

**MONITORAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA
DE
Xanthomonas axonopodis pv. *citri* EM DIFERENTES
CONDIÇÕES AMBIENTAIS**

TÂNIA PAULA AQUINO DEFINA



Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular)

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Junho de 2003

Resumo

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* é um fitopatógeno causador do cancro cítrico que compromete parte da produção de laranjas do Estado de São Paulo, com reflexos negativos para a economia do Estado e do País.

Para que haja um controle futuro do cancro cítrico, vários pesquisadores se empenharam no Projeto Genoma-*Xanthomonas* visando desvendar o conjunto gênico desta bactéria e fornecer subsídios para a identificação dos genes envolvidos com a sua patogenicidade.

Neste sentido, o atual trabalho visa o monitoramento da expressão gênica do patógeno quando submetido a diferentes condições ambientais, tais como variações no pH extracelular e antibacterianos utilizando o *Differential Display* RT – PCR. Deste modo, obtivemos a expressão de genes importantes quando o microrganismo foi submetido ao pH 8.0 tais como: um gene relacionado a um transportador MFS, valina – piruvato aminotransferase, glucano 1,4- β -glucosidase e uma proteína hipotética conservada. Quando submetida à agentes inibidores como a ampicilina, a *Xanthomonas* expressou proteínas como a integrase, proteína de virulência e uma fosforibosilformilglicinamida ciclo ligase. Quando em meio de cultura contendo penicilina, a bactéria expressou o gene da tirosil t-RNA sintetase.

Há um grande interesse em desvendar os mecanismos de ataque da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, na sua interação com o vegetal e também suas estratégias para inibir o sistema de defesa do hospedeiro, promovendo o surgimento da doença. Neste sentido, espera-se que estes resultados, adicionados a outros projetos funcionais, possam fornecer informações quanto ao mecanismo de defesa da *Xanthomonas*, bem como da interação planta-bactéria e conseqüentemente auxiliar no controle do cancro cítrico.

Abstract

The bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is a pathogen causing citric canker that compromises part of the orange production in the State of São Paulo, with negative consequences for the economy of the State and the Country.

For the future control of citric canker, several investigators participated in the *Xanthomonas* Genome Project in order to determine the gene set of this bacterium and to contribute to the identification of the genes involved in its pathogenicity.

In this respect, the objective of the current study was to monitor the gene expression of the pathogen when submitted to different environmental conditions such as variation in extracellular pH, and to different antibacterial agents using Differential Display RT-PCR. Using this method we obtained the expression of important genes when the bacteria were submitted to pH 8.0, such as a gene related to an MFS transporter, valine-pyruvate aminotransferase, glucan 1,4- β -glucosidase and a conserved hypothetical protein. When submitted to the action of inhibitory agents such as ampicillin, *Xanthomonas* expressed various proteins, i.e., integrase, virulence protein and a phosphoribosylformylglycinamide cycloligase. In a culture containing penicillin, the bacteria expressed the gene of tyrosyl t-RNA synthetase.

There is great interest in determining the mechanisms of attack of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, its interaction with plants and also the strategies it uses to inhibit the defense system of the host, promoting the onset of the disease. In this respect, the present results, added to those obtained in other functional projects, are expected to provide information about the defense mechanism of *Xanthomonas* and about the plant-bacterium interaction in order to contribute to the control of citric canker.

1. Introdução

1.1. *Xanthomonas*

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são fitopatógenos de monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo muito destes hospedeiros de grande importância econômica incluindo os citrus, arroz, feijão, uva e algodão (www.fapesp.br). Estas bactérias pertencem ao grupo das Proteobactérias e sub classe γ , como também a *Xylella*, *Pseudomonas* e *Erwinia* (PRESTON *et al.*, 1998).

Os organismos deste gênero produzem, na sua maioria, um muco de cor amarela e de aspecto viscoso característico deste grupo. O muco é composto de mono ou dibromo arilpolienos chamado xantomonadina. Além disso, um polissacarídeo extracelular ligado à membrana, chamado xantana, é responsável pela viscosidade do muco.

As células são gram-negativas com o tamanho de 0,4 a 0,6 μm por 1,0 a 2,9 μm , aparecem sozinhas ou aos pares podendo formar cadeias. Ocasionalmente, são observadas células filamentosas e freqüentemente se movem por meio de um flagelo bipolar.

A *Xanthomonas axonopodis*, que possui as mesmas características já descritas para o gênero, apresenta diversos patovares que se diferenciam pela especialização com o hospedeiro e pelos substratos metabólicos. O atual estudo se propõe a desenvolver experimentos com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, um patovar que infecta espécies de laranja (*Citrus sienensis*).

1.2 Patogenicidade de *Xanthomonas* e *Xylella*

Existem pragas agrícolas que causam um grande prejuízo econômico, pois tais doenças não têm ainda um tratamento estabelecido. Isto se deve ao processo de invasão bastante eficiente de microrganismos como a *Xanthomonas axonopodis* pv.

citri (Figura 1.A), causadora do cancro cítrico, e a *Xylella fastidiosa* (Figura 1.C) causadora da Clorose Variegada dos Cítrus (o amarelinho).

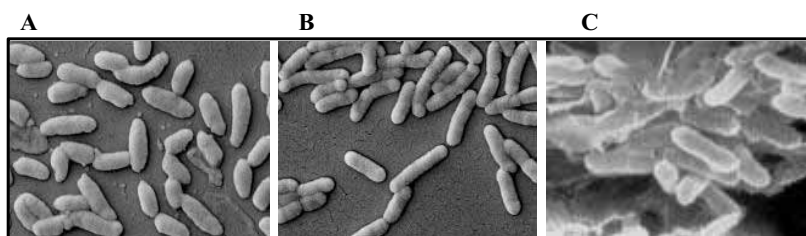


Figura 1: A- *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, B- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, C- *Xylella fastidiosa* (www.fapesp.br).

A fitopatogenicidade da *Xanthomonas* é um fenômeno bastante complexo e envolve várias etapas, iniciando-se pela penetração no hospedeiro, e em seguida a multiplicação que, em algumas espécies de *Xanthomonas*, ocorre no tecido vascular da célula hospedeira. Nesta etapa, há um aumento na permeabilidade da membrana da planta e por isso a perda de nutrientes da célula vegetal é grande. A infecção nas folhas ou no tecido vascular promovem a degradação das células vegetais adjacentes, degeneração das organelas e a parede vegetal é fragmentada, entre outros prejuízos ao hospedeiro. Os sintomas causados por estes microrganismos podem ser: clorose, necrose, hiperplasia e o cancro. Tal patógeno é descrito como biotrófico, capaz de viver no tecido do hospedeiro e também como necrogênico, porque causa necrose na célula vegetal. A melhor descrição poderia ser hemibiotróficos porque, inicialmente, a bactéria vive na célula hospedeira, posteriormente, rompe e mata a célula vegetal utilizando-se dos nutrientes provenientes deste processo (JAMES *et al.*, 1999)

A interação entre a planta e o patógeno é um processo dinâmico, como já mencionado, que envolve uma cascata de “sinais” ativando o sistema de defesa da planta, bem como estratégias de infecção do microrganismo. Um aspecto bastante relevante é a regulação dos genes de patogenicidade em situações ambientais e fisiológicas de estresse durante o processo infeccioso. Essa expressão é regulada por fatores como pH e densidade osmótica do meio ambiente, além dos “sinais” de

defesa emitidos pela planta como as proteínas R (RAHME *et al.*, 1992). Deste modo, genes envolvidos na interação planta-hospedeiro são classificados em quatro categorias não necessariamente exclusivas:

1. Genes que se expressam no hospedeiro, mas não necessariamente resultam em sintomas na planta;
2. Genes que determinam o(s) hospedeiro(s), por exemplo: *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* infecta algodão; *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* que infecta arroz; *Xanthomonas campestris* pv. *citumelo* que infecta uva e citrus; *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infecta tomate e pimenta;
3. Genes de Patogenicidade (*hrp*) que necessariamente provocam sintomas na planta. Estes genes são responsáveis pela patogenicidade da bactéria e por um mecanismo de defesa da planta, a Resposta Hipersensitiva;
4. Genes de Avirulência (*avr*) estão relacionados com a virulência de um patovar na população hospedeira. Os *avrs* atuam como fatores negativos uma vez que limitam a virulência bacteriana e a presença destes genes possibilita a Resposta Hipersensitiva (HR) na planta. A HR é caracterizada pela morte celular programada no tecido vegetal infectado e este fenômeno pode atenuar a doença. Assim, mutações tanto nos *avr* como nos genes *R*, genes de resistência da planta, podem resultar numa ausência de HR e assim a doença pode ser estabelecida. Os genes *avrs* codificam proteínas caracterizadas por uma sequência bastante conservada de aminoácidos repetidos. Modificações na sequência ou no número de repetições podem eliminar a avirulência e em alguns casos podem causar novas características de avirulência.

O gene *pthA*, relacionado a patogenicidade e avirulência, de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* confere a habilidade do fitopatógeno em causar o cancro cítrico e induzir HR em outros hospedeiros. A transferência deste gene para outros

patovares de *Xanthomonas* (como pv. *alfalfae* e *citrumelo*) pode promover nestes organismos a capacidade de causar o cancro cítrico.

Aparentemente, a ocorrência ou não da infecção depende de uma complexa interação entre os produtos dos genes de avirulência e de patogenicidade dos patógenos com os produtos dos genes de resistência (*R*) das plantas. Há evidências que esta interação ocorre no citoplasma vegetal e isto implica na existência de um mecanismo de transferência de proteínas avrs e pth da bactéria para a planta. Os genes *hrp* estão envolvidos, pois codificam proteínas que compõem o Sistema de Secreção tipo III esquematizado na figura 2. No entanto, há outros determinantes de virulência como os Sistemas de Secreção I, II ou IV.

A diferença no tamanho do genoma de *Xylella fastidiosa* (~ 2,7 Mb) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Figura 1.B) (~5.5Mb) provavelmente reflete as estratégias diferentes para causar doenças e capacidade de crescimento dos dois organismos dentro do hospedeiro. A *X. fastidiosa* depende do rompimento da folha para sua infecção e está limitada ao xilema do hospedeiro. A *X. campestris* pv. *campestris* pode infectar folhas intactas, penetrando pelos estômatos abertos ou hidatódios e é capaz de crescer e sobreviver nas folhas e no solo.

Uma importante diferença entre os dois organismos é a ausência em *X. fastidiosa* do sistema de secreção tipo III. Isto sugere que seria desnecessário tal sistema uma vez que sua infecção é mediada por insetos e talvez por isto não haja a necessidade de um genoma maior, capaz de codificar um maior número de proteínas relacionadas ao processo infeccioso. Além disso, um rastreamento no genoma da *Xylella* revelou a inexistência de seqüências de genes *avrs* (DOW e DANIELS, 2000). A patogenicidade de *X. fastidiosa* não requer a síntese de Avrs, de supressão dos processos específicos de sobrevivência da célula hospedeira, mas é capaz de destruir a célula do vegetal, ao contrário de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae*, por exemplo, que utilizando o sistema de secreção tipo III colonizam o xilema e a morte celular pode não ocorrer.

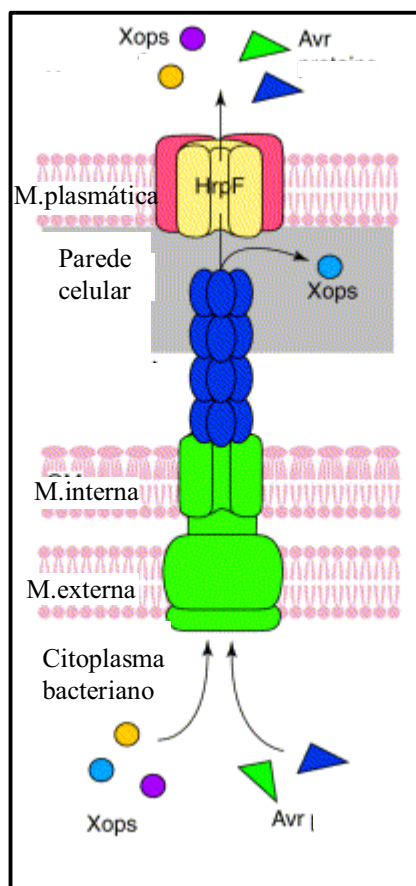


Figura 2: Modelo de aparato do Sistema de Secreção tipo III de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Em verde está representado o complexo protéico que atravessa a membrana e parede celular do patógeno. Em roxo está representado o complexo protéico que forma o longo pilus bacteriano localizado no espaço intercelular e que penetra na célula hospedeira por HrpF (em amarelo e vermelho) atravessando a parede celular da planta. Longo pilus extracelular. As Avr e os Fatores de Virulência (Xops) são translocados para o citoplasma da célula da planta (extraído de BÜTTNER e BONAS, 2002).

Apesar das características distintas, há algumas similaridades quanto aos produtos e a organização dos genes de patogenicidade destes fitopatógenos (DOW e DANIELS, 2000). O sistema de secreção tipo II é identificado tanto em *X. fastidiosa* como em *X. campestris* pv. *campestris* e em *X. oryzae*. Em *X. fastidiosa*

está envolvido no transporte de enzimas incluindo as endoglucanases, poligalactorunases e as proteases. Uma possível função para estas enzimas na patogenicidade de *X. fastidiosa* é degradar compostos da membrana, promovendo falhas no tecido e contribuindo para a movimentação do patógeno prevista para vasos do xilema. No caso das *Xanthomonas*, ocorre a exportação de enzimas extracelulares (pectinas, celulase e glicoproteínas) capazes de degradar componentes da matriz extracelular da célula hospedeira.

Muitos dos genes identificados em *Xanthomonas* estão relacionados com virulência ou com biossíntese de um polissacarídeo extracelular, a xantana, de grande importância industrial e determinante no processo de virulência e adesão à célula hospedeira. A xantana é um polímero de unidades repetidas, cuja biossíntese acredita-se que esteja relacionada com codificadores que estão localizados em um *cluster* identificando ORFs, *gumB* a *gumM*. Da mesma forma, o genoma de *X. fastidiosa* contém *gumBCDEFHJKM*, no entanto, pesquisas utilizando o BLAST revelaram que outros produtos são codificados pela seqüências de *gumL* ou *gumI* (DOW e DANIELS, 2000). Desta forma, estes polissacarídeos são também considerados determinantes de virulência, como as já citadas proteínas relacionadas com os sistemas de secreção.

Genes que codificam fatores de virulência em *Xanthomonas* são objetos de uma coordenada regulação, capazes de responder aos sinais do meio ambiente que talvez sejam encontrados durante o processo evolutivo. Alguns dos determinantes de virulência atuam suprimindo a resposta de defesa da planta e promovem as doenças, outros ainda atuam promovendo a liberação de nutrientes da célula hospedeira. Há casos de proteínas efetoras que são secretadas e podem ativar o sistema de defesa da planta e, assim, são determinantes de avirulência.

1.3 Cancro Cítrico

O cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na Ásia, na África, na

América do Norte e América do Sul. Sua disseminação ocorre pelo vento, chuva e também na manipulação de instrumentos agrícolas contaminados. A bactéria invade o tecido vegetal através dos estômatos ou poros ou ainda através de lesões deste tecido causado pelo homem ou por insetos (www.fapesp.br, www.biotech.ufl.edu/~pcfcl/canker.htm).

Os primeiros sintomas da doença surgem com a formação de uma marca circular de 2 a 10 mm de diâmetro e de aparência de uma bolha (www.fundecitrus.com.br). Posteriormente, na superfície epidérmica surgem lesões resultantes de divisões mitóticas excessivas induzidas pela bactéria. Estas lesões aumentam de tamanho, tornam-se espessas, escurecem e adquirem um aspecto rugoso. Ocorre então a desfoliação e a queda prematura dos frutos das plantas afetadas (www.biotech.ufl.edu/~pcfcl/canker.htm) (Figura 3).



Figura 3: Alguns sintomas do cancro cítrico como manchas escuras no fruto e na folha, além do apodrecimento do caule (www.fundecitrus.com.br).

A PCR é o principal método de diagnóstico de doenças de plantas. No entanto, a aplicação desta ferramenta para a detecção de fitopatógeno no tecido vegetal é limitada por fatores da planta que inibem a amplificação de ácidos nucléicos. Esta condição pode resultar em falso-negativo, mascarando a presença do patógeno (CUBERO *et al.*, 2001).

Como não há um método eficiente para identificar as árvores infectadas antes do aparecimento dos sintomas e o controle químico da doença não é eficaz, os

pomares infectados são destruídos pela queima de plantas infectadas e das não infectadas que estão nas proximidades. Isto vem causando um grande prejuízo econômico para o produtor e, conseqüentemente, para o Estado de São Paulo, responsável por um terço da produção mundial de laranja (www.fundecitrus.com.br). Além disso, o número de plantas contaminadas vem crescendo exponencialmente, sendo o oeste paulista a região de maior incidência.

O aumento de focos de infecção também está ocorrendo na região da Flórida, USA. O esforço para a erradicação do cancro cítrico neste país, através da destruição das árvores contaminadas, está custando mais de US\$ 200 milhões por ano, no maior programa governamental já dirigido à uma doença de planta (BROWN, 2001).

A melhor defesa contra pragas de plantas é a resistência natural, que poderia ser transferida entre espécie de cruzamento. No entanto, esta estratégia é demorada e os patógenos evoluem rapidamente para contornar suas adversidades (MOFFAT, 2001). Embora o conhecimento dos processos moleculares envolvidos na patogenicidade das *Xanthomonas* vem aumentando, pouco é conhecido sobre os mecanismos que controlam o início da infecção ou mesmo sobre a especificidade destes patógenos a um hospedeiro.

Somente através da compreensão da natureza da interação bactéria-planta e da identificação dos genes envolvidos nesta interação seremos capazes de desenvolver novas estratégias de controle de *X. axonopodis* pv. *citri* para proteger as plantas cítricas.

1.4 Mudanças Adaptativas

Acredita-se que a maior parte dos microrganismos responda às mudanças químicas e físicas do ambiente com alterações em seu padrão de expressão gênica, levando a uma resposta adaptativa que pode envolver as vias metabólicas intracelulares ou a síntese de moléculas que serão exportadas e poderão modificar o ambiente. A secreção de biomoléculas é provavelmente uma das estratégias de

sobrevivência mais importantes entre os microrganismos.

1.4.1 pH

Muitos processos celulares, tais como a fagocitose, a condutividade de canais iônicos, o ciclo celular, a atuação de elementos contrácteis como a actina, a miosina e os microtúbulos e a expressão dos genes de defesa são modulados ou influenciados por oscilações nos valores de pH intracelular em vários organismos.

