

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Participação da ORF XAC3629 na regulação do operon
de resistência a cobre *copAB* em *Xanthomonas citri*
subsp. *citri***

Aluna: **Amanda Piovesan Ucci**

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Célia Bertolini**

2009

AMANDA PIOVESAN UCCI

Participação da ORF XAC3629 na regulação do operon de resistência a cobre *copAB* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Maria Célia Bertolini**

ARARAQUARA

2009

Dados curriculares

Amanda Piovesan Ucci

1. Dados pessoais

Nascimento: 31 de março de 1983

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: Araraquara – SP

Estado civil: solteira

Filiação: Nelson de Oliveira Ucci

Ana Cláudia Piovesan

Profissão: Bióloga

Documento de Identidade: 33.614.102-6

Cadastro de Pessoa Física: 227.669.688-57

Endereço: Rua Comendador Pedro Morgante, 1051 – Carmo

CEP: 14800-200

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n

CEP: 14800-900 – Araraquara – SP

2. Formação acadêmica

Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, concluído em 2009, Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, concluído em 2006, Centro Universitário de Araraquara – UNIARA.

3. Atividades de pesquisa

3.1 Trabalhos apresentados em congressos

PEIRÓ; D. F, PIOVESAN UCCI; A. P., GORNI; G. R., ALVES, R. G. Entomofauna Associada a Substratos Vivos (Briófitas, Algas Filamentosas, Esponjas e Moluscos) de Ambientes Aquáticos Continentais. In: 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP SIICUSP, 2004, Ribeirão Preto. Anais do 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP SIICUSP, 2004.

OLIVEIRA, H. C.; BARBOSA, J. H.; CARMO, A. U.; FERNANDES, D.; UCCI, A. P. Avifauna do Parque do Basalto: Composição, Frequência e Aspectos Biológicos. In: XIV Congresso Brasileiro de Ornitologia, 2006, Ouro Preto. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Ornitologia, 2006.

CARMO, A. U.; BARBOSA, J. H.; OLIVEIRA, H. C.; FRARE, G. F.; PIZZAIA, D.; UCCI, A. P.; FERNANDES, D.; BERTATO, A. C. Comparação na dieta alimentar da coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*) das áreas rurais e urbanas do município de Araraquara, SP. In: 17º Encontro de Biólogos do CRBio-1, 2006, Santos. Anais do 17º Encontro de Biólogos do CRBio-1, 2006.

BARBOSA, J. H.; CARMO, A. U.; OLIVEIRA, H. C.; UCCI, A. P.; FERNANDES, D.; FRARE, G. F.; MELLO, M. C.; SCHLINDWEIN, M. N. Parque Ecológico do Basalto: refugio para a diversidade da avifauna do município de Araraquara-SP. In: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, 2006, Londrina. Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, 2006.

PEDROSO, G. A.; UCCI, A. P.; BERTOLINI, M. C. XAC3629, a short upstream open reading frame from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri strongly regulates the operon *copAB* expression XI Congress of the PABMB; XXXVII Reunião Anual SBBq, 2008, Águas de Lindóia.

UCCI, A. P.; BERTOLINI, M. C. The short ORF XAC3629 from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri regulates the operon *copAB* expression, XXXVIII Reunião Annual SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

3. 2 Publicação

CARMO, A. U.; UCCI, A. P.; FERNANDES, D.; FRARE, G. F.; OLIVEIRA, H. C.; BARBOSA, J. H.; SCHLINDWEIN, M. N.; MELLO, M. C. Levantamento Preliminar da Avifauna do Parque Ecológico do Basalto no Município de Araraquara - SP. Revista UNIARA, Araraquara, SP, v. 17/18, p. 257-266, 2006.

3.3 Participação em eventos

15º Encontro de Biólogos do CRBio-1, 2004.

VII Encontro sobre Abelhas, 2006.

I Workshop sobre Aves da UfsCar, 2007.

XXXVII Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, 2008.

XXXVIII Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, 2009.

Workshop de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Unesp, 2009.

“A satisfação está no esforço
e não apenas na realização final”

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho à minha mãe,
Ana Cláudia

Agradecimentos

Muitas pessoas tiveram participações fundamentais na realização deste trabalho, estando direta ou indiretamente envolvidas nele, ou realizando os papéis que fazem toda a diferença na minha vida: o de família e o de amigos.

Portanto, deixo aqui os meus agradecimentos a algumas dessas pessoas:

À minha mãe Ana Cláudia, o melhor genoma ancestral que um filho poderia desejar, e que me auxiliou a superar todas as dificuldades, graças ao seu amor.

À minha irmã Luana, pela grande e eterna amizade e cumplicidade.

Ao Jorge pelo apoio e por sempre acreditar em mim.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Célia Bertolini, pelos ensinamentos ao longo destes anos, por fazer parte do meu crescimento profissional e pela oportunidade de trabalho.

Ao Pedro, pelo carinho, compreensão e pelo companheirismo.

À Gisele Audrei Pedroso, pela colaboração inicial neste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório, Monica, que mostrou sua verdadeira amizade em todos os momentos, Rodrigo, que sempre esteve disposto a dividir seus conhecimentos, Messias, pelos momentos agradáveis, à Fernanda Cupertino, pela boa convivência e troca de experiência, Fernanda Zanolli (Ferza), pelas discussões e sugestões neste trabalho, Flávia e Eliane, pela demonstração de carinho e preocupação em tão pouco tempo.

Aos que estiveram ou passaram pelo laboratório neste período, Luis, pelo exemplo como pesquisador, Eduardo, Flávia e Patrícia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos técnicos do laboratório, Fátima, Waldenir, Fernando e ao Tarsísio em especial, que de forma amigável muito contribuiu para a realização deste trabalho.

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

Aos meus amigos de fora do laboratório pelos momentos de descontração.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

Sumário

Resumo	01
Abstract	03
Introdução	05
1. <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> e características do genoma	06
2. Mecanismos de resistência a cobre em diferentes bactérias	07
Objetivos	14
Materiais e Métodos	16
1. Linhagens e manutenção de <i>Xcc</i>	17
2. Inativação da ORF XAC3629 através da inserção de um transposon	17
3. Inativação da ORF XAC3629 através de deleção	18
3.1. Obtenção da construção plasmidial	18
3.2. Transformação de <i>Xcc</i> e seleção da linhagem nocauteada	23
4. Análise das linhagens mutantes XAC3629::Tn em relação ao crescimento	24
5. Complementação funcional das linhagens mutantes XAC3629::Tn	24
5.1. Obtenção da construção plasmidial	24
5.2. Transformação de <i>Xcc</i> e seleção dos clones	26
5.3. Análise de crescimento das linhagens	26
6. Análise da região <i>upstream</i> ao operon <i>copAB</i>	27
7. Preparo de células competentes e transformação de <i>E. coli</i>	27
8. Preparo de células competentes e transformação de <i>Xcc</i>	29
9. Extração de DNA genômico de <i>Xcc</i>	29
10. Extração de DNA plasmidial	30
11. Seqüenciamento de DNA	30
Resultados e Discussão	32
1. Organização genômica da ORF XAC3629	33
2. Construção de uma linhagem nocaute na ORF XAC3629	33
3. Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> das células mutantes XAC3629::Tn	41

4. Ensaios de complementação dos mutantes XAC3629::Tn	45
5. Construções plasmidiais contendo fragmentos da região <i>upstream</i> ao operon <i>copAB</i>	49
Conclusões	52
Referências Bibliográficas	55

Resumo

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xcc) é uma bactéria Gram-negativa responsável pelo o cancro cítrico. A doença causada por este fitopatógeno constitui numa das mais graves doenças da citricultura brasileira, cujas medidas de controle capazes de eliminar completamente a doença são ineficientes até o momento. O sequenciamento e anotação do genoma de Xcc juntamente com estudos relacionados à genômica funcional nesta bactéria realizados em nosso laboratório mostraram a existência, na bactéria, de alguns genes (*copA* e *copB*) que codificam proteínas envolvidas com o mecanismo de resistência a cobre (CopA e CopB). Os genes que codificam ambas proteínas estão organizados em um operon, cuja transcrição é induzida por cobre e é específica ao metal. Componentes a base de cobre são comumente usados na agricultura como agentes microbicidas a fim de reduzir a severidade desta e também de outras doenças nas plantas. Contudo, a eficácia do cobre está sendo reduzida pelo aparecimento de linhagens de bactérias resistentes a este metal, portanto, estudos visando a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência a cobre em Xcc são de grande importância. Uma pequena ORF (XAC3629) que codifica uma proteína hipotética de 152 aminoácidos e que se localiza *upstream* aos genes *copAB* foi identificada. Neste trabalho foi estudado o papel da ORF na regulação do operon *copAB*. Linhagens mutantes contendo a ORF XAC3629 interrompida por um transposon (XAC3629::Tn), previamente construídas no laboratório, foram avaliadas em relação ao crescimento em meio contendo diferentes concentrações de cobre. Estas linhagens mostraram perda da resistência quando o metal foi adicionado ao meio, mesmo em baixas concentrações (0,25 mM), sugerindo seu envolvimento na regulação do operon de resistência a cobre *copAB*. Células da linhagem selvagem são capazes de crescer até uma concentração de cobre de 1 mM. Tentativas foram realizadas para a construção de uma linhagem contendo a ORF nocauteada, entretanto, não foi possível a obtenção deste tipo de mutante. Duas linhagens mutantes XAC3629::Tn foram transformadas com uma construção plasmidial contendo a ORF XAC3629 intacta e os resultados obtidos não mostraram complementação funcional (recuperação da resistência quando as células foram crescidas em meio contendo cobre), sugerindo que o papel desta ORF esteja relacionado a sua sequência nucleotídica. Vários fragmentos da região *upstream* ao operon *copAB*, que contém a ORF XAC3629 foram obtidos e as suas sequências nucleotídicas confirmadas por sequenciamento de DNA. Estes fragmentos serão, posteriormente, utilizados em ensaios de retardamento em gel para verificar se proteínas extraídas da bactéria, após crescimento na presença do metal, são capazes de ligar aos fragmentos. Estes resultados poderão, no futuro, fornecer informações adicionais acerca do papel da ORF na regulação do operon de resistência a cobre em Xcc.

Palavras chave: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, regulação gênica, resistência a cobre, operon.

Abstract

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xcc) is a Gram-negative bacterium that causes citrus canker, one of the most serious diseases in Brazilian crops, and the ways to eliminate it are not efficient. After sequencing and annotation of the Xcc genome our laboratory started to perform functional genomic studies in Xcc. Previous studies identified two genes (*copA* and *copB*) that encode proteins involved in the copper resistance mechanism (CopA and CopB). The genes are organized in an operon whose transcription is induced and specific to copper. Copper compounds are commonly used in agriculture in order to control plant diseases, however the copper effectiveness is being reduced due to the emergence of copper resistant bacteria strains. Therefore, studies related to copper resistance mechanism in Xcc are very relevant. A short ORF (XAC3629) which encodes an 152 amino acids hypothetical protein was identified upstream the operon *copAB*. In this work the role of the ORF in the operon regulation was studied. Mutant strains containing the ORF XAC3629 interrupted by a transposon (XAC3629::Tn) were previously constructed in our laboratory and in this work their growth were evaluated in a medium containing different copper concentration. The mutant strains were unable to grow when the metal was added to the medium, even at low concentration (0.25 mM) suggesting that the ORF XAC3629 may have a role in regulating the operon *copAB*. Wild type Xcc cells are able to grow up to 1 mM copper concentration. Attempts to construct an ORF XAC3629 knocked out strain were performed but this mutant strain was not obtained. Two XAC3629::Tn mutants strains were transformed with a plasmid construction containing the ORF XAC3629 entire sequence plus its flanking regions. The results did not show functional complementation (recovery of the copper resistance when cells were grown in medium containing the metal) suggesting that the role of the ORF might be related to its nucleotide sequence. Different fragments of the operon *copAB* upstream region were obtained and their nucleotide sequence were confirmed after DNA sequencing. The fragments will be utilized in a DNA gel shift essay to verify whether proteins extracted from the bacterium after growth in the presence of copper are able to bind to the fragments or not. These results may provide additional information about the role of the ORF in the regulation of the operon *copAB* in Xcc.

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, gene regulation, copper resistance, operon.

Introdução

1. *Xanthomonas citri* subsp *citri* e características do genoma

Xanthomonas citri subsp. *citri* é uma bactéria Gram-negativa com morfologia de bastonete e não exigente nutricionalmente. É uma bactéria cosmopolita de cor amarela devido à produção do pigmento xanthomonadina e a produção de exopolissacarídeos ou goma xanthana, o que deixa a colônia com aspecto mucóide. No gênero *Xanthomonas* vários táxons foram reclassificados em relação à nomenclatura para melhor adequação na classificação formal e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi reclassificada para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006).

Xanthomonas citri subsp *citri* (Xcc), *X. fuscans* subsp *aurantifolli* e *X. alfafae* subsp *citrumelonis* são responsáveis pelo cancro cítrico (Schaad et al., 2006) no Brasil e em todos os outros lugares do mundo onde há o cultivo de plantas do gênero citrus. As plantas afetadas por Xcc são vítimas de graves lesões tanto nas folhas como no fruto, o que causa sérios prejuízos na economia. A citricultura é um dos agronegócios mais competitivos do Brasil no mercado internacional. Entretanto, como nas demais culturas agrícolas, os citrus são suscetíveis a diferentes pragas conhecidas, as quais causam danos às plantas e grandes prejuízos aos citricultores. O cancro cítrico, causado pela bactéria Xcc, é responsável pelos maiores prejuízos, e atualmente, não há controle químico ou microbiológico para esta doença. Uma das medidas preventivas para a erradicação do cancro cítrico é a remoção de parte das plantas infectadas ou então da planta inteira, dependendo da intensidade da infecção.

O cancro cítrico é uma doença que ataca variedades e espécies de citros, desde as mais susceptíveis até as mais resistentes. Para que ocorra a contaminação em citros a bactéria deve entrar em contato com os estômatos foliares, poros de água ou lesões no tecido da planta e, deste modo, obter o acesso ao interior da folha, causando a doença. Esta bactéria também pode viver sem o hospedeiro e alastra-se de forma muito fácil, o que aumenta sua disseminação entre as plantações. Esta disseminação pode ser causada tanto por agentes naturais como pelo próprio homem, nas colheitas.

O seqüenciamento do genoma completo de Xcc, realizado pela rede ONSA da FAPESP representou um primeiro passo para o início dos estudos visando um melhor entendimento da doença e a busca de estratégias de controle e combate ao agente patogênico bacteriano. A conclusão deste seqüenciamento representa uma enorme contribuição para a agricultura de vários países, pois possibilita um avanço no conhecimento das interações entre a planta e o patógeno. Após o seqüenciamento, foi verificado que o genoma de Xcc possui ao redor de 5.0 Mb com um total de 4.313 ORFs codificadoras de proteínas sendo que 1.603 são ORFs hipotéticas. Além disso, Xcc possui dois plasmídeos: pXAC33 com 33.699 pb e pXAC64 com 64.920 pb (Silva et al., 2002).

