

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA XAC1201  
ENVOLVIDA NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri***

**Flávia Campos Freitas Vieira**

**Bióloga**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA XAC1201  
ENVOLVIDA NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri***

**Flávia Campos Freitas Vieira**

**Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro**

**Coorientador: Prof. Dr. João Martins Pizzauro Junior**

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

**2014**

Vieira, Flávia Campos Freitas  
V658 Caracterização funcional da proteína XAC1201  
c envolvida na patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp.  
*citri* / Flávia Campos Freitas Vieira. -- Jaboticabal, 2014  
xi, 114 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual  
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
2014

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: João Martins Pizauro Junior

Banca examinadora: Tiago Santana Balbuena, José  
Belasque Junior

Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Expressão heteróloga. 3. Histidina  
quinase. 4. IMAC. 5. Proteína hipotética. I. Título. II.  
Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 632.23:634.31



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA XAC1201 ENVOLVIDA NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

**AUTORA:** FLÁVIA CAMPOS FREITAS VIEIRA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOAO MARTINS PIZAURO JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Flávia Campos Freitas Vieira, nascida em Uberlândia – MG, em 26 de abril de 1990. Ingressou, em 2005, na Escola Estadual Messias Pedreiro - MG, onde concluiu, em 2007, o Ensino Médio. Em 2008, entrou para a Universidade Federal de Uberlândia, onde cursou Ciências Biológicas, vindo a graduar-se em 2011. Em 2012, iniciou o mestrado no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Jaboticabal, SP, com auxílio financeiro da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação do Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, onde desenvolveu pesquisas relacionadas com a identificação de função de proteínas hipotéticas do patógeno do cancro cítrico para o controle da doença, resultando no presente trabalho. Em sua vida acadêmica, estagiou em várias áreas, entre elas na Escola de Educação Básica da Universidade Federal de Uberlândia (ESEBA-UFU), participando de um projeto de extensão voltado para a comunidade. Atuou como monitora da disciplina de Anatomia Humana do curso de Biologia. Participou da MinasBio, Empresa Junior do curso de Biologia, como Diretora Administrativa, Jurídica e Financeira. Foi contemplada com duas bolsas de iniciação científica (PIBIC), sendo que a primeira esteve vinculada ao Programa de Melhoramento de Soja da UFU e a segunda ao Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, onde concluiu as pesquisas da monografia, resultando em um artigo científico. Participou da publicação de 12 resumos em eventos científicos. Atuou como participante em sete cursos com temas ligados à área biológica e de 24 eventos científicos. Participou da organização de três eventos ligados à Biologia. Participou da ministração do minicurso “Expressão Heteróloga de Proteínas” dentro do XIX Curso de Inverno de Genética da FCAV-UNESP.

Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.

Colossenses 3:23-24

## DEDICATÓRIA

À minha família:

Aos meus pais, Flávio César e Noemi,

por me ensinarem através de suas vidas a amar e a servir a Deus, por serem meu exemplo de perseverança, dedicação e transparência, e por serem, para muitos, através do amor entre vocês, exemplo de respeito, companheirismo e lealdade.

Ao meu irmão, Estêvão,

por ser muitas vezes “insuportável”, mas sempre indispensável, por sempre me apoiar do seu jeito singular, e me amar com toda sinceridade.

Vocês participaram de maneira fundamental na realização e conclusão deste trabalho. Entre muitas outras formas, com orações, palavras de motivação e consolo para os dias difíceis e de alegria e vibração para os dias de vitórias, além de serem meus maiores incentivadores para eu estar aqui. O que nos une é muito mais do nossa constituição genética. O amor que nos torna um, vem dAquele que é o próprio amor, o Senhor Deus. Amo a vida de vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Senhor e Salvador, Jesus Cristo, por ser, dia após dia, meu companheiro, durante todas as etapas deste trabalho. Por ser invariavelmente aquele em quem eu encontrei força e ânimo diante dos desafios, sabedoria para os momentos de decisão, tranquilidade para os dias de tensão e paz acima das circunstâncias. Todo o mérito eu entrego a Ele.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, compreensão, suporte por meio de orações, palavras de sabedoria, força e carinho que me sustentaram e me mantiveram prosseguindo para o alvo. Ao meu irmão, pelo carinho e apoio constantes. Em especial, à minha mãe, pela revisão ortográfica e normatização do trabalho.

Ao Prof. Jesus Aparecido Ferro, pela orientação e ensino durante esses dois anos. Foi uma grande oportunidade para meu crescimento profissional estar sob a orientação de um excelente profissional que genuinamente tem paixão pela ciência.

Ao Prof. João Martins Pizauro Junior, pela coorientação e ensinamentos que foram de extrema importância para a elaboração deste trabalho.

À Profa. Maria Inês, pelo acolhimento ao grupo LBM e a disposição em sempre ajudar, além do suporte financeiro dispensado neste projeto.

Aos Professores Tiago Santana Balbuena, Marcos Túlio de Oliveira e Alessandro Varani, por disporem de tempo e esforços na realização de análises e na elaboração de estratégias para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do LBM (Laboratório de Biologia Molecular) que me receberam com tanto carinho desde o início. À Elaine, Mayara, Juliana C., Tereza, Nayara, que me ajudaram e acompanharam nos primeiros passos dentro do Laboratório. Agradeço à Lucília e ao Rafael, pela experiência compartilhada e por me acompanharem de perto sendo responsáveis por grande parte do meu treinamento. Meus agradecimentos à Claudênia, Ana Carolina, Juliana V., Flávia “mãe”, Miguel, Raquel, Larissa, Karina, Daniele, Aline Belesini, Bruna, Juan, Sonia, Amanda, Ângela, Fernando, Janaína, Ângela (Nova Fórmula), Gabriela, Gustavo P., Gustavo S. e mais recentemente à Aline L. e Thaísa, porque todos, em algum momento, tiveram sua participação neste trabalho, seja com conselhos, sugestões,

experiências compartilhadas, dúvidas sanadas, auxílio em experimentos, momentos de descontração ou com palavras de incentivo.

Em especial, agradeço à Claudênia, Ana, Janaína, Elaine e Juliana V., porque com vocês tem sido cultivada uma amizade além do ambiente de trabalho. O companheirismo e a alegria de vocês me deram outro ânimo para o dia-a-dia. Vocês se mostraram verdadeiras amigas através de pequenos gestos de carinho, apoio e consolo nos momentos de definição, de prazos apertados, de resultados negativos e muito parceiras para celebrar, comprar, dar boas e altas risadas e fiéis nos inúmeros momentos de gordices. Muito obrigada, suas “imensinhas”!

Às meninas do CREBIO, Agda, Mariza e Renata pelo suporte que deram em muitas etapas experimentais, pela disponibilidade e o ótimo convívio com vocês.

Ao LEA (Laboratório de Enzimologia Aplicada) pelo acolhimento durante os meses que estive lá. Pela disposição em me ensinar e auxiliar nos experimentos, além de todos os momentos de descontração que aliviaram os de tensão. Muito obrigada Adriano, Flávio, Rafael, Ana Carol, Gabriela e Maria Luíza!

Aos amigos conquistados neste período: ao Gustavo, agradeço pelo apoio, pela amizade, generosidade e pelas conversas que despreziosamente me motivavam, e à Dora e Juliana, pelo convívio, carinho e por terem suportado com paciência muitos momentos de tensão da minha parte.

Aos amigos da ABU (Aliança Bíblica Universitária), Tatiana, Laís, Cris, Gabriela e Eduardo, pelo incentivo e orações e pelo carinho e acolhimento desse grupo tão precioso!

Às amigas de longa data, Cláudia e Mariana, que mesmo a distância, me lembravam de quanto eu era querida. Agradeço pelas orações, paciência, incentivo compreensão e amor que tiveram por mim nesses anos.

À Raphaela, minha irmã por escolha, pilar de fé, que em inúmeros momentos me sustentou com palavras de sabedoria, perseverança, com orações e com um amor refletido em ações. Apesar da distância, foi uma das pessoas mais próximas de tudo o que se passou nesse período.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

## SUMÁRIO

	Página
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Aspectos gerais da citricultura brasileira.....	14
2.2 Compreendendo o Cancro Cítrico.....	17
2.3 <i>Xanthomonas</i> e os tipos de cancros cítricos.....	22
2.4 Avanços em estudos sobre Xac a partir do sequenciamento do seu genoma.....	24
2.4.1 Obtenção do mutante 11C09 e o interesse na proteína XAC1201.....	26
2.4.2 O Sistema de Dois Componentes.....	29
2.5 O Processo de Purificação de Proteínas Recombinantes.....	37
2.5.1 Expressão Heteróloga de Proteínas.....	38
2.5.2 Uso de <i>Escherichia coli</i> como sistema de expressão.....	39
2.5.3 Purificação por cromatografia de afinidade.....	41
3. OBJETIVOS.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. Condições de cultivo bacteriano para teste de patogenicidade.....	45
4.2. Teste de patogenicidade <i>in vivo</i> do mutante 11C09.....	45
4.3. Reconfirmação da inserção do transposon no mutante 11C09.....	46
4.3.1 Extração de DNA genômico do mutante 11C09.....	46
4.3.2 Amplificação do DNA genômico do mutante 11C09.....	47
4.3.3 Purificação do produto da PCR do DNA genômico do mutante 11C09.....	48
4.3.4 Sequenciamento do mutante.....	48
4.4. Análise por eletroforese em gel de agarose.....	49
4.5. Expressão Heteróloga de XAC1201.....	50
4.5.1 Amplificação da ORF por PCR.....	50
4.5.2 Clonagem no Vetor de Expressão e Transformação Bacteriana.....	50
4.5.3 Expressão em Pequena Escala de His-SUMO-1201 em <i>E. coli</i> .....	51
4.5.4 Ensaio de Solubilidade e Expressão de His-SUMO-XAC1201 em <i>E. coli</i> .....	52
4.5.5 Purificação de His-SUMO-XAC1201 por IMAC.....	53
4.6. Análise por SDS-PAGE.....	54
4.7. Quantificação de proteína.....	55
4.8. Análises por espectrometria de massas e confirmação da identidade da XAC1201.....	55
4.8.1. Digestão da proteína em gel.....	55
4.8.2. Espectrometria de massas.....	56
4.9. Caracterização bioquímica da proteína XAC1201.....	57
4.9.1 Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatásica (ATPásica).....	57

4.9.2	Determinação da atividade de pirofosfatase.....	58
4.9.3	Determinação da atividade de piridoxalfosfatase.....	58
4.9.4	Determinação da atividade de PNPPase.....	58
4.9.5	Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatásica na presença de histidina.....	59
4.9.6	Determinação da atividade de PNPPase na presença de histidina.....	59
4.9.7	Dimerização e atividade de ATPase e PNPPase da proteína XAC1201 na presença de íons.....	60
4.9.8	Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de detergentes.....	61
4.10	Análise por gel nativo.....	61
4.11	Análise da frequência e diversidade da ORF XAC1201 presente nos bancos de dados.....	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1.	Teste de patogenicidade <i>in vivo</i> do mutante 11C09.....	62
5.2.	Reconfirmação do transposon no mutante 11C09.....	66
5.3.	Construção e Confirmação da Expressão do Plasmídeo His-SUMO-1201.....	69
5.4.	Padronização das Condições de Expressão de His-SUMO-1201 na forma solúvel.....	71
5.5.	Purificação de His-SUMO-1201 por IMAC.....	74
5.6.	Rendimento proteico de XAC1201 no processo de purificação.....	81
5.7.	Análises por espectrometria de massas e confirmação da identidade da XAC1201.....	83
5.8.	Caracterização bioquímica da proteína XAC1201.....	87
5.8.1	Atividade de XAC1201 como fosfatase e histidina quinase.....	87
5.8.2	Dimerização e atividade de ATPase e PNPPase da proteína XAC1201 na presença de diferentes íons.....	89
5.8.3	Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de detergentes.....	91
5.9	Análise da frequência e diversidade da ORF XAC1201 presente nos bancos de dados.....	93
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
7.	AGRADECIMENTOS.....	97
8.	REFERÊNCIAS.....	98

## CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA XAC1201 ENVOLVIDA NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

**RESUMO** – A ORF XAC1201 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) codifica uma proteína hipotética que, quando nocauteada por inserção de transposon, leva a alterações na patogenicidade da bactéria em citros. A ORF possui 819 pb e codifica a proteína XAC1201 que possui uma massa molecular de 29,1 kDa. A região codificadora foi clonada no vetor de expressão pET SUMO e a proteína de fusão His-SUMO-XAC1201 foi expressa na *Escherichia coli* linhagem BL21(DE3) pLysS. A melhor condição para expressão da proteína na forma solúvel foi a 28°C e 250 rpm por 4h na presença de 0,2 mM IPTG. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) em coluna de Ni<sup>2+</sup>-Sepharose e a proteína de não fusão foi obtida após digestão com SUMO protease e nova cromatografia em coluna de Ni<sup>2+</sup>-Sepharose. O rendimento final do processo foi de 3,18% da proteína total, tendo a proteína recombinante nativa sido isolada com alto grau de pureza e na forma nativa. A identidade de XAC1201 recombinante foi confirmada pelas análises de espectrometria de massas, com mais de 80% de cobertura da sequência. Foram realizados testes enzimáticos para verificar as prováveis atividades de fosfohidrolase e histidina quinase, porém, estes testes não foram conclusivos. A análise de frequência e diversidade da ORF XAC1201 em bancos de dados sugere que se trata de uma proteína ubíqua e com função ancestral, presente em diversos filos dentro do Domínio Bacteria. A obtenção desta proteína na forma pura, solúvel e nativa é o primeiro passo para os estudos de caracterização da sua função e, devido à presença de alta identidade desta sequência com muitos outros grupos bacterianos, a elucidação da função desta proteína será de grande interesse, não apenas para Xac, como também para outros microrganismos.

### **Palavras-chave:**

cancro cítrico, expressão heteróloga, histidina quinase, IMAC, proteína hipotética

## FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF XAC1201 PROTEIN INVOLVED IN *Xanthomonas citri* subsp. *citri* PATHOGENICITY

**ABSTRACT** – The ORF XAC1201 of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) encodes a hypothetical protein and when knocked out by transposon insertion leads to changes in the pathogenicity of the bacterium in citrus. The ORF XAC1201 has 819 bp and encodes a protein with a molecular mass of 29.1 kDa. The coding region was cloned into the expression vector pET SUMO and His-SUMO-XAC1201 fusion protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS strain. The best condition for protein expression in soluble form was 28°C and 250 rpm for 4 hours in the presence of 0.2 mM IPTG. Purification was performed by immobilized metal ions affinity chromatography (IMAC) on a Ni<sup>2+</sup>-Sepharose column and the non-fusion protein was obtained after digestion with SUMO protease and new chromatography on Ni<sup>2+</sup>-Sepharose column. The final process yield was 3.18% of the total protein, and the protein was obtained highly pure and in the native form. The identity of the purified protein was confirmed by mass spectrometry analysis with sequence coverage above 80%. Enzymatic assays were made to verify phosphohydrolases and histidine kinase activities, however, the results are inconclusive. It is suggested that XAC1201 is a ubiquitous protein and plays an ancestral role, since it is found in several Phyla within the Bacteria Domain. Obtaining this protein in pure, soluble and native form is the first step towards characterization studies of its function. Since this protein is present not only in Xac but has a ubiquitous presence in many other bacterial groups, the understanding of its function is of great interest to many areas.

### **KEYWORDS:**

citrus canker, heterologous expression, histidine kinase, hypothetical protein, IMAC

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Consumo mundial de suco de laranja brasileiro.....	16
Figura 2 – Preço da caixa de laranja (40,8 kg) dos anos de 2009 a 2013.....	17
Figura 3 – (A) Foto apresentando os sintomas de cancro em folhas e na laranja. (B) Foto apresentando os sintomas de cancro e erupções em ramo de laranjeira. (C) Foto apresentando em destaque sintoma de cancro em laranja.....	19
Figura 4 - <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> saindo de um estômato de uma folha, 5 dias após infecção.....	20
Figura 5 – Colônias isoladas de Xac em meio NA.....	22
Figura 6 – Dados relativos à ORF XAC1201. Foto representativa da caracterização fenotípica do mutante 11D03. Identificação (ID) de Xac quanto o Psort e ao SinalP: MI (membrana interna) e NS (não secretória). Estrutura dos principais domínios da ORF XAC1201: domínio HDOD e domínio HD. Fenótipo: ENCH: encharcamento; HIPER: hiperplasia; NEC: necrose; HR-1: resposta de hipersensibilidade tipo 1. ND: não definido; '+': indução; '-': repressão. Modificado de LAIA, et al., 2009.....	27
Figura 7 – Resultado do InterProScan apresentando a posição dos principais domínios dentro da sequência proteica de XAC1201.....	28
Figura 8 – Estrutura em cristal da HK853 de <i>Termatoga maritima</i> em complexo com RR468 (PDB:3DGE) apresentando os resíduos de aminoácidos importantes para a especificidade da fosfotransferência. Esses resíduos no Regulador de Resposta e na Histidina Quinase são apresentandos como esferas sólidas em vermelho e laranja, respectivamente (PODGORNAIA; LAUB, 2013).....	30
Figura 9 – Via do Sistema de Transdução de Dois Componentes. Sinalização em uma via ortodoxa de fosfotransferência (esquerda) e uma via de fosforilação múltipla ( <i>phosphorelay pathway</i> ) (direita). Em uma via ortodoxa, o domínio sensorial extracitoplasmático da histidina quinase recebe um estímulo de entrada que resulta na autofosforilação da histidina na região de transmissão citoplasmática. A região de transmissão consiste no domínio DHp, que media a dimerização, e no domínio CA, que liga o ATP e catalisa a	

fosforilação da histidina. O grupo fosforil na histidina é transferido para um aspartato no domínio receptor do regulador de resposta. Essa fosforilação altera a atividade do domínio efetor do regulador de resposta levando a mudanças na expressão gênica. Já a via de fosforilação múltipla tem dois passos adicionais de fosfotransferência em relação à via ortodoxa. O grupo fosforil da histidina quinase é transferido para o regulador de resposta, e depois para um fosfotransferase de histidina, antes de alcançar o regulador de resposta final. (Modificado de ASHENBERG, 2012).....

31

Figura 10 – Região de transmissão do homodímero HK853 de *T. maritima* (PDB ID 2C2A). O domínio DHp é um homodímero e forma um arranjo de quatro hélices, com a região conservada de fosforilação da histidina (verde) voltada para a primeira hélice,  $\alpha 1$ , e o domínio CA forma uma cavidade de ATP ligante ocupada por um ATP (ASHENBERG, 2012).....

33

Figura 11 – Organização e sinalização dos domínios no TSCT. Na Classe I das histidinas quinases, o domínio de dimerização e fosfotransferência de histidina (DHp) é conectado com o domínio catalítico e ATP ligante (CA) através de um ligante. Na Classe II, o H box contendo o domínio de fosfotransferência de histidina (HPt) é separado do domínio CA por uma região de entrada e um domínio extra de dimerização (Dim). Tipicamente, o TCST é caracterizado por uma única transferência do grupo fosforil ( $H \rightarrow D$ ), enquanto que a via de fosforilação múltipla permite a reação de múltiplas fosfotransferências ( $H \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow D$ ). Os sítios de fosforilação estão representados por: H (Histidina), D (Aspartato). (JUNG et al., 2012).....

36

Figura 12 - Esquema representativo da construção His-SUMO-1201 com escala do tamanho de cada proteína. Tamanho total da proteína expressa: 42,1 kDa.....

51

Figura 13 - Teste de patogenicidade. Superfície abaxial de folhas jovens de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbek), inoculadas com suspensão celular do mutante 11C09 de Xac a concentração de  $10^8$  UFC/mL, observadas durante 21 dias após a inoculação (DAI).....

64

Figura 14 - Teste de patogenicidade. Superfície abaxial de folhas jovens de limão cravo (*Citrus limonia* Osbek), inoculadas com suspensão celular do mutante 11C09 de Xac a concentração de  $10^8$

- UFC/mL, observadas durante 21 dias após a inoculação (DAI)... 65
- Figura 15 - Gel de agarose 1%. (A) DNA genômico do mutante 11C09. (B) Produto de PCR do DNA genômico do mutante 11C09 amplificado com os primers específicos de XAC1201. M= Marcador molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas®); DG= DNA genômico; PP= Produto da PCR..... 67
- Figura 16 - Esquema em escala aproximada da posição do transposon *Tn5* (verde) interrompendo a ORF XAC1201 (barra em preto). As setas coloridas mostram a direção de amplificação dos *primers* do transposon (KAN-2 FP e KAN-2 RP) e da ORF XAC1201 (XAC1201 F e XAC1201 R)..... 68
- Figura 17 – Sequência de nucleotídeos da ORF XAC1201 e sequência de aminoácidos codificada. Os números em preto indicam a sequência de nucleotídeos e os em vermelho indicam a sequência de aminoácidos. As metioninas presentes na sequência estão indicadas em azul e o códon de terminação está indicado em lilás. As bases 727 e 728, entre as quais o transposon *Tn5* se inseriu estão indicadas em vermelho. O códon ccg do qual elas fazem parte codifica o aminoácido prolina (P), marcado em vermelho..... 68
- Figura 18 – Gel de agarose 1%. Produto de PCR de 819 pb da ORF XAC1201. 1, 2 e 3 - repetições. M - marcador molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas®)..... 70
- Figura 19 – Sequência de aminoácidos da proteína de fusão His-SUMO-XAC1201. O total de aminoácidos da proteína é de 391. As seis histidinas (H) estão mostradas em amarelo; a sequência da SUMO proteína está mostrada em azul, com o sítio de reconhecimento da SUMO protease em negrito e sublinhado; a sequência da XAC1201 está mostrada em cinza, com a clivagem ocorrendo entre a última glicina da SUMO e a metionina da XAC1201..... 70
- Figura 20 – Expressão em pequena escala, de dois clones (1 e 2), da construção His-SUMO-1201, a 37°C, 4h. M – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*® – Fermentas. NI – amostra não induzida com IPTG 0,4 mM. I – amostra induzida com IPTG 0,4 mM..... 70
- Figura 21 - Ensaio de solubilidade de His-SUMO-XAC1201 em SDS-PAGE. A seta preta indica a condição de expressão escolhida (28°C, 4h, 0,2 mM IPTG). T – proteína total; S – sobrenadante; P – precipitado; M – marcador molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas)..... 72

- Figura 22 - Esquema das etapas da purificação da His-SUMO-1201, do lisado até a obtenção da proteína pura. O gradiente de cor representa a purificação obtida em cada etapa, sendo o mais escuro, a amostra com maior grau de contaminantes e o mais claro, a proteína purificada..... 75
- Figura 23 – SDS-PAGE das etapas da purificação de XAC1201. (A) Amostra proteica após sonicação: L – lisado; S1 – sobrenadante inicial; P1 – precipitado inicial. (B) Frações da cromatografia: FT – Flow Through; W1 – lavagem; E1 – eluato. (C) Precipitação com sulfato de amônio: [E1] – frações do eluato concentradas; S2 – sobrenadante a 20% de precipitação; P2 – precipitado a 20% de precipitação; S3 – sobrenadante a 70% de precipitação; P3 – precipitado a 70% de precipitação. (D) Cromatografia por gravidade: P.D. – amostra após digestão com SUMO protease; FT2 – flow through; W2 – lavagem; E2 – eluato. (E) Amostra concentrada: F – sobrenadante do filtro; PP – proteína pura. M – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*® – Fermentas..... 76
- Figura 24 - Perfil cromatográfico da separação de His-SUMO-1201 do lisado de *E.coli* pela coluna de resina de Ni<sup>2+</sup>. Tamanho da coluna: 5,0 mL; Tampão de carregamento e lavagem (A): 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 mM imidazol, 500 mM NaCl, 5% glicerol; Taxa de fluxo: 2,0 mL/min; Gradiente de eluição (linha pontilhada) de 100% do Tampão A a 100% do Tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM imidazol, 500 mM NaCl, 5% glicerol); Volume de eluição: 60 mL..... 77
- Figura 25 – Esquema representativo da digestão da proteína SUMO pela SUMO protease originando a proteína nativa e a eluição das outras proteínas na presença dos tampões A e B (alta concentração de imidazol-Im). A proteína recombinante está ligada por afinidade à resina com níquel (Ni<sup>2+</sup>) que está imobilizada em uma matriz de agarose..... 79
- Figura 26 – SDS-PAGE. Gel desnaturante corado com Comassie (à direita) e nitrato de prata (à esquerda) demonstrando a pureza de XAC1201 (3,68 mg/mL) em três volumes diferentes: 5 µL, 10 µL e 20 µL com as respectivas concentrações de proteína: 1- 18,4 µg, 2- 36,8 µg, 3- 73,6 µg. M- Marcador Molecular: Precision Plus Protein® Kaleidoscope® Standards (BioRad)..... 81
- Figura 27– Sequência de aminoácidos de XAC1201 identificados por espectrometria de massas, com destaque para os peptídeos em negrito..... 84

- Figura 28 – Gel nativo. XAC1201 incubada a 37°C por 1h com diferentes íons ( $ZnCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ), após diálise *overnight*. C: controle (ATP + enzima). M – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*® – Fermentas..... 90
- Figura 29 – Árvore filogenética do Domínio Bacteria enfatizando nos quadros amarelos os filos de bactérias cujas proteínas obtiveram identidade com a proteína XAC1201..... 94

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Variações dos íons utilizados para a dimerização de XAC1201.....	60
Tabela 2 – Rendimento de três purificações de XAC1201 em todas as etapas do processo de purificação, partindo-se de 1 L de meio de cultura inicial, apresentando a média e o desvio padrão de cada etapa.....	82
Tabela 3 – Sequências de peptídeos de três repetições da proteína recombinante XAC1201 identificadas por espectrometria de massas. Score: pontuação obtida pela análise dos espectros. Cobertura: porcentagem de peptídeos identificados. PSMs ( <i>peptide spectrum matches</i> ): correlação entre o espectro teórico e o espectro experimental. Xcorr: pontuação obtida pela sobreposição entre os espectros teóricos e experimentais de cada peptídeo.....	86
Tabela 4 – Valores de absorbância a 355 nm, dos resultado das atividades de ATPase (com e sem MgCl <sup>2+</sup> ), com His 1 mM, Pirofosfatase (com e sem MgCl <sup>2+</sup> ) e PLPase (com 1 e 5 µL de enzima) de XAC1201, feito em triplicata e apresentando a média geral.....	88
Tabela 5 – Valores de absorbância a 410 nm dos resultado das atividades de PNPPase (com e sem MgCl <sup>2+</sup> ), com diferentes concentrações de substrato e de enzima, incubados ou não <i>overnight</i> , de XAC1201. É apresentada a média geral das duplicatas de cada teste realizado.....	89
Tabela 6 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes íons para testar a dimerização proteica.....	90
Tabela 7 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes detergentes.....	92
Tabela 8 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes detergentes, solubilizados em ultrassonicador.....	92
Tabela 9 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes detergentes, solubilizados em sonicador de ponteira.....	92

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura tem passado, nos últimos anos, por uma de suas crises mais severas. Influenciada pela diminuição do consumo de suco pelo mercado externo e com elevados estoques, houve acúmulo de laranjas não processadas nas indústrias, o que, juntamente com o baixo preço das caixas das frutas, levou os produtores ao abandono dos pomares, resultando em problemas fitossanitários, com muitos danos irreversíveis e erradicação completa de pomares, que chegam a comprometer a safra 2013/14 (CONAB, 2013).

Entre os problemas fitossanitários que acometem a citricultura, o cancro cítrico é uma das doenças mais temidas, pois afeta todas as variedades de importância econômica (DAS, 2003). O cancro cítrico tipo A (ou cancro asiático), causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma doença caracterizada pela formação de lesões eruptivas decorrente dos fenômenos de hipertrofia e hiperplasia das células hospedeiras em resposta à infecção. Como resultado, a epiderme é rompida e a bactéria alcança a superfície da planta podendo iniciar um novo ciclo de infecção (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

O sequenciamento do genoma de Xac, feito por Da Silva e colaboradores em 2002, teve como foco o estudo dos genes envolvidos na sua patogênese e virulência, a partir do qual foram realizados numerosos estudos com o intuito de compreender o patossistema Xac-citros em nível molecular. Um desses trabalhos foi sobre a análise funcional de genes de Xac relacionados com a patogenicidade, na qual foi produzida, por meio da inserção aleatória do transposon Tn5, uma biblioteca com cerca de 10.000 mutantes a partir da linhagem selvagem Xac 306. Entre os mutantes produzidos, alguns apresentaram alteração no padrão de virulência e/ou patogenicidade, que variaram desde a diminuição dos sintomas até a ausência completa dos mesmos. A partir desses mutantes e da análise das ORFs foi possível identificar genes relacionados com a patogenicidade, associados à infecção, além de ORFs hipotéticas (LAIA et al., 2009).

