysis of the chromosome segregation protein Spo0J of *Bacillus subtilis*: evidence for separate domains involved in DNA binding and interactions with Soj protein. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 41, n.3, p743-755, 2001.
- BEIER, D.; GROSS, R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.9, n.2, p. 143-152, 2006.
- BIGNELL, C.; THOMAS, C. M. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n.1, p. 1-34, 2001.
- BURCKSTUMMER, T.; BENNET, K. L.; PRERADOVIC, A.; SCHUTZE, G.; HANTSCH, O.; SUPERTI-FUGA, G.; BAUCH, A. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. **Nature Methods**, Londres, v.3, n. 12, p. 1013-1019, 2006.
- BUTLAND, G.; PEREGRIN-ALVAREZ, J.M.; LI, J.; YANG, W.; YANG, X.; CANADIEN, V.; STAROSTINE, A.; RICHARDS, D.; BEATTIE, B.; KROGAN, N.; DAVEY, M.; PARKINSON, J.; GREENBLAT, J.; EMILI, A. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. **Nature**, Londres, v.433, n.7025, p531-537, 2005.
- CARVALHO, F.M.S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 2006. 170 p. Tese (Doutorado em química) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- CHAGAS, M.C.M. ***Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae): Bioecologia e relação com o cancro cítrico**. 1999. 67f. Tese (Doutorado em agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba

CHEN, L.L. Identification of genomic islands in six plant pathogens. **Gene**, Amsterdam, v. 374, p. 134-141, 2006.

CSERZO, M.; WALLIN, E.; SIMON, I.; VON HEIJNE, G.; ELOFSSON, A. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. **Protein Engineering**, Oxford, v.10, n.6, p. 673-676, 1997.

DA SILVA, A.C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Londres, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002.

DANIELS, M. J.; BARBER, C. E.; TURNER, P. C.; SAWCZYK, M. K.; BYRDE, R. J.; FIELDING, A. H. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **Embo Journal**, Oxford, v.3, n.13, p.3323-3328, 1984.

DAS, A. K. Citrus Canker – A Review. **Journal of Applied Horticulture**, [s.l.], v.5, p.52-60, 2003.

DAWSON, S. C.; PHAM, J. K.; HOUSE, S. A.; SLAWSON, E. E.; CRONEMBOLD, D.; CANDE, W. Z. Stable transformation of an episomal protein-tagging shuttle vector in the piscine diplomonad *Spironucleus vortens*. **BMC Microbiology**, Londres, v.8, p.71

DE BOER, P. A.; CROSSLEY, R. E.; ROTHFIELD, L. I. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. **Cell**, Cambridge, v. 56, n.4, p. 641-649, 1989.

DE BOER, P. A.; CROSSLEY, R. E.; ROTHFIELD, L. I. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 1, p. 63-70, 1992.

DE SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; MACHADO, M. A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 16, n. 10, p. 867-875, 2003.

ECONOMIC RESEARCH SERVICE. **U.S. Citrus Production Forecast**. [s.l], 2008. 25 p.

FALKE, J. J.; BASS, R. B.; BUTLER, S. L.; CHERVITZ, S. A.; DANIELSON, M. A. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 13, p. 457-512, 1997.

FERREIRA, H.; BARRIENTOS, F. J. A.; BALDINI, R. L. ; ROSATO, Y. B. Electrotransformation in three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 651-655, 1995

FIELDS, S. High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. **FEBS Journal**, Oxford, v. 272, n. 21, p. 5391-5399, 2005.

FIELDS, S.; SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, Londres, v. 340, n. 6230, p. 245-246, 1989.

GITAI, Z.; THANBICHLER, M.; SHAPIRO, L. The choreographed dynamics of bacterial chromosomes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, n.5, p. 221-228, 2005.

GLASER, P.; SHARPE, M. E.; RAETHER, B.; PEREGO, M.; OHLSEN, K.; ERRINGTON, J. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. **Genes & Development**, Cold Spring Harbour, v. 11, n. 9, p. 1160-1168, 1997.

GOEHRING, N. W.; BECKWITH, J. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. **Current Biology**, Londres, v. 15, n. 13, p. R514-526, 2005

GONCALVES, E. R.; HARA, H.; MIYAZAWA, D.; DAVIES, J. E.; ELTIS, L. D.; MOHN, W. W. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6183-6193, 2006.

GUEIROS-FILHO, F. J.; LOSICK, R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes & Development**, Cold Spring Harbour, v. 16, n. 19, p. 2544-2556, 2002.

GULLY, D.; MOINIER, D.; LOISEAU, L.; BOUVERET, E. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 548, p. 90-96, 2003.

HE, Y. W.; XU, M.; LIN, K.; NG, Y. J.; WEN, C. M.; WANG, L. H.; LIU, Z. D.; ZHANG, H. B.; DONG, Y. H.; DOW, J. M.; ZHANG, L. H. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 59, n. 2, p. 610-622, 2006.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Previsão da Safra Agrícola 2007/08 para a Cultura da Laranja**. [s.l], 2000. 6p.

JOSLIN, S. N.; HENDRIXSON, D. R. Activation of the *Campylobacter jejuni* FlgSR Two-component System is Linked to the Flagellar Export Apparatus. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 6, 2009.

JUNGBLUT, P. R.; BUMANN, D.; HAAS, G.; ZIMNY-ARNDT, U.; HOLLAND, P.; LAMER, S.; SIEJAK, F.; AEBISCHER, A.; MEYER, T. F. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 36, n. 3, p. 710-725, 2000.

KAMIL, J. P.; COEN, D. M. Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 19, p. 10659-10668, 2007.

KARIMOVA, G.; PIDOUX, J.; ULLMANN, A.; LADANT, D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States**, Washington, v.95, n. 10, p. 5752-5756, 1998.

LAU, I. F.; FILIPE, S. R.; SOBALLE, B.; OKSTAD, O. A.; BARRE, F. X.; SHERRATT, D. J. Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. **Molecular Microbiology**, salem, v. 49, n. 3, p. 731-743, 2003.

LEONARD, T. A.; BUTLER, P. J.; LOWE, J. Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. **Embo Journal**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 270-282, 2005

LEWIS, P. J. Bacterial subcellular architecture: recent advances and future prospects. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 54, n. 5, p. 1135-1150, 2004.

LIN, D. C.; GROSSMAN, A. D. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 5, p. 675-685, 1998.

LUTKENHAUS, J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 76, p. 539-562, 2007.

MARSTON, A. L.; ERRINGTON, J. Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 33, n. 1, p. 84-96, 1999.

MAYER, D.; BAGINSKY, S.; SCHWEMMLE, M. Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 17, p. 4483-4487, 2005

MEILE, J. C.; WU, L. J.; EHRLICH, S. D.; ERRINGTON, J.; Noirot, P. Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 7, p. 2135-2146, 2006.

MEIMA, M. E.; WEENING, K. E.; SCHAAP, P. Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium*. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 283-288, 2007.

MURRAY, H.; ERRINGTON, J. Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. **Cell**, Cambridge, v. 135, n. 1, p. 74-84, 2008.

MURRAY, H.; FERREIRA, H.; ERRINGTON, J. The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 61, n. 5, p. 1352-1361, 2006.