2. Mecanismos de resistência a cobre em diferentes bactérias

O cobre é um metal de transição amplamente distribuído no meio ambiente, presente principalmente em minerais como sulfetos, óxidos ou carbonatos. O cobre existe em dois estados de oxidação: a forma cúprica oxidada Cu(II) e a forma cuprosa reduzida Cu(I) que são efetivos íons para a ligação de moléculas orgânicas. O cobre é um essencial cofator de inúmeras metaloproteínas e enzimas envolvidas na respiração, como oxigenases e proteínas de transporte de elétrons. Contudo, sob certas concentrações, ele é tóxico na célula. Portanto seu nível intracelular deve ser fortemente controlado, pois este metal pode gerar radicais livres e danificar o DNA e membranas lipídicas (Hoshino et al., 1999). Assim, sua captação, disponibilidade e estoque são voltados para as necessidades fisiológicas e os possíveis efeitos tóxicos são limitados.

Assim como o cobre, vários metais são importantes para muitas funções biológicas, mas o excesso do metal pode ser letal. Algumas bactérias para se protegerem das concentrações tóxicas do metal e ao mesmo tempo assegurar suas necessidades nutricionais desenvolveram diferentes sistemas para controlar a homeostase, distribuição, detoxificação e efluxo de cobre. Esses mecanismos de injúria que forçaram muitas bactérias a desenvolver diferentes sistemas para controlar o nível de cobre intracelular a fim de conter o efeito tóxico do metal estão sendo amplamente estudados. Além desses sistemas de homeostase de cobre, mecanismos de resistência ao metal também estão sendo identificados em algumas bactérias (Melano and Cooksey, 1988; Bender et al., 1989). Considerando que a maioria das enzimas que requerem cobre em bactéria parecem ser extracitoplasmáticas ou localizadas dentro de estruturas de membrana interna, e que a maioria dos danos celulares ocorrem no periplasma, é concebível que tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas façam um grande esforço fisiológico para controlar fortemente a concentração de cobre (Macomber et al., 2007). De fato, a presença de sistemas periplasmáticos para neutralizar a toxicidade de cobre tem se tornado bastante evidente (Osman and Cavet, 2008).

Nos organismos procariotos a resistência a cobre pode ocorrer por diferentes mecanismos, e dependendo do organismo pode ser resultante da ação, independente ou não, de genes localizados em plasmídeos ou no DNA cromossomal. Alguns fatores determinam como é a resistência em um microrganismo, como por exemplo, o tipo e o número de mecanismos de captura do metal, o papel que cada metal desempenha no metabolismo normal e a presença de genes localizados em plasmídeos ou cromossomos que controlam a resistência aos metais (Silver and Ji, 1994). Os possíveis mecanismos de resistência incluem seqüestro físico, exclusão e/ou efluxo e detoxificação (Summers and Silver, 1978).

A resistência a cobre em microrganismos também pode envolver um mecanismo de transporte ativo. Neste caso, os sistemas são altamente específicos ao íon tóxico e podem estar

ligados ou não a ATPases. O transporte bacteriano de cobre têm sido relacionado com ATPases do tipo P. Essas enzimas constituem uma família de bombas transportadoras de cátions, localizadas na membrana, com alta conservação de seqüência, encontradas tanto em procariotos como em eucariotos (Silver et al., 1993). Elas geralmente possuem um ou mais domínios de ligação ao metal que contém um par de resíduo de cisteína. Em alguns casos, esses domínios interagem com proteínas de ligação a cobre específicas do citosol, conhecidas como metalochaperonas (Waldron and Robinson, 2009).

Tanto células procarióticas como eucarióticas requerem cobre para o crescimento normal, mas componentes a base de cobre vem sendo usados como controle de bactérias e fungos que causam doenças na agricultura, o que propiciou o surgimento de linhagens de bactérias resistentes a este metal. Porém, mecanismos de homeostase e resistência ao cobre são relatados somente em algumas bactérias patogênicas. Em bactérias fitopatogênicas a resistência ocorre principalmente em *Pseudomonas syringae* e vários gêneros de *Xanthomonas* (Cooksey et al., 1987; Bender et al., 1989; Voloudakis et al., 1993).

O mecanismo para homeostase de cobre no patógeno *Escherichia coli* é amplamente conhecido e realizado através de dois sistemas cromossômicos que catalisam a remoção de excesso de cobre na célula. O sistema *cue* (Cu efflux) que confere tolerância a cobre sob moderadas e altas concentrações do metal e o sistema *cus* (Cu-sensing) que aumenta a tolerância sob condições extremas de estresse pelo metal (Outten et al., 2001). O sistema *cue* consiste em uma proteína metaloregulatória responsiva a cobre, CueR que regula a expressão dos genes *copA* e *cueO*. CopA é uma ATPase do tipo P de translocação de cobre, a qual apresenta indução por quantidades elevadas do metal no meio (Rensing et al., 2000). Ao analisar a região regulatória do gene *copA* de *E. coli*, Outten et al. (2000) encontraram elementos característicos de promotores controlados por proteínas metaloregulatórias da família MerR. Esses mesmos elementos são encontrados na região regulatória do gene *yacK*, o qual codifica uma provável oxidase de cobre, sendo que proteínas homólogas a esta, as quais facilitam o efluxo de cobre, são codificadas por determinantes de resistência ao metal (Outten et al., 2000). A proteína CueO é uma putativa oxidase periplasmática (Grass and Rensing, 2001). O outro sistema cromossômico, denominado *cus*, é regulado por um sistema de transdução de sinal de dois componentes, codificado pelos genes *cusR* e *cusS*, que ativam a expressão do operon *cusCFBA* (Munson et al., 2000).

Há também um mecanismo plasmidial de efluxo em *E. coli* codificado pelos genes *pco* do plasmídio conjugativo pRJ1004. O conjunto de genes *pco* é formado por 7 genes (*pcoABCDRE*) que com exceção do gene *pcoE* está organizado em um operon. A indução dos genes do operon é dependente dos genes *pcoR* e *pcoS* que estão localizados *upstream* aos genes estruturais *pcoABCD* (Brown et al., 1995).

Mecanismos de homeostase a cobre também foram descritos em outras bactérias patogênicas, como *Bacillus subtilis* (Gaballa et al., 2003), *Helicobacter pylori* (Waider et al., 2002), *Enterococcus faecium* (Hasman et al., 2005) e *Enterococcus hirae* (Wunderli-Ye and Solioz, 2001). Na bactéria Gram-positiva *E. hirae*, por exemplo, foi descrito o operon *cop* contendo quatro genes, *copABZY*, no qual as proteínas CopA e CopB são ATPases e os produtos dos genes *copZY* regulam o operon (Solioz and Odermatt, 1995). As duas ATPases transportadoras de cobre no sistema cromossomal de homeostase de *E. hirae* são reguladas independentemente: uma delas importa cobre para a célula e outra é responsável pelo efluxo de cobre da célula (Silver, 1996; Wunderli-Ye and Solioz, 2001).

Foi descoberto também um sensor de cobre intracelular, CsoR, em *Mycobacterium tuberculosis* que parece pertencer a uma grande família de repressores responsivos a Cu(I) em bactéria (Liu et al., 2007). O gene *csoR* de *M. tuberculosis* faz parte do operon *cso* (copper sensitive operon) cuja expressão é induzida por elevados níveis de cobre e prata em menor extensão, mas não é induzida por outros metais (Liu et al., 2007; Ward et al., 2008).

A aquisição de resistência a cobre por bactérias fitopatogênicas é um problema sério visto que a aplicação em larga escala de bactericidas contendo cobre ainda é a base do controle de doenças bacterianas em muitas culturas economicamente importantes.

O primeiro sistema bem estudado de resistência a cobre em bactérias fitopatogênicas foi o plasmídeo pPT23D, encontrado em uma linhagem de *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Este plasmídeo apresenta o sistema *cop*, no qual os genes estão organizados em um operon consistindo de quatro genes, *copABCD*, sob o controle de um promotor induzível por cobre e regulado por três genes, *copR*, *copS* e *copM* (Mellano and Cooksey, 1988; Mills et al., 1993). É através deste sistema que ocorre a exclusão de cobre do citoplasma por proteínas que ligam cobre. Os genes *copA* e *copC* codificam proteínas periplasmáticas capazes de se ligar ao metal. O gene *copB* codifica uma proteína de membrana externa e o gene *copD* codifica uma proteína de membrana interna (Cha and Cooksey, 1991). Estudos genéticos mostraram que as proteínas periplasmáticas CopA e CopB conferem resistência a cobre enquanto CopC (pertencente a classe das chaperonas de cobre) e CopD atuam no transporte de cobre (Cooksey, 1993). Portanto, em *P. syringae*, os genes *copA* e *copB* são essenciais para resistência em baixas concentrações de cobre enquanto que *copC* e *copD* são requeridos para resistência completa de cobre.

Similarmente, na linhagem TSS de *P. fluorescens*, que não possui os genes *copAB*, mutações realizadas nos genes *copC* e *copD* reduzem mas não extinguem a habilidade de resistência ao cobre na bactéria (Hu et al., 2009). Nesta linhagem a expressão de *copCD* é bem regulada e requerida para a resistência a cobre, sugerindo a possibilidade de CopCD poder existir como um sistema funcional independentemente de CopAB (Hu et al., 2009).

Em *X. campestris* pv. *juglandis* um fragmento de 4,9 kb foi isolado do cromossomo de linhagens resistentes a cobre, o qual apresenta quatro ORFs orientadas na mesma direção (ORFs 1, 2, 3 e 4), sendo todas requeridas para a expressão de resistência a cobre (Lee et al. 1994). As seqüências de aminoácidos deduzidas para as ORFs 1 a 4 mostraram identidades variando de 40 a 65% com os produtos do genes *copA*, *copB*, *copC* e *copD*, respectivamente, de *P. syringae* pv. *tomato*.

Os genes de resistência a cobre de *X. arboricola* pv. *juglandis* também tem a mesma estrutura *copABCD* dos genes de *P. syringae*, mas há algumas diferenças no tamanho e na sequência dos genes, porém, faltando os homólogos dos genes regulatórios *copRS* presentes em *P. syringae* (Mellano and Cooksey, 1988).

A resistência a cobre também foi descrita no fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav). Esta bactéria mostrou carregar genes de resistência a cobre os quais são relacionados aos operons de *E. coli* e *P. syringae* (Bender et al., 1989). No entanto, ao contrário dos sistemas de dois componentes *copRS* e *pcoRS* que regulam a expressão dos operons de resistência a cobre em *P. syringae* e *E. coli*, respectivamente, Xav possui um gene, *copL*, que se localiza *upstream* ao gene *copA* e que é requerido para a expressão do produto gênico de *copA* (Voloudakis et al., 2005).

Durante a fase de anotação do genoma de *Xcc* foram encontrados genes potencialmente envolvidos com a resistência a cobre nessa bactéria. Os genes *copA* e *copB* presentes no DNA cromossomal de *Xcc* mostraram homologia com os genes *copA* e *copB* de *P. syringae* pv. *tomato* (Mellano and Cooksey, 1998; Teixeira et al., 2008). Porém, não foram encontrados genes homólogos aos genes *copC* e *copD* de *P. syringae* pv. *tomato*. Devido a essa semelhança encontrada, nosso laboratório deu início aos estudos funcionais com a bactéria *Xcc* investigando os aspectos moleculares e bioquímicos dos genes *copA* e *copB* e as proteínas codificadas por eles.

Os produtos dos genes *copA* (que codifica uma proteína de 593 aminoácidos) e *copB* (que codifica uma proteína de 364 aminoácidos) presentes no DNA cromossomal de *Xcc* apresentam, respectivamente, 62% e 47% de identidade com os produtos dos genes *copA* e *copB* de *P. syringae*. As mesmas proteínas também apresentaram alta identidade com os produtos das ORFs 1 (64%) e 2 (45%) presentes no operon de resistência a cobre de *X. campestris* pv. *juglandis*. Os genes *copA* e *copB* estão localizados seqüencialmente no genoma de *Xcc* e organizados em um sistema tipo operon e a proteína CopA apresenta em sua seqüência primária um potencial sítio de ligação a cobre, semelhante aos sítios encontrados nas enzimas multicobre oxidases. Os estudos realizados com estes genes mostraram que a transcrição do operon *copAB* foi induzida por cobre e específica a este metal (Teixeira et al., 2008).

Em nossos estudos, o gene que codifica CopA foi inativado pela inserção de um transposon, o que levou à obtenção de uma linhagem da bactéria incapaz de sintetizar a proteína CopA. A linhagem mutante denominada *copA::Tn* foi analisada em relação à sua capacidade de crescer em meio contendo cobre e os resultados mostraram uma total incapacidade da linhagem em crescer mesmo em baixas concentrações de cobre (0,25 mM). A linhagem mutante também foi analisada *in planta* em relação à capacidade de causar sintomas característicos do cancro cítrico em folhas de limão e em relação à capacidade de crescer na presença de cobre. Comparada à linhagem selvagem, a linhagem mutante mostrou uma sensibilidade maior ao cobre durante o crescimento e um retardo maior na indução dos sintomas característicos da doença (Teixeira et al., 2008).

Em bactérias do gênero *Xanthomonas* não foram encontrados genes homólogos aos genes regulatórios de *P. syringae* ou *E. coli* (*copRS* e *pcoRS*, respectivamente) porém, algumas espécies possuem uma sequência *upstream* aos operons de resistência a cobre que pode estar atuando na regulação destes genes de resistência. A figura 1 mostra a organização dos operons de resistência a cobre em diferentes bactérias fitopatogênicas.

Em *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, Voloudakis et al. (2005) descreveram a presença de uma pequena ORF (*copL*) de 369 pb que se localiza *upstream* ao operon *copAB* (113 pb de região intergênica) e que possui um papel na regulação dos genes de resistência a cobre. A sequência de aminoácidos de CopL (122 aminoácidos) apresenta alto conteúdo dos aminoácidos cisteína e histidina, os quais são potenciais sítios de ligação a metais, sugerindo que esta proteína também poderia estar envolvida com o mecanismo de resistência a cobre. Embora a ligação a cobre não tenha sido demonstrada, a sequência do gene *copL* inteiro foi mostrada ser importante para a resistência a cobre, utilizando a análise do promotor mínimo. Foi verificada a presença do transcrito de *copL* tanto na ausência quanto na presença de cobre, enquanto que *copA* foi transcrito apenas na presença deste metal, o que sugere que *copL* é transcrito constitutivamente, mas a transcrição de *copA* é dependente de cobre em *Xav*. Os experimentos realizados envolvendo mutações específicas, alteração da frame, deleções e substituições, mostraram que a tradução de uma mensagem intacta de *copL* é requerida para a transcrição de *copA*, ou seja, *copL* está possivelmente envolvido na regulação da transcrição do gene *copA* (Voloudakis et al. 2005).

Análise das sequências genômicas revela a presença de ORFs homólogas a *copL* em *Xcc*, *X. campestris* pv. *campestris* (Silva et al., 2002) e *Xylella fastidiosa* (Simpson et al., 2000), mas não em bactérias do gênero *Pseudomonas*. A ORF homóloga à *copL* em *Xcc* (XAC3629, 456 pb) também está localizada *upstream* ao gene *copA* a uma distância de 112 pb.

