



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES *XANB* E *XYLA2* DE *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP.  
*CITRI*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO”**

**André Vessoni Alexandrino\***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientadora:***

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur

**\*Bolsista CAPES – 88882.426495/2019-01**

**São Carlos – SP  
2020**

ANDRÉ VESSONI ALEXANDRINO

**“Análise funcional dos genes *xanB* e *xylA2* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico”**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientadora:***

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur

BANCA EXAMINADORA

*Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza*  
Departamento de Química – UFSCar

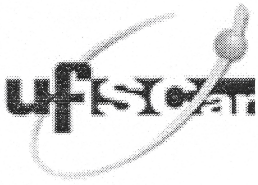
*Prof. Dr. Flávio Henrique Silva*  
Departamento de Genética e Evolução – UFSCar

*Prof. Dr. Franklin Behlau*  
Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus

*Prof. Dr. Henrique Ferreira*  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia (Instituto de Biociências) – UNESP Rio Claro

*Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur*  
Departamento de Genética e Evolução – UFSCar

São Carlos – SP  
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato André Vessoni Alexandrino, realizada em 20/02/2020:

---

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur  
UFSCar

---

Prof. Dr. Henrique Ferreira  
UNESP

---

Prof. Dr. Franklin Behlau  
FUNDECITRUS

---

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva  
UFSCar

---

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza  
UFSCar

## Agradecimentos

À minha esposa, Taís, pelo companheirismo, cumplicidade, amizade, carinho, amor, compreensão e paciência, **muita paciência**.

Aos meus pais e avós, pelo carinho, amor, incentivos, conselhos e apoio em todas as fases e decisões da minha vida.

Ao meu irmão, Daniel, pela cumplicidade, amizade, amor e confiança.

Aos meus amigos Alberto Zanata, Douglas Álvaro Dias e Marcos Bravi, pela amizade, parceria e por me proporcionarem agradabilíssimas conversas.

À Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, pela orientação, oportunidade, confiança e apoio, que foram essenciais para realização deste trabalho. Agradeço, também, pela relação de amizade que desenvolvemos ao longo desses mais de oito anos.

Ao Dr. Leandro Seiji Goto, pelo apoio e ensinamentos.

Ao Dr. Humberto D’Muniz Pereira (IFSC/USP), pela imensa colaboração nos estudos de estrutura de proteínas.

A todos os professores que disponibilizaram seus equipamentos e espaço, especialmente aos professores Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, Dr. Felipe Roberti Teixeira, Dr. Flávio Henrique da Silva, Dr. Gilberto Moraes, Dr. Iran Malavazi, Dr. Marco Antonio Del Lama e Dra. Silvia Nassif Del Lama.

Ao FUNDECITRUS, pela disponibilização de espaço para realização dos ensaios *in vivo*, especialmente ao Dr. Franklin Behlau e à Me. Tamiris Garcia.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e à Me. Lúcia Bonci Cavalca pela colaboração nos experimentos *in vivo* na UNESP – Rio Claro.

Aos colegas de laboratório, Beatriz, Bianca, Carol, Evandro, Inaê, Jéssica, Mariana, Naiane, Nicole, Solange, Vinícius e Yuri pela colaboração, amizade, parceria e momentos de descontração.

À Célia Regina Câmara, pela amizade e por todo o apoio na realização dos experimentos.

Aos meus colegas de trabalho da UNICEP e Collegium Sapiens, pela amizade e paciência nos meus momentos de hiperatividade exigidos pelo doutoramento.

À FAPESP e CAPES, pelo auxílio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Alexandrino, André Vessoni. **Análise funcional dos genes *xanB* e *xyIA2* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico**. 2020. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

## Resumo

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) é a principal causadora do cancro cítrico, uma doença que acomete todas as cultivares cítricas de interesse comercial, ocasionando prejuízos ao setor citricultor devido à queda na produtividade e qualidade dos frutos, e à ausência de medidas eficazes de controle e cura. Em trabalhos de análise proteômica diferencial previamente conduzidos por nosso grupo de pesquisa, fosfomanose isomerase (PMI) e xilose isomerase (XI) foram proteínas identificadas como potencialmente envolvidas na patogênese do cancro cítrico, sendo a PMI detectada pela primeira vez na superfície de Xcc. A PMI de Xcc é predita como uma enzima bifuncional com atividades catalíticas de interconversão de D-manose-6-fosfato e D-frutose-6-fosfato, bem como de D-manose-1-fosfato em GDP-D-manose. A XI de Xcc também é classificada como uma enzima bifuncional que interconverte D-xilose em D-xilulose e D-glicose em D-frutose. O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização funcional dos genes codificantes da PMI e da XI (*xanB* e *xyIA2*, respectivamente), especialmente no tocante à relação com a patogenicidade de Xcc, partindo de estratégias que envolveram a construção de sistemas de expressão heteróloga induzíveis por IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo) em *E. coli*, os quais permitiram a confirmação das atividades biológicas preditas das proteínas-alvo. A dupla recombinação homóloga entre o DNA genômico bacteriano e o vetor suicida pNPTS138 contendo regiões flanqueadoras do gene-alvo a ser deletado foi utilizada para a construção de linhagens mutantes deletadas nos genes *xanB* e *xyIA2* (Xcc $\Delta$ *xanB* e Xcc $\Delta$ *xyIA2*, respectivamente). Uma linhagem complementante para o primeiro mutante (Xcc $\Delta$ C*xanB*) foi obtida com sucesso pela reinserção do gene no locus original utilizando o pNPTS138, uma metodologia inédita em Xcc. Ensaio *in vivo* em *Citrus aurantifolia* foram conduzidos utilizando as linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ *xanB*, Xcc $\Delta$ C*xanB* e Xcc $\Delta$ *xyIA2*, os quais permitiram a avaliação da relação dos genes-alvo com a patogenicidade de Xcc. A deleção do gene *xyIA2* desencadeou um aumento na virulência de Xcc, o que pode ser explicado pelo consequente acúmulo de xilose e um possível aumento da expressão de genes *hrp*. A deleção do gene *xanB*, por sua vez, resultou na perda de patogenicidade de Xcc, com redução de suas propriedades relacionadas ao processo infeccioso, como motilidade, formação de biofilme e resistência à radiação ultravioleta, com todos esses fenótipos sendo integralmente restaurados pela complementação gênica. Sendo assim, a constatação de que o gene *xanB* é essencial para a patogenicidade de Xcc o torna um alvo inédito e bastante promissor do ponto de vista biotecnológico, propiciando uma perspectiva de controle e/ou cura do cancro cítrico por meio da utilização de inibidores da PMI e, também, do desenvolvimento de cultivares cítricas que neutralizem a ação de tal enzima durante o processo infeccioso.

**Palavras-chave:** *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; fosfomanose isomerase; xilose isomerase; patogenicidade; virulência.

Alexandrino, André Vessoni. **Functional analysis of the *xanB* and *xylA2* genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causative agent of citrus canker.** 2020. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

## **Abstract**

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) is the main bacterium that causes citrus canker, a disease that affects all citrus cultivars of commercial interest, causing damages to the citrus sector due to the decrease in fruit productivity and quality, and the lack of effective control and cure measures. In differential proteomic analysis previously conducted by our research group, phosphomannose isomerase (PMI) and xylose isomerase (XI) were proteins identified as potentially involved in the pathogenesis of citrus canker, the first being detected for the first time on the Xcc surface. Xcc PMI is predicted as a bifunctional enzyme with catalytic activity of interconverting D-mannose-6-phosphate into D-fructose-6-phosphate and D-mannose-1-phosphate to GDP-D-mannose. Xcc XI is also classified as a bifunctional enzyme that interconverts D-xylose into D-xylulose and D-glucose into D-fructose. The present work had as general objective the functional characterization of the coding genes of PMI and XI (*xanB* and *xylA2*, respectively), especially regarding the relationship with the Xcc pathogenicity, starting from strategies that involved the construction of IPTG-inducible heterologous expression systems in *E. coli*, which allowed the confirmation of the predicted biological activities of the target proteins. Homologous double recombination between the genomic DNA and the suicide vector pNPTS138 containing flanking regions of the target gene to be deleted was used to construct mutant strains deleted in the *xanB* and *xylA2* genes (Xcc $\Delta$ *xanB* and Xcc $\Delta$ *xylA2*, respectively). A complementing strain for the first mutant (Xcc $\Delta$ C*xanB*) was successfully obtained by reinserting the gene in the original locus using pNPTS138, an unprecedented methodology in Xcc. In vivo assays in *Citrus aurantifolia* were conducted using the Xcc, Xcc $\Delta$ *xanB*, Xcc $\Delta$ C*xanB* and Xcc $\Delta$ *xylA2* strains, which allowed the evaluation of the relationship of the target genes with the Xcc pathogenicity. Deletion of the *xylA2* triggered an increase in Xcc virulence, which may be explained by the consequent accumulation of xylose and a possible increase in *hrp* gene expression. Deletion of the *xanB* resulted in loss of Xcc pathogenicity, with reduction of its properties related to the infectious process, such as motility, biofilm formation and resistance to ultraviolet radiation, with all these phenotypes being fully restored by gene complementation. Thus, the finding that the *xanB* is essential for the Xcc pathogenicity makes it a novel and promising target from a biotechnological point of view, providing the perspective of control and/or cure of citrus canker through the use of PMI inhibitors and also the development of citrus cultivars that neutralize the action of such protein during the infectious process.

**Keywords:** *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; phosphomannose isomerase; xylose isomerase; pathogenicity; virulence.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1 – Introdução

<b>Figura 1.1</b> A possível relação metabólica entre PMI e XI	16
<b>Figura 1.2</b> Lesões características do cancro cítrico	20
<b>Figura 1.3</b> Estrutura química da goma xantana	24
<b>Figura 1.4</b> A relação entre a PMI e biossíntese de xantana	25
<b>Figura 1.5</b> Esquema da estrutura geral do xilano	26
<b>Figura 1.6</b> Alinhamento entre sequências peptídicas de PMI	30
<b>Figura 1.7</b> Esquema das reações catalisadas pela xilose isomerase	32
<b>Figura 1.8</b> Contextos genômicos dos genes <i>xyIA</i> em <i>Xcc</i>	33

### Capítulo 2 – Material e Métodos

<b>Figura 2.1</b> Esquema das reações envolvidas no Teste de Seliwanoff	46
<b>Figura 2.2</b> Esquema simplificado do método de detecção de D-glicose	47
<b>Figura 2.3</b> Esquema simplificado da metodologia de deleção gênica	49
<b>Figura 2.4</b> Esquemas simplificados dos plasmídeos de deleção	50
<b>Figura 2.5</b> Metodologia para seleção dos possíveis mutantes deletados	54
<b>Figura 2.6</b> Representação do vetor de complementação pLAL6_CxanB	59
<b>Figura 2.7</b> Representação dos oligonucleotídeos utilizados na confirmação da orientação da clonagem no vetor pNPTS138_CxanB	61
<b>Figura 2.8</b> Exemplos de <i>Citrus aurantifolia</i> , utilizadas como hospedeiro no ensaio de patogenicidade <i>in vivo</i> por infiltração	63
<b>Figura 2.9</b> Ensaio de patogenicidade <i>in vivo</i> das linhagens selvagem, mutantes de deleção e complementante por aspersão	64

### Capítulo 3 – Resultados e Discussão

<b>Figura 3.1</b> Análise dos produtos de amplificação por PCR a partir de DNA genômico de <i>Xcc</i>	68
<b>Figura 3.2</b> Análise de restrição dos DNAs plasmidiais para confirmação da clonagem dos fragmentos de interesse no vetor de propagação pJET 1.2	69
<b>Figura 3.3</b> Análise de restrição dos DNAs plasmidiais para confirmação da clonagem das regiões codificadoras da PMI e da XI nos vetores de expressão da série pET	70
<b>Figura 3.4</b> Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccPMI por SDS-PAGE	71



<b>Figura 3.5</b> Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccPMI_C sob SDS-PAGE	72
<b>Figura 3.6</b> Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccGST_PMI por SDS-PAGE	74
<b>Figura 3.7</b> Análise da expressão, solubilidade e purificação <i>in tandem</i> da XccGST_PMI por SDS-PAGE	75
<b>Figura 3.8</b> Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccXI por SDS-PAGE	76
<b>Figura 3.9</b> Avaliação da atividade enzimática da XccPMI_C	77
<b>Figura 3.10</b> Avaliação da atividade enzimática da XccGST_PMI	78
<b>Figura 3.11</b> Avaliação da atividade enzimática da XccXI	79
<b>Figura 3.12</b> Avaliação da atividade enzimática da XccXI	80
<b>Figura 3.13</b> Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138_xanB	81
<b>Figura 3.14</b> Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138_xylA	82
<b>Figura 3.15</b> Confirmação da deleção do gene <i>xanB</i> por PCR	84
<b>Figura 3.16</b> Confirmação da deleção do gene <i>xylA2</i> por PCR	84
<b>Figura 3.17</b> Confirmação da depleção da síntese da PMI por <i>Western blot</i>	85
<b>Figura 3.18</b> Análise de restrição do vetor de complementação pLAL6_xanB	86
<b>Figura 3.19</b> <i>Screening</i> das colônias transformantes quanto à capacidade de degradar amido	87
<b>Figura 3.20</b> Construção do vetor de complementação pNPTS_CxanB e confirmação da orientação da clonagem do gene <i>xanB</i>	88
<b>Figura 3.21</b> Confirmação da complementação gênica do mutante XccΔxanB	89
<b>Figura 3.22</b> Curva de crescimento das linhagens Xcc e XccΔxanB	90
<b>Figura 3.23</b> Ensaio de patogenicidade <i>in vivo</i> por aspersão de Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB em <i>Citrus aurantifolia</i>	92
<b>Figura 3.24</b> Ensaio de patogenicidade <i>in vivo</i> por infiltração de Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB em <i>Citrus aurantifolia</i>	94
<b>Figura 3.25</b> Ensaio de motilidade	96
<b>Figura 3.26</b> Ensaio de formação de biofilme	98
<b>Figura 3.27</b> Ensaio de resistência à radiação ultravioleta	99
<b>Figura 3.28</b> Ensaio de patogenicidade <i>in vivo</i> por infiltração de Xcc e XccΔxylA2 em <i>Citrus aurantifolia</i>	101

## Lista de Tabelas

### Capítulo 2 – Material e Métodos

<b>Tabela 2.1</b> Desenho dos oligonucleotídeos	37
<b>Tabela 2.2</b> Pares de oligonucleotídeos e seus respectivos produtos de PCR (pPCR), funções e vetores nos quais foram clonados	39
<b>Tabela 2.3</b> Variações de posicionamento da cauda de histidinas e fusão à glutationa-S-transferase (GST) na fosfomanose isomerase recombinante utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos	40
<b>Tabela 2.4</b> Variações de posicionamento da cauda de histidinas na xilose isomerase recombinante utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos	40
<b>Tabela 2.5</b> Ciclos de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos gênicos	42
<b>Tabela 2.6</b> Etapas de PCR utilizadas na confirmação das deleções gênicas	56

## Lista de Abreviaturas e Siglas

2D-PAGE	" <i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> ", eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.
BSA	" <i>Bovine Serum Albumin</i> ", albumina de soro bovino.
DO <sub>595 nm</sub>	Densidade óptica em 595 nm.
dNTP	Trifosfato de desoxinucleotídeo.
EDTA	" <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ", ácido etilenodiamino tetraacético.
FAO	" <i>Food and Agriculture Organization</i> ", Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura.
GenBank	Banco de dados de sequências de DNA e proteínas no NCBI.
GOD	Glicose oxidase.
GST	Glutathione-S-transferase.
IMAC	" <i>Immobilized metal affinity chromatography</i> ", cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo.
kb	Quilopares de bases.
kDa	Quilodalton.
LB	Meio de cultura Lúria-Bertani.
NCBI	" <i>National Center for Biotechnology Information</i> ", Centro Nacional de Informação Biotecnológica.
ORF	" <i>Open Reading Frame</i> ", quadro aberto de leitura.
pb	Pares de bases.
PBS	" <i>Phosphate Buffer Saline</i> ", tampão fosfato de sódio.
PCR	" <i>Polymerase Chain Reaction</i> ", Reação em cadeia da DNA polimerase.
PDB	" <i>Protein Data Bank</i> ", banco de dados de estruturas resolvidas de proteínas.

PMI	Fosfomanose isomerase.
POD	Peroxidase.
pPCR	Produtos de PCR.
rpm	Rotações por minuto.
SDS-PAGE	" <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ", eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio.
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento.
SMR	Sistema de Mitigação de Riscos.
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA.
TM	Temperatura de <i>melting</i> ou temperatura de transição de fase.
UFC	Unidades formadoras de colônia.
XAM-M	Meio de cultura XAM-1 modificado, conhecido por ser indutor de patogenicidade.
XauB	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo B.
XauC	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C.
Xcc	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> linhagem 306.
Xcc $\Delta$ xanB	Linhagem mutante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com deleção do gene que codifica a fosfomanose isomerase.
Xcc $\Delta$ CxanB	Linhagem complementante do mutante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com deleção do gene que codifica a fosfomanose isomerase.
Xcc $\Delta$ xyIA	Linhagem mutante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com deleção do gene que codifica a xilose isomerase.
XccGST_PMI	Fosfomanose isomerase recombinante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> fusionada à glutationa-S-transferase na região N-terminal.
XccPMI	Fosfomanose isomerase recombinante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com cauda de histidinas N-terminal.
XccPMI_C	Fosfomanose isomerase recombinante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com cauda de histidinas C-terminal.
XccXI	Xilose isomerase recombinante de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com cauda de histidinas N-terminal.
XI	Xilose isomerase.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	4
<b>Abstract</b>	5
<b>Lista de Figuras</b>	6
<b>Lista de Tabelas</b>	8
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	9
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	15
1.1 Origem, controle e incidências do cancro cítrico	17
1.2 Características gerais e ciclo do cancro cítrico	19
1.3 O gênero <i>Xanthomonas</i>	22
1.4 Goma xantana	23
1.5 Xilano: estrutura e vias de degradação	25
1.6 Estudos genômicos e pós-genômicos	28
1.7 Genes-alvo e seus produtos	29
1.7.1 <i>xanB</i>	29
1.7.2 <i>xyIA</i>	31
1.8 Objetivos	34
1.8.1 Objetivo geral	34
1.8.2 Objetivos específicos	34
<b>Capítulo 2 – Material e Métodos</b>	35
2.1 Linhagens bacterianas, meios e condições de cultivo	35
2.2 Enzimas, kits e procedimentos em biologia molecular	35
2.3. Desenho e síntese de oligonucleotídeos	35
2.4 Extração de DNA genômico	41
2.5 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos de interesse	41

<b>2.6</b>	Construção dos sistemas de expressão	43
<b>2.7</b>	Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade	43
<b>2.8</b>	Ensaio de atividade enzimática	45
<b>2.8.1</b>	Avaliação da atividade enzimática da PMI	45
<b>2.8.2</b>	Avaliação da atividade enzimática da XI	46
<b>2.9</b>	Deleções gênicas	48
<b>2.9.1</b>	Construção dos vetores de deleção	48
<b>2.9.2</b>	Preparação de células de Xcc eletrocompetentes	51
<b>2.9.3</b>	Transformação de Xcc por eletroporação	51
<b>2.9.4</b>	Seleção de mutantes deletados	52
<b>2.9.5</b>	Confirmação das deleções dos genes-alvo	55
<b>2.10</b>	Confirmação da depleção da síntese de PMI no mutante de deleção	56
<b>2.11</b>	Complementação gênica com o vetor pLAL6	57
<b>2.11.1</b>	Construção do vetor de complementação pLAL6_CxanB	57
<b>2.11.2</b>	Seleção de complementantes	59
<b>2.12</b>	Complementação gênica com o vetor pNPTS138	60
<b>2.12.1</b>	Construção do vetor de complementação pNPTS138_CxanB	60
<b>2.12.2</b>	Confirmação da orientação de clonagem de <i>xanB</i> no pNPTS138_CxanB	61
<b>2.12.3</b>	Seleção de possíveis complementantes e confirmação da complementação gênica	62
<b>2.13</b>	Estudos funcionais das linhagens mutantes e complementante	62
<b>2.13.1</b>	Testes de patogenicidade em <i>Citrus aurantifolia</i>	62
<b>2.13.2</b>	Curvas de crescimento	64
<b>2.13.3</b>	Ensaio de formação de biofilme	65

2.13.4 Avaliação de motilidade	65
2.13.5 Sobrevivência à radiação ultravioleta	66
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	<b>67</b>
3.1 Amplificação por PCR e clonagem	67
3.2 Expressão heteróloga e purificação das proteínas recombinantes	69
3.2.1 Construção dos vetores de expressão	69
3.2.2 Análise da expressão heteróloga e da purificação por cromatografia de afinidade	71
3.3 Avaliação das atividades enzimáticas das proteínas recombinantes	76
3.4 Deleção gênica	80
3.4.1 Construção dos vetores de deleção	80
3.4.2 Confirmação das deleções gênicas	82
3.4.3 <i>Xcc</i> Δ <i>xanB</i> é incapaz de sintetizar a PMI	85
3.5 Complementação gênica utilizando o vetor pLAL6	85
3.5.1 Construção do vetor pLAL6_C <i>xanB</i>	85
3.5.2 <i>Screening</i> de possíveis complementantes	86
3.6 Complementação gênica utilizando o vetor pNPTS138	87
3.6.1 Construção do vetor pNPTS_C <i>xanB</i>	87
3.6.2 Confirmação da complementação gênica	89
3.7 Caracterização fenotípica das linhagens mutantes e complementante	90
3.7.1 Deleção de <i>xanB</i> não afeta o perfil de crescimento	90
3.7.2 <i>xanB</i> é essencial para a patogenicidade de <i>Xcc</i>	91
3.7.3 <i>xanB</i> está envolvido na motilidade, formação de biofilme e resistência à radiação UV	95
3.7.4 A deleção do gene <i>xyIA2</i> aumenta a virulência de <i>Xcc</i>	100

<b>Capítulo 4 – Conclusões</b>	105
<b>Referências</b>	106



## Capítulo 1 – Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com uma produção estimada em mais de 17 milhões de toneladas em 2017 (FAO STAT, 2017), sendo o estado de São Paulo responsável por 78,7% de toda a produção nacional (IBGE, 2018). Em 2016 as exportações de suco de laranja concentrado somaram US\$ 1,43 bilhão, valor que colocou tal *commoditie* na décima posição no *ranking* de exportações brasileiras (FAO STAT, 2017).

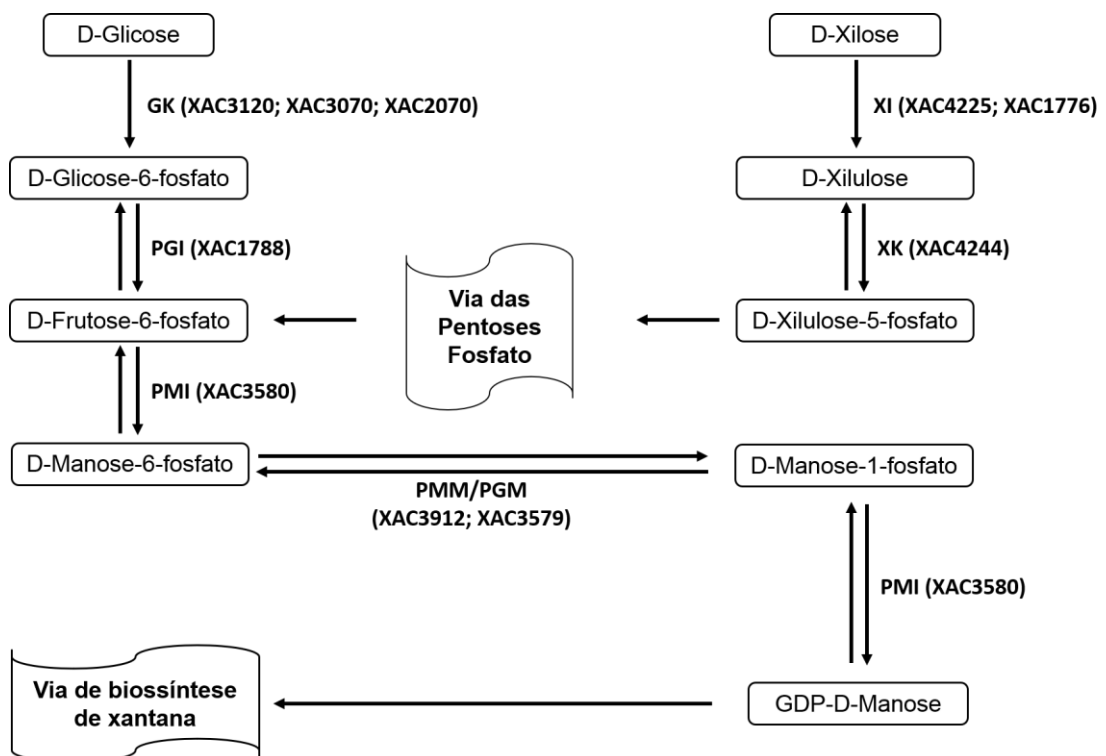
A produção de citros influencia também o mercado interno brasileiro, uma vez que em 2016 o PIB gerado por todos os elos da cadeia produtiva cítrica foi de US\$ 6,5 bilhões e, além disso, a citricultura gerou 200 mil empregos diretos e indiretos (NEVES; TROMBIN, 2017). Entretanto, o potencial econômico da citricultura é limitado, em parte, pelas doenças que afetam a sua produtividade, como o cancro cítrico, causado principalmente pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) (KOLLER, 1994; LANZA et al., 2018), que é uma doença causadora de prejuízos ao setor citricultor devido à queda na produtividade e qualidade dos frutos e à ausência de medidas eficazes de controle e cura (FERENCE et al., 2018).

Desde 1995, o cancro cítrico vem se alastrando de maneira alarmante, principalmente no Brasil e nos EUA, evidenciando a suscetibilidade dos citros frente a esse fitopatógeno (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE JUNIOR, 2016). Até 2009, o manejo da doença era realizado por meio de medidas preventivas com a erradicação de plantas sintomáticas e suspeitas, concomitantemente ao uso de inseticidas para controle do minador dos citros, um inseto facilitador da infecção por Xcc (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE JUNIOR, 2016; SANCHES et al., 2014).

Porém, o abrandamento da legislação e a extinção do programa de erradicação de plantas contaminadas ocorridos a partir de 2013, juntamente com a ineficiência dos setores de fiscalização, refizeram do cancro cítrico um problema para o setor citricultor, uma vez que a incidência da doença em 2018 atingiu preocupantes 16,43% dos talhões contaminados (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014; FUNDECITRUS, 2018). Assim, independentemente da adoção de uma estratégia de manejo integrado ou de erradicação, atualmente não há estratégias eficientes no controle ou cura do cancro cítrico (FERENCE et al., 2018).

Diante do contexto apresentado, estudos que contribuam para um melhor entendimento da infecção bacteriana, da patogênese do cancro cítrico e,

adicionalmente, que subsidiem o desenvolvimento de insumos de controle e cura da doença tornam-se necessários e valiosos. Dessa forma, é nesse cenário que se insere a presente tese de doutorado, utilizando-se da biologia molecular como uma ferramenta para caracterizar funcionalmente os genes codificantes das proteínas fosfomanose isomerase e xilose isomerase (genes *xanB* e *xylA2*, respectivamente), as quais foram previamente identificadas por nosso grupo como potencialmente relacionadas à patogenicidade de Xcc (CARNIELLI et al., 2017; ZANDONADI et al., dados não publicados). Os genes-alvo deste trabalho podem ter relação do ponto de vista metabólico (Figura 1.1), embora tal relação ainda necessite de investigação, não sendo ainda totalmente compreendida.



**Figura 1.1** A possível relação metabólica entre PMI e XI. A via das pentoses fosfato pode ser utilizada para correlacionar as funções metabólicas da PMI e da XI, proteínas-alvo deste trabalho. GK: glicocinase. PGI: fosfoglicose isomerase. PMM/PGM: fosfomanomutase/fosfoglicomutase. XK: xiluloquinase. Fonte: próprio autor.

Para isso, foram produzidas linhagens mutante e complementante para o gene *xanB*, além de uma linhagem mutante para o gene *xylA2*. Estas linhagens foram testadas quanto à virulência em *Citrus aurantifolia*, bem como o mutante para *xanB* foi caracterizado *in vitro* quanto a fenótipos relacionados à patogenicidade, relativamente à linhagem selvagem, o que permitiu a avaliação do papel dos genes *xanB* e *xylA2* no processo infeccioso de Xcc.

Além disso, foram construídos sistemas de expressão heteróloga e de purificação das enzimas fosfomanose isomerase (PMI) e xilose isomerase (XI), os quais possibilitaram a confirmação das atividades enzimáticas preditas e, também, a produção de anticorpos contra tais moléculas. Devido aos resultados obtidos neste trabalho, a enzima recombinante PMI está sendo utilizada em ensaios com inibidores obtidos por modelagem estrutural *in silico* da PMI de *Xcc* (BARCELOS et al., 2020), para avaliação da potencialidade desses compostos como novos insumos de controle do cancro cítrico.

### **1.1 Origem, controle e incidências do cancro cítrico**

O cancro cítrico constitui uma das mais importantes doenças da citricultura e a sua origem é ainda incerta. Entretanto, o Sul da China, a Indonésia e a Índia são os locais mais prováveis para o surgimento da doença, a partir dos quais houve a disseminação para os outros continentes (DAS, 2003). Nos EUA, um dos principais países produtores de citros, o cancro cítrico foi identificado pela primeira vez em 1912, sendo o sudeste do país a porta de entrada para a doença, a partir de mudas contaminadas oriundas do Japão (DOPSON, 1964).

Embora a doença tenha sido considerada erradicada nos EUA 21 anos após a sua identificação, a doença reapareceu em meados da década de 1980 na Flórida, sendo novamente declarada erradicada no ano de 1994 (STALL; CIVEROLO, 1991). Porém, em 1995, uma área residencial de 36,3 km<sup>2</sup> próxima ao Aeroporto Internacional de Miami foi infectada pela doença e, desde 1997, novos surtos da doença vêm acometendo os EUA, afetando a produtividade do setor citricultor norte-americano (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

No Brasil, o berço do cancro cítrico foi o Estado de São Paulo, especificamente o município de Presidente Prudente, no ano de 1957 (BITANCOURT, 1957). Desde o seu surgimento, a doença se alastrou para diversos estados brasileiros, como Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (NAMEKATA; ROSSI; CERAVOLO, 1996).

Em decorrência da importância econômica da citricultura para o Estado de São Paulo, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) atuou em campanhas de erradicação e manejo do cancro cítrico desde a década de 50 e, a partir de 1984, em

parceria com o Fundecitrus, mantendo a doença sob controle em boa parte deste período (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE JUNIOR, 2016).

Durante muitos anos, o controle da doença foi alcançado por meio de um programa de erradicação de plantas contaminadas e, também, de plantas sem sintomas localizadas nas imediações (inicialmente 12 m e, depois, 30 m de raio), bem como pela instauração de inspeções periódicas (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE JUNIOR, 2016). Retrato da eficiência do programa de erradicação do cancro cítrico foi a taxa de incidência mensurada no ano de 2009, com apenas 0,14% dos talhões contaminados (BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

Em 2009, produtores de áreas mais atingidas pelo cancro cítrico pressionaram a SAA com o objetivo de modificar as diretrizes do programa de erradicação da doença, o que foi acatado. Então, de 2009 a 2013, o nível de incidência deixou de ser considerado um parâmetro do programa de erradicação, fazendo com que os produtores localizados em áreas de baixa incidência também erradicassem as plantas contaminadas e as assintomáticas localizadas em um raio de 30 m (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014).

A mudança na legislação fez com que o Fundecitrus rescindisse o acordo com a SAA, sob a alegação de que o número de inspetores teria de ser vertiginosamente aumentado para atender o Estado todo e manter a doença sob controle. Como resultado, somente a SAA passou a regulamentar a erradicação pelos produtores das plantas contaminadas e, em 2012, o índice de talhões contaminados aumentou quase dez vezes em relação à 2009, chegando a 1,39% (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014).

A partir de 2013, a legislação foi modificada no sentido de desobrigar esta erradicação de plantas suspeitas e, em 2017, uma nova resolução instituída pela SAA do Estado de São Paulo passou a permitir a presença de plantas sintomáticas nos pomares, exigindo apenas um Sistema de Mitigação de Riscos (SMR) para o controle da doença (SÃO PAULO, 2013, 2017).