NAKAGAWA, T.; KUROSE, T.; HINO, T.; TANAKA, K.; KAWAMUKAI, M.; NIWA, Y.; TOYOOKA, K.; MATSUOKA, K.; JINBO, T.; KIMURA, T. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 104, n. 1, p. 34-41, 2007.

NEVES, M. E.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D. S.; NEVES, F. M. Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros 1996-2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 432, 2001.

OCHMAN, H.; DAVALOS, L. M. The nature and dynamics of bacterial genomes. **Science**, Washington, v.311, n. 5768, p. 1730, 2006.

PUIG, O.; CASPARY, F.; RIGAUT, G.; RUTZ, B.; BOUVERET, E.; BRAGADONILSSON, E.; WILM, M.; SERAPHIN, B.; SHEVCHENKO, A.; MANN, M. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification: A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Methods**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 218-229, 2001.

RAIN, J. C.; SELIG, L.; DE REUSE, H.; BATTAGLIA, V.; REVERDY, C.; SIMON, S.; LENZEN, G.; PETEL, F.; WOJCIK, J.; SCHACHTER, V.; CHEMAMA, Y.; LABIGNE, A.; LEGRAIN, P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. **Nature**, Londres, v. 409, n. 6817, p. 211-215, 2001.

RIGAUT, G.; SHEVCHENKO, A.; RUTZ, B.; WILM, M.; MANN, M.; SERAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 10, p. 1030-1032, 1999.

ROCHA, E. P.; DANCHIN, A.; VIARI, A. Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 17, p. 3567-3576, 1999.

ROHILA, J. S.; CHEN, M.; CERNY, R.; FROMM, M. E. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, p.172-181, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHEFFERS, D. J. The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, n. 17, p. 2601-2608, 2008.

SHIN, N. R.; LEE, D. Y.; YOO, H. S. Identification of quorum sensing-related regulons in *Vibrio vulnificus* by two-dimensional gel electrophoresis and differentially displayed reverse transcriptase PCR. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 94-103, 2007.

SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVE, J. M.; BRIONES, M. R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANCA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI, A., JR.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA, H. A., JR.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE, M. ROSA A. J.; DE ROSA, V. E., JR.; DE SA, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA ; SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA, W. A., JR.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCE, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-LMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature**, Londres, v. 406, n. 6792, p. 151-157, 2000.

STALL, R.E.; SEYMOUR, C. P Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 5, p. 581, 1983.

STELZER, S.; EGAN, S.; LARSEN, M. R.; BARTLETT, D. H.; KJELLEBERG, S. Unravelling the role of the ToxR-like transcriptional regulator WmpR in the marine antifouling bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Microbiology**, Reading, v. 152, n. 5, p. 1385-1394, 2006.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 69, p. 183-215, 2000.

VAN LEENE, J.; WITTERS, E.; INZE, D.; DE JAEGER, G. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 10, p. 517-520, 2008.

WANG, J.; YING, T.; WANG, H.; SHI, Z.; LI, M.; HE, K.; FENG, E.; YUAN, J.; LI, T.; WEI, K.; SU, G.; ZHU, H.; ZHANG, X.; HUANG, P.; HUANG, L. 2-D reference map of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R proteins. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 17, p. 4488-4495, 2005a.

WANG, X.; POSSOZ, C.; SHERRATT, D. J. Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. **Genes & Development**, Cold Spring Harbour, v. 19, n. 19, p. 2367-2377, 2005b.

WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 369-376, 2001.

WU, L. J.; ERRINGTON, J. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 49, n. 6, p. 1463-1475, 2003.

ZHOU, D.; REN, J. X.; RYAN, T. M.; HIGGINS, N. P.; TOWNES, T. M. Rapid tagging of endogenous mouse genes by recombineering and ES cell complementation of tetraploid blastocysts. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 16, p. 128, 2004.