O sensoramento e a resposta aos sinais ambientais é crucial para a patogenicidade bacteriana. Para a progressão bem sucedida da infecção, a expressão de genes de virulência é coordenada em resposta à sinais específicos no organismo hospedeiro, que dependem de uma complexa interação entre os produtos dos genes de virulência e/ou patogenicidade com os genes de resistência da planta (DEIWICK e HENSEL, 1999). Há evidências que pelo menos uma parte desta interação ocorra no citoplasma da planta e também no núcleo onde é determinado o padrão de expressão gênica do hospedeiro. Isto implica na existência de mecanismos de transferência de proteínas da bactéria para a planta e os genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) de *Xanthomonas* poderiam estar envolvidos neste processo.

Além disso, o peróxido de hidrogênio e superóxido de oxigênio, que são Espécies Reativas de Oxigênio (ROS– *Reactive Oxygen Species*) também são produzidas durante HR (*Hypersensitive Response*, um tipo de resposta de defesa da planta). Elas apresentam diferentes funções durante a resposta de defesa da planta. Além de servirem como sinalizadores para o reforço da membrana (a lignificação requer H_2O_2) (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996), quando em excesso, podem causar danos celulares tanto no patógeno quanto no hospedeiro e induzir a morte celular (COHN *et al.*, 2001). Este processo oxidativo ocorre num reflexo da planta à ativação de uma oxidase NADPH. Se fizermos uma comparação com os mecanismos de defesa dos mamíferos, iremos observar que o processo oxidativo também é observado em neutrófilos dos mamíferos (GROOM *et al.*, 1996), onde as

mitocôndrias desempenham um papel fundamental na interpretação dos sinais de estresse celular a que a célula é submetida diante do invasor. Quando esta organela reconhece alterações nos níveis de energia celular, nas condições de pH, na concentração iônica (principalmente Ca^{2+}) e na concentração de glicose, elas ativam a liberação de proteínas (como o citocromo c que é liberado para o citossol) que passam a constituir complexos protéicos responsáveis pela ativação de uma cascata de eventos que desencadeiam o processo de morte celular. Como já foram identificadas várias moléculas comuns, entre plantas e estes animais, é possível que o processo de morte celular em vegetais seja semelhante ao processo que ocorre em mamíferos (LAM *et al.*, 2001). Deste modo, é bastante provável que o mecanismo de patogenicidade bacteriana, isto é da *Xac*, esteja relacionado direta ou indiretamente com o monitoramento do pH extracelular.

Um exemplo da interferência do pH extracelular que poderia ser citado está relacionado à *Escherichia coli*. Condições básicas ou ácidas tem efeito significativo no crescimento da bactéria e alterações do pH intra ou extracelular induzem diferentes genes (SLONCZEWSK *et al.*, 1999). Um grupo de genes de *Salmonella typhimurium* também responde a uma variedade de sinais ambientais inclusive ao pH (HEITHOFF *et al.*, 1999). O estudo do padrão de expressão destes genes revelou não somente a versatilidade inerente do patógeno em expressar certos genes em vários hospedeiros, como também a habilidade de modificar suas expressões dependendo do hospedeiro, do tecido, etc. Sabe-se que o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* é um organismo versátil e que pode crescer em várias condições nutricionais e também em variações extremas de pH (ROSSI e ARST, 1990). Isto implica na regulação do pH homeostático, onde as variações de pH não são amplas, e no monitoramento do pH extracelular, para que sejam sintetizadas permeases e secretadas enzimas que efetivamente funcionem no meio externo, como por exemplo, a secreção de fosfatase ácida em meio ácido e fosfatase alcalina em meio alcalino. Neste fungo a regulação da expressão gênica em resposta ao pH de cultivo depende de genes possivelmente envolvidos na regulação dessas enzimas

extracelulares e permeases. Através do isolamento e análise genética de vários mutantes, observou-se que em concentrações limitantes de fosfato e em pH 6,5, os mutantes *pal* (A, B, C, F, H e I) apresentam níveis altos de fosfatase alcalina e níveis baixos de fosfatase ácida.

1.4.2 Agentes Inibidores

Além das alterações de pH, a habilidade de resistir aos componentes tóxicos no ambiente natural é um importante mecanismo adaptativo entre os microrganismos. Durante o processo de infecção de uma planta são produzidas substâncias de defesa com a finalidade de protegê-la do agente infeccioso. Porém, os microrganismos dispõem de mecanismos que os permitem escapar do sistema de defesa da planta hospedeira. Somente os patógenos que conseguem resistir a esse sistema de defesa da planta, nos estágios iniciais de infecção, são capazes de sobreviver e desenvolver a doença.

O mesmo princípio pode ser aplicado quando aos agentes inibidores são antibióticos. Estes agentes podem matar bactérias (bactericida) ou simplesmente anular o seu crescimento (bacteriostático). Muitos dos antibióticos são produtos naturais elaborados por micróbios (bactérias ou fungos) como uma arma química, freqüentemente usado em períodos de super população, para matar outros micróbios no microambiente vizinho (WALSH, 2000).

Desde o seqüenciamento do genoma da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, linhagem 306, os possíveis genes de resistência a agentes inibidores foram identificados. Assim, foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (MIC) desta bactéria quando submetida à algumas drogas como: acriflavina, ampicilina, cloranfenicol, penicilina, kanamicina e tetraciclina. Com estes resultados foi possível analisar níveis de resistência a estes agentes inibidores e compará-los com a linhagem K12 de *E. coli* (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2002).

Vários mecanismos de resistência encontrados em microrganismos patogênicos estão freqüentemente presentes em diferentes combinações e incluem: inativação

das drogas por enzimas, alteração de alvos resultando na diminuição de afinidade, mudança na atividade celular da enzima alvo ou enzimas ativadoras, aumento no reparo de DNA, baixa permeabilidade à droga e efluxo ativo (KOLACZKOWSKI e GOFFEAU, 1997).

O efluxo ativo, por exemplo, é uma estratégia para prevenir o acesso de compostos tóxicos a alvos intracelulares através de proteínas transportadoras presentes na membrana celular. Atualmente, acredita-se que as bombas efluxo de antibióticos e outros inibidores contribuem significativamente para resistência bacteriana adquirida por causa de sua ampla variedade de substratos que reconhecem sua expressão em patógenos importantes e sua cooperação com outros mecanismos de resistência (VAN BAMBEKE *et al.*, 2000).

Canais de porinas, uma família de proteínas, localizados na membrana citoplasmática e no periplasma, atuam como barreira restringindo a passagem de vários solutos e sem gasto de energia (NIKAIDO, 2001). Em *E. coli*, esta família de proteínas é representada pelas porinas OmpA, que estão relacionadas à resistência a algumas cefalosporinas e aos beta-lactâmicos (NIKAIDO e NORMARK, 1987). Então, estas porinas podem estar relacionadas a um processo adaptativo do organismo, seja no efluxo ou influxo de moléculas em resposta a situações adversas à bactéria. A presença da ORF XAC4775, similar a OmpA de *E. coli* sugere que este, assim como as bombas de efluxo, seja um mecanismo de redução do influxo de drogas e pode estar presente em *Xac* (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2002).

Deste modo, o conhecimento do conjunto gênico que se expressa em funcionamento da presença de inibidores no meio de cultivo, fornecerá informações relevantes quanto aos mecanismos utilizados pelas bactérias para responder a agentes tóxicos relevando prováveis alvos para o desenvolvimento de drogas que combatam o patógeno.

1.5 *Differential Display (DDRT-PCR)*

Há dois caminhos que possibilitam a análise da expressão gênica: (1) através da expressão de RNAm (transcricional) e (2) do estudo de proteomas, relacionados a expressão de proteínas (pós-transcricional). Neste trabalho, a expressão gênica de *Xac* foi monitorada através da técnica do DDRT-PCR, utilizada desde 1992, quando foi introduzida por Liang e Pardee. O principal objetivo desta técnica era a identificação de genes eucarióticos e constituída basicamente por duas etapas como mostra a figura 4. A primeira é uma reação de transcrição reversa das populações de RNA mensageiro a serem analisadas, usando um oligo-dT ancorado em uma (A, C ou G) ou duas bases (MN onde M pode ser A, C ou G e N pode ser A, C, G ou T) em suas extremidade 3' e que em teoria anela na cauda poli (A) de uma das subpopulações de mRNA celular (LIANG e PARDEE, 1992; LIANG *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1994). A segunda etapa é a amplificação dos cDNAs obtidos por uma reação de PCR. Nesta reação são usados como oligonucleotídeos o mesmo oligo-dT da primeira reação e um outro, de sequência arbitrária. Em seguida, os fragmentos de cDNA obtidos são separados em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, e então é feita a comparação entre os fragmentos de cDNA das diferentes populações de RNA (LIANG e PARDEE, 1992; LIANG *et al.*, 1993).

O uso de oligos-dT ancorados por uma ou duas bases permite a análise das diferentes subpopulações de RNA mensageiro total de uma célula. Utilizando o oligo-dT ancorado em uma base é possível teoricamente analisar a expressão de 1/3 da população de mRNA, enquanto que o uso do oligo-dTMN, ancorado por duas bases, 1/12 dos mRNA da célula poderão ser estudados. Então, o uso dos 12 oligo-dTMN ancorados em conjunto com os 20 oligos arbitrários, inicialmente descritos por Liang e Pardee em 1992, seriam suficientes para produzir fragmentos de cDNA representando aproximadamente 15000 genes expressos. Em 1993, Bauer e outros pesquisadores desenharam 26 novos oligos arbitrários e

sugeriram que o uso de pelo menos 25 destes seriam necessários para ter toda a população de mRNA representada pela células eucarióticas.

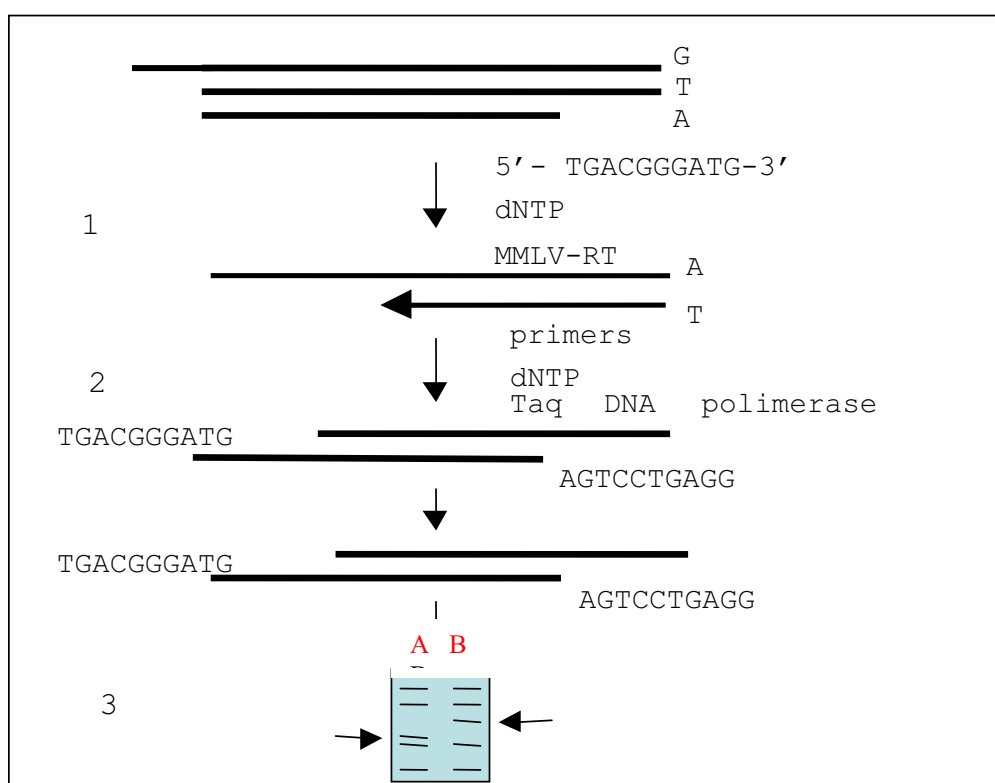


Figura 4: Esquema representativo de um ensaio de *Differential Display*. 1. Fragmentos diferentes, provenientes de diferentes tratamentos, são submetidos a reações com a transcriptase reversa (M-MLV-RT, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase gene) e oligonucleotídeo ancorador. 2. Amplificação dos diferentes cDNAs na presença do oligo ancorador e pelo menos mais um oligo. 3. Genes diferencialmente expressados são detectados através da identificação de fragmentos de DNA exclusivos nos tratamentos A e B (Modificado de KOZIAN e KIRSCHBAUM, 1999).

O *Differential Display*, desde sua primeira publicação, foi considerado como uma rápida estratégia para a comparação da expressão diferenciada de genes em eucariotos. Outras vantagens da DDRT-PCR, em relação à metodologias

alternativas, são a simplicidade e a rapidez das reações; a possibilidade de comparação entre diversas células submetidas a diferentes estímulos e condições; a sua reprodutibilidade e a sua sensibilidade com possibilidade de detecção virtual de todos o RNAm expressados quando são utilizadas várias combinações de oligonucleotídeos (STURTEVANT, 2000). O uso do *Differential Display* é recomendado quando a quantidade de RNA é um fator limitante, pois trata-se de uma técnica que requer pouca quantidade de RNA (20-200ng) (LIANG *et al.*, 1993).

Nestes ensaios, um dos pontos críticos que poderia comprometer os resultados obtidos está relacionado a pureza do RNA, uma vez que qualquer vestígio de DNA genômico poderia alterar o anelamento dos oligonucleotídeos. DDRT-PCR é um método poderoso para a identificação de genes expressos diferencialmente, contudo, não é um método quantitativo (LIANG *et al.*, 1993). Além disso, há alguns problemas associados com a utilização do DDRT-PCR, sendo os mais importantes: (1) a necessidade de técnicas complementares para a confirmação da expressão diferencial, (2) a grande frequência dos falso positivos, (3) a baixa sensibilidade na identificação de genes raros e (4) a clonagem de seqüências pequenas correspondendo geralmente à região 3' não traduzida do gene e que trazem pouca informação para a identificação do gene expresso diferencialmente (BERTIOLI *et al.*, 1995; WAN *et al.*, 1996).

DDRT-PCR tem sido aplicada para investigar os mecanismos moleculares envolvidos em processos biológicos em eucariotos, como por exemplo na diferenciação e no ciclo celular (NAG e AXELROD, 1998, BROWN *et al.*, 1999), nas vias de transdução de sinal (CATALDO *et al.*, 1999; RHODES *et al.*, 2001), no estudo de resistência a drogas (FANCIULLI *et al.*, 1996; MIURA *et al.*, 2001). Modificações na técnica original tem permitido o uso da DDRT-PCR também em procariotos (FLEMING *et al.*, 1998).

Em fungos, de um modo geral, a DDRT-PCR tem sido intensamente usada na investigação dos mais diferentes processos biológicos (JOSHI *et al.*, 1997;

BIRCH, 1998; HARRIER *et al.*, 1998, STURTEVANT, 2000; NOZAWA *et al.*, 2003). Em *Neurospora crassa*, um gene homólogo ao *pacC* de *Aspergillus nidulans* foi relacionado a secreção da fosfatase ácida, quando o fungo foi submetido a um meio ácido. Além disso, o *pacC*-1 pode estar envolvido na regulação de modificações pós-transducionais das fosfatases secretadas por este fungo e que são necessárias para a secreção de uma enzima adaptada para as condições do meio extracelular, além da possível participação do gene *pacC*-1 na regulação da transcrição dos genes estruturais dessas enzimas (NOZAWA, 2002).

Assim, a observação da expressão gênica da *Xac* em diferentes pHs seria importante para a identificação dos mecanismos de adaptação desta bactéria.

2. Objetivos:

O seqüenciamento completo de muito genomas, inclusive o genoma humano, iniciou uma nova era caracterizada pelo estudo do papel funcional dos diferentes genes e como estes genes estão relacionados uns com os outros. A estratégia de análise da expressão gênica tem sido subdividida em domínios “omic” distintos, como: “*genomics, proteomics e metabolomics*” (MUTCH, *et al.*, 2002). Portanto, os estudos funcionais não examinam apenas os elementos gênicos de um organismo, mas também seu produto gênico, a interação deste produto com seu meio celular e com o metabolismo correspondente.

Diante deste atual período da pesquisa científica, o presente trabalho tem como objetivo compreender os mecanismos da regulação da expressão gênica de *X. axonopodis* pv. *citri* que estejam envolvidos nas respostas ao estresse celular, mais especificamente as respostas adaptativas às variações do pH ambiental e ao contato com agentes inibidores. A síntese de proteínas em resposta ao estresse celular é reconhecida como um modo de sobrevivência celular e adaptações às condições adversas. Neste caso específico pode revelar também proteínas que estejam relacionadas ao mecanismo de ação ou de resistência a um agente inibidor ou ainda envolvidas na patogenicidade. Portanto, são reveladas proteínas que podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas ou modificação das já existentes.

Com o intuito de atingir estes objetivos, foi utilizado para a expressão diferencial dos genes o *Differential Display* –RT PCR que tem como objetivo a comparação de genes de *Xac* que podem se expressar diferencialmente em várias condições ambientais.

3. Material e Métodos

3.1 Linhagem

Para a realização deste trabalho foi utilizada a linhagem denominada 306 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro (UNESP-Jaboticabal). Trata-se da mesma linhagem cujo genoma foi inteiramente seqüenciado (da SILVA *et al.*, 2002) e isolada de *Citrus sienensis* (do Paraná).

3.2. Manutenção da Linhagem

A linhagem 306 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi mantida em dois tipos de estoque:

A. Estoque em Glicerol

Estoque foi obtido a partir de uma colônia isolada do fitopatógeno foi inoculada em 2 mL de meio de cultura líquido Nutrient Broth (NB) e mantido sob agitação a 28 °C por 24 horas. Após este período, 100 µL desta suspensão foi adicionada a 100 µL de uma solução de glicerol 50% (v/v) para a obtenção de um estoque permanente de *Xac*, submetido a – 80 °C.

B. Estoque em Tampão Fosfato

Este estoque foi obtido a partir de uma alíquota do estoque em glicerol, que foi estriada em meio de cultura NB sólido. Uma colônia isolada do fitopatógeno foi inoculada em 20 µL de tampão fosfato e assim, esta solução foi mantida à temperatura ambiente. Este tipo de estoque foi utilizado para preservar o máximo possível o estoque permanente de *Xac* que existe no laboratório.

3. 3. Meios de Cultura e Soluções

✓ Meio de Cultura NB

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Para meio sólido, adicionou-se 1,5% (m/v) de ágar e autoclavou-se.

✓ Meio de Cultura para Bactérias LB (Luria-Bertani)

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	0,58 g
Cloreto de potássio	0,19 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado para pH 7,4 e autoclavou-se.

✓ Tampão Fosfato para estoque de *Xac*

Fosfato de potássio dibásico	0,3 g
Fosfato de potássio monobásico	0,2 g
Água destilada q.s.p.	200 mL

A solução teve o pH ajustado em pH 7.0 e autoclavou-se.

✓ Tampão TE

EDTA	pH 8.0	1 mM
Tris-HCl	pH 7.4	10 mM

Autoclavou-se.