Uma dessas ORFs hipotéticas é a XAC1201 que, pela inserção do transposon em sua sequência, produziu o mutante 11C09. Quando folhas de limão cravo e

laranja doce foram inoculadas com esse mutante, apresentaram necrose e ausência dos sintomas característicos do cancro cítrico, como o encharcamento e hiperplasia, em contraste com a estirpe selvagem que induziu a doença, tornando-se, portanto, um importante objeto de estudo.

A análise dos domínios do produto proteico de XAC1201 revelou vários domínios, sendo que a maioria desses domínios ainda não foi caracterizada ou é encontrada em proteínas não caracterizadas. A busca no GenBank por homologia de sequência mostra uma proteína de *Xanthomonas axonopodis* com 99% de identidade e que foi anotada como histidina quinase. No entanto, ainda não há experimentos comprobatórios dessa atividade, enfatizando a necessidade de estudos e experimentos que demonstrem a presença da atividade quinase desta proteína e seu papel na patogenicidade de Xac em citros.

Considerando a crescente incidência do cancro cítrico, a falta de metodologia eficaz no seu controle e a inexistência de cultivares de citros resistentes à doença, a tecnologia do DNA recombinante é um caminho promissor para acelerar a elucidação e a compreensão de mecanismos de patogenicidade em nível molecular, como a identificação de efetores de virulência, sinalizadores para o início do processo de infecção, entre outros, que podem auxiliar na elaboração de drogas e de métodos de controle e intervenção do cancro cítrico. As técnicas para a clonagem do DNA prepararam o caminho dos modernos campos da genômica e proteômica, o estudo de genes e proteínas na escala de células inteiras e organismos (NELSON; COX, 2011).

Uma das formas mais produtivas de se abordar o entendimento dos fenômenos biológicos tem sido aquela de purificar os componentes químicos individuais. Como exemplo, temos as proteínas de um organismo vivo e a caracterização da sua estrutura química ou sua atividade catalítica (NELSON; COX, 2011). A expressão heteróloga de proteínas tem sido uma metodologia amplamente explorada para fins de sua caracterização, as quais não são encontradas ou produzidas em grande quantidade naturalmente (McDONALD, 2011).

O desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e a purificação de macromoléculas biológicas, como as proteínas, tem sido um importante pré-requisito para os vários avanços feitos nas áreas de biociência e de biotecnologia. O

aprimoramento dos materiais e dos equipamentos de alta eficiência tornou a separação de proteínas mais previsível e controlável, apesar de que a maioria dessas ainda é, em grande parte, uma arte, mais do que ciência (JASON; RYDÉN, 1998). Portanto, a expressão heteróloga de proteínas e métodos de purificação, como o IMAC, foram utilizados neste trabalho para expressar e purificar a proteína XAC1201 de forma pura, solúvel e em grande quantidade para avançar em estudos de caracterização funcional com o intuito de elucidar o papel dessa proteína no processo de patogenicidade de Xac em citros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos gerais da citricultura brasileira

A citricultura abrange, entre outras, o cultivo de várias espécies de laranja, limão, lima e tangerinas. Entre as laranjas estão as Laranjas doces (*Citrus sinensis* Osbek) e azedas (*Citrus aurantium* L.). Os limões e limas são classificados como: Limões verdadeiros (*Citrus limon*, Lush), Limões sicilianos (*Citrus limon*), Limas ácidas, como Limão Tahiti (*Citrus latifolia*, Tanaka) e Limão galego (*Citrus aurantifolia*, Tanaka) e Limas doces (*Citrus limettioides*, Tanaka). As tangerinas apresentam, possivelmente, a maior faixa de adaptação climática entre os citros por serem plantas com grande estabilidade a variações na temperatura. As tangerinas podem ser classificadas em: Tangerinas comuns (*Citrus reticulata* Blanco), Pokan, Tangerina Satsumas (*Citrus unchiu*, Marchovitch); Mexericas (*Citrus deliciosa*, Tenore); e híbridos envolvendo tangerinas como Tangor (tangerina x laranja doce) (DA SILVA et al., 2011).

O gênero *Citrus*, juntamente com outras plantas cítricas, como os kunquats (*Fortunella*) e o trifoliata (*Poncirus*), pertence à família Rutaceae e originário das regiões tropicais e subtropicais do continente asiático e do arquipélago malaio (ALVES; MELO, 2003; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). A dispersão das plantas cítricas por quase todos os continentes permeou a história da humanidade, desde os registros dos primeiros ancestrais destas, há mais de quatro milênios. Atualmente, as plantas cítricas são cultivadas em uma ampla faixa ao redor do mundo, compreendida entre os paralelos 44° N e 41° S (AGUSTÍ, 2000), embora as principais áreas produtoras concentrem-se em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20° N ou 20° S (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A introdução do citros no Brasil ocorreu no começo do século XVI, com o início da colonização, e, a partir de então, expandiu-se rapidamente pelo litoral brasileiro. Encontrando no país condições favoráveis para seu crescimento e reprodução, a citricultura desenvolveu-se em todo o território nacional, sendo

confundida em algumas regiões com plantas nativas, devido à ótima adaptação (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A citricultura destacou-se em vários estados, mas foi em 1920, com a criação do primeiro núcleo citrícola que abastecia as cidades do Rio de Janeiro e São Paulo, que se iniciaram as exportações para a Argentina, Inglaterra e outros países europeus (NEVES et al., 2010). Segundo as estatísticas, neste período, o Brasil era o quinto maior produtor mundial da década. No entanto, a onda de exportação foi interrompida com a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), desanimando os produtores que diminuíram os tratamentos culturais e que, por consequência, deu abertura à disseminação das doenças nos pomares. Após esse período conturbado, a citricultura paulista destacou-se com seu ressurgimento na década de 1960, sendo um divisor de águas no perfil da citricultura brasileira, mudando, desde então, o foco comercial de fruta fresca para a produção de matéria-prima voltada à indústria, consolidando São Paulo como o maior polo citrícola nacional e mundial (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A junção de uma citricultura extremamente desenvolvida com uma indústria competitiva fez com que o Brasil se tornasse o maior produtor mundial de laranjas na década de 1980. Nessa fase, com a significativa queda da produção da Flórida, os preços do suco e da fruta atingiram valores recordes e em conjunto com o custo de produção competitivo, a pesquisa de ponta, o produto de excelente qualidade e, ainda, uma logística muito eficiente de distribuição, a citricultura paulista tornou-se um negócio viável, mesmo com a recuperação dos pomares norte-americanos (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; NEVES et al., 2010). Segundo dados da FAO (2013), o Brasil e os EUA são os países com maior produção e produtividade do mundo, atrás somente da China. O Estado de São Paulo e a Flórida detém, em conjunto, 81% da produção mundial de suco (NEVES et al., 2010). Visto do cenário nacional, o Brasil tem grande destaque nesse setor, sendo responsável por metade da produção mundial de suco de laranja e exportando 98% da sua produção, o que representa cerca de 85% de participação no mercado mundial (NEVES et al., 2010).

Sabe-se que, em geral, o gênero *Citrus* possui alto potencial produtivo. O rendimento médio nacional de laranja na safra de 2011 foi de 25.499 kg/ha (IBGE,

2012). No entanto, na safra de 2012, ocorreu queda de 1,3% no rendimento médio da cultura, resultando em 23,668 kg/ha (IBGE, 2013). Segundo dados de dezembro de 2013 (IBGE, 2013), a safra total de laranja foi de 16.303.752 toneladas; um decréscimo de 14,8% na produção e de 12,3% na área colhida, e com um rendimento médio da cultura de 23.003 kg/ha, -2,8%, em relação à safra de 2012.

A citricultura tem passado por uma de suas crises mais severas desde 2011. A retração na demanda europeia e os bloqueios alfandegários dos EUA a partir de 2012, aliado à perda de favoritismo para outros sabores, levaram à diminuição do consumo de suco de laranja pelo mercado externo (Figura 1), resultando em elevados estoques, que se configuraram como importantes fatores de desestímulo à produção citrícola em 2013 e ao conseqüente acúmulo de laranjas não processadas nas indústrias. Esses fatores, juntamente com a queda de preço das caixas das frutas, levaram os produtores ao abandono dos pomares, resultando em problemas fitossanitários, com muitos danos irreversíveis e erradicação completa de pomares. Mesmo inserida em um cenário crítico, a região Sudeste continuou sendo responsável por uma participação de quase 80% do total da produção de laranja, com expressão significativa da participação do Estado de São Paulo, 72,6% na safra de 2013 (CONAB, 2013).

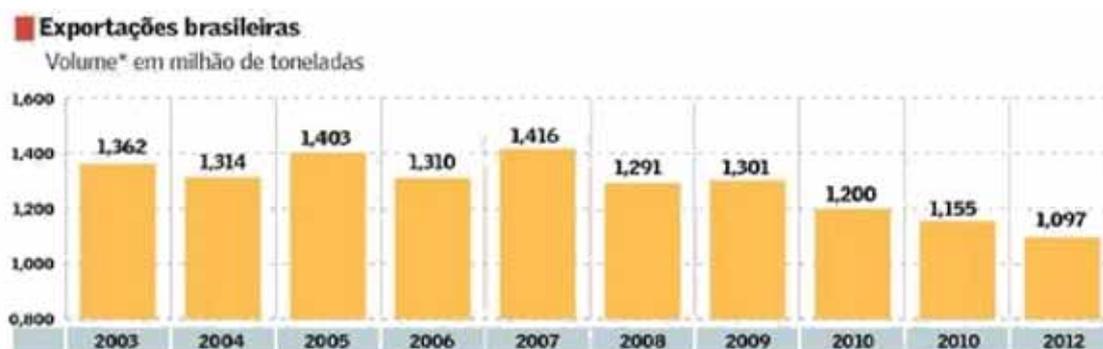


Figura 1 – Consumo mundial de suco de laranja brasileiro.

Fonte: Markestrat, CitrusBR e Valor Data, 2013.

\*: valores convertidos ao equivalente em suco de laranja concentrado e congelado.

De acordo com os levantamentos realizados pela CONAB/CATI/IEA, desde 2010 houve queda de cerca de 38% no número de citricultores paulistas, impulsionados, entre outros fatores, pela crise da citricultura ocorrida em 2012, e

pelo paulatino abandono da cultura. Na atual safra (2013/14) o mercado de citros reagiu, quando comparado à safra passada, aumentando o volume de compra e preço pago ao produtor (Figura 2), devido, principalmente, ao rendimento da fruta que estava abaixo do esperado. Contudo, a pequena reação do mercado não foi suficiente para que os produtores se reerguessem, pois problemas fitossanitários como o *greening* e cancro cítrico ocasionaram perdas agrônomicas e econômicas irreversíveis para a cultura, o que, somado ao impacto do câmbio, aumentou o custo de produção da cultura (CONAB, 2013).

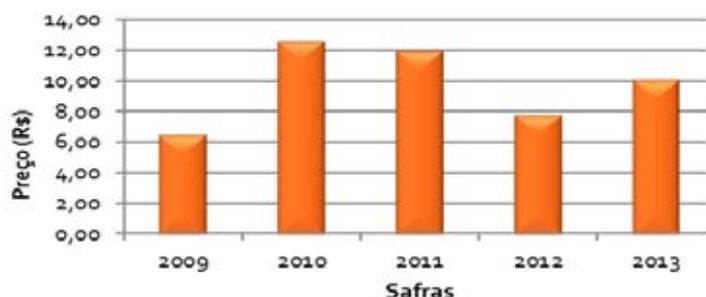


Figura 2 – Preço da caixa de laranja (40,8 kg) dos anos de 2009 a 2013.  
Fonte: IEA, 2013.

## 2.2. Compreendendo o Cancro Cítrico

Entre os problemas fitossanitários que acometem a cultura do citros, está a suscetibilidade a várias doenças e pragas, algumas com um alto potencial de destruição, podendo causar prejuízos econômicos à cultura (SOUZA, 2010) como a “tristeza” do citros, transmitida pelo pulgão-preto (*Toxoptera citricidus*) (ALVES; MELO, 2003), a pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), a verrugose (*Elsinoe* spp.), a melanose (*Diaporthe citri* Wolf.), a rubelose (*Corticium salmonicolor* Berk & BR.), a podridão floral (*Colletotrichum acutatum* Simmons) e a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), causadas por fungos (FEICHTENBERGER, 2000). Entre as principais doenças bacterianas estão a clorose variegada dos citros, CVC, (*Xylella fastidiosa*), o “greening” ou Huanglongbing (HLB) (*Candidatus Liberibacter*) e o cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subs. *citri*) (MOREIRA et al., 2004).

O cancro cítrico tipo A (ou cancro asiático), causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma doença caracterizada pela formação de lesões eruptivas decorrente dos fenômenos de hipertrofia e hiperplasia das células

hospedeiras em resposta à infecção (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). É uma das doenças de citros mais temidas, afetando todas as variedades de importância econômica (DAS, 2003). A origem geográfica do cancro cítrico ainda é controversa. Alguns autores relataram seu aparecimento no sul da China (LEE, 1918), enquanto outros (FAWCETT; JENKINS, 1933) defendem sua origem na Índia e em Java, com relatos históricos que sugerem que a doença se originou nas áreas tropicais da Ásia, como no sul da China, Indonésia e Índia, que coincidem com o local de origem e dispersão dos citros.

No Brasil, o cancro cítrico é uma doença incidente desde a década de 1950, quando foi relatado seu aparecimento na região da Alta Sorocabana, no estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Atualmente, além de São Paulo, o cancro já foi constatado em outros Estados, entre eles Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (BONINI; RODRIGUES NETO; MARINGONI, 2012).

Uma das grandes preocupações com a presença do cancro cítrico nos pomares, principalmente do polo citrícola paulista, são os impedimentos ao comércio externo decorrentes de acordos internacionais. Não só a produção de frutos para suco fica comprometida, mas também, a exportação de frutos frescos, pois para vários países como os da Comunidade Europeia, o cancro cítrico é considerado uma “praga exótica” determinando uma série de exigências para a importação (AMARAL, 2003).

Desde 1995, na 11ª Reunião do Grupo de Trabalho Permanente em Quarentena Vegetal, ocorrida em Montevideú, Uruguai, o cancro cítrico foi classificado no Brasil como “Praga Quarentenária A2” (RODRIGUES NETO; RIBEIRO, 2002). Isto ocorre quando a doença está presente no país ou região, sendo limitada a uma determinada área oficialmente controlada (AMARAL, 2003). Por ter este caráter, o cancro tornou-se uma das principais barreiras fitossanitárias ao livre comércio de frutas frescas e processadas, limitando a amplitude de comercialização, nacional e internacionalmente (BRASIL, 1999; SOUZA, 2010).

O cancro causa extensivos danos nos citros e a severidade das infecções varia conforme as diferentes espécies, variedades e, também, com as condições climáticas predominantes (DAS, 2003). Entre as variedades de citros, possuem alta

suscetibilidade à doença: toranja, lima mexicana, limão; enquanto que a laranja azeda e a laranja doce são moderadamente suscetíveis (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Inicialmente, os sintomas de cancro cítrico surgem, em geral, na face inferior das folhas, na forma de pequenos pontos salientes de coloração marrom claro e à medida que a doença avança, estas lesões tornam-se maiores e mais escuras. Em estágio bem avançado, as lesões podem apresentar, além do halo de coloração escura, rachaduras no centro, resultado da morte do tecido foliar. Lesões tipo encharcamento (*water soaking*), frequentemente aparecem circundadas por um halo clorótico (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; MOREIRA et al., 2004; DOCENA, 2006; FUNDECITRUS, 20--). Os sintomas podem aparecer em folhas, frutos e, mais raramente, em ramos, e como para a maioria das fitobacterioses, não existe meio eficaz de controlar o cancro cítrico (LAIA et al., 2009). A Figura 3 destaca os sintomas característicos do cancro cítrico, que são lesões de cancro rodeados por halos cloróticos nos frutos, folhas e ramos.



Figura 3 – (A) Foto apresentando os sintomas de cancro em folhas e na laranja. (B) Foto apresentando os sintomas de cancro e erupções em ramo de laranjeira. (C) Foto apresentando em destaque sintoma de cancro em laranja.

Fonte: FUNDECITRUS, 20-- . <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>

Infecções severas podem causar a desfolha, a deformação e a queda prematura de frutos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). O prejuízo econômico causado pelo cancro é variável, podendo ser devido à queda de frutos prematura pela abscisão e/ou pela não comercialização devido às lesões. Contudo, as doenças nos frutos são os danos de maior importância econômica nas regiões onde há o manejo da doença, uma vez que os frutos com lesões cancrasas não são aceitos no mercado de frutas frescas, além de sofrerem redução nos preços do mercado (DAS,

2003). Nas regiões onde não é feito o controle da doença, os maiores prejuízos são devidos à queda prematura dos frutos.

A disseminação do cancro cítrico é feita de forma direta, ou seja, a bactéria causadora do cancro não depende de vetor, como é o caso do 'greening' ou Huanglongbing (HLB), cuja transmissão da bactéria é feita pelo psilídio. Desse modo, a bactéria pode chegar a um pomar por meio da chuva, do material de colheita, do trânsito de veículos e máquinas agrícolas, de mudas contaminadas e, pelo próprio colhedor (FUNDECITRUS, 20--).

O primeiro passo para a *Xac* chegar à planta é a disseminação, entretanto, somente na presença de aberturas naturais ou artificiais que esta se alojará e se multiplicará no mesofilo do hospedeiro, como resultado, a epiderme é rompida e a bactéria alcança a superfície da planta podendo iniciar um novo ciclo de infecção (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). As formas mais comuns de penetração são por aberturas naturais, como os estômatos (Figura 4); por ferimentos mecânicos, causados por equipamentos, atrito entre partes da própria planta, abrasão de partículas de poeira, etc; e ainda por ferimentos causados por insetos como, por exemplo, a larva minadora dos citros (FUNDECITRUS, 20--).

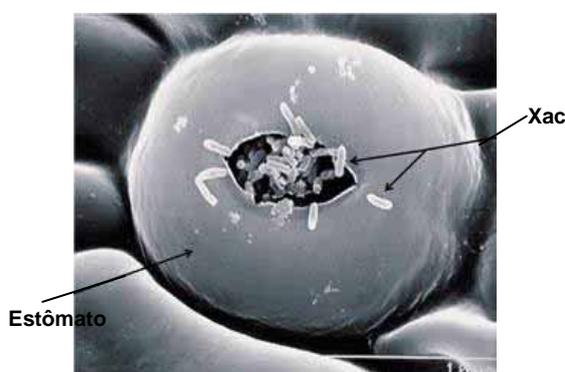


Figura 4 - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* saindo de um estômato de uma folha, 5 dias após infecção. Fonte: GRAHAM et al., 2004.

A larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) foi introduzida no Brasil em 1996 e está associada ao aumento da incidência do cancro cítrico. *P. citrella* forma galerias abaixo da epiderme de folhas, ramos e frutos, quando está se alimentando, e na presença de *Xac*, estas galerias se

tornam entradas para o patógeno na planta (DOCENA, 2006). Além de facilitar a entrada do patógeno, a larva minadora deixa lesões nos citros mais suscetíveis a infecções do que aquelas causadas pelo vento e espinhos (BERGAMIN-FILHO, HUGHES, 2000). A água e temperaturas entre 20°C e 30°C são, contudo, fatores fundamentais para a penetração do patógeno na planta, dessa

forma, a doença é severa em regiões ou áreas caracterizadas pela umidade e calor (DAS, 2003).

O método mais seguro de erradicar a doença dos pomares é por meio da eliminação das plantas contaminadas, um processo que traz significativas perdas econômicas. Até o ano de 2009, no estado de São Paulo, o maior produtor de citros do país, a legislação em vigor quanto ao controle do cancro cítrico assegurava a eliminação de todas as plantas ao redor do foco da infecção num raio de 30m e, quando as plantas contaminadas excedessem 0,5% do total, todo o talhão deveria ser eliminado, sendo proibido o cultivo de citros no local pelos dois anos seguintes (LAIA et al., 2009). Porém, desde junho de 2009, foram alterados os critérios relacionados à erradicação da doença, com o abrandamento da metodologia acima citada, o que desobrigou os produtores a erradicarem as plantas contaminadas e o talhão quando a infecção excedesse 0,5% do total (BELASQUE JR. et al., 2010). As consequências dessa mudança têm sido o atual aumento da incidência da doença nos talhões do parque citrícola paulista que, segundo dados do FUNDECITRUS, foi de 39% de 2011 para 2012.

Para evitar a presença e a multiplicação do patógeno nos pomares, a melhor forma de controle é prevenindo, através de inspeções minuciosas em propriedades, ou locais próximos, onde a doença tenha sido diagnosticada; adquirindo mudas saudáveis, livre de patógenos; desinfestando o material de colheita; plantando quebra-ventos, árvores de grande porte nas fronteiras da propriedade para evitar a ação do vento e da poeira sobre o pomar; controlando as larvas minadoras, que provocam ferimentos para entrada do patógeno; e utilizando bactericidas cúpricos. As aplicações de bactericidas à base de cobre podem ser um fator de reforço somente em áreas ou partes da fazenda que tenham apresentado casos recentes da doença e sempre associado à inspeção de plantas e eliminação dos focos encontrados. O uso exclusivo de bactericidas cúpricos não impedirá a infecção de novas plantas e talhões e, conseqüentemente, o crescimento da doença, mas são componentes essenciais do manejo integrado do cancro cítrico em áreas com ocorrência endêmica da doença (FUNDECITRUS, 20--).

### 2.3. *Xanthomonas* e os tipos de cancos cítricos

Xac pertence ao grande gênero de bactérias Gram-negativas, *Xanthomonas* (do grego *xanthos*, isto é, amarelo, e *monas*, entidade), da família *Pseudomonadaceae*, da classe Gama Proteobacteria, constituído por 27 espécies que, em conjunto, causam doenças graves em aproximadamente 400 hospedeiros vegetais, distribuídos em 68 famílias e em mais de 240 gêneros, incluindo uma ampla variedade de plantas de importância econômica além dos citros, como arroz, banana, tomate, pimenta, feijão e repolho. Sem dúvidas, entre as bactérias fitopatogênicas é o gênero que possui maior gama de hospedeiros e maior especificidade de ataque das espécies, ou seja, apesar da grande variedade de hospedeiros, cada espécie em particular é limitada a um grupo de gêneros ou a um grupo de espécies dentro de um gênero, fazendo de *Xanthomonas* um gênero ideal para os estudos de interação planta-patógeno (HAYWARD, 1993; BRUNINGS; GABRIEL, 2003; RYAN et al., 2011).

As espécies de *Xanthomonas* têm, em geral, a forma de bastonete e em média de 0,4 a 0,7  $\mu\text{m}$  de largura e 0,7 a 1,8  $\mu\text{m}$  de comprimento, com um único flagelo polar (monotríquia). São bactérias aeróbias obrigatórias, quimiorganotróficas, isto é, utilizam fontes de carbono de diversos carboidratos para a obtenção de energia. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 25°C e 30°C, ocorrem predominantemente isoladas e, em geral, apresentam colônias lisas, viscosas e amarelas devido à presença de um pigmento insolúvel ligado à membrana, chamado xanthomonadina, que forma a goma xantana (Figura 5) (BRADBURY, 1984; FARIA, 2005; BÜTTNER; BONAS, 2010).

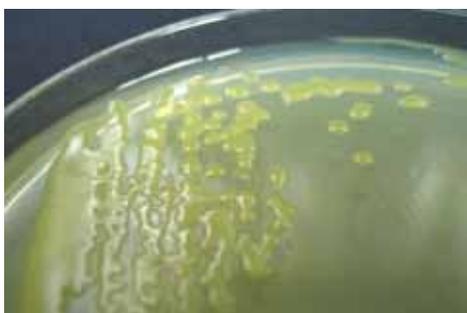


Figura 5 – Colônias isoladas de Xac em meio NA.

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular (EPS), um biopolímero classificado como hetero-exopolissacarídeo ramificado, aniônico, produzido por fermentação. Dentre as gomas microbianas, esta se destaca por apresentar propriedades distintas e incomuns que permite sua aplicação em diversas áreas e produtos das indústrias química, alimentícia,

petrolífera, farmacêutica, cosmética, de tintas, têxtil e agrícola participando da produção de espessantes, estabilizantes, gelificantes, agentes de suspensão e de floculação, entre outros (MULCHANDANI; LUONG; LEDUY, 1988; ASHTAPUTRE; SHAH, 1995; FARIA, 2005; DINIZ; DRUZIAN; AUDIBERT, 2012). Ademais, a goma xantana desempenha um importante papel na sobrevivência de *Xanthomonas*, protegendo a célula contra a luz UV, congelamento e dessecação (MEYER; BOGDANOVE, 2009) e, também, participa da formação dos sintomas, uma vez que com a multiplicação da bactéria no mesofilo, a goma xantana ocupa os espaços intercelulares, aprisionando a água do xilema devido ao potencial higroscópico da goma, dando o aspecto de encharcamento ao tecido infectado (PADMANABHAM; VIDHYASEKARAN; RAJAGOPALAN, 1974).

São conhecidas duas formas de colonização de *Xanthomonas* spp. Existem espécies que colonizam o espaço intercelular do hospedeiro de forma pontual, como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (em citros), *X. campestris* subsp. *vesicatoria* (em pimenta e tomate) e *X. oryzae* subsp. *oryzicola* (no arroz), enquanto outras se espalham sistemicamente através dos vasos de xilema, *Xanthomonas oryzae* subsp. *oryzae* (no arroz), *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (em crucíferas) (BÜTTNER; BONAS, 2010) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* na mandioca (VERDIER et al., 2004). Após a colonização no hospedeiro, a bactéria ativa a expressão de genes envolvidos com motilidade e ancoramento e, seguindo-se um período de crescimento endofítico, utiliza o sistema de secreção de proteínas tipo III (T3S) para transferir efetores de virulência para o interior da célula hospedeira (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Uma vez dentro da célula hospedeira, as proteínas efetoras, ou Avr (avirulência), como são conhecidas, modulam as atividades celulares provavelmente alterando a expressão de genes da planta e/ou suprimindo as respostas de defesa.

É relatada a existência de três diferentes formas de cancro, causadas por vários patovares e variantes de *Xanthomonas* e, pela sintomatologia entre eles ser bem próxima, a diferenciação é feita com base na gama de hospedeiro e em características fenotípicas e genotípicas. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (anteriormente classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, cuja abreviação, Xac, será usada para menção da bactéria ao longo do trabalho) é o

agente causal do cancro cítrico tipo A (ou cancro asiático), que causa o cancro mais comum, abrangente e com sintomas mais severos. O cancro asiático é endêmico na Índia, Paquistão, nas ilhas do Oceano Índico, no Sudoeste asiático, na China e Japão, além de estar presente nas Américas, Oceania e África (DAS, 2003; GRAHAM et al., 2004).

Já o cancro tipo B, cancrose B, ou cancro sul-americano é causado pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* tipo B e tem os limões na Argentina, Paraguai e Uruguai como hospedeiros, sendo uma doença de grande preocupação nesses países. Também possuem susceptibilidade a laranja azeda, o limão galego e o pomelo. A cancrose B apresenta os sintomas típicos do cancro, porém, atenuados, e o crescimento desta bactéria em meio de cultura é bem mais lento do que o de Xac. Por fim, no Brasil, a cancrose tipo C, também causada pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* tipo C, foi isolada do limão galego no ano de 1970, em São Paulo, e o tem como seu único hospedeiro. Sua sintomatologia é a mesma apresentada pela cancrose B (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DAS, 2003; GRAHAM et al., 2004).

Nas duas últimas décadas, identificaram-se duas variantes de Xac denominadas de A\* (VERNIÈRE et al., 1998) e A<sup>w</sup> (SUN et al., 2004), ambas possuem limitada gama de hospedeiros, sendo que A\* é patogênico somente para o limão galego, enquanto que A<sup>w</sup> ataca o limão galego e *Citrus macrophylla*. Primeiramente, A\* foi identificado no sudeste asiático, entre 1986 e 1988, na Arábia Saudita, Omã, Irã e Índia (VERNIÈRE et al., 1998), mais tarde, foi relatada a presença dessa variante na Tailândia (NGOC et al., 2007), Camboja (NGOC et al., 2008) e no continente africano (DERSO; VERNIÈRE; PRUVOST, 2009). Em contrapartida, A<sup>w</sup> teve sua presença relatada somente no estado da Flórida, EUA (GRAHAM et al., 2004, JACIANI, 2012).

#### **2.4. Avanços em estudos sobre Xac a partir do sequenciamento do seu genoma**

Uma afirmação que introduziu a bacteriologia na Era Genômica, foi a do pesquisador Robert D. Fleischman e colaboradores (1995) que defendiam que o pré-requisito para compreender a biologia completa de um organismo é a determinação da sequência do seu genoma inteiro. Fleischman e colaboradores realizaram o primeiro sequenciamento bacteriano do patógeno humano *Haemophilus influenzae* Rd, por meio do método tradicional de sequenciamento de Sanger. Dez anos mais tarde, o advento da tecnologia de alto rendimento (“*Next Generation*”) permitiu maior facilidade e efetividade, menor custo, alta precisão e resolução de mapeamento, maior comparação dos mapas genômicos e genéticos entre populações e organismos, além da diminuição de tempo, que passou para horas uma tarefa que, antes, era realizada em meses e anos (METZKER, 2005; HUANG et al., 2009; LOMAN et al., 2012).