## 11 – Apêndice 1: Tabelas

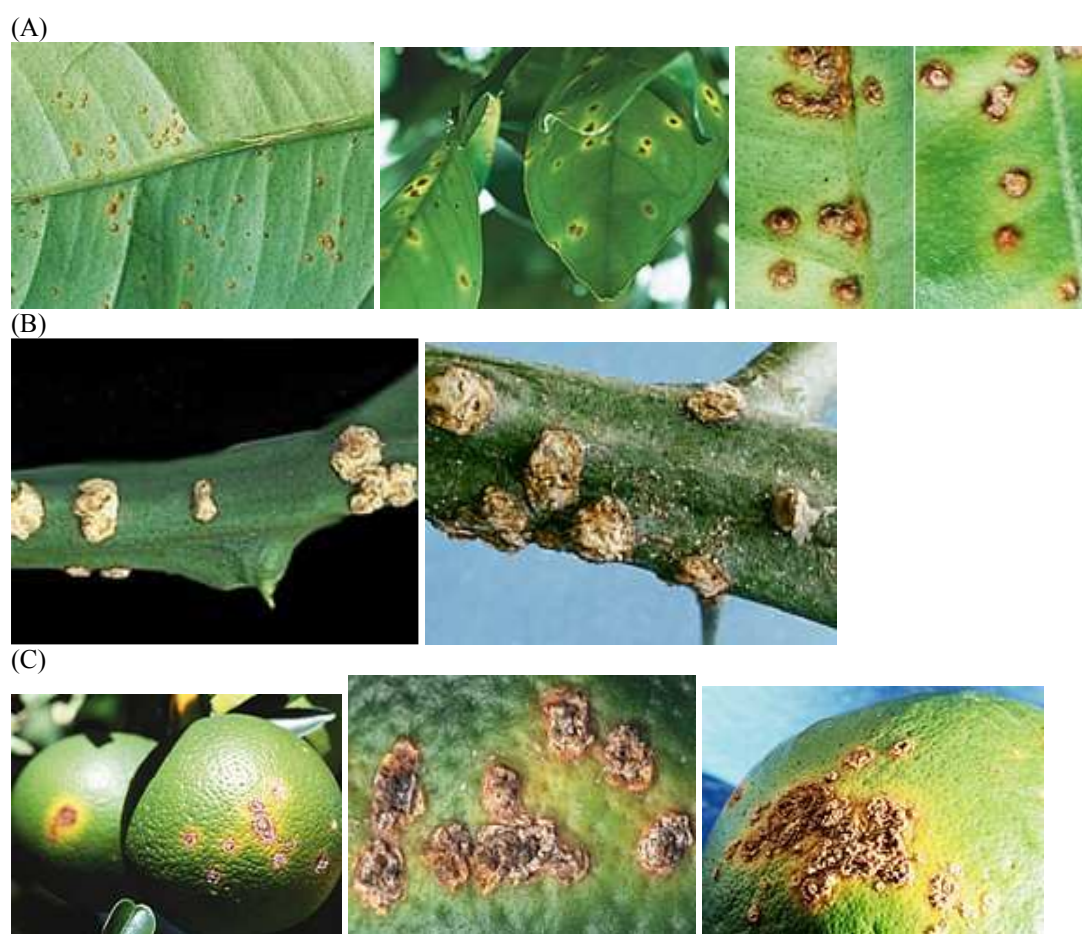
**Tabela II: Plasmídeos**

| PLASMÍDEO                         | DETALHES                                                                                                                                               | REFERÊNCIA                                                  |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| pEA18                             | Vetor de expressão GFP para <i>Bacillus subtilis</i> . Contém o promotor e repressor de xilose ( <i>xylR-pxyl</i> ); Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> | Dr. Frederico Gueiros-Filho, Depto. Bioquímica, IQ, USP, SP |
| pCR2 .1 TOPO                      | Vetor de clonagem; Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                                                   | Invitrogen                                                  |
| pUC18                             | Vetor de clonagem; Ap <sup>R</sup>                                                                                                                     | New England Biolabs (NEB)                                   |
| pTAS1                             | pUC18 + oligo sintético contendo RBS (Ribosome Binding Site), Ap <sup>R</sup>                                                                          | Este trabalho                                               |
| pTAS3                             | pTAS1 + promotor e repressor de xilose ( <i>xylR-pxyl</i> ) de pEA18, Ap <sup>R</sup>                                                                  | Este trabalho                                               |
| pTAS3- <i>gfp</i>                 | pTAS3 + <i>gfp</i> de pEA18, Ap <sup>R</sup>                                                                                                           | Este trabalho                                               |
| pPM1                              | pTAS3 <i>gfp</i> + Km <sup>R</sup> de pUC4K                                                                                                            | Este trabalho                                               |
| pPM2                              | pCR2.1 TOPO sem MCS + cassete <i>xylR-pxy-gfp</i> de pTAS3+ <i>gfp</i> ; Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                             | Este trabalho                                               |
| pPM2a                             | pPM2 + fragmento do gene de $\alpha$ -amilase (“ <i>amy</i> ”), Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                      | Este trabalho                                               |
| pPM2- <i>parB</i> <sup>Xac</sup>  | pPM2 + <i>parB</i> <sup>Xac</sup> , Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                                  | Este trabalho                                               |
| pPM2a- <i>zapA</i> <sup>Xac</sup> | pPM2a + ORF3408 (provável <i>zapA</i> ), Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                             | Este trabalho                                               |
| pPM2a-315                         | pPM2a + ORF315 Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                                                       | Este trabalho                                               |
| pPM2a-1223                        | pPM2a + ORF1223 Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                                                      | Este trabalho                                               |
| pPM2a-1508                        | pPM2a + ORF1508 Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                                                      | Este trabalho                                               |
| pPM2a-1991                        | pPM2a + ORF1991 Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                                                                      | Este trabalho                                               |
| pHF5Ca                            | pCR2.1 TOPO sem MCS + cassete <i>xylR-pxy-TAP</i> + <i>amy</i> , Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                                     | Este trabalho                                               |

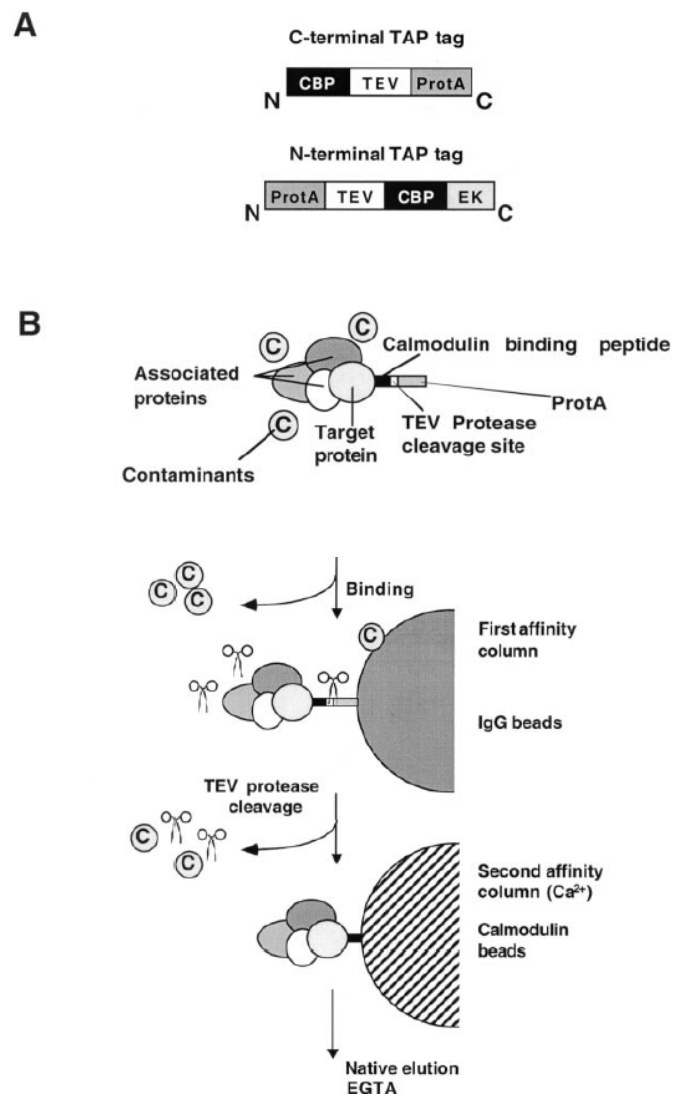
**Tabela III: Primers**

| NOME                      | SEQUÊNCIA                                   |
|---------------------------|---------------------------------------------|
| M13F (NEB S1224S)         | 5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC                  |
| M13R (NEB S1233S)         | 5'AGCGGATAACAATTTACACAGG                    |
| M13F <sub>to vector</sub> | 5'GTTTTACAACGTCGTGACTGGG                    |
| M13R <sub>to vector</sub> | 5' AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG                 |
| pxylF                     | 5'GTACTTACTATATGAAATAAAAATG                 |
| Amy5F                     | 5'ATCGAATTCGATGTCATCCTGCACGCCTTCAACTG       |
| Amy5R                     | 5'ATCGAATTCGATGTCATCCTGCACGCCTTCAACTG       |
| ParB-R                    | 5'ACTGCATGCGCAGGCGTTTCGAGCACG               |
| ParB-F                    | 5'CATGAACAAGCCGATCCCCGCAAAGAAGC             |
| GFP F                     | 5'ATGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTC       |
| GFP R                     | 5'GTTCTAGATTTCAGTGC GCGGCCGCTGCTTCTTTGTATAG |
| 0315F                     | 5'ATCGGATCCATGGGAGATGCAAAAATGGG             |
| 0315R                     | 5'ATCAGGATCCAGAAATGCCATCGCTGGCGC            |
| 1223F                     | 5'GGATCCATGCGCGTGACCACTCCCAC                |
| 1223R                     | 5'TCAGGATCCTGCAGGCAACAAGCCGCGTGCG           |
| 1508F                     | 5'GGATCCATGGCACGTTTAGCTGAAAG                |
| 1508R                     | 5'TCAGGATCCAGAGGGGCTCTTTTTCGCAG             |
| 1991F                     | 5'GGATCCATGACCGCCAAGTTTTTCTC                |
| 1991R                     | 5'CTAGGATCCTCGCGGCTGCCGGATCGGTAG            |
| 3408F                     | 5'TCTAGAAGTCGACATGAGCAACAACGAACCGGTC        |
| 3408R                     | 5'TCTAGAGTCGACTCAGCGCGGTGTGTCGGCAAC         |