Após o abrandamento da legislação em relação ao manejo do cancro cítrico, houve um demasiado e preocupante aumento na incidência da doença nos últimos dez anos. Em 2009, o índice de talhões contaminados no cinturão citrícola era de 0,14%, valor que permitia a classificação da doença como “controlada” (SANCHES et al., 2014). Porém, o último levantamento, realizado em 2018, mostrou que 16,43% dos talhões apresentaram sintomas da doença (FUNDECITRUS, 2018).

Atualmente, uma das principais estratégias de mitigação da incidência da doença é a pulverização dos pomares infectados com uma solução de cobre metálico 0,1%. Contudo, em elevadas concentrações, metais pesados como o cobre são tóxicos aos microrganismos e aos ecossistemas e sua utilização tem levado à seleção de linhagens de Xcc resistentes ao cobre (BEHLAU et al., 2011), nas quais foram inclusive identificados genes relacionados a essa resistência (TEIXEIRA et al., 2008). Tal evento pode requerer a utilização de concentrações crescentes de cobre, o que é fator ainda maior de preocupação ambiental.

## 1.2 Características gerais e ciclo do cancro cítrico

Após atingirem os tecidos vegetais, as bactérias causadoras do cancro cítrico penetram principalmente pelas folhas por meio de aberturas naturais, como os estômatos e os hidatódios, e também por ferimentos causados pelo minador dos citros, por espinhos, pelo contato de máquinas e equipamentos e pelo atrito provocado por grãos de areia transportados pelo vento (GRAHAM et al., 2000).

Uma vez posicionada no apoplasto, Xcc reconhece as células hospedeiras por meio do *pilus* Hrp ou do *pilus* tipo IV, componentes do Sistema de Secreção Tipo III (T3SS, *type IV secretion system*), deixam de ser planctônicas e iniciam a fase de multiplicação e agregação como consequência da formação de biofilme (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; GRAHAM et al., 2004).

Em seguida, inicia-se o ataque às células hospedeiras, também por meio do T3SS, que resulta na translocação de fatores de virulência como a PthA, proteína que atua como reguladora da expressão do gene *upa20* da planta hospedeira, elicitando uma resposta de hipertrofia e hiperplasia (KAY et al., 2007; SCHUBERT et al., 2001). Como consequência do aumento do volume e número das células, os espaços intercelulares são diminuídos e passam a ser preenchidos pela goma xantana, polissacarídeo produzido por Xcc durante a formação de biofilme, que, por ser extremamente higroscópico, causa um dos sintomas característicos do cancro cítrico, o encharcamento do tecido vegetal (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Além disso, a injeção da PthA modula a expressão de genes relacionados à síntese de auxina e giberelina em citros, além de aumentar a produção do fitohormônio etileno (PEREIRA et al., 2014).

O cancro cítrico ocorre em uma grande diversidade de cultivares de citros e desencadeia lesões nas partes aéreas das plantas, sobretudo nas folhas e nos frutos, nos quais o tecido vegetal é induzido à hipertrofia e à hiperplasia (SWARUP et al., 1992), causando erupções de 2 a 10 mm, de aspecto corticoso e áspero (Figura 1.2) devido ao rompimento da epiderme vegetal (ROSSETTI, 2001), com margens elevadas, centros afundados e circulares (DEWDNEY; GRAHAM; ROGERS, 2014).



**Figura 1.2** Lesões características do cancro cítrico. Lesões típicas do cancro cítrico em folha, fruto e ramo infectados por Xcc, da esquerda para a direita. Fonte: Fundecitrus (<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=66>)

O desbalanço na produção de pigmentos em decorrência da infecção pode ocasionar o aparecimento de halos amarelos ao redor das erupções, o que está associado ao decréscimo de clorofilas a e b, caroteno e xantofila (PADMANABHAN et al., 1973). Além disso, lesões em estágios avançados podem se apresentar escurecidas em decorrência da colonização por fungos saprófitos, como *Colletotrichum* spp. (DEWDNEY; GRAHAM; ROGERS, 2014).

Ambas as superfícies foliares são acometidas pelas lesões do cancro cítrico, mas principalmente a abaxial, por conta da elevada concentração de estômatos, fazendo das folhas a região mais importante no processo de infecção (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Adicionalmente, a atividade do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella*) pode facilitar a penetração do patógeno e intensificar a incidência do cancro cítrico (HALL; GOTTWALD; BOCK, 2010).

Os períodos de maior suscetibilidade ao cancro cítrico ocorrem após as brotações e, também, no início do desenvolvimento dos frutos, podendo ser agravados pela ocorrência de grandes tempestades e elevação abrupta de temperatura (SCHUBERT et al., 2001).

Entretanto, os sintomas apresentados pelas plantas contaminadas pelo cancro cítrico não constituem o principal problema da doença, uma vez que raramente tais manifestações são letais para a planta. Todavia, um dos efeitos adicionais do cancro

cítrico é o aumento na produção do fito-hormônio etileno em resposta à infecção, como mencionado anteriormente, o que provoca a abscisão prematura de folhas e frutos, tornando estes inapropriados para o comércio de frutas frescas e não comercializáveis para a indústria (CROZIER et al., 2000).

A chuva e o vento são relevantes agentes disseminadores do cancro cítrico. Ao serem molhadas pela chuva, as lesões cancrosas são exsudadas e os potenciais inóculos bacterianos têm a sua propagação facilitada pelo vento, o que as permite atingir distâncias consideravelmente longas, da ordem de alguns quilômetros em situações extremas (DAS, 2003). Frutos em estágio avançado de infecção também atuam como dispersores da doenças pois apresentam ruptura na casca, o que facilita a distribuição do patógeno (AMARAL, 2003).

A elevada taxa de sobrevivência de Xcc nas lesões nas frutas e em variadas superfícies faz do homem um outro importante agente disseminador, por meio do transporte de mudas, restos de cultura e do manuseio de equipamentos contaminados, principalmente quando as plantas estão molhadas (BOCK et al., 2006).

O manejo do cancro cítrico pode envolver medidas drásticas como a erradicação de plantas contaminadas, principalmente em áreas endêmicas, como ocorreu por um longo período de tempo no Brasil (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE JUNIOR, 2016). Paralela e concomitantemente à erradicação, diversos citricultores desenvolveram estratégias de controle, restringindo a aquisição de mudas de citros oriundas de locais vigorosamente atingidos pelo cancro cítrico (LEITE JR; MOHAN, 1990).

A desinfecção completa de roupas, sapatos, máquinas e equipamentos utilizados em campo também tem sido uma prática de controle da disseminação do patógeno, uma vez que a capacidade de sobrevivência de Xcc em materiais de madeira, metálicos, plásticos e de couro atinge até 72 horas dependendo das condições climáticas (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Dado que o vento é um dos principais agentes dispersores da doença, a implantação de quebra-ventos é uma das mais efetivas medidas de controle da dispersão de Xcc (LEITE JR; MOHAN, 1990), principalmente quando utilizada concomitantemente à pulverização de cobre nos pomares, embora este metal seja tóxico ao ambiente (BEHLAU et al., 2017) e já tenham sido identificadas linhagens resistentes (BEHLAU et al., 2011).

Outras medidas de controle do cancro cítrico incluem a aplicação de indutores de resistência (GRAHAM et al., 2000; GRAHAM; MYERS, 2009), controle do minador dos citros (HOY; NGUYEN, 1997) e, mais recentemente, o uso de produtos com atividade bactericida contra Xcc como metabólitos de *Pseudomonas* sp. (DE OLIVEIRA et al., 2011), dihidroxibenzoatos de alquila (NAZARÉ et al., 2018), galatos de alquila (SILVA et al., 2013) e o desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas (BARBOSA-MENDES et al., 2009; JIA et al., 2016, 2017; PENG et al., 2017; YANG et al., 2011).

Entretanto, as medidas de controle e manejo do cancro cítrico são mitigadoras de risco e paliativas, não sendo constatadas no campo medidas eficazes de controle e cura para a doença (SILVA et al., 2013).

### 1.3 O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo economicamente importante de fitopatógenos com estreito espectro de hospedeiro para cada espécie, mas que na totalidade das espécies conhecidas acomete 240 gêneros de plantas distribuídas em 68 famílias diferentes, especialmente a das rutáceas (HAYWARD, 1993).

Este grupo é composto por bactérias aeróbicas restritas, Gram-negativas, portadoras de um único flagelo polar, não fastidiosas, com morfologia de bastonete e não redutoras de nitrato (GRAHAM et al., 2004; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

As colônias são circulares, lisas, convexas e, por conta da produção de um aril-poliene-brominado denominado xantomonadina, apresentam coloração amarelada (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). Seu aspecto visual é mucoso (STALL; CIVEROLO, 1991), em decorrência da produção da goma xantana, um polissacarídeo plurivalente com aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica, química e petroquímica (GOTTIG et al., 2010; LOPEZ; MORENO; RAMOS-CORMENZANA, 2001).

Dentre as espécies causadoras do cancro cítrico, destaca-se a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), que infecta a maioria das espécies conhecidas de citros (DEWDNEY; GRAHAM; ROGERS, 2014). Encontrada no Uruguai, Paraguai e Argentina, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB) é menos virulenta e provoca a cancrose B principalmente em *Citrus limon* (STALL; SEYMOUR, 1983). *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC), causadora da cancrose C, ataca um único hospedeiro, *Citrus aurantifolia* (CIVEROLO, 1984).



Apesar de haver variações a respeito da suscetibilidade de espécies de *Citrus* em relação ao cancro cítrico, a resistência à infecção artificial por Xcc não foi identificada, o que sugere que as flutuações de vulnerabilidade dos hospedeiros à bactéria decorram de componentes ambientais (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

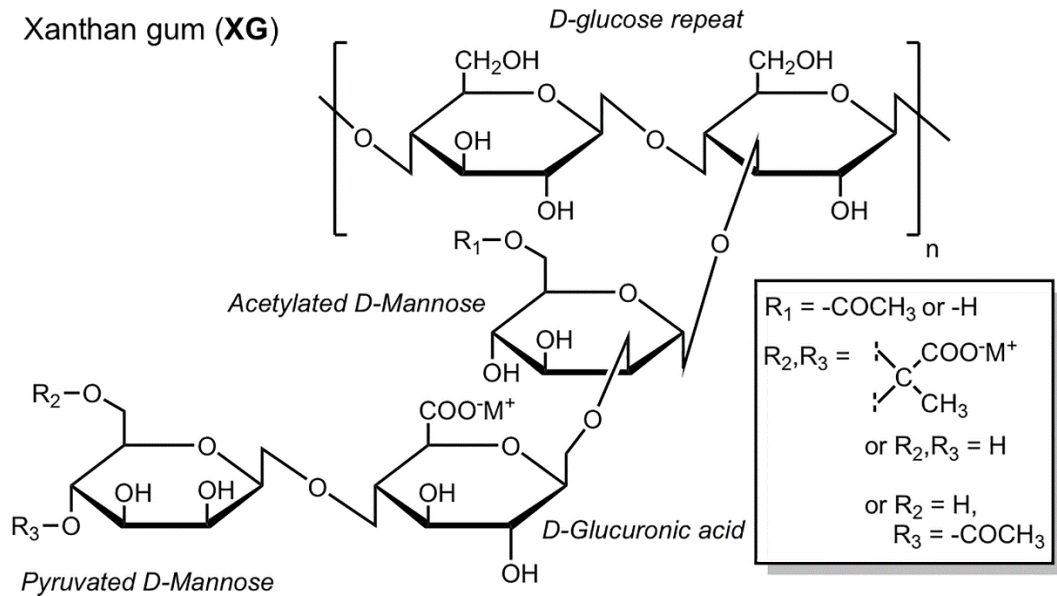
#### 1.4 Goma xantana

Dentre os fatores de virulência produzidos por *Xanthomonas* spp., a goma xantana merece especial atenção, uma vez que, além de ser um produto de interesse industrial (CARMONA et al., 2017), esse exopolissacarídeo (EPS) possui relação com a formação de biofilme e, também, com o processo infeccioso (BÜTTNER; BONAS, 2010).

A xantana é um heteropolissacarídeo constituído por um esqueleto central formado por dois resíduos de D-glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4, sendo que o segundo é substituído em seu oxigênio 3 (O-3) por um trissacarídeo composto por manose-( $\beta$ -1,4)-ácido glicurônico-( $\beta$ -1,2)-manose, com o primeiro resíduo de manose podendo ser acetilado e o último piruvatado (Figura 1.3).

O grau de acetilação e piruvatação dos resíduos de manose é variável entre as diversas espécies (e até mesmo entre as linhagens) de *Xanthomonas*, podendo sofrer influência adicional de fatores ambientais (CADMUS et al., 1976; KOOL et al., 2013; STANKOWSKI; MUELLER; ZELLER, 1993). Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, a piruvatação é essencial para a patogenicidade por suprimir a deposição do polissacarídeo calose, uma importante estratégia de defesa das plantas (BIANCO et al., 2016)

A via de biossíntese de xantana é bem compreendida em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, sendo primariamente composta pelo *operon gumBCDEFGHIJKLM*, cujos genes codificam principalmente glicosiltransferases e proteínas transportadoras, as quais possuem atividade concentrada na membrana celular, local de síntese desse EPS (KATZEN et al., 1996).

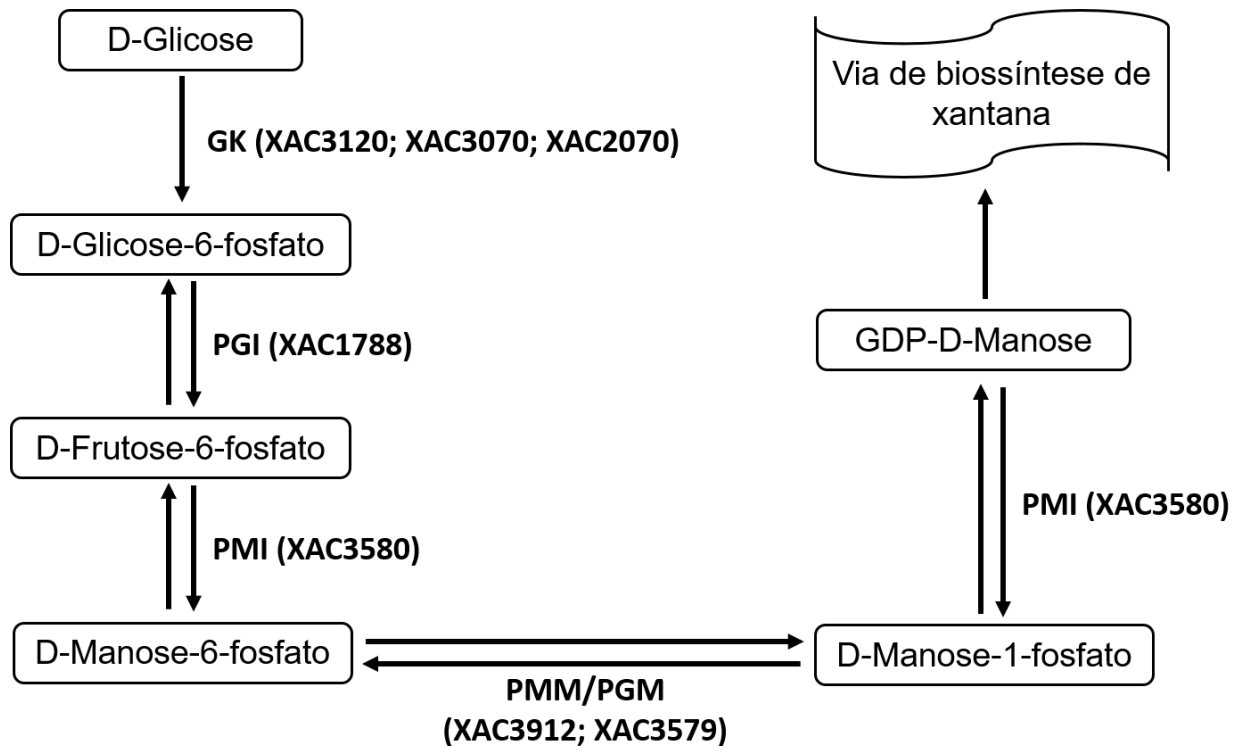


**Figura 1.3** Estrutura química da goma xantana. A figura apresenta a unidade pentassacarídica que compõe o exopolissacarídeo xantana. Fonte: HUTCHISON et al., 2019.

Os mais importantes precursores da via de biossíntese de xantana são UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico, fosfoenolpiruvato e GDP-manose, sendo este último um composto produzido pela fosfomanose isomerase (PMI) a partir de manose-1-fosfato, que por sua vez tem como precursor a manose-6-fosfato, originada também pela ação da PMI sobre a frutose-6-fosfato (Figura 1.4) (KÖPLIN et al., 1992).

Embora não seja essencial para a patogenicidade de *Xcc* (DUNGER et al., 2007), a goma xantana está envolvida na sobrevivência epifítica por promover proteção contra a radiação ultravioleta, ao congelamento e a dessecação (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

A relação entre a biossíntese de xantana e o processo infeccioso de *Xanthomonas* spp. tem sido estudada nas últimas décadas. Dunger e colaboradores (2007) produziram linhagens deficientes na produção de xantana por meio da deleção do gene *gumD* de *Xcc*. Apesar de não ter afetado a extensão dos sintomas provocados pela bactéria e a capacidade de induzir a resposta de hipersensibilidade, a defectividade na produção de xantana reduziu a resistência ao estresse oxidativo, além de comprometer a sobrevivência no ambiente epifítico.



**Figura 1.4** A relação entre a PMI e biossíntese de xantana. A via de biossíntese de xantana é alimentada por diversos precursores, dentre os quais se destaca a GDP-D-Manose, a qual é produzida a partir de D-manose-1-fosfato pela fosfomanose isomerase (PMI). GK: glicocquinase. PGI: fosfoglicose isomerase. PMM/PGM: fosfomanomutase/fosfoglicomutase. Fonte: próprio autor.

Em *Xanthomonas campestris*, a deleção do mesmo gene supracitado resultou em redução da virulência bacteriana por conta da alteração da via de biossíntese de xantana em experimentos utilizando repolho (KATZEN et al., 1998) e brócolis (CHOU et al., 1997) como hospedeiros.

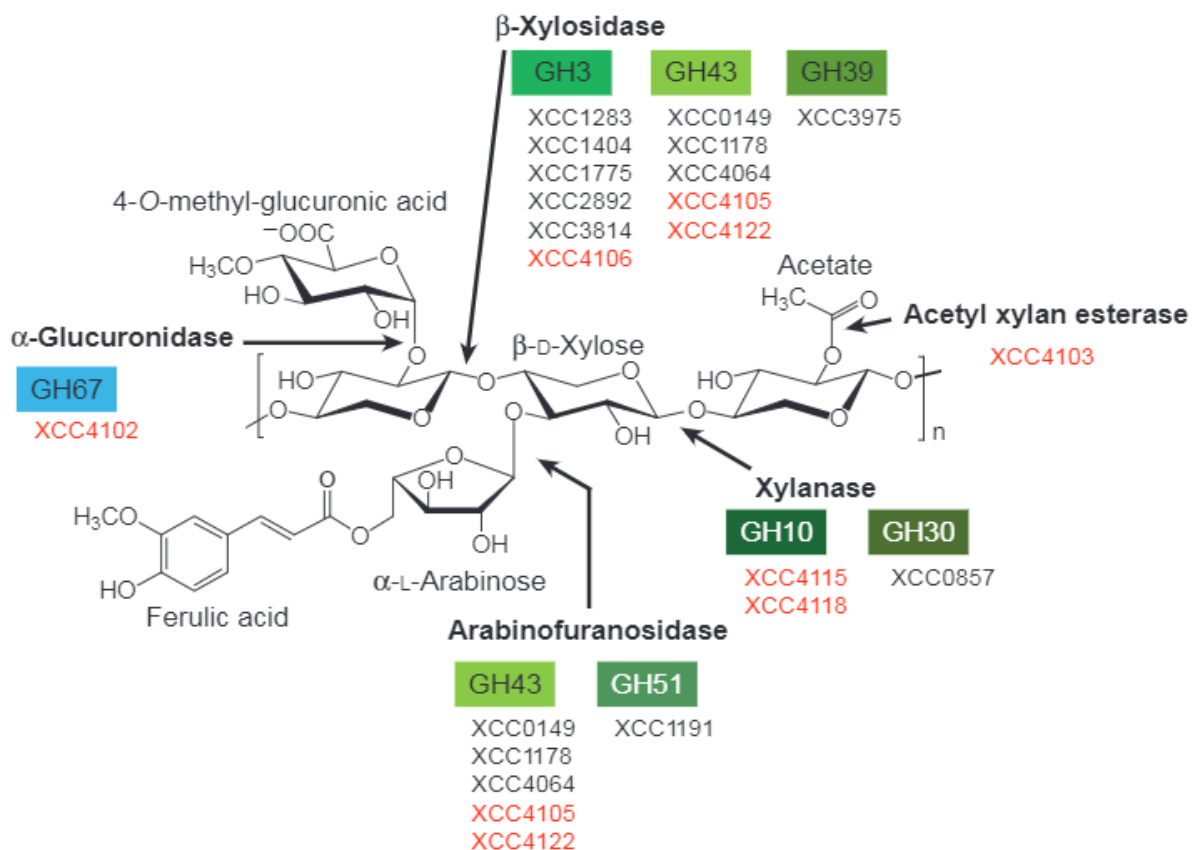
A disrupção de um outro gene do *operon gum*, relacionado à biossíntese de xantana, *gumG*, que codifica uma acetiltransferase, levou à diminuição na produção de exopolissacarídeos e à redução severa da virulência de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (DHARMAPURI; SONTI, 1999).

### 1.5 Xilano: estrutura e vias de degradação

Os carboidratos complexos (oligossacarídeos e polissacarídeos) são formados por uma gigantesca variedade de combinações de subunidades de resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e possuem funções estruturais e de armazenamento de energia, constituindo o maior depósito de carbono passível de metabolização da biosfera (GRONDIN et al., 2017).

Unidades de D-xilose, uma aldopentose, estão unidas por ligações  $\beta$ -1,4 para formar o esqueleto central de um dos maiores componentes das hemiceluloses presentes na parede celular vegetal (Figura 1.5), o heteropolissacarídeo xilano (CHOW et al., 2015), que pode conter uma diversidade enorme de substituintes em suas ramificações (BUSSE-WICHER et al., 2016).

Sendo um heteropolissacarídeo, o xilano apresenta composição heterogênea, podendo apresentar ramificações com L-arabinofuranose ligada às posições C-3 dos resíduos de D-xilose, os quais são denominados arabinoxilanos (AX) (SCHENDEL et al., 2015). Os glicuronoxilanos (GX) possuem o ácido D-glicurônico ou 4-O-metil-glicurônico ligado às posições C-2 dos resíduos de D-xilose (TOGASHI; KATO; SHIMIZU, 2009), ao passo que os heteroxilanos que contêm uma mistura de L-arabinofuranose e ácido D-glicurônico são chamados de arabinoglicuronoxilanos (AGX) (EBRINGEROVÁ, 2005).



**Figura 1.5** Esquema da estrutura geral do xilano. Estrutura do heteropolissacarídeo xilano com a indicação das enzimas xilanolíticas, bem como de suas ORFs codificantes em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (modificado a partir de DÉJEAN et al., 2013).

Sistemas enzimáticos xilanolíticos têm sido identificados em bactérias, fungos e leveduras (CHADHA et al., 2019) e são basicamente compostos por xilanases e outras glicosidases (GH, glycoside hydrolases), carboidrato esterases (CE) e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, *Lytic polysaccharide monoxygenases*), compondo vias metabólicas responsáveis pela degradação completa de xilano (MALGAS et al., 2019).

As carboidrato-esterases (CEs) são enzimas presentes em alguns microrganismos e têm como função sobrepujar uma estratégia de proteção que diversas plantas desenvolveram, baseada na esterificação parcial de polissacarídeos com ácido acético. Por exemplo, resíduos de glicosil acetilados não podem ser hidrolisados pelas glicosidases, mas após serem desacetilados pelas esterases específicas, tornam-se acessíveis às GH (BIELY, 2012).

A degradação das cadeias laterais de xilano inclui as  $\alpha$ -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que hidrolisam as ligações glicosídicas entre os resíduos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo em AXs e xilo-oligossacarídeos (XOS) (LAGAERT et al., 2014). Da mesma forma, as  $\alpha$ -glicuronidases (EC 3.2.1.139) atuam sobre os GX, liberando os substituintes de ácido D-glicurônico (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

Já a degradação do esqueleto central xilano tem a participação principal das  $\beta$ -xilosidases (E.C.3.2.1.37) e endo-1,4- $\beta$ -xilanases (EC 3.2.1.8), enzimas que atuam na hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre os resíduos de xilopiranosil, liberando xilose, xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e até xilo-oligossacarídeos (XOs) mais longos ou também ramificados (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016).

Importante salientar também a recente descoberta de estratégias auxiliares de hidrólise de polissacarídeos, baseadas em um mecanismo oxidativo ainda pouco compreendido, que atuam sinergicamente com as enzimas dos sistemas xilanolíticos na desconstrução dessas macromoléculas e na disponibilização de biomassa vegetal (MOREAU et al., 2019), como já descrito em *Xanthomonas* (SANTOS et al., 2014).

Diversos fitopatógenos, incluindo Xcc, têm desenvolvido eficientes vias metabólicas de assimilação da D-xilose liberada pelas enzimas xilanolíticas como fonte de energia, envolvendo o transporte dessa pentose através da membrana citoplasmática, seguida por sua isomerização a D-xilulose, catalisada pela xilose isomerase, e fosforilação a D-xilulose-5-fosfato, um componente que é finalmente metabolizado pela via das pentoses-fosfato (CHOW et al., 2015). Dessa forma, a

xilose isomerase, um dos alvos deste trabalho, está envolvida na utilização de fontes de carbono oriundas do xilano.

## 1.6 Estudos genômicos e pós-genômicos

A importância econômica da citricultura associada à falta de controle e cura eficazes do cancro cítrico motivou estudos em bactérias do gênero *Xanthomonas* utilizando diversas estratégias, dentre as quais destacam-se a genômica comparativa (FONSECA et al., 2019a, 2019b), proteômica diferencial (ARTIER et al., 2018; CARNIELLI et al., 2017; MOREIRA et al., 2017), análise de expressão gênica (ASTUA-MONGE et al., 2005), análise funcional por deleção gênica (ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016; UCCI et al., 2014), bem como a elucidação da estrutura e função de proteínas relacionadas ao processo infeccioso (CABREJOS et al., 2019; GOTO et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018).

Tais estudos foram impulsionados pela conclusão dos projetos de sequenciamento dos genomas de bactérias do gênero *Xanthomonas*, principalmente Xcc (DA SILVA et al., 2002), ampliaram o conhecimento sobre a patogênese do cancro cítrico e estão imersos em um contexto de busca por estratégias de controle para a doença.

A proteômica, considerada uma análise em larga escala da expressão proteica, é uma das áreas centrais no estudo do metabolismo, sendo amplamente utilizada em nosso grupo de pesquisa para a identificação de proteínas envolvidas no processo infeccioso de Xcc (ARTIER et al., 2018; CARNIELLI et al., 2016, 2017).

No trabalho de Carnielli e colaboradores (2017), proteínas superficiais de células intactas de Xcc foram marcadas com fluoróforos, após a exsudação das bactérias de folhas de citros infectadas (ensaio *in vivo* em *Citrus aurantifolia*) ou após cultivo em condição de não infecção (cultivo *in vitro* em meio rico em nutrientes). Após lise celular, as proteínas totais foram separadas por eletroforese bidimensional (2D-DIGE) e os *spots* diferenciais entre as duas condições foram excisados do gel, digeridos com tripsina e identificados por espectrometria de massas.

Uma das proteínas encontradas como mais abundantes na condição de indução de patogenicidade foi a fosfomanose isomerase (PMI). Embora a PMI não apresente peptídeo sinal conhecido, relacionado ao transporte à membrana, a sua identificação na superfície de Xcc desperta interesse, uma vez que tal exposição

facilita a utilização de substâncias inibidoras, caso a proteína se revele um bom alvo. Assim, a localização celular, juntamente à identificação inédita em Xcc em uma situação de indução de patogenicidade *in vivo* foram motivações para a escolha do gene codificante da PMI como alvo para este trabalho.

Em um outro trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, Zandonadi (2012) comparou o perfil de extratos proteicos enriquecidos em periplasma de Xcc e XauB (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, tipo B), esta última causadora de uma forma mais branda da doença, a cançrose. As bactérias foram cultivadas nos meios XAM-M (indutor de patogenicidade) ou em caldo nutriente (CN), um meio rico em nutrientes e não indutor da expressão de fatores de virulência do sistema de secreção tipo III (CARVALHO, 2006). Dezenas de proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas entre Xcc e XauB nas diferentes condições, e a xilose isomerase foi encontrada exclusivamente em Xcc quando cultivada em XAM-M. Por conta desse indício de participação da xilose isomerase no processo infeccioso de Xcc, o seu gene codificante, *xyIA2*, foi também escolhido como alvo para esta tese de doutorado.

## **1.7 Genes-alvo e seus produtos**

### **1.7.1 *xanB***

Fosfomanose isomerases (EC 5.3.1.8) são enzimas envolvidas no metabolismo de manose por meio da interconversão de D-manose-6-fosfato e D-frutose-6-fosfato, mas em alguns casos, são capazes de converter D-manose-1-fosfato em GDP-D-manose (Figura 1.4), um intermediário imprescindível para a síntese de EPS, como a xantana (JENSEN; REEVES, 1998; MILES; GUEST, 1984; PAPOUTSOPOULOU; KYRIAKIDIS, 1997; SMITH et al., 1992).

Foram identificadas três classes de PMI em bactérias e fungos, as quais possuem sequências peptídicas significativamente diferentes. As PMI tipo I possuem uma única atividade catalítica, a de interconversão de D-manose-6-fosfato e D-frutose-6-fosfato. Além da atividade apresentada pelas PMI tipo I, a conversão de D-manose-1-fosfato em GDP-D-manose é uma atividade catalítica adicional apresentada pelas PMI tipo II, também chamadas de PMI-GMP (fosfomanose isomerase-GDP-D-manose pirofosforilase). O terceiro tipo de PMI possui a mesma

atividade catalítica da PMI tipo I e ocorre somente em *Rhizobium meliloti*, sendo incluída em uma categoria única por conta de sua sequência peptídica notadamente distinta das PMI do tipo I (JENSEN; REEVES, 1998; SCHMIDT et al., 1992).

A PMI de *Xanthomonas campestris* foi categorizada na classe II por sua atividade catalítica bifuncional, sendo também identificada como uma enzima zinco-dependente, uma vez que este íon metálico atua como um cofator enzimático (PAPOUTSOPOULOU; KYRIAKIDIS, 1997).

Dado que a sequência peptídica predita a partir do gene *xanB* de Xcc compartilha uma identidade de 88,22% e semelhança de 99,78% com a sequência de *Xanthomonas campestris* (Figura 1.6), é possível inferir que a enzima de Xcc também se enquadra no tipo II.

```

citri          MSDVLP I I L S G G S G T R L W P L S R E S Y P K Q F L P L V G D K S M L Q S T W L R A A P V A G H A P I V V A N E 60
campestris   MSDVLP I I L S G G S G T R L W P L S R E T Y P K Q F L P L V G E H S M L Q A T W L R S A P V A A H A P I V V A N E 60
                *****:*****:*****:*****:*****:*****

citri          E H R F M A A E Q L Q Q L G V K P S A I L L E P K G R N T A P A I A V A A L E A T R D G A D P L L L V L P S D H V I Q N 120
campestris   E H R F M A A E Q L Q Q L G V K P S A I L L E P K G R N T A P A I A V A A L E A T R N G G D P L L L V L P S D H V I R D 120
                *****:*.*****:

citri          E A A F Q A A V T L A A T A A E Q G K L V T F G I K P T A P E T G Y G Y I K A S A G A G A S A V E R F V E K P D L A T A 180
campestris   E A A F Q A A V T V A A A A E Q G K L V T F G I K P T A P E T G Y G Y I K A G A G T G A T A V E R F V E K P D L A T A 180
                *****:*.*****:*****:*****:*****:*****

citri          Q S Y L A S G E Y Y W N S G M F L F R A S R Y L E E L R K F H P A I A D A C Q K A W E N G K R D A D F T R L D K D A F A 240
campestris   Q G Y L A S G E Y Y W N S G M F L F R A S R Y L E E L R K F Q P A I A D A C Q K A W E G G K R D A D F T R L D K D A F A 240
                * . *****:*****:*****:*****

citri          A S P S D S I D Y A V M E K T A D A V V V P L D A G W N D V G S W S S L L D V S N Q D A Q G N A H H G D V I Q L D C Q N 300
campestris   S S P S D S I D Y A V M E K T A D A V V V P L D A G W N D V G S W S S L L D V S E Q D G Q G N A H H G D V I Q L D C K N 300
                : *****:*****:*****:*****:*****

citri          T Y A Y G S R L I A M V G L E D V V V V E T D A V L V G H R D R I Q E V K D V V S Q I K T A G R S E A T W H R K V Y R 360
campestris   T Y A Y G S R L I A M V G L E N V V V V E T D A V L V G H R D R I Q E V K E V V S Q I K S A G R S E A T W H R K V Y R 360
                *****:***** *****:*****:*****:*****

citri          P W G A Y D S I D M G Q R H Q V K R I T V K P G A V L S L Q M H H H R A E H W I V V S G T A E V T R G E E V L L L T E N 420
campestris   P W G A Y D S I D M G Q R F Q V K R I T V K P G A T L S L Q M H H H R A E H W I V V S G T A E V T R G D E V L L L T E N 420
                ***** . ***** . *****:*****

citri          Q S T Y I P L G V T H R L R N P G K L P L E L I E V Q S G S Y L G E D D I V R F E D T Y G R A 467
campestris   Q S T Y I P L G V T H R L K N P G K L P L E L I E V Q S G S Y L G E D D I V R F E D T Y G R T 467
                *****:*****:

```

**Figura 1.6** Alinhamento entre sequências peptídicas de PMI. As sequências peptídicas preditas a partir da PMI de Xcc e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foram alinhadas utilizando o algoritmo CLUSTAL O(1.2.4), resultando em uma identidade de 88,22% e semelhança de 99,78%. O único par de resíduos de aminoácidos sem similaridades químicas está destacado em vermelho. Xcc e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* estão mencionadas como *citri* e *campestris*, respectivamente. Resíduos idênticos e com características principais conservadas são mostrados por (\*) e (:), respectivamente. Resíduos com características secundárias conservadas são mostrados por (.). Fonte: próprio autor.