Nesse sentido, nas últimas décadas, vários projetos de sequenciamento e, mais recentemente, de ressequenciamento de microrganismos patogênicos e de suas estirpes têm sido desenvolvidos partindo do pressuposto que esta é a base para a compreensão dos mecanismos moleculares e dos processos biológicos que auxiliam, por exemplo, na determinação da virulência e da amplitude de hospedeiros de cada espécie ou estirpe. Temos, por exemplo, os genomas das seguintes bactérias fitopatogênicas que foram sequenciados e com isso permitiram uma gama de estudos, como *Agrobacterium tumefaciens* (WOOD et al., 2001), *Pseudomonas syringae* (BUELL et al., 2003), *Ralstonia solanacearum* (SALANOUBAT et al., 2002), *Xylella fastidiosa* (SIMPSON, et al., 2000), *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* (SILVA, et al., 2002).

O sequenciamento genômico completo da Xac (isolado 306) foi descrito em 2002 por pesquisadores brasileiros da rede Onsa (“Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis”), um instituto virtual de genômica criado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O sequenciamento mostrou a presença de um cromossomo circular de 5.175.554 pb e dois plasmídeos, um menor, pXAC33, com 33.699 pb, e outro maior, pXAC64, com 64.920 pb. Relatou-se que, aproximadamente, 40% dos genes de Xac possuem similaridade com genes ortólogos de outros organismos fitopatogênicos, sugerindo o envolvimento destes com a interação planta-patógeno. Das 4.428 proteínas

codificadas, 62,6% foram associadas com proteínas de função conhecida, enquanto 37,4% remetem a proteínas hipotéticas, ou seja, sem função conhecida no momento do estudo (SILVA, et al., 2002).

O sequenciamento de um genoma é o primeiro passo que possibilita a identificação da função dos genes de um organismo por meio da comparação com sequências de outros depositados em bancos de dados. Essa comparação também é ampliada para o nível das respectivas sequências proteicas, para as quais são determinadas possíveis funções celulares e, na ausência de similaridade, são consideradas proteínas hipotéticas ou sem função conhecida (DOCENA, 2006; BORTOLOSSI, 2007). Considerando que quase 40% dos genes de Xac corresponderam a proteínas hipotéticas, muitas destas podem não ser proteínas funcionais e, também, suas sequências podem não codificar nenhuma proteína, visto que proteínas exclusivas ou com alto grau de divergência evolucionária, sem similaridade com proteínas em bancos de dados, podem, na verdade, não existir (JIA et al., 2010), constituindo-se em artefatos gerados pelos programas de buscas de fases de leituras abertas (ORFs) na sequência de bases do genoma. Em contrapartida, grande parte das proteínas hipotéticas codificam proteínas com alguma função e, possivelmente, relacionadas com os processos de patogenicidade e virulência de Xac, podendo ter um importante papel na ação de mecanismos desconhecidos de virulência e sobrevivência da bactéria no hospedeiro, como, por exemplo, na sinalização de efetores de virulência e participando da inativação de vias de defesa do hospedeiro.

#### **2.4.1. Obtenção do mutante 11C09 e o interesse na proteína XAC1201**

A fim de compreender a interação planta-patógeno de citros-Xac, nosso laboratório realizou um trabalho sobre a análise de mutantes e da expressão gênica global por meio de microarranjos de DNA (LAIA, 2007). Inicialmente, obteve-se uma biblioteca com cerca de 10.000 mutantes introduzindo o transposon *Tn5* por mutagênese aleatória na linhagem selvagem de Xac 306. Para verificar se a

interrupção do gene pelo transposon afetou a virulência de Xac em citros, 3.330 desses mutantes foram submetidos ao teste de patogenicidade *in planta*, sendo inoculados em folhas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e observada a presença de sintomas três dias após a inoculação. Esse procedimento foi repetido quatro vezes e selecionados 56 mutantes. A partir desses mutantes e da análise das ORFs foi possível reconhecer genes relacionados com a patogenicidade em fitobactérias, genes associados à infecção, além de ORFs hipotéticas, as quais ainda não possuíam função determinada.

Uma dessas proteínas hipotéticas foi selecionada para estudos de caracterização bioquímica e funcional. A ORF XAC1201, quando interrompida com o transposon *Tn5*, produziu dois mutantes: 11C09 e 11D03, que apresentaram padrão alterado de virulência e/ou patogenicidade, com necrose e ausência de hiperplasia e encharcamento (Figura 6), no entanto, somente o mutante 11C09 foi estudado neste trabalho, visto já terem sido realizados estudos com o mutante 11D03 (BORTOLOSSI, 2007).

Caracterização Fenotípica	Xac ID (Psort/SinalP) Produto (nome do gene) Mutantes Estrutura do domínio	Fenótipo			
		ENCH	HIPER	NEC	HR-1
	<p>XAC1201 (MI/NS) Proteína hipotética conservada 11C09/11D03</p> 	ND	ND	+	-

Figura 6 – Dados relativos à ORF XAC1201. Foto representativa da caracterização fenotípica do mutante 11D03. Identificação (ID) de Xac quanto ao Psort e ao SinalP: MI (membrana interna) e NS (não secretória). Estrutura dos principais domínios da ORF XAC1201: domínio HDOD e domínio HD. Fenótipo: ENCH: encharcamento; HIPER: hiperplasia; NEC: necrose; HR-1: resposta de hipersensibilidade tipo 1. ND: não definido; '+': indução; '-': repressão. Modificado de LAIA, et al., 2009.

A ORF XAC1201 está localizada na fita senso do genoma da Xac, entre as seqüências 1.370.682 e 1.371.500. Possui 819 pares de bases e seu produto é uma proteína hipotética conservada de 270 aminoácidos. A proteína XAC1201 apresenta alguns domínios principais (Figura 7) de acordo com o *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI), entre eles o HD, o HDc, o HDIG e o HDOD.

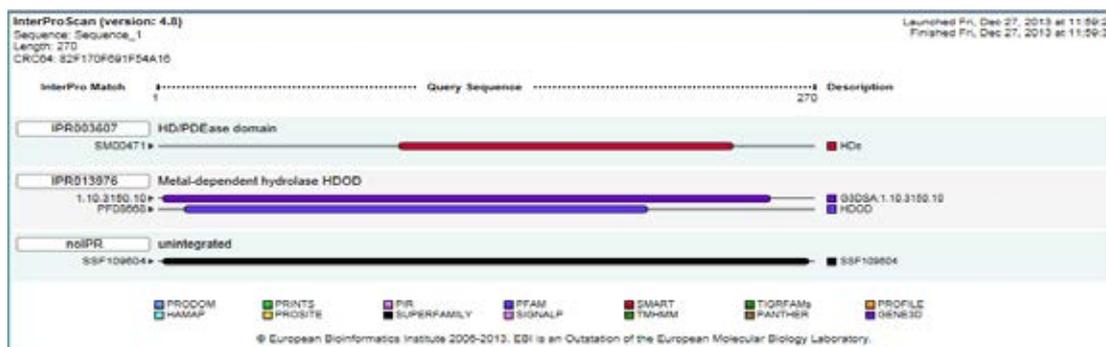


Figura 7 – Resultado do InterProScan apresentando a posição dos principais domínios dentro da sequência proteica de XAC1201.

O domínio HD define uma superfamília de fosfohidrolases dependente de metal (ARAVIND; KOONIN, 1998; YAKUNIN et al., 2004) e inclui uma variedade de proteínas e domínios não caracterizados associados com nucleotidiltransferases e helicases de bactérias e eucariotos. Essa superfamília enzimática é relacionada com um grupo bem caracterizado de metaloenzimas, a 3',5'-fosfodiesterase cíclica eucariótica, no entanto, esta se difere da superfamília HD e contém várias regiões conservadas (FRANCIS et al., 1994; ARAVIND; KOONIN, 1998).

Considerando que todos os resíduos altamente conservados na superfamília HD são histidinas ou aspartatos, e levando em consideração dados experimentais, existe uma grande inferência que a coordenação de cátions divalentes dependentes de fosfohidrolases seja essencial para a atividade dessas proteínas, e que seus substratos são, provavelmente, uma ampla variedade de moléculas que contém ligações fosfoéster (ARAVIND; KOONIN, 1998). A fusão do domínio HD com nucleotidiltransferases, helicases e domínios KH de ligação a RNA, indicam que uma das principais funções deste domínio é relacionada ao metabolismo de ácidos nucleicos (ARAVIND; KOONIN, 1998; YAKUNIN et al., 2004). Outra importante função para este domínio é relacionada com a transdução de sinal (GALPERIN et al., 1999), pois estão presentes nas proteínas da família SpoT/RelA, conservadas em todas bactérias e encontradas, também, em eucariotos (ARAVIND; KOONIN, 1998).

O domínio HD é, também, fusionado com um domínio receptor do sistema de dois componentes em uma proteína não caracterizada de *Synechocystis* sp. (cianobactéria) (VOLZ; MATSUMURA, 1991; PAO; SAIER JR., 1995; ARAVIND; KOONIN, 1998), encontrada também em *Thermotoga maritima* (TAM; SAIER JR.,

1993). Além disso, duas proteínas de *T. maritima* ligadas ao domínio HD com domínios de ligantes extracitoplasmáticos, são proximamente relacionadas às proteínas de ligação soluto periplasmático, que são componentes do sistema de transporte ATP dependente (TAM; SAIER JR., 1993; GALPERIN et al., 1999).

Outro domínio da proteína XAC1201 é o HDc, também um domínio fosfohidrolase dependente de metal, inclui nucleotídeos eucarióticos cíclicos fosfodiesterases (PDEc) e possui o domínio HD conservado. O domínio HDIG ainda não foi caracterizado e é encontrado em alguns nucleotidiltransferases conhecidos, e em grande número de proteínas não caracterizadas, contendo quatro resíduos de histidina separados amplamente. E o domínio HDOD, classificado como um modelo que pode abranger mais do que um domínio e não está relacionado com nenhuma superfamília de domínios (NCBI, 2014).

Busca no GenBank por homologia de sequência mostra uma proteína de *Xanthomonas axonopodis* com 99% de identidade e que foi anotada como histidina quinase. No entanto, ainda não há experimentos comprobatórios dessa atividade, enfatizando a necessidade de estudos e experimentos que demonstrem a presença da atividade quinase desta proteína e seu papel na patogenicidade de Xac em citros.

#### **2.4.2. O Sistema de Dois Componentes**

As vias de transdução de sinais são usadas para controlar processos celulares críticos em todos os domínios da vida. Essas vias são centrais para vários processos como metabolismo, diferenciação celular, migração celular, controle do ciclo celular, entre outros (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; ASHENBERG, 2012). Em bactérias, as vias de sinalização incluem inúmeros componentes que monitoram parâmetros ambientais e intracelulares e, por consequência, respondem especificamente às mudanças desses parâmetros (DOCENA, 2006). Apesar da grande diversidade de estímulos e respostas, apenas um pequeno número de estratégias moleculares são utilizadas

para sinalização. A fosforilação de proteínas quinases e fosfatases são algumas dessas estratégias fundamentais (WEST; STOCK, 2001).

Várias cascatas de sinalização em eucariotos envolvem as proteínas quinases que tanto podem se autofosforilar como fosforilar outros substratos proteicos com resíduos específicos como Ser, Thr, Tyr (WEST; STOCK, 2001; ENDICOTT; NOBLE; JOHNSON, 2012). Por outro lado, em procariotos, o Sistema de Transdução de Dois Componentes (“Two-component signal transduction” – TCST) predomina para este mesmo fim, sendo suas proteínas abundantes na maioria de Bacteria, no qual constitui aproximadamente 1% das proteínas codificadas, e estando presentes nas bactérias patogênicas tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. O TCST regula a função básica dos genes constitutivos, além de uma ampla variedade de processos, incluindo quimiotaxia, controle do ciclo celular, esporulação, virulência, controle da expressão de toxinas e outras proteínas de importância patogênica (PARKINSON; KOFOID, 1992; HOCH; SILHAVY, 1995; WEST; STOCK, 2001).

O Sistema de Transdução de Dois Componentes é um mecanismo para percepção e resposta a estímulos ambientais, composto por um sensor de histidina quinase (HK) e um regulador de resposta (RR) (Figura 8) (ASHENBERG, 2012; PODGORNIAIA; LAUB, 2013).

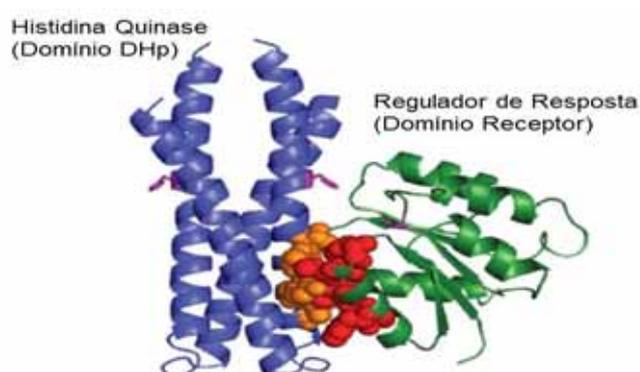


Figura 8 – Estrutura em cristal da HK853 de *Termatoga maritima* em complexo com RR468 (PDB:3DGE) apresentando os resíduos de aminoácidos importantes para a especificidade da fosfotransferência. Esses resíduos no Regulador de Resposta e na Histidina Quinase são apresentados como esferas sólidas em vermelho e laranja, respectivamente. (PODGORNIAIA; LAUB, 2013).

Em resposta a um determinado estímulo, a quinase que recebe um sinal de entrada sofre autofosforilação em um resíduo de histidina conservado, utilizando trifosfato de adenosina (ATP) como doador do grupo fosfato e, depois, especificamente, transfere o grupo fosforil para um resíduo de aspartato conservado no regulador de resposta, que induz a resposta celular apropriada pela modulação da expressão gênica (Figura 9) (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; ASHENBERG, 2012).

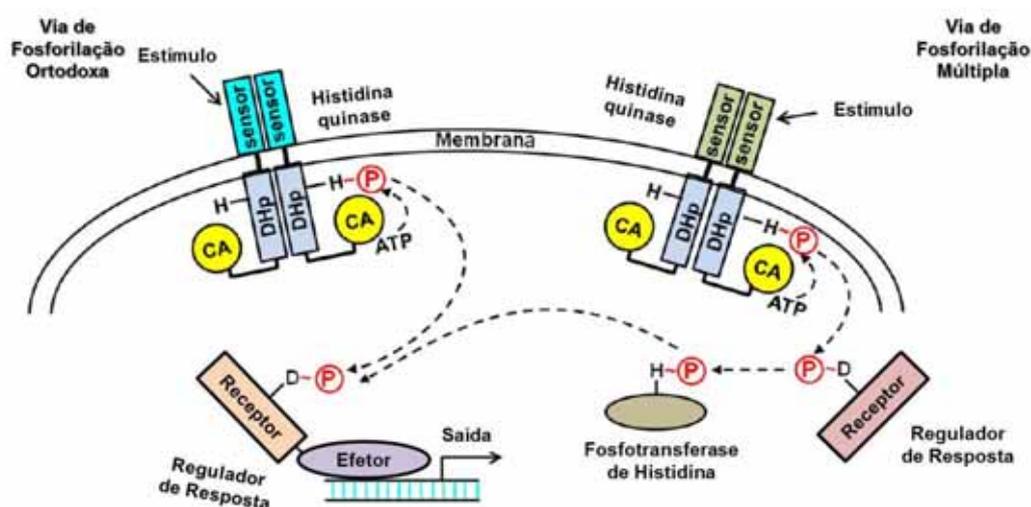


Figura 9 – Via do Sistema de Transdução de Dois Componentes. Sinalização em uma via ortodoxa de fosfotransferência (esquerda) e uma via de fosforilação múltipla (*phosphorelay pathway*) (direita). Em uma via ortodoxa, o domínio sensorial extracitoplasmático da histidina quinase recebe um estímulo de entrada que resulta na autofosforilação da histidina na região de transmissão citoplasmática. A região de transmissão consiste no domínio DHP, que medeia a dimerização, e no domínio CA, que liga o ATP e catalisa a fosforilação da histidina. O grupo fosforil na histidina é transferido para um aspartato no domínio receptor do regulador de resposta. Essa fosforilação altera a atividade do domínio efetor do regulador de resposta levando a mudanças na expressão gênica. Já a via de fosforilação múltipla tem dois passos adicionais de fosfotransferência em relação à via ortodoxa. O grupo fosforil da histidina quinase é transferido para o regulador de resposta, e depois para um fosfotransferase de histidina, antes de alcançar o regulador de resposta final (Modificado de ASHENBERG, 2012).

As histidinas quinases são, em geral, receptores transmembrânicos, mas algumas são proteínas citoplasmáticas solúveis. Em ambas as formas, as HKs são modulares, com regiões transmissoras catalíticas altamente conservadas e ligadas a

vários domínios sensores. Compreender plenamente as mudanças inter e intra-estruturais das formas ativa e inativa dessas proteínas é dificultada, devido a sua localização transmembrânica (ASHENBERG, 2012). Semelhantemente, entender o reconhecimento do substrato da quinase é complexo, pois existem poucas estruturas de quinases interagindo com seus substratos, além de que essas interações são, em geral, fracas e transientes e, frequentemente, envolvem um pequeno número de resíduos de uma região menos ordenada do substrato (ENDICOTT; NOBLE; JOHNSON, 2012).

A maioria das HKs são proteínas homodiméricas e possuem uma região transmissora citoplasmática que liga o receptor de HK ao domínio sensor por meio de uma transmembrana  $\alpha$ -hélice. A região transmissora é constituída por dois domínios, sendo um domínio sensor periplasmático amino-terminal (N-terminal), denominado domínio de dimerização e fosfotransferência de histidina (*histidine phosphotransfer domain* – DHp) de tamanho variado, que pode ocorrer na forma citossólica solúvel em muitas HKs. O outro domínio é um quinase citoplasmático carboxi-terminal (C-terminal), designado de “core” catalítico ou “catalítico e ATP-ligante” (CA) de aproximadamente 250 resíduos (Figura 10) (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; WEST; STOCK, 2001; ASHENBERG, 2012).

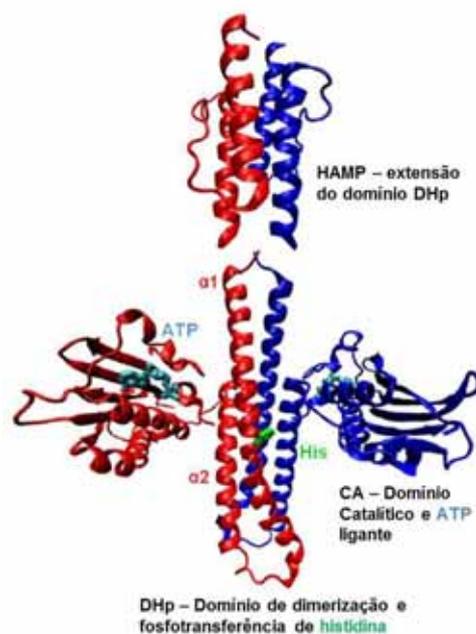


Figura 10 – Região de transmissão do homodímero HK853 de *T. maritima* (PDB ID 2C2A). O domínio DHP é um homodímero e forma um arranjo de quatro hélices, com a região conservada de fosforilação da histidina (verde) voltada para a primeira hélice,  $\alpha 1$ , e o domínio CA forma uma cavidade de ATP ligante ocupada por um ATP (ASHENBERG, 2012).

O core catalítico é mais conservado entre as HKs e pode ser identificado por um conjunto de motivos: o H-box, com um resíduo conservado de His, o qual é fosforilado, e os “boxes” N, G1, F e G2, que são blocos adicionais de aminoácidos conservados que definem o domínio de ligação ao ATP (WEST; STOCK, 2001; DOCENA, 2006).

A atividade global das HKs é modulada pelos sinais de entrada no domínio sensor. As HKs sofrem uma autofosforilação ATP dependente em um resíduo de His conservado no núcleo da quinase. A autofosforilação é uma reação bimolecular entre os homodímeros, em que um monômero da HK catalisa a fosforilação do resíduo de His conservado do outro monômero. Diferentemente dos outros tipos de cascata quinase, em que uma proteína quinase fosforila alvos múltiplos, no TCST, o RR, estequiometricamente, transfere o grupo fosforil do complexo fosfo-HK para um resíduo conservado de Asp no domínio regulador. No entanto, algumas HKs podem apresentar atividade fosfatase em direção aos seus respectivos RRs, como um meio adicional de regular os níveis de RRs fosforilados na célula. Essas HKs bifuncionais

estão geralmente presentes em vias de fosfotransferência que precisam ser desligadas rapidamente (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000).

Devido à natureza modular das HKs, sua arquitetura estrutural permite que elas sejam adaptadas às necessidades específicas do sistema de sinalização. E apesar da diversidade, as HKs podem ser classificadas grosseiramente em ortodoxas e híbridas (PARKINSON; KOFOID, 1992; ALEX; SIMON, 1994). A proteína EnvZ de *E. coli* é representativa da maioria das HKs, pois funciona como um receptor periplasmático, além de possuir duas regiões transmembrânicas que separam as proteínas em um domínio sensorial N-terminal e uma região catalítica citoplasmática C-terminal. Entretanto, existem outras HKs ortodoxas que contêm múltiplos segmentos transmembrânicos, como a FixL de *Rhizobium meliloti* (LOIS; DITTA; HELINSKI, 1993) e a UhpB de *E. coli* (ISLAND; WEI; KADNER, 1992); e outras que não são ligadas à membrana, como as quinases quimiotáticas CheA (STOCK et al., 1988). HKs solúveis podem ser reguladas intracelularmente e/ou por interações com o domínio citoplasmático de outras proteínas (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000).

Em contrapartida, as histidinas quinases híbridas contêm múltiplas regiões fosfodadoras e fosforeceptoras. Ao invés de promover uma fosfotransferência única, as quinases híbridas utilizam um sistema expandido com vias de fosforilação múltipla (*phosphorelays pathways*). A complexidade global da estrutura dessas quinases permite que diferentes entradas e saídas sejam integradas na via de sinalização (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000). Estima-se que aproximadamente 20% de todas as HKs sejam codificadas como quinases híbridas contendo RR e domínios HPT adicionais (GREBE; STOCK, 1999; WEST; STOCK, 2001).

A química de transferência do grupo fosforil do TCST, envolve três reações de fosfotransferência e duas fosfoproteínas intermediárias. Após a autofosforilação (citada anteriormente), ocorre a reação de transfosforilação dependente de ATP, através do domínio de ligação ao ATP. O resultado é a formação de fosfohistidina cujo grupo fosfato é transferido a um resíduo conservado de aspartato do domínio RR. Por último, a desfosforilação do fosfoaspartato ocorre através de uma reação de hidrólise. Todas as reações requerem a presença de íons metálicos divalentes,

preferencialmente  $Mg^{2+}$ , de acordo com o seguinte esquema (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; DOCENA, 2006):

1. Autofosforilação:  $HK-His + ATP \rightleftharpoons HK-His\sim P + ADP$
2. Fosfotransferência:  $HK-His\sim P + RR-Asp \rightleftharpoons HK-His + RR-Asp\sim P$
3. Desfosforilação:  $RR-Asp\sim P + H_2O \rightleftharpoons RR-Asp + P_i$

Concernente ao domínio de transmissão, as HKs podem ser classificadas em duas classes (BILWES et al., 1999). Na Classe I, o domínio de dimerização (DHp) é conectado através de um ligante mais ou menos flexível com o domínio CA. Já na Classe II, as HKs possuem, ao invés do DHp, um domínio de fosfotransferência de histidina (*histidine phosphotransfer domain* – HPt) que é separado do domínio CA por uma região de entrada e por um domínio de dimerização (Dim). Ademais, os domínios de regulação que modulam os sinais são geralmente da Classe II, enquanto a maioria das HKs conhecidas pertence à Classe I (Figura 11) (DUTTA; QIN; INOUE, 1999; JUNG et al., 2012).

Existem, ainda, algumas HKs híbridas, que possuem, além do domínio de ligação ao fosfato, o domínio HPt ligado à região C-terminal. Nessas HKs, o domínio de transmissão é fusionado a um domínio receptor e o grupo fosforil é transferido da histidina para o aspartato dentro do polipeptídeo. Posteriormente, o grupo fosforil vai para a histidina do domínio HPt, que pode tanto estar localizada dentro da HK híbrida ou formar uma proteína separada. O domínio HPt transfere o grupo fosforil ao domínio receptor (Asp) do RR. O complexo de fosforilação suporta múltiplos pontos de regulação e pode facilitar um melhor ajuste do que os protótipos do TCST (Figura 11) (MIZUNO, 1998; JUNG et al., 2012).

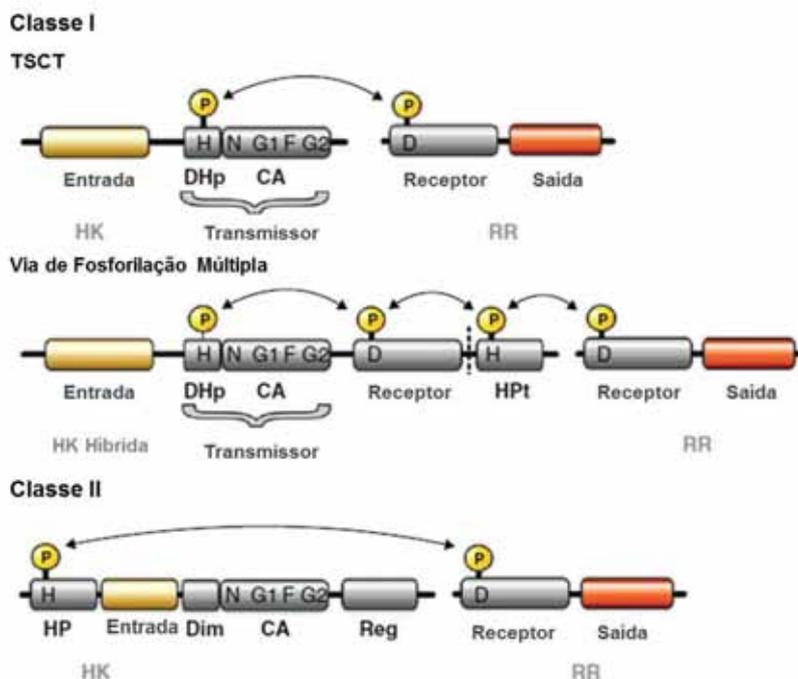


Figura 11 – Organização e sinalização dos domínios no TSCT. Na Classe I das histidinas quinases, o domínio de dimerização e fosforotransferência de histidina (DHp) é conectado com o domínio catalítico e ATP ligante (CA) através de um ligante. Na Classe II, o H box contendo o domínio de fosforotransferência de histidina (HPt) é separado do domínio CA por uma região de entrada e um domínio extra de dimerização (Dim). Tipicamente, o TCST é caracterizado por uma única transferência do grupo fosforil ( $H \rightarrow D$ ), enquanto que a via de fosforilação múltipla permite a reação de múltiplas fosforotransferências ( $H \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow D$ ). Os sítios de fosforilação estão representados por: H (Histidina), D (Aspartato) (JUNG et al., 2012).

Os cromossomos bacterianos podem codificar inúmeros tipos de Sistemas de Dois Componentes (HE et al., 2006). Essas variações são decorrentes da diversidade de estímulos para os quais esse sistema responde. Por ser um sistema, em geral, com poucos componentes, existe uma grande variedade dentro e entre esses componentes, o que dificulta a anotação correta de suas funções nos diferentes organismos identificados. O TCST pode desempenhar várias funções em diferentes organismos, por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa* (com mais de 60 genes para a codificação) o Sistema de Dois Componentes está relacionado com a ativação do *Quorum Sensing* (LEE et al., 2006), enquanto que em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (com mais de 100 genes) sua função está associada à regulação positiva da dispersão de biofilme e na produção de fatores de virulência

(SLATER et al., 2000; DOW et al., 2003). Com isso, o estudo das particularidades de cada situação em que se encontra esse Sistema enriquece a compreensão de seus mecanismos e suas variáveis.

## **2.5.O Processo de Purificação de Proteínas Recombinantes**

Para entender o complexo processo biológico, é necessário isolar e estudar *in vitro* todos os componentes individuais envolvidos, para depois reunir as informações, a fim de formar um quadro coerente de todo o processo. Uma fonte importante dessas informações, em nível molecular, está no local de armazenamento delas na célula, no DNA (NELSON; COX, 2011).

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante iniciou-se em 1970, quando os bioquímicos Berg, Boyer e Cohen mostraram que os genes podiam ser transferidos de um organismo para outro. Diante da capacidade de transferência de genes, foi verificado que a sequência de DNA heteróloga inserida podia recombinar-se com o DNA do microrganismo hospedeiro, tendo sido criados os primeiros organismos geneticamente modificados, tornando-se, assim, uma ferramenta muito potente para a obtenção de construções de interesse (ALBERTS, 2005).