✓ **Ampicilina 100 mg / mL**

Ampicilina	1 g
Água destilada estéril	10 mL

Filtrou-se e as alíquotas foram estocadas a -20°C .

✓ **Penicilina 100 mg / mL**

Penicilina	1 g
Água destilada estéril	10 mL

Filtrou-se e as alíquotas foram estocadas a -20°C .

✓ **Cloranfenicol 100 mg / mL**

Cloranfenicol	1 g
Etanol	10 mL

Filtrou-se e as alíquotas foram estocadas a -20°C .

✓ **Solução I para extração de DNA plasmidial**

Glicose	50 mM
Tris-HCl	pH 8.0
EDTA	pH 8.0
	10 mM

✓ **Solução II para extração de DNA plasmidial**

NaOH	0,2 M
SDS	1% (m/v)

✓ Solução III para extração de DNA plasmidial

Acetato de Potássio	5M	60 mL
Ácido acético glacial		11,5 mL
Água destilada	q.s.p	100 mL

3. 4. Repressão/Desrepressão gênica

As células de *Xac* do estoque em tampão fosfato foram inoculadas em meio de cultura NB sólido, mantidas a 28°C e assim, colônias da bactéria foram isoladas. Cada colônia foi submetida a 200 mL de meio de cultura NB líquido para iniciar os ensaios de repressão/desrepressão gênica.

Após a incubação, por aproximadamente 48 horas a 28 °C sob agitação, este inóculo foi submetido a 10 minutos de centrifugação, 600 x g, a 4 °C. Os “pellets” foram obtidos para posterior ressuspensão em 50 mL de meio de cultura NB líquido, em condições ambientais diversas, caracterizando a repressão/desrepressão gênica, conforme mostra a Tabela 1.

3. 5. Extração de RNA total

Ao término do tratamento, os frascos contendo a *Xac* foram novamente submetidos à centrifugação a 10000 x g, por 10 minutos a 4 °C. Fez-se a extração do RNA total com a utilização do RNA Isolation Kit, Cell and Tissue Kit – Gentra Systems. O produto foi adicionado à uma solução de formaldeído, tampão TE, brometo de etídeo e o corante Azul de Bromofenol, visualizado em gel de agarose 1% (m/v). Além disso, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5, Milton Roy).

Tabela 1: Condições de repressão/desrepressão gênica a que foi submetida a linhagem 306 de *Xac*.

Tratamentos	Tempo de desrepressão
pH 3.0	2 horas
pH 6.8	2 horas
pH 8.0	2 horas
Ampicilina 400 µg / mL	15 minutos
Ampicilina 600 µg / mL	15 minutos
Penicilina 400 µg / mL	15 minutos
Penicilina 600 µg / mL	15 minutos
Cloranfenicol 800 µg / mL	15 minutos
Cloranfenicol 1200 µg / mL	15 minutos

✓ Gel de agarose 1% (m/v) para RNA

agarose	1 g
formol	12,3 M
tampão MOPS	5X

✓ Tampão de migração MOPS (5X)

Acetato de Sódio	pH 7.0	50 mM
EDTA	pH 8.0	0,5 M
MOPS		20,6 g

3. 6. Expressão diferencial de genes (*Differential Display* DDRT-PCR)

A estratégia escolhida para o monitoramento da expressão gênica de *Xac* foi o *Differential Display* (DDRT-PCR). Utilizou-se alíquotas do RNA total, desnaturado por 5 minutos a 65° C, obtido nos diferentes tratamentos na seguinte reação de DDRT-PCR com o kit Ready-To-Go PCR (Amersham- Bioscience):

RNA	20 ng
oligonucleotídeo X	3 pmol
oligonucleotídeo Y	3 pmol
H ₂ O RNase free q.s.p.	20 µL

Cada reação foi inserida em um tubo do kit que continha a Transcriptase Reversa e a *Taq* Polimerase. Desta forma, a partir do RNA sintetizou-se o cDNA com uma posterior PCR de cada um dos tratamentos.

Várias combinações de oligonucleotídeos (FISLAGE *et al.*, 1997), listados na Tabela 2, foram ensaiadas visando maior eficiência deste experimento. Além disto, algumas condições de temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos e as moléculas de interesse foram testadas. Contudo, o seguinte ciclo foi utilizado com sucesso no termociclador Eppendorf, Mastercycler Gradient.

30 X		94°C	30''
		50°C	2'
		72°C	30''

Tabela 2: Código dos oligonucleotídeos e suas seqüências (FISLAGE *et al.*, 1997).

Oligonucleotídeos	Seqüências 5'→ 3'
Ea1	TTT TAT CCA GC
Ea4	TCA GCG TTT TA
Ea9	TTT TAT CCC AGC
Es2	GCT GCT GGC G
Es5	TGG CGG CGG C
Es7	ATG CGC TGG C
OPA	CGT GAA TTC GCA GGC CTT C
AP-3	AAG CTT TGG TCA G

3. 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos do PCR foram observados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) e aqueles fragmentos expressados diferencialmente em determinados tratamentos foram isolados. Os pedaços de gel contendo os fragmentos foram macerados com o auxílio de um pistilo para microtubos e eluídos em tampão TE por 14-16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram clonados em pMOS e estes vetores contendo os insertos de interesse foram inseridos em *E.coli* (MOS-Blue).

✓ Gel de Poliacrilamida 8% (m/v)

Solução acrí/bisacrilamida 40% (m/v)	6 mL
Tampão TAE 50X	600 µL
Temed	6 µL
Persulfato de amônio	250 mg
Água destilada q.s.p.	30 mL

✓ TAE 50X – Tampão Tris-Acetato

Tris-Base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M pH8.0	100 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

3. 8. Clonagem dos Fragmentos

Aproximadamente 200 ng do DNA resultante da eluição de cada banda foram utilizados em reações de ligação com 50 ng do plasmídeo pMOS e 3U da enzima T4 DNA ligase. As ligações foram realizadas em um volume final de 25 µL por 12-24 h a 4 °C. Uma alíquota destas ligações (5 µL) foram submetidas à transformação por *Heat Shock* em células competentes da linhagem MOS-*Blue* de *E. coli*. As colônias com plasmídios recombinantes foram selecionadas em meio LB adicionado de ampicilina (50 µg/mL), na presença de X-gal e IPTG. As colônias bacterianas brancas foram isoladas, cultivadas em meio líquido LB e ampicilina, e os plasmídios recombinantes foram purificados, como descrito no item 3.9 e os produtos desta purificação foram utilizados para as reações de sequenciamento dos insertos.

✓ Solução de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A solução estoque de X-gal consistiu em dissolver 2g deste composto em 1L de N'-dimetilformamida. Esta solução foi mantida a -20 °C em frasco escuro para prevenir fotodegradação.

✓ **Solução de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactosyranoside)**
(SAMBROOK *et al.*, 1989).

A solução estoque de IPTG consistiu em dissolver 2g de IPTG em 10 mL de água destilada e esterilizar por filtração através de um filtro de 2 μ m estéril. Esta solução foi alíquotada e mantida a -20°C e em frasco escuro.

✓ **Células competentes para *Heat Shock***

A linhagem MOS-*Blue* foi inoculada em 3 mL de LB, a partir do seu estoque e cultivada por 12-24 horas, a 37 °C. Uma alíquota de 2,5 mL desta cultura foi inoculada em 250 mL de LB e cultivada por mais 1,5 a 2,5 horas, a 37 °C, ou até que fosse atingida uma absorbância a 550 nm, entre 0,4-0,5. A cultura foi então colocada em banho de gelo por 15 minutos, as células foram recolhidas por centrifugação (5000 x g, por 15 minutos a 4 °C) e ressuspensas em 125 mL de tampão I [Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 50 mM]. Esta mistura foi incubada em banho de gelo por 15 minutos e as células foram recolhidas por centrifugação (5000 x g, por 10 minutos a 4 °C). As células foram ressuspensas em 3 mL de tampão II [Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 50 mM e glicerol 15% (v/v)]. Alíquotas de 200 μ L foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C.

✓ **Transformação por *Heat shock***

Quando necessária, uma alíquota de 200 μ L de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de DNA transformante (10-50 ng). A mistura de células e DNA foi incubada em banho de gelo por 30 min e em seguida foram transferidas para um banho a 47 °C por 1 minuto e 45 segundos. Em seguida, as células foram imediatamente incubadas em banho de gelo por 5 minutos e 1 mL de LB (sem antibiótico) foi adicionado às células transformadas que foram então incubadas por 1 hora a 37 °C. Alíquotas da transformação foram

espalhadas sobre meio LB sólido contendo antibiótico (50 µg/mL de meio de cultura) e incubadas por 14-24 horas a 37 °C.

3. 9. Extração de DNA Plasmidial

As colônias obtidas foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB mantidas *overnight* a 37° C, sob agitação, para posterior extração de DNA plasmidial (mini-prep) (SAMBROOK *et al.*, 1989). A cultura foi transferida para um tubo e centrifugou-se a 14000 x g, por 1 minuto a 4° C. A solução sobrenadante foi descartada e, em seguida, o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de solução I gelada. Adicionou-se 200 µL de solução II e homogeneizou-se por inversão. Após alguns minutos no gelo, acrescentou-se 150 µL de solução III e os tubos foram mantidos no gelo por mais alguns minutos.

As amostras foram centrifugadas a 14000 x g, por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde adicionou-se 5 µL RNase (100 mg/mL). Feito este tratamento, adicionou-se igual volume de uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram vortexados e centrifugados a 14000 x g, por 5 minutos a 4 °C para separar as fases. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e ao DNA foi adicionado 2 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3M. Depois de incubadas em gelo por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 14000 x g, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o “pellet” obtido foi lavado com etanol 70% (v/v) também a 4° C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, depois de seco, o “pellet” foi ressuspensionado em 50 µL de água estéril. O produto desta extração foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v).

3. 10. Eletroforese em gel de agarose

✓ Gel de Agarose 0,8% (m/v) para DNA

Agarose	0,8 g
TAE 1X	100 mL

3. 11. Seqüenciamento automático

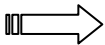
O seqüenciamento de DNA fita dupla foi feito pela metodologia de SANGER *et al.* (1977) e o DNA submetido à reação de seqüenciamento descrita em seguida.

DNA	200-500 ng
oligonucleotídeo	3,2 pmol
tampão 2,5X	4 µL
Big Dye	2 µL
H ₂ O q.s.p.	10 µL

✓ Tampão 2,5X

Tris-HCl pH 9.0	200 mM
MgCl ₂	5 mM

Condições de temperatura:

Desnaturação	
40 ciclos	 96 °C 10'' 52 °C 20'' 60 °C 4'

As soluções da reação de seqüenciamento foram purificadas através da adição de 80 µL de isopropanol 75% (v/v), seguido de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 5000 x g, por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado seguindo-se duas lavagens com etanol 70% (v/v) 5000 x g, por 10 minutos a 4 °C.

Após a extração e purificação das amostras, estas foram ressuspensas em 2,5 µL de Loading Color (Amersham Biosciences), aplicando 0,7 µL de cada amostra num gel de acrilamida e submetidas ao Seqüenciador automático 377 da PE Biosystems.

✓ Gel de acrilamida (placas de 36cm):

Uréia	9 g
Água	13 mL
Acrilamida Long ranger	2,5 mL
TBE 10x	2,5 mL
Temed	17,5 mL
APS 10%	125 µL
Volume Total	25 mL

3. 12. Análise das Seqüências obtidas: BLAST

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas através da utilização de um banco de dados (Gene Bank) e do programa BLAST [HOME PAGE NCBI: (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)]. Assim, procurou-se identificar similaridade com as seqüências de genes de *X. axonopodis* pv. *citri*.

3. 13. *Northern Blotting*

Identificados os fragmentos e as respectivas proteínas expressadas por *Xac* em resposta a diferentes condições ambientais, houve a necessidade de realizar ensaios de *Northern Blotting* (SAMBROOK *et al.*, 1989), cujo objetivo seria eliminar os falsos positivos. Para isto, o RNA total extraído da linhagem 306 de *Xac*, submetido às mesmas condições em que foram obtidas as bandas amplificadas, foi transferido para membranas de nylon (Hibond N⁺ Amersham Biosciences). Para a transferência foi utilizado o sistema Vacuum Blotter Model 785 (Biorad) por 2 horas. Após este período, o material foi submetido a radiação UV por 2 minutos para fixação do RNA na membrana.

As sondas utilizadas foram os fragmentos de DNA seqüenciados e supostamente parte de um gene diferencialmente expresso. Primeiramente, os DNAs plasmidiais dos clones foram submetidos à digestão química com as seguintes enzimas de restrição: *KpnI* e *XbaI* para liberação do inserto. Os produtos desta digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e os fragmentos de interesse foram extraídos (GFXTM PCR, DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences) e, então, marcados com o radioisótopo ³³P. Além disso, para que estes experimentos tivessem uma amostra controle, utilizou-se também como sonda o gene da γ -actina do fungo *Aspergillus nidulans*.

Estes ensaios foram constituídos por uma pré-hibridação da membrana submetida à solução de pré-hibridação, tampão *Church*, a 65 °C por 6 horas, aproximadamente. Durante este período, fez-se a marcação das sondas através da utilização do ³³P e do kit Random Primers DNA Labeling e System – GIBCO BRL. Cada reação de marcação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas, aproximadamente. Então, cada sonda marcada foi submetida à hibridação com cada membrana a 65 °C por 24 horas, aproximadamente. Após esta fase, as membranas foram lavadas por 10 minutos com a Solução SSC/SDS e expostas a um filme KODAK – MXG/Plus por 7 dias.

✓ Tampão Church

EDTA	0.5 M
Fosfato de sódio dibásico	0.25 M
Ácido fosfórico	8 M
casaminoácidos	5 g
SDS	35 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

✓ Solução SSC/SDS

SSC	20X
SDS	10X

✓ Solução SSC 20x

Cloreto de Sódio	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

4. Resultados

Este trabalho avaliou o mRNA da bactéria *Xac* submetida aos tratamentos anteriormente listados na tabela 1. Depois dos experimentos de extração de RNA bacteriano, alíquotas eram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose, cujo padrão está demonstrado na figura 5.



Figura 5: Gel de agarose 1% (m/v). Padrão resultante da extração do RNA total após os seguintes tratamentos: 1. pH 3.0; 2. pH 6.8; 3. pH 8.0; 4. Ampicilina 400 µg/mL; 5. Ampicilina 600 µg/mL; 6. Penicilina 400 µg/mL; 7. Penicilina 600 µg/mL; 8. Cloranfenicol 800 µg/mL; 9. Cloranfenicol 1200 µg/mL.

Em seguida, os ensaios de DDRT-PCR realizados com várias combinações de oligonucleotídeos revelaram uma representação diferenciada no tratamento com Penicilina 600 µg/mL e Ampicilina 400 µg/mL em reações onde foram utilizados os oligos OPA e AP-3 (Figura 6, gel A). Em outro ensaio, também observou-se a expressão diferenciada em pH 8.0 (2 fragmentos diferenciados neste único tratamento, sendo um de 100 pb e outro de 80 pb), com a utilização dos oligos Ea9 e Es5 (Figura 6, gel B). Portanto, foram selecionados 4 fragmentos expressados diferencialmente: um fragmento revelado com o tratamento com a penicilina, o segundo fragmento com o tratamento com a ampicilina, o terceiro e quarto fragmentos relacionados ao pH 8.0 (100 pb e 80 pb).

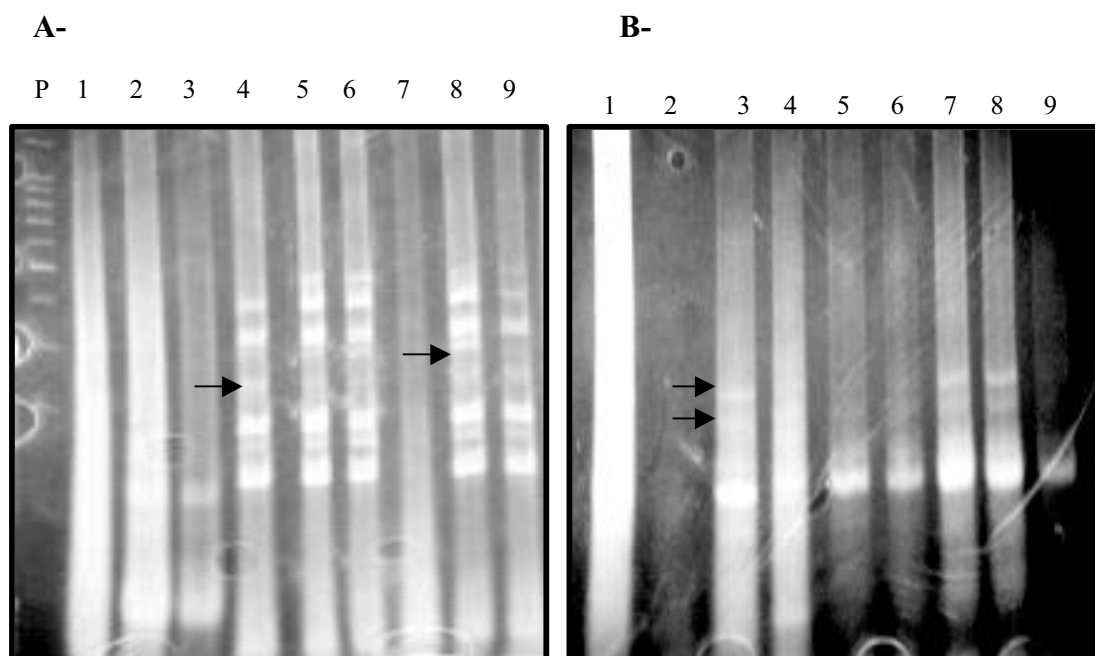


Figura 6: Padrão da expressão gênica diferenciada em *Xac* quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com brometo de etídio. **Gel A** Utilização dos oligonucleotídeos OPA e AP-3. **Gel B** Utilização dos oligos Ea9 e Es5. P: padrão de peso molecular 100 pb; 1. pH 3.0; 2. pH 6.8 ; 3. pH 8.0; 4. Ampicilina 400 µg/mL; 5. Ampicilina 600 µg/mL; 6. Cloranfenicol 600 µg/mL; 7. Cloranfenicol 1200 µg/mL; 8. Penicilina 600 µg/mL; 9. Penicilina 400 µg/mL.

Estes quatro fragmentos foram submetidos a clonagem em pMOS, inseridos em *E. coli* por transformação e os experimentos resultaram em quatro grupos de colônias referentes a cada um dos fragmentos selecionados. Então, 5 colônias de cada grupo foram aleatoriamente escolhidas e inoculadas em meio de cultura para posterior extração do DNA plasmidial (Figura 7).

Em seguida, uma nova reação de PCR foi realizada, agora com a utilização de oligonucleotídeos M13 e F7, que anelam no vetor, com a finalidade de identificar as colônias que realmente continham um inserto (Figura 8).