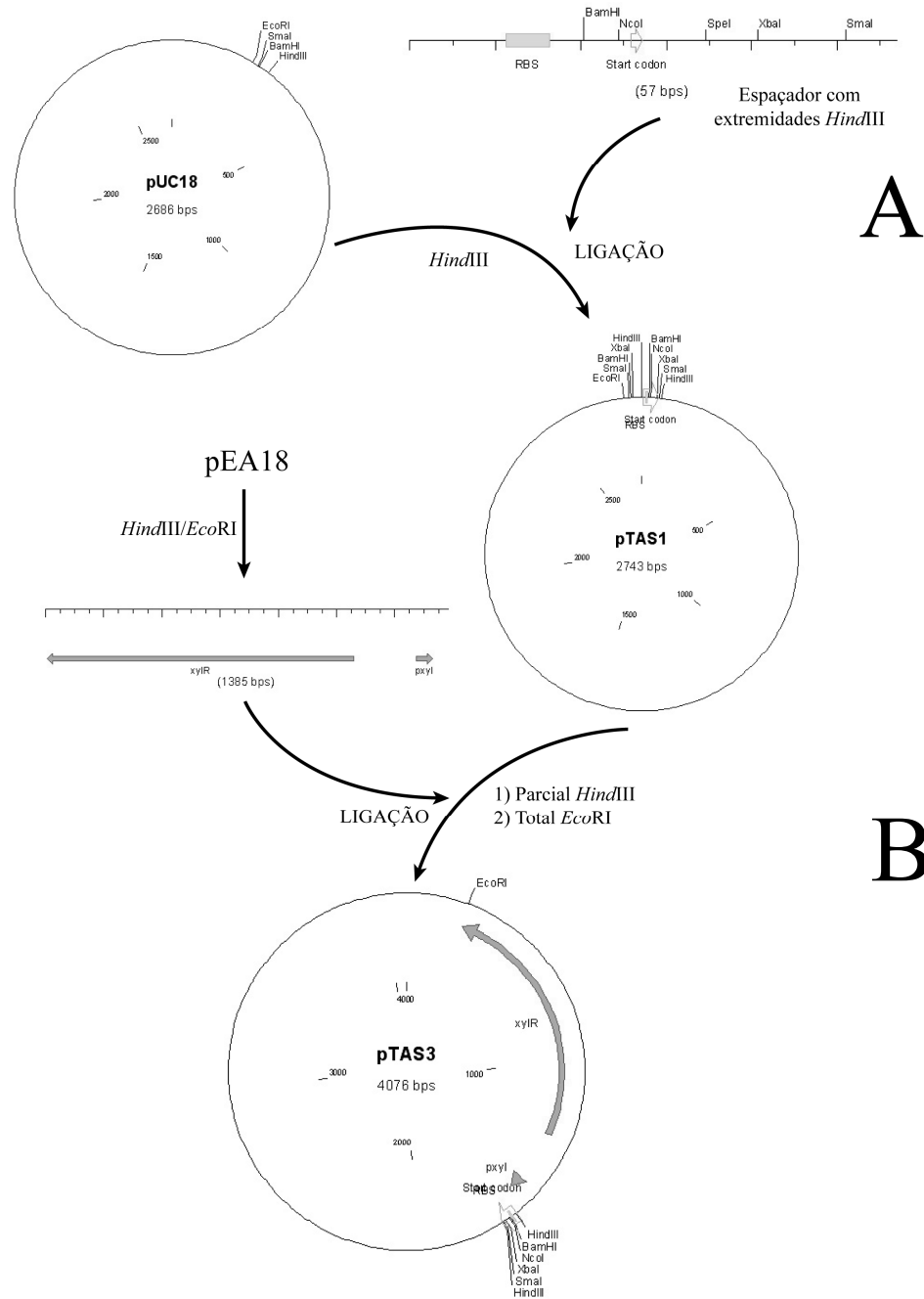
## 12 - Apêndice 2: Figuras



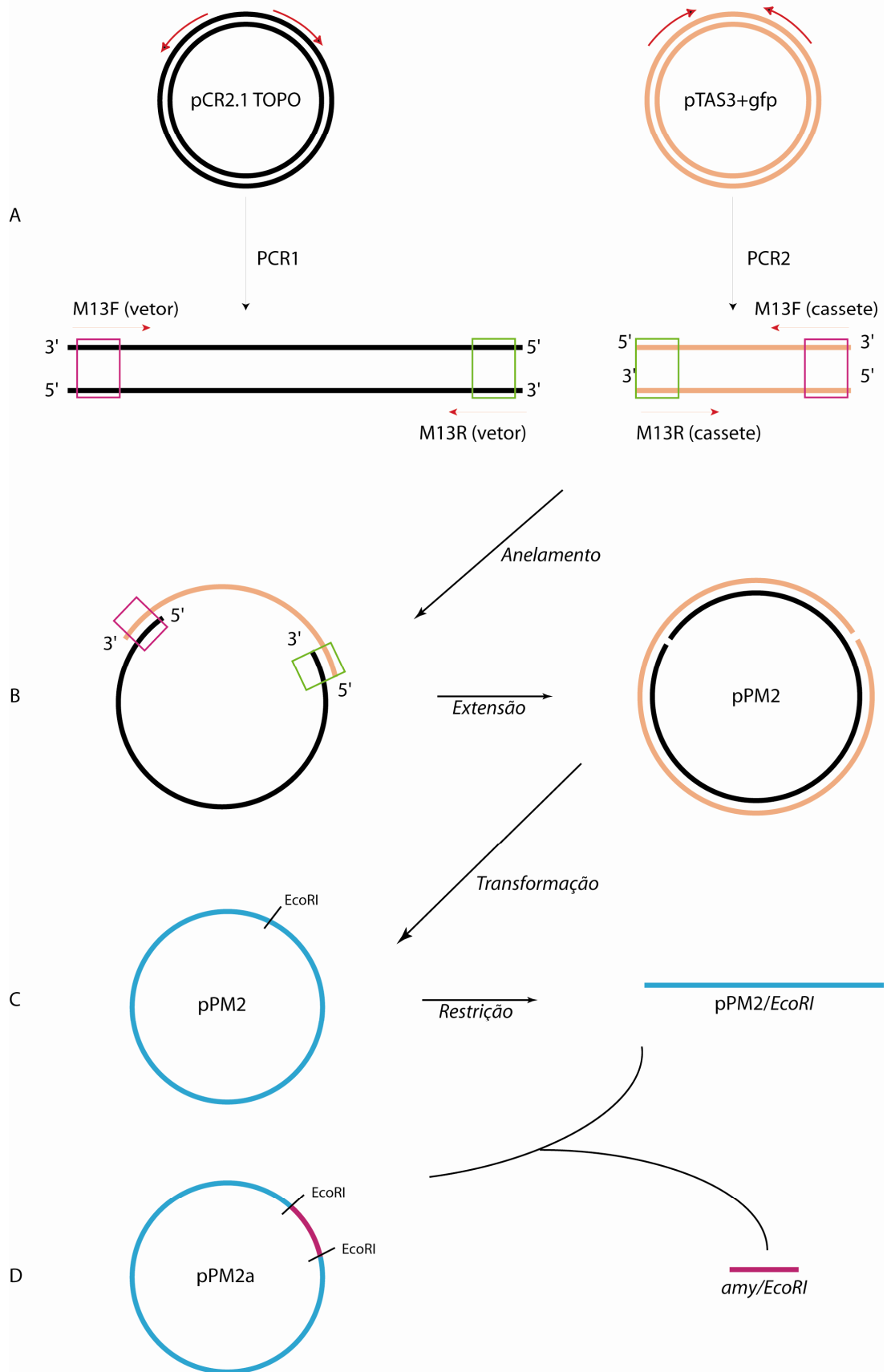
**Figura 1.** Lesões causadas por Xac em folhas (A), ramos (B) e frutos (C). Fotos extraídas de <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>.