Entretanto, para compreender o resultado final da informação genética levada pelo DNA, é necessário o estudo das proteínas codificadas por genes estratégicos. As proteínas intermediam praticamente quase todos os processos celulares, exibindo uma diversidade quase infinita de funções. São as macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas as partes da mesma, com uma grande variedade existente em uma única célula. As proteínas são os mais importantes produtos finais das vias de informação e os meios pelos quais essas são expressas (NELSON; COX, 2011). Dessa forma, o estudo das proteínas envolvidas em vias e mecanismos patogênicos de importância tem sido de grande interesse para a compreensão destes e elaboração de estratégias de controle.

### 2.5.1. Expressão Heteróloga de Proteínas

A expressão heteróloga de proteínas consiste na produção massiva de uma proteína exógena em um organismo que naturalmente não a produziria, devido à dificuldade de isolar ou produzir em grande quantidade essa proteína no organismo de origem. O organismo hospedeiro da proteína de interesse é escolhido devido à presença de características favoráveis para atuar como a maquinaria de produção em larga-escala.

Na era pós-genômica, cada vez mais demandas e expectativas têm sido colocadas na produção de proteínas em laboratórios para uma produção mais expressiva e rápida. Acrescentando-se a isso o aumento exponencial do interesse de produção de proteínas pouco ou não caracterizadas (HUNT, 2005). O potencial da tecnologia do DNA recombinante, aliado com a recente capacidade de produzir, rapidamente e com baixo custo, moléculas de DNA, tem aberto um caminho promissor para a produção de novas proteínas heterólogas. Esse tem sido o resultado dos esforços da engenharia de proteínas com base na evolução molecular e triagem funcional para desenvolver, por exemplo, novas enzimas capazes de funcionar em altas temperaturas, ou mesmo incorporar aminoácidos exógenos em um produto proteico terapêutico que prolonguem e garantam sua ação (McDONALD, 2011).

Diversas áreas de pesquisas biomédicas e os processos de produção biotecnológicos se apoiam na expressão heteróloga para o desenvolvimento de reagentes e biomoléculas chaves (ANGOV; LEGLER; MEASE, 2011). Os avanços das ferramentas moleculares, bioinformáticas e de engenharias têm levado a novas estratégias para o desenho, a criação, a clonagem e a inserção de informações gênicas dentro das células hospedeiras, assim como para a expressão, recuperação e caracterização de produtos de proteínas heterólogas (McDONALD, 2011).

Existe, atualmente, uma grande variedade de células hospedeiras utilizadas para fins de expressão, incluindo microrganismos (bactérias, fungos, e leveduras), células de mamíferos, insetos, plantas, musgos, algas e, mais recentemente, células

livres, em que cada uma tem suas próprias vantagens e limitações para a expressão de um produto proteico específico (McDONALD, 2011).

Em alguns casos, populações homogêneas e grandes quantidades são requisitos para os objetivos do estudo; nessa situação é interessante o uso de indutores para a expressão proteica, caso a proteína exógena exerça um efeito patológico na célula. Em outros casos, a expressão através de vírus é vantajosa, devido à infecção massiva que ocorre em um mesmo tempo. A expressão proteica também pode ser alcançada através da injeção direta do DNA plasmidial no núcleo da célula hospedeira via microinjeções (OTTER-NILSSON; NILSSON, 1999). Desse modo, a escolha do sistema de expressão depende inteiramente do propósito do estudo e afeta não somente a expressão da proteína mas, também, o modo como o produto será posteriormente purificado (RECOMBINANT..., 2009).

Para muitas proteínas heterólogas, a qualidade e a funcionalidade do produto dependerão da habilidade da célula hospedeira de realizar certas modificações pós transcricionais que, juntamente com o processo de degradação celular e interações proteína-proteína, resultam, geralmente, na produção de proteínas heterogêneas, afetando a qualidade do produto final (McDONALD, 2011). Por fim, o objetivo da maior parte da utilização da expressão heteróloga de proteínas é, em geral, maximizar a produção funcional da proteína (mg de proteína total solúvel/L de cultura), a produtividade volumétrica (mg de proteína/L de cultura/dia), a especificidade do produto (mg de proteína/g de massa celular/dia), através da escolha criteriosa da célula hospedeira, da construção gênica, do sistema de expressão, da otimização do meio e do bioprocesso. Considerando, ainda, que algumas dessas escolhas podem causar grandes impactos nos processos finais como a recuperação, purificação, estabilização e a qualidade do produto final, interferindo na rentabilidade e aplicabilidade da técnica (McDONALD, 2011).

### **2.5.2. Uso de *Escherichia coli* como sistema de expressão**

O uso de *Escherichia coli* tem sido de preferência, nas últimas décadas, para a expressão heteróloga de proteínas de origem procariótica e eucariótica. O vasto conhecimento da genética e fisiologia deste organismo, aliado a sua relativa simplicidade, fazem da *E. coli* a escolha mais frequente na produção de proteínas recombinantes (HUNT, 2005; ANGOV; LEGLER; MEASE, 2011).

Entre as vantagens do uso desta bactéria como sistema de expressão está o fato do seu genoma ser completamente sequenciado, possuir cultivo de baixo custo, alta taxa de crescimento (dobrando o número de células a cada 20 min), altos níveis de expressão (acima de 5g de proteína por litro), ser facilmente transformável e a habilidade de crescer em altas densidades em meios simples ou escassos (APPELBAUM; SHATZMAN, 1999; HUNT, 2005; PETI; PAGE, 2007; ANGOV; LEGLER; MEASE, 2011; McDONALD, 2011).

No entanto, existem limitações no uso da *E. coli*, principalmente, devido a sua incapacidade de realizar modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação ou acetilação, fundamentais em eucariotos para o correto enovelamento proteico, e a sua limitada habilidade em realizar amplas formações de pontes dissulfeto e montagem de proteínas heterólogas (APPELBAUM; SHATZMAN, 1999; PETI; PAGE, 2007). Outra preocupação no uso de *E. coli* para a expressão de proteínas eucarióticas é que seu *codon usage* (codon preferencialmente usados por um organismo para um dado aminoácido) é muitas vezes diferente do utilizado para a produção da proteína no organismo de origem, interferindo na tradução da mensagem (McDONALD, 2011) e acarretando baixa ou nenhuma produção de proteína. Igualmente importante é o fato que algumas proteínas podem demandar grandes esforços, em geral, proteínas grandes ou de membrana, para serem expressas na forma solúvel, devido ao enovelamento incorreto, agregação ou precipitação em corpos de inclusão (APPELBAUM; SHATZMAN, 1999; PETI; PAGE, 2007; McDONALD, 2011).

Suas limitações, entretanto, são superadas com a ampla gama de produtos comerciais (promotores, sistemas e vetores de expressão e linhagens) disponíveis que facilitam a expressão solúvel e a posterior purificação em único passo (PETI; PAGE, 2007). As linhagens utilizadas para a expressão recombinante são de extrema importância, não podendo apresentar proteases que sejam naturalmente

prejudiciais, para que haja a manutenção estável do plasmídeo de expressão, como na *E. coli* DE3. Entre as linhagens vantajosas em *E. coli*, está a BL21, a mais utilizada como célula hospedeira devido a sua marcante relevância em procedimentos de expressões recombinantes (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). *E. coli* BL21 é uma linhagem capaz de crescer vigorosamente em meios escassos, não é patogênica e improvável de causar doença (CHART et al., 2000), além de ser deficiente em duas proteases que podem interferir no isolamento da proteína recombinante (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

Entre os vários sistemas de expressão disponíveis, o sistema de expressão *The Champion*® pET SUMO (Invitrogen) tem grande vantagem, visto que se utiliza da alta atividade e especificidade da RNA polimerase do bacteriófago T7 para permitir a regulação da expressão de genes heterólogos em *E. coli* (ROSENBERG et al., 1987). O sistema T7 é um promotor forte com bastante popularidade nos últimos anos, que favorece a indução da expressão, principalmente quando baseado na expressão de plasmídeos pET (HUNT, 2005). As linhagens DE3 de *E. coli* carregam o fago com o gene 1 T7, que codifica a T7 RNA polimerase. A indução da T7 RNA polimerase é mediada pela presença de isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e, somente quando a lisozima T7 é empregada, esse sistema é capaz de diminuir a expressão basal. Desse modo, foi desenvolvida a linhagem de *E. coli* (DE3) BL21 pLysS, que expressa lisozima ativa na célula, garantindo a expressão da proteína de interesse sem a interferência da expressão basal (HUNT, 2005; SAMUELSON, 2011).

### **2.5.3. Purificação por cromatografia de afinidade**

Atualmente, várias estratégias têm visado a produção eficiente e com alta produtividade de culturas celulares para a produção em larga escala de proteínas recombinantes, entretanto, existe, na sequência, uma necessidade de garantir a remoção de todas as impurezas e a obtenção em quantidades suficientes da

proteína altamente purificada para as aplicações desejadas (SARASWAT et al., 2013).

A preparação de uma amostra pura é essencial para que as propriedades e atividades de uma proteína possam ser determinadas. Uma estratégia para alcançar a purificação e a separação é trabalhar com base nas diferenças das suas propriedades. A cromatografia em coluna é um dos mais poderosos métodos para fracionamento proteico e pode ser realizada com base na diferença de tamanho, carga, afinidade de ligação e outras propriedades (NELSON; COX, 2011).

Para a cromatografia de afinidade, é necessário um ligante de afinidade, que é uma molécula que pode reconhecer a proteína alvo com considerável seletividade. O grau de seletividade é determinado pela constante de dissociação do complexo ligante de afinidade-proteína formado. Essa constante tem que ser menor do que a constante de dissociação correspondente do complexo que pode ser formado com o ligante de afinidade e as proteínas presentes na amostra. Em geral, a cromatografia de afinidade é composta por quatro passos (ROY; MONDAL; GUPTA, 2007):

1. Criação de um meio de afinidade conectando o ligante de afinidade adequado à matrix;
2. Formação do complexo ligante de afinidade-proteína;
3. Separação do complexo de afinidade do resto da solução;
4. Eluição da proteína de interesse pela dissociação do complexo de afinidade.

A cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) é uma técnica baseada na afinidade dos íons de níquel disponíveis a partir de uma matriz quelada de ácido iminodiacético (IDA) imobilizados em uma matriz suporte de agarose, ligados aos íons expostos de imidazol da histidina na amostra proteica. Devido às propriedades de ligação metálica dos grupos funcionais de imidazol dos resíduos de histidina presentes na cauda fusionada à proteína de interesse, a eluição da proteína de fusão recombinante é prontamente conseguida através da competição com um tampão adequado, como imidazol ou histidina, ou uma diminuição do pH, que resulta na protonação do radical de imidazol (MOONEY et al., 2014).

Assim como outras formas de cromatografia por afinidade, IMAC é utilizada em casos em que é necessária a rápida purificação e a pureza substancial do produto, apesar de que quando comparado com outras tecnologias é classificado como tendo afinidade moderada (GABERC-POREKAR; MENART, 2001). Em contrapartida, IMAC possui várias vantagens sobre técnicas de cromatografia de afinidade bioespecífica, como estabilidade do ligante, alta capacidade de carregamento proteico, condições de eluição suave, regeneração simples da coluna e relativo baixo custo (ARNOLD, 1991; GABERC-POREKAR; MENART, 2001), além de que a resina utilizada na IMAC não é afetada por proteases na amostra como outras técnicas de afinidade biológica (SARASWAT et al., 2013). São inúmeras as aplicações analíticas, preparativas e industriais de IMAC, como a separação e purificação de diferentes biomoléculas (peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos), a separação de células a partir de extratos biológicos e estudos de estrutura-função de proteínas (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

No princípio, a técnica de IMAC era exclusivamente utilizada para a purificação de biomoléculas com resíduos de histidina expostos naturalmente, que são responsáveis, primariamente, pela ligação aos íons metálicos imobilizados. Porém, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se possível a produção de proteínas fusionadas a caudas ("tags") na porção C ou N-terminal, conferindo às proteínas sem espécies doadoras de elétrons, a possibilidade de purificação por IMAC (HOCHULI, 1988; HOCHULI et al., 1988; BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Nesse sentido, uma estratégia baseada na afinidade de íons, extensivamente utilizada para a purificação de proteínas recombinantes, tem sido o uso de caudas de fusão, com ênfase para as caudas de histidina (His). Essas caudas são formadas por uma sequência de seis ou mais resíduos de histidinas que são adicionados na extremidade N ou C terminal da proteína recombinante e exibem alta afinidade para metais como zinco (Zn) e níquel (Ni) (SARASWAT et al., 2013).

Visto que é incomum a presença natural de vários resíduos de histidinas nas extremidades de proteínas, a cauda de polihistidinas torna-se uma base de alta seletividade e eficiência, geralmente provendo uma purificação em um único passo com mais de 90% de pureza (GABERC-POREKAR; MENART, 2001). As proteínas

com cauda de polihistidina (His6X) podem ser eluídas da coluna de IMAC por condições suaves de eluição que podem auxiliar na retenção da atividade e do enovelamento nativo da proteína a fim de não prejudicar as etapas posteriores de estudo da proteína (SARASWAT et al., 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho consistiu na expressão em *E. coli* da proteína hipotética XAC1201 da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) isolado 306 e na sua caracterização bioquímica parcial.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1.** Confirmação dos sintomas produzidos pelo mutante 11C09 da ORF XAC1201 em folhas de laranja doce e limão-cravo;
- 3.2.2.** Reconfirmação por sequenciamento da presença e da posição do transposon *Tn5* no mutante 11C09;
- 3.2.3.** Clonagem da ORF XAC1201 no vetor de expressão pET SUMO;
- 3.2.4.** Expressão da proteína recombinante His-SUMO-XAC1201 na forma solúvel;
- 3.2.5.** Purificação da proteína XAC1201 por meio de cromatografia de afinidade com íons metálicos;
- 3.2.6.** Caracterização bioquímica parcial da proteína XAC1201.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condições de cultivo bacteriano para teste de patogenicidade

O cultivo da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, isolado 306 e do mutante 11C09, obtido junto à biblioteca de mutantes armazenada no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), foi feito em meio de cultura *Nutrient Buffer* (NB) contendo 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona para 1 L de água destilada, para meios líquidos, e *Nutrient Agar* (NA) contendo 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona e 15,0 g de ágar para 1 L de água, para meios sólidos. As células foram incubadas a 28°C por 72h e, quando em meio líquido, as células foram mantidas sob agitação constante a 200 rpm. A adição do antibiótico canamicina 35 µg/mL ao meio foi feito somente no cultivo de bactérias mutantes, pois o transposon *Tn5* possui o gene de resistência a canamicina.

### 4.2 Teste de patogenicidade *in vivo* do mutante 11C09

Após o crescimento bacteriano, foi coletada separadamente uma alíquota de bactérias das placas do mutante 11C09 e da Xac 306 e feita a suspensão celular pela homogeneização das células em água destilada gelada, para uma densidade óptica (D.O.) de 0,3 a 600<sub>nm</sub>, o que equivale a cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL. A suspensão de bactérias foi infiltrada em dois pontos na parte abaxial das folhas jovens completamente expandidas de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbek) e de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbek). À esquerda da nervura central foi inoculado o mutante, enquanto que à direita foi inoculada a estirpe selvagem. As plantas inoculadas foram mantidas num laboratório de segurança concebido especialmente para a manipulação e inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, localizado nas

dependências do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da UNESP, Campus de Jaboticabal. Este local possui um sistema de filtragem absoluta do ar para gerar pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente, além de manter condições ótimas de temperatura, luminosidade e umidade (LAIA, 2007). A observação dos sintomas nas plantas inoculadas foi feita diariamente, com registro de fotografia digital a cada 48h durante 21 dias.

### **4.3 Reconfirmação da inserção do transposon no mutante 11C09**

#### **4.3.1 Extração de DNA genômico do mutante 11C09**

Para extrair o DNA genômico, utilizou-se como protocolo base a metodologia descrita por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), a fim de isolar o DNA para o sequenciamento do gene mutado. Cultivou-se, em um erlenmeyer de 25 mL, 5,0 mL de meio de cultura NB com o mutante (11C09), mantido sob agitação constante de 200 rpm, a 28°C, por 72h. Após esse período, a cultura foi centrifugada na centrífuga Eppendorf (5417R) por 2 min em tubos de centrífuga 1,5 mL até a formação de um precipitado compacto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 567 µL de tampão TE 10:0,1. Adicionou-se SDS e proteinase K para uma concentração final de 0,5% e 100 µg/mL, respectivamente. Homogeneizaram-se as amostras e incubou-se a 37°C por 1h. Após esse tempo, com a solução viscosa adicionou-se 100 µL de NaCl 5 M e, em seguida, 80 µL de solução CTAB/NaCl, incubando a 65°C por 10 min. Nesse ponto, adicionou-se o mesmo volume de solução de clorofórmio/álcool isoamílico, centrifugando na velocidade máxima por 5 min na centrífuga Eppendorf (5417R). O sobrenadante aquoso/viscoso foi transferido para um novo tubo e, adicionando-se água estéril, foi novamente centrifugado. No novo tubo, adicionou-se um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugou-se na velocidade máxima por 5 min na centrífuga Eppendorf (5417R).

Transferiu-se o sobrenadante para um outro tubo e adicionou-se 0,6 volume de isopropanol para precipitar os ácidos nucleicos. O tubo foi agitado até a visualização de um DNA esbranquiçado. Centrifugou-se na velocidade máxima por 5 min, centrífuga Eppendorf (5417R), o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco em dissecador por 5 min. Fez-se a lavagem do DNA com etanol 70% para remover o CTAB residual, centrifugou-se novamente por 5 min e o DNA foi novamente seco em dissecador. O DNA foi ressuspendido em 80 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0) com 1 µg/mL de RNase e incubado a 37°C por 1h. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com 10 mg/mL de brometo de etídeo, com o tampão de corrida TBE 0,5X e a quantificação foi feita no *NanoDrop*® ND-1000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

#### 4.3.2 Amplificação do DNA genômico do mutante 11C09

Os oligonucleotídeos direto (*forward*): 5´ ATGAAGTTGGAGGCGTTG 3´ e reverso (*reverse*): 5´ TTAGTGCAGCAACTCGGC 3´ foram utilizados para a amplificação e isolamento da ORF XAC1201, desde a metionina inicial até o códon de terminação. As reações de PCR foram realizadas com 100 ng de DNA genômico do mutante 11C09, 10 mM de cada oligonucleotídeo, 10 mM de dNTPs, 5U/µL de Taq DNA polimerase (Fermentas), 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10X de tampão Taq, para uma reação com volume final de 50 µL. O termociclador GeneAmp® Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems) foi usado com o programa de desnaturação inicial de 94°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. A amplificação do gene foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com 10 mg/mL de brometo de etídeo com o tampão de corrida TBE 0,5X e quantificado em *NanoDrop*® ND-1000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

### 4.3.3 Purificação do produto da PCR do DNA genômico do mutante 11C09

Como houve a presença de bandas múltiplas, foi necessário recortar do gel de agarose *low melting* (1%) a banda desejada com tamanho de 2.040 pb (819 pb da ORFXAC1201 e 1.221 pb do transposon *Tn5*). A banda recortada passou por uma desproteinização com fenol clorofórmio para a limpeza do DNA. Inicialmente o tubo de centrífuga 1,5 mL contendo o gel foi centrifugado à velocidade máxima por 2 min na centrífuga Eppendorf (5417R) e levado para banho-maria a 65°C por 10 min. Centrifugou-se por 1 min na centrífuga Eppendorf (5417R) e adicionou-se 0,5 volume de fenol, agitou-se por 1 min e centrifugou-se por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se 0,25 volume de fenol e clorofórmio. Agitou-se por 1 min e centrifugou-se por mais 5 min na centrífuga Eppendorf (5417R). O sobrenadante foi recuperado e adicionou-se 0,10 volume de acetato de sódio e 2,5 volume de etanol absoluto. A amostra foi mantida em freezer de ultra baixa temperatura, a -80°C por 20 min e, após esse período, centrifugada por 30 min na centrífuga Eppendorf (5417R). O precipitado foi ressuspendido em 1,0 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA seco em dissecador. Ressuspendeu-se o DNA em 10 µL de água estéril e quantificou-se em *NanoDrop*® ND-1000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

### 4.3.4 Sequenciamento do mutante

A presença do transposon dentro da ORF XAC1201 foi reconfirmada pelo sequenciamento da região de inserção do transposon *Tn5*. Como o transposon se encontra dentro do gene, foram sequenciadas as duas extremidades de DNA que o flanqueiam. Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos específicos: KAN-2 FP-1 *Forward Primer* 5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3' e KAN-2 RP-1 *Reverse Primer* 5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3', que possuem

complementaridade de bases nas extremidades do transposon e direcionam a síntese no sentido externo ao transposon (LAIA, 2007). A reação de sequenciamento foi constituída de 1,0  $\mu\text{L}$  de *BigDye* (Taq DNA polimerase, dNTPs com e sem fluorescência) v3.1 (Applied Biosystems), 3,0  $\mu\text{L}$  de tampão *SaveMoney*, 1,0  $\mu\text{L}$  de cada primer KAN-2 (FP-1 e RP-1) a 10  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ , 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA a 50 ng e 3,0  $\mu\text{L}$  de água estéril para um volume final de reação de 10  $\mu\text{L}$ . O termociclador PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) foi usado com o programa de desnaturação inicial de 96°C por 1 min, seguidos de 39 ciclos de 96°C por 15 seg, 52°C por 15 seg e 60°C por 4 min.

Após a reação, foi feita a preparação do DNA para o sequenciamento, adicionando 80  $\mu\text{L}$  de isopropanol ao produto de PCR. Após 15 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich) a 3220 xg por 30 min a 20°C. Após a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 10 min a 20°C na centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich). As amostras foram secas a vácuo e, anteriormente ao sequenciamento, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de formaldeído para desnaturação e manutenção da fita simples. Foi utilizado o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) conforme metodologia sugerida pelo fabricante (LAIA, 2007).

As sequencias obtidas foram analisadas por bioinformática e alinhadas com o genoma de *Xac* para identificar a presença e a posição do transposon no gene mutado. O processo de alinhamento foi realizado por meio do algoritmo BLASTn.

#### **4.4 Análise por eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de PCR e o resultado das extrações de DNA genômico e plasmidial foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% [1,0 g de agarose, 10,0 mL de TBE 5X (54 g de Tris base, 27,5 g de Ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 em 1 L de água destilada) e 10  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo em 100 mL de água destilada]. Após a polimerização, foram aplicados 10% do volume final

das amostras nos poços do gel, submetendo o DNA a uma tensão elétrica de 90-100 V por 1 hora. Pela presença do brometo de etídio foi possível a visualização e o registro fotográfico das bandas sobre luz ultravioleta. O marcador molecular usado como padrão de peso foi *O'GeneRuler*® 1kb DNA *Ladder ready-to-use* (Fermentas).

## **4.5 Expressão Heteróloga de XAC1201**

### **4.5.1 Amplificação da ORF por PCR**

Para a amplificação por PCR da sequência codificadora da ORF XAC1201, desde a metionina inicial até o códon de terminação, foram utilizados os oligonucleotídeos direto: 5'-ATGAAGTTGGAGGCGTTG-3' e reverso: 5'-TTAGTGCAGCAACTCGGC-3'. As reações de PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp® Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems) utilizando 100 ng de DNA do cosmídeo contendo a ORF XAC1201, 10 mM de cada oligonucleotídeo, 10 mM de dNTPs, 5U/μL DNA polimerase Taq *High Fidelity* (Fermentas), 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 10X tampão da Taq *High Fidelity*, para uma reação com volume final de 50 μL. O programa utilizado foi composto por desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg e 68°C por 2 min. O tamanho do fragmento foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com 10 mg/mL de brometo de etídeo com o tampão de corrida TBE 0,5X.

### **4.5.2 Clonagem no Vetor de Expressão e Transformação Bacteriana**

O produto de PCR da ORF XAC1201 foi clonado no vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen) para a obtenção da construção His-SUMO-XAC1201 (Figura 12).

Para otimizar a reação de ligação, ao produto de PCR foi adicionado 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (Fermentas) e o mesmo foi incubado a 72°C por 10 min no termociclador GeneAmp® Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems) para adição de

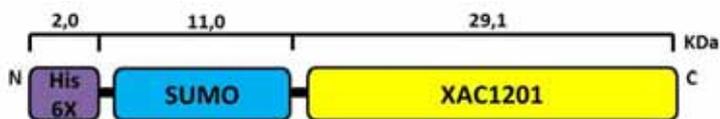


Figura 12 - Esquema representativo da construção His-SUMO-1201 com escala do tamanho de cada proteína. Tamanho total da proteína expressa: 42,1 kDa.

adenina às extremidades do produto de PCR. A reação de ligação foi realizada com 1,5  $\mu\text{L}$  de produto de PCR (100 ng) tratado com Taq, 25 ng/ $\mu\text{L}$  do vetor pET SUMO, 10X do tampão de ligação, 1,0  $\mu\text{L}$  de T4 ligase e água estéril para um

volume final de reação de 10  $\mu\text{L}$ , incubada a 16°C por 16h. Para a transformação bacteriana, 3  $\mu\text{L}$  do produto da ligação foi adicionado em 50  $\mu\text{L}$  de células termocompetentes de *E. coli* DH10B, incubadas 30 min no gelo, seguidos por 2 min a 42°C e incubadas novamente no gelo. Ao tubo com células, adicionou-se 1 mL de meio SOC (40  $\mu\text{L}$  de glicose 20% e 40  $\mu\text{L}$  de cloreto de magnésio 1 M em meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,58 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, pH 7,5 para 1 L)) e incubou-se a 37°C, por 1h sob agitação de 250 rpm. Foram espalhados 100 e 200  $\mu\text{L}$  de células em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani, LB (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl em 1 L) contendo 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina, incubados a 37°C por 16h, para a formação de colônias isoladas. O DNA plasmidial das colônias isoladas foi extraído pelo kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagil) conforme instruções do fabricante e sequenciado para verificação da posição do inserto no vetor. O DNA plasmidial dos clones com a construção correta foi utilizado para transformação de células quimiocompetentes One Shot® *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen).

#### 4.5.3 Expressão em Pequena Escala de His-SUMO-1201 em *E. coli*

As colônias isoladas obtidas após a transformação foram incubadas em 5,0 mL de meio LB contendo 35 µg/mL de canamicina a 37°C, sob agitação de 250 rpm até uma densidade óptica (D.O.600<sub>nm</sub>) de 0,6 a 0,8. Separou-se uma alíquota (1,0 mL) da cultura e adicionou-se ao meio 0,4 mM do indutor isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), incubados por 4h nas mesmas condições, separando uma alíquota (1,0 mL). Após, centrifugou-se as alíquotas induzidas e não induzidas com IPTG na microcentrífuga (5415R, Eppendorf) a 16.100 xg por 6 min e as amostras foram ressuspensas em 100 µL (induzidas) e 50 µL (não induzidas) de água estéril e preparadas para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

#### **4.5.4 Ensaio de Solubilidade e Expressão de His-SUMO-XAC1201 em *E. coli***

Após a escolha do clone e verificação em pequena escala da expressão da proteína recombinante em *E. coli*, foi testada a solubilidade da proteína nas seguintes condições: 16°C por 2, 4 e 8 horas de indução, 20°C por 2, 16 e 24 horas de indução, 28°C por 2, 4 e 8 horas de indução e 37°C por 2, 3 e 4 horas de indução. Para cada tempo e temperatura foram testadas as concentrações de 0,1, 0,2 e 0,4 mM de IPTG. A cultura celular foi feita em 50 mL de meio LB contendo 35 µg/mL de canamicina e incubação a 37°C e 250 rpm até uma D.O.600<sub>nm</sub> de 0,4 a 0,5. Os erlenmeyers foram transferidos para as incubadoras nas temperaturas de teste e adicionou-se IPTG para as concentrações determinadas. Após a indução as amostras foram centrifugadas a 3.220 xg por 15 min a 4°C na centrífuga (5810R, Eppendorf). O precipitado foi ressuspensado em 1 mL de solução tampão (2,0 M Tris-HCl pH 8,0, 5,0 M NaCl, 50% glicerol), sonicadas por 1 min e descansadas em banho de gelo por 30 seg no período total de 5 min. O lisado foi centrifugado por 18 min a 16.100 xg a 4°C usando a microcentrífuga (5415R, Eppendorf), o sobrenadante e o precipitado foram coletados separadamente e preparados para análise em SDS-PAGE.