Em nosso laboratório, alguns experimentos iniciais relacionados aos estudos funcionais da ORF XAC3629 foram realizados. Através de ensaios de *Northern blot* foi verificado a

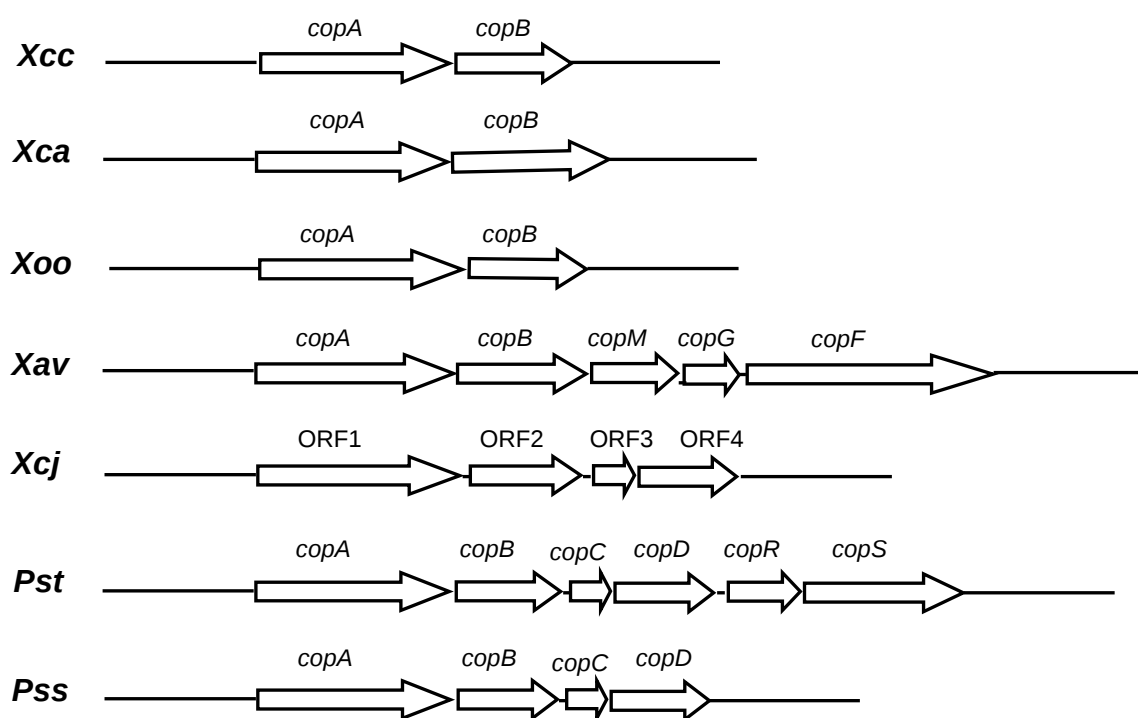


Figura 1: Comparação da organização dos genes de resistência a cobre em diferentes bactérias fitopatogênicas. O operon de resistência a cobre de *X. citri* subsp *citri*, *Xcc* (NC_003919) foi comparado aos operons de *X. campestris* pv. *campestris*, *Xca* (NC_007086) , *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo* (AE013598), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xav* (AY536748), *X. campestris* pv. *juglandis*, *Xcj* (L19222), *P. syringae* pv. *tomato*, *Pst* (NC_004578) e *P. syringae* pv. *syringae*, *Pss* (NC_007005). As setas indicam a direção de transcrição dos genes organizados em operons nas diferentes bactérias (Teixera et al., 2008).

presença de um transcrito de aproximadamente 450 pb referente à ORF XAC3629. A presença desse transcrito de 450 pb indicou que o gene é transcrito independentemente da transcrição do operon *copAB*, mostrando que este gene não faz parte do operon *copAB*. Além disso, a detecção do transcrito ocorreu apenas nas amostras de RNA das células induzidas por cobre, assim como o transcrito do operon *copAB* que é somente transcrito na presença do metal.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal dar continuidade aos estudos relacionados à investigação do papel da ORF XAC3629 na regulação do operon de resistência a cobre *copAB* de *Xcc*. Desta maneira pretendeu-se estudar os seguintes aspectos:

- Construir uma linhagem contendo o gene correspondente à ORF inativado por recombinação homóloga. Nesta parte pretendeu-se deletar o gene através de recombinação homóloga, analisar a linhagem mutante em relação ao crescimento na ausência e presença de cobre e comparar os resultados com uma linhagem contendo a ORF inativada pelo transposon.
- Tentar complementar linhagens mutantes de *Xcc* (XAC3629::Tn) com uma construção plasmidial contendo a sequência interna da ORF e suas regiões flanqueadoras.
- Analisar a ligação de proteínas da bactéria à região *upstream* ao operon *copAB*, a qual contém a ORF3629. Nesta etapa pretendeu-se isolar fragmentos de DNA correspondentes à região *upstream* ao operon *copAB* e confirmar os fragmentos. Estes fragmentos serão futuramente analisados em experimentos relacionados à capacidade de ligação de proteínas da bactéria aos fragmentos de DNA.

Materiais e Métodos

1. Linhagens e manutenção de *Xcc*

As linhagens de *Xcc* utilizadas neste trabalho foram:

- linhagem 306 selvagem, a mesma utilizada no sequenciamento do genoma (da Silva et al., 2002);
- linhagem XAC3629::Tn, construída através da inativação da ORF XAC3629 pela inserção de um transposon;
- linhagem *copA*::Tn, construída através da inativação do gene *copA* pela inserção de um transposon (Teixeira et al., 2008).

2. Inativação da ORF XAC3629 através da inserção de um transposon

Quando este trabalho se iniciou, havia sido construída no laboratório uma linhagem de *Xcc* contendo a ORF inativada por um transposon. A seguir, uma descrição resumida do procedimento utilizado será apresentada. A sequência polinucleotídica da ORF XAC3629 (456 pb) foi amplificada por PCR a partir da construção previamente obtida pMOS-XAC3629 (existente no laboratório). O gene XAC3629 amplificado foi subclonado no vetor pUC18, um vetor suicida na bactéria *Xcc*, e a construção plasmidial resultante (pUC-3629) foi utilizada para a inserção *in vitro* do transposon com a utilização do kit EZ-Tn5™ Transposon Tools (Epicentre Biotechnologies®), da seguinte maneira:

- Adição ao DNA alvo (pUC-3629) de 0,1 pmol do transposon e 1 U da enzima transposase. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas.
- Adição de 1 µL de *stop solution* presente no kit. A reação permaneceu a 70°C por 10 minutos.
- Eletroporação de células de *E. coli* competentes com o produto da reação.
- Plaqueamento das células em meio de cultura contendo o antibiótico kanamicina, marca de seleção do transposon e seleção dos clones.

O DNA plasmidial dos clones recombinantes obtidos foi extraído e analisado através de digestão enzimática com a enzima de restrição *EcoRI*, para a verificar se a inserção do transposon ocorreu dentro da ORF XAC3629. Como a inserção do transposon, neste momento, é aleatória, a utilização desta enzima permitiu selecionar construções plasmidiais contendo o transposon inserido na ORF. Em seguida, os clones foram analisados através de digestão enzimática com o par de enzimas *NcoI/SacII*, as quais contêm sítios nas posições 164 e 362 pb da ORF, respectivamente. Esta digestão permitiu localizar internamente a posição da inserção do transposon na ORF. O clone que apresentou o transposon inserido na posição desejada

(preferencialmente no meio da sequência) foi confirmado através de sequenciamento de DNA, o que permitiu identificar a exata localização do transposon.

A construção plasmidial pUC-3629 selecionada foi utilizada para transformar células de *Xcc* da linhagem 306 através de eletroporação em um procedimento descrito a seguir (Sun et al., 2003). Todos os clones obtidos da transformação tiveram seus DNAs genômicos extraídos e analisados através de amplificação por PCR com a utilização de oligonucleotídeos correspondentes a regiões que flanqueiam a ORF. O fragmento foi amplificado com cerca de 200 ng do DNA total, 100 pmoles de cada oligonucleotídeo, 10 mM de cada dNTP e MgSO_4 50 mM. O produto da amplificação foi analisado por digestão com diferentes enzimas de restrição e as linhagens comprovadamente mutantes foram selecionadas e armazenadas a -80°C .

3. Inativação da ORF XAC3629 através de deleção

3.1. Obtenção da construção plasmidial

Para a obtenção de uma linhagem contendo a ORF XAC3629 deletada, uma construção plasmidial contendo a ORF sem a região nucleotídica central foi inicialmente obtida através de uma reação de PCR reversa utilizando um plasmídeo contendo um fragmento de DNA correspondente à ORF mais as regiões flangeadoras *upstream* e *downstream*. Para a obtenção desta construção, o fragmento de DNA foi amplificado por PCR a partir de 200 ng de DNA genômico utilizando 100 pmoles dos oligonucleotídeos XacF (5'-TGAAGTGGTCCATGAAGTGCC-3') e CopARP (5'-GGTTGAGCCGTGGGAAAA-3') que amplificam, além dos 456 pb da ORF, 550 pb *upstream* e 137 pb *downstream*. As condições de amplificação foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação de 98°C por 5 minutos e, em seguida, 39 ciclos de 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 68°C por 1,5 minuto. O fragmento foi clonado no vetor de clonagem pMOS Blue Blunt Ended Cloning kit (GE Healthcare), visto na Fig. 2, e o plasmídeo resultante foi denominado pMOS-XAC3629, o qual foi utilizado em uma reação de PCR reversa como esquematizado na Fig 3.

Para a PCR reversa os oligonucleotídeos 3629Fi (5'-TCCCCGCGGGAGACCTTGACCGAGGGG-3') e 3629Ri (5'-TCCCCGCGGGAACAGGCACAGCCACAG-3') foram utilizados. As bases sublinhadas representam sítios para a enzima de restrição *Sac*II. O oligonucleotídeo 3629Fi hibridiza em uma sequência nucleotídica que se inicia no aminoácido da posição 130 da sequência polipeptídica, enquanto o oligonucleotídeo 2629Ri hibridiza em uma sequência nucleotídica que termina no aminoácido da posição 28 da sequência polipeptídica. Desta maneira, o produto

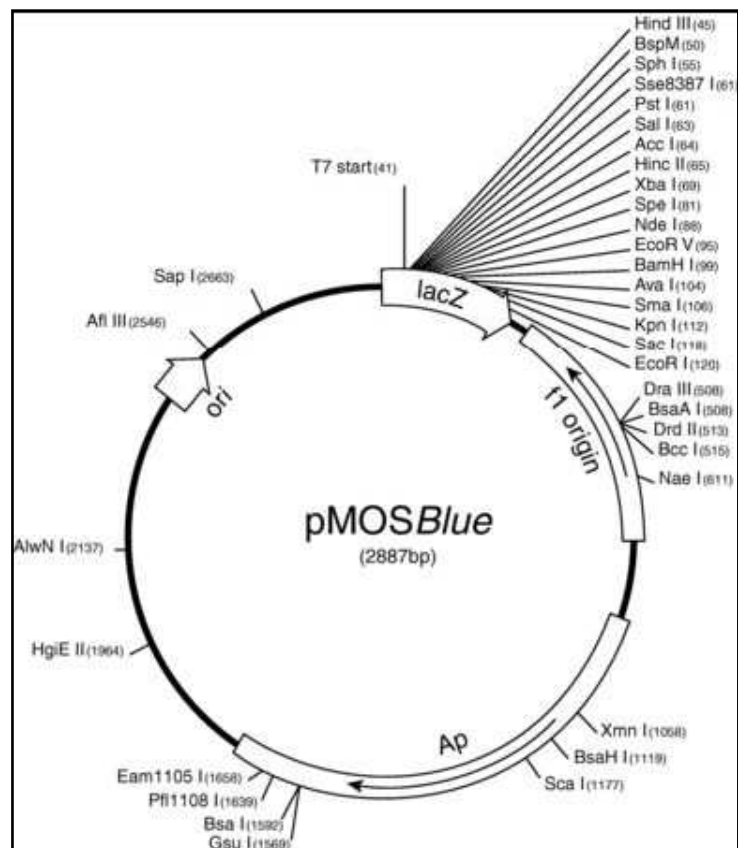


Figura 2- Mapa físico do vetor pMOSBlue.

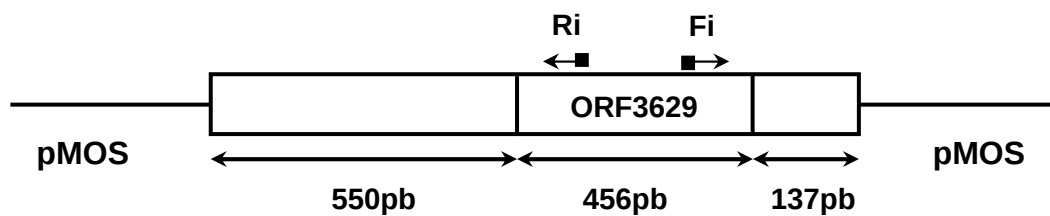


Figura 3- Esquema mostrando o procedimento da PCR reversa no vetor pMOS-XAC3629 para a deleção da região nucleotídica central da ORFXAC3629. As setas acima da ORF representam os oligonucleotídeos utilizados para a PCR com sítios para a enzima *SacII* (quadrados cheios) nas extremidades. As setas abaixo das caixas mostram o tamanho da ORF em pares de base e de suas regiões *upstream* e *downstream*.

amplificado contém a sequência inteira do vetor pMOS Blue e nas extremidades do fragmento sequências nucleotídicas das extremidades 5' e 3' da ORF. A reação de amplificação foi realizada utilizando aproximadamente 200 ng de DNA, 2 U da enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen), tampão de amplificação 1X, 100 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto e reverso), 10 mM de cada dNTP e MgSO₄ 50 mM no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando uma etapa inicial de desnaturação de 96°C por 4 minutos e, em seguida, 39 ciclos de 96°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 68°C por 3,5 minutos.

O fragmento amplificado foi purificado utilizando o kit Geneclean (Bio 101) e digerido com a enzima *SacII*. A reação de digestão ocorreu utilizando 10 U da enzima *SacII* por um período de 2 horas à 37°C. O fragmento digerido e posteriormente purificado foi submetido a uma reação de ligação utilizando 200 U da enzima T4 DNA ligase por aproximadamente 16 horas à 16°C e utilizado para transformar células competentes de *E. coli*. Clones recombinantes foram utilizados para a extração de DNA plasmidial e os plasmídeos resultantes foram analisados por digestão com 15 e 20 U das enzimas *XbaI* e *BamHI*, respectivamente. Uma construção plasmidial foi confirmada por sequenciamento de DNA e o plasmídeo resultante foi denominado pMOS-ΔXAC3629.

Após a obtenção e confirmação da ORF XAC2629 deletada na sua sequência central, uma troca de cassete de DNA foi realizada entre o plasmídeo pMOS-ΔXAC3629 e o vetor pNPTS138, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. S. C. Farah (Instituto de Química, USP, São Paulo). Este vetor é um vetor suicida para *Xcc* e possui 5361 pb, marca de seleção de canamicina e marca de seleção *sacB*. O gene *sacB* codifica a enzima levansucrase, a qual catalisa a hidrólise de sacarose e a síntese de levans, os quais são polímeros de frutose de alto peso molecular (Pelicic et al., 1995). Para a troca do cassete de DNA, o fragmento de DNA contendo a ORF XAC3629 deletada e suas regiões flanqueadoras foi removido com as enzimas de restrição *BamHI* e *Sall* da construção pMOS-ΔXAC3629 e subclonado no vetor pNPTS138. A confirmação da construção pNPTS-ΔXAC3629 foi feita através da liberação do inserto por uma reação de digestão com as mesmas enzimas e analisada em gel de agarose 0,8%.