A relação entre o gene *xanB* e a patogenicidade de *Xcc* não havia sido estabelecida, mas há trabalhos que associam a PMI de *Xanthomonas campestris* ou outras espécies a processos como a síntese de xantana (KÖPLIN et al., 1992; PAPOUTSOPOULOU; KYRIAKIDIS, 1997), adesão celular e reconhecimento (WIEDERSCHAIN, 2013), formação de biofilme (AMOS et al., 2011; SOUSA et al., 2007) e produção de lipopolissacarídeos (VORHÖLTER; NIEHAUS; PÜHLER, 2001), processos estes relacionados com a patogenicidade.

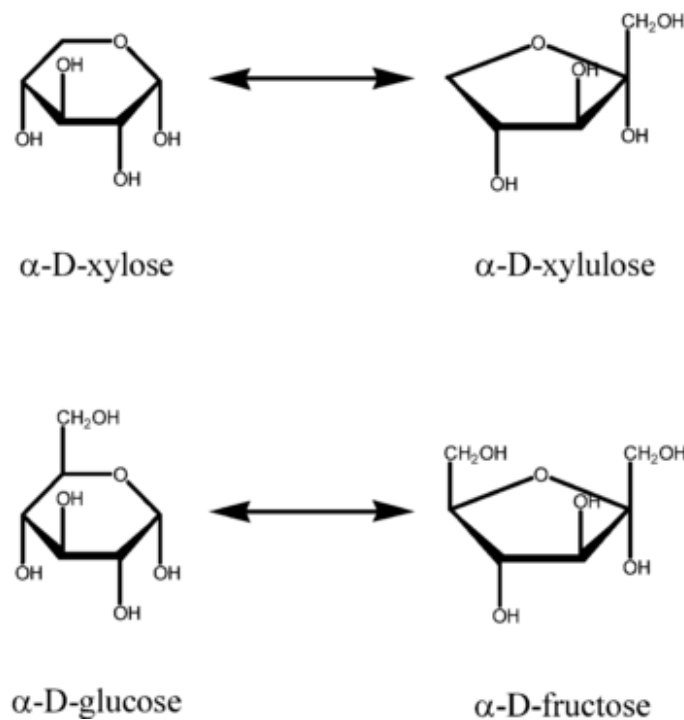
No PDB (Protein Data Bank), existem vinte estruturas cristalográficas de fosfomanose isomerases pertencentes a somente quatro espécies, as quais possuem os seguintes códigos de acesso: *Candida albicans* (1PMI e 5NW7), *Salmonella typhimurium* (3H1M, 3H1W, 3H1Y, 5ZT4, 5ZT5, 5ZT6, 5ZUW, 5ZUY, 5ZV0, 5ZVR, 5ZVU, 5ZVX e 2WFP), *Pyrobaculum aerophilum* (1X9H, 1X9I, 1TZB e 1TZC) e *Bacillus subtilis* (1QWR).

### 1.7.2 *xyIA*

A xilose isomerase (EC. 5.3.1.5), também conhecida como glicose isomerase (Figura 1.7), é uma enzima responsável por catalisar as reações de isomerização reversíveis de D-xilose em D-xilulose e D-glicose em D-frutose (STEVIS; HO, 1985), porém, sua afinidade pela xilose é 160 vezes maior do que pela glicose em *Aeromonas hydrophila* (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

No contexto do processo infeccioso de *Xanthomonas* spp., a fonte de carboidratos foi identificada como um componente significativo na expressão de fatores de virulência. Por exemplo, o *cluster hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) em *Xanthomonas oryzae* possui alguns membros com regulação positiva somente na presença de xilose (IKAWA; TSUGE, 2016).

Em *Xanthomonas* spp., os componentes desse *cluster hrp* codificam para o sistema de secreção tipo III, cuja função é injetar proteínas efetoras nas células do hospedeiro, de modo que o fitopatógeno aproveite a degradação da parede celular lignocelulósica de maneira ideal, utilizando os seus resíduos tanto como moléculas de sinalização quanto como fonte energética (BÜTTNER; BONAS, 2010).



**Figura 1.7** Esquema das reações catalisadas pela xilose isomerase. A enzima catalisa as isomerizações reversíveis entre D-xilose e D-xilulose, bem como de D-glicose e D-frutose (modificado a partir de BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

Diferentemente das leveduras industriais, bactérias do gênero *Xanthomonas* têm a capacidade de metabolizar xilose, um dos principais componentes da massa lignocelulósica, que é negligenciada na produção de biocombustíveis (SIEVERT et al., 2017). É pela capacidade de aproveitar essa biomassa abundante e barata que o gênero *Xanthomonas* tem sido objeto de estudos voltados à produção de biocombustíveis e goma xantana (ZHANG; CHEN, 2010).

O metabolismo da xilose envolve uma série de genes frequentemente organizados em *operons* que respondem a essa aldopentose. Em *Bacillus* spp. e *Lactobacillus pentosus*, o *operon xylAB* é composto pelos genes *xylA* (codificante da xilose isomerase) e *xylB* (codificante da xiluloquinase) e é inibido pelo regulador da família LacI, chamado XylR (DAHL; SCHMIEDEL; HILLEN, 1995; LOKMAN et al., 1997).

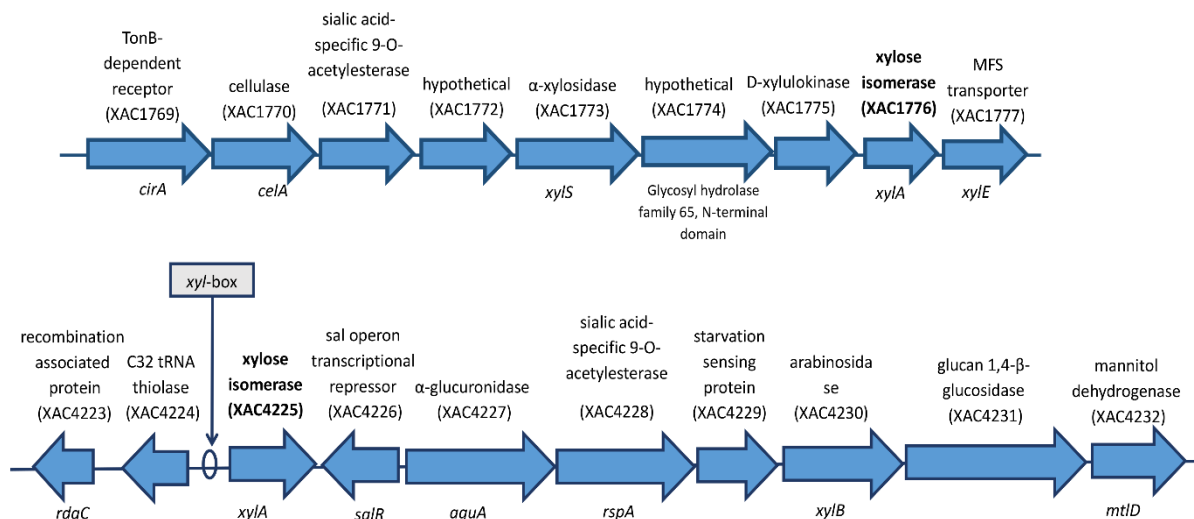
Em *Caulobacter crescentus*, XylR se liga ao operador *xyl-box* na ausência de xilose, inibindo a expressão dos genes regulados por *xyl-box*, mas se dissocia quando ligado à xilose, (STEPHENS et al., 2007). Em *Xanthomonas oryzae*, XylR também reprime a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo da xilose que são regulados por *xyl-box*, além de estar envolvido na regulação negativa dos genes *hrp* (IKAWA et al., 2018).

A deleção do gene *xylR* em *Streptomyces lividans* aumentou quase cinco vezes a expressão do gene codificante da xilose isomerase, uma das principais enzimas do metabolismo da xilose (HEO et al., 2008).

O genoma de Xcc possui dois genes anotados como codificantes de xilose isomerase (Figura 1.8) e, para facilitar a identificação, esses genes foram aqui denominados *xylA1* (ORF XAC1776) e *xylA2* (ORF XAC4225), sendo este último o alvo do presente trabalho.

Embora as sequências peptídicas preditas a partir dos dois genes compartilhem 99,32% de identidade, os contextos genômicos são bastante distintos, uma vez que apenas *xylA2* está inserido em um operon regulado por *xyl-box*, isto é, sob provável ação de XylR ou outra proteína análoga.

Apesar do metabolismo de xilose ter sido relacionado à patogenicidade de *Xanthomonas* spp., não há estudos sobre o papel desempenhado pela xilose isomerase no processo infeccioso de Xcc, uma das enzimas centrais de via metabólica dessa aldopentose.



**Figura 1.8** Contextos genômicos dos genes *xylA* em Xcc. Os dois genes codificantes de xilose isomerase estão destacados em negrito. Apesar de compartilharem identidade de aproximadamente 99% em relação às suas sequências nucleotídicas, apenas *xylA2* (ORF XAC4225) está sob provável controle de *xyl-box* (ZANDONADI et al., dados não publicados).

No PDB (*Protein Data Bank*), existem inúmeras estruturas cristalográficas de xilose isomerases, com destaque para as espécies *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (código de acesso 1A0C), *Bacillus stearothermophilus* (1A0D), *Thermotoga neapolitana* (1A0E), *Thermus thermophilus* (1BXB), *Thermus caldophilus*

(1BXC), *Streptomyces diastaticus* (1CLK), *Streptomyces rubiginosus* (4ZB2, 4DUO), *Streptomyces olivochromogenes* (1MUW, 1S5N, 1S5M, 2GYI), *Actinoplanes missouriensis* (1BHW), *Pseudomonas aeruginosa* (2H5A) e *Arthrobacter sp* (4XIA, 5XIA).

## 1.8 Objetivos

### 1.8.1 Objetivo geral

O objetivo foi a análise funcional dos genes *xanB* e *xyIA2* de *Xcc*.

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Expressão heteróloga das ORFs XAC3580 e XAC4225 e purificação por cromatografia de afinidade dos produtos recombinantes;
- Caracterização da atividade biológica dos produtos de expressão heteróloga dos genes *xanB* e *xyIA2* de *Xcc*.
- Obtenção de linhagens de *Xcc* mutantes deletadas nos genes *xanB* e *xyIA2* (*Xcc*Δ*xanB* e *Xcc*Δ*xyIA*, respectivamente);
- Obtenção de linhagem complementante para o gene *xanB* (*Xcc*Δ*CxanB*);
- Estudos *in vivo* dos efeitos da deleção dos genes *xanB* e *xyIA2* em relação à patogenicidade e virulência de *Xcc* em *Citrus aurantifolia*;
- Avaliação dos efeitos da deleção do gene *xanB* na motilidade, formação de biofilme e resistência à radiação ultravioleta.

## Capítulo 2 – Material e Métodos

### 2.1 Linhagens bacterianas, meios e condições de cultivo

A linhagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (Xcc) foi gentilmente fornecida pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus, Araraquara, SP, Brasil) e armazenada a -80 °C em meio Luria-Bertani (LB, Sigma) com 10% de glicerol.

Os cultivos de Xcc, *E. coli* DH5 $\alpha$  e *E. coli* BL21(DE3) em meios sólido e líquido foram realizados em ágar-LB (Sigma) e caldo LB (Sigma), respectivamente. Para Xcc, os cultivos foram incubados a 30 °C e 200 rpm, e para as linhagens de *E. coli*, a temperatura foi de 37°C e 250 rpm.

Para os ensaios de caracterização da linhagem Xcc $\Delta$ xanB (mutante deletada no gene que codifica a fosfomanose isomerase), os cultivos foram feitos em meio indutor de patogenicidade XAM-M, que consiste no meio XAM-1 (CARVALHO, 2006), com modificações. A composição do meio XAM-M (ARTIER et al., 2018) foi a seguinte: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,57 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 33,06 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60,28 mM; citrato de sódio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) 1,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1M; casaminoácidos 0,03%; Frutose 10 mM, Sacarose 10 mM; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup>; pH 5,4.

### 2.2 Enzimas, kits e procedimentos em biologia molecular

Para a extração de DNA genômico de Xcc foi utilizado o *kit PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit* (Invitrogen). DNA polimerase (*Phusion High Fidelity DNA Polimerase*), enzimas de restrição, vetor de propagação e demais *kits* de extração de DNA foram adquiridos da Fermentas-Thermo Scientific e da Cellco Biotec. Os antibióticos ampicilina, canamicina e gentamicina foram obtidos da Sigma.

Quando não detalhados, os procedimentos de biologia molecular foram conduzidos exatamente como descritos anteriormente (AUSUBEL, 2002).

### 2.3. Desenho e síntese de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da DNA Polimerase) das regiões codificantes da fosfomanose isomerase e da xilose isomerase de Xcc foram projetados com base nas

sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), cujos códigos de acesso são XAC3580/AAM35493.1 (*GDP-mannose pyrophosphorylase*) e XAC4225/AAM39060.1 (*xylose isomerase*), respectivamente, de tal forma a coincidirem 15-20 bases da região 5' da fita codificante e da sua respectiva fita reversa complementar (3' do fragmento gênico).

As análises *in silico* das ORFs XAC3580 e XAC4225 utilizando o *software* SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) indicaram ausência de peptídeos sinais nas sequências peptídicas preditas.

Para a construção dos plasmídeos de deleção dos genes-alvo, foram projetados oligonucleotídeos designados à amplificação por PCR das regiões de 1 kb *upstream* e *downstream* às ORFs XAC3580 e XAC4225, com base na sequência do genoma completo de *Xcc*, depositada no GenBank sob o código de acesso NC\_003919.1.

Para a confirmação da deleção e complementação gênicas, foram desenhados pares de oligonucleotídeos que hibridizam em segmentos adjacentes às regiões flangeadoras *upstream* e *downstream* de 1 kb. Como tais oligonucleotídeos não hibridizam nos vetores de deleção e complementação, tal estratégia foi adotada criteriosamente no sentido de certificar que os produtos de PCR obtidos a partir das linhagens mutantes e complementante são oriundos de hibridização dos oligonucleotídeos no DNA cromossômico das linhagens.

Para a construção de um primeiro plasmídeo de complementação do gene que codifica a fosfomanose isomerase (pLAL6\_CxanB), foram desenhados oligonucleotídeos destinados à amplificação por PCR da região predita como promotora do *operon xanAB*, bem como da região codificante do gene *xanB*, com base na sequência do genoma completo de *Xcc*.

Um segundo vetor de complementação do gene *xanB* (pNPTS138\_CxanB) foi construído a partir do vetor de deleção pNPTS138\_xanB, utilizando um par de oligonucleotídeos destinados à amplificação de um fragmento gênico correspondente à região codificante do gene *xanB*.

Todos os oligonucleotídeos possuem sítios de restrição estrategicamente posicionados para a posterior clonagem dos produtos de PCR nos vetores de propagação, expressão, deleção e/ou complementação.

Foi utilizado o *software* Lasergene 7.1 ([www.dnastar.com](http://www.dnastar.com)) para a análise das sequências nucleotídicas, bem como para a escolha e posicionamento dos sítios de

restrição das endonucleases adotadas, de modo que tais sítios não estivessem presentes nas sequências nucleotídicas a serem clonadas.

Foram inseridas bases adicionais às extremidades 5' de alguns oligonucleotídeos para possibilitarem, caso necessário, clonagem direta no vetor de expressão e, também, otimização dos parâmetros termodinâmicos como temperatura de transição de fase (*melting temperature*) e temperatura de formação de superestruturas indesejáveis como *hairpins*, homo e hetero dímeros de hibridização oligo-oligo. Tais otimizações foram feitas com o *software* OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Exxtend (Paulínia-SP, Brasil).

A Tabela 2.1 apresenta a sequência de todos os oligonucleotídeos (e respectivos vetores utilizados) e a Tabela 2.2 mostra a relação entre os pares de oligonucleotídeos e os correspondentes produtos de PCR, especificando suas respectivas funções no presente trabalho.

**Tabela 2.1** Desenho dos oligonucleotídeos. Ao final do processo de otimização, os oligonucleotídeos resultantes estão apresentados, sendo indicados os vetores pET28 (ou 29), pLAL6 e pNPTS138 (negrito) nos quais os fragmentos amplificados com os respectivos oligonucleotídeos foram clonados. Bases em vermelho indicam regiões de sobreposição com o fragmento gênico de interesse. Em letras minúsculas estão as bases adicionadas para otimização nas regiões 5'. Sítios de restrição estão grifados em amarelo, com as respectivas enzimas de restrição identificadas acima e pontos de clivagem representados por "/". As bases que são transcritas nos códons de fim de tradução (*stop codon*) estão grifadas em azul. Os resíduos de aminoácidos das traduções conceituais previstas da região *N*-terminal de cada proteína de interesse estão mostrados em verde. As temperaturas de *melting* (TM) dos oligonucleotídeos estão indicadas. FW e RV se referem aos oligonucleotídeos direto e reverso para o fragmento indicado. KO indica os oligonucleotídeos utilizados na confirmação da deleção e complementação gênicas. pPMI denota a região promotora predita (aqui denominada *xanP*) do gene que codifica a PMI. cPMI indica a região codificante do gene *xanB*, clonada em pLAL6 ou pNPTS138 para fins de complementação gênica do mutante de deleção. 1kb\_Up e 1kb\_Down consistem nos fragmentos flangeadores de 1 kb das respectivas ORFs a serem deletadas.

#### **pET2829\_PMI**

pET2829PMI\_FW 5' gtaa <sup>*NdeI*</sup> CA/TATGAGCGACGTCCTACCC 3' TM 65,1 °C  
M S D V L P

pET2829PMI\_RV 5' tatata <sup>*XhoI*</sup> C/TCGAGTTAGGCGCGGCCGTA 3' TM 68,8 °C

pET2829PMI\_RV\_C 5' tatata <sup>*XhoI*</sup> C/TCGAGGGCGCGGCCGTAG 3' TM 69,4 °C

#### **1kb\_Up\_PMI**

Up\_PMI\_FW 5' tatata <sup>*HindIII*</sup> A/AGCTTATACCGCAGCGCCAGGC 3' TM 68,8 °C

Up\_PMI\_RV 5' cgtata <sup>*EcoRI*</sup> G/AATTCGGGCGGGGGAAACTC 3' TM 68,7 °C

**Tabela 2.1 (Continuação)** Desenho dos oligonucleotídeos.

<b>1kb_Down_PMI</b>		
Down_PMI_FW 5' ttaaca	<i>EcoRI</i> G/AATTC TCGCGCGTCTCAACGTAG 3'	TM 68,7 °C
Down_PMI_RV 5' ataatt	<i>NheI</i> G/CTAGC TTGTACGACAACCTGTACCC 3'	TM 68,5 °C
<b>KO_PMI</b>		
KO_PMI_FW 5'	GATCAGCTCGGACACCGG 3'	TM 63,2 °C
KO_PMI_RV 5'	GGACCGACAACATCATCTTCTCG 3'	TM 63,8 °C
<b>pLAL6_pPMI</b>		
pLAL6_pPMI_FW 5' tatata	<i>EcoRI</i> G/AATTC ACGAAATCATCTTGCGGATCTG 3'	TM 66,1 °C
pLAL6_pPMI_RV 5' tatata	<i>XhoI</i> C/TCGAG GGGCAAATCCTGAAGT 3'	TM 66,0 °C
<b>pLAL6_cPMI</b>		
pLAL6_cPMI_FW 5' tattaa	<i>XhoI</i> C/TCGAG ATGAGCGACGTCCTAC 3' M S D V L	TM 66,0 °C
pLAL6_cPMI_RV 5' tata	<i>XbaI</i> T/CTAGATTAGGCGCGGCCGTAG 3'	TM 65,9 °C
<b>pNPTS_cPMI</b>		
pNPTS_cPMI_FW 5' tatata	<i>EcoRI</i> G/AATTC ATGAGCGACGTCCTACCCAT 3' M S D V L P I	TM 67,3 °C
pNPTS_cPMI_RV 5' tatata	<i>EcoRI</i> G/AATTC TTAGGCGCGGCCGTAGG 3'	TM 67,8 °C
<b>pET2829_XI</b>		
pET2829_XI_FW 5' tatata	<i>NdeI</i> CA/TATGAGCAACACCGTGTACAT 3' M S N T V Y I	TM 65,4 °C
pET2829XI_RV 5'	<i>XhoI</i> C/TCGAGTCAACGCGTCAGATACTG 3'	TM 65,3 °C
pET2829XI_RV_C 5' tatat	<i>XhoI</i> C/TCGAGACGCGTCAGATACTGAT 3'	TM 65,3 °C
<b>1kb_Up_XI</b>		
Up_XI_FW 5' tata	<i>HindIII</i> A/AGCTTGGTCACGCCATGCGTC 3'	TM 68,0 °C
Up_XI_RV 5' ttaata	<i>BamHI</i> G/GATCCGGGGTGAAGCTCCTG 3'	TM 68,0 °C
<b>1kb_Down_XI</b>		
Down_XI_FW 5' tatatata	<i>BamHI</i> G/GATCCGCCTTGCCACTGCAC 3'	TM 68,0 °C
Down_XI_RV 5' tatata	<i>SalI</i> G/TCGACGGTGGCATCGCGTAC 3'	TM 67,9 °C



**Tabela 2.1 (Continuação)** Desenho dos oligonucleotídeos.**KO\_XI**KO\_XI\_FW 5' **GATGGTGGCCGAGCGCGAT**

TM 68,5 °C

KO\_XI\_RV 5' **GCTGCTGGGCGTGTTCG**

TM 68,1 °C

**Tabela 2.2** Pares de oligonucleotídeos e seus respectivos produtos de PCR (pPCR), funções e vetores nos quais foram clonados.

<b>Par de oligonucleotídeos</b>	<b>Produto de PCR (pPCR)</b>	<b>Função</b>
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV	Região codificante do gene <i>xanB</i> ( <b>pPCR1</b> )	Expressão Heteróloga
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV_C	Região codificante do gene <i>xanB</i> sem o <i>stop codon</i> nativo do gene ( <b>pPCR2</b> )	Expressão Heteróloga
pNPTS_cPMI_FW e pET2829PMI_RV	Região codificante do gene <i>xanB</i> a ser clonada no vetor pET41a ( <b>pPCR3</b> )	Expressão Heteróloga
Up_PMI_FW e Up_PMI_RV	Região de 1 kb <i>upstream</i> ao gene <i>xanB</i> ( <b>pPCR4</b> )	Deleção Gênica
Down_PMI_FW e Down_PMI_RV	Região de 1 kb <i>downstream</i> ao gene <i>xanB</i> ( <b>pPCR5</b> )	Deleção Gênica
KO_PMI_FW e KO_PMI_RV	Região de 2 kb (linhagem mutante XccΔXanB) ou 3,4 kb (linhagem selvagem Xcc)	Confirmação da deleção e complementação gênicas
pLAL6_pPMI_FW e pLAL6_pPMI_RV	Região promotora predita do gene <i>xanB</i> ( <b>pPCR6</b> )	Complementação gênica
pLAL6_cPMI_FW e pLAL6_cPMI_RV	Região codificante do gene <i>xanB</i> ( <b>pPCR7</b> )	Complementação gênica
pNPTS_cPMI_FW e pNPTS_cPMI_RV	Região codificante do gene <i>xanB</i> ( <b>pPCR8</b> )	Complementação gênica
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV	Região codificante do gene <i>xylA</i> ( <b>pPCR9</b> )	Expressão Heteróloga
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV_C	Região codificante do gene <i>xylA</i> sem o <i>stop codon</i> nativo do gene ( <b>pPCR10</b> )	Expressão Heteróloga
Up_XI_FW e Up_XI_RV	Região de 1 kb <i>upstream</i> ao gene <i>xylA</i> ( <b>pPCR11</b> )	Deleção Gênica
Down_XI_FW e Down_XI_RV	Região de 1 kb <i>downstream</i> ao gene <i>xylA</i> ( <b>pPCR12</b> )	Deleção Gênica
KO_XI_FW e KO_XI_RV	Região de 2 kb (linhagem mutante XccΔXylA) ou 3,4 kb (linhagem selvagem Xcc)	Confirmação da deleção gênica

Foram projetados dois oligonucleotídeos reversos que hibridizam na região 3' dos fragmentos gênicos codificantes da fosfomanose isomerase e da xilose isomerase, objetivando o aumento da variabilidade de produtos de expressão quanto à presença e posicionamento da(s) cauda(s) de histidinas. Além disso, um par de oligonucleotídeos permite a amplificação de um fragmento gênico que resulta na obtenção da PMI recombinante fusionada à glutationa-S-transferase (GST) quando clonado no vetor pET41a (Tabelas 2.3 e 2.4).

**Tabela 2.3** Variações de posicionamento da cauda de histidinas e fusão à glutationa-S-transferase (GST) na fosfomanose isomerase recombinante utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos.

Par de oligonucleotídeos	Vetor	Uso de Trombina	Cauda de Histidinas	Fusão à GST
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV	pET28a	Não	N-terminal	Não
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV	pET28a	Sim	Não	Não
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV_C	pET28a	Não	N-terminal e C-terminal	Não
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV_C	pET28a	Sim	C-terminal	Não
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV	pET29b	Não	Não	Não
pET2829PMI_FW e pET2829PMI_RV_C	pET29b	Não	C-terminal	Não
pNPTS_cPMI_FW e pET2829PMI_RV	pET41a	Não	N-terminal	N-terminal

**Tabela 2.4** Variações de posicionamento da cauda de histidinas na xilose isomerase recombinante utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos.

Par de oligonucleotídeos	Vetor	Utilização de Trombina	Cauda de Histidinas
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV	pET28a	Não	N-terminal
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV	pET28a	Sim	Não
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV_C	pET28a	Não	N-terminal e C-terminal
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV_C	pET28a	Sim	C-terminal
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV	pET29b	Não	Não
pET2829XI_FW e pET2829XI_RV_C	pET29b	Não	C-terminal

Sendo assim, os diferentes produtos de PCR voltados à expressão gênica de cada um dos genes-alvo puderam ser utilizados para a obtenção de distintas proteínas recombinantes (sem cauda de histidinas, com cauda N-terminal de histidinas, com cauda C-terminal de histidinas e até com as duas caudas de histidinas).

## 2.4 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico de Xcc, uma colônia isolada foi inoculada em 10 ml de caldo LB, seguida de incubação a 30 °C e 200 rpm até que o cultivo atingisse a DO<sub>595 nm</sub> igual a 0,5. As células foram coletadas por centrifugação e lavadas três vezes com PBS (Tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,4; 150 mM NaCl).

Em seguida, o *pellet* de bactérias foi utilizado para a extração de DNA genômico por meio do *kit PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. O DNA foi suspenso em água mili-Q e quantificado por espectrometria a 260 nm.

## 2.5 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos de interesse

Os fragmentos gênicos de interesse descritos na Tabela 2.2 (pPCR1 a pPCR12) foram amplificados por PCR utilizando DNA genômico de Xcc como molde e os oligonucleotídeos correspondentes (Tabela 2.2).

As amplificações foram realizadas em um termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) segundo o descrito a seguir:

---

50 ng de DNA genômico
0,25µM de oligonucleotídeo FW
0,25 µM de oligonucleotídeo RV (ou RV_C)
1 U de <i>Phusion</i> DNA polimerase
1,5 mM de MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM de dNTP
H <sub>2</sub> O MilliQ q.s.p 50 µl

---

Os ciclos utilizados nas amplificações por PCR destinadas ao isolamento dos fragmentos gênicos de interesse estão descritos na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5** Ciclos de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos gênicos.

pPCR Etapa da PCR	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9		10, 11 e 12	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	98 °C	10 minutos	98 °C	10 minutos
Desnaturação	98 °C	30 segundos	98 °C	30 segundos
Hibridização	62 °C	30 segundos	64 °C	30 segundos
Extensão	72 °C	1,5 minuto	72 °C	1 minuto
Extensão final	72 °C	10 minutos	72 °C	10 minutos

35x

Após a purificação por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% contendo brometo de etídeo, os produtos de PCR foram utilizados em reação de ligação (com T4 DNA ligase) para clonagem no vetor pJET 1.2 (Fermentas, Anexo I), seguindo a razão molar de 3:1 (inserto:vetor).

As reações de ligação foram utilizadas na transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes por tratamento com cloreto de cálcio (AUSUBEL, 2002). As células transformadas foram plaqueadas em meio ágar-LB contendo ampicilina 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

Colônias resistentes à ampicilina foram submetidas à extração de DNA plasmidial para averiguação de clones positivos para cada um dos insertos pPCR 1-pPCR 12; Tabela 2.2) por dupla digestão do DNA plasmidial com as endonucleases específicas (Tabela 2.1), seguida de análise por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% contendo brometo de etídeo.

Os clones positivos (insertos com tamanho próximo ao esperado) tiveram o DNA plasmidial sequenciado pelo método do didesoxinucleotídeo marcado de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco (CEGH-CEL), do Instituto de Biociências da USP (São Paulo-SP). As reações foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), segundo as instruções do fabricante, em um equipamento 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems™).

## 2.6 Construção dos vetores de expressão

Os insertos referentes aos produtos de PCR 1, 2, 3 e 9 (Tabela 2.2) foram digeridos com as endonucleases específicas (Tabela 2.1), purificados por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% e clonados nos vetores pET28a (Novagen, Anexo II), pET29b (Novagen, Anexo III), pET41a (Novagen, Anexo IV) e pET28a, respectivamente, em reações de ligação com T4 DNA ligase (razão molar inserto:vetor de 3:1) com os vetores previamente digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada uma das construções (*NdeI* e *XhoI* para pET28a e pET29b; *EcoRI* e *XhoI* para pET41a).

As reações de ligação foram utilizadas na transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes. As células transformantes foram plaqueadas em meio ágar-LB contendo canamicina 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e os clones resistentes foram cultivados em caldo LB adicionado de canamicina 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para fins de extração do DNA plasmidial, seguida da confirmação da presença dos insertos por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% após a dupla digestão com as endonucleases específicas.

Após a confirmação do sucesso das clonagens, os vetores foram denominados pET28a\_PMI, pET29b\_PMI\_C, pET41a\_GST\_PMI e pET28a\_XI, os quais possibilitam a obtenção das seguintes proteínas recombinantes: PMI fusionada a uma cauda de histidinas N-terminal, PMI fusionada a uma cauda de histidinas C-terminal, PMI fusionada à GST na região N-terminal e XI fusionada a uma cauda de histidinas N-terminal, respectivamente (ver Tabelas 2.3 e 2.4).