Após a verificação da melhor condição para expressão da proteína solúvel, a expressão em larga escala foi feita adicionando-se 10 mL da cultura celular em 1 L de meio LB contendo 35 µg/mL de canamicina, incubados a 37°C e 250 rpm até uma D.O.<sub>600nm</sub> de 0,4 a 0,5, quando foi adicionado IPTG (0,2 mM) e incubados por mais 4h a 28°C. A cultura foi centrifugada em centrífuga refrigerada de alta rotação (CR22GIII, Hitachi) a 1.960 xg, por 10 min a 4°C e o precipitado ressuspendido em 100 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 0,5% Tween 20). As células foram lisadas por sonicação em banho de gelo, em pulsos de 10 seg e intervalos de 10 seg por 5 min e centrifugadas a 30.000 xg, por 15 min a 4°C. O precipitado foi ressuspendido no mesmo volume em água e guardado a 4°C juntamente com o sobrenadante.

#### **4.5.5 Purificação de His-SUMO-XAC1201 por IMAC**

A purificação foi feita em cromatografia por afinidade de íons metálicos no Akta Prime Plus FPLC System (GE, Amersham) usando a coluna de Ni-Sepharose® His-Trap Chelating de 5 mL (GE, Amersham). A coluna foi equilibrada com o tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 30 mM imidazol) e carregada com a amostra. Após a passagem da mesma, a coluna foi lavada com o tampão A para eluir compostos não específicos. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi feita por um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM imidazol) com um fluxo de 2,0 mL/min e coleta das frações a cada 2,0 mL. As frações coletadas no pico de absorbância a 280 nm foram reunidas e precipitadas com 20% de sulfato de amônio, centrifugadas em centrífuga refrigerada de alta rotação (CR22GIII, Hitachi) a 11.300 xg por 15 min. Ao sobrenadante foi adicionado 70% de sulfato de amônio seguido da mesma condição de centrifugação, no qual o precipitado foi ressuspendido em 3,0 mL de tampão A2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5% glicerol, 30 mM imidazol). Para a separação da proteína SUMO da His-SUMO-XAC1201, foi feita a digestão com a enzima de clivagem sítio específica SUMO protease e ditiotretol (DTT) 1mM, a 4°C

por 16h. Após esse período, a amostra foi passada em coluna de gravidade com a resina de Ni-Sepharose® High Performance Media (GE, Healthcare), a fim de eluir somente a proteína pura, que foi concentrada em filtro de centrifuga de *cutoff* de 10 kDa (Centriprep Concentrators - Amicon). Todas as etapas foram analisadas em SDS-PAGE.

#### 4.6 Análise por SDS-PAGE

As amostras proteicas foram diluídas em 3X tampão da amostra (187,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS (m/v), 30% glicerol, 16%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,03% azul de bromofenol (m/v)), fervidas por 5 min e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  quando necessário. As proteínas foram separadas em um gel de concentração a 5% (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS, 30% solução de acrilamida, 0,1% de APS e 0,1% de TEMED) e separação a 12% (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS, 30% solução de acrilamida, 0,1% de APS e 0,1% de TEMED) e a eletroforese foi realizada no Sistema de Eletroforese Vertical Hoefer miniVE (GE Healthcare) à voltagem constante de 200V e visualizadas com solução corante com Coomassie (40% metanol, 20% de ácido acético, 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250).

Quando a coloração do gel foi realizada com nitrato de prata, o gel foi fixado com o descorante por 2h e lavado duas vezes com água sob agitação por 10 min. Em seguida, adicionou-se solução de DTT (100  $\mu\text{L}$  de 200 mM) em 50 mL de água, mantendo sob agitação por 30 min. A solução foi descartada e adicionou-se a solução corante (0,1 g de nitrato de prata em 50 mL de água) sob agitação por 30 min. O corante foi descartado e iniciou-se o processo de revelação, com 50 mL de água por 20 s; 30 mL de solução de  $\text{NaCO}_3$  a 3% (duas vezes); 30 mL de de solução de  $\text{NaCO}_3$  a 3% com 25  $\mu\text{L}$  de formaldeído (três vezes). Para cessar a reação, adicionou-se 15 mL de solução de ácido cítrico 1 M.

## 4.7 Quantificação de proteína

O rendimento do processo de purificação foi feito pela quantificação de proteína total utilizando uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da amostra de cada etapa, em triplicata. Quando necessário, foi feita a diluição das amostras com fator de diluição de 10 ou 25. As quantificações foram feitas com o Protein Assay Kit do Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante (a precisão do kit para concentrações proteicas está na faixa de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  a 5  $\text{mg/mL}$ ). A média e desvio padrão foram calculados para cada etapa.

## 4.8 Análises por espectrometria de massas e confirmação da identidade da XAC1201

### 4.8.1 Digestão da proteína em gel

A proteína XAC1201 pura (~20  $\mu\text{g}$ ) foi recortada do gel de SDS-PAGE e os pedaços do gel foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem (100% de acetonitrila (ACN): 100 mM bicarbonato de amônio (AmBic) 1:1), incubados a temperatura ambiente por 1h sob agitação suave. Removeu-se toda a solução e repetiu-se o procedimento por 3 vezes. Em seguida, o gel foi desidratado com 500  $\mu\text{L}$  de ACN por 10 min e a solução removida. Depois, o gel foi reidratado com a adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução de redução (10 mM de DTT em 100 mM de AmBic) por 30 min a 56°C, com a solução sendo removida após esse período. Novamente, o gel foi desidratado como citado e para a reidratação adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de alquilação (50 mM de iodoacetamida em 100 mM de AmBic) por 30 min no escuro à temperatura ambiente. Removeu-se a solução e, novamente, desidrataram-se os géis com 500  $\mu\text{L}$  de ACN por 5 min. Para a digestão da proteína em gel, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de digestão (20  $\mu\text{g}$  de tripsina liofilizada em 1,25 mL de 10 mM

de AmBic com 10% de ACN) e incubou-se a 4°C por 1h e, em seguida, a 37°C overnight. Posteriormente, adicionou-se 500 µL da solução de extração (5% de ácido fórmico: 100% de acetonitrila), agitou-se por 1h e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes para garantir a retirada da solução de digestão dos pedaços de géis. Logo após, desidratou-se pela última vez o gel, com 400 µL de ACN, agitando por 30 min e transferindo o sobrenadante para outro tubo. Os peptídeos desidratados foram colocados em dissecador (Maxi Dry Lyo, Heto) até estarem completamente secos e estes foram armazenados em *ultrafreezer* -80°C até seu uso.

#### 4.8.2 Espectrometria de massas

Previamente às análises no espectrômetro de massas, os peptídeos digeridos foram separados em um sistema cromatográfico do tipo EASY-nLC1000 (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) utilizando-se uma nano-coluna de fase reversa (15cm, 2µm, 100Å) e gradiente de polaridade decrescente (solvente A contendo 0,1% de ácido fórmico em água e solvente B contendo 0,1% de ácido fórmico em ACN) durante 60 min sob fluxo de 300 nl/min. A ionização e injeção dos peptídeos no espectrômetro de massas (Q-Exactive, Thermo) ocorreu por *electrospray* (ESI), utilizando-se 3 kV de potencial aplicado diretamente na agulha de injeção. O espectrômetro de massas foi operado no modo *data-dependent*, onde os dez íons peptídicos mais abundantes de cada *survey scan* foram selecionados para fragmentação e aquisição de espectros do tipo MS2. Os espectros do tipo MS1 e MS2 foram adquiridos, respectivamente, em resolução igual a 70,000 e 17,500 FWHM (*full width at half maximum*), respectivamente. O tipo de fragmentação utilizado foi o *high collision dissociation* (HCD), com energia de colisão normalizada a 35%. Os íons peptídicos selecionados para fragmentação foram excluídos de um novo evento de fragmentação por 60s. A confirmação da identidade da proteína purificada foi realizada por buscas restritivas baseadas em sequências depositadas em um banco de proteínas. Para tanto, o genoma de *Xanthomonas citri*

subsp. *citri* foi traduzido nos seis quadros de leitura e, posteriormente, utilizados na criação de um banco de proteínas contendo 163.191 acessos. As correlações entre os espectros do tipo MS2, obtidos do espectrômetro de massas, e os espectros virtuais, oriundos da digestão virtual e processamento do banco de proteínas, foram realizados pela ferramenta Sequest HT, inserida no programa Proteome Discover v. 1.4.0, utilizando os seguintes parâmetros de busca: 10 ppm de tolerância para os íons precursoros e 0,1 Da para os íons fragmentos, oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação da cisteína como modificação estática. Os resultados obtidos (*peptide spectrum matches*, PSMs) foram filtrados, tendo sido consideradas apenas as identificações que continham no mínimo dois peptídeos e que esses possuíssem coeficiente de correlação cruzada (*XCorr*) igual a 1,5, 2,0, 2,25 e 2,5 para os íons de carga +1, +2, +3 e +4, respectivamente.

#### **4.9 Caracterização bioquímica da proteína XAC1201**

##### **4.9.1 Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatásica (ATPásica)**

A atividade de ATPase foi determinada colorimetricamente, consistindo na determinação de fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a hidrólise do ATP, segundo o método descrito por Fiske e Subbarow (1925) e Sato (2011), com modificações.

Tubos de ensaio com o meio de reação utilizado (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, e em alguns tubos, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>) foram incubados em banho-maria a 37°C por 5 min. Ao meio de reação foi adicionado 1 µL (~4,0 µg/µL) da proteína XAC1201. Depois de 30 min, foi adicionado 1 mM de ATP, e após 1h, a reação foi interrompida com adição de solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v). Após a homogeneização, os tubos foram colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise espontânea do substrato. Aos tubos de ensaio foram

adicionados 500  $\mu$ L de molibdato de amônio com ácido sulfúrico, 1,0 mL de acetona 100% e 500  $\mu$ L de 400 mM de ácido cítrico, agitando-se os tubos por 15 seg a cada reagente adicionado. O precipitado proteico formado foi eliminado por centrifugação na centrífuga 5810R (Eppendorf) a 10.000 xg por 10 min a 4°C. Em seguida, o Pi produzido na reação foi determinado por leitura em espectrofotômetro Hitachi modelo U-200, no comprimento de onda de 355 nm. Em cada experimento foram incluídos controles sem a adição da enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera um  $\mu$ mol de fosfato por minuto por miligrama de proteína por minuto, nas condições padrões do ensaio.

#### **4.9.2 Determinação da atividade de pirofosfatase**

A atividade de pirofosfatase da XAC1201 foi determinada através da dosagem do fosfato liberado a partir da hidrólise do pirofosfato (1 mM), conforme metodologia descrita no item 4.9.1.

#### **4.9.3 Determinação da atividade de piridoxalfosfatase**

Determinou-se a atividade de piridoxalfosfatase (PLPase) através da dosagem de fósforo liberado a partir da hidrólise do piridoxal fosfato (1 mM), utilizando-se o meio de reação (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM  $\text{MnCl}_2$  e 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), com 1  $\mu$ L e 5  $\mu$ L de enzima, conforme metodologia descrita no item 4.9.1.

#### **4.9.4 Determinação da atividade de PNPPase**

A atividade de p-nitrofenilfosfatase (PNPPase) foi determinada através da formação do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon=17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , pH13), a partir da hidrólise do p-nitrofenilfosfato (PNPP), em um espectrofotômetro Hitachi modelo U-200, segundo Sato (2011), com modificações. O meio de reação (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , e em alguns tubos, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), com volume final de 1 mL, foi incubado, inicialmente, por 5 min em banho-maria a 37°C. Após 30 min da adição de 1  $\mu\text{L}$  (~4,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) da proteína XAC1201, adicionou-se 2,5 mM do substrato PNPP e após 1h, a reação foi interrompida adicionando-se 1 mL de NaOH 1M. Após a mistura por agitação, a absorvância foi determinada no comprimento de onda de 410 nm.

A atividade de PNPPase também foi determinada dobrando-se a concentração de PNPP (5 mM) em alguns tubos, e em outros, dobrando-se a concentração da enzima (5  $\mu\text{L}$  ~ 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e, ainda metade das amostras foram incubadas a 4°C, *overnight*, contendo tampão de reação e a enzima. Em cada experimento foram incluídos controles sem a adição da enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera um  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína por minuto, nas condições padrões do ensaio.

#### **4.9.5 Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatásica na presença de histidina**

Para verificar se o fósforo liberado no meio de reação é capturado pela enzima XAC1201 com auxílio de histidina do meio, a atividade de ATPase na presença de histidina foi determinada com o mesmo procedimento do item 4.9.1, adicionando-se 1mM de histidina juntamente com o ATP 1 mM e 5  $\mu\text{L}$  de enzima.

#### **4.9.6 Determinação da atividade de PNPPase na presença de histidina**

Com o mesmo intuito do item anterior, a atividade de PNPPase foi determinada na presença de histidina. No meio de reação (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) adicionou-se 1 mM de histidina juntamente com 10 µL de PNPP e 5 µL de enzima, procedendo-se conforme metodologia descrita no item 4.9.4.

#### 4.9.7 Dimerização e atividade de ATPase e PNPPase da proteína XAC1201 na presença de íons

Com a possibilidade da XAC1201 ser uma proteína dimérica, foi realizado um experimento com base no trabalho de Wang et al. (2013), com modificações. Os íons e as combinações utilizadas são apresentadas na Tabela 1. Todas as variações foram acrescentadas de 1 mM de ATP com a enzima, que constituiu o controle (ATP e enzima). As reações foram incubadas por 1h a 37°C.

**Tabela 1 – Variações dos íons utilizados para a dimerização de XAC1201**

<b>Íons</b>	<b>Combinações entre íons</b>
1µM de ZnCl <sub>2</sub>	1µM de ZnCl <sub>2</sub> + 0,5 mM de MgCl <sub>2</sub>
0,5 mM de MnCl <sub>2</sub>	1µM de ZnCl <sub>2</sub> + 2 mM MnCl <sub>2</sub>
2 mM de MgCl <sub>2</sub>	

Após o período de incubação, foi feita a diálise *overnight* das amostras no tampão de reação com 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl. Depois da diálise, foram retiradas alíquotas de cada amostra para os testes de atividade de ATPase e PNPPase, conforme citado nos itens 4.9.1 e 4.9.4, respectivamente. Ademais, foi retirada uma alíquota para a visualização das amostras em gel de poliacrilamida nativo.

#### **4.9.8 Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de detergentes**

Para verificar se a proteína XAC1201 é uma proteína de membrana, utilizaram-se alguns detergentes não iônicos para mimetizar um ambiente hidrofóbico que fosse mais favorável à atividade da mesma. Assim, foram utilizados os detergentes: Polidocanol, Ocatileno Glicol Monododecil Éter (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>), ChapS e Chap50, na relação proteína: detergente de 1: 1. Inicialmente, o detergente foi diluído no tampão de solubilização com 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MnCl<sub>2</sub> e 5% de glicerol. Em seguida, a enzima foi adicionada a este meio e mantida sob agitação constante a 25°C. Após 1h, 6h e 24h coletou-se uma alíquota de cada amostra para os testes de atividade de ATPase e PNPPase.

Para otimizar a solubilização da enzima com o detergente, foram utilizadas duas estratégias de sonicação. Primeiramente, prepararam-se as amostras com tampão, detergente e enzima, como descrito acima, e colocou-se as amostras em banho de gelo no ultrassônico (Ultrasonic Cleaner – Thornon, Unique) por 1h constante. Outra estratégia utilizada foi com o sonicador de ponteira (Sonifier 250, Branson), em que as amostras foram sonicadas de 30s em 30s, por aproximadamente 2 min, descansando em banho de gelo. Após a sonicação, retirou-se uma alíquota de cada amostra para os testes de atividade de ATPase e PNPPase. Em cada experimento foram incluídos controles, constituído de detergente, tampão de solubilização e tampão de armazenamento da enzima (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5% glicerol), na proporção 1:1:1.

#### **4.10 Análise por gel nativo**

As amostras proteicas foram diluídas em 3X de tampão da amostra (187,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 30% glicerol, 0,03% azul de bromofenol (m/v)). As proteínas foram separadas em um gel de concentração a 5% (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 30%

solução de acrilamida, 0,1% de APS e 0,1% de TEMED) e separação a 12% (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 30% solução de acrilamida, 0,1% de APS e 0,1% de TEMED) e a eletroforese foi realizada no Sistema de Eletroforese Vertical Hoefer miniVE (GE Healthcare) a 200V constantes e visualizadas com solução corante com Coomassie (40% metanol, 20% de ácido acético, 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250).

#### **4.11 Análise da frequência e diversidade da ORF XAC1201 presente nos bancos de dados**

Para verificar a relação da proteína XAC1201 com proteínas de outros organismos por meio da análise de frequência e diversidade, foi realizada a comparação da sequência proteica de XAC1201 contra sequências depositadas em bancos de dados de proteínas. Para isso utilizou-se a ferramenta blastp (protein blast), com o retorno máximo dos resultados ajustados para 20.000.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Teste de patogenicidade *in vivo* do mutante 11C09**

No teste de patogenicidade foram observados os sintomas produzidos pelo mutante 11C09 quando inoculado em folhas jovens de plantas cítricas hospedeiras suscetíveis (laranja doce e limão cravo). Observa-se, a partir das Figuras 13 e 14, que os sintomas foram menos severos nas folhas de limão cravo do que nas de laranja doce, e além da menor expansão dos sintomas nos locais de infiltração da suspensão celular, houve maior tolerância da planta à infecção. Enquanto as folhas de limão cravo se mantiveram intactas na planta durante os 21 dias de avaliação, ao

18º dia após a inoculação (DAI), as folhas de laranja doce sofreram abscisão no 18º dia após a inoculação (DAI) devido à infecção severa.

Os sintomas apresentados nas folhas de limão cravo foram concordantes com aqueles descritos por Laia e colaboradores (2009), isto é, presença de necrose e ausência de hiperplasia e encharcamento. Em contrapartida, nas folhas de laranja doce, foi possível observar, além da necrose mais alastrada, a presença do início de encharcamento. O fenótipo do mutante 11D03, igualmente produzido pela interrupção da ORF XAC1201 foi analisado por Bortolossi (2007), que relatou diminuição de hiperplasia e aumento de necrose, estando de acordo com o fenótipo relatado para o mutante 11C09. Apesar de serem interrupções em bases distintas de uma mesma ORF, podemos observar semelhança nos sintomas produzidos por esses mutantes *in vivo*, concordando com a descrição apresentada por Laia (2007).

A curva de crescimento do mutante 11D03 da ORF XAC1201 foi feita por Bortolossi (2007) para avaliar o perfil de desenvolvimento do patógeno dentro do hospedeiro. Até o segundo dia de infecção, o mutante apresentou o mesmo desenvolvimento da estirpe selvagem (Xac 306), a partir de quando começou a redução da multiplicação. No quarto dia de infecção, o desenvolvimento do mutante estava dez vezes menor que o da estirpe selvagem e, continuou progressivamente, até atingir, no décimo quarto dia, 1.000 vezes menos bactéria em comparação com a Xac selvagem. Desse modo, o desenvolvimento dos sintomas produzidos pelos mutantes 11C09 e 11D03 é reduzido devido ao crescimento limitado da bactéria dentro do mesofilo do hospedeiro.



Figura 13

Teste de patogenicidade. Superfície abaxial de folhas jovens de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbek), inoculadas com suspensão celular do mutante 11C09 de Xac a concentração de  $10^8$  UFC/mL, observadas durante 21 dias após a inoculação (DAI).



Figura 14 – Teste de patogenicidade. Superfície abaxial de folhas jovens de limão cravo (*Citrus limonia* Osbek), inoculadas com suspensão celular do mutante 11C09 de Xac a concentração de  $10^8$  UFC/mL, observadas durante 21 dias após a inoculação (DAI).

Vários estudos têm sido realizados buscando identificar genes alvos responsáveis por ou participantes dos processos desencadeadores da patogenicidade de Xac em citros. A mutagênese mediada por *Tn5* é um método eficiente para produzir mutantes e tem sido usada para um mapeamento em larga escala de potenciais genes de virulência em várias espécies de *Xanthomonas* (QIAN et al., 2005; LAIA et al., 2009; ROTT et al., 2011). Guo e colaboradores (2010) produziram, pela inserção do transposon EZ-*Tn5* em Xac 306, dois mutantes do gene *galU*, que têm envolvimento na produção de EPS (polissacarídeo extracelular), CPS (cápsula polissacarídica), assim como na formação de biofilme. Os mutantes produzidos ocasionaram a perda da patogenicidade de Xac quando inoculados em folhas de tangerina.

Em outro trabalho, produziu-se uma biblioteca de mutantes, também pela inserção aleatória do transposon EZ-*Tn5* em Xac 306, no qual foram identificados 32 genes previamente caracterizados como fatores de virulência em bactérias patogênicas, além de 27 genes novos. De 16 genes hipotéticos identificados, três (XAC1142, XAC1230 e XAC2357) foram classificados como genes de categorias essenciais (domínio PRPF, peptídeo sinal e domínio transmembrânico) e os outros 13 como genes putativos relacionados à patogenicidade. A mutação em 12 desses genes resultou na diminuição dos sintomas enquanto que a mutação em um gene (XAC1142) resultou no atraso do desenvolvimento dos sintomas, quando inoculados em folhas de tangerinas (YAN; WANG, 2012).

## **5.2 Reconfirmação do transposon no mutante 11C09**

O mutante 11C09 foi sequenciado a fim de reconfirmar a presença do transposon *Tn5* em sua sequência. O DNA genômico do mutante 11C09 (Figura 15A) amplificado com oligonucleotídeos específicos (Figura 15B) revelou, pela visualização em gel de agarose, a presença de banda dupla, sendo que a banda superior se refere à ORF XAC1201 (819pb) com o transposon *Tn5* (1221 pb), totalizando no tamanho de 2.040 pb, enquanto que a banda inferior, possivelmente,

é referente a amplificação inespecífica, ocorrendo a alteração da temperatura de pareamento para aumento da especificidade. Apesar do ajuste, foi necessário o isolamento do produto de PCR a partir do gel de agarose *low melting*. Após passar por um processo de purificação, o produto de PCR foi preparado para o sequenciamento.

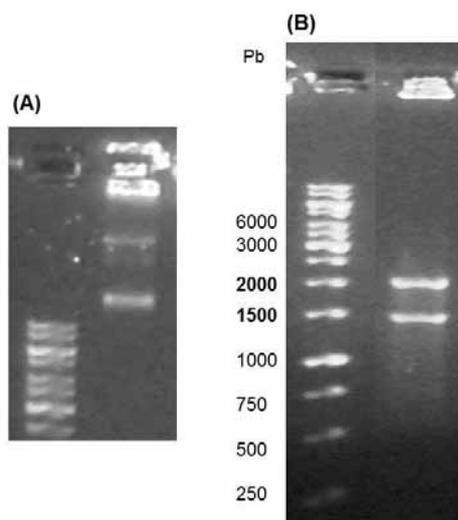


Figura 15 – Gel de agarose 1%. (A) DNA genômico do mutante 11C09. (B) Produto de PCR do DNA genômico do mutante 11C09 amplificado com os primers específicos de XAC1201. M= Marcador molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas®); DG= DNA genômico; PP= Produto da PCR.

O resultado do sequenciamento do mutante foi bem sucedido, tendo a ORF inteira sido sequenciada. A partir desse resultado, foi possível identificar o local de inserção do transposon *Tn5* no genoma, que ocorreu entre as bases 1.371.409 e 1.371.410, correspondentes às bases 727 e 728 da ORF XAC1201 (Figura 16), ou seja, na sua porção 3'. Na proteína codificada pela ORF XAC1201, corresponde a uma interrupção no códon da prolina (P), aminoácido 244 da sequência de um total de 272 da proteína (Figura 17).

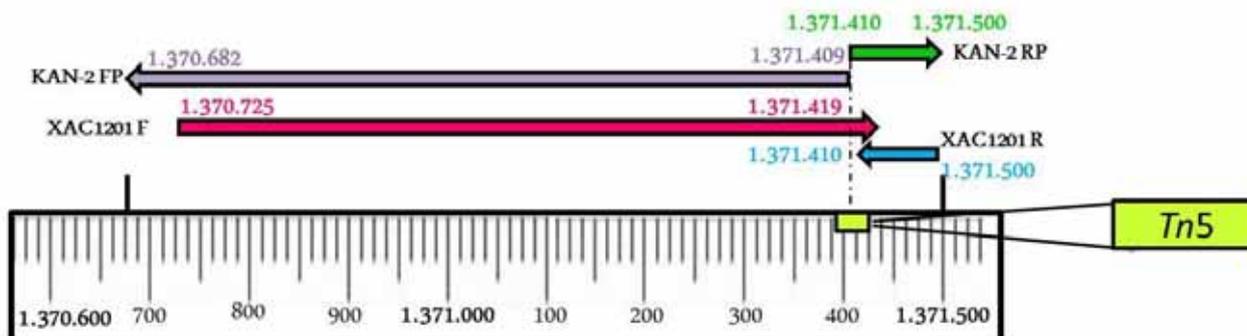


Figura 16 - Esquema em escala aproximada da posição do transposon *Tn5* (verde) interrompendo a ORF XAC1201 (barra em preto). As setas coloridas mostram a direção de amplificação dos *primers* do transposon (KAN-2 FP e KAN-2 RP) e da ORF XAC1201 (XAC1201 F e XAC1201 R).

```

1 atgaagttggaggcgttgttcgaccagttgcacacctgcccacc 45
1 M K L E A L F D Q L H T L P T 15
46 gtgccaaggtggcgcaagacctgatccgtcaattcgacgatccg 90
16 V P K V A Q D L I R Q F D D P 30
91 cagaccgatatcgatacgtggcgcacagtatcgagcgcgatccg 135
31 Q T D I D T L A H S I E R D P 45
136 gtgatcgccgccaagtgttgcggtggccaattcgcgcgcttc 180
46 V I A A K V L R L A N S A R F 60
181 catggcttgcgcgattccaccagcgtggaagacgcggccatg 225
61 H G L R D S T S V E D A A M R 75
226 ctgggcttcaacaccctgcgcacgctgggtgctggcgatg 270
76 L G F N T L R T L V L A S A M 90
271 actggcgcttccgggctggcccgggcttcgacctcaaggccttc 315
91 T G A F R A G P G F D L K A F 105
316 tggcggcacagtttcgaagtggccggcatctgccgctgctggcg 360
106 W R H S F E V A G I C R L L A 120
361 gccagcaggggtggaccgggagacggccttcacctgcccgatg 405
121 R Q Q G V D P E T A F T C G M 135
406 atgcacaacatcggcgagctcttgatccagtcgggtgcgcggaa 450
136 M H N I G E L L I Q S G A P E 150
451 tacgccagccgatcaatcacgaaacctcctctgccggtcatg 495
151 Y A S R I N H E T S S A G H A 165
496 gccgaagaaacctgcaactgggcttcggctatccggaagtccgg 540
166 A E E T L Q L G F G Y P E V G 180
541 gccgagctggcacggcgctggcagttgccggtgggtgatccaggaa 585
181 A E L A R R W Q L P V V I Q E 195
586 gccatcggtatcaggtccggcctgcgcggccccggacgggtgcg 630
196 A I G Y Q V R P A A A P D G A 210
631 cgcatgccattgctggtggcccaggcggtaactggtctcgatg 675
211 R M P L L V A Q A V L V C D A 225
676 ctgcatgcgatggcgcgccaacgcggcgccattggaagcgata 720
226 L H A H G G A N A A A L E A I 240
721 cgcagcaccgctgatgacggcggtgatctggacgcgtgttcgcc 765
242 R S P L M D G V D L D A L F A 255
766 gcgttgccggaggtcatcgaggcagatcgcgcccttgcggagttg 810
256 A L P E V I E A D R A F A E L 270
811 ctgcactaa 819
271 L H * 272

```

Figura 17 – Sequência de nucleotídeos da ORF XAC1201 e sequência de aminoácidos codificada. Os números em preto indicam a sequência de nucleotídeos e os em vermelho indicam a sequência de

aminoácidos. As metioninas presentes na sequência estão indicadas em azul e o códon de terminação está indicado em lilás. As bases 727 e 728, entre as quais o transposon *Tn5* se inseriu estão indicadas em vermelho. O códon ccg do qual elas fazem parte codifica o aminoácido prolina (P), marcado em vermelho.

### 5.3 Construção e Confirmação da Expressão do Plasmídeo His-SUMO-1201

O produto da PCR da ORF XAC1201, contendo 819 pares de bases (Figura 17), teve seu tamanho confirmado em gel de agarose (Figura 18) e foi inserido diretamente no vetor de expressão pET SUMO por ser este um vetor TA que permite a ligação direta por complementaridade da base timina, presente nas extremidades do vetor aberto, com a base adenina, presente nas extremidades do inserto. O produto da ligação contendo o vetor com o inserto ligado foi inserido em *E. coli* DH10B. O DNA plasmidial de algumas colônias foram purificados e sequenciados, o que permitiu a identificação de plasmídeos contendo o inserto inserido na orientação correta (resultados não apresentados). Como se trata de uma clonagem não direcional, o inserto pode se ligar ao plasmídeo nas duas orientações, sendo que apenas uma delas a metionina inicial da proteína estará em fase com a proteína SUMO do vetor de expressão. Um plasmídeo contendo a orientação correta da região codificadora da ORF XAC1201 foi então utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Após a transformação, foi feita a indução de dois clones selecionados para verificar a expressão do vetor com a construção correta.