Com a obtenção do plasmídeo pNPTS-ΔXAC3629, o próximo passo foi a transformação de *Xcc* com esta construção plasmidial conforme procedimento descrito no item 8. Após transformação, a seleção dos clones foi feita com o antibiótico canamicina (marca de seleção do plasmídeo pNPTS138). Com o produto desta transformação alguns clones bacterianos foram obtidos e selecionados conforme procedimento descrito no item 3.2. Após várias tentativas, a recombinação do fragmento no DNA genômico mostrou não ter ocorrido no *locus* correto. Portanto, foi decidido transformar a bactéria com um fragmento contendo uma maior extensão da região *downstream* que continha apenas 137 pares de base. Como não foi possível amplificar, a partir do DNA genômico de *Xcc*, um fragmento de DNA único contendo esta região em maior extensão, utilizamos uma outra estratégia: amplificação de parte desta região e

ligação ao fragmento já existente. Um esquema do procedimento realizado está mostrado na Fig. 4.

Inicialmente 200 ng do fragmento correspondente à região *downstream* foi amplificado com 100 pmoles dos oligonucleotídeos 3629Fi e CopAR1 (5'-ACGGAACAGGGCGGCCGG-3'), 2 U da enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen), tampão de amplificação 1X, 10 mM de cada dNTP e MgSO₄ 50 mM. O fragmento foi digerido com 5 U da enzima *AgeI* e purificado com o kit Gene Clean (BIO 101). A construção pMOS-ΔXAC3629 foi também submetida a uma digestão com 5 U da enzima *AgeI*, onde esta reconhece um sítio de clivagem no final da ORF e com 10 U da enzima *SmaI*, localizada no final do sítio múltiplo de clonagem do vetor. O fragmento purificado foi inserido no plasmídeo pMOS-ΔXAC3629 resultando em uma construção plasmidial contendo a região *downstream* com 756 pb. O plasmídeo resultante foi amplificado em *E.coli* e analisado através de digestão com 10 U dos pares das enzimas de restrição *Sall/EcoRI* e *AgeI/SacI* para a confirmação do fragmento obtido.

Após a obtenção desta construção, um cassete de DNA contendo o inserto foi trocado com o vetor suicida pNPTS138 utilizando 10 U das enzimas *HindIII* e *EcoRI* e inserido no vetor suicida linearizado com as mesmas enzimas. A reação de ligação foi realizada e, posteriormente, o produto desta reação de ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli*. Após a transformação e extração do DNA plasmidial, a seleção dos clones positivos foi feita através da reação de digestão com as mesmas enzimas utilizadas anteriormente para a liberação do inserto e do vetor. Os plasmídeos positivos foram confirmados por digestão com 15 U da enzima *XbaI* e 10 U da enzima *NotI*. Um plasmídeo positivo foi utilizado para transformar a linhagem selvagem de *Xcc*.

3.2. Transformação de *Xcc* e seleção da linhagem nocauteada

A transformação de *Xcc* com o plasmídeo resultante foi realizada conforme procedimento descrito no item 9. Após a preparação de *Xcc* competente, as células foram transformadas por eletroporação com diferentes quantidades de DNA plasmidial variando de 3,0 a 10 µg de DNA e 50 µL de células competentes. Após transformação e plaqueamento em meio contendo canamicina (50 µg/mL) alguns clones foram obtidos e selecionados.

As colônias que cresceram na presença de canamicina provavelmente incorporaram o plasmídeo. Várias colônias foram transferidas para o meio LB líquido (triptona 1%, NaCl 1% e extrato de levedura 0,5%) contendo ampicilina (100 µg/mL) e crescidas durante dois dias para estimular a perda do plasmídeo pNPTS-ΔXAC3629. Após esse período, várias diluições da suspensão celular foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina e sacarose 3% para a obtenção de colônias isoladas que tenham perdido o plasmídeo. Estas colônias isoladas foram

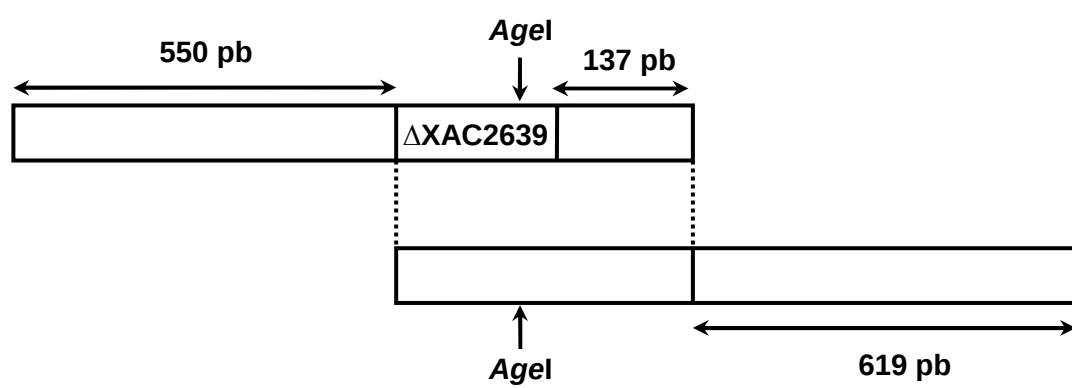


Figura 4- Esquema mostrando o procedimento utilizado para a obtenção do fragmento de DNA correspondente à ORF XAC3629 deletada mais as regiões flanqueadoras.

então plaqueadas em duas condições: meio LB com ampicilina e meio LB com canamicina. Aquelas crescendo apenas no primeiro meio são provavelmente os mutantes nocautes. A transferência de colônias nos dois meios (contendo ampicilina e canamicina) foi repetida sucessivamente.

4. Análise das linhagens mutantes XAC3629::Tn em relação ao crescimento

Com o objetivo de verificar o efeito da inativação da ORF XAC3629 no crescimento de *Xcc* na presença de cobre, células de seis linhagens contendo a ORF XAC3629 interrompida pelo transposon (XAC3629::Tn) foram avaliadas em relação ao crescimento na ausência e presença de diferentes concentrações de cobre. Para isto, as linhagens mutantes XAC3629::Tn e *copA*::Tn, (Teixeira et al., 2008) e a linhagem selvagem foram rejuvenescidas em meio TSA (triptona 1%, sacarose 1% e glutamato de sódio 0,1%) sólido, contendo (para as mutantes) ou não (para a selvagem) o antibiótico canamicina (50 µg/mL) por 36-48 horas a 28°C. Após crescimento, uma alça das células foi inoculada em 50 mL de meio ágar nutriente (triptona 0,5%, extrato de carne 0,2% e NaCl 0,5%) e mantidas a 28°C durante a noite a 250 rpm.

Um volume deste pré-inóculo (correspondente à densidade óptica de 0,5 a 550 nm) foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 mL de meio ágar nutriente (pH mantido em 7,0 pela adição de tampão fosfato de potássio) na presença e ausência de CuSO₄.5H₂O 1,0 mM em uma avaliação inicial, e na presença de CuSO₄.5H₂O nas concentrações 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mM em uma avaliação posterior. O pH dos meios foi mantido ao redor de 7,0. As células foram crescidas a 28°C e 250 rpm durante 24 horas e o crescimento foi avaliado através de turbidimetria a 550 nm em um espectrofotômetro Beckman, modelo DU640.

5. Complementação funcional das linhagens mutantes XAC3629::Tn

5.1. Obtenção da construção plasmidial

Para análises de complementação das linhagens mutantes obtidas após interrupção da ORF XAC3629 por um transposon, foi utilizado o vetor de complementação pBBR1MSC-05 (Kovach et al., 1995), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. S. C. Farah, do IQ, USP, SP, que possui 4768 pb e marca de seleção para gentamicina, como ilustrado na Fig. 5. Para a realização desta construção plasmidial foi utilizado um fragmento de DNA correspondente à ORF

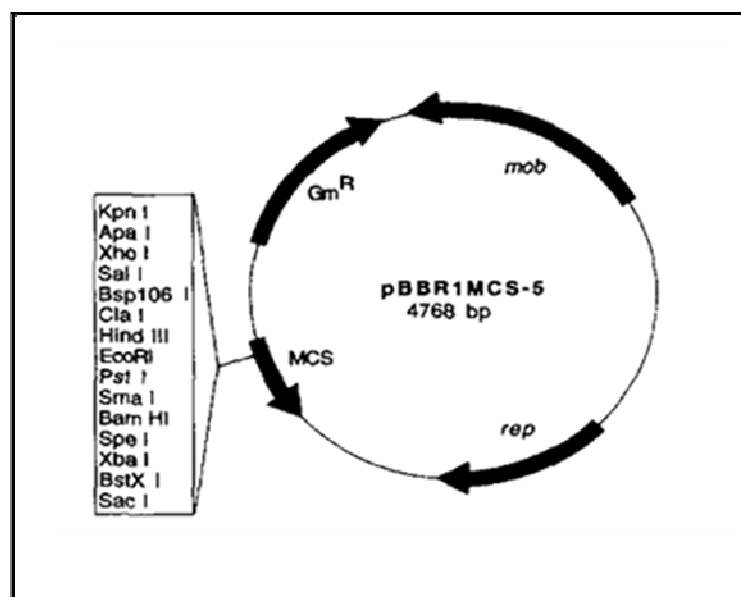


Figura 5- Mapa físico do vetor de complementação pBBR1MCS-05.

XAC3629 mais 550 pb da região *upstream* (contendo o promotor do gene) e 137 da região *downstream* (contendo a região de terminação da transcrição do gene), o qual está presente na construção pMOS-XAC3629. A subclonagem no vetor pBBR1MSC-05 foi realizada com a troca do cassete de DNA utilizando 20 U das enzimas de restrição *Hind*III e *Sac*I. Após transformação em células de *E. coli*, plaqueamento e seleção dos clones em meio contendo o antibiótico gentamicina (10 µg/mL), a confirmação foi feita através da digestão enzimática dos DNAs plasmidiais com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem para liberar o inserto. Uma segunda confirmação dos clones positivos foi realizada através da digestão com 20 U da enzima *Sac*II.

5.2. Transformação de *Xcc* e seleção dos clones

Duas linhagens mutantes XAC3629::Tn foram rejuvenescidas e tornadas competentes para serem transformadas. A transformação foi realizada com quantidades variáveis entre 1 e 5 µL da construção plasmidial pBBR1MCS-XAC3629 e 50 µL das células competentes. Após transformação por eletroporação as células foram plaqueadas em meio TSA contendo gentamicina (10 µg/mL), marca de seleção do plasmídeo. Para controle dos resultados de complementação, os dois mesmo mutantes também foram transformados com o plasmídeo pBBR1MCS-05 sem inserto. As colônias que cresceram na presença de gentamicina foram as que incorporaram o plasmídeo, portanto, foram submetidas aos ensaios de crescimento para verificação de complementação funcional.

5.3. Análise de crescimento das linhagens

As células das linhagens de *Xcc* 306 selvagem, *copA*::Tn, dois mutantes XAC3629::Tn transformados com o plasmídeo de complementação vazio e dois mutantes XAC3629::Tn transformados com o plasmídeo de complementação contendo a ORF intacta foram rejuvenescidos em meio TSA à 28°C por 48 horas. Após rejuvenescimento, foi realizado um pré-inóculo em 50 mL de meio ágar nutriente tamponado (o pH 7,0 foi mantido com fosfato de potássio) com uma alça cheia de cada linhagem rejuvenescida, as quais foram crescidas por um período de 12 a 14 horas a 28°C e 250 rpm.

Após crescimento, um volume de pré-inóculo correspondente a densidade óptica de 0,5 a 550 nm foi transferido para outro Erlenmeyer contendo 50 mL do mesmo meio tamponado, agora na ausência ou presença de CuSO₄.5H₂O 1,0 mM. Estas células foram então crescidas a 28°C e 250 rpm durante 24 horas. A avaliação do crescimento celular foi realizada por análises de turbidimetria em triplicata a 550 nm, em espectrofotômetro Beckman modelo DU640.

6. Análise da região *upstream* ao operon *copAB*

Com o objetivo de verificar se ocorre interação de proteínas à região *upstream* ao operon *copAB* a qual contém a ORF XAC3629, fragmentos desta região foram preparados, como segue. Primeiramente, a partir da construção pMOS-XAC3629 foram realizadas duas reações de amplificação (esquema mostrado na Fig. 6). A primeira reação amplificou um fragmento de 625 pb correspondente a metade inicial do inserto clonado no vetor com o par de oligonucleotídeos XacF e 3629Ri. Este fragmento foi submetido à digestão com 10 U da enzima *BglI* e 5 U da enzima *MboI* para obter os fragmentos de 170, 189 e 216 pb. A segunda reação, realizada com o par de oligonucleotídeos CopA600F (5'-CGGAATTCTACGCAGCCACGCATCG-3') e CopARP amplificou um fragmento de 636 pb, o qual foi submetido à digestão com 10 e 5 U das enzimas *PvuII* e *MboI*, respectivamente, para a obtenção dos fragmentos de 314 e 268pb. Nas duas reações foram utilizados 200 ng de DNA, 2 U da enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase (Invitrogen)*, tampão de amplificação 1X, 100 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto e reverso), 10 mM de cada dNTP e MgSO_4 50 mM nas seguintes condições: desnaturação de 94°C por 5 minutos, e em seguida 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 68°C por 1 minuto e uma temperatura de extensão final de 68°C durante 5 minutos.

Os cinco fragmentos obtidos após digestão foram purificados utilizando o kit Gene Clean (BIO 101) e clonados no vetor pMOS*Blue*. Os produtos das ligações foram transformados em células competentes de *E. coli*. Após extração do DNA plasmidial das cinco transformações, a seleção dos clones positivos foi feita com 20 U da enzima *BamHI* e 15 U da enzima *XbaI*, as quais liberam fragmentos com tamanhos correspondentes aos insertos (170, 189, 216, 268 e 314 pb) e ao vetor (aproximadamente 3 kb).