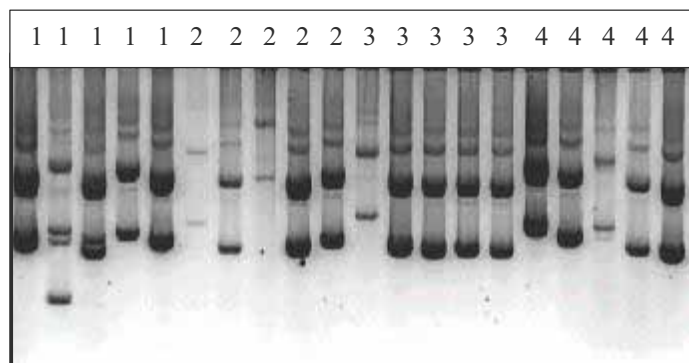


Figura 7: Padrão da extração de DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% (m/v). 1. Padrão de extração do grupo 1, relacionado ao tratamento com ampicilina. 2. Padrão de extração do grupo 2, tratamento com penicilina. 3 e 4. Padrão de extração dos grupos 3 e 4, tratamento com pH 8,0, fragmento 100 pb e de 80 pb, respectivamente.

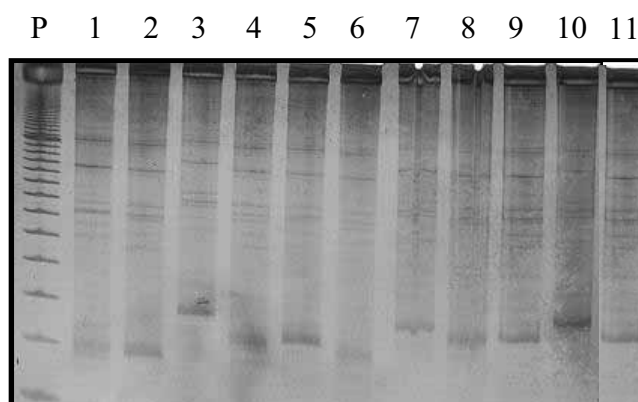


Figura 8: Gel de Poliacrilamida 8% (m/v), corado com prata. Produto de PCR com a utilização do Oligonucleotídeo M13 e F7, desta forma foram selecionadas amostras que continham inserto para serem submetidas ao seqüenciamento automático. P: padrão de peso molecular 100 pb. 1-5: pH 8,0; 6-9. ampicilina 400 µg/mL; 10-11. penicilina 400 µg/mL.

Foram selecionadas amostras de cada um dos tratamento que revelaram fragmentos exclusivos nas seguintes condições: pH 8,0 (fragmentos de, aproximadamente, 80 pb e 100 pb), ampicilina 400 µg/mL e penicilina 600 µg/mL. Estas amostras foram submetidas ao seqüenciamento automático utilizando os oligonucleotídeos M13 e F7. A validação da expressão diferencial foi feita por

Northern Blotting. Nestes ensaios foram utilizadas membranas de nylon contendo RNAs totais da *Xac* submetida aos diferentes tratamentos em que apareceram genes diferencialmente expressos (Figura 9).

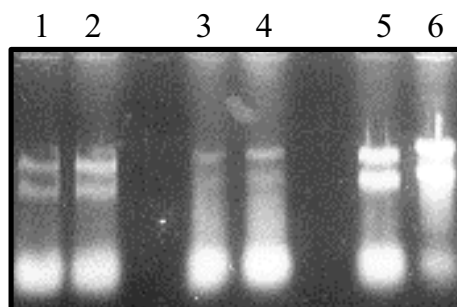


Figura 9: Padrão da extração de RNA total em gel de agarose 1% (m/V). 1. pH 6.8; 2. pH 8.0; 3. Ampicilina 400 µg/mL; 4. Ampicilina 600 µg/mL; 5. Penicilina 400 µg/mL; 6. Penicilina 600 µg/mL. Este gel foi transferido para membrana de nylon e posteriormente utilizada em ensaios de *Northern Blotting*.

As sondas moleculares utilizadas para rastrear e confirmar a presença dos fragmentos de DNA de interesse foram obtidas através da liberação do inserto clonado com a digestão química com enzimas de restrição, tais como: *KpnI* e *XbaI*. Estas enzimas foram escolhidas por fazerem parte do *polylinker* do vetor pMOS (Anexo 1).

Nas figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 estão apresentados a análise, através dos BLASTx e BLASTn, das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos dos fragmentos obtidos:

A. gi|21107356|gb|AE011751.1| xac1215

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 129 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 1254 pb

Length = 13546 Score = 111 bits (56),

Expect = 5e-22

Identities = 56/56 (100%) Strand = Plus / Plus

Query: 222 gcaggccttcacccagttgatgaccaatacgggtggt 256

Sbjct: 10770 gcaggccttcacccagttgatgaccaatacgggtggt 10804

Query: 257 ggccgggggtgctgtcgccgc 277

Sbjct: 10805 ggccgggggtgctgtcgccgc 10825

3 transportador MFS gi|21241969|

Tamanho da proteína: 418 aa

Score = 38.1 bits (87), Expect = 0.023

Identities = 18/18 (100%), Positives = 18/18 (100%)

Frame = +1

Query: 223 QAFTQLMTNTVVAGVLSP 276

QAFTQLMTNTVVAGVLSP

Sbjct: 349 QAFTQLMTNTVVAGVLSP 36

1 2

B.

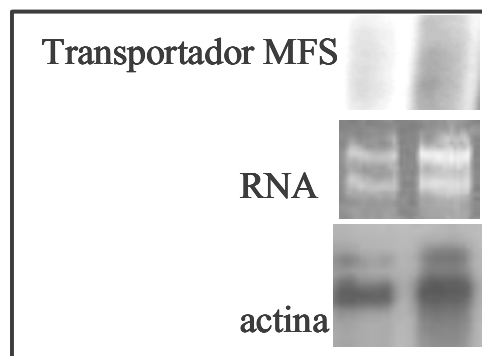


Figura 10: O transportador MFS de *Xac* diferencialmente expresso em meio de cultivo pH 8.0. A. Análise pelo blastx e blastp. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em: 1. pH 6.8 (controle); 2. p 8.0.

A. gi|21107985|gb|AE011811.1| xac1793

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 189 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 2613 pb

Length = 10644

Score = 127 bits (64), Expect = 1e-27

Identities = 78/78 (100%)

Strand = Plus / Minus

Query: 1 gttggggtagtcgctgcgcttggtgccggtgccctgccag 60
Sbjct: 7608gttggggtagtcgctgcgcttggtgccggtgccctgccag7549

Query: 61 ttcagggtccagccgccg 78
Sbjct: 7548 ttcagggtccagccgccg 7531

3 *Glucano1, 4- beta- glucosidase* gi|21242538|

Tamanho da proteína: 871 aa

Score = 58.9 bits (141), Expect = 2e-08

Identities = 25/25 (100%), Positives = 25/25 (100%)

Frame = -1

Query: 77 GGWTLNWQGTGTRSDYP 3
GGWTLNWQGTGTRSDYP
Sbjct: 484 GGWTLNWQGTGTRSDYP 508

B.

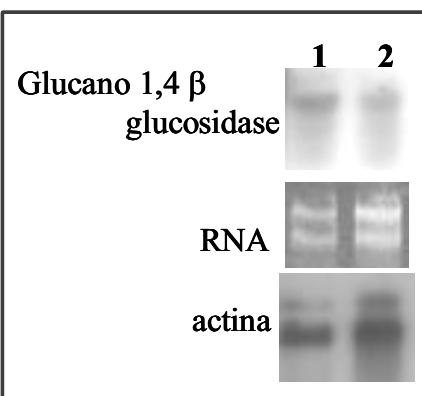


Figura 11: A Glucano1, 4- beta- glucosidase de *Xac* diferencialmente expresso em meio de cultivo pH 8,0. A. Análise pelo blastx e blastp. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em: 1. pH 6,8; 2. p 8,0.

A. gi|21109322|gb|AE011943.1| xac1858

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 321 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 1284 pb

Length = 10029

Score = 117 bits (59),

Expect = 4e-24

Identities = 59/59 (100%) Strand = Plus / Plus

Query: 1 cctgctcaacaccgctcaccgacgcggtgatcgctacct 38

Sbjct: 2866 cctgctcaacaccgctcaccgacgcggtgatcgctacct 2903

Query: 39 ggccgcacaacgcgcgcgcg 59

Sbjct: 2904 ggccgcacaacgcgcgcgcg 2924

3 Valina – piruvato aminotransferase gi|21242602|

Tamanho da proteína: 428 aa

Score = 68.9 bits (167), Expect = 1e-11

Identities = 33/36 (100%), Positives = 36/36 (100%)

Frame = -3

Query: 121 PSDEGGVVVDALDPSLLADARFLY 14

PSDEGGVVVDALDPSLLADARFLY

Sbjct: 172 PSDEGGVVVDALDPSLLADARFLY 207

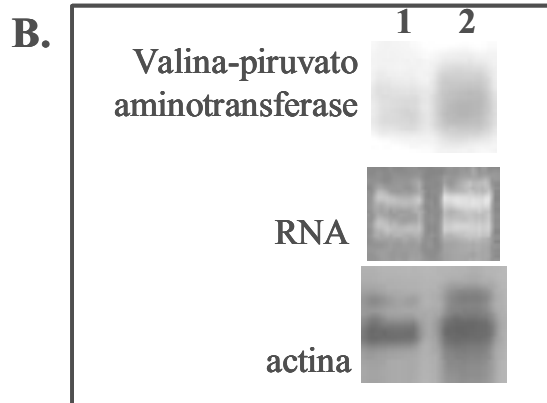


Figura 12: A Valina – piruvato aminotransferase de *Xac* diferencialmente expressada em meio de cultivo pH 8,0. A. Análise pelo blastx e blastp. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em 1. pH 6,8; 2. pH 8,0

A. gi|21110400|gb|AE012048.1| xac3992

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 426 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 843 pb

Length = 12239

Score = 268 bits (135), Expect = 8e-69

Identities = 138/138 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 493gtcggccacatccaccatcgccgtttgcatgtaagggcgctgcggaacgagcg552

Sbjct: 534gtcggccacatccaccatcgccgtttgcatgtaagggcgctgcggaacgagcg593

Query: 553gccgatcatgtggtcgtaccactcccagtcgccgcgtttgatcgcaaaggcctt606

Sbjct: 594gccgatcatgtggtcgtaccactcccagtcgccgcgtttgatcgcaaaggcctt653

Query: 607 gtgcaccgcgaccacgccgcgcc 630

Sbjct: 654 gtgcaccgcgaccacgccgcgcc 671

3 Proteína hipotética conservada gi|21244710

Tamanho da proteína: 281 aa

Score = 70.1 bits (170), Expect = 5e-12

Identities = 33/33 (100%), Positives = 33/33 (100%)

Frame = -3

Query: 137 KRGDWEWYDHMIGRSFRTHPYMQTAMVD39

KRGDWEWYDHMIGRSFRTHPYMQTAMVD

Sbjct: 126 KRGDWEWYDHMIGRSFRTHPYMQTAMVD158

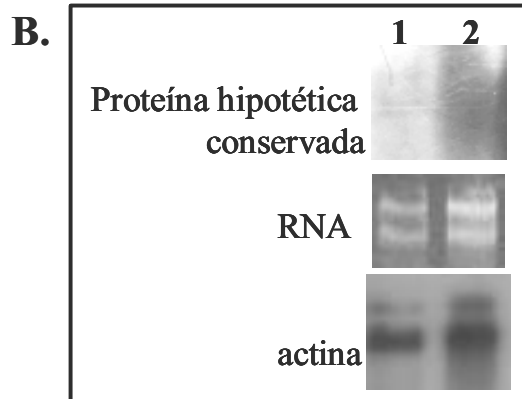


Figura 13: A Proteína hipotética conservada de *Xac* diferencialmente expresso em meio de cultivo pH 8,0. A. Análise pelo blastx e blastp. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em 1. pH 6,8; 2. pH 8,0.

A. gi|21109266|gb|AE011938.1|xac2959

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 316 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 1026 pb

Length = 11157

Score = 89.7 bits (45),

Expect = 7e-16

Identities = 45/45 (100%) Strand = Plus / Minus

Query: 21 caggccttcgggtatcacgcggatgatgttttcggtgaggccgcc 65

|||||

Sbjct: 853 caggccttcgggtatcacgcggatgatgttttcggtgaggccgcc 809

3 *Fosforibosil-formil-glicinamida* gi|21243686|

Tamanho da proteína: 342 aa

Score = 35.8 bits (81), Expect = 0.14

Identities = 16/16 (100%), Positives = 16/16 (100%)

Frame = -1

Query: 68 GGGLTENIIRVIPEGL 21

GGGLTENIIRVIPEGL

Sbjct: 246 GGGLTENIIRVIPEGL 261

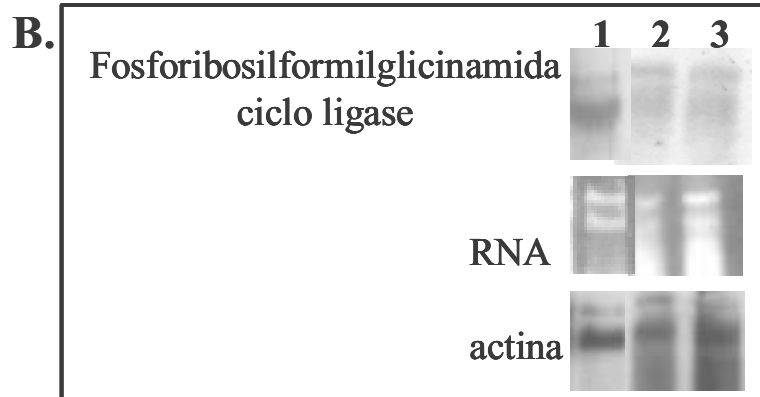


Figura 14: A Fosforibosil-formil-glicinamida ciclo ligase de *Xac* diferencialmente expressada em meio de cultivo contendo ampicilina 400µg/mL. Análise pelo blastx e blastp. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em: 1. controle; 2. ampicilina 400 µg/mL; 3. ampicilina 600 µg/mL.

A. gi|21109636|gb|AE011975.1| xac3298

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 353 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 1518 pb

Length = 12826

Score = 127 bits (64),

Expect = 4e-27

Identities = 64/64 (100%) Strand = Plus / Minus

Query: 1 atgggggtggcactatcgatggcattcgatgccatgcggaaagggatgac 50

Sbjct:5847atgggggtggcactatcgatggcattcgatgccatgcggaaagggatgac5798

Query: 51 cgtggatctggaag 64

Sbjct: 5797 cgtggatctggaag 5784

3 *Integrase* gi|21244024|

Tamanho da proteína: 506 aa

Score = 44.7 bits (104), Expect = 3e-04

Identities = 23/23 (95%), Positives = 23/23 (95%)

Frame = +1

Query: 1 MGVALSMAFDAMRKGMTVDLE 69

MGVALSMAFDAMRKGMTVDLE

Sbjct: 46 MGVALSMAFDAMRKGMTVDLE 68

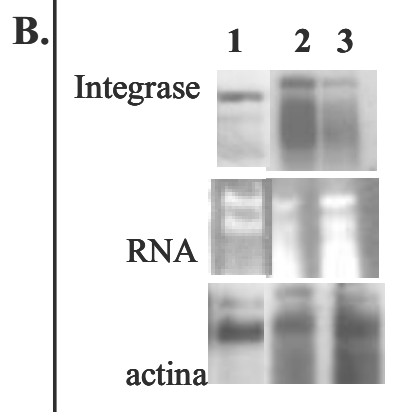


Figura 15: A Integrase de *Xac* diferencialmente expressada em meio de cultivo contendo ampicilina 400µg/mL. A. Análise pelo blastx e blastp. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em: 1. ausência de agente inibidor; 2. ampicilina 400 µg/mL; 3. ampicilina 600 µg/mL.

A. gi|21107527|gb|AE011768.1| xac1368

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 146 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 1374 pb

Length = 12907

Score = 75.8 bits (38),

Expect = 8e-11

Identities = 90/100 (90%), Gaps = 2/100 (2%)

Strand = Plus / Plus

Query: 77 gaccaagcagaacctgcgcatgacngcgctgttgctcgggcggc 125

Sbjct: 3670 gaccaagcagaacctgcgcatgacggcgctgttgctcggtcggc 3719

Query:126 aagctgggcgacnaccaaatt-cacgtcaacaancggntgggttcggatga 174

Sbjct:3720aagctggccgactacgaattccacgtcagcaactggctgggctcggatga 3769

3 Proteína de Virulência gi|21242121|

Tamanho da proteína: 458 aa

Score = 77.8 bits (190), Expect = 7e-14

Identities = 40/40 (95%), Positives = 40/40 (95%)

Frame = -2

Query: 170 AATKQNLRM TALLSVGKLADYEFHVS NWLGSDDEGL 51

AATKQNLRM TALLSVGKLADYEFHVS NWLGSDDEGL

Sbjct: 353 AATKQNLRM TALLSVGKLADYEFHVS NWLGSDDEGL 392

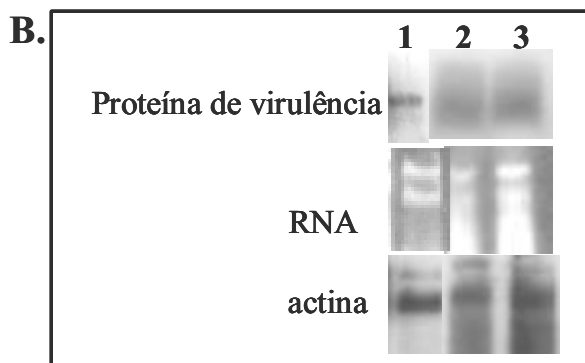


Figura 16: A Proteína de Virulência de *Xac* diferencialmente expressada em meio de cultivo contendo ampicilina 400µg/mL. A. Análise pelo blastx e blastp. . B. Resultado do *Northern Blotting*. 1. ausência de agente inibidor; 2. ampicilina 400 µg/mL; 3. ampicilina 600 µg/mL.

3gi|21110297|gb|AE012039.1| xac3894

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* str. 306, section 417 of 469 of the complete genome

Tamanho do gene: 1212 pb

Length = 10587 Score = 93.7 bits (47),

Expect = 1e-16

Identities = 66/75 (88%) Strand = Plus / Minus

Query: 211 ggcaccgaanagatcctcaagnnnnaacaactgcaggcgcggtngccac 260

Sbjct: 3846 ggcaccgaagagatcctcaagctcgatcaactgcaggcgcggtcgccac 3797

Query: 261 cggtaanccgctgcgggtgaaggcc 285

Sbjct: 3796 cggtaaagccgctgcgggtgaaggcc 3772

3 *Tirosil t-RNA Sintetase* gi|21244616|

Tamanho da proteína: 404 aa

Score = 42.7 bits (99), Expect = 8e-04

Identities = 22/28 (78%), Positives = 22/28 (78%)

Frame = +1

Query: 202 GTEEILKXXQLQARXATGXPLRVKA 285

GTEEILK QLQAR ATG PLRVKA

Sbjct: 11 GTEEILKLDQLQARLATGKPLRVKA 38



Figura 17: A Tirosil t-RNA Sintetase de *Xac* diferencialmente expressada em meio de cultivo contendo penicilina 600µg/mL. A. Análise pelo blastx e blastp. B. B. Resultado do *Northern Blotting* quando a *Xac* foi cultivada em: 1. ausência de agente inibidor; 2. penicilina 400 µg/mL; 3. penicilina 600 µg/mL.