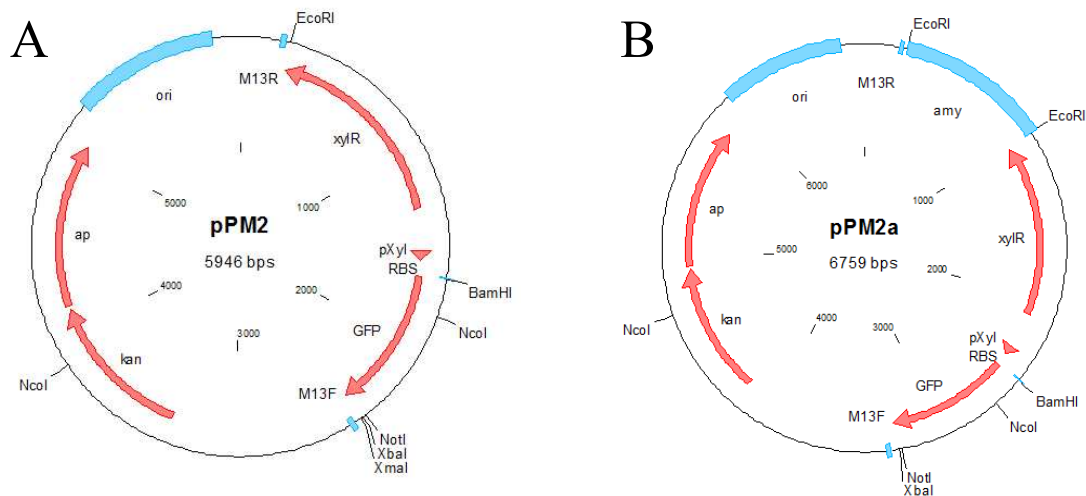
**Figura 2. (A)** Representação esquemática dos TAP-Tags C- e N-terminais. **(B)** Resumo da estratégia TAP de purificação (Puig *et al.*, 2001).



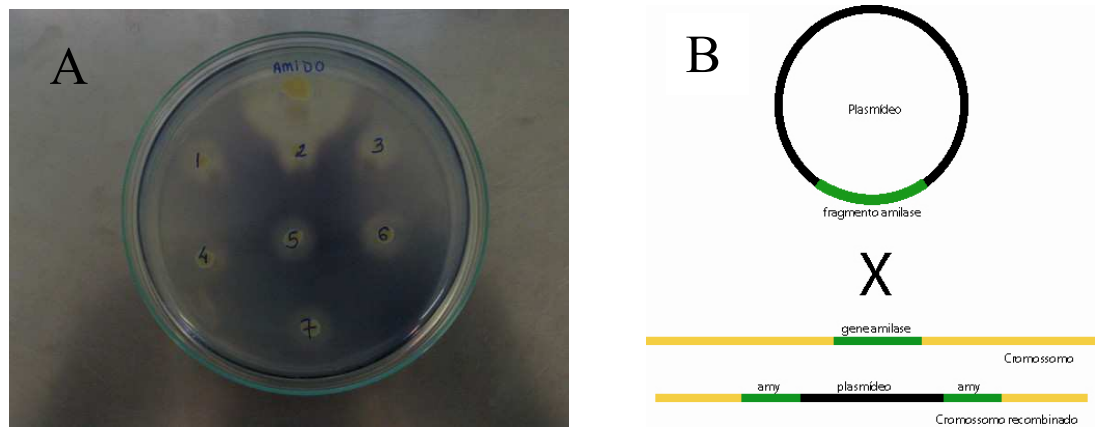
**Figura 3. Esquema construção de pTAS3.** O espaçador (oligo sintético) contendo RBS foi ligado em pUC18 (A), resultando no vetor pTAS1, ao qual foi ligado o promotor de xilose (isolado por restrição enzimática de pEA18), originando o vetor pTAS3 (B).



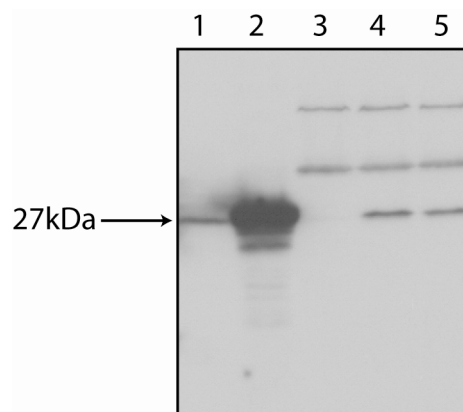
**Figura 4. Esquema de construção do vetor pPM2a.** A) O cassete de expressão GFP foi removido de pTAS3-*gfp* por PCR utilizando-se primers de seqüenciamento para pUC18, que anelam em regiões flanqueando o polylinker deste vetor (vetor usado como base para a construção de pTAS3-*gfp*); em outro PCR, removeu-se o polylinker do vetor comercial pCR2.1-TOPO, utilizando-se primers especialmente desenhados para tal (as setas vermelhas indicam o sentido). Finalmente, os produtos dos PCRs em A) foram ligados no passo B) através de uma reação de PCR sem adição de primers; note que as extremidades do produto do cassete sobrepõem as extremidades do produto de amplificação do vetor pCR2.1-TOPO, ocorrendo anelamento entre as seqüências complementares dos dois produtos (indicadas pelas caixas verde e rosa). Desta última reação de PCR resultou o vetor pPM2 (C), que foi transformado diretamente em DH10B. Após extração deste plasmídeo e subsequente digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, o vetor linearizado foi ligado ao fragmento *amy*, previamente tratado com *EcoRI*, resultando no vetor pPM2a (D).