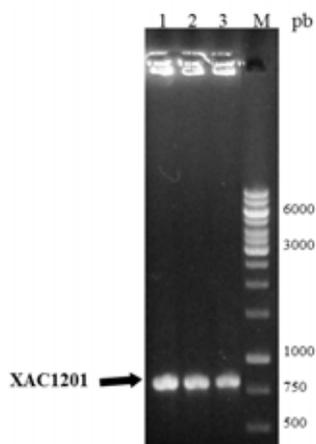


Figura 18 – Gel de agarose 1%. Produto de PCR de 819 pb da ORF XAC1201. 1, 2 e 3 - repetições. M - marcador molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas®).

MGSSHHHHHGSGLVPAGSASMSDSGVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLM  
 EAFAKRQ GKEMDSLRF LYDGI RIQADQTPEDLDMEDNDI IEAH**REQIGG**MKLEALFDQLHTLPTVPKVAQ  
 DLIRQFDDPQTDIDTLAHSIERDPVIAAKVLRRLANSARFHGLRDSTSVEDAAMRLGFNTLRTLVLASAMT  
 GAFRAGPGFDLKA FWRHSFEVAGICRLLARQQGVDPEFTAFTCGMMHNI GELLIQSGAPEYASRINHETSS  
 AGHAAEETLQLGFGYPEVGAELARRWQLPVVIQEAIGYQVRPAAAPDGARMPLLLVAQAVLVCDALHAHGG  
 ANAAALEAIRSPLMDGVLDLALFAALPEVIEADRAFAELLH

Figura 19 – Sequência de aminoácidos da proteína de fusão His-SUMO-XAC1201. O total de aminoácidos da proteína é de 391. As seis histidinas (H) estão mostradas em amarelo; a sequência da SUMO proteína está mostrada em azul, com o sítio de reconhecimento da SUMO protease em negrito e sublinhado; a sequência da XAC1201 está mostrada em cinza, com a clivagem ocorrendo entre a última glicina da SUMO e a metionina da XAC1201.

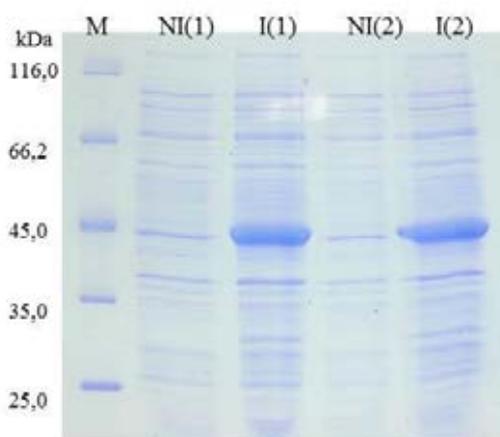


Figura 20 – Expressão em pequena escala, de dois clones (1 e 2), da construção His-SUMO-1201, a 37°C, 4h. M – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*® – Fermentas. NI – amostra não induzida com IPTG 0,4 mM. I – amostra induzida com IPTG 0,4 mM.

A proteína de fusão His-SUMO-XAC1201 possui 391 aminoácidos (Figura 19), sendo o seu *pI* teórico predito de 5,48, característico de uma proteína ácida, e a massa molecular teórica predita de 42,6 kDa ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)).

Comparou-se em gel de SDS-PAGE o perfil de proteínas de dois clones antes (não induzido) e após a indução com IPTG (induzido), para verificar a expressão de proteína na ausência e na presença do indutor. Uma proteína com peso aparente de cerca de 45 kDa teve a expressão induzida na presença de IPTG (Figura 20), o que está em bom acordo com o valor esperado para a proteína de fusão His-SUMO-XAC1201. É sabido que algumas proteínas apresentam massa molecular aparente em SDS PAGE ligeiramente diferente de sua massa molecular real, devido principalmente a presença de cargas que interferem na sua associação com o SDS ou pela presença de estrutura secundária não desfeita pelo SDS, como também observado por Bruderer et al., 2011. Como observado na Figura 20, não houve diferença de expressão entre os dois clones selecionados. Portanto, foi escolhido o clone 1 para a expressão da proteína em larga escala.

A expressão heteróloga em *E. coli* tem sido uma ferramenta bastante utilizada em biologia molecular por este ser um organismo versátil, com características atrativas, que incluem sistema de vetor portátil, genética relativamente simples e rápido crescimento (HUNT, 2005; SAMUELSON, 2011, WU et al., 2014). De acordo com as estatísticas do *Protein Data Base* (PDB) de 2013, 76,69% das pesquisas com expressão heteróloga utilizam *E. coli* como organismo fonte de expressão. Além disso, o sistema de expressão pET contendo o gene da RNA polimerase do fago T7 é seguramente o mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Esses fatores, juntamente com a escolha das células de expressão, BL21 (DE3) pLysS, que promovem altos níveis de expressão da proteína de interesse (SAMUELSON, 2011), favoreceram a expressão adequada do gene e da proteína recombinante neste trabalho.

#### **5.4 Padronização das Condições de Expressão de His-SUMO-1201 na forma solúvel**

A determinação das melhores condições de expressão da proteína na forma solúvel foi feita variando os fatores tempo de indução (2h, 4h, 8h, 16h e 24h), temperatura de indução (16°C, 20°C, 28°C e 37°C) e concentração do indutor IPTG (0,1 mM, 0,2 mM e 0,4 mM) (Figura 21).

Como observado na Figura 21, as condições em que a proteína foi expressa em grande quantidade de forma solúvel foram nas temperaturas de 20°, 28° e 37°C na presença de 0,2 mM de IPTG, a partir de onde houve diminuição da quantidade de proteína na concentração de 0,4 mM de IPTG. A maior quantidade de proteína solúvel em relação à proteína precipitada (insolúvel) foi observada em 4h e 8h a 28°C e 24h a 20°C, enquanto que a 16°C houve pouca quantidade de proteína sendo expressa (dados não apresentados).

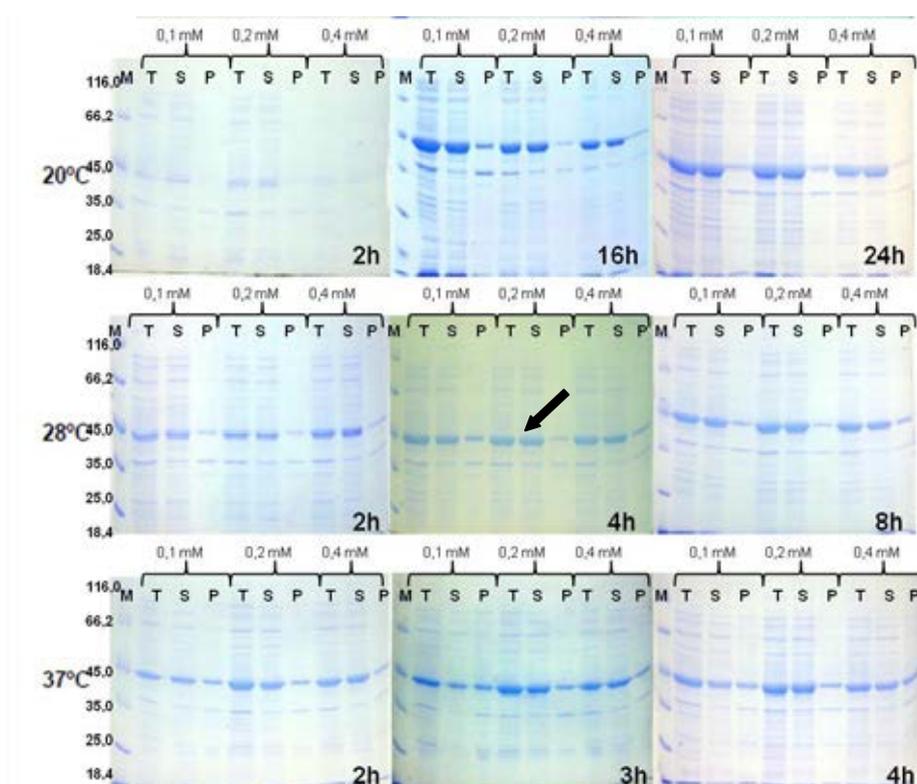


Figura 21 - Ensaio de solubilidade de His-SUMO-XAC1201 em SDS-PAGE. A seta preta indica a condição de expressão escolhida (28°C, 4h, 0,2 mM IPTG). T – proteína total; S – sobrenadante; P – precipitado; M – marcador molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas).

A padronização de alguns fatores para a otimização e refinamento das condições de expressão e purificação é realizada por meio do ensaio de solubilidade (HUNT, 2005). Um estudo comparativo entre a expressão de proteína recombinante e ensaios de solubilidade em *E. coli* comparou vários fatores interferentes na metodologia de expressão heteróloga, utilizados rotineiramente em 8 diferentes laboratórios, a fim de padronizar esses fatores. Em relação às variáveis determinantes do ensaio de solubilidade, como concentração de indutor, tempo e temperatura de indução, constatou-se que o IPTG é um indutor adequado para os ensaios, e que os menores tempos e as menores temperaturas de indução acompanham os melhores resultados (BERROW et al., 2006).

Sabe-se que temperaturas mais baixas de indução tem efeito nítido no envelhecimento e estabilidade das proteínas, além de frequentemente aumentarem a produção de proteínas solúveis (KANE, 1995). Entretanto, a temperatura de 28°C foi considerada a melhor temperatura para padronização dos experimentos deste trabalho, devido a maior quantidade de proteína solúvel produzida, e levando em consideração que quanto mais próximo à temperatura ótima de crescimento da *E. coli*, maior é a taxa de crescimento e mais expressiva a produção de células (JECHLINGER et al., 1999).

Concernente ao tempo de indução, Berrow e colaboradores (2006) testaram a indução da expressão em *E. coli* nas diferentes fases log: inicial, estacionária e tardia, e constataram melhores resultados na fase log inicial, ou seja, com menor tempo de indução. Desse modo, procurou-se a intermediação entre a menor temperatura e o menor tempo de indução para obter as maiores quantidades de His-SUMO-XAC1201 na forma solúvel, sendo encontrada essa condição no tempo de 4h de indução a 28°C.

A concentração de IPTG em que houve maior quantidade de proteína His-SUMO-XAC1201 expressa foi de 0,2 mM, havendo uma diminuição na quantidade com o aumento da concentração de IPTG. Esse fato é corroborado por Malakar e Venkatesh (2012), que estudaram a diminuição da taxa de crescimento de *E. coli* em glicerol na presença de IPTG utilizando o sistema Lac. Os autores testaram várias concentrações de IPTG (0 a 0,3 mM), onde inicialmente observou-se que,

acompanhando o aumento da concentração, houve redução crescente da taxa de crescimento de *E. coli* acima de 0,1 mM de IPTG, atingindo a saturação de  $\beta$ -galactosidase a 0,25 mM. Relatou-se ainda que, concentrações de IPTG acima de 0,2 mM, podem sobrecarregar a célula (KRZEWINSKI et al., 1996), prejudicando a expressão proteica.

A fim de escolher entre as melhores condições de expressão aquela que seria padronizada para os testes seguintes, consideraram-se as temperaturas abaixo da temperatura ótima de crescimento da *E. coli*, 37°C, além do tempo mais favorável à agilidade dos experimentos. Desse modo, a condição padronizada para a expressão de His-SUMO-XAC1201 foi a 28°C e 250 rpm por 4h na presença de 0,2 mM IPTG.

### **5.5 Purificação de His-SUMO-1201 por IMAC**

A purificação ocorreu conforme esquema apresentado na Figura 22.

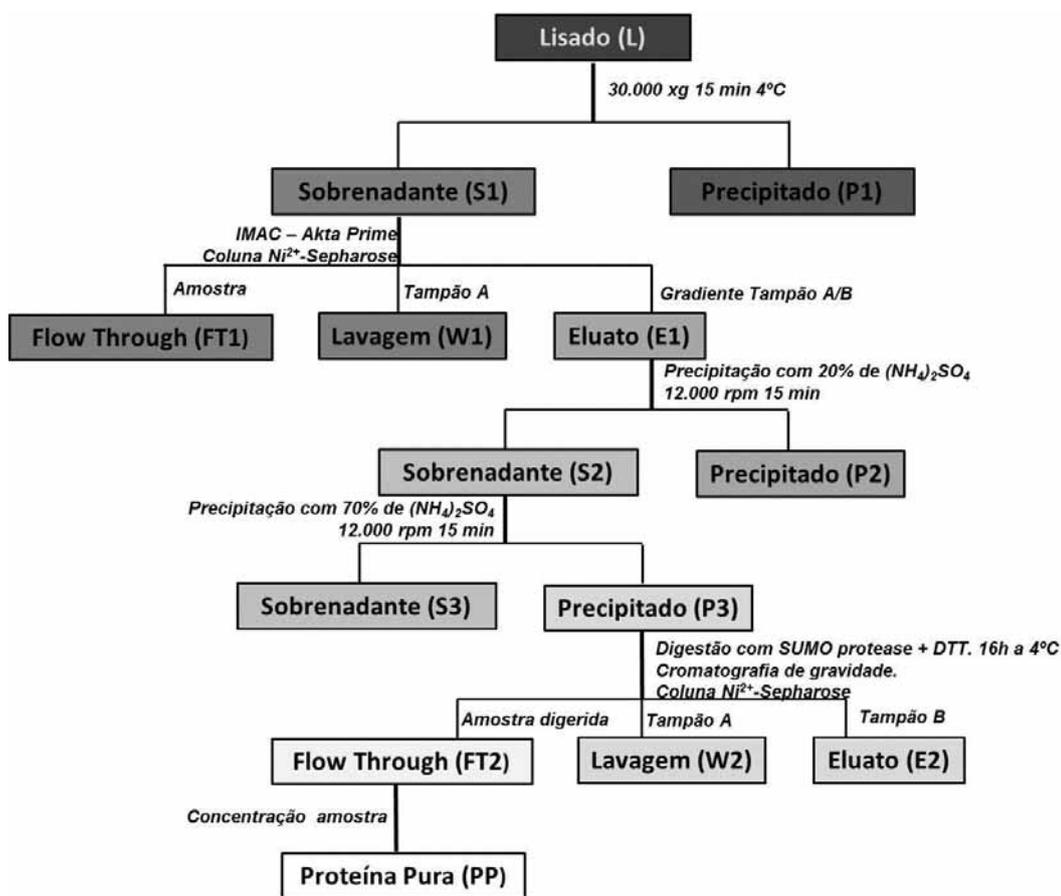


Figura 22 - Esquema das etapas da purificação da His-SUMO-1201, do lisado até a obtenção da proteína pura. O gradiente de cor representa a purificação obtida em cada etapa, sendo o mais escuro, a amostra com maior grau de contaminantes e o mais claro, a proteína purificada.

Embora o sistema T7 permita a expressão de altos níveis proteicos, é relatado na literatura que a taxa de síntese proteica pode ultrapassar o processamento e enovelamento proteico, resultando na inibição do crescimento das células de *E. coli* e promovendo a formação de corpos de inclusão (WU et al., 2014), que podem ser observados na fração insolúvel após a lise celular. Diante disso, a expressão pelo sistema T7 foi considerada satisfatória neste trabalho, visto que a pequena quantidade de proteína recombinante presente na fração insolúvel após o rompimento das células de *E. coli* (Figura 23A), é atribuída principalmente ao método de lise utilizado, sonicação, do que pela formação de corpos de inclusão. Após a lise, o sobrenadante S1 foi levado para as etapas de purificação até atingir o grau de pureza desejado.

A proteína de fusão utilizada para a expressão de XAC1201 é uma porção da proteína SUMO, *small ubiquitin-related modifier*, que se liga covalentemente a outras proteínas. Quando fusionada na extremidade N-terminal de proteínas, pode enovelá-las e protegê-las por suas propriedades de chaperona. Entre as vantagens de seu uso estão o aumento da expressão proteica, diminuição da degradação proteolítica, aumento do enovelamento e solubilidade da proteína e simplificação da purificação e detecção (LI et al., 2010). Essas características favoreceram a purificação de His-SUMO-XAC1201 por IMAC, que pode atingir em um único passo uma purificação acima de 95%, com recuperação de 90% (BORNHORST; FALKE, 2000; SARASWAT et al., 2013).

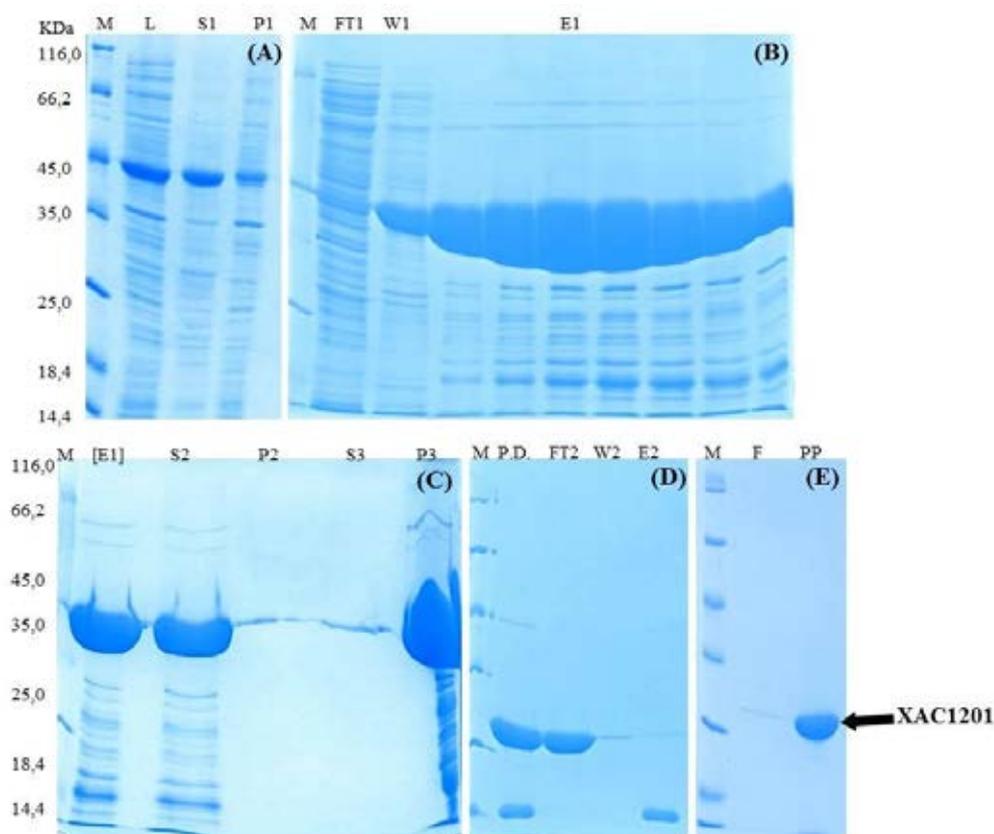


Figura 23 – SDS-PAGE das etapas da purificação de XAC1201. (A) Amostra proteica após sonicação: L – lisado; S1 – sobrenadante inicial; P1 – precipitado inicial. (B) Frações da cromatografia: FT – Flow Through; W1 – lavagem; E1 – eluato. (C) Precipitação com sulfato de amônio: [E1] – frações do eluato concentradas; S2 – sobrenadante a 20% de precipitação; P2 – precipitado a 20% de precipitação; S3 – sobrenadante a 70% de precipitação; P3 – precipitado a 70% de precipitação. (D) Cromatografia por gravidade: P.D. – amostra após

digestão com SUMO protease; FT2 – flow through; W2 – lavagem; E2 – eluato. (E) Amostra concentrada: F – sobrenadante do filtro; PP – proteína pura. M – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*® – Fermentas.

Observando a Figura 23B, nota-se que houve uma grande quantidade de contaminantes eliminados nas fases *flow through* e uma grande quantidade de proteína recombinante eluída. Apesar de haver ainda contaminantes junto com a proteína recombinante eluída, devido a presença de proteínas que naturalmente são ligantes de metal ou que possuem regiões ricas em histidina e cisteína, levando à competição com a proteína de fusão e ligação à coluna (SARASWAT et al., 2013), a proporção desses é pequena em comparação com a proteína de interesse eluída.

Na Figura 24 é apresentado o perfil cromatográfico resultante da purificação na coluna de  $\text{Ni}^{2+}$ , em que nota-se o pico de absorvância a 280 nm que representa a eluição da proteína recombinante da coluna.

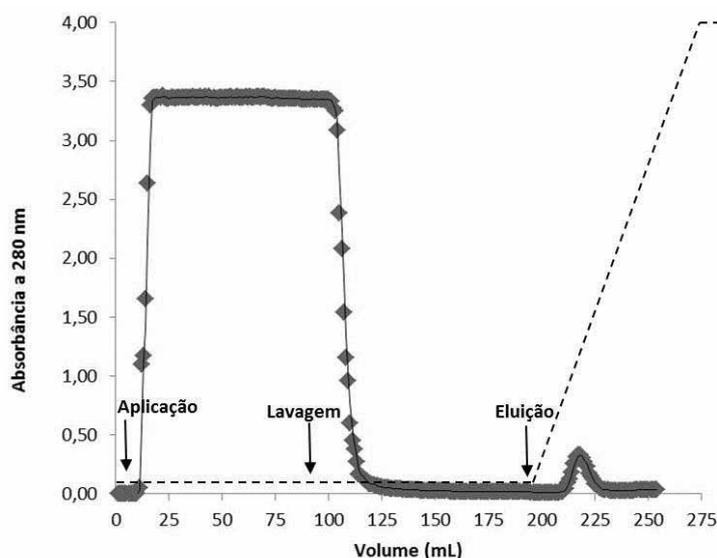


Figura 24 – Perfil cromatográfico da separação de His-SUMO-1201 do lisado de *E.coli* pela coluna de resina de  $\text{Ni}^{2+}$ . Tamanho da coluna: 5,0 mL; Tampão de carregamento e lavagem (A): 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 mM imidazol, 500 mM NaCl, 5% glicerol; Taxa de fluxo: 2,0 mL/min; Gradiente de eluição (linha pontilhada) de 100% do Tampão A a 100% do Tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM imidazol, 500 mM NaCl, 5% glicerol); Volume de eluição: 60 mL.

Apesar da grande eficiência da técnica IMAC, somente a cromatografia por afinidade não foi suficiente para purificar a amostra com o grau de pureza desejado,

e, segundo Saraswat e colaboradores (2013), a cromatografia de afinidade é sempre auxiliada de outro método de purificação. Para tanto, realizou-se a precipitação com sulfato de amônio (*salting out*) a 20% e a 70% de saturação (Figura 23C), que permitiu a limpeza e concentração do material pela saturação seletiva de proteínas.

A precipitação ocorre quando uma substância solúvel torna-se insolúvel pela mudança crucial nos parâmetros químicos e físicos ambientais. Uma vez que para a recuperação do precipitado é necessário somente uma separação sólido-líquido (centrifugação), a precipitação intencional de proteínas de interesse, em condições não desnaturantes, há muito tem sido uma ferramenta eficaz para a bioseparação (HILBRIG; FREITAG, 2003). À medida que o sal é adicionado à amostra proteica, seus íons tornam-se solvatados, e as moléculas livres de água tornam-se escassas, levando primeiramente a precipitação daquelas proteínas com maior número de resíduos polares e posteriormente àquelas com menor quantidade de resíduos polares (SCOPES, 1993).

Sabendo que a porcentagem de saturação da proteína His-SUMO-XAC1201 recombinante está entre 40% e 60%, é possível separar as proteínas contaminantes pelas diferentes porcentagens de saturação. Nesse sentido, o *salting out* foi utilizado nas frações de 20% e 70% de saturação de sulfato de amônio (Figura 23C). No entanto, existem muitas proteínas que coprecipitam com a proteína de interesse e, com isso, sua separação não é alcançada por esta técnica (FONG; WU; WOOD, 2009). Porém, a grande vantagem do *salting out* neste trabalho foi para a diminuição do volume da amostra, uma importante aplicação desta técnica (SCOPES, 1993), também utilizada por Wang e colaboradores (2008). A fração do precipitado de 70% de saturação com sulfato de amônio foi ressuspensa em 3,0 mL do tampão A2, para que, além da diminuição do volume inicial da amostra, fosse diminuída a concentração de sal e imidazol, que são inibidores na reação de digestão com a SUMO protease.

Uma vez que a amostra com a proteína recombinante está, em grande parte, livre de contaminantes, ainda é necessário obter a proteína nativa, de não-fusão, pela clivagem do peptídeo da porção N-terminal da proteína de fusão, o qual contém a cauda de histidina e a proteína SUMO (Figura 23D, linha P.D.). A presença de cauda de afinidade em proteínas recombinantes pode afetar importantes

características ou funções da proteína a ser estudada, com isso é de grande importância sua retirada antes das análises de atividade ou demais estudos. A remoção da cauda pode ser feita com uma protease sítio-específica e a clivagem não deve diminuir a atividade da proteína (TERPE, 2003). No presente caso, a cauda de histidina estava fusionada à proteína SUMO, que por sua vez estava fusionada à proteína XAC1201. A enzima SUMO protease é uma cisteína protease altamente ativa, que reconhece a estrutura terciária da proteína SUMO e cliva especificamente a SUMO conjugada à proteína alvo (Figura 25) (LI; HOCHSTRASSER, 1999; MOSESSEVA; LIMA, 2000).

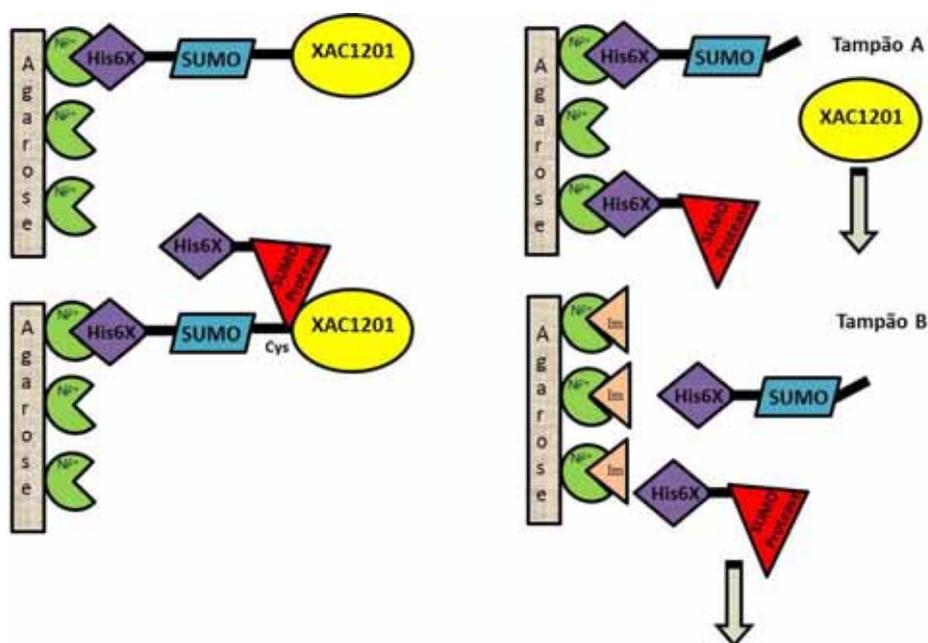


Figura 25 – Esquema representativo da digestão da proteína SUMO pela SUMO protease originando a proteína nativa e a eluição das outras proteínas na presença dos tampões A e B (alta concentração de imidazol-Im). A proteína recombinante está ligada por afinidade à resina com níquel ( $Ni^{2+}$ ) que está imobilizada em uma matriz de agarose.

Como a SUMO proteína e a SUMO protease possuem em suas extremidades N-terminais a cauda de histidina (LI et al., 2010), é possível separá-las da proteína nativa pela passagem da amostra digerida na coluna de afinidade contendo  $Ni^{2+}$ . O volume nesta etapa não é suficiente para a passagem da amostra no cromatógrafo Akta Prime Plus FPLC System (GE, Amersham) e, deste modo, a cromatografia foi realizada em uma coluna de gravidade contendo a resina de Ni-Sepharose® High

Performance Media (GE, Healthcare), que permitiu a ligação das caudas His6X da His-Sumo e da Sumo protease e a eluição da XAC1201 recombinante na presença do tampão de carregamento e lavagem (tampão A2). Somente na presença do tampão B foi possível eluir as caudas His6X da coluna por meio da competição com a alta concentração de imidazol do tampão B (Figura 23D). A clivagem da porção His-SUMO pela SUMO protease resultou na produção da proteína nativa recombinante sem nenhum aminoácido extra entre o sítio de clivagem e a metionina inicial da proteína XAC1201.

Obtida a proteína pura e nativa, é apropriado reduzir o volume total da solução para mantê-la em melhores condições de armazenamento, ou seja, com menor quantidade de sal e solutos que possam levar a sua desnaturação. Isto foi feito com o filtro de *cutoff* 10 kDa da Amicon, com a paulatina substituição do tampão no qual a proteína se encontrava por outro sem imidazol e com menor quantidade de sal (tampão A3). Com um volume final da solução de aproximadamente 4,0 mL, a proteína recombinante XAC1201 (Figura 5E) foi congelada por congelamento instantâneo (*flash freeze*) em nitrogênio líquido antes de ser armazenada a -20°C.