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

Células competentes de *E. coli*, linhagem DH10B, foram preparadas para serem transformadas, de acordo com Sambrook and Russel (2001), da seguinte maneira: a partir de um estoque de *E. coli* DH10B mantido a -80°C, inoculou-se a bactéria em 5 mL de meio de cultura 2YT (triptona 1,6%, glicose 0,2%, NaCl 0,5%, extrato de levedo 1%). Após crescimento (12-14 horas a 37°C), transferiu-se 3 mL desta cultura para 100 mL de meio 2YT e aguardou-se até esta atingir densidade óptica de, aproximadamente 0,7 medida a 600 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU640. As células foram coletadas por 10 minutos a

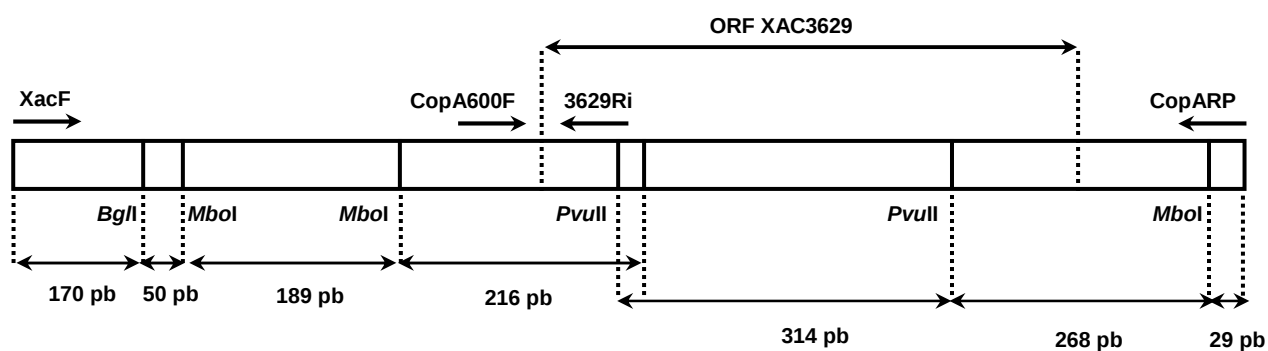


Figura 6- Esquema mostrando as regiões amplificadas e digeridas para análise de interação protéica à sequência do DNA que compreende a ORF XAC3629 e suas regiões flanqueadoras. As setas indicam as duas regiões amplificadas, cada uma das cinco regiões digeridas e purificadas, e localização da ORF.

4.000 rpm em centrífuga refrigerada Eppendorf de mesa e lavadas com 25 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. No final, as células foram ressuspensas em 4 mL de cloreto de cálcio 100 mM e, a elas, foi adicionado 1 mL de glicerol 80%. As células foram aliquotadas e estocadas a -80°C.

Para a transformação das células, uma quantidade de 5,0 µL do produto da reação de ligação (vetor e inserto de DNA) foi adicionada a 100 µL de células competentes e a mistura incubada em gelo por 30 minutos. A seguir, submeteu-se ao choque térmico a 42°C por 2 minutos e, logo após, adicionou-se 400 µL de meio 2YT. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora e as células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

8. Preparo de células competentes e transformação de *Xcc*

Para serem transformadas, as células de *Xcc* foram preparadas de acordo com o método descrito por Sun et al. (2003) da seguinte maneira: inoculou-se a bactéria em placa contendo meio TSA. Após crescimento (48-72 horas a 28°C), uma alça da bactéria foi transferida para 10 mL de meio 210 (sacarose 0,5%, hidrolisado enzimático de caseína 0,8%, extrato de levedo 0,4%, K₂HPO₄ 0,3% e de MgSO₄.7H₂O 0,03%, pH 7,0) e, após crescimento durante a noite, transferiu-se todo o volume da cultura para 250 mL do mesmo meio. As células foram crescidas a 28°C até atingir uma densidade óptica entre 0,5-0,6 a 600 nm, e em seguida, as células foram incubadas em gelo por 20 minutos e separadas por centrifugação durante 15 minutos a 4.000 rpm em centrífuga refrigerada *Eppendorf*, modelo 5810R. As células foram lavadas com 50 mL de glicerol 10% gelado, a seguir com 20 mL e, em seguida, com 10 mL. No final, as células foram ressuspensas em 150 µL de glicerol gelado e utilizadas na transformação por eletroporação.

Para a eletroporação, a construção plasmidial foi homogeneizada com 50 µL de células em uma cubeta de eletroporação estéril em gelo. As células foram transformadas nas seguintes condições: 2400 Volts, capacitância de 25 µF e resistência de 300 Ω em um eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad). Após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio TSA e incubou-se a mistura a 28°C por 2-3 horas, sob agitação moderada. As células foram plaqueadas contendo o antibiótico específico para a seleção das colônias.

9. Extração de DNA genômico de *Xcc*

O DNA genômico de *Xcc* foi extraído da seguinte maneira: colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio TSA, contendo o antibiótico específico, e crescidas por aproximadamente 20 horas a 28°C. As células foram coletadas em tubos Eppendorf por centrifugação e ressuspensas em 560 µL de uma solução contendo Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 e EDTA 10 mM. Adicionou-se 5 µL de RNase 10 mg/mL e 75 µL de SDS 10% e a mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C. A seguir, um volume de 80 µL de NaAc 3 M, pH 6,8 foi adicionado e a mistura foi homogeneizada. Um volume de 400 µL de fenol saturado com tampão foi adicionado à solução, seguido de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e um volume de 400 µL de clorofórmio foi adicionado à solução, seguido de homogeneização e centrifugação. Um volume de aproximadamente 400 µL da fase aquosa foi transferido para tubos limpos e o DNA genômico foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol, coletado por centrifugação e lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. O DNA foi dissolvido em 80 µL de água ultrapura e quantificado através de leituras de absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU640.

10. Extração de DNA plasmidial

Cerca de 1,5 mL da cultura de células foram transferidos para tubos Eppendorf, centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 350 µL de uma solução contendo sacarose 8%, Triton X-1000, 5%, EDTA 50 mM pH 8,0 e Tris 10 mM, contendo 0,3 mg de lisozima. A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 40 segundos e imediatamente centrifugada por 15 minutos.

O precipitado viscoso foi retirado e descartado com a ajuda de um palito e os ácidos nucléicos precipitados com 40 µL de acetato de sódio 3 M e 500 µL de isopropanol. A seguir, o material foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 100 µL de água ultrapura. Um volume de 100 µL de fenol saturado com tampão foi adicionado à solução e a mesma foi homogeneizada e centrifugada novamente. Um volume de 80 µL da fase aquosa foi transferido para tubos Eppendorf e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 µL de acetato de amônia 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70% gelado. O DNA foi dissolvido em 30 µL de água ultrapura.

11. Sequenciamento de DNA

As reações para seqüenciamento automático do DNA foram realizadas em termociclador utilizando-se o kit *Big Dye* (Perkin Elmer). A metodologia foi baseada na reação de Sanger et al. (1977), através da utilização de trifosfatos de didesoxinucleosídeos marcados com corantes fluorescentes derivados da rodamina. Durante o seqüenciamento foi utilizado o seqüenciador automático ABI PRISM-377 DNA SEQUENCER (Perkin Elmer). Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados 400 ng de DNA, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos direto ou reverso, 2 µL de tampão Tris-HCl 200 mM, pH 9,0 e MgSO₄ 5 mM e 2 µL do kit *Big Dye*. Após reação em termociclador, o DNA foi precipitado pela adição de 80 µL de isopropanol 70%, lavado com 1 mL de etanol 70% duas vezes e, após secagem à temperatura ambiente, estocado a -20 °C até o uso.

No momento da aplicação do gel, o DNA foi ressuspenso em 2,0 µL de reagente preparado a partir do kit ABI PRISM Lane GuideTM da PE Biosystems: pré-mix 17% (Lane Code 33% e Loading Color 67%), mais 82,5% de formamida. Em seguida, o DNA foi desnaturado a 100°C por 2 minutos e imediatamente imerso em gelo. Realizou-se então a eletroforese em gel de poliacrilamida 6,0% contendo uréia 8 M em um seqüenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer), e posteriormente, a análise das seqüências nucleotídicas.

Parte das reações de seqüenciamento foi realizada no Serviço de Seqüenciamento de DNA no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, USP, São Paulo.

Resultados e Discussão

1. Organização genômica da ORF XAC3629

A posição, tamanho e orientação da ORF XAC3629 foram determinadas após o sequenciamento do genoma da bactéria *Xcc* (Silva et al., 2002) e está mostrado na Fig. 7. Como pode ser visto na figura, a ORF está localizada *upstream* ao operon *copAB* de *Xcc*. Esta ORF possui 456 pb e codifica para uma proteína de 152 resíduos de aminoácidos com *pI* estimado de 6.34 e peso molecular de aproximadamente 14 kDa (www.expasy.ch). Seu índice de instabilidade é de 63.80, o que a classifica como uma proteína instável, podendo interferir em sua produção, purificação e expressão (www.expasy.ch).

A proteína codificada pela ORF XAC3629 não apresenta nenhum domínio de ligação ao DNA, porém mostra um domínio transmembrana localizado na região N-terminal (LLRLLLCLCLVANTATGAWASVG). A Fig. 8B, obtida através do software *Smart* (<http://smart.embl-heidelberg.de>) mostra este domínio da ORF em *Xcc*.

O alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos codificada pela ORF XAC3629 de *Xcc* com seqüências homólogas de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), *X. campestris* pv. *campestris* (*Xca*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) e *Xylella fastidiosa* (*Xf*) está mostrado na Fig 8A. A seqüência da proteína de *Xcc* possui regiões de identidade e similaridade com as seqüências das outras bactérias as quais foi comparada. Esta seqüência em *Xav* (denominada *copL*) é requerida para a expressão induzida por cobre de uma multicobre oxidase codificada pelo gene *copA* que se localiza *downstream* à *copL* (Voloudakis et al., 2005) Esta seqüência em *Xav* possui 26% de identidade e 37% de similaridade com a seqüência homóloga em *Xcc* (XAC3629).

A seqüência de aminoácidos deduzida de CopL e suas proteínas homólogas mostram alguns resíduos de cisteína (8 resíduos na seqüência de *Xcc*) e histidina (7 resíduos na seqüência de *Xcc*), sugerindo que estas seqüências polipeptídicas podem ter um papel na ligação com íons de cobre. Na seqüência de aminoácidos de *Xcc* pode ser notada também a grande quantidade de resíduos de prolina (13 resíduos). A prolina é um aminoácido que exerce forte influencia na conformação da cadeia polipeptídica, pois possui uma estrutura quimicamente rígida que leva à redução da flexibilidade estrutural de regiões polipeptídicas em que esse aminoácido ocorre, geralmente não participando da formação de α -hélice. Esta observação sugere que estas proteínas podem não apresentar uma estrutura tridimensional definida.

2. Construção de uma linhagem nocaute na ORF XAC3629

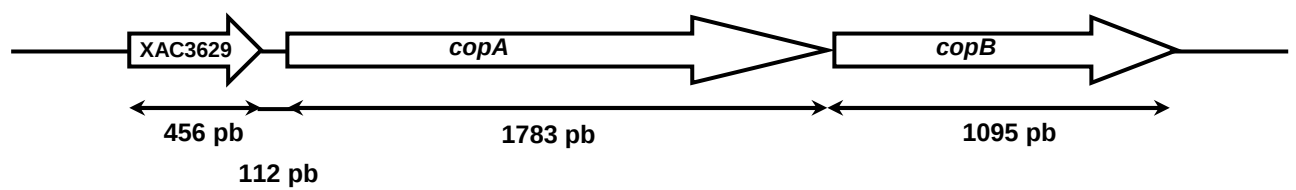


Figura 7- Localização da ORF XAC3629 juntamente com o operon *copAB* no genoma de *Xcc* e seus respectivos tamanhos.

A

Xcc	1	-----MLHRL
Xav	1	-----MLCSLHLSLPRLLVLHRL
Xoo	1	-----MLHRL
Xca	1	-----MPHCL
Xf	1	MPLRWQHRLIEQEPRVLGIATWRTCKNALSVASAGINLGVSSPYTDATSRLRCTPLPSLL

Xcc	6	LRLLLCLCLVANTATGAWASVGMAMPAMASGTPMAAPMAGTAATTQTEQPAALPCHEAMP
Xav	19	LRLLLCLSLVANTATGAWASVGMAMPAMASGAMPAATMAGGTAATQSELPAAVPCHDAMP
Xoo	6	LRLLLCLCLVANTASGAWASVGMAMPVMASGAMPAAAMVSSVSTMHAAMPAAMPCHDATP
Xca	6	LRLLLCLCLVANTATGAWASVGMAMPAMGS-----AAMGSAARGMHAAAPDALPCHEDMA
Xf	61	LRLLLISLCLIAQSVSAWASVTMP-----RIALPSMPVAVVDRPCHHTGV

Xcc	66	PPTAMQ--VHDKATHAHAPDCCKLGSCDCLQHCSLALLTLPVAPAGLLGHPALPDTLITEG
Xav	79	PPTAMQW-QHDKATHAHAPDCCKLGSCDCLQHCSLALLTLPVAVAGLLGHPAVPDTLITEG
Xoo	66	PPTFAQ--LPDKATHAHADCCCKLGSCDCLQHCSLALLTLPVAPAGQFGQLALPATLADG
Xca	61	SPAAMPLPDPDHAQHAGKGDCCCKLGSCDCLQHCSLALLTLPVAPAAAGRPAMPGALAEG
Xf	107	SGVQSAA-HLSHAIPTSTPCSKIGHCDCLQHSNALPVTLLILPVLLERMPPLAGITLTS

Xcc	124	RSSPLPDQVRPPPIA
Xav	138	RSSPLPDQVRPPPIA
Xoo	124	RSSPLPDQVRPPPIA
Xca	121	RANPAPEQVRPPPIA
Xf	166	RGLPAPYRPMRPPPIA

B

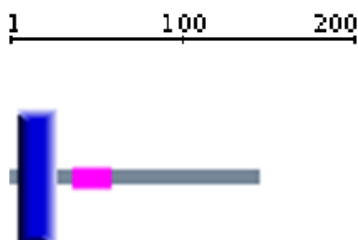


Figura 8– (A) Alinhamento múltiplo da proteína codificada pela ORF XAC3629 de Xcc ([NP_643936.2](#)) com as proteínas homólogas de Xav ([YP_365477.1](#)), Xoo ([YP_001915617.1](#)), Xca ([NP_635970.2](#)) e *Xylella fastidiosa* ([YP_001828822.1](#)). O alinhamento de seqüências foi realizado por *ClustalW* ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](#)) e os resíduos de aminoácidos idênticos (em preto) e as trocas conservativas (em cinza) foram identificados por *BoxShade* ([www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html](#)). **(B)** Representação do domínio transmembrana de 22 resíduos de aminoácidos (em azul) na seqüência codificada pela ORF XAC3629. Em rosa está representada uma região de baixa complexidade.

Como descrito anteriormente, linhagens de *Xcc* contendo a ORF XAC3629 inativada pela inserção de um transposon haviam sido construídas no laboratório. Esta ORF foi inativada para analisar sua participação no mecanismo de resistência a cobre, uma vez que a sequência de *copL* em *Xav*, homóloga à ORF XAC3629, mostrou ser importante na indução do gene *copA*, verificado através da expressão do gene repórter *lacZ* em ensaios de β -galactosidase (Voloudakis et al., 2005). Neste presente trabalho, estas linhagens mutantes foram analisadas em relação ao crescimento na presença de cobre e foi observado que as linhagens apresentaram sensibilidade ao metal sugerindo um papel da ORF na regulação do operon *copAB*. Como a inserção de um transposon em um gene leva à introdução de uma mutação polar (uma mutação que altera a transcrição dos genes subsequentes), seria importante construir uma linhagem contendo o gene nocauteado, onde apenas a ORF XAC3629 seria deletada. Para isto foi utilizado o procedimento de nocaute gênico por recombinação homóloga, no qual a região interna da sequência nucleotídica da ORF foi removida, ou seja, a proteína codificada seria truncada na maior parte da sequência polipeptídica interna.