5. Discussão

5.1 Estratégia de monitoramento da Expressão Gênica

O DDRT-PCR tem sido utilizado com sucesso em várias áreas como por exemplo na detecção e isolamento de genes responsáveis por fatores de crescimento e também alguns genes que são expressados em fases específicas de uma doença. Atualmente, o DDRT-PCR vem sendo bastante utilizado por nosso grupo (NOZAWA, 2002, NOZAWA *et. al.*, 2003) apresentando vantagens importantes como o baixo custo destes experimentos, além de haver a possibilidade de encontrar genes novos, isto é, genes cuja função ainda não está estabelecida. Deste modo, baseamo-nos na literatura para a seleção de alguns oligonucleotídeos, mas várias foram as tentativas com o intuito de se obter o maior número de representações de expressões diferenciais de genes de *Xac*. Mas no caso dos procariotos, a aplicação desta técnica é dificultada pelos baixos níveis de poliadenilação da extremidade 3' do mRNA (FISLAGE *et al.*, 1997). Tal fato prejudica a síntese de cDNA, pois a eficiência do oligonucleotídeo ancorador é baixa. O problema poderia ser solucionado com a utilização de oligonucleotídeos arbitrários, mas ainda sim algumas modificações quanto a reação de PCR dificultaria a utilização desta estratégia.

Tendo em vista que o *Differential Display* é uma ferramenta para a identificação e isolamento de genes expressados diferencialmente em organismos eucarióticos e procarióticos, com o uso de oligonucleotídeos arbitrários, há uma grande ocorrência de resultados falso positivos. Foram feitos onze ensaios de Northern Blotting e 72% confirmaram os resultados positivos, 8 ORFs e 28% falso positivos. Tais resultados confirmam os resultados obtidos por MOU *et al.* (1994); CORTON *et al.* (1997); SHEPARD *et al.* (1999) e PAULINO *et al.* (2002).

Por outro lado, o desenvolvimento e a introdução do DNA microarray, uma outra técnica para detecção da expressão gênica, trouxeram modificações na tecnologia que monitora a expressão gênica. Esta técnica é bastante precisa uma

vez que a expressão diferenciada é “medida” através de sofisticados cálculos estatísticos e é capaz de medir níveis de expressão gênica em larga escala (PAN *et al.*, 2002). Uma questão polêmica desta ferramenta é quanto ao número de réplicas que devem ser feitas para tal experimento. Isto torna-se relevante uma vez que métodos estatísticos são requisitados. Outro fator considerado quanto ao microarray é o fato de ser uma técnica com grande poder de resolução mas de alto custo e de difícil padronização.

5.2. Modelos Propostos

As bactérias são submetidas continuamente a rápidas alterações do meio ambiente como: condições nutricionais, níveis de toxinas, acidez, temperatura, densidade celular, dentre outras. Então, para a sua sobrevivência, estes microrganismos devem ser capazes de expressar genes em resposta adaptativa aos sinais ambientais.

O atual trabalho investigou a expressão gênica de *Xac* em resposta adaptativa ao estresse por pH e na presença de agentes inibidores aos quais a bactéria parece ser resistente (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2002). Deste modo, foram investigados oito ORFs (confirmadas pelo Northern Blotting), sendo todas elas genes cromossomais. Sete delas apresentam alta similaridade com a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e uma delas, a integrase, não foi encontrada nesta bactéria, embora sua sequência tenha apresentado similaridade com uma *phage integrase family* (9e⁻⁴⁹).

Nesta fase conclusiva do projeto, buscamos a relação das ORFs diferencialmente expressadas com as respostas adaptativas do fitopatógeno em pH alcalino e em meio de cultura contendo os agentes inibidores.

5.2.1 Orfs identificadas no tratamento com pH 8.0

As alterações de pH atuam como armadilhas para muitos organismos e, para serem bem sucedidos, é necessário não só um sistema que regule o pH homeostático, mas também um sistema que regule a síntese de moléculas que irão funcionar além da barreira celular (permeases, enzimas extracelulares e metabólitos exportados). Isto é, estas moléculas devem ser sintetizadas para exercerem as funções de acordo ao pH ambiental. Diante disto, a *Xac* quando submetida ao pH 8.0 expressou diferencialmente proteínas como: um transportador MFS, a glucano 1,4-beta glucosidase, a valina-piruvato aminotransferase e uma proteína hipotética conservada. No atual trabalho não foi observado nenhuma outra proteína expressando-se diferencialmente nos pH 3.0 e pH 6.8.

Estas ORFs representam genes que não possuem promotores em comum, uma vez que estão fisicamente distantes no genoma da *Xac*. No entanto, os supostos promotores de cada uma das 4 ORF foram alinhados com o intuito de buscar a similaridade destes e assim investigar possibilidades que expliquem a ativação simultânea destes promotores no pH alcalino e /ou participação de alguns fatores de transcrição como ocorre em organismos eucariotos (NOZAWA, 2002). O alinhamento das seqüência dos 4 promotores foi feito do programa Alignx (Vector NTI Suit 5.5) e revelou 15% de similaridade, sem nenhum domínio específico de ligação de proteínas.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, as mudanças no pH extracelular podem causar respostas transcricionais através da indução de três genes pelo pH alcalino: *ENAI*, *SHC1* e *SCY1*. Além deste sistema foi identificado também em *S. cerevisiae* um outro tipo de resposta ao pH alcalino dada pela indução da ativação de Rim101p. Este último é homólogo ao PacC de *Aspergillus nidulans* (LAMB *et al.*, 2001), identificaram 71 genes de *S. cerevisiae* que foram expressados diferencialmente em pH 8.0 através de ensaios de macroarray. Diante destes resultados, as ORFs expressadas diferencialmente em *Xac* em pH alcalino foram submetidas a uma busca de identidade com alguns dos genes encontrados em leveduras. No entanto,

esta comparação não revelou similaridade dos genes de *Xac* com os genes de resposta ao pH alcalino de *S. cerevisiae*.

Transportador MFS (xac1215)

Durante o processo de anotação do Projeto Genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, o gene *bcr* foi anotado pelo nosso grupo de pesquisa (Profa. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi) (da SILVA, *et al.* 2002), e assim, identificado como um transportador MFS. O gene *bcr* possui 1254 pb e destes, 56 pb foram identificados e sequenciados no atual trabalho com 100% de similaridade. A sequência deste gene foi submetida ao BLAST e o resultado foi a identificação de uma alta similaridade com transportador MFS (Major Facilitator Superfamily) de *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar de apresentar domínios conservados de um transportador de açúcar (e-value de $5e^{-05}$) (Figura 21), tanto em *Pseudomonas* como em *E. coli*, o gene está relacionado a resistência do organismo à biciclomicina (tetraciclina, fosfomicina, acriflavina) e há outros casos em que este transportador está relacionado à resistência a multidrogas.

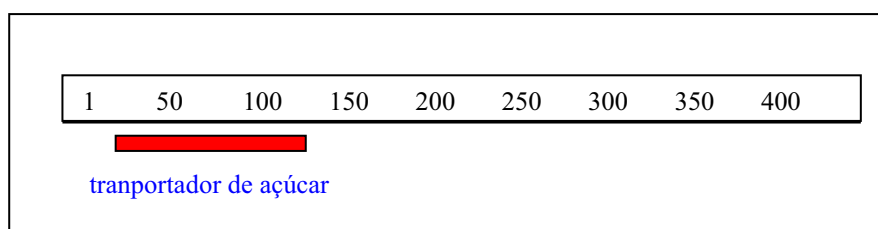


Figura 21: Esquema representativo do domínio conservado (transportador de açúcar) do transportador MFS.

Downstream a este gene há uma região codificadora de uma proteína hipotética conservada e em seguida, um gene da dipeptidil carboxipeptidase (aumenta a atividade da angiotensina, constrição) e finalmente o gene *yjdB* que codifica uma proteína localizada na parede interna do organismo (Figura 22). *Upstream* ao gene *bcr* está o gene *gcvP* (codifica a glicina descarboxilase, relacionado a degradação da glicina), em seguida, há uma região da

carboxilesterase (atividade hidrolítica). Além destes genes, foi identificado também uma região relacionada a uma oxiredutase.

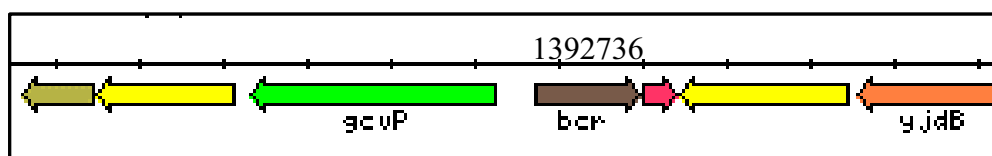


Figura 22: Esquema representativo da localização do gene *bcr*. A posição do *start codon* é 1.392.736 pb. *Downstream* há uma região codificadora de uma proteína hipotética conservada, um gene da dipeptidil carboxipeptidase e o *yjdB* que codifica uma proteína da membrana interna. *Upstream* está o gene *gcvP* (codifica a glicina descarboxilase, relacionado a degradação da glicina), em seguida, há uma região da carboxilesterase e também uma região relacionada a uma oxiredutase

Análises de genomas de procariotos e eucariotos mostraram que proteínas de transporte representam uma larga fração (~ 30%) de todas as proteínas que integram a membrana. Estas proteínas podem se classificadas em 4 grupos: facilitadores ou carreadores (mediam reação de uniporter), simporte ou antiporte e a classe da super família MFS. Acredita-se que a maioria das proteínas MFS (ex: lactose permease, glucose transporter-GLUT1), contém 12 hélices transmembrânicas, uma estrutura semelhante àquela de outros sistemas de transportadores (incluindo os transportadores ABC) (HEYMANN *et al.*, 2001).

Membros desta super família funcionam como antiporters de H^+ que utilizam a força motora do próton para realizar o transporte (Fling *et al.*, 1991), isto é, a difusão facilitada quando o transporte de solutos ocorre contra o gradiente de concentração eletroquímico, a energia gerada para este processo é fornecida pelos *antiporters* e *simporters* de H^+ ou outros íons que estão abaixo do seu gradiente de concentração eletroquímico. Quando o transporte de solutos ocorre abaixo do seu gradiente de concentração, a energia é geralmente mediada por uniporters.

O transporte celular é um dos aspectos mais importantes e fascinantes da vida e é essencial para qualquer organismo. Os organismos unicelulares mantêm o seu balanço homeostático através da constante captação de nutrientes e secreção de

produtos tóxicos, além de serem capazes de monitorar as alterações do seu meio biótico e abiótico. Deste modo, a alteração do pH e no gradiente eletroquímico pode ter induzido a expressão destes facilitadores em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Este processo pode estar relacionado a uma resposta adaptativa com a finalidade de efetuar o efluxo de um agente tóxico a este organismo através da membrana. Porém, além de atuar como um mecanismo de resistência a antibióticos, uma outra função deste transporte pode ser a regulação osmótica da bactéria, já que em pH alcalino haveria a necessidade de um influxo de prótons como fonte de energia, por exemplo. Também poderia estar ocorrendo o transporte de outras moléculas de adaptação ao meio alcalino ou o efluxo de outras moléculas nocivas ao patógeno.

Diante disto, a *Xanthomonas* pode estar ativando o sistema MFS, ocorrendo exclusivamente num caso de estresse do organismo quando submetido ao pH 8.0 (Figura 23). Em pH ácido, é possível que a regulação osmótica e também o transporte de moléculas em resposta ao estresse ocorram. No entanto, em pH ácido outros mecanismos, diferentes daqueles acionados em meio alcalino, podem ser ativados e não foram detectados nas condições experimentais utilizadas.

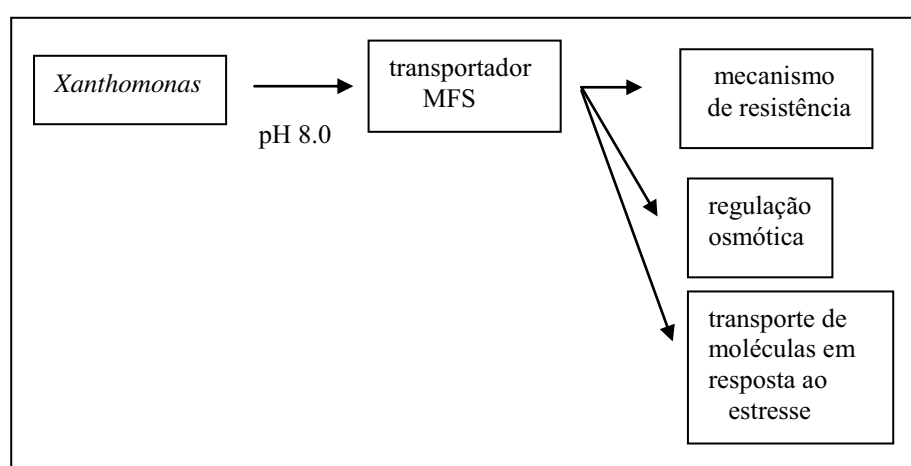


Figura 23: Esquema representativo de possíveis processos que ocorrem em *Xanthomonas* cultivada em pH 8.0. O transportador MSF pode ser ativado como mecanismo de resistência, para regulação osmótica do meio celular e no transporte de moléculas de resposta ao estresse alcalino.

⌘ *Proteína Hipotética Conservada (xac3992)*

As proteínas hipotéticas conservadas tem um grupo exclusivo com esta mesma classificação: “Proteínas Hipotéticas Conservadas” (da SILVA *et al.*, 2002). O presente trabalho sugere que esta proteína “hipotética” pode estar relacionada com uma resposta da *Xac* ao estresse ao pH, uma vez que este resultado foi obtido quando o microrganismo foi submetido a um estresse de pH alcalino (pH 8,0). A figura 24 mostra uma parcela do mapa genético da bactéria onde está inserido este gene.

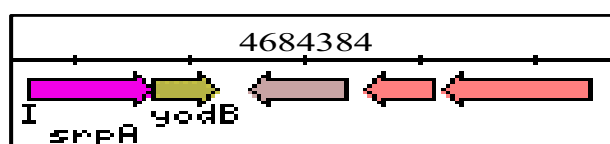


Figura 24: Esquema representativo da localização do gene da Proteína Hipotética conservada (em cinza). Posição inicial 4684384pb. *Downstream* ao gene relacionado a proteína hipotética conservada há uma região codificadora do citocromo B561 (gene *yodB*). O gene *srpA* relacionado a expressão de uma catalase. *Upstream* identificou-se o gene (sem denominação) de uma proteína regulatória (envolvida no sinal de transdução) e de uma proteína sensor, estas duas moléculas participam de um sistema sensor de histidina quinase (vermelho).

Downstream ao gene relacionado a proteína hipotética conservada (Figura 24) há uma região codificadora do citocromo B561 (gene *yodB*). O citocromo tipo b, que é uma proteína transmembrânica com regiões com resíduos de histidina. Também foi identificado o gene *srpA* relacionado a expressão de uma catalase. Esta família de genes *srp* apresenta homologia com uma região do genoma de *Pseudomonas aeruginosa* conferindo resistência a multidrogas. *Upstream* ao gene da proteína hipotética conservada identificou-se um sistema composto por duas proteínas sendo uma proteína regulatória (atuando na transdução de sinal na transferência de fosfato) e outra, uma proteína sensor da histidina quinase. Diante disto, a proteína hipotética conservada, as proteínas que compõem o sistema sensor da histidina quinase podem estar formando um *cluster* (Figura 25).

Em *X. campestris*, este sistema sensor está relacionado com a regulação da síntese de polissacarídeos patogênicos e algumas enzimas (WENGELNIK e BONAS, 1996). Portanto, uma outra possibilidade é que a proteína hipotética conservada pode estar relacionada apenas com a ativação deste sistema de duas proteínas possibilitando a síntese de moléculas patogênicas ou algumas enzimas. Neste caso, a *Xac* pode estar expressando tal proteína que possivelmente por ter encontrado um meio inóspito. Assim, estas moléculas patogênicas ou enzimas poderão, *in vitro*, promover a adaptação da bactéria neste meio.

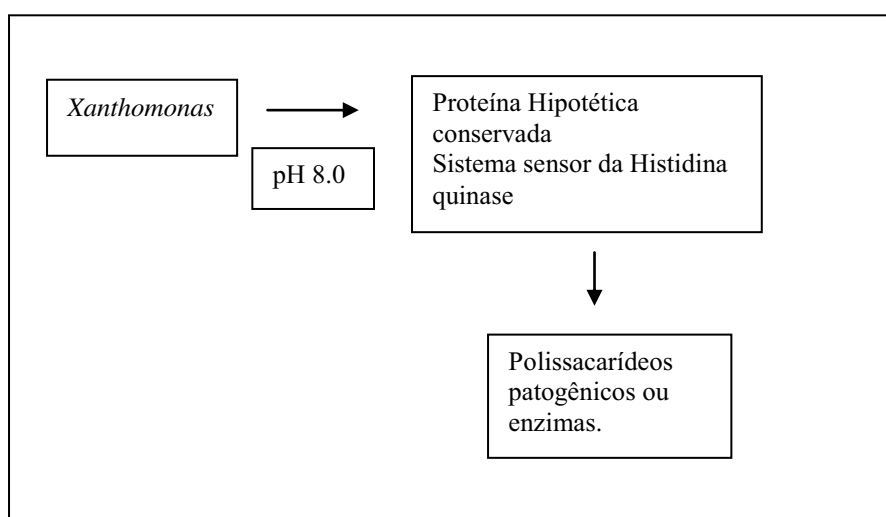


Figura 25: Esquema representativo da Xac em meio alcalino. Uma proteína hipotética conservada é expressada e pode estar relacionada ao sistema sensor para síntese de moléculas patogênicas ou de adaptação em resposta ao pH 8.0 através da síntese de algumas enzimas.

Glucano1, 4- beta- glucosidase (celD) (xac1793)

Esta proteína foi catalogada, durante o processo de anotação, no grupo das proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação (da SILVA *et al.*, 2002). A glucano 1,4- beta glucosidase, que pode ser denominada também de exo-1,4-beta-glucosidase, tem a função de degradar a parede celular da célula hospedeira, atuando juntamente com outras enzimas na quebra da celulose. A *Xac* é

capaz de ativar esta enzima durante o processo de hidrólise das ligações 1,4 nas moléculas 1,4-beta-D-glucanos e remover sucessivas unidades de glucoses presente na parede da célula hospedeira. Este fenômeno biológico pode caracterizar uma etapa do processo de patogenicidade deste fitopatógeno.