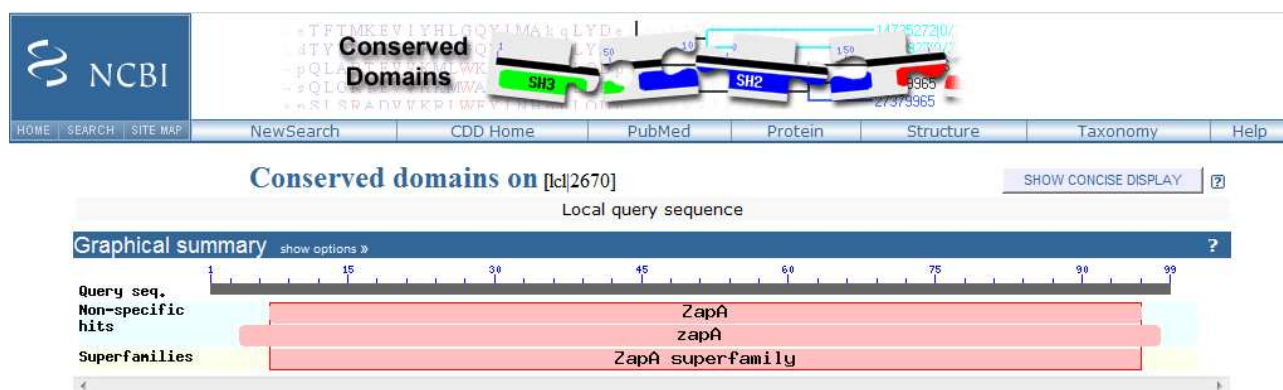
**Figura 5: Mapas dos vetores de expressão utilizados.** A) pPM2 e B) pPM2a (capaz de integrar-se no locus *amy*). Em ambos utilizam-se nas clonagens das ORFs, o sítio *Bam*HI para produção de peptídeo com GFP no C-terminal e *Xba*I (ou *Not*I) para produção de peptídeo com GFP no N-terminal



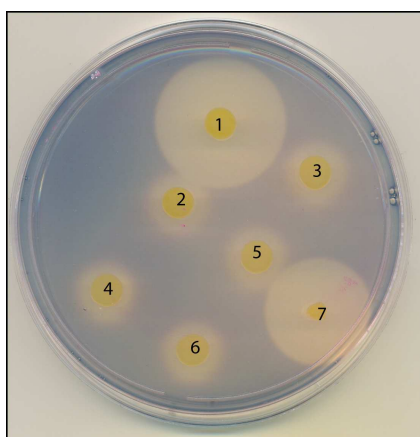
**Figura 6: Disrupção do locus *amy* por recombinação homóloga** A) Placa contendo meio NYG com amido 0,2%, na qual podem ser observados e comparados os halos resultantes da degradação deste açúcar (halos foram revelados através da exposição do meio de cultura a vapores de iodo). No alto, Xac selvagem, abaixo (numerados de 1 a 7), diferentes mutantes Xac *amy::pPM2a*. B) O fragmento *amy* presente no vetor pPM2a guia a recombinação do mesmo com o gene de  $\alpha$ -amilase do cromossomo de Xac, provocando a disrupção deste gene



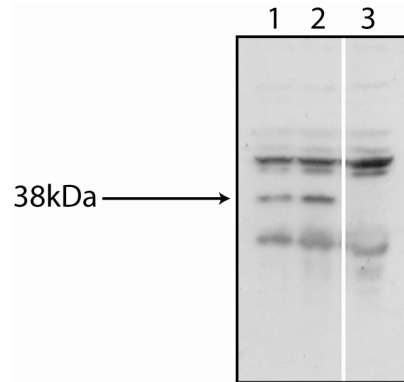
**Figura 7: Expressão de GFP a partir do vetor pPM2a.** *E. coli* DH10B contendo pPM2a e Xac *amy::pPM2a* foram cultivadas na presença e ausência de xilose, seguindo-se separação de proteínas totais em SDS-PAGE 12% e imunodeteção de GFP em proteínas transferidas para membrana de PVDF. Canaletas: 1) *E. coli* DH10B/pPM2a; 2) *E. coli* DH10B/pPM2a 0,5% xilose; 3) Xac selvagem, 4) Xac *amy::pPM2a*, e 5) Xac *amy::pPM2a* 0,5% xilose.



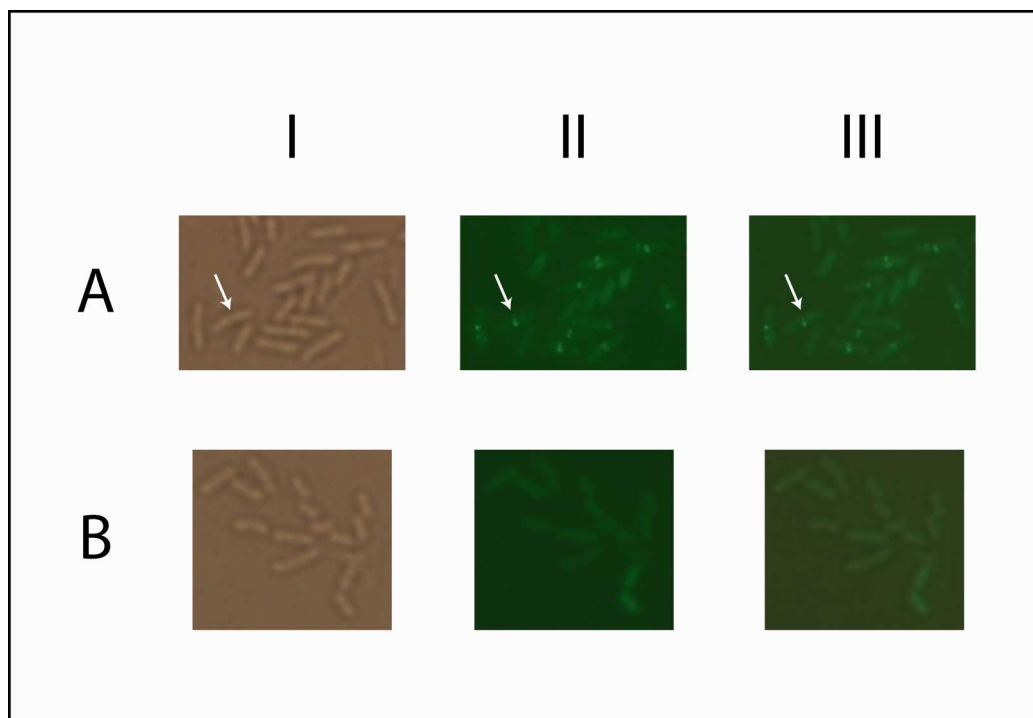
**Figura 8: Produto de XAC3408 analisado pelo algoritmo BLAST.** O polipeptídeo teoricamente codificado pela ORF XAC3408 foi confrontado à base de dados pública presente em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, demonstrando elevada similaridade à superfamília ZapA.