Para a obtenção deste tipo de linhagem mutante foi necessário obter um fragmento de DNA contendo as regiões *upstream* e *downstream* à ORF, as quais são requeridas no evento de recombinação homóloga, necessário para o nocaute da ORF. Para isto, um fragmento de 1143 pb foi amplificado por PCR e inserido no vetor pMOS, gerando a construção pMOS-XAC3629. Para a deleção da maior parte da sequência codificadora foi realizada uma PCR reversa em que 306 pb da região interna da ORF foi removida. Este procedimento resultou em um fragmento de DNA contendo a sequência nucleotídica que codifica os 28 resíduos de aminoácidos da região N-terminal seguidos em fusão de uma sequência nucleotídica que codifica os 21 resíduos de aminoácidos da região C-terminal da sequência polipeptídica do produto da ORF.

Após PCR reversa o fragmento de DNA foi digerido com a enzima *SacII* e religado resultando na construção pMOS- Δ XAC3629. A confirmação foi feita através da análise de restrição com as enzimas *XbaI* e *BamHI*, cuja digestão libera a ORF deletada mais as regiões flanqueadoras, correspondente a um tamanho de 837 pb. O resultado da digestão pode ser visualizado na Fig. 9, a qual mostra um clone (linha 9) que apresenta um fragmento de DNA de 837 pb e outro de aproximadamente 2,9 kb correspondente ao vetor pMOS. Este clone positivo foi submetido a uma reação de sequenciamento de DNA para a confirmação da sequência. Após a confirmação, o inserto foi removido da construção pMOS- Δ XAC3629 e inserido no vetor pNPTS138 linearizado com as mesmas enzimas, originando a construção pNPTS- Δ XAC3629, a qual foi utilizada para transformar células competentes de *Xcc*. O vetor pNPTS138, além de ser suicida (não se replica em *Xcc*) em *Xcc* possui a marca de seleção *sacB*. Em bactéria Gram-negativa, a expressão do gene *sacB* na presença de sacarose é letal. O gene *sacB* codifica a enzima levansucrase, a qual catalisa a hidrólise de sacarose e a síntese de levans, os quais

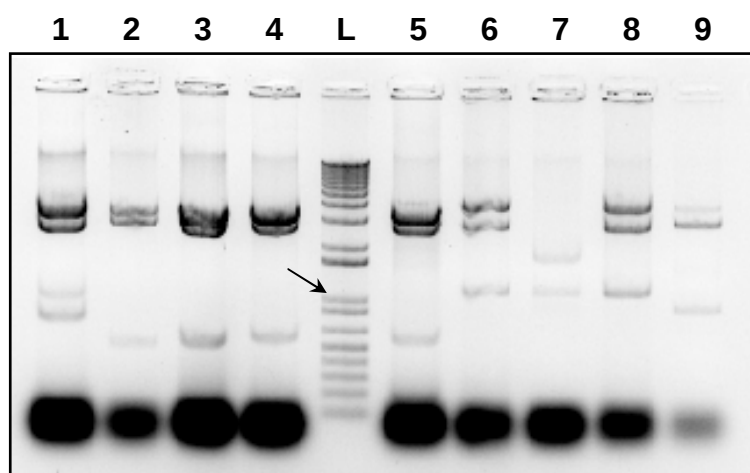
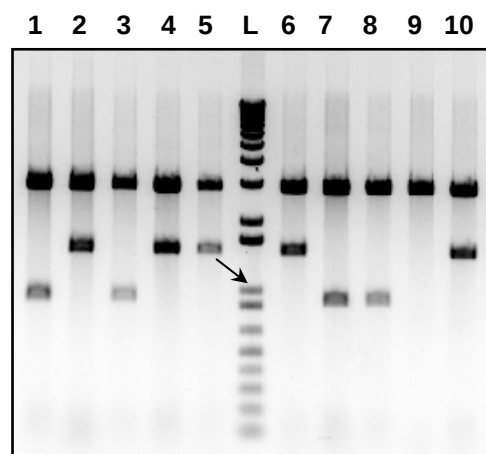


Figura 9- Análise de restrição da construção pMOS-XAC3629 com as enzimas *XbaI* e *BamHI*. As linhas correspondem ao (L) DNA 1 kb *plus ladder* (Invitrogen); (1 a 8) clones negativos; (9) clone positivo. A seta indica o fragmento de DNA de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

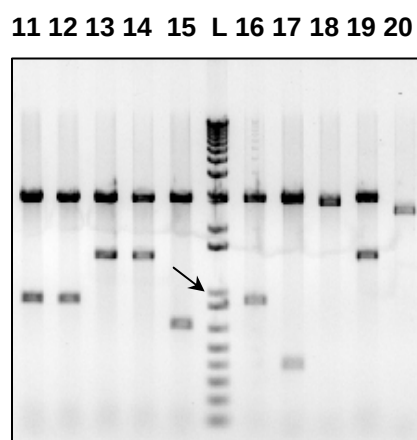
são polímeros de frutose de alto peso molecular (Pelicic et al., 1995). A base da toxicidade ainda é obscura, mas pode ser devido ao acúmulo de levan que pode obstruir o periplasma, devido seu alto peso molecular ou a transferência de resíduos de frutose para aceptores moleculares inapropriados que pode causar efeitos tóxicos nas células bacterianas (Pelicic et al., 1995).

Após a transformação de *Xcc* os clones foram selecionados e analisados em relação à obtenção das linhagens mutantes. Várias transformações foram realizadas, entretanto nenhuma teve resultado conclusivo. Isto foi interpretado como resultado do pequeno tamanho da região *downstream* a ORF, necessária no processo de recombinação homóloga. Decidiu-se, então, por obter um fragmento contendo a região *downstream* ampliada para que ocorresse uma maior probabilidade de recombinação no local desejado. Para isso, foram obtidos dois fragmentos contendo a região a ser ampliada e através da digestão com a enzima *AgeI* um fragmento único contendo a região foi obtido. Este procedimento foi necessário, pois não foi possível amplificar o fragmento inteiro. Após a transformação em células de *E. coli* e extração de DNA plasmidial, o DNA foi digerido com as enzimas *Sall* e *EcoRI* que liberam o fragmento inteiro de 1405 pb e o vetor de clonagem pMOS de aproximadamente 2,9 kb (Figs 10A e 10B). Uma segunda digestão foi realizada com o par de enzimas *AgeI* e *SacI*, que libera um fragmento de 682 pb e outro de 3,6 kb (Fig. 10C). Após a confirmação da construção, o fragmento de DNA de 1405 pb foi inserido no vetor pNPTS138 seguida da análise de restrição do DNA plasmidial. Várias reações de digestão foram realizadas para a confirmação. Entre elas, a digestão com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* que libera o inserto de 1405 pb e o vetor de 5,3 kb (Fig. 11A). Com seis dos clones positivos foi feita outra confirmação através da digestão com o par de enzimas *XbaI* e *NotI* que libera fragmentos de 2,0 e 4,7 kb (Fig. 11B).

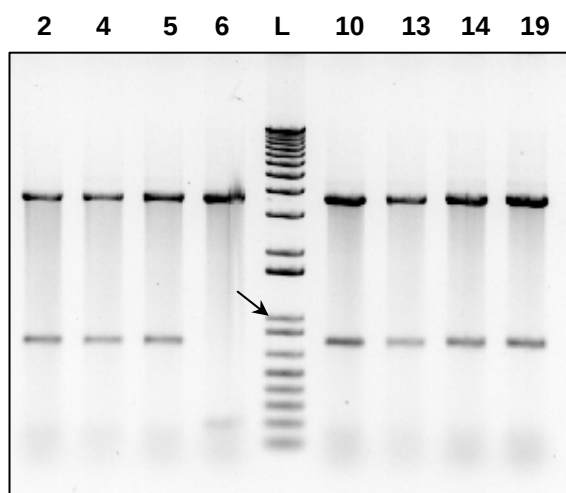
A construção pNPTS-ΔXAC3629 modificada foi utilizada para transformar células competentes de *Xcc*. Após a transformação, as células foram selecionadas em meio TSA contendo canamicina. Várias colônias foram crescidas durante dois dias em meio LB líquido contendo ampicilina para estimular a perda do plasmídeo. Após esse período, várias diluições das suspensões celulares foram realizadas seguidas de plaqueamento em meio LB com ampicilina e sacarose 3% para a seleção das colônias. Aquelas cujo plasmídeo não foi perdido têm o gene *sacB* e são, portanto, sensíveis à sacarose, não crescendo no meio. Mas, mesmo em altas diluições, um grande número de colônias cresceu em meio contendo sacarose, o que inicialmente pareceu normal, pois este resultado indica a perda do plasmídeo. As colônias que teoricamente perderam o plasmídeo foram repicadas em outros dois meios: LB contendo ampicilina e LB contendo canamicina. Era esperado que as colônias crescessem no meio contendo ampicilina, já que células de *Xcc* são resistentes a este antibiótico, mas não em canamicina, pois foi feita uma pré-seleção em meio contendo sacarose. Porém, depois da



A



B



C

Figura 10- Análise de restrição dos DNAs plasmidiais da construção pMOS- Δ XAC3629. **(A)** e **(B)** digestão enzimática com *Sall* e *EcoRI*, liberando fragmentos de 1405 pb do inserto e 2,9 kb do vetor de clonagem. A segunda confirmação **(C)** com *AgeI* e *SacI* libera fragmentos de 682 e 3,6 kb. (L) DNA 1 kb *plus ladder* (Invitrogen). A seta indica o fragmento de DNA de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

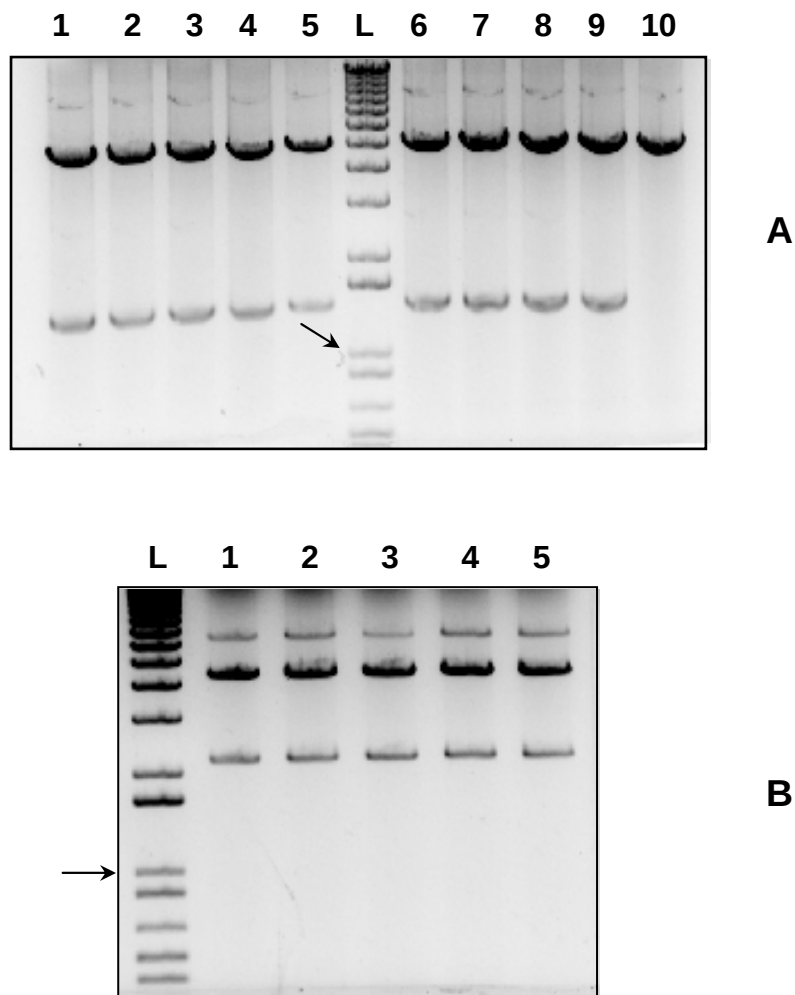


Figura 11- Análise de restrição dos DNAs plasmidiais obtidos após subclonagem no vetor suicida pNPTS138. **(A)** digestão com as enzimas *Hind*III e *Eco*RI que liberam fragmentos de 1,4 (inserto) e 5,3 (vetor) kb. **(B)** digestão com as enzimas *Xba*I e *Not*I que liberam fragmentos de 2,0 e 4,7 kb. A seta indica o fragmento de 1 kb do DNA 1 kb (L) *plus ladder* (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

análise de centenas de colônias, nenhuma mostrou ausência ou inibição de crescimento na presença do antibiótico canamicina, não assegurando, portanto, a obtenção da linhagem nocaute. O crescimento das colônias em sacarose não é uma seleção forte, pois o gene *sacB* do vetor pNPTS138 tem uma certa facilidade em inativar-se, o que torna difícil a seleção da linhagem nocauteada.

Devido ao problema encontrado, uma outra preparação plasmidial foi recebida no laboratório e utilizada para a obtenção de uma nova construção plasmidial e novos experimentos foram realizados. Nestes experimentos foi verificado um número reduzido de colônias após crescimento em meio contendo sacarose, o que pareceu indicar que somente as linhagens sem o plasmídeo foram isoladas. Entretanto, na avaliação final na presença dos dois antibióticos todas as linhagens cresceram, mostrando, novamente, a presença do plasmídeo nas linhagens. Tentativas de amplificação por PCR de fragmentos de DNA genômico para a verificação do nocaute da ORF não foram bem sucedidas. Desta maneira, as tentativas de obtenção de uma linhagem nocaute da ORF foram descontinuadas e as análises posteriores foram realizadas com a linhagem contendo a ORF inativada pelo transposon (XAC3629::Tn).

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório por *Northern blot* mostraram que o gene correspondente à ORF XAC3629 possui um transcrito de aproximadamente 450 pb, o que mostra que a sequência do gene não faz parte do operon *copAB*. Além disso, a expressão gênica não mostrou ser constitutiva, ou seja, a expressão do gene foi induzida por cobre. Este resultado que difere do obtido por Voloudakis et al. (2005) que mostraram por RT-PCR que o gene *copL* de *Xav* é transcrito constitutivamente. Nestes mesmos estudos, Voloudakis et al. (2005) mostraram que algumas regiões importantes de *copL* são requeridas na transcrição do gene repórter *lacZ*. Linhagens mutantes que continham a região 5' final de *copL* e cerca de 100 pb *upstream* à *copL* mostraram indução do gene repórter. Contudo, uma linhagem mutante contendo somente a região 3' do gene, correspondente a metade final de *copL* e início de *copA* não foi capaz de induzir a expressão de um gene repórter. Os resultados obtidos por Voloudakis et al. (2005) sugeriram a necessidade de uma mensagem intacta de *copL* incluindo sua região *upstream*, a qual contém o sítio de início de transcrição para a transcrição do gene repórter *lacZ*.