Esta proteína apresentou domínios conservados com grande similaridade com o domínio 3N terminal da família das Glicosil hidrolase (e-value $1e^{-46}$ e alinhamento com 99,6% dos aminoácidos). Além desta família de proteínas, a glucano 1,4-beta glucosidase apresentou domínios conservados quando comparada ao domínio 3C terminal da família das Glicosil hidrolase (e-value $5e^{-29}$ e alinhamento com 90% dos aminoácidos). Os domínios conservados podem ser observados na figura 26.

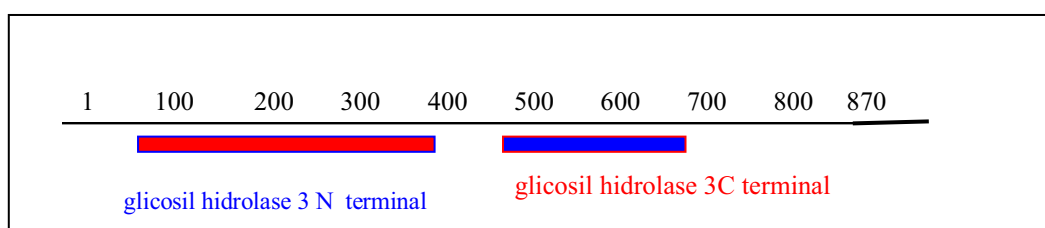


Figura 26: Esquema representativo dos domínios conservados da glucano 1,4- beta glucosidase: domínio 3N terminal e 3C terminal da família das Glicosil hidrolase

Downstream ao gene da 1,4-beta glucosidase está o gene *sglT* relacionado a uma proteína que atua no co-transporte de sódio e glucose (*simporter*). Em seguida, foi identificada um gene codificador de uma proteína hipotética conservada (Figura 27). *Upstream* ao gene da 1,4-beta glucosidase está o gene *phoX* da fosfatase alcalina, genes que codificam uma proteína hipotética, uma proteína hipotética conservada e finalmente uma outra proteína hipotética.

Durante o processo infeccioso da bactéria ocorrem várias alterações no ambiente celular. Tanto o patógeno quanto a planta sofrem alterações metabólicas com o intuito de acionar os mecanismos de ataque do fitopatógeno e também de

defesa do hospedeiro. Por um lado, hospedeiro tenta se defender de enzimas de ataque do patógeno. Enquanto isso, o fitopatógeno tenta inibir as proteínas de defesa da planta e sintetizar de modo eficiente àquelas proteínas relacionadas a patogenicidade.

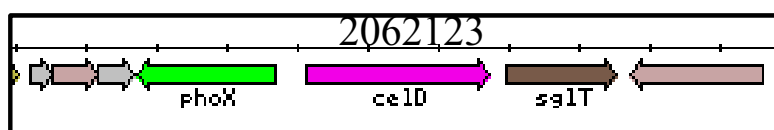


Figura 27: Esquema representativo da localização do gene *celD* (*start codon* 2.062.123 pb) *Downstream* está o gene *sglT*, um gene codificador de uma proteína hipotética conservada. *Upstream* ao gene da 1,4-beta glucosidase está o gene *phoX*, genes que codificam uma proteína hipotética, uma proteína hipotética conservada e o gene de uma proteína hipotética.

Estas alterações metabólicas estão relacionadas à permeabilidade da membrana, modificações no fluxo de íons, pH entre outras. Diante disto, a *Xac* quando submetida ao pH alcalino pode ter encontrado um ambiente semelhante àquele que ocorre durante a interação planta e o fitopatógeno (neste caso, isto pode ocorrer por uma resposta adaptativa da bactéria devido ao processo infeccioso eficiente no pH alcalino). Assim, o pH pode ser um fator de regulação da expressão de *celD*.

⌘ *Valina Piruvato Aminotransferase (avtA) (xac1858)*

O gene *avtA* expressa a proteína valina-piruvato aminotransferase (da SILVA, *et al.*, 2002), que tem função catalítica na biossíntese de aminoácidos que pode ser descrita na seguinte reação:



Tal proteína pode ser chamada também de transaminase C e alanina-valina transaminase. A valina piruvato aminotransferase apresenta como cofator o

piridoxal-fosfato e tem domínios conservados das aminotransferases classe 1 e 2 (e-value $5e^{-12}$) (Figura 28).

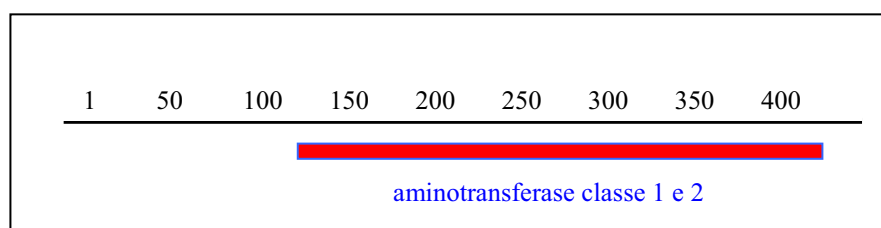


Figura 28: Esquema representativo do domínio conservado da valino-piruvato aminotransferase que apresenta similaridade com domínios das aminotransferases classes 1 e 2.

O gene *avtA* tem seu *start codon* na posição 2.152.651 pares de bases do genoma da *Xac*. *Downstream* ao gene *avtA* foi identificado um gene relacionado a uma proteína hipotética conservada (Figura 29) e o gene *dapB*. Este último trata-se de um gene que codifica uma redutase que atua na biossíntese de aminoácidos (aspartato). *Upstream* ao gene foram identificados genes de proteínas hipotéticas conservadas. Além disso, foi identificado o gene *feoB* (proteína B, de membrana interna, relacionada ao transporte de ferro) (Figura 29).

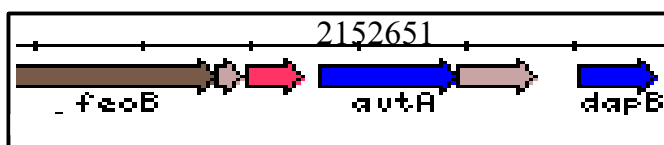


Figura 29: Esquema representativo da localização do gene *avtA*. *Upstream* ao gene *avtA* existe um gene relacionado a uma proteína hipotética conservada e o gene *dapB*. *Downstream* identificou-se genes de proteínas hipotéticas conservadas e o *feoB*.

A proteína valina piruvato aminotransferase foi expressada diferencialmente em pH 8,0, desta forma é possível que a regulação da biossíntese de aminoácidos

seja regulada pelo pH (uma vez que a expressão da maioria das proteínas está relacionada a este fator, bem como o transporte iônico, etc). Neste caso, a *Xac*, neste ambiente *in vitro*, pode ter encontrado uma situação favorável a síntese de aminoácidos. Diante disto, este processo pode estar relacionada com a síntese de proteínas de ataque ou de sua defesa (uma vez que a planta sintetiza proteínas para anular a infecção pela *Xac*).

Uma outra hipótese é que a síntese de proteínas pode estar ocorrendo em *Xac* devido a uma adaptação da bactéria neste pH. Estas proteínas podem estar relacionadas ao funcionamento normal do organismo e não necessariamente estarem relacionadas à interação da bactéria e a planta (Figura 30).

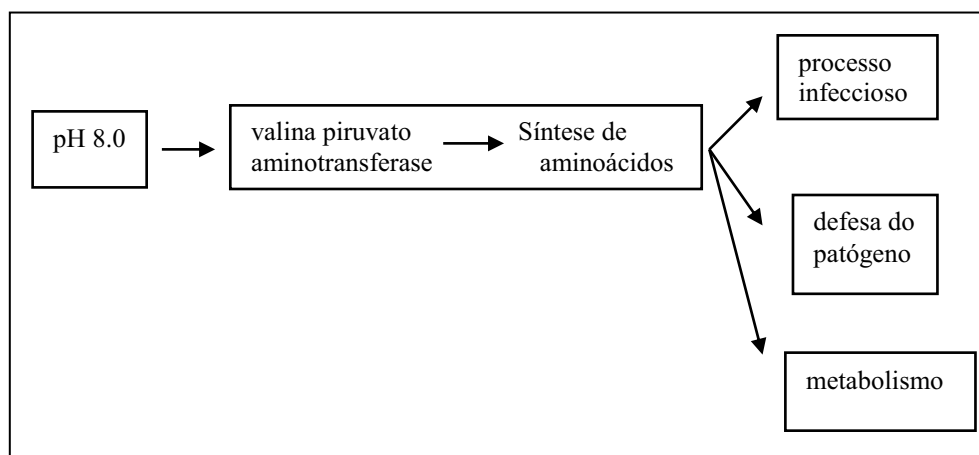


Figura 30: A valina-piruvato aminotransferase foi diferencialmente expressa em pH 8,0. Pode estar relacionada à síntese de proteínas de ataque do patógeno; proteínas para inibir a defesa do hospedeiro ou proteínas para o funcionamento normal do metabolismo da *Xac*.

Portanto, assim como em outros organismos, a *Xac* tem um mecanismo de adaptação, *in vitro*, diante de alterações do pH extracelular. No atual trabalho foi observada a expressão diferenciada de genes em pH alcalino e pode ser explicada como mostra o esquema da Figura 31.

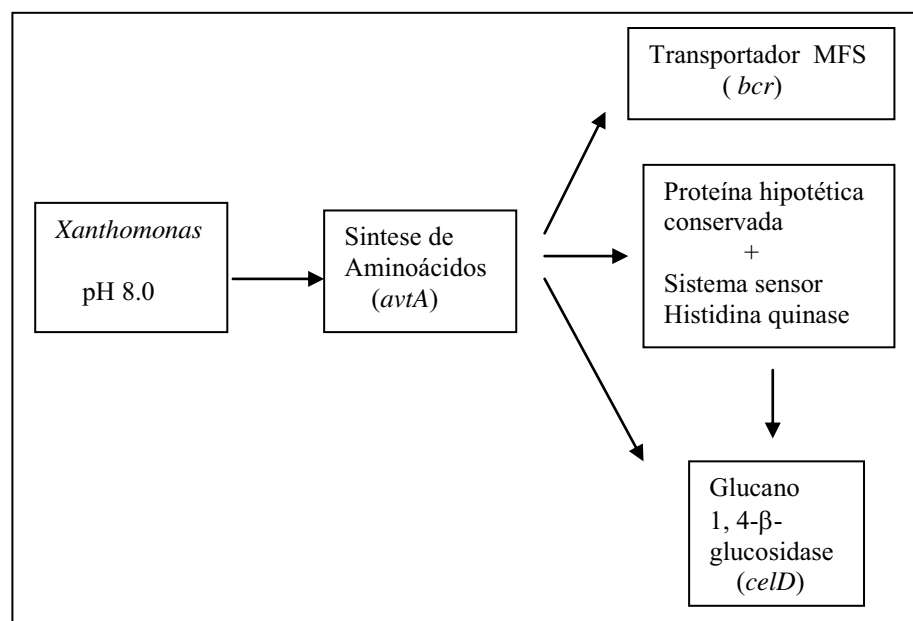


Figura 31: Em pH alcalino a *Xac* expressou *avtA*, *bcr*, *celD* e uma proteína conservada. A síntese de aminoácido pode estar relacionada a inúmeros processos biológicos da bactéria, inclusive: 1. síntese de um transportador MFS que pode ser responsável pelo transporte moléculas para adaptação (influxo ou efluxo); 2. síntese da proteína hipotética conservada, atuando com um sistema sensor de histidina quinase e responsável pela síntese de um polissacarídeo patogênico (pode ser a Glucano 1,4-β-glucosidase); 3. síntese da Glucano 1,4-β-glucosidase.

Diante deste esquema é possível concluir que em pH alcalino a *Xac* pode estar reconhecendo um ambiente semelhante ao encontrado no processo infeccioso uma vez que foi observado a expressão de proteínas como a Glucano 1,4-β-glucosidase ou pelo menos a possibilidade de sintetizar esta (quando mencionamos que a proteína hipotética pode pertencer a um *cluster* capaz de sintetizar uma molécula de ataque ao patógeno). O transportador não é, neste caso, responsável pelo transporte de antibióticos. Mas, este pode ser um mecanismo adaptativo da *Xac* para transportar outros tipo de moléculas tóxicas que permaneceram ou foram

sintetizadas no ambiente celular uma vez que houve a alteração na permeabilidade da membrana celular com a alteração do pH. Neste caso, o transportador pode ser também um mecanismo de defesa em relação às substâncias de defesa do hospedeiro. Então, em pH alcalino foi possível demonstrar algumas situações de ataque e defesa da bactéria que podem ocorrer durante a infecção.

5.2.2 Orf identificada no tratamento com penicilina 600 mg/ml

Os agentes antimicrobianos podem atuar de várias maneiras: na biossíntese da membrana celular; na síntese protéica da bactéria; na replicação e reparo do DNA, dentre outras. A penicilina e a cefalosporina são agentes inibidores da biossíntese da parede celular do microrganismo. Estas substâncias, que atuam como pseudosubstratos, possuem domínios de transpeptidase e transglicosilase capazes de ligarem-se aos sítios de algumas enzimas como a PBPs- *beta lactam-containing penicillins*. As PBPs participam da síntese da parede celular bacteriana e estão ancoradas na membrana citoplasmática (PITOUT *et al.*, 1997). A penicilina quando está ligada a um sítio de uma PBP pode impedir a formação de cadeias peptídicas (peptídeoglicanos) impossibilitando a composição da parede celular (WALSH, 2000). Por isto, estes agentes inibidores são conhecidos como beta lactâmicos.

O microrganismo, alvo destes antibióticos, pode adquirir e utilizar vias estratégias de resistência a estas substâncias. Uma destas vias é a organização e/ou ativação de um complexo protéico, conhecido como bomba de efluxo de drogas, localizado na membrana plasmática, capaz de impedir o acúmulo de substâncias tóxicas para o organismo.

Um outro mecanismo de resistência para impedir a atuação da penicilina é a sua destruição química dada por hidrólise, através da atuação da beta lactamase. O seqüenciamento completo do genoma da *Xac* revelou a existência de 5 genes codificadores desta enzima (um deles foi denominado *bla* e os demais estão ainda

sem denominação). Além disso, identificou-se um gene regulador transcricional de *bla*, chamado de *blaI*.

Em nosso trabalho, a *Xac* submetida a penicilina na concentração de 600 µg/mL (próximo ao MIC) expressou diferencialmente a proteína tirosil tRNA sintetase.

⌘ *Tirosil tRNA sintetase (tyrS) (xac3894)*

O gene *tyrS*, que codifica a proteína tirosil tRNA sintetase, identificado durante o processo de anotação, foi catalogado no grupo denominado de Metabolismo de Macromoléculas (da SILVA *et al.*, 2002). Esta proteína está relacionada com o metabolismo de RNA e sua atividade catalítica pode ser representada pela seguinte reação:



A tirosil tRNA sintetase apresenta domínios conservados com a tRNA sintetase de classe 1 (e-value $5e^{-62}$ e um alinhamento de 96,5%) como mostra a figura 32.

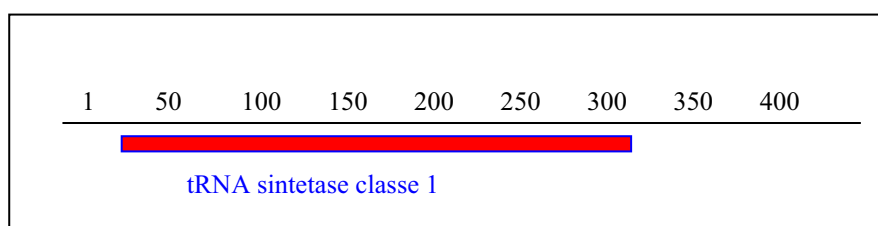


Figura 32: Esquema representativo do domínio conservado da tirosil tRNA sintetase apresentando similaridade com o domínio da tRNA sintetase classe 1.

As aminoacil-tRNA sintetases formam um grupo de enzimas que ativam e transferem aminoácidos para as moléculas específicas de tRNA, este processo é a etapa inicial da síntese protéica. As 20 aminoacil tRNA sintetases são divididas em duas classes: I e II. A classe I é específica para arginina, cisteína, ácido glutâmico,

glutamina, isoleucina, leucina, metionina, tirosina, triptofano e valina. Já foi observado experimentalmente que a estrutura molecular desta classe apresenta homologia com a triptofanil tRNA sintetase (DOUBLIE *et al.*, 1995).

Upstream ao gene *tyrS* identificou-se três de proteínas hipotéticas conservadas e uma ORF do gene *ampG* cuja função acredita-se estar relacionado a uma permease do sistema de indução da beta-lactamase e também na reposição de peptídeoglicanos (Figura 33). *Downstream* ao gene *tyrS* foi identificado um *cluster* relacionado à síntese de RNA ribossomal.

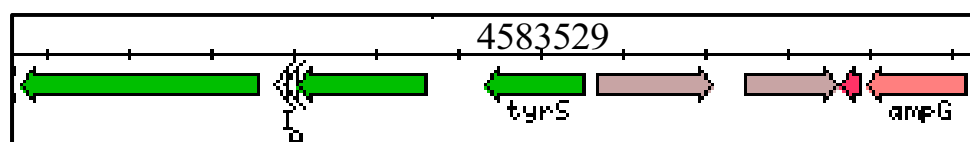


Figura 33: Esquema representativo da localização do gene *tyrS*. *Upstream* ao gene *tyrS* identificou-se três de proteínas hipotéticas conservadas e o gene *ampG*. *Downstream* ao gene *tyrS* foi identificado um operon relacionado à síntese de RNA ribossomal.

A expressão diferencial do gene *tyrS* pode estar relacionada a: 1. síntese de uma proteína de tolerância a penicilina (gene *lytB*) identificada em *Xac*, e em todas as bactérias gram negativas, como uma hidrolase capaz de regular a atividade da guanosina 3',5'-bispirofosfato sintetase I; 2. síntese de proteínas relacionadas à síntese e/ou atuação da beta-lactamase, uma vez que próximo ao *tyrS* está localizada uma região codificadora da AmpG. Como já foi citado, esta proteína é atuante na indução da beta-lactamase; 4. formação do complexo de moléculas relacionadas ao efluxo de drogas.

Nestes casos, a síntese de aminoácido ocorre para a *Xac* responder de forma eficiente a algum destes mecanismos (Figura 34).