## 2.7 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade

Células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) foram separadamente transformadas com os vetores de expressão obtidos e plaqueadas em ágar-LB contendo canamicina 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Colônias isoladas de cada uma das construções foram inoculadas em caldo LB adicionado de canamicina 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e submetidas aos ensaios de expressão induzidos por IPTG 0,1 mM, adicionado na fase *mid-log* de crescimento populacional bacteriano ( $\text{DO}_{595\text{ nm}} = 0,4$ ). Somente para os ensaios relativos à PMI, foi adicionado cloreto de zinco (Sigma) 0,2  $\mu\text{M}$  ao meio de cultura de expressão heteróloga, uma vez

que o zinco é um cofator da PMI de *Xanthomonas campestris*, proteína com elevada identidade em relação à PMI de Xcc (PAPOUTSOPOULOU; KYRIAKIDIS, 1997).

Os ensaios de expressão foram incubados por 16 horas a 18 °C em agitador orbital a 250 rpm. Ao final da indução, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8), NaCl 100 mM e lisadas por cinco pulsos de ultrassom (Sonic Dismembrator 500, Fisher Scientific, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza) com duração de 30 segundos e amplitude de 30%, com intervalos de um minuto entre os pulsos, sob banho de gelo. Para a separação da fração solúvel, o lisado celular foi submetido à centrifugação a 4 °C, 12.000 x g por 30 minutos.

A purificação de todas as proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando íons metálicos imobilizados (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) para as proteínas fusionadas somente à cauda de histidinas, ou glutatona para a proteína fusionada à GST.

Para IMAC, a fração solúvel do lisado celular foi aplicada em uma coluna de níquel imobilizado Ni-NTA (Novagen) e as proteínas foram eluídas da coluna por meio da aplicação de um gradiente crescente de concentrações de imidazol (de 5 mM a 500 mM). Alíquotas das frações solúvel e insolúvel, bem como alíquotas do pós-coluna (após a passagem da fração solúvel do lisado pela coluna cromatográfica de afinidade) e dos eluatos em imidazol foram submetidas à análise em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para averiguar a funcionalidade dos sistemas de expressão e purificação.

Para a PMI fusionada à GST na região N-terminal (XccGST\_PMI), o procedimento de purificação foi realizado utilizando 800 µl de uma resina de sefarose imobilizada com glutatona (Glutathione Sepharose® 4 Fast Flow, GE Healthcare), gentilmente cedida pela Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza. A coluna foi lavada com cinco volumes de coluna de água destilada, seguida de uma etapa de equilíbrio com dez volumes de coluna com tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM NaCl.

Em seguida, a fração solúvel do lisado celular foi aplicada à coluna por gravidade, e a eluição foi realizada com 5 ml de glutatona reduzida (Sigma) a uma concentração de 10 mM. Nesta etapa de eluição, foram coletadas alíquotas de 1 ml para averiguação da eficiência do processo de purificação, por SDS-PAGE.

Para os experimentos de atividade enzimática (item 2.8), os ensaios de expressão foram repetidos e otimizados quanto à purificação, utilizando apenas as soluções de imidazol 25 mM ou de tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), NaCl 100 mM para lavagem da coluna de níquel ou de glutatona imobilizados, respectivamente, para eliminação de contaminantes, e 500 mM de imidazol para eluição das proteínas XccPMI, XccPMI\_C e Xcc\_XI purificadas, além de 10 mM de glutatona reduzida para a eluição da proteína XccGST\_PMI.

Essas últimas frações foram dialisadas contra tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, e quantificadas pela medida da absorção no UV em comprimento de onda de 280 nm, em um espectrofotômetro NanoVue Plus™ (Biochrom) utilizando como base o coeficiente de extinção molar de cada uma das proteínas recombinantes obtidas.

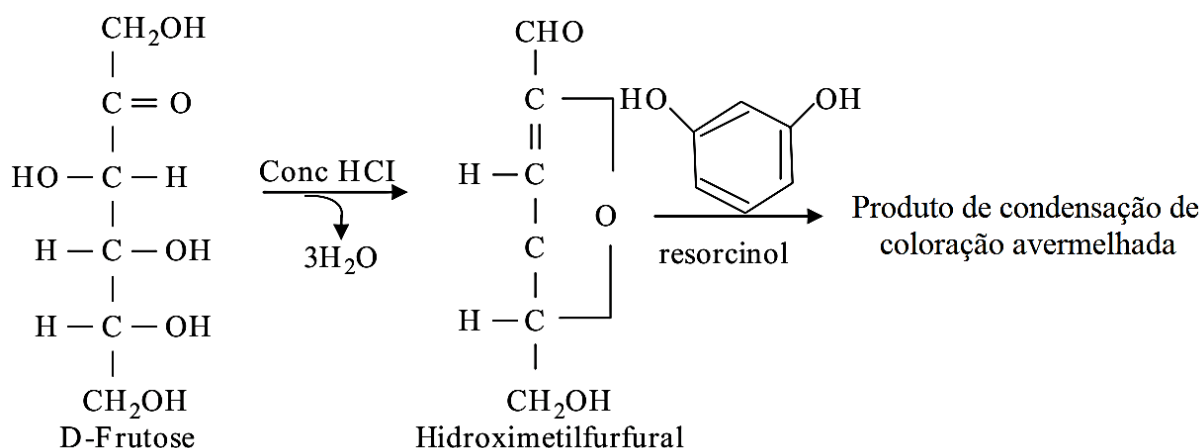
## **2.8 Ensaios de atividade enzimática**

### **2.8.1 Avaliação da atividade enzimática da PMI**

A PMI catalisa a isomerização reversível de D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato e, portanto, o teste de Seliwanoff foi usado para detectar a formação desta cetose.

O teste de Seliwanoff (Figura 2.1) é um teste convencionalmente utilizado para a detecção de cetoses, como frutose, xilulose, ribulose e tagatose (CHAWLA, 2014), e é baseado em um reagente composto por resorcinol (benzeno-1,3-diol) 0,05% (m/v, concentração final) em ácido clorídrico (HCl) diluído em água (1:1).

A função do ácido clorídrico é desidratar a cetose e produzir um composto chamado hidroximetilfurfural, o qual reage com o resorcinol formando uma molécula de coloração avermelhada (ou esverdeada, dependendo da cetose), cuja intensidade é proporcional à quantidade de cetose presente na solução (ROE, 1934).



**Figura 2.1** Esquema das reações envolvidas no Teste de Seliwanoff (modificado a partir de KATOCH, 2011).

As reações foram constituídas por 30 µg de XccPMI\_C (cauda de histidinas na extremidade C-terminal) ou XccGST\_PMI (fusionada à GST e com cauda de histidinas na extremidade N-terminal) recombinantes, D-manose-6-fosfato (sal dissódico, Sigma) em concentração final de 0,5 mM, considerando volume final de 500 µl. Após 2 horas de reação, foram adicionados 3 ml de reagente Seliwanoff com a coloração formada sendo registrada por fotografia. Para a reação de controle negativo, o volume da enzima foi substituído pelo tampão no qual a mesma foi solubilizada (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl).

O controle positivo teve a mesma constituição da reação anterior, substituindo D-manose-6-fosfato por D-frutose-6-fosfato, também em concentração 0,5 mM. Os testes foram realizados em triplicata.

### 2.8.2 Avaliação da atividade enzimática da XI

A XI catalisa a isomerização da D-xilose em D-xilulose e, portanto, o teste Seliwanoff foi utilizado para detectar a formação dessa cetose em uma reação contendo XccXI recombinante (com cauda histidinas na região N-terminal), D-xilose e reagente de Seliwanoff (ROE, 1934). Para este fim, três ensaios foram preparados com as seguintes concentrações de enzima recombinante purificada: 0,05, 0,15 e 0,25 mg.ml<sup>-1</sup>.

Cada ensaio recebeu 20 µl de resorcinol a 1%, 600 µl de HCl 30%, 300 µl de D-xilose 0,5 M e seus volumes foram completados para 1,4 ml com água destilada, resultando em concentração final de 0,1 M de xilose.



Dois outros ensaios também foram preparados para servirem como branco e controle positivo. O branco recebeu 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, substituindo o volume de enzima, mantendo todas as proporções dos outros compostos. O controle positivo consistiu em D-frutose 0,5 M e não recebeu enzima.

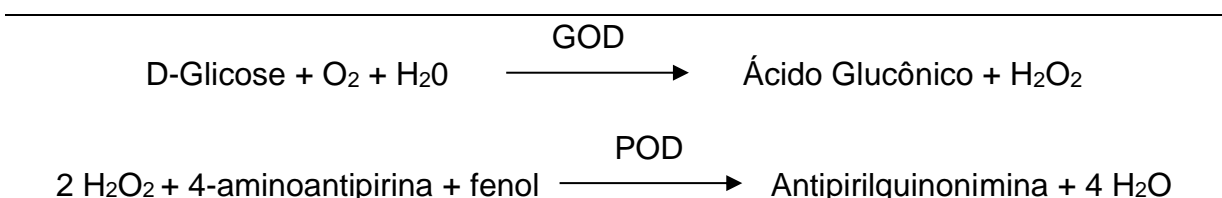
Primeiro, XccXI e seu substrato foram incubados por 2 e 3 horas. Depois disso, HCl com resorcinol e água destilada foram adicionados a todos os tubos. Em seguida, todos os tubos foram agitados vigorosamente e incubados a 80 °C por 30 minutos, com as verificações de cores realizadas a cada cinco minutos.

A segunda atividade prevista de XccXI é a interconversão de D-frutose em D-glicose. Para verificar esta atividade, um teste baseado nas reações acopladas de glicose oxidase e peroxidase foi empregado para detectar D-glicose em solução (TRINDER, 1969).

Para isso, a D-frutose foi utilizada como substrato e a detecção de D-glicose realizada com o *kit* Glucose Liquiform (Labtest), composto por tampão fosfato 30 mM, pH 7,5, fenol 1 mM, glicose oxidase 12500 U/l, peroxidase 800 U/l, 290 µM de 4-aminoantipirina, 7,5 mM de azida de sódio e surfactantes.

A D-glicose resultante da isomerização de D-frutose é oxidada pela glicose oxidase (GOD) do *kit* supracitado, formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado participa de uma reação de oxidação envolvendo 4-aminoantipirina e fenol, catalisada pela peroxidase (POD), resultando em água e um composto avermelhado, a antipirilquinonimina, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de glicose liberada (Figura 2.2).

Foram utilizadas três concentrações diferentes de XccXI: 20, 60 e 100 µg.ml<sup>-1</sup>. A produção de D-glicose foi medida analisando, em triplicata, a absorbância a 490 nm das soluções após 2 e 3 horas de reação à temperatura ambiente.



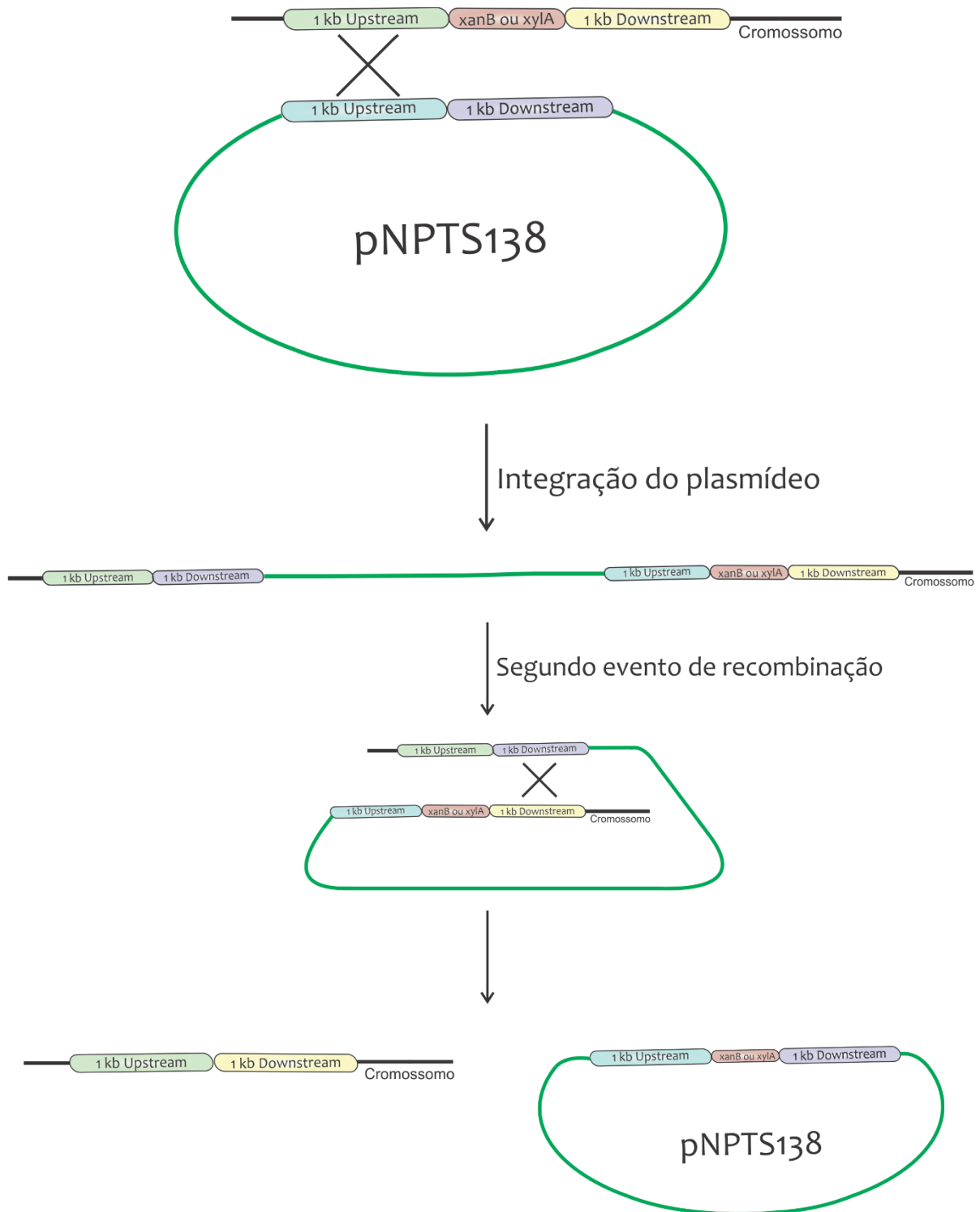
**Figura 2.2** Esquema simplificado do método de detecção de D-glicose. A D-glicose resultante da isomerização da D-frutose, catalisada pela xilose isomerase, é oxidada pela glicose oxidase (GOD), formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de D-glicose na amostra. Adaptado do Manual de Instruções de Uso do produto Glucose Liquiform (Labtest).

## 2.9 Deleções gênicas

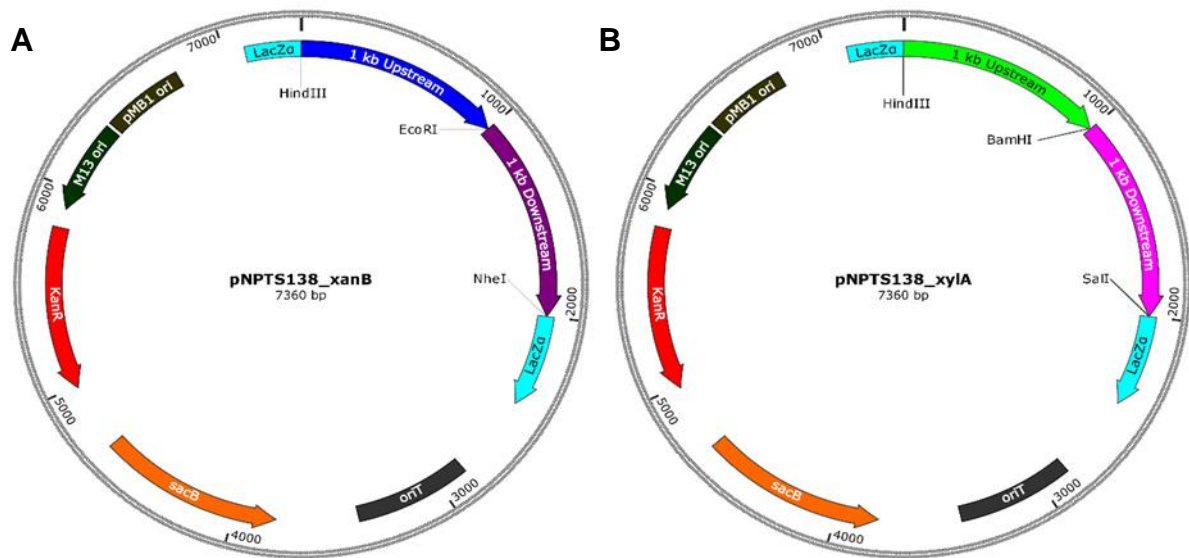
### 2.9.1 Construção dos vetores de deleção

As linhagens mutantes foram obtidas usando o vetor suicida pNPTS138, gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira (UNESP – Rio Claro), seguindo metodologia padronizada por nosso grupo de pesquisa (ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016; CABREJOS et al., 2019; GOTO et al., 2016).

Os genes-alvo *xanB* e *xyIA2* foram deletados utilizando uma metodologia baseada na dupla recombinação homóloga (Figura 2.3) entre o vetor pNPTS138 (5,36 kb, Anexo V), no qual foram clonados *in tandem* dois fragmentos de aproximadamente 1 kb correspondentes, no DNA cromossomal de *Xcc*, às regiões *upstream* e *downstream* aos genes-alvo a serem deletados, resultando nos vetores de deleção do gene *xanB*, denominado pNPTS138\_*xanB*, e do gene *xyIA2*, denominado pNPTS138\_*xyIA* (Figura 2.4).



**Figura 2.3** Esquema simplificado da metodologia de deleção gênica. A metodologia de deleção gênica é baseada na dupla recombinação homóloga entre o vetor de deleção pNPTS138 e o DNA cromossomal de *Xcc*. O primeiro evento de recombinação ocorre com um primeiro fragmento clonado no pNPTS138 (*upstream*), e resulta na integração do vetor de deleção no DNA cromossomal de *Xcc*, fazendo com que as linhagens transformantes sejam resistentes à canamicina, marcador de resistência do referido vetor. O segundo evento de recombinação ocorre com um segundo fragmento clonado no pNPTS138 (*downstream*) e resulta na deleção gênica, com a transferência do gene-alvo ao vetor de deleção. As regiões *upstream* e *downstream* (de 1 kb), amplificadas e clonadas no vetor pNPTS138, são as que ladeiam, no cromossomo de *Xcc*, o gene a ser deletado. O vetor pNPTS138 é um vetor suicida e, portanto, não se replica nas células-filhas de *Xcc*. Fonte: próprio autor.



**Figura 2.4** Esquemas simplificados dos plasmídeos de deleção. O gene que confere resistência à canamicina está representado por *KanR*. *sacB* denota o gene de *Bacillus subtilis*, que codifica a enzima levansucrase, a qual converte sacarose em um composto tóxico para as células. As regiões de 1000 pb que flanqueiam no genoma de *Xcc* os genes-alvo *xanB* (A) ou *xylA* (B) estão representadas por 1 kb *downstream* e 1 kb *upstream*, com os respectivos sítios de restrição estrategicamente posicionados para clonagem dos fragmentos *in tandem*. Fonte: próprio autor.

Para isso, os insertos referentes aos produtos de PCR 4, 5, 11 e 12 foram excisados dos vetores de propagação pJET 1.2 (Fermentas) pela digestão com as endonucleases específicas para cada um deles (ver item 2.5) seguida de purificação por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%.

Para iniciar a construção de cada vetor de deleção, o plasmídeo pNPTS138 foi previamente digerido com as endonucleases *HindIII* e *EcoRI* para *xanB* e *HindIII* e *BamHI* para *xylA* e purificado por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%.

Em seguida, os fragmentos de 1 kb *upstream* purificados foram utilizados em reação de ligação com T4 DNA ligase (razão molar inserto:vetor de 3:1) juntamente com o vetor pNPTS138 digerido.

Tais reações de ligação foram utilizadas na transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes (AUSUBEL, 2002) seguida de plaqueamento em ágar-LB contendo canamicina 30  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

Colônias transformantes foram cultivadas em LB contendo canamicina para extração do DNA plasmidial, seguida de digestão com as endonucleases específicas para confirmação da clonagem por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%.

Para a clonagem dos fragmentos de 1 kb *downstream* a cada gene-alvo, seguiu-se o mesmo procedimento, utilizando os vetores já clonados com a região de 1 kb *upstream*, digerindo-os com *EcoRI* e *NheI* para *xanB* e *BamHI* e *Sall* para *xylA2*.

Novamente, os vetores digeridos e purificados compuseram reações de ligação com os fragmentos de 1 kb *downstream*, seguida da transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes (AUSUBEL, 2002) e posterior plaqueamento em ágar-LB contendo canamicina 30  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

Ao final da clonagem *in tandem*, colônias transformantes de ambas as construções foram cultivadas em LB contendo canamicina 30  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  e tiveram o DNA plasmidial extraído e digerido com as endonucleases específicas de cada vetor, permitindo a confirmação da construção dos vetores de deleção como foram planejados.

### **2.9.2 Preparação de células de Xcc eletrocompetentes**

Células de Xcc foram cultivadas em 100 ml de caldo LB, sob agitação de 200 rpm, a 30 °C até atingirem  $\text{DO}_{595 \text{ nm}}$  igual a 0,5. Em seguida, as células foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 x *g* a 4 °C e lavadas três vezes com água estéril gelada (AUSUBEL, 2002). As células foram concentradas 25 vezes em relação ao volume de cultivo original, aliquotadas e armazenadas a -80 °C.

### **2.9.3 Transformação de Xcc por eletroporação**

Cem nanogramas dos vetores de deleção pNPTS138\_*xanB* e pNPTS138\_*xylA* foram independentemente utilizados na eletroporação de células de Xcc eletrocompetentes. A eletroporação foi realizada com cubetas de 0,2 cm em um eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation Systems* (Bio-Rad), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Iran Malavazi, sob as seguintes condições: 2,5 kV, 50  $\Omega$  e 50  $\mu\text{F}$ .

Após o pulso elétrico, foram adicionados 2 ml de caldo LB isento de antibióticos e o cultivo foi incubado por 2 horas sob agitação de 200 rpm a 30 °C. Em seguida, o cultivo foi plaqueado em ágar-LB contendo canamicina (30  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ).

#### 2.9.4 Seleção de mutantes deletados

O vetor pNPTS138 possui uma cópia do gene *sacB* (Figura 2.4), que codifica para a enzima levansucrase (SacB de *Bacillus subtilis*), que converte a sacarose em um composto tóxico para as células (BRAMUCCI; NAGARAJAN, 1996). Desse modo, o crescimento em sacarose 10% somente ocorre para as bactérias que o eliminaram (ou seja, quando há excisão do plasmídeo com o gene do cromossomo seguido de cura plasmidial).

Além disso, células resultantes de recombinação única também são eliminadas por possuírem o plasmídeo integrado no genoma. Para aumentar as chances de cura plasmidial nos mutantes que sofreram o duplo *crossing-over*, os mesmos foram cultivados repetidamente em meio de cultivo na ausência de canamicina.

Colônias mutantes de Xcc obtidas foram analisadas quanto à deleção por PCR utilizando oligonucleotídeos que hibridizam em regiões adjacentes aos fragmentos flanqueadores. Alíquotas dos cultivos bacterianos oriundos dos mutantes confirmados foram armazenadas a -80 °C.

O processo de *screening* de possíveis mutantes deletados envolve uma série de plaqueamentos e repiques, os quais estão descritos a seguir. Após a eletroporação, colônias transformantes resistentes à canamicina foram repicadas em duas condições diferentes: ágar-LB contendo canamicina a 30 µg.ml<sup>-1</sup> e sacarose 10% (Meio B) e ágar-LB contendo sacarose 10% (Meio C).

Em seguida, colônias que não tiveram crescimento nos meios B e C foram cultivadas em caldo LB isento de antibióticos (Meio D) por 12 horas, sob agitação de 200 rpm, a 30 °C, para possibilitar o primeiro evento de recombinação, que resulta na integração do vetor de deleção ao DNA cromossomal de Xcc.

Para cada processo de deleção, tal cultivo foi estriado em ágar-LB para isolamento de colônias, as quais foram repicadas em três diferentes condições:

Meio A: Ágar-LB contendo canamicina a 30 µg.ml<sup>-1</sup>;

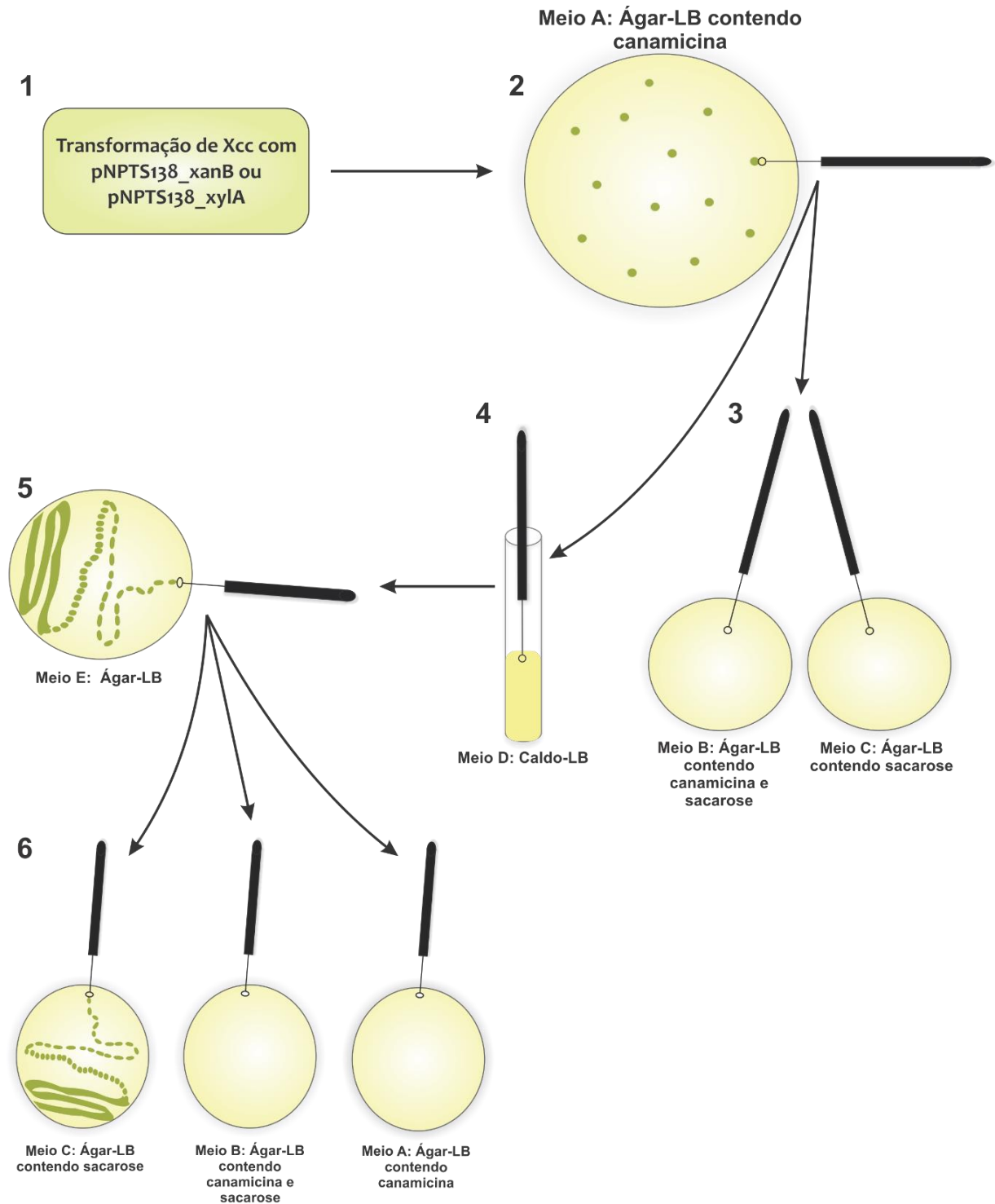
Meio B: Ágar-LB contendo canamicina a 30 µg.ml<sup>-1</sup> e sacarose 10%;

Meio C: Ágar-LB contendo sacarose 10%.

O repique de cada uma das colônias nos três meios supracitados facilita o *screening* dos possíveis mutantes deletados, uma vez que colônias resistentes à

sacarose e sensíveis à canamicina podem ser resultantes da dupla recombinação seguida da eliminação do plasmídeo de deleção.

A Figura 2.5 ilustra o procedimento adotado na seleção das possíveis colônias mutantes deletadas. Foram isoladas colônias com capacidade de crescimento no meio contendo sacarose (meio C, etapa 6, Figura 2.5) e também incapazes de crescer em meio contendo canamicina (meio A, etapa 6, Figura 2.5), sendo que tais colônias tinham se originado inicialmente de colônia capaz de crescer nesse antibiótico (meio A, etapa 2, Figura 2.5); isto denota que a célula adquire o plasmídeo mas o “elimina” posteriormente, eventos estes essenciais para a obtenção do mutante e sua confirmação, considerando que no intermédio desses dois eventos vários repiques são realizados.



**Figura 2.5** Metodologia para seleção dos possíveis mutantes deletados. Diferentes cultivos foram realizados para facilitar o *screening* de linhagens mutantes deletadas. **1-2** | Células de Xcc eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com cada vetor de deleção e, em seguida, plaqueadas em ágar-LB adicionado de canamicina (Meio A). **3** | Colônias transformantes foram repicadas em ágar-LB contendo canamicina e sacarose (Meio B) e ágar-LB contendo somente sacarose (Meio C). **4-5** | Colônias que não apresentaram crescimento nos meios B e C foram cultivadas em caldo-LB (Meio D) e então estriadas em ágar-LB (Meio E) para seu isolamento. **6** | Colônias isoladas foram repicadas nos meios A, B e C, para seleção dos possíveis mutantes deletados (aqueles que apresentaram crescimento apenas no meio C). Fonte: próprio autor.



### 2.9.5 Confirmação das deleções dos genes-alvo

Pares de oligonucleotídeos (KO\_PMI\_FW e KO\_PMI\_RV para o gene *xanB*; KO\_XI\_FW e KO\_XI\_RV para o gene *xyIA*, ver Tabelas 2.1 e 2.2) que hibridizam nas regiões do DNA cromossomal adjacentes às regiões flanqueadoras de 1 kb aos genes-alvo (distantes cerca de 50 pb) e não hibridizam nos respectivos vetores de deleção pNPTS138\_xanB e pNPTS138\_xyIA foram projetados para a confirmação das deleções por PCR.

A PCR utilizando esses pares de oligonucleotídeos permite diferenciar uma colônia mutante deletada de uma selvagem de acordo com os tamanhos dos produtos de PCR obtidos.

Pelo *screening* citado no item anterior, foram isoladas colônias com capacidade de crescimento no meio contendo sacarose e incapazes de crescer nos meios contendo canamicina. Cada uma dessas colônias foi ressuspensa em 49 µl de água destilada estéril e fervida por 5 minutos.

Cinco µl desse material foram utilizados como DNA molde juntamente com 5 µl de um *mix* de PCR preparado suficiente para 10 reações (descrito abaixo) de volume final de 10 µl.

---

150 pMol de oligonucleotídeo KO\_PMI\_FW ou KO\_XI\_FW  
 150 pMol de oligonucleotídeo KO\_PMI\_RV ou KO\_XI\_RV  
 0,8 mM de dNTP (0,2 mM de cada)  
 5x *Phusion Green High-Fidelity Buffer*  
 2 U de *Phusion High-Fidelity* DNA polimerase  
 H<sub>2</sub>O MiliQ q.s.p 19 µl

---

As amplificações foram realizadas em um termociclador C1000 Touch (Bio-Rad), segundo as etapas descritas na Tabela 2.6, sendo o produto da amplificação analisado por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%.

**Tabela 2.6** Etapas de PCR utilizadas na confirmação das deleções gênicas.

Etapa da PCR	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	98 °C	10 minutos
Desnaturação	98 °C	30 segundos
Hibridização	60 °C	30 segundos
Extensão	72 °C	4 minutos
Extensão final	72 °C	10 minutos

} 45x

## 2.10 Confirmação da depleção da síntese de PMI no mutante de deleção

Complementarmente à confirmação da deleção gênica realizada por PCR, a deleção do gene *xanB* foi também avaliada por *Western blot*, por meio da constatação da depleção da síntese da PMI na linhagem mutante *XccΔxanB*.