3. Avaliação do crescimento *in vitro* das células mutantes XAC3629::Tn

A análise das células mutantes XAC3629::Tn obtidas através da inativação com um transposon foi realizada em relação ao crescimento na presença de cobre. Para este ensaio, as células mutantes obtidas (seis clones) e uma linhagem mutante no gene *copA* (*copA*::Tn) juntamente com as células da linhagem selvagem foram crescidas por 24 horas, na ausência e

presença de cobre. A linhagem mutante no gene *copA* e a linhagem selvagem foram utilizadas como controle. Após este período, o crescimento foi quantificado por medidas de turbidimetria a 550 nm. Em um ensaio preliminar, as células foram crescidas na ausência e presença de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ na concentração de 1,0 mM. Como pode ser observado na Fig. 13A o crescimento das linhagens mutantes foi semelhante ao da selvagem na ausência de cobre. Já na presença de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mM, o crescimento das células da linhagem selvagem foi reduzido, enquanto que o crescimento das células mutantes foi praticamente nulo.

Em um ensaio posterior, as células foram crescidas na ausência e na presença de cobre nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mM (Fig. 13B) com o objetivo de avaliar qual a menor concentração do metal capaz de inibir os mutantes, tanto da linhagem XAC3629::Tn quanto da linhagem *copA*::Tn. Neste ensaio, o crescimento das células mutantes foi novamente semelhante ao da linhagem selvagem na ausência de cobre. Entretanto, baixas concentrações deste metal (0,25 mM) foram suficientes para inibir o crescimento das células. Estes resultados sugerem fortemente o envolvimento da ORF XAC3629 no mecanismo de resistência a cobre em *Xcc*, pois mesmo não fazendo parte do operon *copAB* e estando localizada 112 pb *upstream*, os ensaios de crescimento *in vitro* comprovaram que houve aumento da sensibilidade das células mutantes desta bactéria ao metal quando esta sequência foi interrompida pela inserção de um transposon.

A ausência de crescimento na linhagem mutante *copA*::Tn já havia sido documentada anteriormente (Teixeira et al., 2008), pois trata-se da inativação de um dos genes do operon de resistência a cobre *copAB*. Apesar da ligação do metal à proteína não ter sido experimentalmente demonstrada, a proteína CopA de *Xcc* contém um provável sítio de ligação a cobre na extremidade C-terminal, similar ao encontrado nas multicobre oxidases, o qual envolve os aminoácidos His-526, Cys-575, His-850 e Met-585 (Teixeira et al., 2008) e é homólogo ao sítio encontrado na proteína CopA de *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Cha and Cooskey, 1991).

O resultado da inativação da ORF XAC3629 levar a uma inativação do operon *copAB* é intrigante. A ORF XAC3629 não faz parte do operon e a inativação realizada (inativação com transposon) é resultante da inserção de uma sequência nucleotídica (Tn5) na sequência da ORF. Portanto, se a ORF contém regiões capazes de serem ligadas por proteínas que estavam regulando a expressão do operon, estas regiões estariam livres para atuarem como regulatórias. É importante enfatizar que a inserção do transposon foi no nucleotídeo 197 (Fig. 12), e comparando os nossos resultados aos obtidos em *Xav* (Voloudakis et al., 2005) é possível observar que um fragmento contendo a extremidade 5' do gene *copL* mais a sua região *upstream* é capaz de induzir a expressão do gene repórter.

Outro aspecto a ser mencionado é o fato de que em *Xcc* a regulação do operon

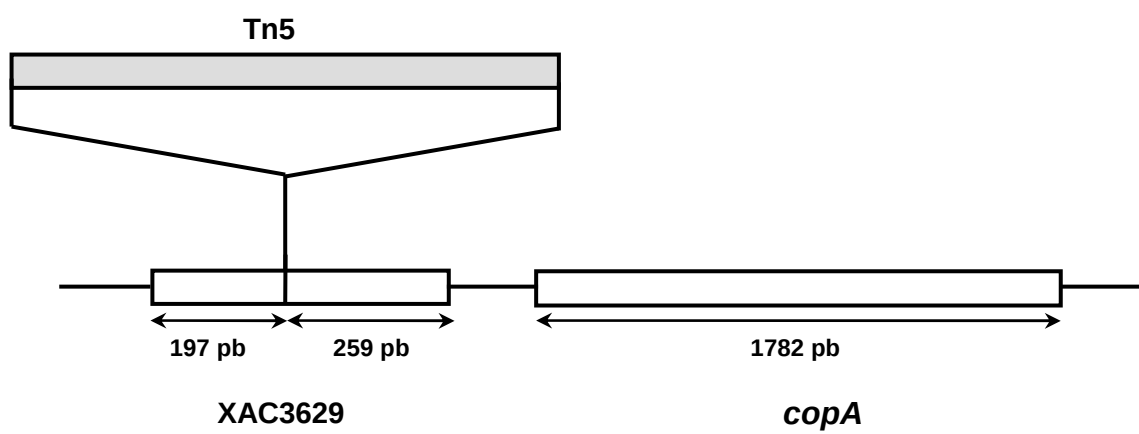
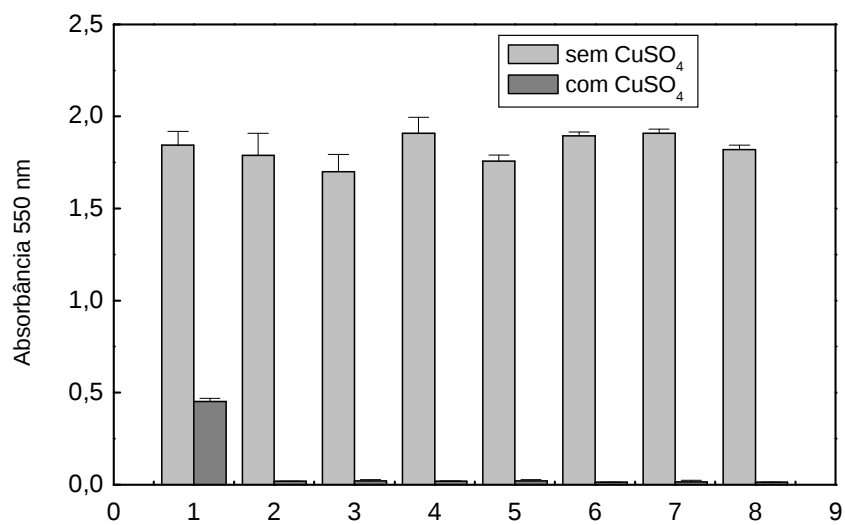
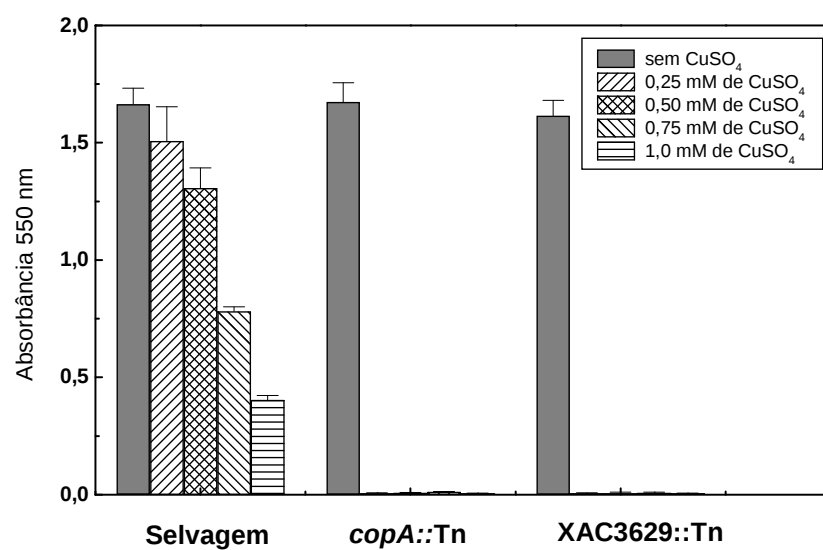


Figura 12- Esquema mostrando a inserção do transposon de aproximadamente 1.2 kb na região mediana da ORF XAC3629



A



B

Figura 13- Crescimento *in vitro* de células mutantes e selvagem de *Xcc*. **(A)** Crescimento na ausência e presença de CuSO₄ 1mM. As linhas correspondem a (1), *Xcc* linhagem 306 selvagem; (2), células mutantes *copA::Tn*; (3 a 8), células mutantes XAC3629::Tn. **(B)** Crescimento na ausência e presença de CuSO₄ nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM. As amostras foram coletadas após 24 h de crescimento a 28°C sob agitação de 250 rpm e o crescimento foi quantificado por turbidimetria a 550 nm. Este resultado é a média de pelo menos três experimentos independentes.

copAB possa ser dependente do produto intacto da ORF XAC3629. Nos experimentos de inativação por transposon a proteína, se sintetizada, estaria truncada.

4. Ensaios de complementação dos mutantes XAC3629::Tn

Os experimentos de complementação funcional foram realizados para definir se a regulação do operon *copAB* está sob o controle da proteína codificada pela ORF XAC3629 ou se apenas a sequência nucleotídica da ORF atua na regulação do operon de resistência a cobre em *Xcc*. Como não foi possível construir uma linhagem mutante contendo a ORF XAC3629 nocauteada, os ensaios de complementação foram realizados apenas com as linhagens contendo a ORF inativada pela inserção do transposon e que mostraram ser sensíveis ao cobre mesmo em baixas concentrações.

A ORF XAC3629 inteira e suas regiões flanqueadoras foram removidas da construção pMOS-XAC3629 e subclonada no vetor de complementação pBBR1MCS-05 através das enzimas *HindIII* e *SacI*. A digestão dos plasmídeos de 14 clones com as mesmas enzimas foi feita para verificar a construção pBBR1MCS-XAC3629 e apenas os clones 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 foram positivos, como mostram as Figs. 14A e 14B. Uma segunda confirmação dos clones positivos foi realizada através da digestão com a enzima *SacII* que cliva nas posições 903 do inserto e 225 do vetor liberando dois fragmentos de tamanhos 2,1 e 3,6 kb (Fig. 14C).

Para os experimentos de complementação, as células das linhagens mutantes XAC3629::Tn foram transformadas com a construção pBBR1MCS-XAC3629 e a seleção dos clones foi feita em meio TSA contendo gentamicina. Para controle do estudo, estes mesmos mutantes foram transformados com o plasmídeo pBBR1MCS-05 vazio. Após a obtenção dos clones, a análise do crescimento foi realizada em meio contendo ou não $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ na concentração final de 1mM. Esta análise foi realizada para verificar se a região do genoma contendo a ORF XAC3629 inserida no vetor de complementação poderia complementar os mutantes que contém esta mesma ORF interrompida com um transposon. As linhagens selvagem e a mutante *copA*::Tn foram utilizadas como controle.

Inicialmente foi realizado um pré-inóculo das células em meio ágar nutriente tamponado sem cobre. Após crescimento por 12 horas, um volume de células correspondente à densidade óptica de 0,5 à 550 nm foi inoculado em meio contendo ou não $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM. A densidade óptica das células foi medida novamente após um período de 24 horas e o resultado referente à média de três experimentos independentes (três transformações) está mostrado na Fig 15.

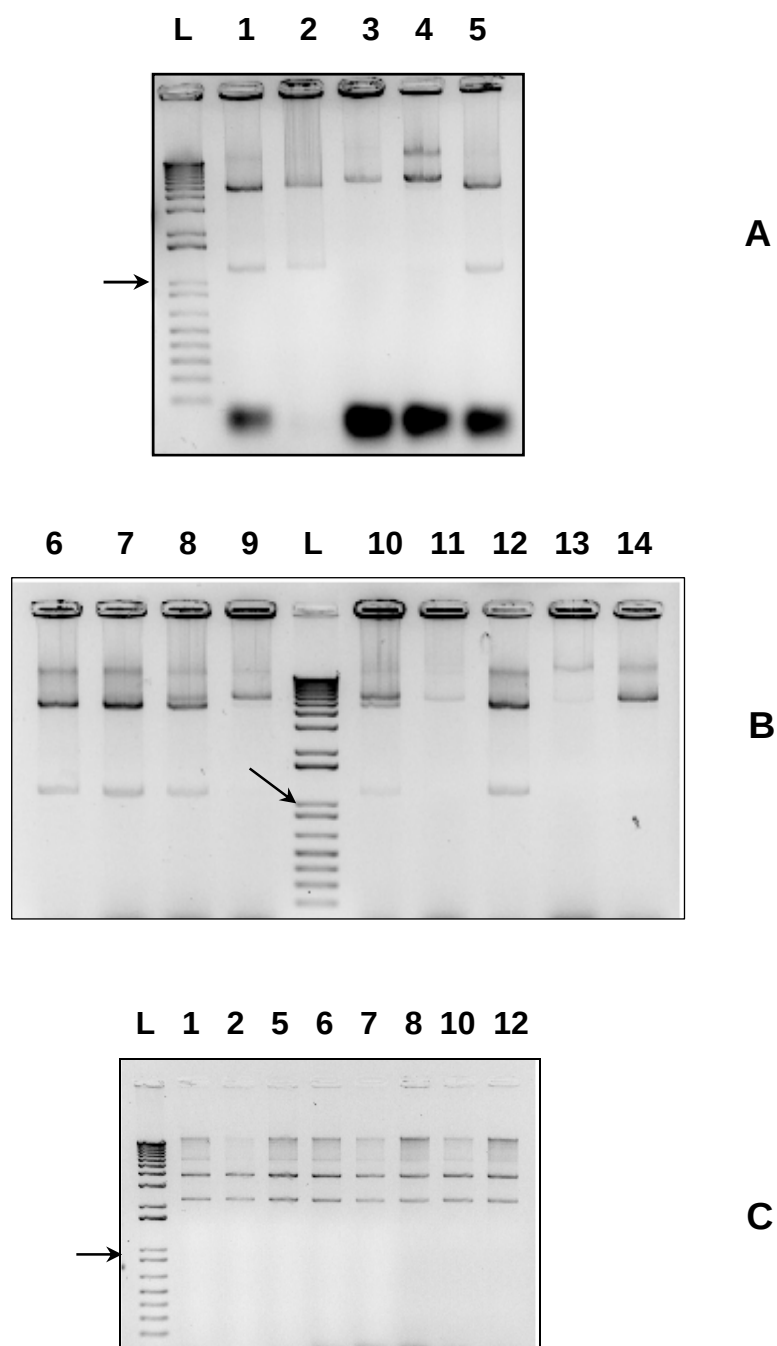


Figura 14- Análise dos DNAs plasmidiais obtidos da construção pBBR1MCS-XAC3629. **(A)** e **(B)** digestão com *Hind*III e *Sac*II e liberação dos fragmentos de aproximadamente 1,2 e 4,8 kb (1 a 14) **(C)** digestão enzimática dos plasmídeos positivos (1, 2, 5, 6, 7, 8, 10 e 12) com *Sac*II e liberação de fragmentos de 2,1 e 3,6 kb. A seta indica o fragmento de 1 kb do DNA (L) 1 kb *plus ladder* (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