A pureza de XAC1201 foi comprovada por meio de gel desnaturante, SDS-PAGE, corado com Comassie, e outro, corado com nitrato de prata em três diferentes concentrações de proteína: 18,4 µg, 36,8 µg e 73,6 µg. Na Figura 26, observa-se que somente com a maior concentração de proteína (73,6 µg) foi possível visualizar alguns poucos contaminantes de baixa massa molecular no gel corado com Comassie, enquanto que no gel corado com nitrato de prata (maior sensibilidade), a partir de 36,8 µg de proteína é possível visualizar alguns contaminantes na amostra.

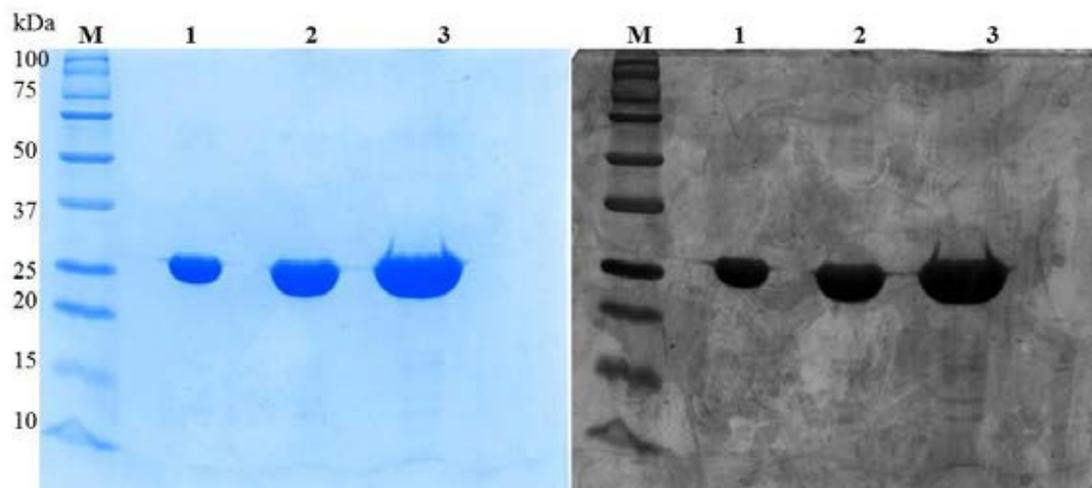


Figura 26 – SDS-PAGE. Gel desnaturante corado com Comassie (à direita) e nitrato de prata (à esquerda) demonstrando a pureza de XAC1201 (3,68 mg/mL) em três volumes diferentes: 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 20  $\mu$ L com as respectivas concentrações de proteína: 1- 18,4  $\mu$ g, 2- 36,8  $\mu$ g, 3- 73,6  $\mu$ g. M- Marcador Molecular: Precision Plus Protein® Kaleidoscope® Standards (BioRad).

A presença dos poucos contaminantes identificados no gel não diminuem a pureza e dificilmente interferem na atividade de XAC1201, visto que somente com uma grande quantidade de proteína pura foi possível visualizá-los, lembrando que os testes de atividade, em geral, são realizados com as menores quantidades de proteína pura possíveis. Desse modo, enfatiza-se que a purificação de XAC1201 recombinante permitiu seu isolamento com um alto grau de pureza, superior a 99%.

### 5.6 Rendimento proteico de XAC1201 no processo de purificação

Todas as etapas do processo de purificação foram quantificadas de modo a permitir o cálculo do rendimento em termos de proteína total. Na Tabela 2 é possível observar o rendimento de três purificações em cada etapa do processo, partindo-se de 1 L de meio inicial. Observando a média das três purificações, nota-se que a recuperação de proteína na fase de lise, apresentada no sobrenadante 1 (S1), foi alta, representando 87,78%. Ademais, na fase de aplicação da amostra no

cromatógrafo, houve eliminação na fase *flow through* (FT1), de grande parte dos contaminantes que compunham a amostra (65,55%), sendo que a recuperação de proteína na fração do Eluato 1 Concentrado [E1], foi de aproximadamente 5% da proteína total, tendo a amostra tornado-se mais pura.

Após o volume da amostra ter sido reduzido pela precipitação com sulfato de amônio, o rendimento de proteína encontrou-se em torno de 4% da proteína total. E, somente depois da segunda cromatografia para a obtenção da proteína recombinante nativa, foi possível obter o rendimento final de proteína pura (PP), com 3,18% da proteína total, sendo que a concentração da PP obtida nas três purificações foram, respectivamente, 17,55 mg/L, 6,60 mg/L e 8,24 mg/L, com uma média de 10,80 mg/L.

**Tabela 2 – Rendimento de três purificações de XAC1201 em todas as etapas do processo de purificação, partindo-se de 1 L de meio de cultura inicial, apresentando a média e o desvio padrão de cada etapa**

<b>Etapas</b>	<b>Cód.</b>	<b>Purif. 1 (mg)</b>	<b>Purif. 2 (mg)</b>	<b>Purif. 3 (mg)</b>	<b>Média</b>	<b>Desv Pad</b>
Lisado	L	385,00	337,50	295,00	339,17	45,02
Sobrenadante 1	S1	337,50	268,38	287,38	297,75	35,71
Precipitado 1	P1	75,80	74,20	101,00	83,67	15,03
Flow Through 1	FT1	245,25	206,10	215,65	222,33	20,41
Lavagem 1	W1	18,00	22,86	28,26	23,04	5,13
Eluato 1 Conc.	[E1]	24,38	17,53	12,28	18,06	6,07
Sobrenadante 2	S2	22,97	17,83	16,03	18,94	3,60
Precipitado 2	P2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sobrenadante 3	S3	73,97	42,11	26,89	47,66	24,03
Precipitado 3	P3	19,50	14,03	9,23	14,25	5,14
Flow Through 2	FT2	14,84	6,92	7,56	9,77	4,40
Lavagem 2	W2	1,39	1,31	1,42	1,37	0,06
Eluato 2	E2	2,92	4,53	6,00	4,48	1,54
Proteína pura	PP	17,55	6,60	8,24	10,80	5,91

## 5.7 Análises por espectrometria de massas e confirmação da identidade da XAC1201

A técnica espectrométrica utilizada (MS/MS), possui dois estágios de espectrometria de massas ( $MS_1$  e  $MS_2$ ). No primeiro estágio ( $MS_1$ ) é isolado o íon de interesse que, em seguida, é fragmentado na cela de colisão. No segundo estágio ( $MS_2$ ) é feita a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse isolado em  $MS_1$  para obtenção do espectro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Essa técnica é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (VÉKEY, 2001; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A espectrometria de massas é, contudo, amplamente utilizada para fins de identificação e confirmação da sequência de aminoácidos. Como exemplo, essa técnica foi utilizada em um trabalho para identificação da sequência de aminoácidos de uma proteína recombinante da raiz de milho (MENCKHOFF et al., 2013) e, também, para a confirmação da sequência do hormônio de crescimento humano clonado em sementes de soja transgênica (CUNHA et al., 2011).

Por meio das análises de espectrometria de massas, nesse trabalho, foi possível a confirmação da identidade de XAC1201 recombinante. Houve uma ótima cobertura de análise da sequência de aminoácidos (>84,56%), enfatizando a confiabilidade dos resultados (Figura 27) e não deixando nenhuma dúvida de que a proteína induzida e purificada corresponde de fato à XAC1201. Na Tabela 3 são apresentadas as sequências dos peptídeos identificados da proteína recombinante em três repetições. Foram identificados 19, 21 e 20 peptídeos para as repetições R1, R2 e R3, respectivamente. De forma geral, a maioria das sequências peptídicas identificadas foi encontrada nas três repetições, com exceção de duas sequências que foram identificadas, exclusivamente, em R2 (nº 14 e 17) e duas em R3 (nº 19 e

20). Observa-se, também, que quatro peptídeos tiveram os maiores PSMs (*peptide spectrum matches*), acima de 19, ou seja, esses foram os peptídeos mais encontrados nas análises, visto que o PSM reflete a correlação existente entre o espectro teórico, formado pela digestão virtual e processamento do banco de proteínas e o espectro experimental, gerado a partir da fragmentação e análise dos espectros dos peptídeos mais abundantes.

<p><b>MKLEALFDQLHTLPTVPKVAQDLIRQFDDPQTDIDTLAHSIERDPVIAAKVLRRLANSARFHGLRDSTSVEDA</b>  <b>AMRLGFNTRLRTLVLASAMTGAFRAGPGFDLKAFWRHSFEVAGICRLLARQQGVDPETAFTCGMMHNIGEL</b>  <b>LIQSGAPEYASRINHETSSAGHAAEETLQLGFGYPEVGAELARRWQLPVIQEAIGYQVRPAAAPDGARM</b>  <b>PLLVAQAVLVCDALHAHGGANAAALEAIRSPLMDGVLDLALFAALPEVIEADRAFAELLH</b></p>
--

Figura 27 – Sequência de aminoácidos de XAC1201 identificados por espectrometria de massas, com destaque para os peptídeos em negrito.

A sobreposição dos espectros teóricos e experimentais é expressa quantitativamente por meio de uma pontuação para cada peptídeo (*Xcorr*). O *Xcorr* é um parâmetro que depende de vários fatores, como o tamanho do banco de dados usado para a busca e a massa/carga de cada peptídeo, ou seja, quanto maior um peptídeo, maior sua carga/massa e maior será a pontuação obtida (CANTÚ et al., 2008). O *Xcorr* dos peptídeos mais abundantes em cada repetição foi de 7,36 para o peptídeo mais abundante na primeira repetição (PSM = 36); 7,27 para o mais abundante na segunda repetição (PSM = 34); e 6,57 para o mais abundante na terceira repetição (PSM = 40). Ainda, por ocasião da alquilação realizada na etapa de digestão dos peptídeos, as cisteínas sofreram carbamidometilação e algumas metioninas sofreram oxidação, sendo estas apresentadas na Tabela 3 com letras minúsculas.

Uma vantagem da espectrometria de massas é o fornecimento de uma identificação absoluta. Porém, essa técnica não fornece só a informação estrutural da molécula de interesse, como também, o peso molecular e o ponto isoelétrico (pI) do analito (ARDREY, 2003). Outra vantagem está na sensibilidade da técnica, sendo que um escaneamento completo de espectros e, potencialmente de identificação, podem ser obtidos com picogramas (pg) de analito. Ademais, é um tecnica usada

para fornecer informações quantitativas, em geral, de níveis baixos, com alta acurácia e precisão (ARDREY, 2003).

Temos então resultados que indicam que a proteína obtida encontra-se altamente purificada e que de fato trata-se da XAC1201. O resultado do dicroísmo circular realizado (dado não apresentado) revelou que a proteína encontra-se enovelada e é rica em estrutura secundária do tipo alfa-hélice, sugerindo que a proteína está na sua conformação nativa e, portanto, apta a ser utilizada em estudos funcionais de atividade.

**Tabela 3 – Sequências de peptídeos de três repetições da proteína recombinante XAC1201 identificadas por espectrometria de massas. Score: pontuação obtida pela análise dos espectros. Cobertura: porcentagem de peptídeos identificados. PSMs (peptide spectrum matches): correlação entre o espectro teórico e o espectro experimental. Xcorr: pontuação obtida pela sobreposição**

Nº	DESCRÇÃO		SCORE	COBERT.	DESCRÇÃO		SCORE	COBERT.	DESCRÇÃO		SCORE	COBERT.
	SEQUÊNCIAS	PSMs	768,15	85,66%	SEQUÊNCIAS	PSMs	797,87	84,56%	SEQUÊNCIAS	PSMs	786,93	87,50%
1	INHETSSAGHAAEETLQGFYPEVGAELAR	19	7,93	INHETSSAGHAAEETLQGFYPEVGAELAR	34	7,27	INHETSSAGHAAEETLQGFYPEVGAELAR	29	7,80			
2	mPLLVAQAVLVCDALHAHGGANAALAEAIR	36	7,36	mPLLVAQAVLVCDALHAHGGANAALAEAIR	20	6,95	mPLLVAQAVLVCDALHAHGGANAALAEAIR	16	7,71			
3	mPLLVAQAVLVCDALHAHGGANAALAEAIR	19	7,09	MPLLVAQAVLVCDALHAHGGANAALAEAIR	31	6,61	MPLLVAQAVLVCDALHAHGGANAALAEAIR	40	6,57			
4	RWQLPVVIQEAIGYQVRPAAPDGAR	5	6,87	RWQLPVVIQEAIGYQVRPAAPDGAR	10	6,44	LGFNTRLRLVLASAMTGAFR	2	5,83			
5	LGFNTRLRLVLASAMTGAFR	2	6,27	LGFNTRLRLVLASAMTGAFR	2	6,14	QQGVDPETAFTCGMMHINIGELLIQSGAPEYASR	5	5,49			
6	SPLmDGVLDLDAALFAALPEVIEADR	7	5,61	QQGVDPETAFTCGmmHINIGELLIQSGAPEYASR	4	4,97	RWQLPVVIQEAIGYQVRPAAPDGAR	8	5,36			
7	SPLMDGVLDLDAALFAALPEVIEADR	8	5,25	SPLmDGVLDLDAALFAALPEVIEADR	4	4,92	SPLMDGVLDLDAALFAALPEVIEADR	6	5,02			
8	QFDDPQTDIDTLAHSIER	5	4,69	SPLMDGVLDLDAALFAALPEVIEADR	6	4,88	SPLMDGVLDLDAALFAALPEVIEADR	5	4,86			
9	QQGVDPETAFTCGmmHINIGELLIQSGAPEYASR	6	4,67	QQGVDPETAFTCGmmHINIGELLIQSGAPEYASR	4	4,64	QQGVDPETAFTCGmmHINIGELLIQSGAPEYASR	7	4,69			
10	QQGVDPETAFTCGMMHINIGELLIQSGAPEYASR	6	4,65	WQLPVVIQEAIGYQVRPAAPDGAR	8	4,51	WQLPVVIQEAIGYQVRPAAPDGAR	6	4,64			
11	QQGVDPETAFTCGMmHINIGELLIQSGAPEYASR	6	4,63	QQGVDPETAFTCGMMHINIGELLIQSGAPEYASR	5	4,41	QQGVDPETAFTCGMmHINIGELLIQSGAPEYASR	4	4,26			
12	WQLPVVIQEAIGYQVRPAAPDGAR	9	4,57	QFDDPQTDIDTLAHSIER	8	4,28	QFDDPQTDIDTLAHSIER	5	3,95			
13	TLVLASAMTGAFR	30	3,63	FHGLRDSTSVEDAAMR	5	3,99	mKLEALFDQLHTLTPVK	3	3,90			
14	LEALFDQLHTLTPVK	1	3,47	AFWRHSFEVAGIGR	1	3,84	TLVLASAMTGAFR	28	3,68			
15	FHGLRDSTSVEDAAMR	2	3,43	mKLEALFDQLHTLTPVK	1	3,69	FHGLRDSTSVEDAAMR	4	3,54			
16	mKLEALFDQLHTLTPVK	1	3,07	MKLEALFDQLHTLTPVK	2	3,64	QFDDPQTDIDTLAHSIERDPVIAAK	1	3,17			
17	QFDDPQTDIDTLAHSIERDPVIAAK	2	3,05	LGFNTRLRLVLASAmTGAFR	1	3,58	MKLEALFDQLHTLTPVK	1	3,17			
18	HSEVAGIGR	4	2,90	TLVLASAMTGAFR	27	3,40	LEALFDQLHTLTPVK	1	2,77			
19	DSTSVEDAAMR	1	2,53	LEALFDQLHTLTPVK	1	3,04	AGPGFDLKAFWR	1	2,75			
20				DSTSVEDAAMR	1	2,67	DPVIAAKVLR	1	2,63			
21				HSEVAGIGR	2	2,64						

**entre os espectros teóricos e experimentais de cada peptídeo**

## 5.8 Caracterização bioquímica da proteína XAC1201

### 5.8.1 Atividade de XAC1201 como fosfatase e histidina quinase

As fosfatases são hidrolases que agem sobre compostos de fósforo, e são encontradas em diversas formas moleculares, podendo ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, dependendo do pH necessário para o desenvolvimento de sua atividade ótima. A catálise enzimática, em geral, é caracterizada pela interação entre o substrato e o sítio ativo. A atividade das enzimas depende de uma série de fatores, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, temperatura, pH, íons, inibidores, entre outros (NAKAGI, 2007).

Inicialmente, testou-se a atividade de XAC1201 como uma fosfohidrolase, desse modo, foram realizados testes para medir a presença de fósforo inorgânico liberado no meio de reação pela quebra dos substratos, que foram a adenosina-5'-trifosfatásica (ATP), o p-nitrofenilfosfato (PNPP), o piridoxalfosfato (PLP) e o pirofosfato.

Na Tabela 4 observam-se os resultados dos testes com alguns substratos (adenosina-5'-trifosfatásica (ATP), piridoxalfosfato (PLP) e pirofosfato). Para a maioria dos testes (ATPase, ATPase com  $MgCl^{2+}$ , ATPase com His 1 mM, Pirofosfatase e PLPase), observa-se que os valores de absorbância foram negativos. Isso pode ser explicado devido ao fato de que um meio de reação contém variações normais pelos erros de pipetagem e, pelo fato da amostra não ter apresentado atividade, a leitura fica comprometida quando é extremamente baixa (próxima de zero). Dessa forma, os resultados com absorbância negativa são considerados “nulos” ou “zero”, visto que o branco da reação pode estar absorvendo mais luz no comprimento de onda determinado, no caso 355 nm, do que os tubos contendo a enzima, indicativo de que não houve atividade enzimática.

Com o intuito de verificar a atividade de quinase da XAC1201, adicionou-se histidina no meio de reação numa tentativa de otimizar a reação de fosforilação no

teste de ATPase. Observando a Tabela 4, nota-se que houve um início de atividade de ATPase na presença de histidina (Abs: 0,103).

A influência de diferentes íons metálicos sobre a atividade fosfatásica tem sido estudada com o objetivo de se investigar a importância desses para a estabilidade e, principalmente, para a atividade de fosfatase de diferentes origens (FERNLEY, 1971; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; GENGE et. al., 1998; SATO, 2011). Nesse sentido, a adição do íon magnésio ao tampão de reação foi feita com o intuito de otimizar a atividade de XAC1201, devido aos seus vários domínios de fosfohidrolase dependentes de metal, íons como magnésio podem funcionar como cofatores da atividade específica. Os testes com os substratos de pirofosfatase e pirofosfatase (PLPase) não se mostraram eficientes para elucidação da atividade de XAC1201. Mesmo com as modificações feitas, como adição de íon magnésio ou aumento da quantidade de enzima, os resultados apontam que esses substratos não são apropriados para a atividade da enzima.

**Tabela 4 – Valores de absorvância a 355 nm, dos resultado das atividades de ATPase (com e sem  $MgCl^{2+}$ ), com His 1 mM, Pirofosfatase (com e sem  $MgCl^{2+}$ ) e PLPase (com 1 e 5  $\mu L$  de enzima) de XAC1201, feito em triplicata e apresentando a média geral**

Testes	R1	R2	R3	Média
ATPase	-0,102	-0,107	-0,116	-0,108
ATPase com $MgCl^{2+}$	0,022	-0,031	0,002	-0,002
ATPase com His 1 mM	0,063	0,079	0,166	0,103
Pirofosfatase	-0,002	-0,034	-0,014	-0,017
Pirofosfatase com $MgCl^{2+}$	0,011	0,023	0,017	0,017
PLPase com 1 $\mu L$ de enzima	-0,101	-0,013	-0,085	-0,066
PLPase com 5 $\mu L$ de enzima	0,013	-0,008	-0,029	-0,008

Já na Tabela 5 observa-se que, na presença de histidina, a atividade de PNPPase de XAC1201 foi maior (Abs: 0,170) do que quando esta foi analisada na ausência ou presença do íon magnésio. Quando variou-se a concentração do substrato (2,5 mM e 5 mM de PNPP) e a concentração da enzima (1 e 5  $\mu L$ ), os valores detectados foram muito baixos, demonstrando que não houve atividade significativa de PNPPase de XAC1201. Para verificar se com mais tempo de contato

entre a enzima e o tampão de reação, contendo os íons manganês e magnésio, a atividade enzimática aumentaria, devido à formação de ligações mais estáveis, incubou-se a enzima *overnight*. Com isso, detectou-se aumento da absorvância, chegando próximo de 0,1 a 410 nm, com as maiores concentrações de substrato e enzima (2,5 mM e 5 µL, respectivamente). Apesar disso, esses valores não indicam atividade significativa da enzima.

**Tabela 5 – Valores de absorvância a 410 nm dos resultado das atividades de PNPPase (com e sem MgCl<sup>2+</sup>), com diferentes concentrações de substrato e de enzima, incubados ou não *overnight*, de XAC1201. É apresentada a média geral das duplicatas de cada teste realizado**

	Testes	R1	R2	Média
	PNPPase	0,004	0,000	0,002
	PNPPase com MgCl <sup>2+</sup>	0,112	0,072	0,092
	PNPPase com His 1 mM	0,235	0,106	0,170
	PNPPase com 2,5 mM de substrato e 1 µL de enzima	-0,052	-0,020	-0,036
	PNPPase com 2,5 mM de substrato e 5 µL de enzima	0,006	-0,004	0,001
	PNPPase com 5,0 mM de substrato e 1 µL de enzima	0,013	-0,026	-0,006
	PNPPase com 5,0 mM de substrato e 5 µL de enzima	0,041	0,061	0,051
Incubado <i>overnight</i>	PNPPase com 2,5 mM de substrato e 1 µL de enzima	0,015	-0,002	0,006
	PNPPase com 2,5 mM de substrato e 5 µL de enzima	0,028	0,037	0,032
	PNPPase com 5,0 mM de substrato e 1 µL de enzima	0,032	0,049	0,040
	PNPPase com 5,0 mM de substrato e 5 µL de enzima	0,056	0,094	0,075

### 5.8.2 Dimerização e atividade de ATPase e PNPPase da proteína XAC1201 na presença de diferentes íons

Com indicações que a XAC1201 seja uma histidina quinase, foram realizados experimentos para verificar a possibilidade de formação de dímeros. Nesse sentido,

a mesma foi incubada com diferentes íons antes de ser realizada a atividade de ATPase e PNPPase. Os resultados da Tabela 6 apresentam a média de todas as condições utilizadas para os testes, em que é possível observar que não houve incremento nos valores de atividade pelo acondicionamento da enzima com diferentes íons. Para confirmar os resultados, um gel de poliácridamida nativo foi feito (Figura 28), no qual, também, não foi observada a presença de dímeros em nenhuma condição.

**Tabela 6 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes íons para testar a dimerização proteica**

	Testes	R1	R2	R3	Média
<b>ATPase</b>	Controle (ATP + enzima)	0,073	0,028	0,094	0,065
	ZnCl <sub>2</sub>	-0,023	-0,109	-0,016	-0,049
	ZnCl <sub>2</sub> + MnCl <sub>2</sub>	0,026	0,070	0,019	0,038
	MgCl <sub>2</sub>	-0,051	-0,049	-0,047	-0,049
	ZnCl <sub>2</sub> + MgCl <sub>2</sub>	0,044	0,046	0,039	0,043
<b>PNPPase</b>	Controle (ATP + enzima)	0,026	0,040	0,032	0,033
	ZnCl <sub>2</sub>	-0,029	-0,009	-0,018	-0,019
	ZnCl <sub>2</sub> + MnCl <sub>2</sub>	-0,029	0,045	0,170	0,062
	MgCl <sub>2</sub>	-0,096	-0,029	-0,031	-0,052
	ZnCl <sub>2</sub> + MgCl <sub>2</sub>	-0,032	-0,026	-0,029	-0,029

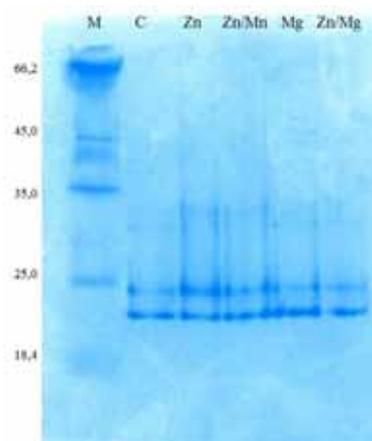


Figura 28 – Gel nativo. XAC1201 incubada a 37°C por 1h com diferentes íons (ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>), após diálise *overnight*. C: controle (ATP + enzima). M – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker®* – Fermentas.

A dimerização oferece várias vantagens estruturais e funcionais às proteínas, incluindo o aperfeiçoamento da estabilidade, o controle da acessibilidade e especificidade dos sítios ativos e o aumento da complexidade (MARIANAYAGAM; SUNDE; MATTHEWS, 2004). Existe a possibilidade de a proteína XAC1201 não estar na forma de dímero devido a ausência de cofatores ou de certas condições como pH, temperatura, presença do substrato específico, entre outras condições essenciais para a formação do dímero proteico.

### **5.8.3 Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de detergentes**

Visto que as histidinas quinases são proteínas transmembrânicas, a atividade da XAC1201 foi avaliada em um meio de reação mais hidrofóbico com a presença de diferentes detergentes. O papel específico dos lipídios, até hoje, não está totalmente elucidado, porém, sabe-se que existe um importante papel exercido pelas interações moleculares da interface lipídio/proteína, não somente na regulação da relação estrutura/função nas membranas celulares, mas também em uma variedade de relevantes aspectos biológicos (PANTUSA; SPORTELLI; BARTUCCI, 2008).

Os resultados apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, demonstram que não houve atividade significativa de ATPase e PNPPase na presença de detergentes. A complexidade da maioria das membranas biológicas dificulta os estudos dos seus componentes individuais *in situ* (YONEDA, 2010). Desse modo, a ausência de atividade nesses experimentos pode ser um indicativo da necessidade de experimentos mais específicos, como o de reconstituição de membranas, para simular com maior precisão o ambiente hidrofóbico.

**Tabela 7 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes detergentes**

	Deterg.	Tempo		
		1h	6h	24h
<b>ATPase</b>	Det1	0,004	-0,058	0,007
	Det2	0,025	0,102	0,012
	Det3	0,039	0,126	0,014
	Det 4	0,027	0,023	0,016
<b>PNPPase</b>	Det1	-0,022	-0,029	0,010
	Det2	0,000	-0,002	0,004
	Det3	-0,002	0,018	0,004
	Det 4	0,006	-0,003	0,017

**Tabela 8 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes detergentes, solubilizados em ultrassonicador**

	Detergentes	R1	R2	R3	Média
<b>ATPase</b>	Det1	0,063	0,053	0,047	0,054
	Det2	-0,022	-0,001	0,000	-0,008
	Det3	0,064	0,098	0,060	0,074
	Det 4	-0,004	-0,002	0,004	-0,001
<b>PNPPase</b>	Det1	0,011	0,013	0,002	0,009
	Det2	0,002	0,000	-0,005	-0,001
	Det3	0,001	0,013	0,000	0,005
	Det 4	0,001	0,003	0,003	0,002

**Tabela 9 – Atividade de ATPase e PNPPase de XAC1201 na presença de diferentes detergentes, solubilizados em sonicador de ponteira**

	Detergentes	R1	R2	R3	Média
<b>ATPase</b>	Det1	0,034	-0,003	0,004	0,012
	Det2	0,005	0,006	0,004	0,005
	Det3	0,008	-0,001	0,012	0,006
	Det 4	0,021	0,017	0,012	0,017
<b>PNPPase</b>	Det1	-0,218	-0,203	-0,201	-0,207
	Det2	0,009	0,010	0,003	0,007
	Det3	0,003	0,002	0,022	0,009
	Det 4	0,051	0,040	0,043	0,045

## 5.9 Análise da frequência e diversidade da ORF XAC1201 presente nos bancos de dados

A análise comparativa da sequência proteica de XAC1201 contra sequências encontradas em bancos de dados revelou uma ampla gama de proteínas pertencentes a diversos filos dentro do Domínio Bacteria que possuem alta identidade com a sequência de interesse. Constatou-se que quase a totalidade das sequências apresentadas nos resultados refere-se a proteínas putativas ou hipotéticas, ou seja, que ainda não possuem uma função determinada, e, ainda, a proteínas não caracterizadas, com as quais não é possível realizar inferências com confiabilidade, como, por exemplo, proteínas putativas fosfohidrolases dependentes de metal e transdutoras de sinal de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, histidina quinase contendo o domínio HDIG não caracterizado de *Xanthomonas vesicatoria*, ou ainda uma proteína fosfohidrolase da família HD da  $\delta$ -Proteobacterium, além de uma proteína reguladora de resposta de *Riftia pachyptila*.

Filtrando-se os dados, foi possível reconhecer os filos nos quais se encontram as proteínas que têm algum grau de identidade com XAC1201. A Figura 29 apresenta esses filos, em que se notou uma grande diversidade, com as proteínas estando englobadas dentro de 8 filos do Domínio Bacteria. Dentre esses filos, encontram-se as Proteobacterias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), as Firmicutes (Bactérias Gram-positivas ricas em GC), as Planctomyces, as Espiroquetas, as Thermotogas, as Verrucomicróbios e o grupo CFB (Bacterióides Cytophaga e Flavobactérias).