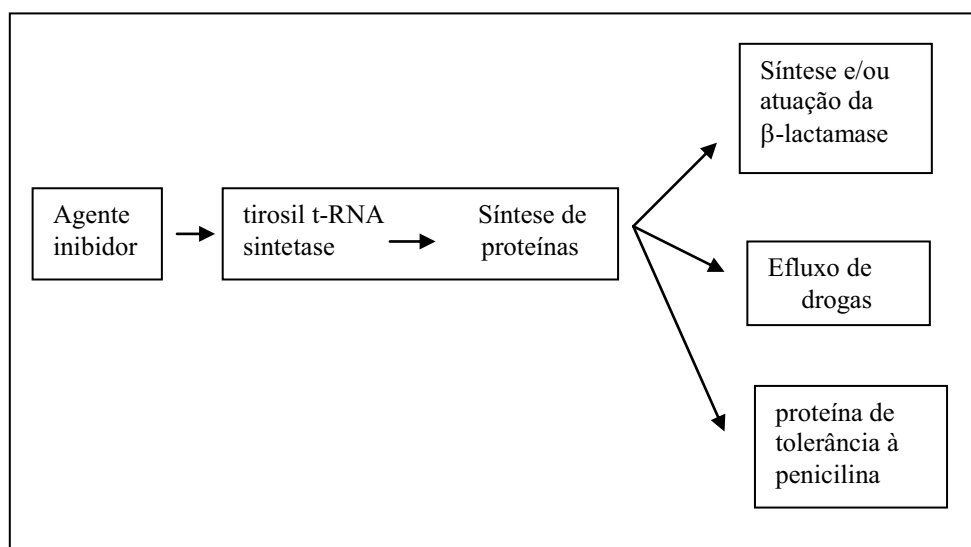


Figura 34: Representação das hipóteses possíveis para a expressão diferencial da tirosil t-RNA sintetase diante do estresse à penicilina. Esta proteína atuante na síntese de outra proteína que pode ser a beta lactamase ou um indutor dela. Pode ser uma proteína do efluxo de drogas ou uma proteína de tolerância à penicilina.

Esta pode ser uma proteína que está sendo expressada em qualquer outro ambiente ou pode estar sendo expressada pelo ambiente desfavorável, no entanto a atuação da tirosil t-RNA sintetase pode ser em inúmeras possibilidades, além destas destacadas no esquema da figura 34.

5.2.3 Orfs identificadas no tratamento com ampicilina 400 mg/ml

A ampicilina é um agente beta-lactâmico, assim como a penicilina e seus derivados. Um mecanismo de resistência da *Xac* é a síntese da β -lactamase. Na *Xac* esta enzima é induzida por permeases codificada por ampG (proteína sinalizadora), além de ampR (proteína regulatória da β -lactamase), AmpC, ampE (proteína de membrana que atua na sinalização para a regulação da enzima).

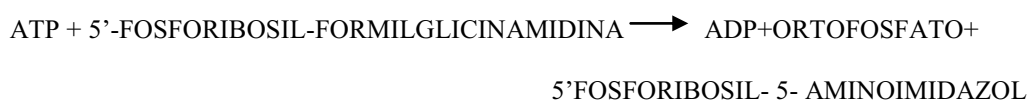
WEND *et al.* (1997) identificaram uma β -lactamase periplasmática de 30 kDa em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, linhagem 11, resistente à ampicilina. Os pesquisadores demonstraram identidade e domínios conservados entre o gene da β -lactamase (gene *bla*) desta linhagem com outras linhagens de *Xanthomonas*: *X. campestris* (linhagens 2, 6, 11A, 17 e 85), *X. begoniae* (linhagem 59), *X. phaseoli* (linhagem 73), *X. glycines* (linhagem 69), *X. vesicatoria* (linhagem 64), um fragmento de 10 Kb foi detectado para *X. axonopodis* pv. *citri* (linhagem 60) e um fragmento de 5.5 Kb, em *X. oryzae* pv. *oryzae* (linhagem 21).

Já foi descrito que a ampicilina é capaz de ativar um mecanismo de resistência alternativo (CARLSON e FERRIS, 1999). A expressão do gene *marA* tem sido identificado como um mecanismo impedindo o influxo de antibióticos (GEORGE e LEVY, 1993) através da diminuição da expressão de porinas (HERNANDES-ALLES *et al.*, 1999). A *Xac* possui em seu genoma componentes que induzem a expressão de um operon *mar* e também foi identificado o regulador negativo deste operon, um repressor MarR.

Quando submetida a um meio de cultura contendo 400 $\mu\text{g/mL}$, valor próximo ao MIC (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2002), apresentou uma expressão diferencial de genes relacionados à fosforibosilformilglicinamida ciclo ligase e à uma integrase. A expressão desses genes não foi observada em meio de cultura sem o antibiótico e também quando o meio apresentava 600 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina.

⌘ Fosforibosilformilglicinamida ciclo ligase (purM) (xac2959)

A fosforibosilformilglicinamida ciclo ligase foi catalogada no grupo relacionado a Biossíntese de Pequenas Moléculas (da SILVA *et al.*, 2002). Sabe-se que esta proteína atua na biossíntese de purinas, caracterizada pela seguinte reação:



A fosforibosilformilglicinamidina ciclo-ligase também pode ser chamada de Fosforibosil-aminoidazol sintetase, AIR sintase, AIR sintetase e finalmente AIRS.

Esta proteína tem um domínio conservado com a extremidade N terminal da proteína AIR sintase e sugere-se que trata-se de um domínio ligante de ATP (98,7% de alinhamento e e-value $9e^{-29}$). Também foi identificado um outro domínio semelhante a extremidade C-terminal da proteína AIRS-C (postulado como um domínio ligante de sulfato) (apresentou 76, 3% de alinhamento e e-value $3e^{-18}$) (figura 35).

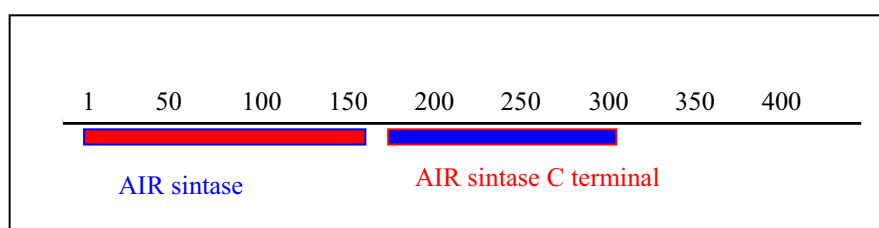


Figura 35: Esquema representativo dos domínios conservados da AIR sintase de *Xac* que apresenta grande similaridade com os domínios de da AIR sintase e AIR sintase C terminal de outros organismos.

O gene *purM* está localizado no genoma da *Xac* numa região bastante conservada e pode pertencer a um *cluster* como mostra a figura 36:

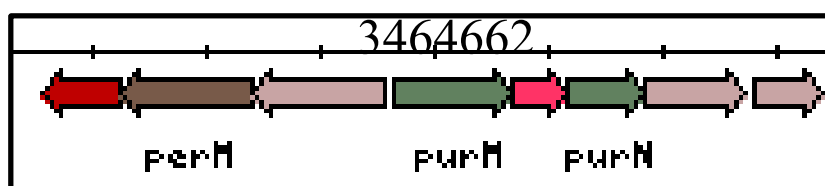


Figura 36: Representação esquemática da localização do gene *purM* com posição inicial em 3.464.662 pb. *Downstream* ao gene *purM* existe um gene que codifica uma proteína hipotética conservada exclusiva de *Xanthomonas*, um gene *purN*. Em seguida há ainda outras regiões que codificam proteínas hipotéticas conservadas. *Upstream* ao *purM* foi identificado um gene que codifica uma proteína hipotética conservada e o *perM*.

Na região *downstream* ao gene *purM* existe um gene que codifica uma proteína hipotética conservada exclusiva de *Xanthomonas*, um gene *purN* (codifica a 5'-fosforibosylglycinamida transformilase) também relacionado a síntese de purinas. Em seguida, há ainda outras regiões que codificam proteínas hipotéticas conservadas. A região *upstream* ao *purM* foi identificado um gene que codifica uma proteína hipotética conservada, um gene *perM* que codifica uma permease, além de um gene relacionado a replicação de DNA (gene ainda sem nome, relacionado a ATPase no replicação do DNA).

Estudos da AIR sintase em *E. coli* já admitiram que trata-se de uma classe de proteína ligante de ATP (LI *et al.*, 1999 e MUELLER *et al.*, 1999). Uma deficiência na atividade da enzima foi superada com o aumento nos níveis de concentração do substrato formilglicinamida ribonucleotídeo (a AIR sintase converte este substrato em aminoimidazol ribonucleotídeo (AIR), ADP e P_i) (ZILLES *et al.*, 2001). Deste modo, esta enzima pode ser regulada pela concentração de ATP ou do substrato, AIR.

Sabe-se que esta enzima pode estar ativada em condições favoráveis à sobrevivência da bactéria. No entanto, pode-se sugerir uma “super expressão” em meio de cultura contendo a droga, um agente tóxico para o microrganismo. Diante disto, sugere-se que a “batalha” da *Xac* para sobreviver em um meio inóspito pode ter favorecido a expressão da AIR sintase com o intuito de aumentar a síntese de ácidos nucleicos e a replicação de DNA.

⌘ Proteína de Virulência (acvB) (xac1368)

Esta ORF que codifica *acvB* (proteína de virulência identificada em *Agrobacterium tumefaciens*, cuja função é complementada pelo produto do gene *virJ*) está catalogada no grupo “Patogenicidade, virulência e adaptação” (da SILVA *et al.*, 2002) e não apresenta a denominação “Vir” que é observado no restante das proteínas de virulência. O genoma da *Xac* apresenta 14 proteínas Vir (VirB1, VirB10, VirB11, VirB2, VirB3, VirB4, VirB6, VirB6, VirB6, VirB8,

VirB9, VirD4, VirK, VirP) e, separadamente, com diferente nomenclatura, mais duas proteínas de virulência (duas *acvB*).

A proteína de virulência *acvB* não apresenta domínios conservados, no entanto, o gene que codifica tal proteína está localizado próximo a proteínas hipotéticas conservadas, tanto *upstream* como *downstream* ao gene. Foi identificado também o gene *araJ*. Este último é um transportador MFS e atua no transporte de açúcar, induzido por arabinose. Além disso, o *araJ* está envolvido na resistência a antibióticos em bactérias gram negativas (Figura 37).

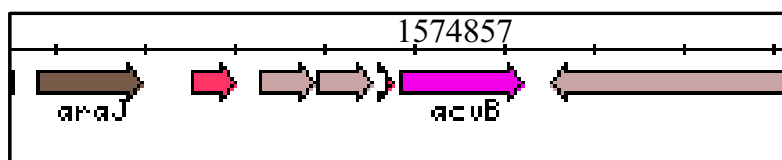


Figura 37: Esquema representativo da localização do gene *acvB*. Posição inicial de 1.574.857 pb. O gene está localizado entre genes que codificam proteínas conservadas.

Conforme já foi mencionado, esta ORF foi identificada em *Agrobacterium tumefaciens* (um gene cromossomal) e sua função na bactéria é complementada pelo gene *virJ*. A infecção de plantas pela *A. tumefaciens* provoca a formação de tumores (galhas) devido a transferência de um complexo nucleoprotéico até o interior da célula hospedeira (célula vegetal) que é mediado por um sistema de transporte codificado por uma região de virulência que contém os genes *vir*. Mutações foram induzidas em genes *vir* de *A. tumefaciens*, revelando a expressão do gene *virJ* através da indução de acetosiringona (AS) (JIA et al., 2002). Esta região *virJ* é similar a um gene cromossomal anteriormente caracterizado como gene *acvB*. Deste modo, sugeriu-se que *virJ* pudesse complementar o fenótipo de avirulência de um mutante de *acvB*, confirmando que estes dois genes codificam o mesmo fator relacionado a tumorigênese. Além disso, estes genes podem estar relacionados a habilidade da *A. tumefaciens* em transferir o T-DNA (oncogene) para o interior da célula vegetal e o *acvB* é o primeiro gene cromossomal implicado

neste processo (PAN *et al.*, 1995), mas sua função específica ainda não está elucidada.

Os genes *vir* do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* são expressos de forma eficiente em meio ácido (LI *et al.*, 2002). Muitas bactérias patogênicas, apesar de ter a taxa de crescimento melhor em pH neutro, durante o processo infeccioso estão expostas às condições muitas vezes de estresse quanto ao pH, tanto fora como quanto dentro do hospedeiro. Sabe-se que o pH ácido é um dos “sinais” que favorecem a expressão de fatores de virulência.

Como já foi mencionado, a *A. tumefaciens* possui tanto a VirJ como a acvB, mas em *Xac* foi identificado somente a acvB com similaridade de $2e^{-37}$ com VirJ de *A. tumefaciens*. A proteína VirJ de *Agrobacterium* apresenta domínios conservados com grande similaridade (e-value $8e^{-62}$) com componentes do sistema de secreção tipo IV (no caso da *Agrobacterium* é responsável pela secreção de Ti até a célula hospedeira). Assim, acvB é uma proteína de virulência que pode atuar como componente do sistema de secreção tipo IV.

Então, a *Xac* pode estar identificando uma situação de estresse, isto é, reconhecendo o antibiótico como uma substância tóxica (talvez uma substância de defesa do hospedeiro). Na tentativa de anular a defesa do hospedeiro, a bactéria utiliza sistemas de secreção que transportam moléculas para o meio externo como defesa ao meio inóspito.

⌘ Integrase (xac3298)

O seqüenciamento completo do genoma da *Xac* revelou a existência de 17 integrases. Uma delas foi identificada no atual trabalho, numa expressão diferenciada, quando a bactéria foi submetida a um meio contendo ampicilina. Esta integrase possui domínios conservados com uma proteína membro da família da fago-integrase (*phage-integrase*) e apresentou um alinhamento de 77% e um e-value de $2e^{-10}$ (Figura 38).

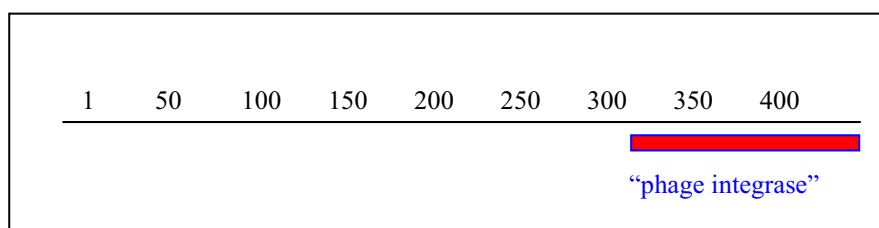


Figura 38: Esquema representativo do domínio conservado observado (*phage integrase*) da integrase.

Os vários membros da família das integrases mostram pouca similaridade de sequência, tal ocorrência pode estar refletindo a diversidade de função e formas na qual estas recombinases atuam nos seus rearranjos ao longo do genoma (GUO *et al.*, 1997).

O gene da integrase identificada neste trabalho tem uma região *downstream* de genes codificadores de proteínas hipotéticas conservadas e *usptream* uma região relacionada à moléculas de RNA ribossomais, o gene *estA* (lipase/esterase), uma região contendo um gene codificador de uma proteína conservada e o gene *thiG* relacionado à síntese de tiaminas (Figura 39).

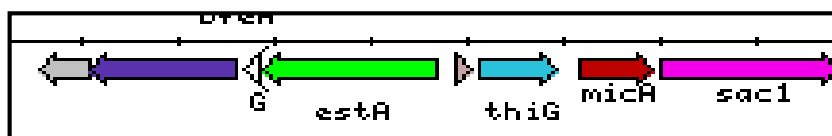


Figura 39: Representação esquemática da localização do gene da integrase (em roxo). Posição inicial 3.877.600 pb. *Downstream* existem genes codificadores de proteínas hipotéticas conservadas. *Usptream* um *cluster* de RNA ribossomais, *estA*, uma região contendo um gene codificador de uma proteína conservada e o gene *thiG*.

Pode-se sugerir que esta proteína esteja atuando no rearranjo do DNA já que esta bactéria possui elementos móveis relacionados com a resposta adaptativa a este mecanismo de resistência ao antibiótico.

Integrans são elementos genéticos que facilitam a integração de DNA exógeno, conhecidos como cassetes, através de um sítio específico de recombinação. Esses genes cassetes usualmente estão associados com uma única ORF que codifica um determinante de resistência a um antibiótico (ROWWE-MAGNUS *et al.*, 2001). A atuação de Integrans de Multiresistência e que contém várias combinações de genes cassetes de resistência a antibiótico está relacionada com elementos transferidos durante a evolução de diversas bactérias gram negativas.

Deste modo, uma possível explicação para a expressão de uma integrase, numa situação de estresse a um agente inibitório, ocorra devido a necessidade da *Xac* ativar um mecanismo de resistência ao antibiótico. Neste caso, a resistência da bactéria ao antibiótico pode estar ocorrendo justamente pela formação destes integrans de multiresistência dado por um rearranjo do DNA da bactéria.

Assim, a *Xac*, em um ambiente contendo um agente inibidor, é capaz de induzir respostas adaptativas como: expressão de uma AIR sintase, uma proteína de virulência e uma integrase. Algumas hipóteses podem explicar quais os processos que devem ocorrer no patógeno como está demonstrado no esquema da figura 40:

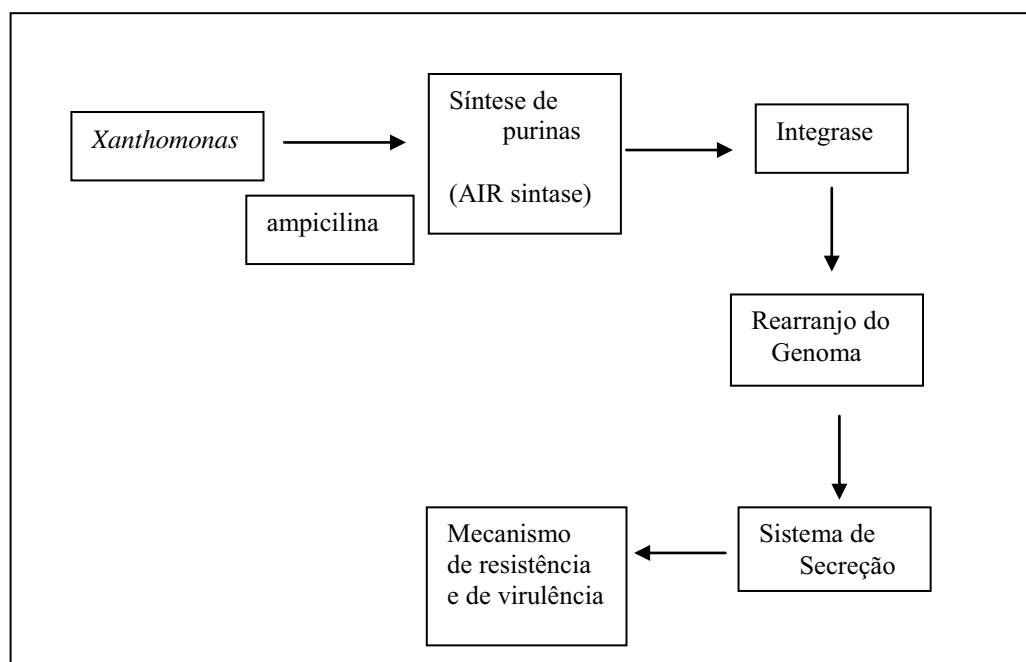


Figura 40: Esquema representativo dos processos celulares da *Xac* em ambiente com ampicilina. Uma proteína relacionada com a síntese de purinas, que participa etapa inicial da síntese protéica pode ser requisitada quando uma integrase é ativada. Ocorre um rearranjo do DNA como um mecanismo de resistência que pode ser auxiliado com a ativação de um Sistema de Secreção IV, impedindo a entrada do agente tóxico.