As linhagens selvagem (*Xcc*) e mutante (*XccΔxanB*) foram cultivadas em 25 ml de meio XAM-M até que atingissem a  $DO_{595\text{ nm}}$  igual 0,4. Em seguida, os cultivos foram centrifugados a 4 °C, 12.000 x *g* por 30 minutos, ressuspensos em 5 ml de tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl e lisadas por cinco pulsos de ultrassom (Sonic Dismembrator 500, Fisher Scientific, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza) com duração de 30 segundos e amplitude de 30%, com intervalos de um minuto entre os pulsos, sob banho de gelo. Para a separação da fração solúvel, o lisado celular foi submetido à centrifugação a 4 °C, 12.000 x *g* por 30 minutos.

Vinte µl de cada fração solúvel do lisado celular juntamente com 20 µg da PMI recombinante (*XccPMI\_C*) foram submetidos à SDS-PAGE em duplicata de géis. Um dos géis foi corado com Coomassie Blue G-250 e o outro foi utilizado para a transferência a uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare) sob voltagem constante de 600 V por 2 horas.

Após a transferência, a membrana foi cuidadosamente retirada do sistema e com a face contendo as proteínas voltadas para cima foi corada com 0.5% Ponceau S (Sigma) em 0,1% de ácido acético para verificar o “carregamento” homogêneo entre as amostras (PEDRAS; MINIC, 2012).

A membrana foi descorada com três lavagens com água destilada e, após isso, foi adicionada uma solução de bloqueio composta por 9% (m/v) de leite em pó desnatado e liofilizado (Nestlé Molico®) em tampão TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,05% v/v Tween-20), seguida de incubação *overnight* a 4 °C.

Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBST por 5 minutos e incubada *overnight* com o anticorpo primário IgG (anti-PMI) diluído 1:5000 em TBST. Tal anticorpo foi produzido pela empresa Proteimax (São Paulo-SP) utilizando coelhos imunizados com a proteína recombinante XccPMI obtida neste trabalho.

A membrana foi lavada três vezes com TBST por 5 minutos e incubada *overnight* com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com HRP, produzido em cabras (RheaBiotech, Campinas-SP), diluído 1:3000 em TBST.

Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes com TBST por 5 minutos, seguida da detecção das proteínas utilizando o “*ECL Western Blotting kit*” (GE Healthcare), com as imagens sendo geradas no *software ImageLab* (Bio-Rad) acoplado ao equipamento *ChemiDOC MP Imaging System* (Bio-Rad).

## 2.11 Complementação gênica com o vetor pLAL6

### 2.11.1 Construção do vetor de complementação pLAL6\_CxanB

O pLAL6 (Anexo VI), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira, é um vetor de complementação integrativo, sendo construído para recombinar com o DNA cromossomal de Xcc no gene que codifica a  $\alpha$ -amilase (Xcc\_amy) (LACERDA et al., 2017).

Originalmente, o vetor apresentava um promotor induzível por arabinose (*araC*), o qual foi retirado quando da construção do vetor de complementação pLAL6\_CxanB, pois a linhagem complementante resultante seria testada *in vivo*, o que tornaria impraticável a indução da expressão do gene *xanB* por requerer inoculação de arabinose.

Como alternativa ao promotor *araC* e visando construir uma linhagem complementante contendo o promotor nativo do gene *xanB*, foi utilizada uma região de 390 pb (aqui denominada *xanP*) localizada imediatamente *upstream* ao gene *xanA* (codificante da fosfoglicomutase), identificada *in silico* como uma região promotora do

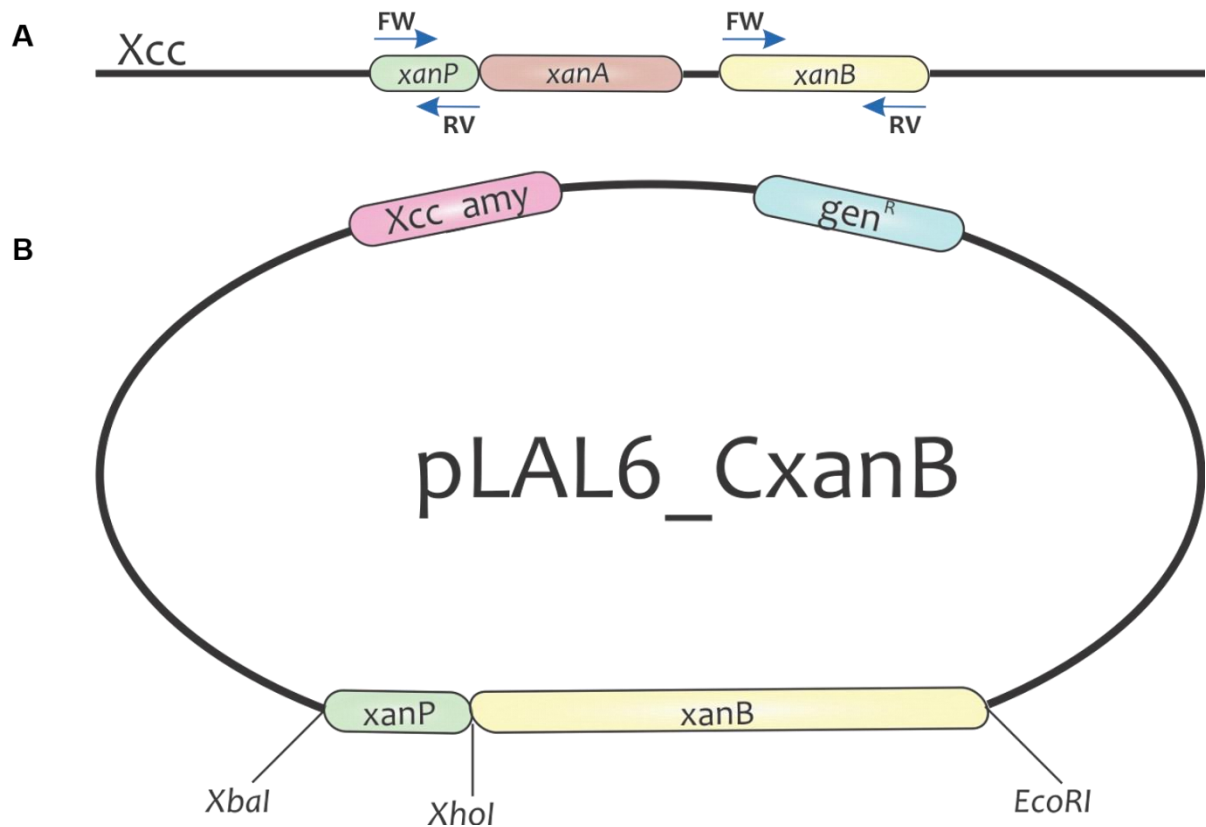
*operon xanAB* por meio do algoritmo *BPROM* (Softberry, Inc), que realiza uma predição baseada em promotores de genes regulados pelo fator  $\sigma 70$  de *E. coli*.

Assim, a região referente ao promotor predito (*xanP*) e a região codificante do gene *xanB* foram amplificadas por PCR e clonadas separadamente no vetor de propagação pJET 1.2 (Fermentas), como detalhado na seção 3.5. Em seguida, o fragmento *xanP* foi excisado do vetor de propagação pela digestão com as enzimas *XbaI* e *XhoI*, purificado por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% e utilizado em uma reação de ligação com T4 DNA ligase com o vetor pLAL6 previamente digerido com as mesmas enzimas supracitadas e purificado.

Essa reação de ligação foi utilizada na transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , seguida de plaqueamento em ágar-LB suplementado com gentamicina 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Colônias transformantes foram cultivadas em caldo LB contendo gentamicina 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para permitir a extração do DNA plasmidial, o qual foi digerido com as enzimas *XbaI* e *XhoI* para confirmação da clonagem por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%.

Após a clonagem da região *xanP*, o vetor pLAL6 recombinante foi digerido com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, purificado por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% e utilizado em reação de ligação com T4 DNA ligase juntamente com o fragmento referente à região codificante do gene *xanB*, previamente excisado do vetor de propagação pela digestão com as mesmas enzimas anteriormente citadas.

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes foram transformadas com a reação de ligação supracitada e plaqueadas em ágar-LB contendo gentamicina 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Do mesmo modo como foi realizado para a primeira clonagem, colônias transformantes foram cultivadas e tiveram seu DNA plasmidial digerido com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem para confirmação por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%, resultando no vetor de complementação pLAL6\_C*xanB* (Figura 2.6).



**Figura 2.6** Representação do vetor de complementação pLAL6\_CxanB. **Painel A** | Esquema da organização genômica de Xcc na região do *operon xanAB* com as indicações dos pares de oligonucleotídeos (FW e RV) utilizados para isolamento e amplificação independentes das regiões xanP (região promotora predita do *operon xanAB*) e da região codificante do gene xanB. **Painel B** | Esquema simplificado da configuração do vetor de complementação pLAL6\_CxanB contendo a região Xcc\_amy, utilizada para a recombinação entre o vetor de complementação e o DNA cromossomal de Xcc, o gene que confere resistência à gentamicina (*gen<sup>R</sup>*) e as regiões xanP e xanB, clonadas *in tandem*. As enzimas de restrição utilizadas na construção do vetor de deleção estão mostradas. Fonte: próprio autor.

### 2.11.2 Seleção de complementantes

O vetor de complementação pLAL6\_CxanB foi utilizado em diferentes quantidades (1, 10, 50, 100 e 1000 ng) na eletroporação de células de XccΔxanB eletrocompetentes. A eletroporação foi realizada com cubetas de 0,2 cm de largura em um eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation Systems* (Bio-Rad), gentilmente cedido para utilização pelo Prof. Dr. Iran Malavazi, sob as seguintes condições: 2,5 kV, 50 Ω e 50 μF.

Após a eletroporação, foram adicionados 2 ml de caldo LB isento de antibióticos e o cultivo foi incubado por 2 horas sob agitação de 200 rpm a 30 °C. Em seguida, o cultivo foi plaqueado em ágar-LB contendo gentamicina (20 μg.ml<sup>-1</sup>) para seleção dos transformantes.

A distinção entre colônias transformantes contendo o plasmídeo integrado no cromossomo (recombinantes) e colônias transformantes com o plasmídeo na forma episomal (não recombinantes) foi possível pelo repique de cada um dos clones resistentes à gentamicina em meio ágar-LB contendo amido 1% (m/v) seguido da sublimação de iodo (I<sub>2</sub>) nas placas, uma vez que tal molécula interage com as cadeias de amilose do amido formando um complexo de coloração azul intensa (FUWA, 1954). As colônias recombinantes teriam o vetor de complementação integrado no gene cromossomal *amy* (que codifica a  $\alpha$ -amilase), de forma a torná-lo inativo. Assim apenas as colônias recombinantes não possuem um halo de degradação do amido, estando a coloração azul presente ao redor desses transformantes, pois estas seriam incapazes de degradar o referido polissacarídeo (LACERDA et al., 2017). Analogamente, para as colônias não recombinantes são esperados halos visíveis de degradação.

## **2.12 Complementação gênica com o vetor pNPTS138**

### **2.12.1 Construção do vetor de complementação pNPTS138\_CxanB**

Como alternativa para obtenção de complementante da linhagem mutante Xcc $\Delta$ xanB, foi realizada uma tentativa inédita em Xcc de reinserção do gene *xanB* no mesmo locus cromossomal do qual foi originalmente deletado, utilizando o mutante de deleção e o vetor de deleção do gene *xanB* (pNPTS138\_xanB). A metodologia aplicada, também baseada na dupla recombinação homóloga entre o inserto no vetor (regiões flangeadoras ao gene de interesse) e o DNA cromossomal bacteriano, foi, no entanto, a inversa à utilizada para a deleção no sentido de que o gene de interesse está agora inserido no vetor pNPTS138 e ausente no cromossomo. Assim, foi realizada a construção do vetor de complementação pela clonagem do gene *xanB* no vetor recombinante pNPTS138\_xanB (utilizado na deleção de *xanB*, o qual já contém as regiões flangeadoras ao referido gene).

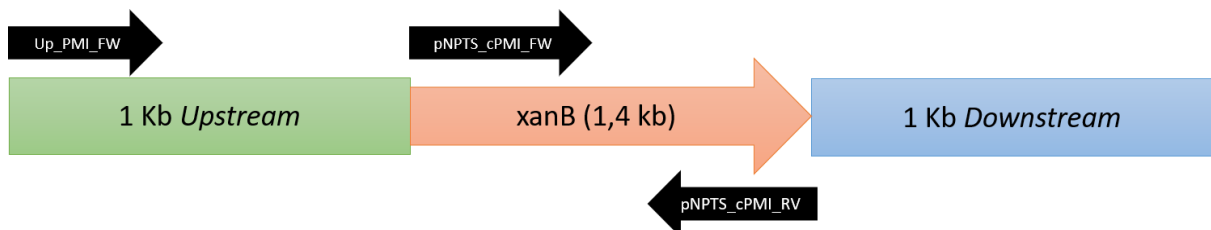
A região codificante do gene *xanB* foi amplificada por PCR a partir dos oligonucleotídeos pNPTS\_cPMI\_FW e pNPTS\_cPMI\_RV (ver Tabela 2.2), ambos com sítios de restrição para enzima *EcoRI*, sob as mesmas condições utilizadas para o fragmento obtido para a construção do vetor de expressão pET41a\_GST\_PMI.

O produto de PCR foi clonado no vetor pJET 1.2, como descrito anteriormente. Em seguida, este fragmento gênico foi clonado no vetor de deleção pNPTS138\_xanB (Figura 2.4A), previamente digerido com *EcoRI*, cujo único sítio de restrição se localiza entre os dois fragmentos flanqueadores de 1 kb, produzindo o vetor de complementação pNPTS138\_CxanB. A confirmação dessa construção foi realizada por análise de restrição por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%.

### 2.12.2 Confirmação da orientação de clonagem de *xanB* no pNPTS138\_CxanB

Como o fragmento gênico de *xanB* utilizado na clonagem que resultou no pNPTS138\_CxanB (item 2.12.1.) apresenta sítio de restrição para *EcoRI* em ambas as extremidades, seriam possíveis duas orientações de clonagem no vetor pNPTS138\_xanB.

Para certificar de que a clonagem ocorreu na orientação esperada, foi realizada uma PCR utilizando oligonucleotídeos que hibridizam nas seguintes regiões: codificante do gene *xanB*, 1 kb *upstream* e 1 kb *downstream* (Figura 2.7).



**Figura 2.7** Representação dos oligonucleotídeos utilizados na confirmação da orientação da clonagem no vetor pNPTS138\_CxanB. Fonte: próprio autor.

Por meio dessa estratégia, foi possível confirmar a orientação da clonagem realizada no vetor pNPTS138\_CxanB, uma vez que a PCR utilizando os oligonucleotídeos Up\_PMI\_FW e pNPTS\_cPMI\_RV resulta em um produto de PCR com 2,4 kb no caso da orientação correta da clonagem, e nenhum produto de PCR no caso de inserção de *xanB* em orientação não apropriada.

A combinação dos oligonucleotídeos Up\_PMI\_FW e pNPTS\_cPMI\_FW resulta na ausência de produtos de PCR em caso de orientação correta da clonagem, e um produto de PCR de 2,4 kb no caso da orientação inversa.

### 2.12.3 Seleção de possíveis complementantes e confirmação da complementação gênica

Após a confirmação da correta clonagem no pNPTS138\_CxanB, células de Xcc $\Delta$ xanB eletrocompetentes foram transformadas com o referido vetor de complementação, seguindo-se o mesmo procedimento utilizado na obtenção da linhagem mutante.

Após o *screening* das possíveis colônias complementantes (resistentes à canamicina, marcador de resistência do pNPTS138), foi utilizada a mesma metodologia de confirmação da deleção gênica (PCR) para atestar a obtenção da linhagem complementante pela reinserção do gene *xanB* no mutante.

## 2.13 Estudos funcionais das linhagens mutantes e complementante

### 2.13.1 Testes de patogenicidade em *Citrus aurantifolia*

As linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB, Xcc $\Delta$ CxanB e Xcc $\Delta$ xylA foram testadas quanto à patogenicidade em plantas de *Citrus aurantifolia* em estufas com temperatura e umidade controladas, gentilmente disponibilizadas pelo Fundecitrus (Araraquara-SP) e pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira (UNESP – Rio Claro). Para o conjunto de linhagens relacionadas ao gene *xanB*, foram utilizados os métodos de aspersão e infiltração, enquanto para o gene *xylA* somente a última metodologia.

Tanto para os ensaios de aspersão quanto de infiltração, colônias isoladas foram cultivadas em 5 ml de caldo LB até atingirem OD<sub>595 nm</sub> de 0,4. Em seguida, o volume de 100  $\mu$ l dessas culturas foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C e os *pellets* foram ressuspensos em 10 ml de solução salina a 0,9%, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>.

Para os testes de infiltração (Figura 2.8), 150  $\mu$ l dos cultivos celulares (ou solução salina a 0,9% para o controle negativo) foram “injetados” na face abaxial das folhas com uma seringa de 5 ml. Para cada uma das condições foram infiltradas quatro folhas de ramos independentes, atentando-se para que todas as plantas tivessem folhas infiltradas com as linhagens bacterianas e o controle negativo com solução salina.





**Figura 2.8** Exemplos de *Citrus aurantifolia*, utilizadas como hospedeiro no ensaio de patogenicidade *in vivo* por infiltração. As plantas, localizadas na casa de vegetação do Fundecitrus, na UNESP em Araraquara-SP, foram cedidas pelo Fundecitrus. Fonte: próprio autor.

Para o teste de aspersão (Figura 2.9), 10 ml das culturas bacterianas (ou solução salina a 0,9% para o controle negativo) foram pulverizados em quadruplicata de plantas, que tiveram as folhas mais suscetíveis demarcadas no início do experimento.

Os testes de infiltração e aspersão foram repetidos em dois dias diferentes, utilizando duas réplicas biológicas (culturas independentes) em cada dia e quatro repetições experimentais (quatro folhas para o teste de infiltração e quatro plantas para o teste de aspersão) para cada linhagem. As folhas foram registradas fotograficamente após vinte dias (infiltração) e 28 dias (aspersão) para comparar visualmente os sintomas do processo infeccioso. Este ensaio foi realizado na estufa do Fundecitrus em Araraquara, com a colaboração do Dr. Franklin Behlau e da Me. Tamiris Garcia.



**Figura 2.9** Ensaio de patogenicidade *in vivo* das linhagens selvagem, mutantes de deleção e complementante por aspersão. **Painel A** | Plantas de *Citrus aurantifolia* utilizadas no experimento de aspersão, após o procedimento e recobertas com plástico transparente para indução de câmara úmida. **Painel B** | Exemplares de *Citrus aurantifolia* utilizadas no experimento na casa de vegetação do Fundecitrus, em Araraquara-SP. Fonte: próprio autor.

### 2.13.2 Curvas de crescimento

As linhagens Xcc e Xcc $\Delta$ xanB foram caracterizadas quanto ao perfil de crescimento em meio XAM-M em triplicata. Para isso, as duas linhagens foram pré-inoculadas em 5 ml de caldo LB até que atingissem DO<sub>595 nm</sub> igual a 0,5. O volume total dos pré-inóculos foi transferido para 100 ml de meio XAM-M e o crescimento foi monitorado pela retirada de alíquotas de 300  $\mu$ l seguida da leitura da densidade ótica a 595 nm em um leitor de microplacas *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad). As leituras foram realizadas em triplicata e as médias dessas réplicas juntamente com

os desvios-padrão amostrais foram utilizados para construir uma curva de crescimento.

### 2.13.3 Ensaio de formação de biofilme

As capacidades de adesão celular e de formação de biofilme são atributos determinantes no sucesso do processo infeccioso de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A mensuração da capacidade de formação de biofilme nas linhagens mutante e complementante de *xanB* produzidas, comparativamente à Xcc (selvagem) foi realizada da seguinte forma.

As linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e XccCxanB foram cultivadas em 150  $\mu$ l de meio XAM-M dispostos em placas de 96 poços com DO<sub>595 nm</sub> inicialmente ajustada para 0,3. Os cultivos foram incubados sem agitação a 30 °C durante 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada tempo, os poços foram lavados com NaCl 0,9% por três vezes e corados com 150  $\mu$ l de cristal violeta 0,1%.

Após trinta minutos de incubação com o corante, os poços foram lavados três vezes com água destilada. Por fim, o cristal violeta residual foi solubilizado em 150  $\mu$ l de etanol 70% e quantificado por absorvância a 595 nm (O'TOOLE; KOLTER, 1998).

### 2.13.4 Avaliação de motilidade

Para avaliar a motilidade “*swarming*”, as linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e XccCxanB foram cultivadas em meio LB contendo 0,7% de ágar. Para este ensaio, as linhagens foram previamente cultivadas *overnight* em meio caldo LB a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida, as densidades ópticas a 595 nm foram medidas e os cultivos ajustados para DO<sub>595 nm</sub> igual a 0,3.

A partir de tais cultivos, foram pipetados 3  $\mu$ l no centro das placas de Petri de 5,1 cm de diâmetro com LB 0,7%. Após isso, as placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas sem agitação. Por fim, as placas foram registradas digitalmente e o diâmetro das colônias obtidas foi mensurado utilizando o *software* ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (MALAMUD et al., 2011).

A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% por meio do *software* Minitab (15.2).

### 2.13.5 Sobrevivência à radiação ultravioleta

A avaliação da resistência à radiação ultravioleta (UV) foi realizada a partir de um cultivo das linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ CxanB em 5 ml de LB a 37 °C por 16 horas. Em seguida, a DO<sub>595 nm</sub> foi ajustada para 0,1 (aproximadamente 3.10<sup>7</sup> UFC/ml).

Em triplicata, 100  $\mu$ l destes cultivos contidos em tubos do tipo “Eppendorf” foram expostos à radiação UV da cabine de fluxo laminar, a uma distância de 60 cm da fonte de luz, segundo descrito anteriormente (LI; WANG, 2011a). Após 15 minutos de exposição, foi feita diluição seriada e o plaqueamento em ágar-LB para contagem de UFC.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95%, utilizando o *software* Minitab (15.2).

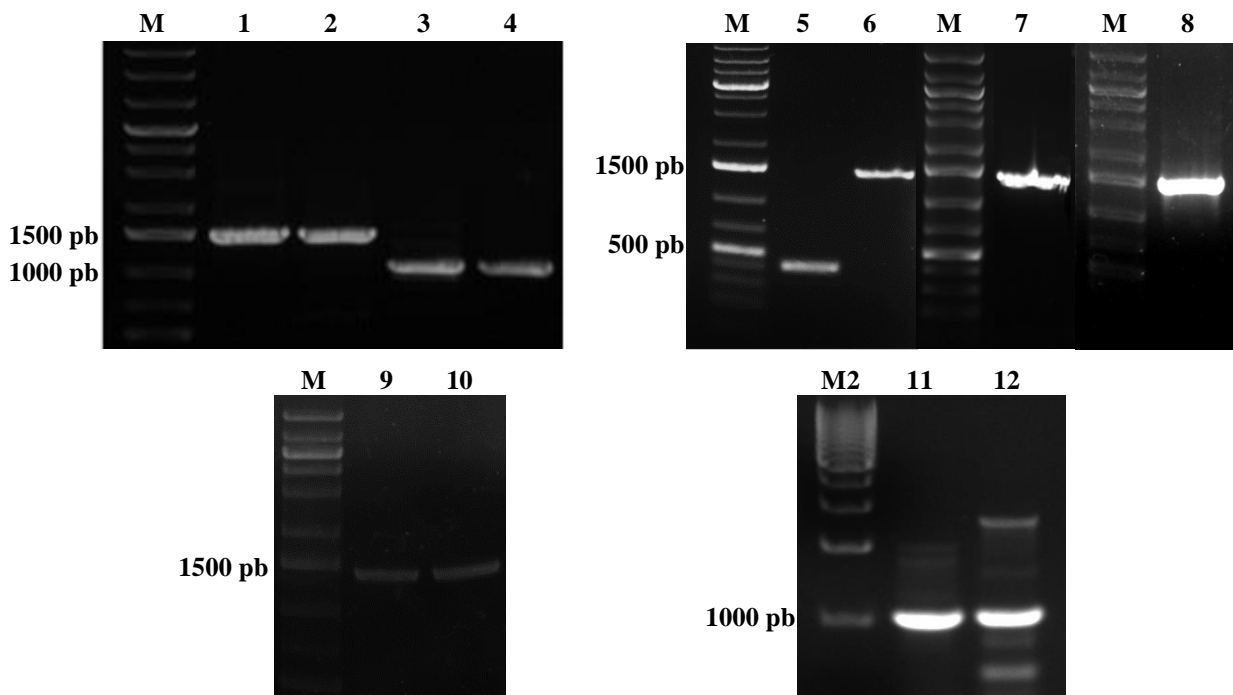
## Capítulo 3 – Resultados e Discussão

### 3.1 Amplificação por PCR e clonagem

Os pares de oligonucleotídeos desenhados foram sintetizados para permitir a amplificação dos fragmentos gênicos de interesse por PCR, seguida da clonagem em vetor de propagação pJET 1.2 (Fermentas), exceto os pares KO\_PMI\_FW-KO\_PMI\_RV e KO\_XI\_FW-KO\_XI\_RV, os quais foram utilizados apenas para confirmação da deleção e complementação gênicas.

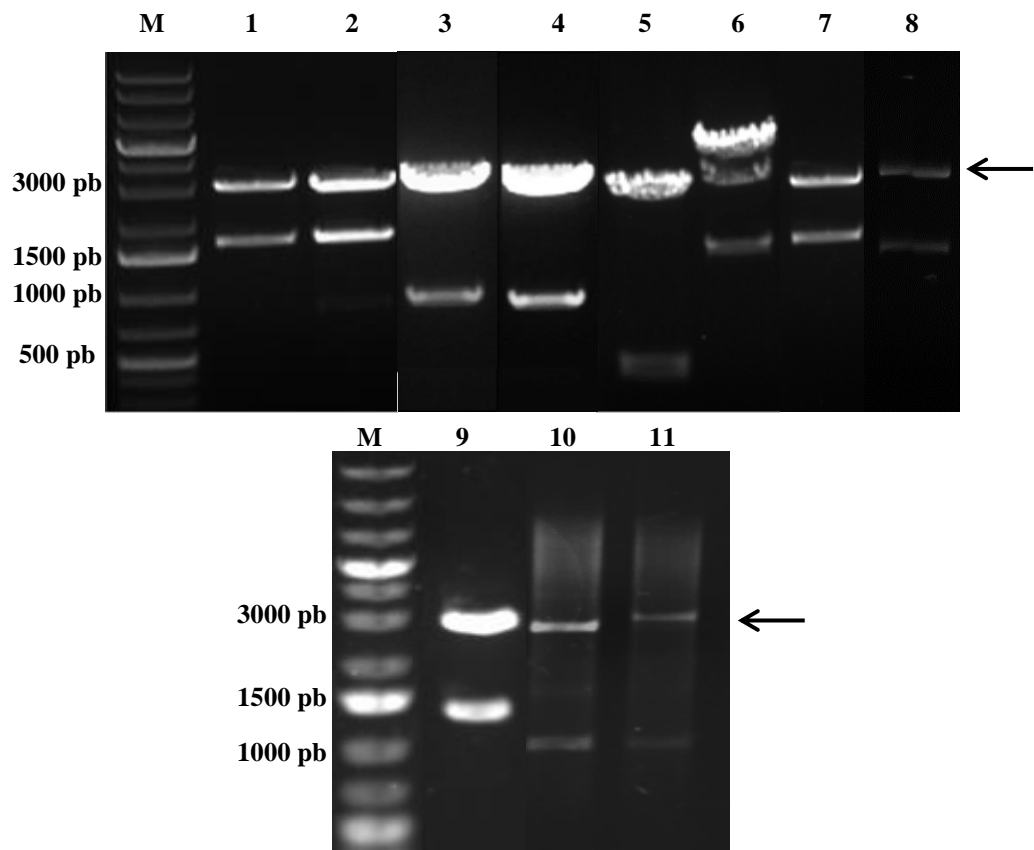
Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (Figura 3.1), isolados a partir do gel e clonados no vetor de propagação pJET 1.2.

Os produtos das reações de ligação foram utilizados na transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes por tratamento com cloreto de cálcio e plaqueadas em ágar-LB adicionado de ampicilina.



**Figura 3.1** Análise dos produtos de amplificação por PCR a partir de DNA genômico de *Xcc*. Alíquotas de 3  $\mu$ L de cada reação de PCR foram analisadas em eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **1** | Produto de PCR referente à região codificante da PMI madura (1404 pb), utilizada para clonagem no vetor pET28a. **2** | Produto de PCR referente à região codificante da PMI madura sem *stop* códon nativo (1401 pb), utilizada para clonagem no vetor pET29b. **3 e 4** | Produtos de PCR referentes aos fragmentos de 1kb *upstream* e *downstream* ao gene *xanB*, respectivamente. **5** | Produto de PCR referente à região promotora predita do gene *xanB* (390 pb). **6** | Produto de PCR referente à região codificante da PMI madura (1404 pb), utilizada na construção do vetor de complementação pLAL6\_CxanB. **7** | Produto de PCR referente à região codificante da PMI madura (1404 pb), utilizada na construção do vetor de complementação pNPTS138\_CxanB. **8** | Produto de PCR referente à região codificante da PMI madura (1404 pb), utilizada na construção do vetor de expressão pET41a\_GST\_PMI. **9** | Produto de PCR referente à região codificante da XI madura (1338 pb). **10** | Produto de PCR referente à região codificante da XI madura sem *stop* códon nativo (1335 pb). **M2** | Padrão de tamanho molecular *EZ Load™ 1 kb Molecular Ruler* (Bio-Rad). **11 e 12** | Produtos de PCR referentes aos fragmentos de 1 kb *upstream* e *downstream* ao gene *xylA*, respectivamente. Bandas do padrão mais próximas ao tamanho dos produtos estão indicadas à esquerda. Fonte: próprio autor.

Colônias isoladas foram cultivadas em caldo LB contendo ampicilina para propagação e purificação do DNA plasmidial dos transformantes. Em seguida, o DNA plasmidial referente a cada clonagem foi submetido à análise de restrição com as respectivas endonucleases para confirmação da clonagem dos insertos no vetor de propagação pJET 1.2 (Figura 3.2). Por fim, os vetores de propagação obtidos a partir das colônias positivas (tamanho dos insertos correspondente ao esperado) foram sequenciados (Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e células-tronco – USP) e os insertos apresentaram 100% de identidade com as sequências dos fragmentos gênicos de interesse presentes no *GenBank*<sup>®</sup>.



**Figura 3.2** Análise de restrição dos DNAs plasmidiais para confirmação da clonagem dos fragmentos de interesse no vetor de propagação pJET 1.2. Entre 500 e 1000 ng de DNA plasmidial dos vetores de propagação foram submetidos à dupla digestão com as endonucleases específicas e analisados em eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). Cada vetor de propagação pJET 1.2 (2974 pb, Anexo I) foi digerido para excisão dos seguintes fragmentos. **1** | Região codificante do gene *xanB*. **2** | Região codificante do gene *xanB* sem o respectivo *stop* códon nativo. **3** | Região de 1 kb *upstream* ao gene *xanB*. **4** | Região de 1 kb *downstream* ao gene *xanB*. **5** | Região promotora predita (*xanP*) do operon *xanAB*. **6** | Região codificante do gene *xanB* para montagem do vetor de complementação pLAL6\_CxanB. **7** | Região codificante do gene *xanB* para montagem do vetor de complementação pNPTS\_CxanB. **8** | Região codificante do gene *xanB* para montagem do vetor de expressão pET41a\_GST\_PMI. **9** | Região codificante do gene *xyIA*. **10** | Região de 1 kb *upstream* ao gene *xyIA*. **11** | Região de 1 kb *downstream* ao gene *xyIA*. Tamanhos de bandas do padrão mais próximos aos insertos e vetor estão indicados. Uma seta indica a altura da banda do vetor de propagação pJET 1.2 (aproximadamente 3 kb), comum em todas as amostras. Fonte: próprio autor.

## 3.2 Expressão heteróloga e purificação das proteínas recombinantes

### 3.2.1 Construção dos vetores de expressão

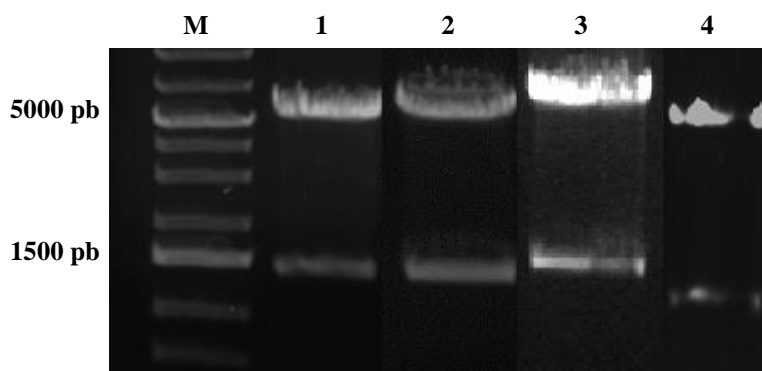
Após a dupla digestão dos vetores de propagação, os insertos referentes às regiões codificantes com *stop codon* nativo e, também, sem o referido códon (que resulta na PMI com cauda de histidinas na região C-terminal, XccPMI\_C) foram purificados a partir do gel de agarose, quantificados e utilizados em reações de ligação, utilizando T4 DNA ligase, com os vetores de expressão pET28a (PMI e XI) e

pET29b (apenas para a PMI) (Tabela 2.2), previamente digeridos com *NdeI* e *XhoI* (Tabela 2.1).