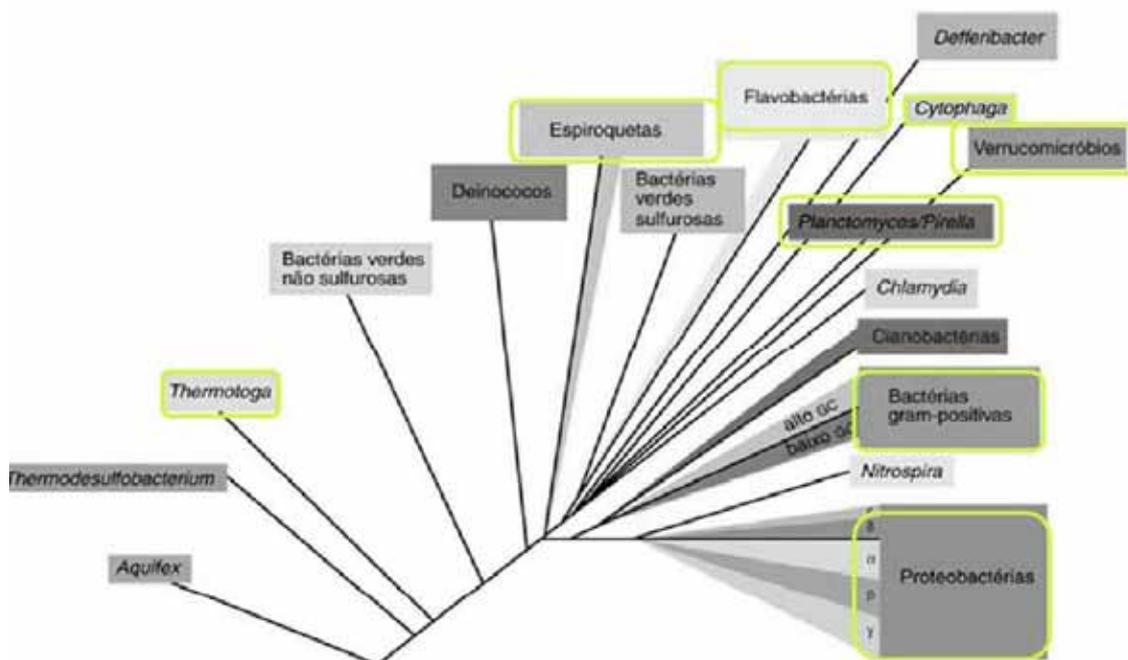


Figura 29 – Árvore filogenética do Domínio Bacteria enfatizando nos quadros amarelos os filamentos de bactérias cujas proteínas obtiveram identidade com a proteína XAC1201.

Devido a grande abrangência de filamentos onde se encontram proteínas relacionadas à XAC1201, esta pode ser considerada uma proteína ubíqua e, portanto, não específica de *Xac*. Ademais, pela alta identidade apresentada para a maioria das sequências, e por ser altamente conservada no Domínio Bacteria, infere-se que essa proteína tenha uma função ancestral. A função da XAC1201, provavelmente está envolvida na sinalização ou fosforilação, com algum papel no metabolismo bacteriano, visto que muitas proteínas relacionadas no GenBank estão anotadas como fosfohidrolases, histidinas quinases ou transdutoras de sinal.

Sabendo que as vias de transdução de sinal de dois componentes (TCST) são ubíquas nos sistemas bacterianos, possuem regiões altamente conservadas, participam da regulação de vários processos que vão desde a quimiotaxia até a virulência (STOCK et al., 1988; CLOUGH et al., 1997; STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; FRANCIS et al., 2013) e levando em consideração os dados relatados neste trabalho, é plausível inferir que a proteína XAC1201 seja uma

proteína desse sistema. No entanto, não foram obtidos experimentos comprobatórios dessa atividade neste trabalho, o que demonstra a necessidade de estudos futuros com esse intuito. Além disso, procurou-se desenvolver experimentos com ATP radioativo ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ ) para verificar se esta proteína desempenha função de fosforilação, porém, não foi encontrada a disponibilidade deste material, o que impediu o desenvolvimento deste experimento em tempo hábil.

Como uma proteína com provável função ancestral e não específica de Xac, pode não haver uma relação direta desta com a patogenicidade. No entanto, sendo constatado pelo teste de patogenicidade dos mutantes da ORF XAC1201 a diminuição dos sintomas do cancro cítrico em folhas de laranja e limão, há, certamente, uma importância desta proteína para o desenvolvimento completo dos sintomas. Contudo, esse envolvimento pode ser anterior ao processo de patogenicidade, como, por exemplo, desempenhando um papel na regulação do ciclo celular ou do metabolismo, que impede a multiplicação regular da bactéria na ausência desta proteína.

Por outro lado, pode haver uma relação direta com a patogenicidade, considerando a XAC1201 uma proteína pertencente ao sistema de dois componentes. As histidinas quinases são responsáveis pelo mecanismo de sinalização em resposta aos estímulos externos, que segundo Paterson e colaboradores (2006), podem participar da produção de efetores de virulência em bactérias patogênicas como *Streptococcus pneumoniae*, como também relatado para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em que sua função está associada à regulação positiva da dispersão de biofilme e na produção de fatores de virulência (SLATER et al., 2000; DOW et al., 2003). Desse modo, são necessários estudos voltados a compreender a relação da ORF XAC1201 na patogenicidade de citros.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir que:

- O mutante da ORF XAC1201 (11C09) tem o transposon *Tn5* presente em sua sequência entre as bases 727 e 728 e, apresenta a redução dos sintomas de cancro cítrico, que são a diminuição do encharcamento e hiperplasia e presença de necrose;
- Por meio da clonagem, expressão em *E. coli* e purificação por IMAC, foi obtida a proteína XAC1201 nativa recombinante na forma solúvel;
- O rendimento final foi da ordem de 10,80 mg/L de meio e obteve-se alto grau de pureza (<99%), sendo a pureza comprovada por gel de SDS-PAGE corado com prata;
- A identidade de XAC1201 recombinante foi confirmada pelas análises de espectrometria de massas, com mais de 80% de cobertura da sequência, e a proteína parecer estar no seu estado nativo;
- Os testes enzimáticos realizados para testar atividade de fosfohidrolase e histidina quinase, não foram conclusivos e a baixa atividade obtida pode estar relacionada à falta de condições específicas (substrato, ambiente hidrofóbico, cofatores, etc) para sua atividade;
- As análises de frequência e diversidade apontaram para uma alta abrangência de filos nos quais esta proteína foi encontrada, podendo ser considerada uma proteína ubíqua com uma função ancestral.

Por fim, a questão levantada por este trabalho é quanto ao papel da ORF XAC1201 na patogenicidade de *Xac* em citros, visto que pode haver uma relação direta ou indireta do produto proteico desta ORF nesse processo. Para isso, é necessária a continuação de estudos de caracterização e identificação da sua função, visto que é anotada como uma proteína hipotética e, levando em

consideração a presença de alta identidade desta sequência com muitos outros grupos bacterianos, a elucidação da função desta proteína será de grande interesse para o avanço da ciência microbiológica.

## **7. AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Ao Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena, pela disponibilização do equipamento e para as análises de espectrometria de massas. Ao pessoal do Laboratório de Enzimologia Aplicada (LEA), coordenado pelo Prof. Dr. João Pizauro Júnior, pela ajuda na determinação das atividades enzimáticas e realização dos géis corados com prata. Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini do Departamento de Química da USP – Ribeirão Preto, pela realização dos experimentos de dicroísmo circular. Ao Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP-FCAV) pelo apoio científico. Ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP-FCAV pelo apoio técnico e científico.

## 8. REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, M. **Citricultura**. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 2000. 416p.

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ALEX, L. A; SIMON, M. I. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. **Trends Genet**, n. 10, p. 133-138, 1994.

ALVES, P. R. B.; MELO, B. Cultura dos Citros. **Núcleo de estudo em fruticultura no cerrado**. Universidade Federal de Uberlândia. 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>>. Acesso em: 23/03/2012.

AMARAL, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília, DF, EMBRAPA, **Comunicado Técnico**, 86, nov. 2003.

ANGOV, E.; LEGLER, P. M.; MEASE, R. M. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. In: EVANS JR., T. C.; XU, M-Q (edit.). Heterologous Gene Expression in *E. coli*. **Methods in Molecular Biology**, v. 705, NY, USA, Springer Protocols, chap. 1, p. 1-13, 2011.

APPELBAUM, E. R.; SHATZMAN, A. R. Prokaryotic *in vivo* expression systems. In: HIGGINS, S. J.; HAMES, B. D. **Protein Expression**; a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1999, chapter 6, p. 169-200.

ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. **Trends Biochem. Sci.**, n. 23, v. 12, p. 469-472, Dec. 1998.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction**. Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd., 2003.

ARNOLD, F. H. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. **Nature Biotechnology**, n. 9, p. 151-156, 1991.

ASHENBERG, O. **Predicting and testing determinants of histidine-kinase functions by leveraging protein sequence information.** (Doctorate) Philosophy. Program of Computational and Systems Biology. Harvard College, Cambridge, MA, 2012.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming expolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, p. 1159-1162, 1995.

BELASQUE JR., J.; BARBOSA, J. C.; BERGAMIN FILHO, A.; MASSARI, C. A. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 314-317, 2010.

BERGAMIN-FILHO, A.; HUGHES, G. Citrus canker epidemiology - methodologies and approaches. **Proc. Intern. Citrus canker Res. Workshop**, Day 2, June 21 2000, Ft. Pierce, Florida. Disponível em: <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/9986/136184/iccrw-transcript06-21-00.pdf>>. Acesso em: jan. 2014.

BERROW, N. S.; BÜSSOW, K.; COUTARD, B.; DIPROSE, J.; EKBERG, M.; FOLKERS, G. E.; LEVY, N.; LIEU, V.; OWENS, R. J.; PELEG, Y.; PINAGLIA, C.; QUEVILLON-CHERUEL, S.; SALIM, L.; SCHEICH, C.; VINCENTELLI, R.; BUSO, D. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. **Acta Cryst.**, v. 62, p. 1218-1226, Oct. 2006.

BILWES, A. M.; ALEX, L. A.; CRANE, B. R.; SIMON, M. I. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. **Cell**, v. 96, p. 131-141, Jan. 1999.

BITANCOURT, A. A. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.

BONINI, M.; RODRIGUES NETO, J.; MARINGONI, A. C. Produção e sensibilidade de isolados brasileiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* à bacteriocinas. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 232-234, 2012.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags, **Methods Enzymol.**, v. 326, p. 245-254, 2000.

BORTOLOSSI, J. C. **Expressão e análise de proteínas recombinantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri em *E. coli* visando análise estrutural por cristalografia**. 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2007.

BRADBURY, J. F. Genus II *Xanthomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 199-210.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa – SDA, n. 38, de 14 de outubro de 1999**. Brasília, DF, 1999.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, EV. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomeoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.

BRUDERER, R.; TATHAM, M. H.; PLECHANOVOVA, A.; MATIC, I.; GARG, A. K.; HAY, R. T. Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. **EMBO Reports**, v. 12, n. 2, p. 142-148, Jan. 2011.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, Florida, USA, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

BUELL, C. R.; JOARDAR, V.; LINDEBERG, M.; SELENGUT, J.; PAULSEN, I. T.; GWINN, M. L.; DODSON, R. J. et al. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 100, n. 18, p. 10181-10186, Sept. 2003.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiol. Rev.**, n. 34, p. 107-133, 2010.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULLF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CHART, H.; SMITH, H. R.; LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. **J. Appl. Microbiol.**, n. 89, p. 1048-1058, 2000.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CLOUGH, S. J.; LEE, K. E.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester **J. Bacteriol.**, n. 179, p. 3639-3648, 1997.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira. Laranja, safra 2013/2014. Terceiro Levantamento - São Paulo e Triângulo Mineiro.** Brasília, DF, p. 1-11, dez. 2013.

CUNHA, N. B.; MURAD, A. M.; CIPRIANO, T. M.; ARAÚJO, A. C. G.; ARAGÃO, F. J. L.; LEITE, A.; VIANNA, G. R.; McPHEE, T. R.; SOUZA, G. H. M. F.; WATERS, M. J.; RECH, E. L. Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. **Transgenic Res.**, n. 20, p. 811-826, 2011.

DAS, A. K. Citrus Canker. A review. **J. Appl. Hort.**, v. 5, n. 1, p.52-60, 2003.

DERSO, E.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. First Report of *Xanthomonas citri* pv. *citri-A\** Causing Citrus Canker on Lime in Ethiopia. **Plant Disease**, St Paul, v. 93, n. 2, p. 203, 2009.

DINIZ, D. M.; DRUZIAN, J. I.; AUDIBERT, S. Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. **Polímeros**, v. 22, n. 3, p. 278-281, 2012.

DOCENA, C. **Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.** 2006.181f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros.** Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.1-18.

DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y. Q.; FENG, J.-X.; TANG, J.-L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, p. 10995-11000, 2003.

DUTTA, R.; QIN, L.; INOUE, M. Histidine kinases: diversity of domain organization. **Mol. Microbiol.**, n. 34, p. 633-640, 1999.

ENDICOTT, J. A.; NOBLE, M. E., M.; JOHNSON, L., N. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 81, p. 587-613, 2012.

FARIA, S. **Produção de goma xantana empregando caldo de cana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459**. 2005. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

**FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>>. Acesso em: jan. 2014.

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

FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico das principais doenças dos citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 6., 2000, Bebedouro. **Anais...** Fundação Cargill, 2000, p. 176-216. Produção Integrada. Bebedouro, 2000.

FERNLEY, H. N. Mammalian alkaline phosphatase. In: BOYER, P. D. (Ed.). **The Enzymes**. New York: Academic Press, 1971. p. 417-477.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, n. 66, p. 375-400, 1925.

FLEISCHMAN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, 28 Jul. 1995.

FONG, B. A.; WU, W-Y.; WOOD, D. W. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. **Protein Expression and Purification**, v. 66, p. 198-202, 2009.

FRANCIS, S. H.; COLBRAN, J. L.; McALLISTER-LUCAS, L. M.; CORBIN, J. D. Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 36, p. 22477-22480, Sept.1994.

FRANCIS, S.; WILKE, K. E.; BROWN, D. E.; CARLSON, E. E. Mechanistic insight into inhibition of two-component system signaling. **Med. Chem. Comm.**, v. 4, n. 1, p. 269-277, Nov. 2013.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. **Doenças e pragas**; cancro cítrico. [20--]. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>. Acesso em: dez. 2013.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, p. 335-360, 2001.

GALPERIN, M. Y.; NATALE, D. A.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 1, n. 2, p. 303-305, 1999.

GENGE, R.; SAUER, R. G.; WU, N. Y. L.; McLEAN, F. M.; WUTHIER, R. E. Correlations between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium durin matrix-induced mineratization. **Journal Biological Biochemistry**, v. 263, p. 18513-18519, 1998.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

GREBE, T. W.; STOCK, J. B. The histidine protein kinase superfamily. **Adv. Microb. Physiol.**, n. 41, p. 139-227, 1999.

GUO, Y.; SAGARAM, U. S.; KIM, J.-S.; WANG, N. Requirement of the *galU* gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth *in planta* of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Appl. Envir. Microb.**, v. 76, n. 7, p. 2234-2242, Apr. 2010.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Eds.). **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 1-17.

HE, Y.-W.; WANG, C.; ZHOU, L.; SONG, H.; DOW, J. M.; ZHANG, L.-H. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. **J. Biol. Chem.**, n. 281, p. 33414-33421, 2006

HILBRIG, F.; FREITAG, R. Protein purification by affinity precipitation. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 79-90, 2003.

HOCH, J. A.; SILHAVY, T. J. (eds). **Two-component signal transduction**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1995.

HOCHULI, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins **J. Chromatogr. A**, v. 444, p. 293-302, July 1988.

HOCHULI, E.; BANNWARTH, W.; DOEBELI, H.; GENTZ, R.; STUEBER, D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. **BioTechnology**, p. 1321-1325, 1988.

HUANG, X.; FENG, Q.; QIAN, Q. et al. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. **Genome Reserch**, n. 19, p. 1068-1076, 2009.

HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 1-22, 2005.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE – **Estatística da produção agrícola – março 2012**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201203.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf)>. Acesso em: jan. 2014.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE – **Estatística da produção agrícola – dezembro 2013**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/2013/estProdAgr\\_201312.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2013/estProdAgr_201312.pdf)>. Acesso em: jan. 2014.

IEA – INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Valor da produção dos principais produtos da agropecuária do Estado de São Paulo**. 2013. Disponível em: <[http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/vp.aspx?cod\\_sis=15](http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/vp.aspx?cod_sis=15)>. Acesso em: jan. 2014.

ISLAND, M. D; WEI, B. Y; KADNER, R. J. Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 9, p. 2754-2762, May 1992.

JACIANI, F. J. **Diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, caracterização molecular e patogênica de *Xanthomonas fuscans* subsp. *auratifolii* e detecção de *Xanthomonas alfalfae* em citrumelo ‘swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil**. 2012. 169f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

JASON, J.-C.; RYDÉN, L. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications**. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc., 1998.

JECHLINGER, W.; SZOSTAK, M. P.; WITTE, A.; LUBITZ, W. Altered temperature induction sensitivity of the lambda pR/cl857 system for controlled gene E expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 347-352, 1999.

JIA, H.; OSAK, M.; BOGU, G. K. et al. Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. **RNA**, n. 16, p. 1478-1487, 2010.

JUNG, K.; FRIED, L.; BEHR, S.; HEERMANN, R. Histidine kinases and response regulators in networks. **Current Opinion in Microbiology**, n. 15, p. 118-124, 2012.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 494-500, 1995.

KRZEWINSKI, F.; BRASSART, C.; GAVINI, F.; BOUQUELET, S. Characterization of the lactose transport system in the strain *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. **Curr. Microbiol.**, v. 32, n. 6, p. 301-307, 1996.

LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. implicados na patogênese.** 2007. 344 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP, 2007.

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

LEE, H. A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. **J. Agr. Res.**, n. 15, p. 661-665, 1918.

LEE, S.-W.; HAN, S.-W.; BARTLEY, L. E.; RONALD, P. C. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity. **PNAS**, v. 103, n. 49, p. 18395-18400, Dec. 2006.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell.**, n. 141, p. 1117-1134, 2010.

LI, F. J.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MA, H. W.; ZHANG, J. X.; ZHANG, S., Q. Production of Bioactive Human Beta-Defensin-4 in *Escherichia coli* Using SUMO Fusion Partner. **Protein J**, n. 29, p. 314-319, 2010.

LI, S.-J.; HOCHSTRASSER, M. A New Protease Required for Cell-Cycle Progression in Yeast. **Nature**, v. 398, p. 246-25, 1999.

LOIS, A. F.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. The oxygen sensor fixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 4, p. 1103-1109, 1993.

LOMAN, N. J.; CONSTANTINIDOU, C.; CHAN, J. Z. M.; HALACHEV, M. et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 599-606, 2012.

MALAKAR, P.; VENKATESH, V. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 93, p. 2543-2549, 2012.

MARIANAYAGAM, N. J.; SUNDE, M.; MATTHEWS, J. M. The power of two: protein dimerization in biology. **Trends Biochem. Sci.**, v. 29, n. 11, Nov. 2004.

MARKESTRAT, CITRUSBR, VALOR DATA, 2013 Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/noticias/produtividade-a-nota-de-corte-da-citricultura-252236-1.asp>>. Acesso em: jan. 2014.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE J.; AMARAL, A. M. do; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, p. 76-83, Sept. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2010.02047.x/full>>. Acesso em: jun. 2012.

McCOMB, R. B.; BOWERS, G. N.; POSEN, S. Reaction Mechanisms. In: \_\_\_\_\_. **Alkaline phosphatase**. New York: Plenum Press, 1979, p. 229-287.

McDONALD, K. A. Heterologous Protein Expression. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive biotechnology**. 2. ed. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2011.

MENCKHOFF, L.; MIELKE-EHRET, N.; BUCK, F.; VULETIĆ, M.; LÜTHJE, S. Plasma membrane-associated malate dehydrogenase of maize (*Zea mays* L.) roots: native versus recombinant protein. **J. of Proteomics**, n. 80, p. 66-77, 2013.

METZKER, M. L. Emerging Technologies in DNA sequencing. **Genome. Res.**, n. 15, p. 1767-1776, 2005.

MEYER, D. F.; BOGDANOVA, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: JACKSON, R. W. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norwich, UK: Horizon Scientific Press, 2009. Chapter 7, p. 147-161.

MIZUNO, T. His-Asp phosphotransfer signal transduction. **J. Biochem.**, n. 123, p. 555-563, 1998.

MOONEY, J. T.; FREDERICKS, D. P.; ZHANG, C.; CHRISTENSEN, T.; JESPERGAARD, C.; SCHIODT, C. B.; HEARN, M. T. W. Purification of a recombinant human growth hormone by an integrated IMAC procedure. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 85-94, Feb. 2014.

MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F. de; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annuals Reviews Phytopathology**, Virginia, USA, v. 42, p. 163-184, 2004.

MOSSESOVA, E.; LIMA, C. D. Ulp1-SUMO Crystal Structure and Genetic Analysis Reveal Conserved Interactions and a Regulatory Essential for Cell Growth in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, p. 2367-2377, 2000.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T.; LEDUY, A. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 639-646, 1988.

NAKAGI, V. S. **Caracterização da atividade da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum***. 2007. 36f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2007.

NCBI – Resources; Protein. **Hypothetical protein XAC1201 [*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306]**. 2014. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_641537.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_641537.1)>. Acesso em: set. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger. Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2011. p. 41, 89, 106.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **Centro de pesquisa e projetos em marketing e estratégia**. 2010. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com.br/citrusbr/assuntos/retrato-da-citricultura.asp>>. Acesso: 23/03/2012.

NGOC, L. B. T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; KOSITCHAMENKUL, N.; PHAWICHIT, S. First report in Thailand of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*-A\* causing citrus canker on lime. **Plant Disease**, St Paul, v. 91, n. 6, p. 771, 2007.

NGOC, L. B. T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; SO, T.; JOHNSON, G. I. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri-A\** causing citrus canker on lime in Cambodia. **Plant Disease**, St Paul, v. 92, n. 11, p. 1588, 2008.

OTTER-NILSSON, M.; NILSSON, T. Protein expression in mammalian cells. In: HIGGINS, S. J.; HAMES, B. D. (Ed.). **Protein expression; a practical approach**. New York, USA: Oxford University Press, 1999. Chapter 1, p. 1-28.

PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 26, n. 2, p. 21-217, 1974.

PANTUSA, M.; SPORTELLI, L., BARTUCCI, R. Spectroscopy and calorimetric studies on the interaction of human serum albumin with DPPC/PEG:2000-DPPE membranes. **Eur. Biophys. J.**, v. 37, p. 961-973, 2008.

PAO, G. M.; SAIER JR., M. H. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. **J. Mol. Evol.**, v. 40, n. 2, p. 136-154, 1995.

PARKINSON, J. S; KOFOID, E. C. Communication modules in bacterial signaling proteins. **Annu. Rev. Gene**, v. 26, p. 71-112, 1992.

PATERSON, G. K.; BLUE, C. E.; MITCHELL, T. J. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Med. Microbiol.**, 55, p. 355-363, 2006.

PETI, W.; PAGE, R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. **Protein Expression and Purification**, n. 51, p. 1-10, 2007.

PODGORNAIA, A. I.; LAUB, M. T. Determinants of specificity in two-component signal transduction. **Current Opinion in Microbiology**, n. 16, p. 156-162, 2013.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S.; HE, Y.; FENG, J.; LU, L.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D.; TANG, H. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Res.**, v. 15, p. 757-767, 2005.

RECOMBINANT protein purification handbook; principles and methods. Separata de: **GE Healthcare**, GE Healthcare Bio-Science AB, Sweden, 18-1142-75, p. 1-306, 2009. Disponível em: <[http://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1336168762999/lt doc18114275\\_201401212221626.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1336168762999/lt doc18114275_201401212221626.pdf)>. Acesso em: dez. 2013.

RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, J. G. B. **Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico**. Brasília: MAPA/SDA/ DDIV, 2002. 66p.

ROSENBERG, A. H.; LADE, B. N.; CHUI, D.-S.; LIN, S.-W.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. **Gene**, v. 56, p. 125-135, 1987.

ROTT, P. C., FLEITES, L., MARLOW, G., ROUER, M., GABRIEL, D. W. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 24, p. 594-605, 2011.

ROY, I.; MONDAL, K.; GUPTA, M. N. Leveraging protein purification strategies in proteomics. **J. Chrom. B.**, n. 849, p. 32042, 2007.

RYAN, R. P.; VORHOLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M. A. V.; BOGDANOVA, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews**, v. 9, p. 344-355, 2011.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, 415, p. 497-502, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMUELSON, J. C. Recent Developments in Difficult Protein Expression: A Guide to *E. coli* Strains, Promoters, and Relevant Host Mutations. In: EVANS JR., T. C.; XU, M-Q (Ed.). **Heterologous Gene Expression in *E. coli*; Methods in Molecular Biology**, v. 705, NY, USA, Springer Protocols, chap. 11, p. 195-209, 2011.

SARASWAT, M.; MUSANTE, L.; RAVIDÁ, A.; SHORTT, B.; BYRNE, B.; HOLTHOFER, H. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. Hindawi Publishing Corporation, **BioMed Research International**, article ID 312709, v. 2013, p. 1-18, 2013.

SATO, V. S. **Indução da expressão *in vivo* e caracterização cinética da fosfatase ácida de *Enterobacter sp.* isolada de raízes de orquídeas**. 2011. 56f. Dissertação (Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2011.

SCOPES, R. K. Separation by precipitation; separation by absorption II: ion exchanges and nonspecific adsorbents. In: \_\_\_\_\_. **Protein Purification; Principles and Practice**. NY, USA, 1993. Chapters. 4; 6.

SILVA, A. C. R. da; FERRO, J. A.; REINACH, F.C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES JR., L. M. C. et al. Comparison of genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, 417, p. 459-463, 2002.

SILVA, R. A. da; AGRA, A. C.; ALEIXO, D. L.; NÓBREGA, V. R. da; DANTAS, E. A. Situação econômica e produtiva da cultura dos citros no estado da Paraíba. **Revista Verde**, Mossoró, RN, v. 6, n. 3, p. 39-48, jul./set. 2011.

SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, 406, p. 151-157, 2000.

SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 986-1003, 2000.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SOUZA, E. C. **Análise da expressão gênica global em mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2010. 144f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP, 2010.

STOCK, A.; CHEN, T.; WELSH, D., STOCK, J. CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 85, n. 5, p. 1403-1407, Mar. 1988.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU P. N. Two-component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 183-215, 2000.

SUN, X.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM J. H.; DIXON, W. D.; SCHUBERT, T. S.; CHALOUX, P. H.; STROMBERG, V. K.; LACY, G. H.; SUTTON, B. D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/Mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n. 11, p. 1179-1188, 2004.

TAM, R.; SAIER JR., M. H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, n. 2, p. 320-346, June 1993.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 523-533, 2003.

VÉKEY, K. A. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 921, n. 2, 6 July 2001, p. 227–236, 2001.

VERDIER, V.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; VÉRONIQUE, J.; LOPEZ, C. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction. **Plant Mol.Biol.**, v. 56, n. 4, p. 573-584, 2004.

VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; CIVEROLO, E. L.; ALVAREZ, A. M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, n. 104, p. 477-487, 1998.

VOLZ, K.; MATSUMURA, P. Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 23, p. 15511-15519, 1991.

WANG, S-L.; CHEN, S-J.; WANG, C-L. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 1171-1179, 2008.

WANG, C.; SANG, J.; WANG, J.; SU, M.; DOWNEY, J. S. et al. Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. **PLOS Biology**, v. 11, p. 1-14, Feb. 2013.

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

WOOD, D. W.; SETUBAL, J. C.; KAUL, R.; MONKS, D. E.; KITAJIMA, J. P.; OKURA, V. K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G. E.; ALMEIDA JR., N. F. et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2317-2323, 2001.

WU, H.; YU, X.; CHEN, L.; WU, G. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 22-27, 2014.

YAKUNIN, A. F.; PROUDFOOT, M.; KUZNETSOVA, E.; SAVCHENKO, G. B.; ARROWSMITH, C. H.; EDWARDS, A. M. The HD Domain of the *Escherichia coli* tRNA Nucleotidyltransferase Has 2', 3' -Cyclic Phosphodiesterase, 2' -Nucleotidase, and Phosphatase Activities. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 279, n. 35, p. 36819-36827, 2004.

YAN, Q; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 69-84, 2012.

YONEDA, J. S. **Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de fosfolipídios e colesterol: caracterização biofísica e bioquímica.** 2010. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.