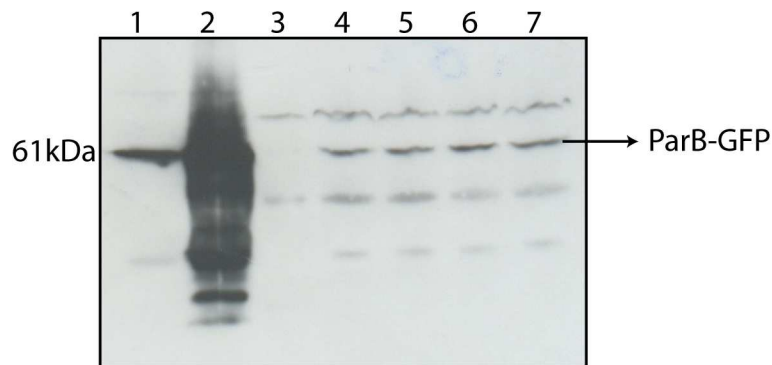
**Figura 9: Teste degradação de amido nos mutantes de Xac.** Placa contendo meio NYG com amido 0,2%, onde podem ser observados e comparados os halos resultantes da degradação deste açúcar pelos diferentes mutantes (halos foram revelados através da exposição do meio a vapores de iodo). No alto, Xac selvagem, abaixo (numerados de 2 a 7), diferentes mutantes Xac: 2) Xac *amy*::pPM2a-315, 3) Xac *amy*::pPM2a-1223; 4) Xac *amy*::pPM2a-1508; 5 e 6) Xac *amy*::pPM2a-*zapA*; 7) Xac XAC1991::pPM2a-1991



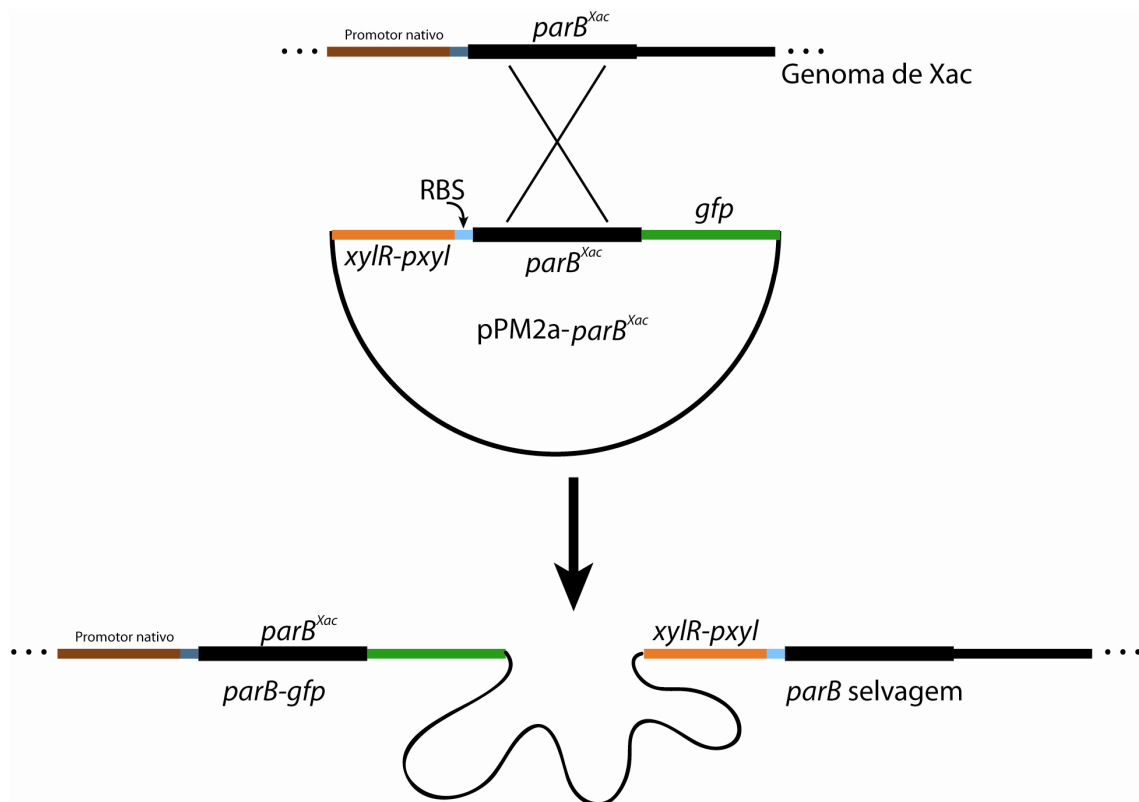
**Figura 10: Expressão da fusão GFP-ZapA<sup>Xac</sup> em Xac** *Xac amy::pPM2a-zapA<sup>Xac</sup>* foram cultivadas na presença e ausência de xilose (0,5% final), seguindo-se separação de proteínas totais em SDS-PAGE 10% e imunodeteção de GFP nas proteínas transferidas para membrana de PVDF. Canaletas: 1) *Xac amy::pPM2a-zapA<sup>Xac</sup>*, 2) *Xac amy::pPM2a-zapA<sup>Xac</sup>* + 0,5% xilose, 3) *Xac* selvagem



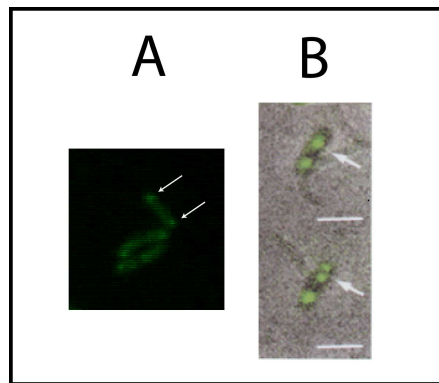
**Figura 11: Visualização de GFP-ZapA<sup>Xac</sup> no mutante Xac amy::pPM2a-zapA<sup>Xac</sup>.** As células foram crescidas em meio NYG até  $DO_{600} \sim 0,4$ , quando alíquotas foram retiradas e submetidas à visualização sob microscópio de fluorescência. Colunas: **I)** imagem das células em campo claro; **II)** imagem obtida através do filtro específico para GFP e **III)** sobreposição de I e II (destacando o contorno da célula). **A)** Mutante *Xac amy::pPM2a-zapA<sup>Xac</sup>* sendo possível observar a proteína GFP-ZapA<sup>Xac</sup> na região mediana da célula (setas brancas); **B)** a mesma linhagem mutante visualizada ao microscópio após tratamento com cloranfenicol (34 $\mu$ l/ml). Aumento de 1000x