Além disso, o vetor de propagação contendo a região codificante da PMI com sítios de restrição para clonagem no pET41a foi digerido com *EcoRI* e *XhoI* (Tabelas 2.1 e 2.2) e o inserto resultante foi purificado para utilização em uma reação de ligação com o referido vetor de expressão previamente digerido com as mesmas endonucleases.

As reações de ligação foram transformadas em *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes por tratamento com cloreto de cálcio e os clones foram confirmados por digestão do DNA plasmidial sob eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% (Figura 3.3).

Os clones positivos foram nomeados como pET28a\_PMI, pET29b\_PMI\_C, pET41a\_GST\_PMI e pET28a\_XI, sendo estes respectivamente os vetores de expressão da PMI com cauda de histidinas na região N-terminal (XccPMI), da PMI com cauda de histidinas na região C-terminal (XccPMI\_C), da PMI fusionada à GST na região N-terminal (XccGST\_PMI) e da XI com cauda de histidinas na região N-terminal (Xcc\_XI), respectivamente.



**Figura 3.3** Análise de restrição dos DNAs plasmidiais para confirmação da clonagem das regiões codificadoras da PMI e da XI nos vetores de expressão da série pET. Os vetores de expressão recombinante foram digeridos com as endonucleases específicas e analisados em eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. **M** | Padrão de tamanho molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas). **1** | Vetor de expressão pET28a\_PMI digerido com *XhoI* e *NdeI*. **2** | Vetor de expressão pET29b\_PMI\_C digerido com *XhoI* e *NdeI*. **3** | Vetor de expressão pET41a\_GST\_PMI digerido com *EcoRI* e *XhoI*. **4** | Vetor de expressão pET28a\_XI digerido com *XhoI* e *NdeI*. Tamanhos de bandas do padrão mais próximos ao inserto e vetor estão indicados. Os plasmídeos pET28a e pET29b possuem cerca de 5,3 kb (Anexos II e III), já o pET41a possui 5,9 kb (Anexo IV), e os insertos referentes às regiões codificadoras da PMI e da XI possuem 1404 ou 1401 pb e 1338 pb, respectivamente. Fonte: próprio autor.



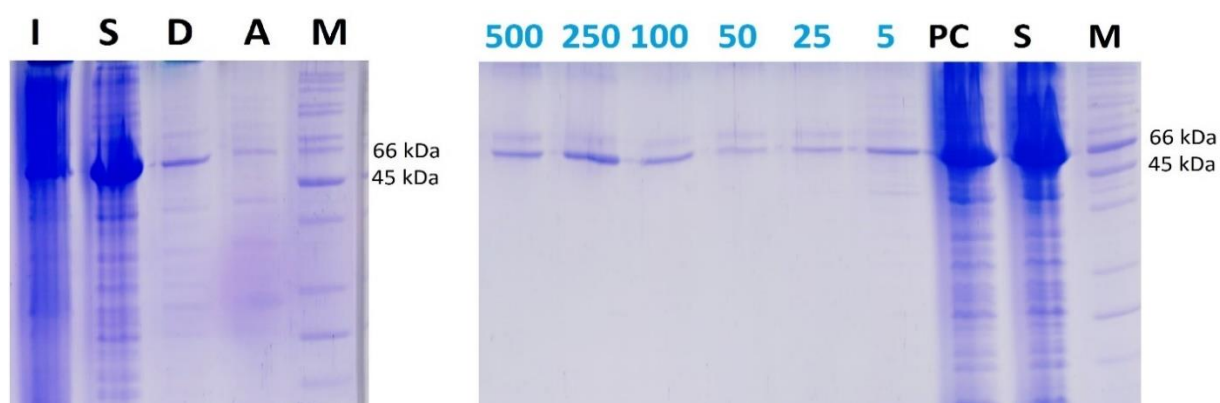
### 3.2.2 Análise da expressão heteróloga e da purificação por cromatografia de afinidade

Os vetores de expressão foram individualmente transformados em *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes por tratamento com cloreto de cálcio e o plaqueamento feito em ágar-LB contendo canamicina. Uma colônia isolada de cada um dos transformantes foi utilizada para o ensaio de expressão heteróloga sob indução de IPTG. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão e lisadas por pulsos de ultrassom, sob banho de gelo.

Para purificação dos produtos de expressão heteróloga obtidos a partir dos vetores pET28a e pET29b, a fração solúvel do lisado de cada cultivo foi aplicada em coluna de níquel imobilizado. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de ressuspensão (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl) e um gradiente crescente de concentrações de imidazol (de 5 a 500 mM) foi aplicado para eluição da proteína.

Já para a purificação da PMI fusionada à GST (pET41a\_GST\_PMI), a proteína foi eluída da coluna de glutathiona imobilizada (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare) com 5 ml de glutathiona reduzida 10 mM.

Para todas as construções dos produtos de expressão alíquotas das frações solúveis e insolúveis, bem como alíquotas do pós-coluna e dos eluatos em imidazol e glutathiona reduzida foram submetidas à análise em SDS-PAGE (Figuras 3.4 – 3.8).



**Figura 3.4** Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccPMI por SDS-PAGE. A figura mostra a purificação da XccPMI (aproximadamente 53 kDa), obtida a partir do vetor de expressão pET28a\_PMI. **I** | Fração insolúvel do lisado. **S** | Fração solúvel do lisado. **D** | Depois da indução por IPTG. **A** | Antes da indução por IPTG. **M** | Padrão de massa molecular *Pierce Unstained Protein MW Marker* (Thermo). **PC** | Fração solúvel após passagem pela coluna de purificação. A proteína foi eluída pela aplicação de um gradiente crescente de concentrações de imidazol (concentrações em mM, mostradas em azul e ordem decrescente de concentração). As eluições foram realizadas com volumes de imidazol referentes a cinco volumes de coluna. O ensaio de expressão teve um rendimento de 5 mg de proteína recombinante por litro de meio de cultura. Massas do padrão estão indicadas à direita. Fonte: próprio autor.

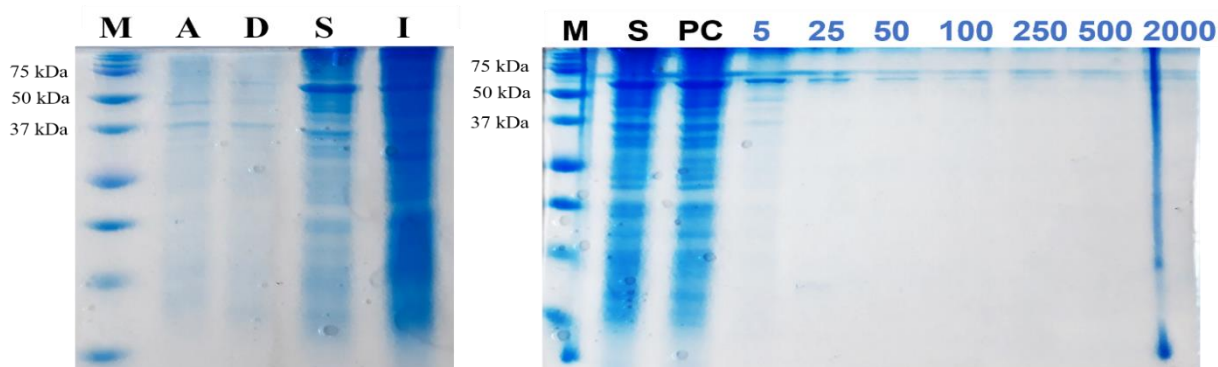
O padrão de bandas no gel da Figura 3.4 permite concluir que os sistemas de expressão e purificação funcionam a contento, uma vez que a massa molecular predita da proteína recombinante é de, aproximadamente, 53 kDa, adicionando-se a massa referente à cauda de histidinas N-terminal, pois a sequência peptídica madura da PMI consiste em aproximadamente 51 kDa.

Embora o sistema de expressão e purificação da PMI com *his-tag* N-terminal tenha funcionado satisfatoriamente, a proteína se mostrou instável em tampões TRIS, PBS, adicionados ou não de glicerol. Em todas as condições testadas, a proteína recombinante formou precipitados em diferentes temperaturas de armazenamento, incluindo -20, 4 e 25 °C.

Com o intuito de melhorar a solubilidade da proteína, foi testado o sistema de expressão e purificação da PMI fusionada à cauda de histidinas C-terminal (XccPMI\_C), utilizando o vetor pET29b\_PMI\_C (Figura 3.5).

A análise da Figura 3.5 possibilita inferir que os sistemas de expressão e purificação também funcionaram satisfatoriamente, como pode ser evidenciado pela presença de uma banda com suficiente grau de pureza na eluição com 500 mM de imidazol.

Além disso, a proteína se mostrou mais estável em temperaturas de 4 a 8 °C, permanecendo solúvel por 24 horas sob tais condições. Apesar da melhoria em relação à XccPMI, o tempo de estabilidade da XccPMI\_C ainda não foi plenamente satisfatório.



**Figura 3.5** Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccPMI\_C sob SDS-PAGE. A figura mostra a purificação da XccPMI\_C (aproximadamente 53 kDa), sintetizada a partir do vetor de expressão pET29b\_PMI\_C. **M** | Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad). **A** | Antes da indução por IPTG. **D** | Depois da indução por IPTG. **S** | Fração solúvel do lisado. **I** | Fração insolúvel do lisado. **PC** | Fração solúvel após passagem pela coluna de purificação. A proteína foi eluída pela aplicação de um gradiente crescente de concentrações de imidazol (concentrações em mM, mostradas em azul). As eluições foram realizadas com volumes de imidazol referentes a cinco volumes de coluna. O ensaio de expressão teve um rendimento de 5 mg de proteína recombinante por litro de meio de cultura. Massas do padrão estão indicadas à esquerda. Fonte: próprio autor.

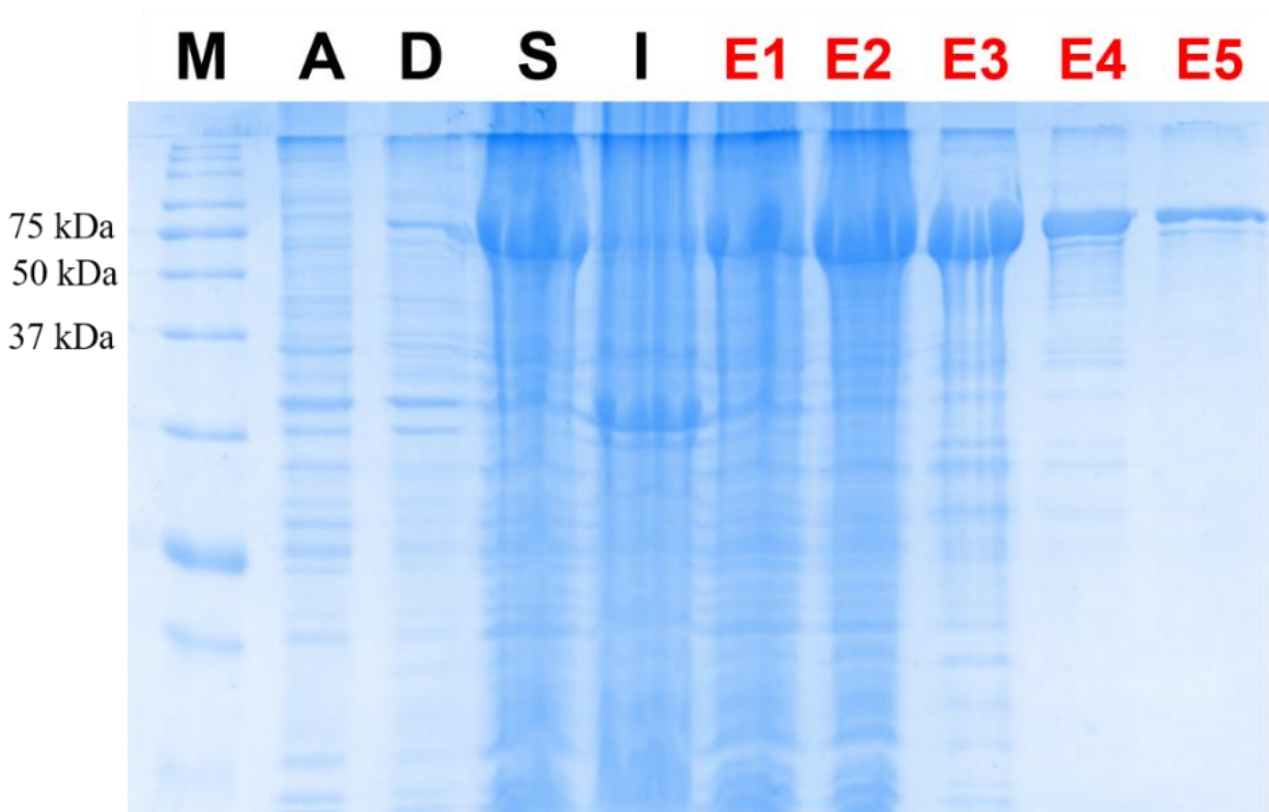
Nesse sentido, foi testada a expressão, purificação, solubilidade e estabilidade da PMI fusionada à GST (XccGST\_PMI), a partir do vetor pET41a\_GST\_PMI (Figura 3.6), que resulta em uma proteína com 79 kDa, uma vez que a GST apresenta 26 kDa.

Os resultados obtidos a partir da expressão heteróloga utilizando o vetor pET41a\_GST\_PMI permitem inferir que os sistemas de expressão e purificação funcionaram de maneira adequada, fornecendo proteína relativamente pura. Ademais, a proteína purificada XccGST\_PMI apresentou-se mais estável, suportando dez dias na temperatura de 4 a 8 °C, o que tornou este sistema o mais adequado para as aplicações *downstream* da proteína recombinante.

As *tags* mais comumente utilizadas em proteínas recombinantes são 6xHis, Glutathione-S-transferase (GST), Proteína de ligação a maltose (MBP), Proteína verde fluorescente (GFP) e diversos epítomos imunogênicos. Além de permitirem a purificação, essas *tags* podem conferir vantagens à proteína-alvo durante a expressão heteróloga, aumentando a solubilidade, protegendo de proteólise, melhorando a conformação e aumentando o rendimento da produção (ARNAU et al., 2006; WOOD, 2014).

A utilização de proteínas fusionadas à GST tem sido amplamente empregada em trabalhos de expressão heteróloga de proteínas. Junior (2017) utilizou um vetor que permite a produção heteróloga de proteínas de *Trypanosoma cruzi* fusionadas à GST, resultando no correto enovelamento proteico e no aumento da solubilidade de tais proteínas. Em outro trabalho, a utilização da *tag* de GST também demonstrou ser eficiente, resultando em altos níveis de expressão do gene-alvo e, também, a otimização do processo de purificação, devido à alta afinidade da GST pela coluna de cromatografia (KAPPAUN; MARTINELLI; RITT, 2008).

Dessa forma, os aumentos de solubilidade e estabilidade atingidos com a XccGST\_PMI serão valorosos para a caracterização estrutural da proteína, cuja estrutura desse gênero ainda não foi elucidada, segundo consulta no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*). Além disso, a obtenção da proteína recombinante pode contribuir em futuros estudos que busquem aumentar a compreensão do seu papel na interação planta-patógeno, bem como de ensaios de inibição enzimática.



**Figura 3.6** Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccGST\_PMI por SDS-PAGE. A figura mostra a purificação da XccGST\_PMI (aproximadamente 79 kDa) em coluna de glutationa imobilizada, a partir do vetor de expressão pET41a\_GST\_PMI. **M** | Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad). **A** | Antes da indução por IPTG. **D** | Depois da indução por IPTG. **S** | Fração solúvel do lisado. **I** | Fração insolúvel do lisado. A proteína foi eluída pela aplicação de 5 volumes de coluna (5 ml) de glutationa reduzida a 10 mM, sendo **E1-E5** (mostrados em vermelho) os eluatos referentes a cada um dos volumes aplicados (1 ml). Massas do padrão estão indicadas à esquerda. O ensaio de expressão teve um rendimento de 6 mg de proteína recombinante por litro de meio de cultura. Experimento realizado durante a orientação do aluno Carlos Henrique Alves de Moraes. Fonte: próprio autor.

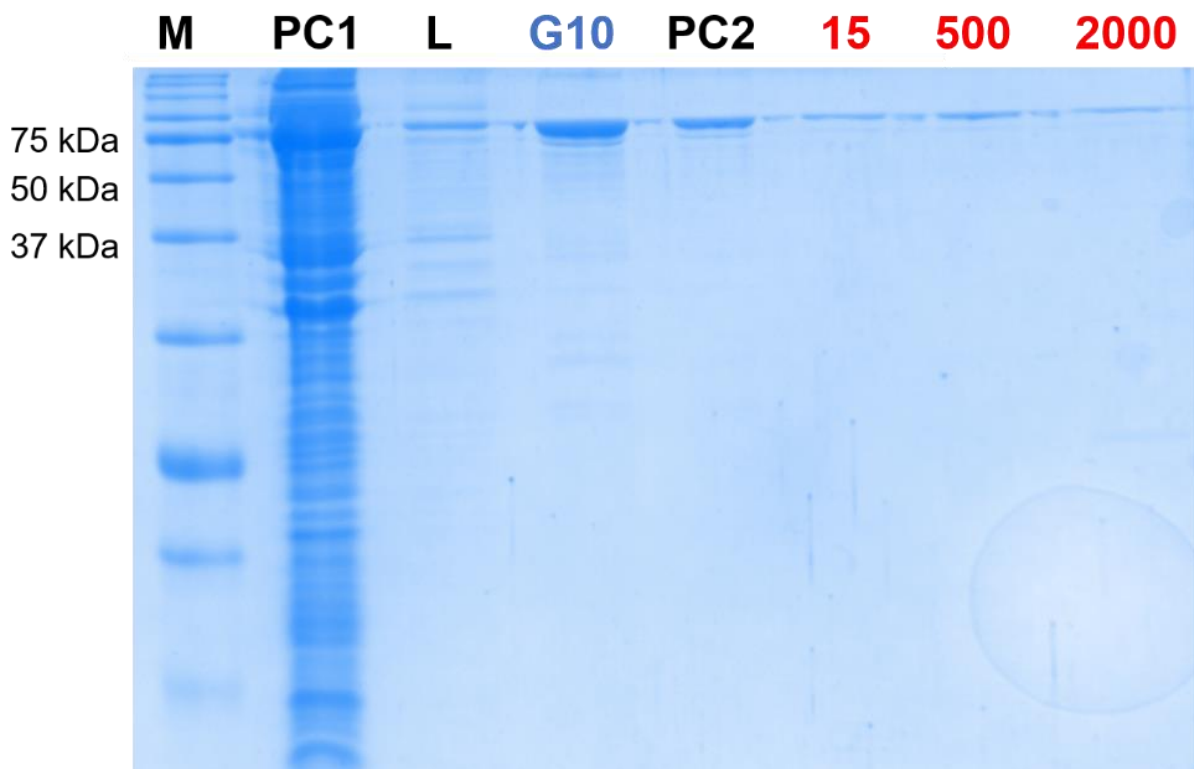
Um importante ponto a ser destacado é que o vetor pET41a\_GST\_PMI resulta em uma proteína recombinante fusionada à GST e com cauda de histidinas na região N-terminal da PMI (entre a GST e a PMI), possibilitando a purificação *in tandem* por meio da utilização de resinas com níquel e glutationa imobilizados (Figura 3.7).

A purificação *in tandem* da proteína recombinante GST\_PMI não resultou em um grau de eficiência satisfatório, uma vez que grande parte do produto recombinante atravessou a coluna de glutationa imobilizada sem adsorção pela mesma (Figura 3.7, PC1). Além disso, o mesmo ocorreu no segundo passo de purificação, quando o eluato da primeira coluna foi aplicado à coluna com níquel imobilizado (Figura 3.7, PC2).

A pouca afinidade pelas colunas poderia ser explicada pela conformação tridimensional do produto proteico, na qual tanto a cauda de histidinas quanto a GST

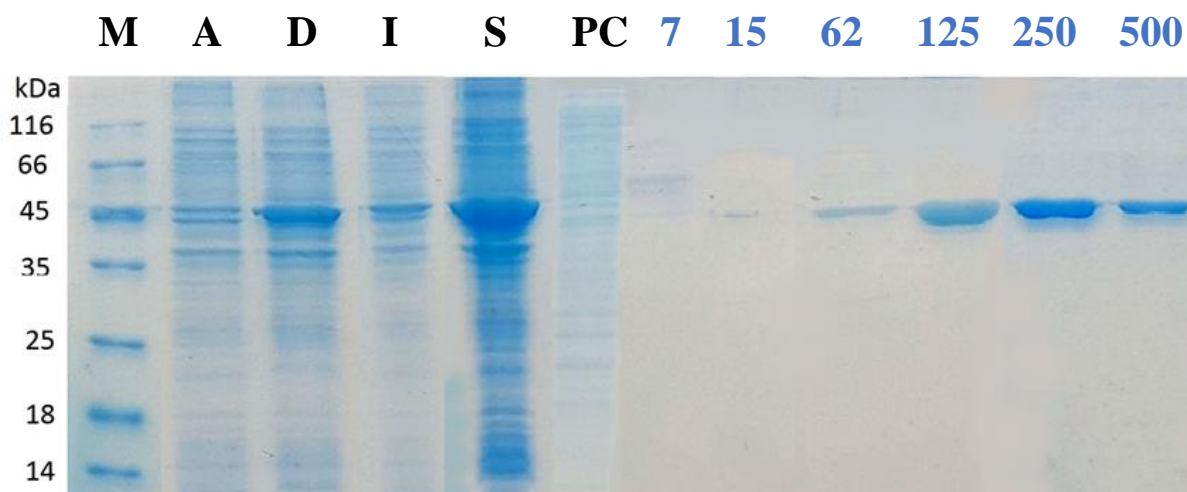
podem não estar tão expostas quanto o desejado para uma purificação por cromatografia de afinidade. Porém, mais ensaios devem ser feitos para corroborar tal hipótese.

Por outro lado, o nível de pureza obtido nos eluatos de imidazol a 500 e 2000 mM foi consideravelmente superior (Figura 3.7) se comparado ao encontrado na purificação de etapa única, utilizando a coluna com glutathiona imobilizada (Figura 3.6).



**Figura 3.7** Análise da expressão, solubilidade e purificação *in tandem* da XccGST\_PMI por SDS-PAGE. A figura mostra a purificação *in tandem* da XccGST\_PMI (aproximadamente 79 kDa), obtida a partir do vetor de expressão pET41a\_GST\_PMI. **M** | Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad). **PC1** | Fração solúvel do lisado celular após passagem pela coluna de purificação com glutathiona imobilizada. **L** | Lavagem da coluna com tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl. **G10** | Eluato a 10 mM de glutathiona reduzida. **PC2** | Eluato G10 após a passagem pela coluna de purificação com níquel imobilizado. **15** | Eluato a 15 mM de imidazol. **500** | Eluato a 500 mM de imidazol. **2000** | Eluato a 2000 mM de imidazol. Massas do padrão estão indicadas à esquerda. Fonte: próprio autor.

A partir da análise da expressão e da purificação da Xcc\_XI (Figura 3.8) foi possível averiguar que tais sistemas funcionaram de modo satisfatório, dado que a massa molecular predita da proteína recombinante é de 49,6 kDa que, somada à massa referente à cauda de histidinas N-terminal, deveria apresentar massa molecular de aproximadamente 51,6 kDa, o que é compatível com o observado.



**Figura 3.8** Análise da expressão, solubilidade e purificação da XccXI por SDS-PAGE. A figura mostra a purificação da XccXI recombinante (aproximadamente 51,6 kDa), obtida a partir do vetor de expressão pET28a\_XI. **A** | Antes da indução por IPTG. **D** | Depois da indução por IPTG. **I** | Fração insolúvel do lisado. **S** | Fração solúvel do lisado. **M** | Padrão de massa molecular Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo). **PC** | Fração solúvel após passagem pela coluna de purificação. A proteína foi eluída pela aplicação de um gradiente crescente de concentrações de imidazol (concentrações em mM, mostradas em azul). As eluições foram realizadas com volumes de imidazol referentes a cinco volumes de coluna. Massas do padrão estão indicadas à esquerda. O ensaio de expressão teve um rendimento de 8 mg de proteína recombinante por litro de meio de cultura. Experimento realizado durante a co-orientação da aluna Nicole Castro Silva Nicolela. Fonte: próprio autor.

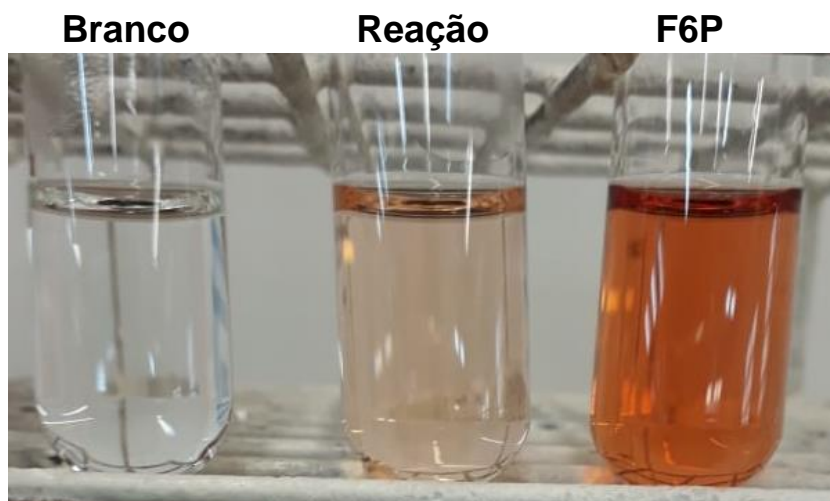
### 3.3 Avaliação das atividades enzimáticas das proteínas recombinantes

Para a análise da atividade biológica das proteínas recombinantes, os procedimentos de expressão e purificação foram repetidos, com algumas modificações para permitir a obtenção de proteínas puras e livres dos tampões de eluição que continham imidazol e glutatona.

Assim, para a XccPMI\_C, o processo de expressão foi refeito e a purificação envolveu a passagem da fração solúvel do lisado celular seguida de uma única lavagem com tampão contendo imidazol 25 mM e a eluição com tampão contendo imidazol 500 mM. Após a eluição, foi realizada diálise contra tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, para a retirada do imidazol do eluato.

Após diálise, a proteína recombinante purificada (0,5 ml a 0,3 mg/ml) foi utilizada em reações contendo 0,1 M de manose-6-fosfato (substrato da XccPMI\_C). Para a detecção da frutose-6-fosfato produzida pela enzima, adicionou-se 1 ml do reagente de Seliwanoff, que produz, sob altas temperaturas, uma molécula de

coloração vermelho-amarronzada na presença de cetoses, como a frutose-6-fosfato (Figura 3.9).

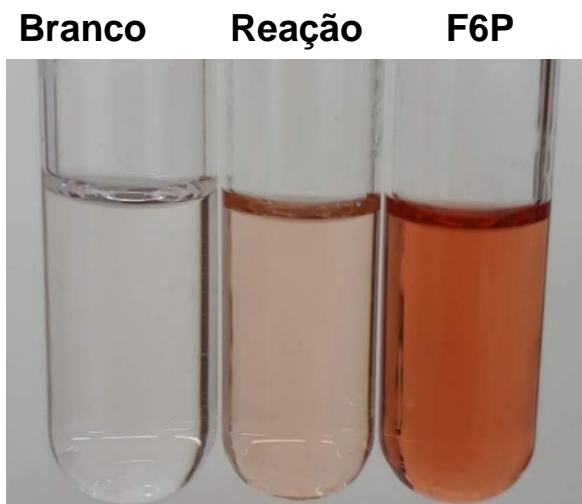


**Figura 3.9** Avaliação da atividade enzimática da XccPMI\_C. A XccPMI\_C purificada foi submetida a um teste qualitativo de atividade enzimática utilizando o reagente de Seliwanoff, o qual permite a identificação de cetoses, como a D-frutose-6-fosfato. **Branco** | Composto por 0,1 M de D-manose-6-fosfato, tampão e o reagente de Seliwanoff. **Reação** | Reação contendo 0,1 M de D-manose-6-fosfato, XccPMI\_C (0,3 mg/ml) em tampão e o reagente de Seliwanoff. **F6P** | Controle positivo contendo 0,1 M de D-frutose-6-fosfato, tampão e o reagente de Seliwanoff. A coloração vermelho-amarronzada no tubo “Reação” permitiu a conclusão de que a XccPMI\_C é capaz de desempenhar a sua atividade predita de conversão de D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato. Todos os tampões utilizados foram compostos de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl. Fonte: próprio autor.

Apesar das concentrações de manose-6-fosfato (Reação, Figura 3.9) e frutose-6-fosfato (F6P, Figura 3.9) serem as mesmas, as colorações apresentadas após a adição do reagente de Seliwanoff foram significativamente distintas, o que pode ser atribuído à não conversão total da D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato pela XccPMI\_C, uma vez que o equilíbrio químico entre os dois monossacarídeos deve ter sido atingido.

Embora a XccPMI\_C tenha apresentado a atividade enzimática esperada, a sua instabilidade dificultou a sua utilização *downstream*, como as tentativas de cristalização. Tal proteína apresentou perda de atividade após 24 horas a 4 °C e, também, depois de um ciclo de congelamento-descongelamento.

Sob as mesmas condições testadas no ensaio anterior, a fosfomanose isomerase fusionada à GST (XccGST\_PMI) foi testada quanto à atividade enzimática de conversão de D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato (Figura 3.10).



**Figura 3.10** Avaliação da atividade enzimática da XccGST\_PMI. A XccGST\_PMI purificada também foi submetida ao teste qualitativo de atividade enzimática utilizando o reagente de Seliwanoff. **Branco** | Composto por 0,1 M de D-manose-6-fosfato, tampão e o reagente de Seliwanoff. **Reação** | Reação contendo 0,1 M de D-manose-6-fosfato, XccGST\_PMI (0,3 mg/ml) em tampão e o reagente de Seliwanoff. **F6P** | Controle positivo contendo 0,1 M de D-frutose-6-fosfato, tampão e o reagente de Seliwanoff. A coloração vermelho-amarronzada no tubo “Reação” permitiu a conclusão de que a XccGST\_PMI também possui a atividade catalítica predita de conversão de D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato. Todos os tampões utilizados foram constituídos de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl. Fonte: próprio autor.

Assim como a XccPMI\_C (fosfomanose isomerase fusionada à cauda de histidinas na região C-terminal), a XccGST\_PMI também apresentou a atividade catalítica predita, sendo capaz de converter D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato.

Dessa forma, tal construção foi capaz de sobrepujar a inconveniência da instabilidade apresentada pela proteína XccPMI\_C, uma vez que permaneceu estável e com atividade enzimática após dez dias de armazenamento a 4 °C e, também, após ciclos de congelamento-descongelamento.

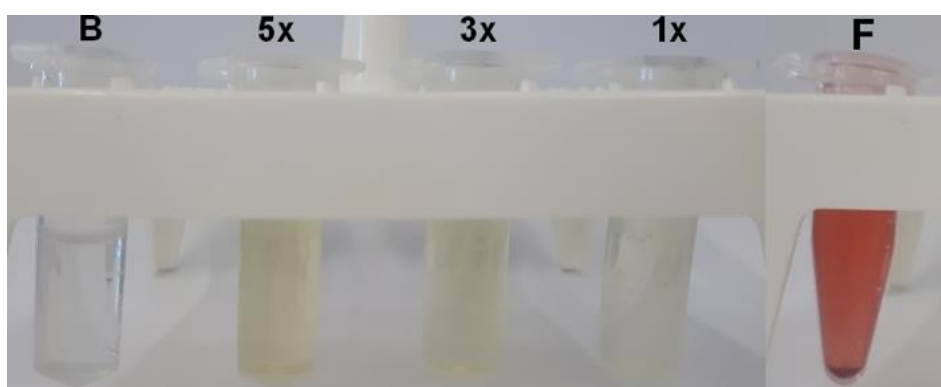
De modo semelhante aos ensaios anteriores, a xilose isomerase recombinante (XccXI) também teve as suas atividades enzimáticas preditas avaliadas. Assim, o ensaio de expressão heteróloga foi repetido e a purificação compreendeu a passagem da fração solúvel do lisado celular seguida de uma única lavagem com tampão contendo imidazol 25 mM e a eluição com tampão contendo imidazol 500 mM. Após a eluição, foi realizada diálise contra tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, para a retirada do imidazol do eluato.