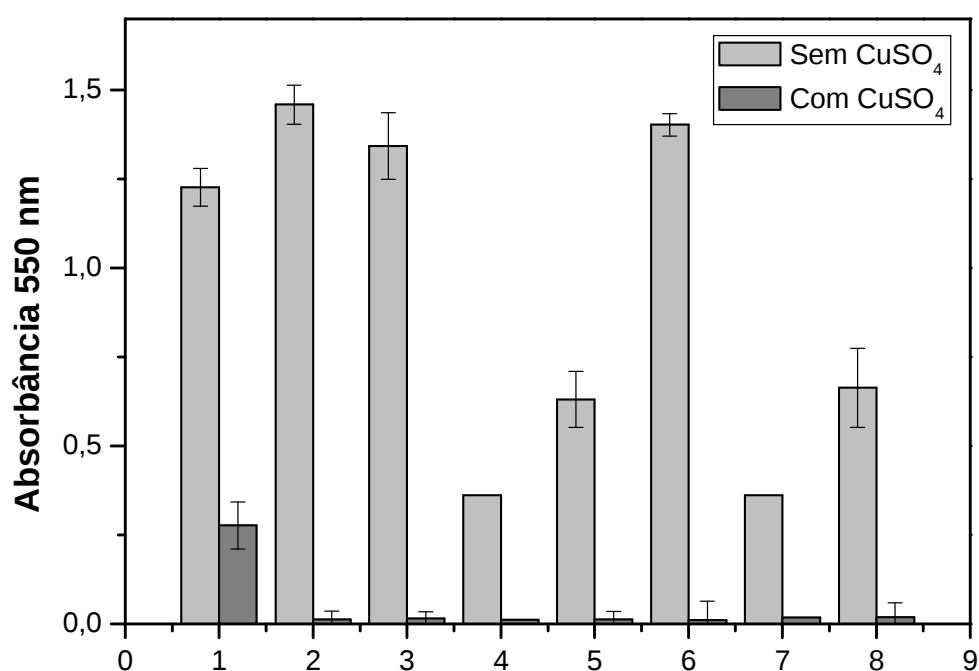


Figura 15- Análise da complementação funcional dos mutantes XAC3629::Tn com a construção pBBR1MCS-XAC3629. As células foram crescidas em meio contendo ou não CuSO₄·5H₂O 1mM. (1) selvagem, (2) *copA*::Tn, (3) XAC3629::Tn mutante 1, (4) XAC3629::Tn mutante 1 transformado com pBBR1MCS-05 vazio, (5) XAC3629::Tn mutante 1 transformado com a construção pBBR1MCS-XAC3629, (6) XAC3629::Tn mutante 2, (7) XAC3629::Tn mutante 2 transformado com pBBR1MCS-05 vazio, (8) XAC3629::Tn mutante 2 transformado com a construção pBBR1MCS-XAC3629. As amostras foram coletadas após 24 horas de crescimento a 28°C sob agitação de 250 rpm e o crescimento foi quantificado por turbidimetria a 550 nm. Este resultado é a média de pelo menos três experimentos independentes.

Como esperado, a linhagem selvagem mostrou alto crescimento em meio sem cobre e a presença do metal levou a uma redução no crescimento. O mutante *copA::Tn* cresceu bem em meio sem cobre (linha 2), comparável à linhagem selvagem (linha 1), porém, a presença do metal inibiu quase completamente o crescimento da linhagem (linha 2). Os dois mutantes XAC3629::Tn analisados (linhas 3 e 6, mutantes 1 e 2, respectivamente) mostraram o mesmo fenótipo do mutante *copA::Tn* na ausência de cobre, ou seja, um crescimento comparável à linhagem selvagem. A presença do metal levou a uma perda da capacidade de crescimento, semelhante ao observado na linhagem *copA::Tn*. A transformação das duas linhagens mutantes XAC3629::Tn com o plasmídeo vazio causou uma redução no crescimento das linhagens na ausência de cobre, um fato ainda não explicável. Esta redução do crescimento na ausência de cobre foi ainda mais acentuada quando as mesmas linhagens foram transformadas com a construção carregando o inserto da complementação funcional (pBBR1MCS-XAC3629). Interessantemente, esta construção não restaurou a capacidade de crescimento das linhagens mutantes na presença de cobre, o que nos levou a concluir a não complementaridade funcional utilizando esta construção plasmidial.

Este plasmídeo pBBR1MCS-05 é derivado do plasmídeo pBBR1MCS (Kovach et al., 1995), mas apesar de comumente ser usado para análises de complementação em diferentes bactérias (Elzer, et al., 1994; Battisti and Minnick, 1999), nossos experimentos mostraram a ausência de complementação. Este resultado pode estar relacionado à não produção da proteína recombinante uma vez que ela é considerada como instável por análises de bioinformática. Outro aspecto a ser considerado é que a proteína possa não ter sido produzida nas células após transformação, mesmo embora o inserto na construção plasmidial contenha as prováveis regiões promotora e terminadora da transcrição. No caso da proteína ter sido produzida na forma recombinante e não ter mostrado complementação nas linhagens mutantes, o papel da ORF XAC3629 na regulação da expressão do operon *copAB* pode estar relacionado apenas à sequência nucleotídica da ORF, e não à proteína codificada por ela. É importante salientar que o laboratório realizou inúmeras tentativas, sem sucesso, para a produção da proteína recombinante codificada pela ORF XAC3629 em *E. coli*. A obtenção da proteína recombinante poderia ser utilizada na produção de anticorpos e, assim, seria possível identificar a proteína nos extratos celulares da bactéria e confirmar se houve ou não sua produção.

Ensaio de complementação funcional também foram descritos por Voloudakis et al. (2005). Neste trabalho, os autores mostraram que a transformação de uma linhagem de *Xav* contendo a sequência de *copL* interrompida pelo gene do antibiótico canamicina com um plasmídeo carregando a sequência referente ao gene *copL* não restaurou a resistência a cobre.

5. Construções plasmidiais contendo fragmentos da região *upstream* ao operon *copAB*

Como um passo inicial para a caracterização da região, fragmentos de DNA foram preparados com o objetivo de avaliar se há ligação de proteínas à região *upstream* ao operon de resistência a cobre em *Xcc*. Os fragmentos de DNA que compreendem esta região serão utilizados nos ensaios de retardamento em gel para verificar se proteínas da bactéria, ativadas por cobre, interagem com a região do operon. Para isto, a região que compreende a ORF XAC3629 e suas regiões flangeadoras foi amplificada em dois fragmentos, o primeiro com 625 pb e o segundo com 636 pb (Fig. 16). A partir destes dois fragmentos várias digestões com diferentes enzimas de restrição foram realizadas com o objetivo de obter fragmentos relativamente pequenos para serem utilizados como sondas nos ensaios de retardamento em gel. A Fig. 6 (Materiais e Métodos) mostrou um esquema da obtenção dos cinco fragmentos obtidos (170, 189, 216, 268 e 314 pb) como resultado das diferentes digestões. Os fragmentos foram clonados no vetor de clonagem pMOS e confirmados por análise de restrição utilizando as enzimas *Bam*HI e *Xba*I, as quais liberam, após digestão os fragmentos inteiros (Fig. 17). As suas seqüências estão sendo confirmadas por seqüenciamento de DNA.

Os fragmentos serão utilizados como sondas em ensaios de EMSA para verificar se proteínas isoladas da bactéria após crescimento na presença de cobre são capazes de interagir com a região *upstream* do operon. Deste modo, os resultados a serem obtidos poderão confirmar se é a seqüência nucleotídica da ORF XAC3629 que pode participar da regulação da expressão do operon de resistência *copAB* em *Xcc*.

Já foi relatado em outros organismos procariotos a interação de proteína com o DNA na região promotora de genes de resistência a cobre (Mills et al., 1994). Em *P. syringae*, CopR é uma proteína ativadora transcricional que se liga a um domínio conservado (*cop box*) no promotor cromossomal do operon resistência a cobre (Mills et al., 1994). Em *P. aeruginosa* foi encontrado um putativo *cop box* localizado entre o gene regulatório *czcR* e o gene estrutural *czcC* do operon *czcCBA* (Chen et al., 2004); genes estes que atuam no mecanismo de resistência a cádmio, zinco e cobalto e que estão localizados *downstream* aos genes regulatórios *copRS*. Este putativo *cop box* encontrado em *P. aeruginosa* sugere que a proteína CopR pode se ligar a esta região promotora e regular a transcrição do operon (Caille et al., 2007).

Foi demonstrado também por Hu et al. (2009) que na linhagem TSS de *P. fluorescens* a proteína CopR regula diretamente a expressão de *copCD* pela ligação específica na região do promotor *copC*. Portanto, seria interessante verificar se há interação da região *upstream* ao operon *copAB* com proteínas regulatórias em *Xcc*.

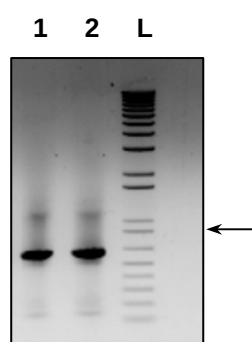


Figura 16 – As linhas correspondem aos fragmentos amplificados com os oligos (1) XacF e 3629Ri, mostrando um fragmento de 625 pb; (2) CopA600F e CopARP, mostrando um fragmento de 636 pb; (L)) DNA 1 kb *plus ladder* (Invitrogen). A seta indica o fragmento de 1 kb do DNA (L) 1 kb *plus ladder* (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

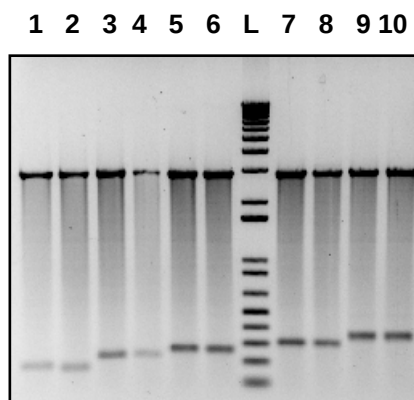


Figura 17- Construções plasmidiais contendo fragmentos da região *upstream* do operon *copAB*. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I. As linhas correspondem ao (L) DNA 1 kb *plus ladder* (Invitrogen), (1 e 2) fragmentos de 170 pb, (3 e 4) fragmentos de 189 pb, (5 e 6) fragmentos de 216 pb, (7 e 8) fragmentos de 269 pb, (9 e 10) fragmentos de 314 pb. A seta indica o fragmento de DNA de 1,0 kb. (L) 1 kb *plus ladder* (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Conclusões

Neste trabalho o papel da ORF XAC3629 de *Xcc* na regulação do operon de resistência a cobre foi estudado. Esta ORF está localizada *upstream* ao operon a uma distância de 112 nucleotídeos do códon de iniciação do primeiro gene estrutural do operon *copAB*. Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Linhagens mutantes de *Xcc*, previamente construídas no laboratório, contendo a ORF XAC3629 interrompida por um transposon (XAC3629::Tn) foram analisadas em relação ao crescimento *in vitro* na presença de cobre. Todas as linhagens mutantes mostraram um aumento na sensibilidade ao cobre quando crescidas em meio contendo o metal, mesmo em baixas concentrações (0,25 mM). Como a ORF não faz parte do operon e sua inativação levou à perda da resistência a cobre nas linhagens mutantes, os resultados sugerem fortemente que a ORF XAC3629 possa estar regulando o operon *copAB*. Essa seqüência poderia codificar uma proteína regulatória ou ser uma seqüência que contém o promotor do operon e elementos de DNA regulatórios.

- Tentativas de construção de uma linhagem mutante contendo a ORF deletada por recombinação homóloga foi um dos objetivos deste trabalho. Entretanto, várias tentativas foram feitas e nenhuma resultou na obtenção do mutante desejado. Os resultados com esta linhagem mutante permitiriam avaliar com maior precisão do verdadeiro papel da ORF XAC3629 na regulação da expressão do operon de resistência a cobre (*copAB*) em *Xcc*.

- As linhagens mutantes contendo a ORF XAC3629 interrompidas por um transposon (XAC3629::Tn) foram submetidas à análises de complementação a fim de determinar se o controle do operon *copAB* está relacionado com a proteína codificada pela ORF ou apenas com sua seqüência nucleotídica. Linhagens mutantes (XAC3629::Tn) que foram transformadas com uma construção contendo a ORF XAC3629 intacta e suas regiões flangeadoras não mostraram complementação em *trans*. Se a proteína foi sintetizada nestes mutantes, os resultados sugerem que a regulação do operon *copAB* está relacionado apenas com a seqüência nucleotídica da ORF e não com sua proteína codificada.

- Se realmente há ligação de proteínas na região *upstream* a ORF XAC3629 que podem estar relacionadas com a regulação do operon *copAB*, poderá ser comprovado através de estudos de EMSA. Para isso, a região *upstream* ao operon foi dividida em diferentes fragmentos que serão utilizados como sonda nos ensaios de interação de proteínas com o DNA, uma vez que em outros organismos, esta ligação já foi determinada.

- Por fim, o conhecimento da regulação do operon de resistência a cobre *copAB* em *Xcc*, o entendimento na atuação das proteínas codificadas por ele e o estabelecimento dos mecanismos de regulação do operon de resistência a cobre, poderão ser um grande passo para a descoberta de novos alvos terapêuticos contra bactérias patogênicas e conseqüentemente a diminuição dos prejuízos na agricultura devido aos agentes fitopatogênicos.

Referências

BATTISTI, J. M.; MINNICK, M. F. Development of a system for genetic manipulation of *Bartonella bacilliformis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3441-3448, 1999.

BENDER, C. L. et al. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 170-175, 1989.

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

CAILLE, O.; ROSSIER, C.; PERRON, K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 13, p. 4561-4568, 2007.

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

CHEN, Y. T. et al. Evolutionary analysis of the two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J. Mol. Evol.**, v. 59, p. 725-737, 2004.

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

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

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

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

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

HOSHINO, N. et al. T. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper complexes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 1245-1250, 1999.

HU, Y. et al. Molecular analysis of the copper-responsive CopRSCD of a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* Strain. **J. Bacteriol.**, v. 47, n. 3, p. 277-286, 2009.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS-05, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, p. 175-176, 1995.

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

LIU, T. et al. Multiple metal binding domains enhance the Zn(II) selectivity of the divalent metal ions transporter AztA. **Biochemistry**, v. 46, p. 11057-11068, 2007.

MacOMBER, L.; RENSING, C.; IMLAY, L. A. Type-2 copper-containing enzymes. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, p. 2887-2899, 2007.

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

MILLS, S. D.; JASALAVICH, C. A.; COOKSEY, D. A. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 6, p. 1656-1664, 1993.

MILLS, S. D.; LIM, C. K.; COOKSEY, D. A. Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (*cop box*) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. **Mol. Gen. Genetic.**, v. 244, p. 341-351, 1994.

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

OSMAN, D.; CAVET, J. S. Copper homeostasis in bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 65, p. 217-247, 2008.

OUTTEN, F. W. et al. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 5339, p. 31024-31029, 2000

OUTTEN, F. W. et al. The Independent *cus* and *cue* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 33, p. 30670-30677, 2001.

PELICIC, V.; REYRAT, J. M.; GICQUEL, B. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on *Mycobacteria*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 4, p. 1197-1199, 1995.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. 1997 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p. 5463-5467, 1997.

SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 690-695, 2006.

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

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

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

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

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

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

TEIXEIRA, E. C. et al. The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri: gene inactivation results in copper sensitivity. **Microbiology**, v. 154, p. 402-413, 2008.

VOLOUDAKIS, A. E.; BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 5, p. 1627-1634, 1993.

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

WAIDER, B. et al. Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327), and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 13, p. 4683-4688, 2002.

WALDRON, K. J.; ROBINSON, N. J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 25-35, 2009.

WARD, S. K.; HOYE, E. A.; TALAAT, A. M. The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 8, p. 2938-2946, 2008.

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