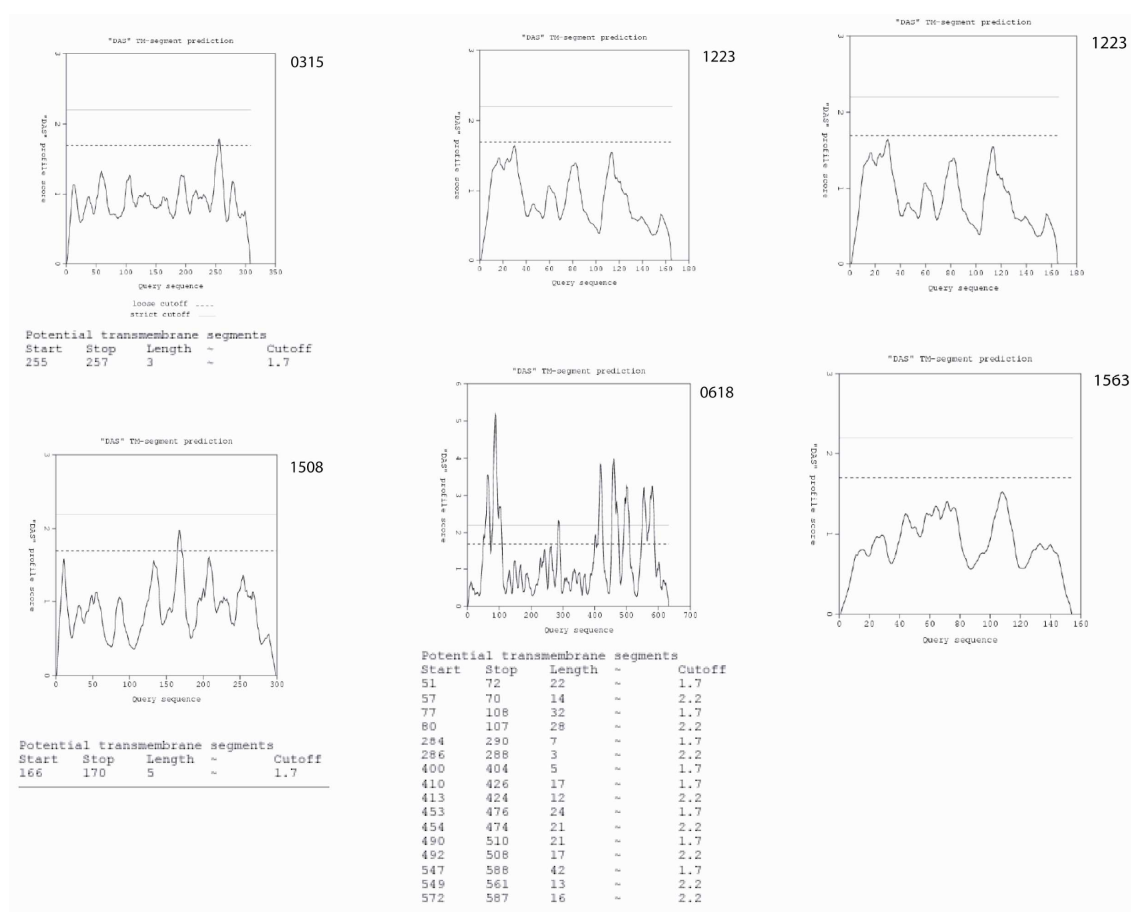
**Figura 12: Expressão da fusão ParB-GFP.** A expressão de ParB-GFP foi testada a partir de *E. coli* DH10B/pPM2-*parB* e de *Xac* *parB*::pPM2*parB*<sup>Xac</sup>. Linhagens foram cultivadas na presença e ausência de xilose, seguindo-se a separação de proteínas totais em SDS-PAGE 12% e imunodeteção de GFP nas proteínas transferidas para membrana de PVDF. Canaletas: 1) *E. coli* DH10B/pPM2-*parB*; 2) *E. coli* DH10B/pPM2-*parB* 0,5% xilose; 3) *Xac* selvagem, 4 a 7) quatro mutantes *Xac* *parB*::pPM2*parB*<sup>Xac</sup>



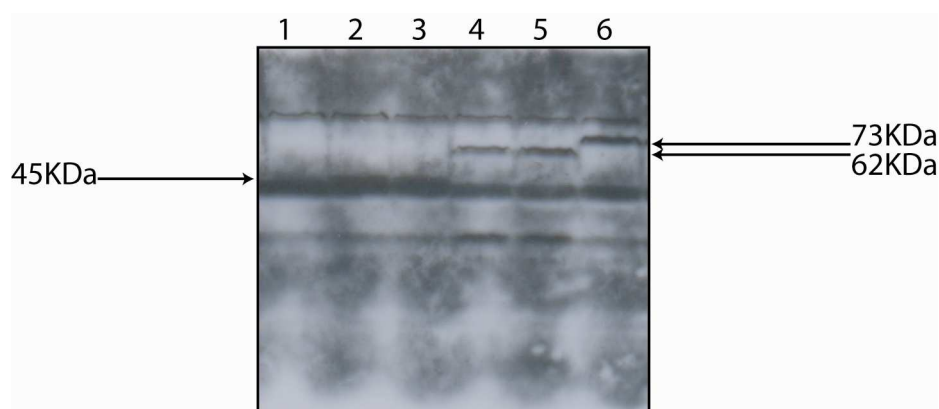
**Figura 13: Esquema de integração de pPM2-*parB*<sup>Xac</sup> no genoma de *Xac*.** Seguindo-se a integração do vetor pPM2-*parB*<sup>Xac</sup> no locus *parB*<sup>Xac</sup> do genoma de *Xac*, note que a cópia nativa (selvagem) ficará sob controle do promotor *pxyl* (laranja), enquanto a cópia com *gfp* (verde) responderá ao promotor nativo de *parB*<sup>Xac</sup> (marrom).



**Figura 14: Microscopia de fluorescência de *Xac parB<sup>Xac</sup>::pPM2-parB*.** **A)** mutante *Xac parB<sup>Xac</sup>::pPM2-parB* visualizado por microscópio de fluorescência (aumento de 1000x) onde é possível observar focos de localização no interior da célula (setas brancas). **B)** Sobreposição de imagens de fluorescência e contraste de fase obtidas de mutante de *Bacillus subtilis* expressando a proteína Spo0J-GFP (pontos verdes). O mesmo campo foi visualizado após 30 min (imagem de baixo) sendo possível observar a duplicação de um dos pontos (indicado pelas setas brancas). Escala 2µm, (adaptado de Glaser et al., 1997).



**Figura 15: Perfil de hidrofobicidade das prováveis proteínas de Xac codificadas pelas ORFs 315, 1223, 1508, 1563, 1991 e 618. A detecção de regiões hidrofóbicas foi realizada utilizando-se o aplicativo DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS>).**



**Figura 16: Expressão proteínas hipotéticas ligadas a GFP.** Mutantes contendo o vetor pPM2a ligado a algumas ORFs foram cultivados na presença e ausência de xilose, seguindo-se separação de proteínas totais em SDS-PAGE 12% e imunodeteção de GFP nas proteínas transferidas para membrana de PVDF. Canaletas: 1) *Xac* selvagem, 2) *Xac amy::pPM2a-1223*, 3) *Xac amy::pPM2a-1223* + 0,5% xilose, 4) *Xac amy::pPM2a-1508*, 5) *Xac amy::pPM2a-1508* + 0,5% xilose, 6) *Xac XAC1991::pPM2a-1991*

(página seguinte) **Figura 17: Visualização das proteínas em fusão a GFP nos mutantes.** As células foram crescidas em meio NYG líquido até D.O.<sub>600</sub> ~ 0,4, quando alíquotas foram retiradas e submetidas à microscopia. Colunas: **I)** Imagem em campo claro; **II)** mesmo campo de “I” observado através de filtro específico para GFP; **III)** sobreposição de I e II (destacando o contorno das células). **A)** controle positivo com o mutante *Xac amy::pPM2a*, que produz somente GFP, onde é possível notar o caráter difuso deste peptídeo pelo citoplasma da célula; **B)** Mutante *Xac amy::pPM2a-1508* onde é possível observar focos da proteína 1508-GFP na região polar das células (setas brancas); **C, D e E)** Mutantes *Xac amy::pPM2a-1223*, *Xac amy::pPM2a-1223* e *Xac XAC1991::pPM2a-1991* onde é possível visualizar, respectivamente, as proteínas 1223-GFP, 315-GFP e 1991-GFP. Aumento de 1000x.