Primeiramente, foi testada a atividade catalítica de conversão de D-xilose em D-xilulose, utilizando o reagente de Seliwanoff. Para isso, após dialisada, a xilose isomerase recombinante purificada foi utilizada em três diferentes concentrações ( $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ ,  $0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$  e  $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) em reações contendo  $0,1 \text{ M}$  de D-xilose.

Para a detecção da D-xilulose produzida pela enzima, adicionou-se  $1 \text{ ml}$  do reagente de Seliwanoff, sendo constatada a formação de um composto coloração amarelo-esverdeada. Como controle positivo para o reagente de Seliwanoff, foi utilizada D-frutose  $0,1 \text{ M}$  (Figura 3.11).

Apesar do teste ter sido conduzido de maneira qualitativa, a utilização de diferentes concentrações da proteína recombinante permitiu a verificação da relação diretamente proporcional (e esperada) entre a concentração da enzima e a intensidade da coloração exibida.



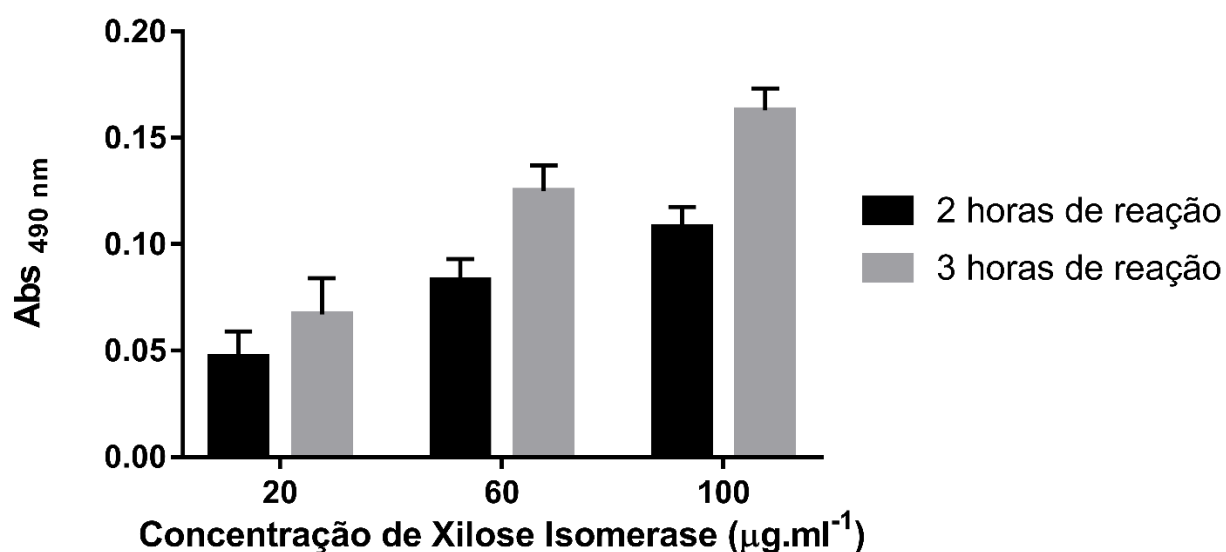
**Figura 3.11** Avaliação da atividade enzimática da XccXI. **B** | Branco contendo tampão e reagente de Seliwanoff. **5x** | Tubo contendo XI ( $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), D-xilose  $0,1 \text{ M}$  e reagente de Seliwanoff. **3x** | Tubo contendo XI ( $0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), D-xilose  $0,1 \text{ M}$  e reagente de Seliwanoff. **1x** | Tubo contendo XI ( $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), D-xilose  $0,1 \text{ M}$  e reagente de Seliwanoff. **F** | Tubo utilizado como controle positivo, composto de D-frutose  $0,1 \text{ M}$ , tampão e reagente de Seliwanoff. A coloração amarelo-esverdeada observada nos tubos 5x, 3x e 1x, cujas intensidades são diretamente proporcionais às quantidades de enzima utilizadas permite a inferência de que a XI recombinante apresentou sua atividade predita de conversão de D-xilose em D-xilulose. Todos os tampões utilizados eram compostos de  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl ( $\text{pH } 8,0$ ),  $100 \text{ mM}$  NaCl. Experimento realizado durante a co-orientação da aluna Nicole Castro Silva Nicolela. Fonte: próprio autor.

A avaliação da atividade de conversão de D-frutose a D-glicose catalisada pela enzima XI foi realizada por meio da detecção de D-glicose (método de GOD-Trinder) formada após a incubação por 2 e 3 horas da enzima (em três diferentes concentrações) juntamente com o seu substrato D-frutose, a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  (Figura 3.12).

A comparação entre as médias obtidas de cada ensaio com as diferentes concentrações de enzima nos distintos intervalos de tempo permitiu a constatação de

que, ao estender o tempo de reação, obtém-se um aumento da absorvância nas reações e, portanto, aumento da presença de D-glicose em solução, resultante da ação da XccXI sobre a D-frutose.

Além disso, foi possível verificar que quanto maior a concentração da enzima, maior a quantidade de D-glicose formada. Tais dados confirmam a existência da atividade de conversão de D-frutose em D-glicose da XccXI recombinante.



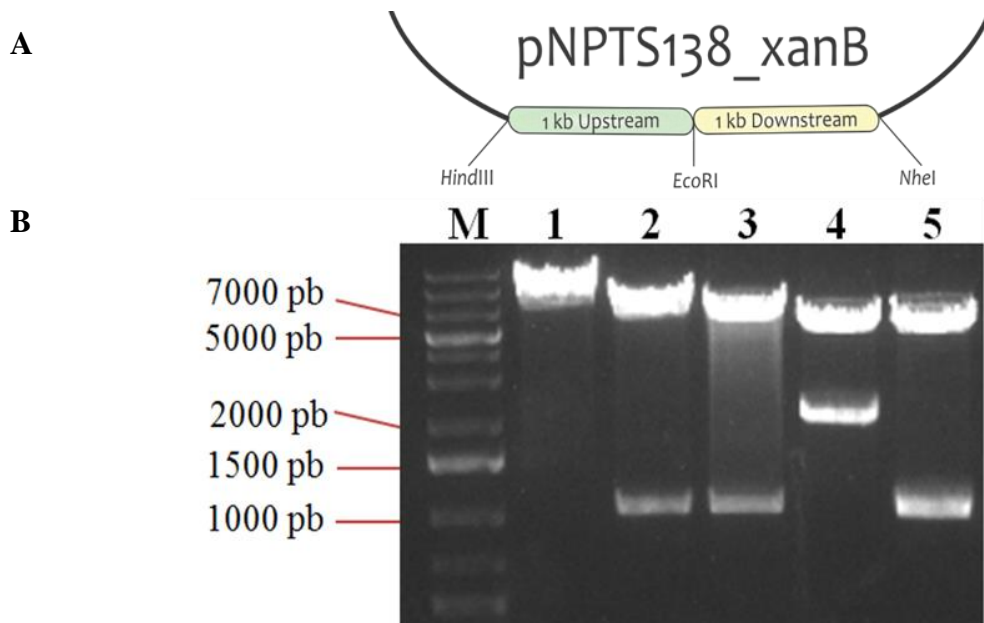
**Figura 3.12** Avaliação da atividade enzimática da XccXI. Foi avaliada a atividade enzimática da XccXI recombinante purificada na conversão de D-frutose em D-glicose. Para isso, foi utilizado um *kit* de detecção de D-glicose e três ensaios com diferentes concentrações da enzima foram realizados. As concentrações de enzima utilizadas (em µg.ml<sup>-1</sup>) foram 20, 60 e 100. Verificou-se que a absorvância em 490 nm nas reações teve um aumento em função do tempo e da concentração de XccXI adotados. O gráfico mostra as médias das medidas realizadas em triplicata, a 25 °C, após duas e três horas de reação. Experimento realizado durante a co-orientação da aluna Nicole Castro Silva Nicolela. Fonte: próprio autor.

### 3.4 Deleção gênica

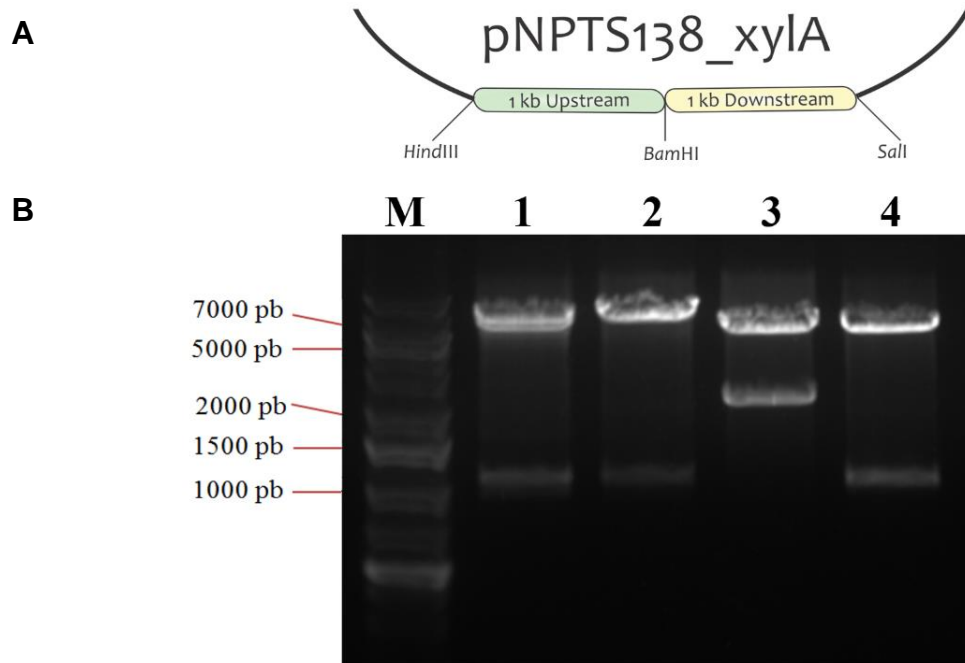
#### 3.4.1 Construção dos vetores de deleção

As regiões de 1 kb que flanqueiam os genes-alvo foram amplificadas por PCR usando o DNA de Xcc como molde e os pares de oligonucleotídeos mostrados nas Tabelas 2.2 e 2.3, sob as condições exibidas na Tabela 2.5. Os produtos de PCR foram clonados no vetor de propagação pJET 1.2 e sequenciados, apresentando 100% de identidade com as sequências dos fragmentos gênicos de interesse presentes no *GenBank*<sup>®</sup>.

Para cada vetor de deleção, os fragmentos gênicos referentes às regiões de 1 kb *upstream* e *downstream* aos genes-alvo foram excisados dos vetores de propagação e clonados sequencialmente *in tandem* no vetor de deleção pNPTS138, entre os sítios de restrição *Hind*III e *Nhe*I para o gene *xanB* (Figura 3.13A) e entre os sítios de restrição *Hind*III e *Sal*I para o gene *xyIA2* (Figura 3.14A). A análise de restrição dos vetores de deleção confirmou os resultados esperados (Figuras 3.13B e 3.14B).



**Figura 3.13** Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138\_xanB. DNA plasmidial do vetor de deleção do gene *xanB* foi submetido a diversas digestões com as endonucleases utilizadas para a sua construção e analisado em eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. **Painel A** | Representação gráfica de um segmento do vetor de deleção pNPTS138\_xanB. **Painel B** | Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138\_xanB. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **1** | pNPTS138\_xanB digerido somente com *Eco*RI. **2** | pNPTS138\_xanB digerido com *Hind*III e *Eco*RI. **3** | pNPTS138\_xanB digerido com *Eco*RI e *Nhe*I. **4** | pNPTS138\_xanB digerido com *Hind*III e *Nhe*I. **5** | pNPTS138\_xanB digerido com *Hind*III, *Eco*RI e *Nhe*I. Tamanhos de bandas do padrão estão indicados. Fonte: próprio autor.



**Figura 3.14** Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138\_xylA. DNA plasmidial do vetor de deleção do gene que codifica a XI foi submetido a diversas digestões com as endonucleases utilizadas em seu desenho e analisado em eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. **Painel A** | Representação gráfica de um segmento do vetor de deleção pNPTS138\_xylA. **Painel B** | Análise de restrição do vetor de deleção. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **1** | pNPTS138\_xylA digerido com *HindIII* e *BamHI*. **2** | pNPTS138\_xylA digerido com *BamHI* e *Sall*. **3** | pNPTS138\_xylA digerido com *HindIII* e *Sall*. **4** | pNPTS138\_xylA digerido com *HindIII*, *BamHI* e *Sall*. Tamanhos de bandas do padrão estão indicados. Fonte: próprio autor.

Assim, em termos de organização gênica, os vetores de deleção são semelhantes ao genoma de *Xcc*, exceto pela substituição dos genes-alvo pelo sítio de restrição de uma enzima: *EcoRI* para *xanB* e *BamHI* para *xylA2*.

### 3.4.2 Confirmação das deleções gênicas

Os vetores de deleção foram utilizados para transformação de células de *Xcc* eletrocompetentes por eletroporação, seguida de plaqueamento em ágar-LB contendo canamicina. Em seguida, colônias transformantes foram cultivadas por várias gerações na ausência de antibióticos para permitir os eventos de recombinação homóloga.

Após isso, esse cultivo foi estriado em placas contendo sacarose, o que permite a seleção de possíveis mutantes de deleção, pois o vetor pNPTS138 carrega um gene denominado *sacB*, o qual codifica para a enzima levansucrase, que converte a sacarose em um composto tóxico para a bactéria (BRAMUCCI; NAGARAJAN, 1996).

Colônias crescidas em meio de cultura contendo sacarose (o que indica cura plasmidial) foram avaliadas quanto à deleção gênica por meio de PCR de colônia, em reações utilizando os oligonucleotídeos KO\_PMI\_FW e KO\_PMI\_RV (para o gene *xanB*) e KO\_XI\_FW e KO\_XI\_RV (para o gene *xyIA*), os quais hibridizam nas regiões adjacentes às regiões flangeadoras dos genes-alvo.

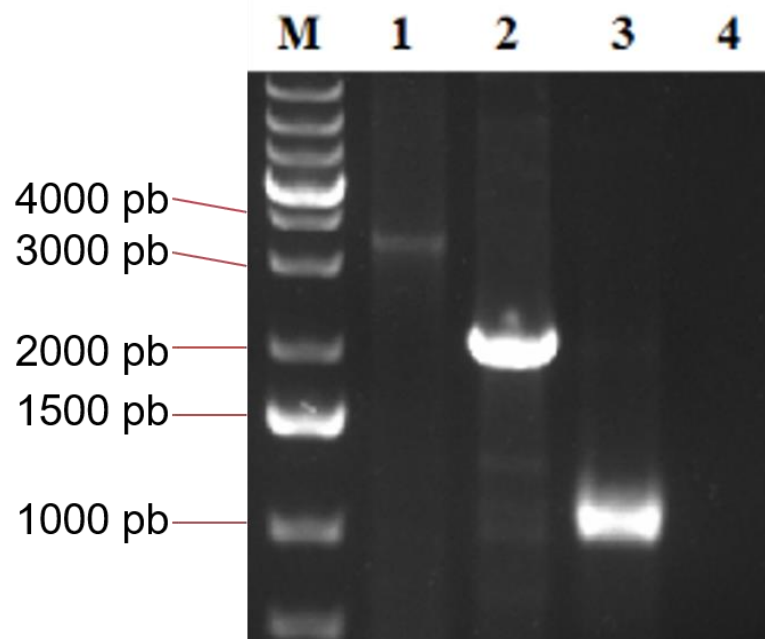
Desse modo, é possível distinguir colônias selvagens de mutantes de deleção pelo tamanho dos produtos de PCR: para o gene *xanB*, colônias selvagens resultam em produtos de PCR de 3,404 kb de tamanho (1 kb da região *upstream* + 1,404 kb da região codificante do gene *xanB* + 1 kb da região *downstream*); colônias mutantes resultam em produtos de PCR com 2 kb de tamanho (1 kb da região *upstream* + 1 kb da região *downstream*).

Já para o gene *xyIA2*, colônias selvagens resultam em produtos de PCR de 3,338 kb de tamanho (1 kb da região *upstream* + 1,338 kb da região codificante do gene *xyIA2* + 1 kb da região *downstream*); colônias mutantes resultam em produtos de PCR com 2 kb de tamanho (1 kb da região *upstream* + 1 kb da região *downstream*).

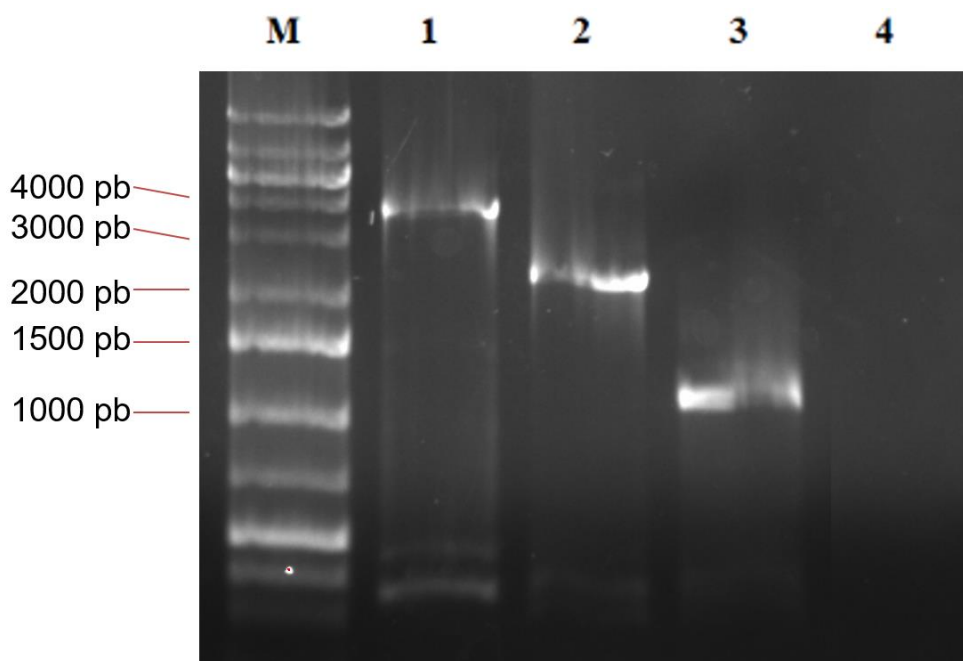
A análise dos produtos de PCR (Figuras 3.15 e 3.16) permite concluir que as deleções dos genes que codificam a PMI e a XI foram realizadas com sucesso, resultando nas linhagens denominadas Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ xyIA2.

Objetivando uma certificação adicional de que os produtos de PCR resultantes das reações utilizando DNA genômico de Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ xyIA2 como moldes se referem às regiões cromossômicas de interesse, tais produtos foram digeridos com as enzimas de restrição cujos sítios de restrição foram inseridos após dupla recombinação homóloga (*EcoRI* para o gene *xanB* e *BamHI* para o gene *xyIA2*).

Além disso, a ausência de produtos de PCR em reações cujos moldes foram os próprios vetores de deleção confirma que os oligonucleotídeos utilizados não hibridizam nestes vetores.



**Figura 3.15** Confirmação da deleção do gene *xanB* por PCR. Análise dos produtos de PCR resultantes das reações utilizando oligonucleotídeos que hibridizam em regiões externas às regiões *upstream* e *downstream* de 1 kb ao gene *xanB*, com DNA molde de colônias de Xcc selvagem, XccΔ*xanB* e o vetor de deleção pNPTS138\_ *xanB*. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **1** | Produto de PCR utilizando Xcc selvagem como molde. **2** | Produto de PCR utilizando XccΔ*xanB* como molde. **3** | Produto de PCR utilizando XccΔ*xanB* como molde, digerido com a endonuclease *EcoRI*. **4** | Produto de PCR utilizando o vetor pNPTS138\_ *xanB* como molde. As bandas relevantes do padrão de tamanho molecular estão indicadas. Fonte: próprio autor.



**Figura 3.16** Confirmação da deleção do gene *xylA2* por PCR. Análise dos produtos de PCR resultantes das reações utilizando oligonucleotídeos que hibridizam em regiões externas às regiões *upstream* e *downstream* de 1 kb ao gene *xylA2*, com DNA molde de colônias de Xcc selvagem, XccΔ*xylA2* e o vetor de deleção pNPTS138\_ *xylA*. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **1** | Produto de PCR utilizando Xcc selvagem como molde. **2** | Produto de PCR utilizando XccΔ*xylA2* como molde. **3** | Produto de PCR utilizando XccΔ*xylA2* como molde, digerido com a endonuclease *BamHI*. **4** | Produto de PCR utilizando o vetor pNPTS138\_ *xylA* como molde. As bandas relevantes do padrão de tamanho molecular estão indicadas. Fonte: próprio autor.

### 3.4.3 Xcc $\Delta$ xanB é incapaz de sintetizar a PMI

Como uma certificação adicional da deleção do gene *xanB*, o extrato total de proteínas de Xcc $\Delta$ xanB, após crescimento em meio indutor de patogenicidade XAM-M, foi avaliado quanto à presença da PMI por *Western blot*, utilizando como controles o extrato total de proteínas de Xcc, além da proteína recombinante XccPMI (Figura 3.17).



**Figura 3.17** Confirmação da depleção da síntese da PMI por *Western blot*. Os extratos proteicos totais das linhagens Xcc e Xcc $\Delta$ xanB cultivadas em meio XAM-M foram avaliados acerca da presença da proteína PMI por *Western blot*. No ensaio, a proteína recombinante XccPMI foi utilizada como controle positivo. Fonte: próprio autor.

A ausência de bandas na revelação do *Western blot* obtida para a linhagem Xcc $\Delta$ xanB corrobora a deleção do gene *xanB*. Para Xcc, foi possível observar que a proteína PMI é produzida em meio indutor de patogenicidade, XAM-M. A presença de banda fortemente marcada para a proteína recombinante assegura a funcionalidade do sistema de avaliação da expressão gênica baseado em *Western blot*.

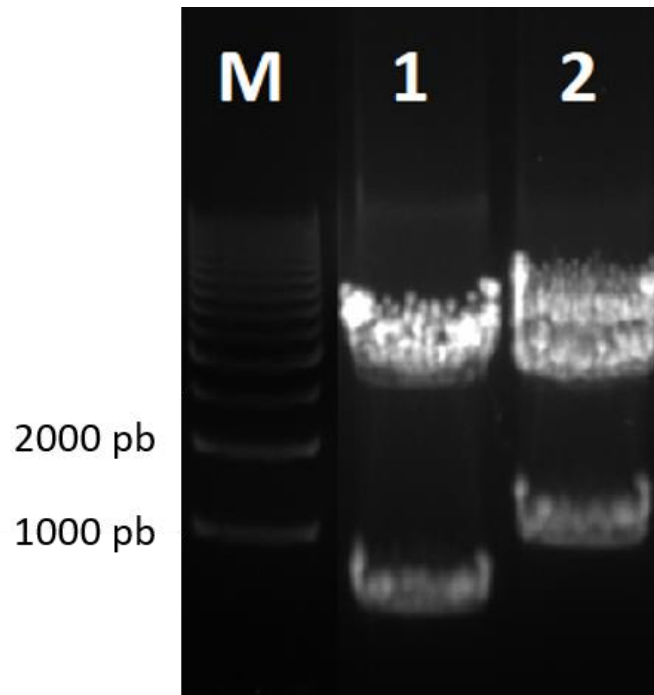
## 3.5 Complementação gênica utilizando o vetor pLAL6

### 3.5.1 Construção do vetor pLAL6\_CxanB

Os clones de propagação referentes às regiões promotora e codificante do gene *xanB* foram digeridos com suas endonucleases específicas, purificados do gel por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8% e quantificados por espectrometria a 260 nm.

Em seguida, os dois fragmentos foram clonados *in tandem* no vetor de complementação pLAL6 (LACERDA et al., 2017), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira (UNESP – Rio Claro), resultando no vetor de complementação denominado pLAL6\_xanB.

A análise de restrição do vetor pLAL6\_xanB mostra que o plasmídeo foi construído a contento (Figura 3.18).



**Figura 3.18** Análise de restrição do vetor de complementação pLAL6\_xanB. DNA plasmidial do vetor de complementação pLAL6\_CxanB foi digerido com endonucleases utilizadas em sua construção e analisado por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. **M** | Padrão de tamanho molecular EZ Load™ 1 kb Molecular Ruler (Bio-Rad). **1** | pLAL6\_xanB digerido com *EcoRI* e *XhoI*, excisando o fragmento referente à região predita como promotora do gene-alvo (390 pb). **2** | pLAL6\_xanB digerido com *EcoRI* e *XbaI*, excisando à construção integral, ou seja, região promotora *in tandem* com a região codificante do gene *xanB*, resultando em um fragmento de 1794 pb. Tamanhos de bandas do padrão estão indicados. Fonte: próprio autor.

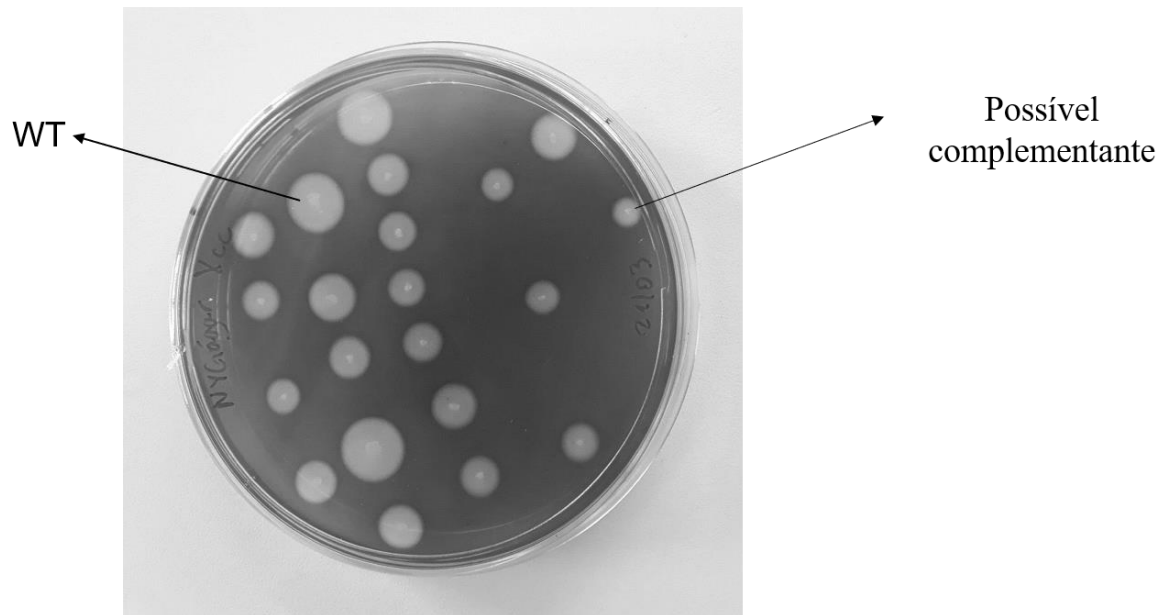
### 3.5.2 Screening de possíveis complementantes

Após a confirmação da sua construção, o vetor pLAL\_xanB foi quantificado e utilizado para transformação de células de *XccΔxanB* eletrocompetentes por eletroporação, seguida do plaqueamento em ágar-LB contendo gentamicina e amido 1% (m/v).

Uma vez que o vetor foi projetado para permitir a sua integração no gene que codifica a  $\alpha$ -amilase, o sucesso da transformação implicaria na incapacidade do transformante em degradar amido, cuja avaliação foi feita pelo contato de vapor de iodo com as placas de transformantes.

Como o iodo ( $I_2$ ) possui a capacidade de interagir com as cadeias de amilose do amido formando um complexo de coloração azul intensa (FUWA, 1954), foi possível constatar que as colônias transformantes obtidas não tinham o vetor pLAL6\_xanB integrado no gene que codifica a  $\alpha$ -amilase, pois foi observado um halo de degradação de amido ao redor de tais colônias (Figura 3.19).





**Figura 3.19** *Screening* das colônias transformantes quanto à capacidade de degradar amido. Células de *Xcc* $\Delta$ *xanB* eletrocompetentes foram eletrotransformadas com o vetor de complementação pLAL6\_C*xanB*, plaqueadas em ágar-LB contendo gentamicina, sendo repicadas individualmente em meio contendo gentamicina e amido 1% e, em seguida, realizada sublimação com iodo (I<sub>2</sub>). De acordo com o esperado, colônias de *Xcc* selvagem (WT) degradaram amido e apresentaram um halo resultante na ausência de iodo, ou seja, degradação de amido. Entretanto, as possíveis colônias complementantes também apresentaram o mesmo halo, indicando que a integração do vetor de complementação não ocorreu na região esperada do genoma e, conseqüentemente, a complementação não ocorreu como o planejado. Fonte: próprio autor.

É possível que a integração do vetor tenha ocorrido em outros locais do genoma bacteriano, uma vez que o pLAL6\_*xanB* apresenta, além da região codificante do gene *xanB*, a sua região promotora predita, a qual pode ter permitido uma recombinação homóloga com o cromossomo bacteriano, o que não foi testado.

Dessa forma, após dezenas de tentativas sem sucesso de transformação da linhagem mutante *Xcc* $\Delta$ *xanB* com o pLAL6\_*xanB*, tal vetor foi desconsiderado para a construção da linhagem complementante.

### 3.6 Complementação gênica utilizando o vetor pNPTS138

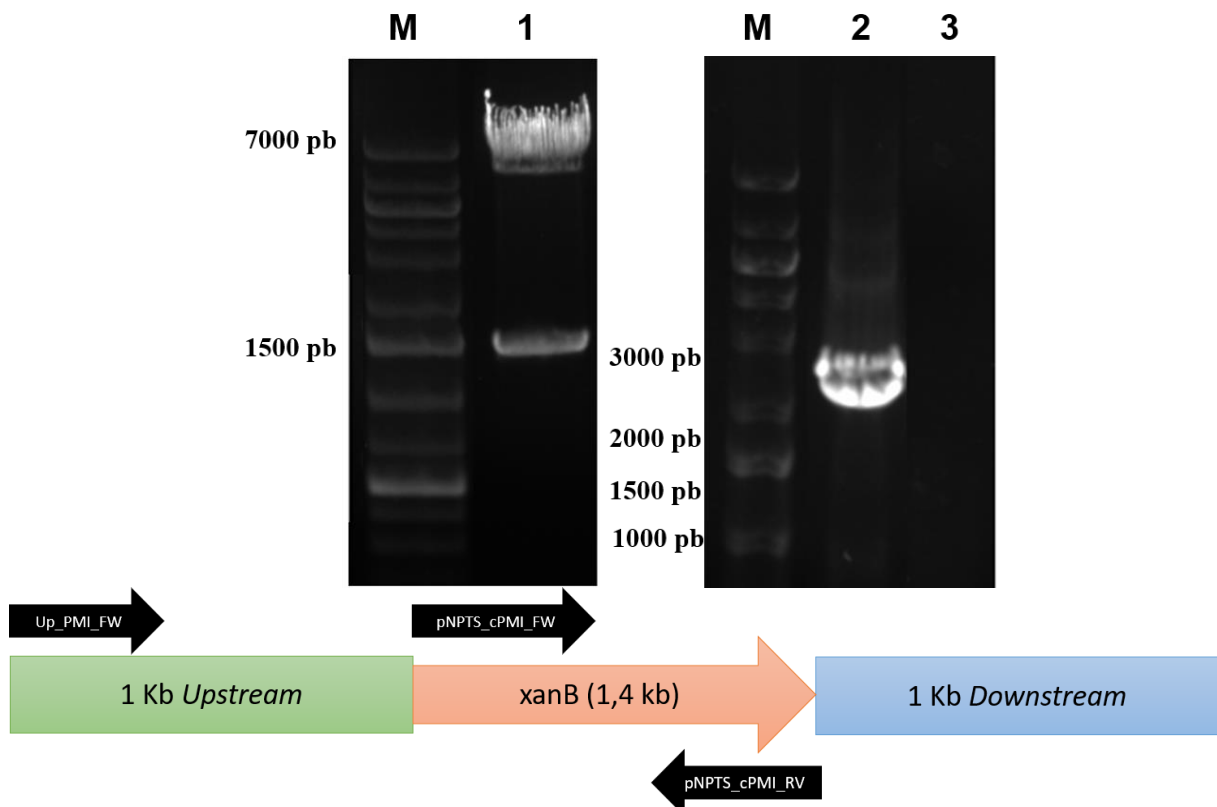
#### 3.6.1 Construção do vetor pNPTS\_C*xanB*

Para a construção do vetor de complementação do gene *xanB* (pNPTS138\_C*xanB*), a região codificante do gene *xanB* foi clonada no vetor de deleção pNPTS\_*xanB* no sítio de restrição para a enzima *EcoRI*. Dessa forma, a

região codificante foi inserida entre as regiões de 1 kb *upstream* e 1 kb *downstream* do vetor de deleção (Figura 3.20).