6. Conclusões

Neste trabalho pode-se observar algumas respostas adaptativas da *Xac* com as alterações no pH extracelular e quando submetida a antibióticos.

A *Xac* submetida ao pH 8.0 expressou diferencialmente um transportador, uma proteína de ataque ao hospedeiro, uma proteína de síntese de aminoácido, uma proteína hipotética conservada.

Este fitopatógeno, quando submetido a um meio de cultura contendo ampicilina na concentração de 400 µg/mL expressou diferencialmente uma proteína de virulência, uma proteína de síntese de purinas e uma integrase.

Nestas situações duas situações, foi possível a identificação de um processo infeccioso caracterizado pela expressão de proteínas de defesa e ataque do patógeno.

Em meio de cultura contendo penicilina a *Xac* expressou uma proteína que pertence ao metabolismo de RNA. Trata-se de uma proteína relacionada com várias possibilidades de mecanismos de respostas adaptativas, o que dificulta a proposição de hipóteses de sua atuação.

Novas perspectivas são levantadas quanto aos próximos experimentos que poderiam ser elaborados com a *Xac*. Este fitopatógeno poderia ser submetido a ensaios mais complexos de expressão gênica, além do rompimento genes de interesse. A bactéria poderia ainda ser inserida em tratamentos semelhantes aos aqui utilizados *in vitro*, no entanto, estes ensaios poderiam ser feitos no campo e observar as respostas de adaptação do microrganismo.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRÉ, B. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.11, n.16, p.1575-1611, 1995.
- BAUER, D., MÜLLER, H., REICH, J., REIDEL, H., AHRENKIEL, V., WARTHOF, P., STRAUSS, M. Identification of differentially expressed mRNA species by improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.*, v.21, n.18, p. 4272-4280, 1993.
- BERTIOLI, D. J., SCHLICHTER, U. H., ADAMS, M. J., BURROWS, P. R., STEINBISS, H. H., ANTONIW, J. F. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, v.23, n.21, p.4520-4523, 1995.
- BIRCH, P. R. Targeted differential display of abundantly expressed sequences from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* which contain regions coding for fungal cellulose-binding domains. *Curr. Genet.*, v.33, p.70-76, 1998.
- BROWN, A. J., HUTCHINGS, C., BURKE, J. F., MAYNE, L.V. Application of a rapid method (targeted display) for the identification of differentially expressed mRNAs following NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells. *Mol. Cell Neurosci.*, v.13, n.2, p.119-130, 1999.
- BROWN, B. Florida fights to stop citrus canker. *Science*, v.292, n.5525, p.2275-2276, 2001.
- BÜTTNER, D., BONAS, U. Port of entry-the type III secretion translocon. *TRENDS in Microbiol.*, v.10, p.186-192, 2002.

- CARLSON, S. A., FERRIS, K. E. Augmentation of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* DT104 following exposure to penicillin derivatives. *Veterinary Microbiology*, v.73, p.25-35, 2000.
- CATALDO, L. M., ZHANG, Y., LU, J., RAVID, K. Rat NAP1: cDNA cloning and upregulation by Mpl ligant. *Gene*, v.226, n.2, p.355-364, 1999.
- COHN, J., SESSA, G., MARTIN, G. B. Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Biol.*, v.13, p.55-62, 2001.
- CORTON, J. C., GUSTAFSSON, J. A. Increased efficiency in screening large numbers of cDNA fragments generated by differential display. *Biotechniques*, v.22, n.5, p.802-810, 1997.
- CUBERO, J., GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Quantitative PCR method for Diagnosis of Citrus Bacterial Canker. *Appl. Envirol. Microbiol.*, v.67, n.6, p.2849-2852, 2001.
- CURSINO-SANTOS, JR.; AQUINO-FERREIRA, R & MARTINEZ-ROSSI, NM. Relação entre a resistência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* à inibidores de crescimento e a presença de genes putativos envolvidos com este processo. Anais do 48th Congresso Nacional de Genética. 2002.
- 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*, v.417, p.459-463, 2002.

DEIWICK, J., HENSEL, M. Regulation of virulence by enviromental signals in *Salmonella typhimurium*. *Electrophoresis*, v.20: (4-5), p.813-817, 1999.

DOUBLIE, S., BRICOGNE, G., GILMORE, C., CARTER, C.W. Tryptophanyl t-RNA synthetase crystal structure reveals na unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase. *Structure*, v.3, n.1, p.17-31, 1995.

DOW, J. M., DANIELS, M. J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast*, v.17, p.263-271, 2000.

FACHIN, A. L. Clonagem e caracterização do gene *atrD*, que codifica um transportador do tipo ABC (ATP Binding Cassete) envolvido na resistência à múltiplas drogas no dermatófito *Trichophyton rubrum*. Ribeirão Preto, 2001. 123p Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- FANCIULLI, M., BRUNO, T., CERBONI, C., BONETTO, F., IACOBINI, C., FRATI, L., PICCOLI, M., FLORIDI, A., SANTONI, A., PUNTURIERI, A. Cloning of a novel human RNA polymerase II subunit downregulated by doxorubicin: new potential mechanisms of drug related toxicity. *FEBS Letters*, v.384, n.1, p.48-52, 1996.
- FISLAGE, R.; BERCEANU, M.; HUMBOLDT, Y.; WENDT, M., OBERENDER, H. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.9, p.1830-1835, 1997.
- FLEMING, J. T., YAO, W., SAULER, G. S. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, n.10, p.3698-3706, 1998.
- GEORGE, A. M., LEVY, S. B. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.*, v.155, n.2, p.531-540, 1983.
- GROOM, Q. J., TORRES, M. A., FORDHAM-SKELTON, A. P., HAMMOND-KOSACK, K. E., ROBINSON, N. J., JONES, J. D. G. *rbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant J.*, n.10, p.515-522, 1996.
- GUO, F., GOPAUL, D.N., VAN DUYNE, G. D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, v.389, n.6646, p.40-46, 1997.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, v.8, p.1773-1791, 1996.

- HARRIER, L. A., WRIGHT, F., HOOKER, J. E. Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* Gerdemann e Trappe. *Curr. Genet.*, v.34, n.5, p.386-392, 1998.
- HEITHOFF, D. M., CONNER, C. P., HENTSCHEL, U., GOVANTES, F., HANNA, P. C., MAHAN, M. J. Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. *Jornal of Bacteriology*, v.181, n.3, p.799-807, 1999.
- HERNANDEZ-ALLES, S., BENEDI, V. J., MARTINEZ-MARTINEZ, L., PASCUAL, A., AGUILAR, A., TOMAS, J. M., ALBERTI, S. Developement of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, v. 43, n.4, p.937-930, 1999.
- HEYMANN, J. A. W., SARKER, R., HIRAI, T., SHI, D., MILNE, J. L. S., MALONEY, P. C., SUBRAMANIAM, S. Projection structure and molecular architecture of OxlT, a bacterial membrane transporter. *EMBO J.*, v.20, n.16, p.4408-4413, 2001.
- JAMES, W. Y. F. e CHAN, P. H. G. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances*, v.17, p.489-508, 1999.
- JIA, Y. H., LI, L. P., HOU, Q. M., PAN, S. Q. An *Agrobacterium* gene involved in tumorigenesis encodes an outer membrane protein exposed on the bacterial cell surface. *Gene*, v.284, p.113-24, 2002.

- JOSHI, L., LEGER, R. J., ROBERTS, D.W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display RT-PCR. *Gene*, v.197, p.1-8, 1997.
- KOLACZKOWSKI, M., GOFFEAU, A. Active Efflux by Multidrug Transporters as One of the Strategies to Evade Chemotherapy and novel Practical Implications of Yeast Pleiotropic Drug Resistance. *Pharmacol. Ther.*, v.76, p.219-242, 1997.
- KOZIAN, D. H.; KIRSCHBAUM, B. J. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol.*, v.17, p.73-78, 1999.
- LAM, E., KATO, N., LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, v.411, n.6839, p.848-853, 2001.
- LAMB, T. M., XU, W., DIAMOND, A., MITCHELL, A. P. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.15, p.1850-1856, 2001.
- LI, C., KAPPOCK, T. J., STUBBE, J., WEAVER, T. M., EALICK, S. E. X-ray crystal structure of aminoimidazole ribonucleotide synthetase (PurM), from the *Escherichia coli* purine biosynthetic pathway at 2.5 Å resolution. *Structure Fold Des.*, v.7, n.9, p.1155-1166, 1999.
- LI, L., JIA, Y., HOU, Q., CHARLES, T. C., NESTER, E. W., PAN, S. Q. A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.19, p.12369-12374, 2002

- LIANG, P., PARDEE, A. B. Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, v.257, p.967-971, 1992.
- LIANG, P. AVERBOUKH, L. PARDEE, A. B. Distribution and cloning of eukaryotic m RNA by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Rev.*, v.21, n.14, p. 3269-3275, 1993.
- LIANG, P., ZHU, W., ZHANG, X., GUO, Z., O'CONNELL, R. P., AVERBOUKH, L., WANG, F., PARDEE, A. B. Differential Display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Rev.*, v.22, p.5763-5764, 1994.
- MIURA, F., YADA, T., NAKAI, K., SAKAKI, Y., ITO, T. Differential display analysis of mutants for the transcription factor Pdr1p regulating multidrug resistance in the budding yeast. *FEBS Lett.*, v.505, n.1, p.103-8, 2001.
- MOFFAT, A . S. Finding New Ways to Fight Plant Diseases. *Science*, v.292, n.5525, p.2270-2274, 2001.
- MOU, L., MILLER, H., LI, J., WANG, E., CHALIFOUR, L. Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Common.*, v.199, n.2, p.564-569, 1994.
- MUELLER, E. J., OH, S., KAVALERCHIK, E., KAPPOCK, T. J., MEYER, E., LI, C., EALICK, S. E., STUBBE, J. Investigation of the ATP binding site of *Escherichia coli* aminoimidazole ribonucleotide synthase using affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, v.38, n.31, p.9831-9839, 1999.

MUTCH, D. M., BERGER, A., MANSOURIAN, R., RYTZ, A., ROBERTS, M-A.
The limit fold change model: A practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BCM Bioinformatics*, v.3, n.1, p.17-28, 2002.

NAG, D. K., AXELROD, J. Identification of yeast meiosis-specific genes by differential display. *Methods*, v.16, n.4, p.423-433, 1998.

NAGEL, A. C., FLEMING, J. T., SAYLER, G. S., BEATTIE, K. L. Screening for Ribosomal-Based False Positives Following Prokaryotic mRNA Differential Display. *BioTechniques*, v.30, p.988-996, 2001.

NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v.12, n.3, p.215-223, 2001.

NIKAIDO, H., NORMARK, S. Sensitivity of *Escherichia coli* to various β -lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic β -lactamases: a quantitative predictive treatment. *Mol Microbiol.*, v.1, n.1, p.29-36, 1987.

NOZAWA, S.R. Regulação da expressão gênica pelo pH em fungos filamentosos: caracterização molecular do gene *pacC*. Ribeirão Preto, 2002. 167p. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

NOZAWA, S. R., MAY, G. S., MARTINEZ-ROSSI, N. M., FERREIRA-NOZAWA, M. S, COUTINHO-NETTO, J., MACCHERONI, W., ROSSI, A.

Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics Biol*, v.38, n.2, p. 220-227, 2003.

PAN, W., LIN, J., LE, C. T. How many replicates of arrays are required to detect gene expression changes in microarray experiments? A mixture model approach. *Genome Biology*, v.3, n.5, research 0022.1-0022.10, 2002.

PAULINO, L. C., MELLO, M. P.; OTTOBONI, L. M. M. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analysed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, v.23, n.4, p.520-527, 2002.

PITOUT, J. D., SANDERS, C. C., SANDERS, W. E. JR. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative Bacilli. *Am J. Med.*, v.103, p.51-59, 1997.

PRESTON, G. M., HAUBOLD, B., RAINEY, P. B. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.1, n.5, p.589-597, 1998.

RAHME, L. G., MINDRINOS, M. N., PANOPOULOS, N. J. Plant and environmental sensor signals control the expression of *hrpX* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bacterial J.*, v.174, n.11, p.3499-3507, 1992.

RHODES, J. C., OLIVER, B. G., ASKEW, D. S., AMLUNG, T. W. Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. *Med. mycol.*, v.39, n.3, p.253-260, 2001.

- ROSSI, A., ARST, H. N. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.54, p.51-53, 1990.
- ROWE-MAGNUS, D. A., GUEROUT, A-M., PLONCARD, P., DYCHINCO, B., DAVIES, J., MAZEL, D. The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.98, n.2, p.652-657, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular Cloning A laboratory Manual. Second edition, 1989. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. A new method for sequencing DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.74, p.560-564, 1977.
- SHEPARD, B. D., GILMORE, M. S. Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.1470-1476, 1999.
- SLONCZEWSKI, J. L., BLANKENHORN, D., FOSTER, J. W., MARTIN, A., BOOTH, I. R., STOCK, J. B., SKULACHEV, V., ROWBURY, R. J., KONING, W. N., BENNETT, G. N., KOBAYASHI, H., FILLINGAME, R. H., SCHAFER, G., POOLE, R. K., KRULWICH, T. A., COOK, G. M., QUIVEY, R.G. Acid and base regulation in the proteome of *Escherichia coli*. *Novartis Found Symp.*, v.221, p.75-92, 1999.
- STURTEVANT, J. Applications of differential display reverse transcription-PCR to

molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin. Microbiol Rev.*, v.13, p.408-427, 2000.

VAN BAMBEKE, F., BALZI, E., TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*, v.60, n.4, p.457-460, 2000.

WAN, J. S., SHARP, S. J., POIRIER, G. M., WAGAMAN, P. C., CHAMBERS, J., PYATI, J., HOM, Y., GALINDO, J. E., HUVAR, A., PETERSON, P. A., JACKSON, M. R., ERLANDER, M.G. Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat. Biothechnol.*, v.14, p. 1685-1691, 1996.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drugs resistance. *Nature*, v.406, n.6797, p.775-781, 2000.

WENG, S. F., CHEN, C.Y., LEE, Y. S., LIN, J. W., TSENG, Y. H. Identification of a novel β -lactamase produced by *Xanthomonas campestris*, a phytopathogenic bacterium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.7, p.1792-1797, 1999.

WENGELNIK, K. B., BONAS, U. HrpXv, na AraC-type regulator activates expression of five out of six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*, v.178, p.3462-3469, 1996

www.biotech.ufl.edu/~pcfcl/canker.htm

www.fapesp.br

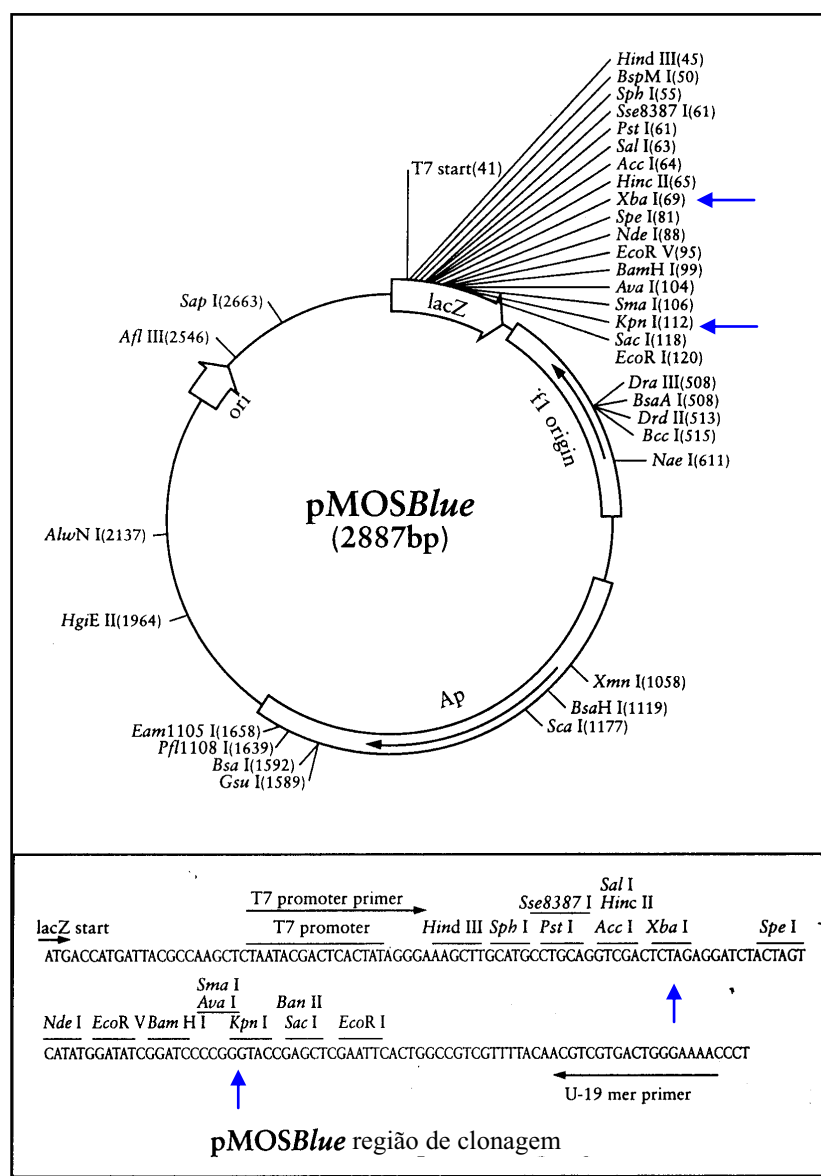
www.fundecitrus.com.br

www.ncbi.nlm.nih.gov

ZILLES, J. L., KAPPOCK, J., STUBBE, J., DOWNS, D. M. Altered Pathway Routing in a class of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mutants defective in Aminoimidazole ribonucleotide synthetase. *Journal of Bacteriology* v.183, n.7, p.2234-2240, 2001.

APÊNDICE

Anexo 1



Anexo 1: Esquema do vetor de clonagem *pMOSBlue*. A digestão através da utilização de enzimas de restrição *Xba I* e *Kpn I* como estratégia para liberação do fragmento clonado que foi utilizado como sonda nos experimentos de *Northern Blotting*.