A clonagem da região codificante do gene *xanB* no vetor de deleção pNPTS\_*xanB* para construir o vetor de complementação pNPTS\_C*xanB* requereu uma confirmação da orientação de tal sequência no vetor, uma vez que o inserto apresentava o mesmo sítio de restrição em ambas as extremidades.

Para isso, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos Up\_PMI\_FW-pNPTS\_cPMI\_RV e Up\_PMI\_FW-pNPTS\_cPMI\_FW em PCR utilizando o vetor de complementação pNPTS\_C*xanB* como DNA molde, o que permitiu a confirmação da correta orientação da clonagem do gene *xanB* (Figura 3.20).

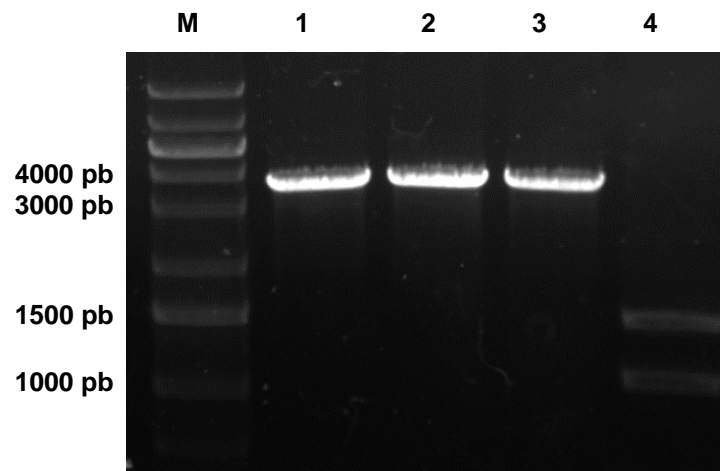


**Figura 3.20** Construção do vetor de complementação pNPTS\_C*xanB* e confirmação da orientação da clonagem do gene *xanB*. A confirmação da construção do vetor de complementação pNPTS\_C*xanB* foi realizada por digestão com endonuclease, seguida pela análise por eletroforese em gel de TAE agarose 0,8%. No painel superior: **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **1** | pNPTS\_C*xanB* digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. O padrão de digestão do vetor mostra que a montagem do vetor foi realizada com sucesso, uma vez que a região codificante apresenta 1404 pb, um tamanho compatível com o observado no gel. **2** | Produto de PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Up\_PMI\_FW-pNPTS\_cPMI\_RV e o vetor pNPTS\_C*xanB* como molde. **3** | Produto de PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Up\_PMI\_FW-pNPTS\_PMI\_FW e o vetor pNPTS\_C*xanB* como molde. A observação de uma banda na altura de 2,4 kb na coluna 2 e a inexistência de bandas na coluna 3 comprova que a orientação da clonagem da região codificante do gene *xanB* no vetor de complementação é a esperada. No painel inferior está representada a organização genômica da região do gene *xanB*, bem como os oligonucleotídeos utilizados na PCR de confirmação da orientação da clonagem. Fonte: próprio autor.

### 3.6.2 Confirmação da complementação gênica

A linhagem *Xcc*Δ*xanB* (mutante deletada no gene que codifica a PMI) foi transformada com o plasmídeo de complementação pNPTS\_C*xanB* por eletroporação e plaqueada em LB contendo canamicina. Após isso, foram seguidos os passos de seleção de duplos recombinantes entre o plasmídeo e o genoma, utilizando o mesmo método da deleção gênica.

Ao final, colônias foram testadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos KO\_PMI\_FW e KO-PMI\_RV, os quais hibridizam nas regiões adjacentes às regiões flanqueadoras do gene-alvo para a confirmação da complementação gênica (Figura 3.21), sendo a linhagem complementante denominada *Xcc*ΔC*xanB*.



**Figura 3.21** Confirmação da complementação gênica do mutante *Xcc*Δ*xanB*. Análise dos produtos de PCR resultantes das reações utilizando oligonucleotídeos que hibridizam em regiões externas às regiões *upstream* e *downstream* de 1 kb ao gene *xanB*, com DNA genômico de *Xcc* selvagem e *Xcc*ΔC*xanB* como molde. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **1** | Produto de PCR utilizando *Xcc* selvagem como molde. **2** | Produto de PCR utilizando *Xcc* selvagem como molde, digerido com a enzima *EcoRI*. **3** | Produto de PCR utilizando *Xcc*ΔC*xanB* como molde. **4** | Produto de PCR utilizando *Xcc*ΔC*xanB* como molde, digerido com a enzima *EcoRI*. A restrição por *EcoRI* do fragmento amplificado ocorreu para *Xcc*ΔC*xanB* e não para *Xcc*, conforme esperado, resultando em duas bandas (um fragmento de 1,4 kb e dois fragmentos de 1 kb), o que é compatível com o tamanho de *xanB* e das duas regiões flanqueadoras. As bandas relevantes do padrão de tamanho molecular estão indicadas. Fonte: próprio autor.

Esta estratégia permitiu a diferenciação das colônias selvagens das complementantes pois, apesar de os produtos de PCR de ambas as linhagens

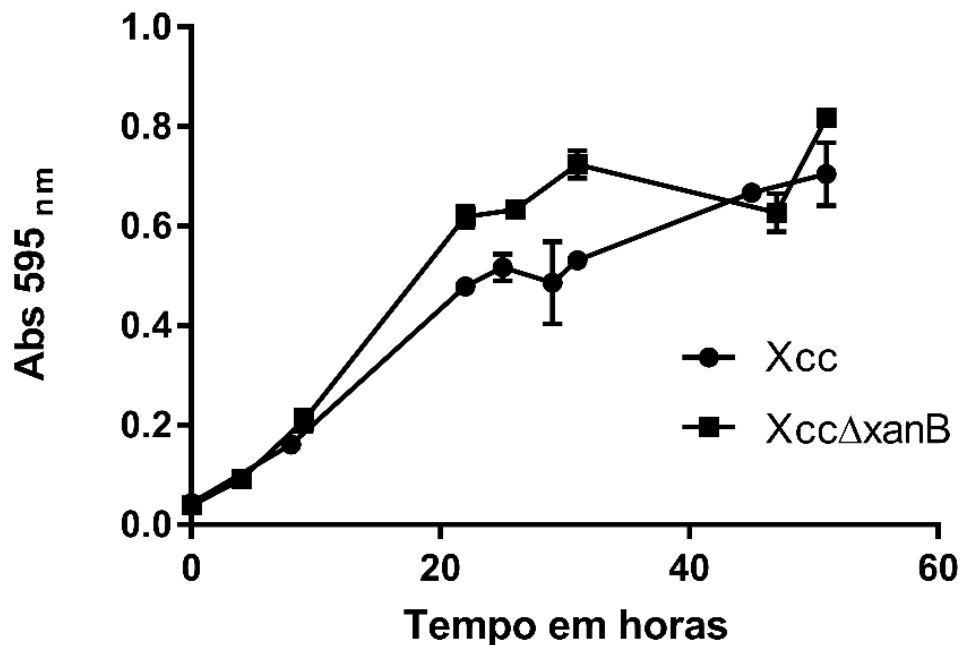
apresentarem 3,4 kb de tamanho, apenas o produto de PCR da linhagem complementante *Xcc*Δ*xanB* pode ser digerido com a enzima *EcoRI*, resultando em três fragmentos: a região codificante do gene *xanB*, cujo tamanho é 1,4 kb e as regiões flangeadoras ao gene-alvo, as quais apresentam 1 kb de tamanho cada.

Dessa forma, foi possível distinguir as colônias selvagens das colônias complementantes, confirmando a complementação gênica de uma linhagem de *Xcc* deletada utilizando o vetor pNPTS138, uma estratégia inédita na literatura para esta espécie.

### 3.7 Caracterização fenotípica das linhagens mutantes e complementante

#### 3.7.1 Deleção de *xanB* não afeta o perfil de crescimento

As linhagens *Xcc* e *Xcc*Δ*xanB* foram cultivadas em meio XAM-M e tiveram suas densidades ópticas em 595 nm mensuradas para a comparação dos perfis de crescimento (Figura 3.22).



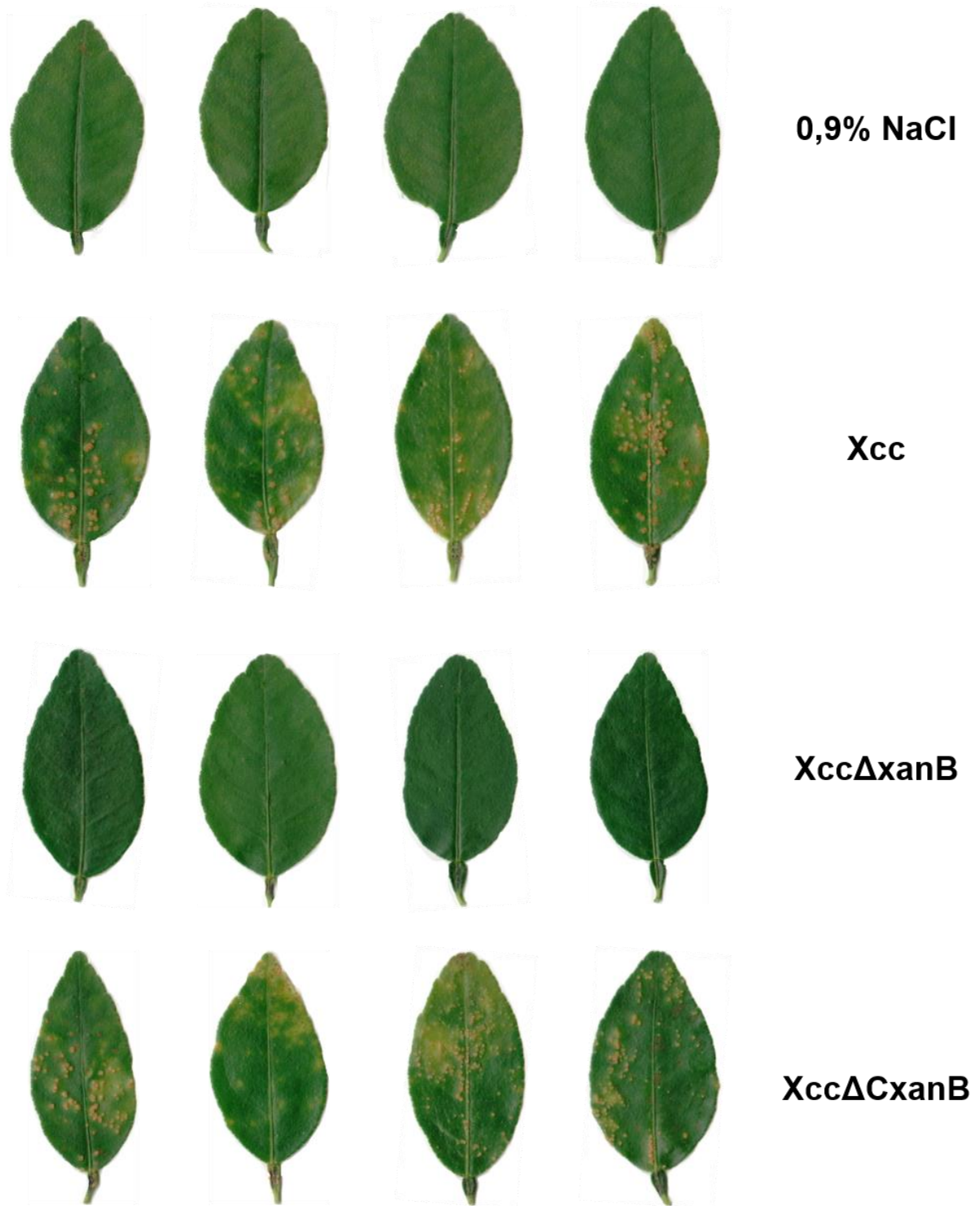
**Figura 3.22** Curva de crescimento das linhagens *Xcc* e *Xcc*Δ*xanB*. As linhagens *Xcc* e *Xcc*Δ*xanB* foram avaliadas e comparadas quanto aos perfis de suas curvas de crescimento em meio XAM-M, indutor de patogenicidade. Barras de erro indicam o desvio-padrão de triplicatas biológicas. Fonte: próprio autor.

A análise das curvas de crescimento de Xcc e Xcc $\Delta$ xanB permite concluir que a deleção do gene *xanB* não comprometeu a capacidade de crescimento da linhagem mutante e, além disso, que o padrão de crescimento foi semelhante entre as duas linhagens.

### **3.7.2 *xanB* é essencial para a patogenicidade de Xcc**

As linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ CxanB foram avaliadas quanto à patogenicidade e virulência em plantas de *Citrus aurantifolia* por meio de duas metodologias distintas – aspersão e infiltração. Para ambos os experimentos, as linhagens foram cultivadas em caldo LB e ressuspendidas em solução salina (0,9% de NaCl) de modo que a concentração final ficasse em 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>.

No ensaio de aspersão, 10 ml de cada suspensão bacteriana e de solução salina, para o controle positivo, foram pulverizados com o uso de um borrifador doméstico estéril em quadruplicata de plantas. As folhas foram registradas digitalmente após 28 dias da aspersão (Figura 3.23).



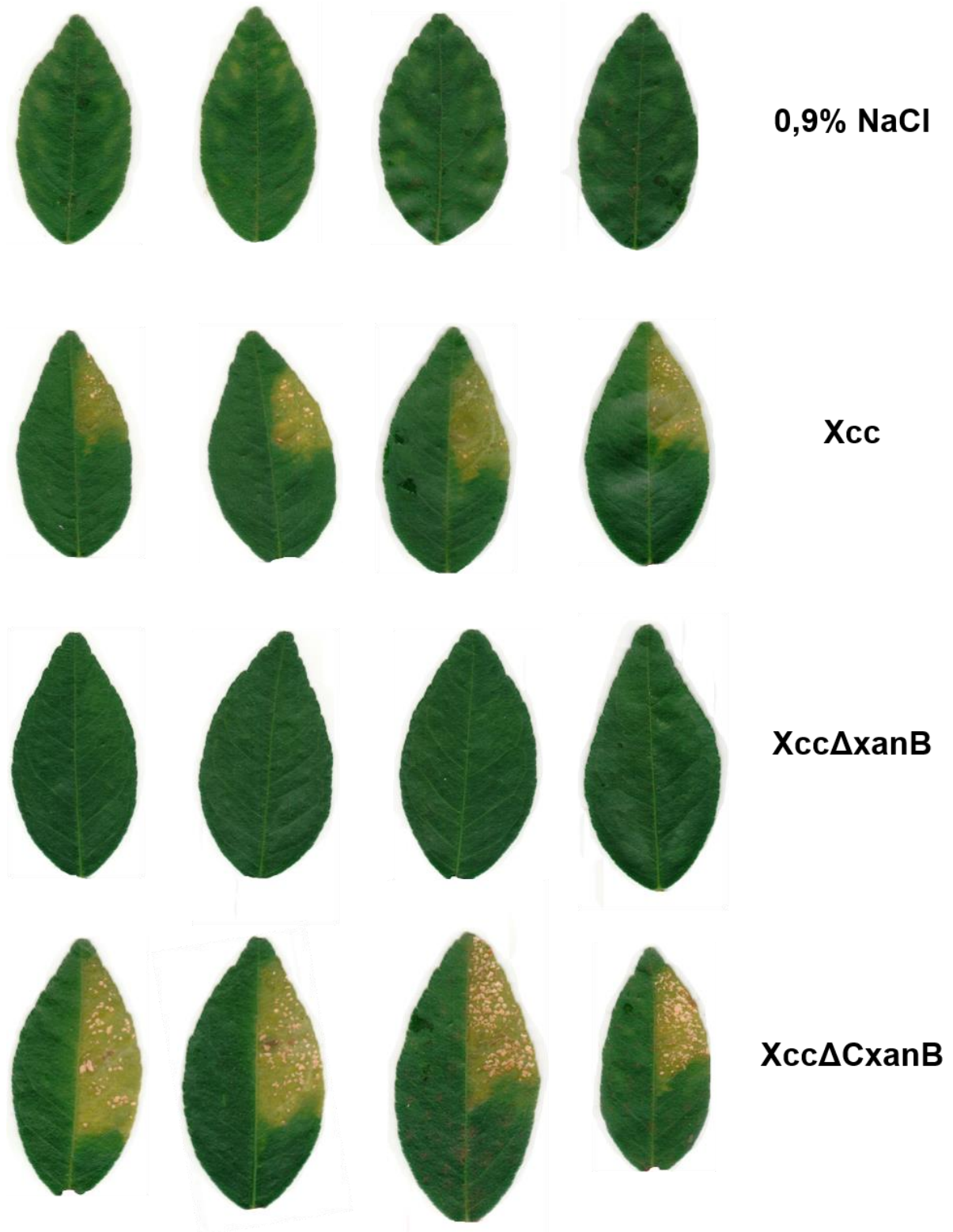
**Figura 3.23** Ensaio de patogenicidade *in vivo* por aspersão de Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB em *Citrus aurantifolia*. Plantas de *Citrus aurantifolia* foram utilizadas para avaliação comparativa da patogenicidade e virulência de Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB. Foram pulverizados 10 ml de cada cultivo bacteriano e o mesmo volume de solução salina (controle negativo) em quadruplicatas de plantas. Após serem destacadas das plantas, as folhas foram fotografadas no vigésimo oitavo dia após a aspersão. Fonte: próprio autor.

Para o ensaio de infiltração, as linhagens ou a solução salina (controle negativo) foram infiltradas na superfície abaxial de folhas de quatro plantas, de forma que todas as plantas receberam os quatro tratamentos diferentes, de forma a minimizar o efeito do hospedeiro sobre os resultados, quando da comparação entre os fenótipos apresentados. Após vinte dias das infiltrações, as folhas foram destacadas e registradas digitalmente para comparação da infecção (Figura 3.24).

Os ensaios de aspersão e infiltração apresentaram um padrão fenotípico em relação aos sintomas de cancro cítrico observados, a partir do qual foi possível constatar que a deleção do gene *xanB* fez com que a bactéria perdesse a patogenicidade. Além disso, a reversão do fenótipo observada nos ensaios com a linhagem complementante *XccΔC<sub>xanB</sub>* corrobora a hipótese de que o gene *xanB* é essencial para a patogenicidade de *Xcc*.

Comparando-se os fenótipos apresentados pelas linhagens selvagem (*Xcc*) e complementante (*XccΔC<sub>xanB</sub>*), observou-se semelhança nos graus de encharcamento e necrose do tecido vegetal, além da mesma frequência e intensidade das pústulas acastanhadas, sintomas característicos do cancro cítrico.

Embora sejam necessários estudos posteriores para a elucidação dos efeitos da deleção na expressão de fatores de virulência, a presente constatação de que o gene *xanB* é essencial para a patogenicidade de *Xcc* possibilita a futura prospecção de ferramentas biotecnológicas de controle e cura para doença, por meio da utilização de inibidores da PMI e, também, do desenvolvimento de cultivares cítricas que neutralizem a ação de tal proteína no processo infeccioso.



**Figura 3.24** Ensaio de patogenicidade *in vivo* por infiltração de Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB em *Citrus aurantifolia*. Plantas de *Citrus aurantifolia* foram utilizadas para avaliação comparativa da patogenicidade e virulência de Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB. Para cada uma das condições foram infiltradas quatro folhas de ramos independentes, atentando-se para que todas as plantas tivessem infiltradas com as três linhagens bacterianas e o controle negativo com solução salina (0,9% de NaCl). As fotografias foram obtidas no vigésimo dia após a infiltração. Fonte: próprio autor.



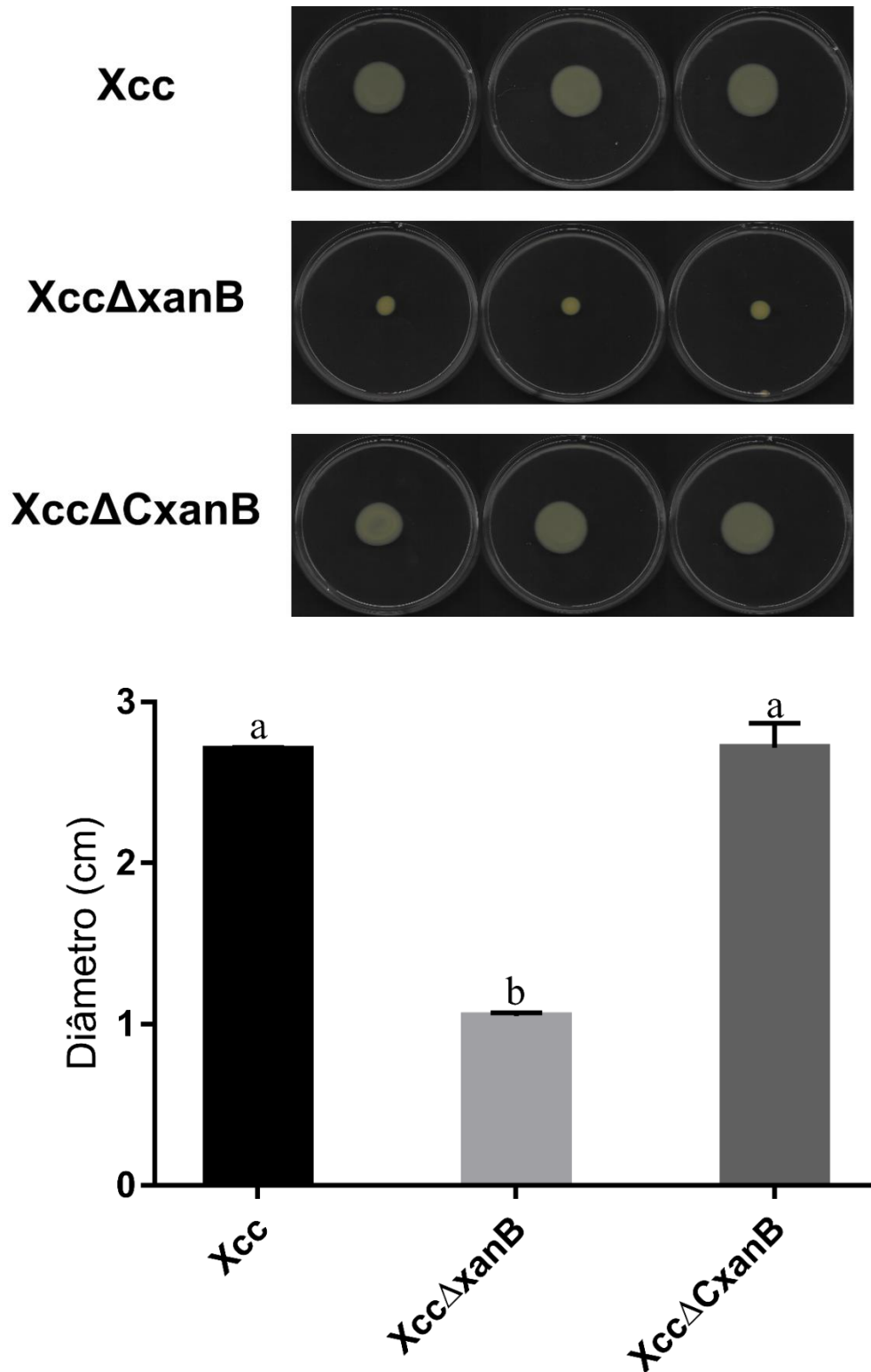
### 3.7.3 *xanB* está envolvido na motilidade, formação de biofilme e resistência à radiação UV

A capacidade de motilidade foi avaliada nas linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ CxanB (Figura 3.25), segundo metodologia padronizada por (MALAMUD et al., 2011). Resumidamente, as linhagens foram cultivadas até que atingissem a DO<sub>595 nm</sub> igual a 0,3 e 3  $\mu$ l destes cultivos foram pipetados no centro das placas de Petri com LB 0,7%.

O diâmetro das colônias de Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ CxanB foi de  $2,703 \pm 0,016$ ,  $1,05 \pm 0,02$  e  $2,716 \pm 0,093$  cm, respectivamente. Assim, em média a linhagem Xcc $\Delta$ xanB apresentou motilidade 61,15% e 61,34% inferior às linhagem selvagem Xcc e complementante Xcc $\Delta$ CxanB, respectivamente, indicando que o gene *xanB* está relacionado a esta importante característica do processo infeccioso.

Em *Stenotrophomonas maltophilia*, a mutação do gene *xanB* utilizando um *transposon* comprometeu a motilidade bacteriana, o que pode ser atribuído à constatação da ausência do flagelo polar nas células mutantes (HUANG; SOMERS; WONG, 2006).

A redução da motilidade pode ter contribuído para a perda de patogenicidade de Xcc $\Delta$ xanB (Figuras 3.23 e 3.24). Os fitopatógenos utilizam mecanismos de motilidade para atingirem superfícies ricas em nutrientes e os tecidos vegetais. Especificamente para Xcc, a motilidade está relacionada ao seu único flagelo polar, que a permite deslizar no ambiente epifítico e, também no apoplasto (GRAHAM et al., 2004; HARSHEY, 2003).



**Figura 3.25** Ensaio de motilidade. As linhagens Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB foram avaliadas quanto à motilidade segundo metodologia padronizada por Malamud e colaboradores (2011). As linhagens foram cultivadas até que atingissem  $DO_{595\text{ nm}}$  igual a 0,3. Três  $\mu\text{l}$  de cada cultivo foram pipetados no centro das placas de Petri de 5,1 cm de diâmetro com ágar-LB 0,7%. Após isso, as placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas sem agitação e registradas digitalmente (Painel superior). O diâmetro das colônias obtidas foi mensurado utilizando o *software* ImageJ e a média das medidas está apresentada no painel inferior. Barras de erro indicam o desvio-padrão absoluto de cada uma das triplicatas. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% por meio do *software* Minitab (15.2). Fonte: próprio autor.

O envolvimento da PMI na síntese de GDP-D-manose, um precursor nas vias de produção de lipopolissacarídeos (LPS), também pode contribuir no entendimento da diminuição da motilidade de Xcc $\Delta$ xanB. Em Xcc, a disrupção do gene *wxacO*, participante da síntese de LPS, afetou negativamente a motilidade do fitopatógeno (LI; WANG, 2011a).

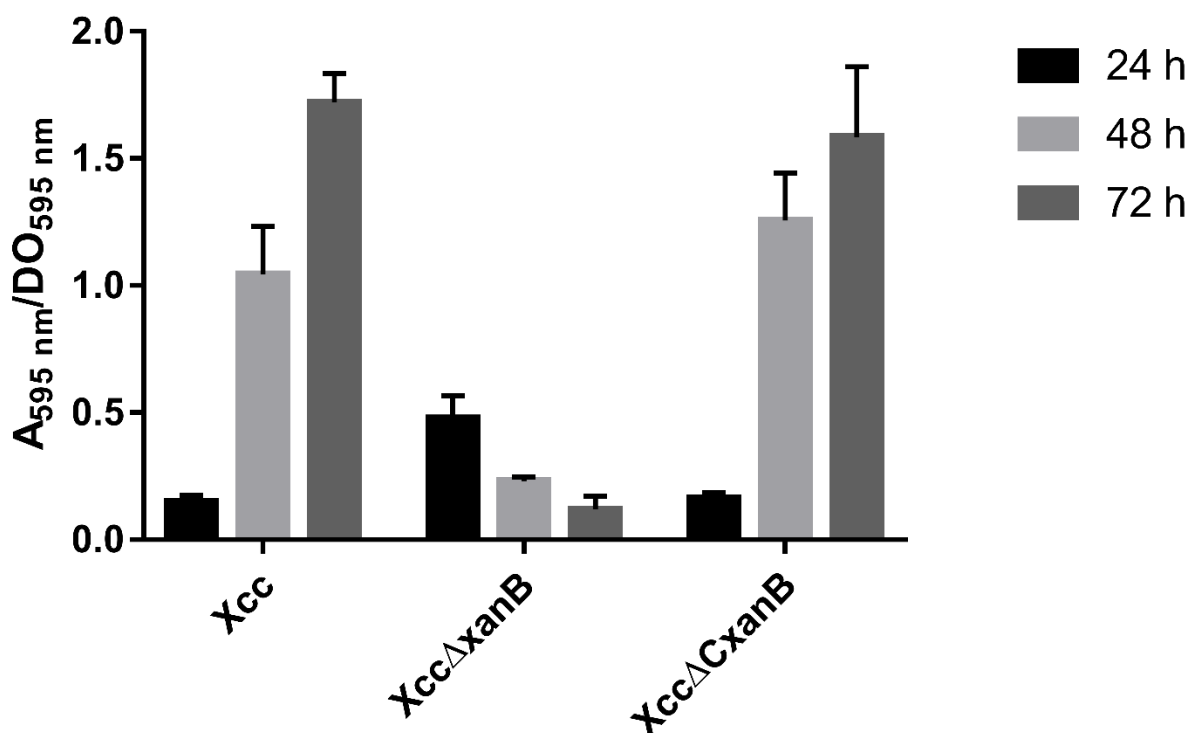
Assim, embora seja necessária a comprovação de que Xcc $\Delta$ xanB apresenta defectividade na produção de LPS e na formação do flagelo polar, é possível sugerir que a redução de motilidade tenha relação com esses dois componentes atuantes na patogênese do cancro cítrico.

A formação de biofilme é uma capacidade que boa parte das bactérias tem de formar agregados em matrizes que permitem adesão a superfícies, possibilitando um modo de vida dinâmico às populações bacterianas (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

As linhagens Xcc, Xcc $\Delta$ xanB e Xcc $\Delta$ CxanB foram avaliadas quanto à formação de biofilme ao longo de 24, 48 e 72 horas, segundo metodologia padronizada por O'Toole e Kolter (1998). Após 24 horas, a linhagem Xcc $\Delta$ xanB apresentou formação de biofilme consideravelmente superior às linhagens selvagem Xcc e complementante Xcc $\Delta$ CxanB. Em *Photobacterium luminescens*, a PMI foi relacionada somente ao estágio de maturação do biofilme, e não ao estágio inicial do seu desenvolvimento (AMOS et al., 2011).

Em 48 e 72 horas houve uma inversão significativa desse padrão, com a linhagem Xcc $\Delta$ xanB apresentando formação de biofilme 4,5 e 14,5 vezes menor (48 e 72 horas, respectivamente) em relação à linhagem selvagem Xcc (Figura 3.26).

Importante ressaltar que o comportamento da linhagem complementante Xcc $\Delta$ CxanB foi extremamente semelhante ao de Xcc, indicando que os efeitos depletivos da formação de biofilme em Xcc $\Delta$ xanB após 48 e 72 horas parecem ser, de fato, decorrentes da deleção do gene *xanB*.



**Figura 3.26** Ensaio de formação de biofilme. As linhagens Xcc, XccΔxanB e XccΔCxanB foram avaliadas quanto à formação de biofilme segundo metodologia padronizada por O’Toole e Kolter (1998). Os resultados estão apresentados como a média da razão entre a absorvância de cristal violeta em 595 nm e a densidade óptica de cada cultivo bacteriano imediatamente antes da mensuração da formação de biofilme ( $A_{595\text{ nm}}/DO_{595\text{ nm}}$ ). As medidas foram auferidas em 24, 48 e 72 horas. Barras de erro indicam o desvio-padrão absoluto de cada uma das sextuplicatas. Fonte: próprio autor.

Li e Wang (2011b) utilizaram uma abordagem de mutagênese em larga escala por meio de *transposons* e identificaram 92 genes de Xcc relacionados à formação de biofilme, dentre os quais está incluído *xanB*, o que reforça os dados aqui obtidos utilizando uma metodologia diferente para a mutação do gene-alvo.

O processo de formação e maturação dos biofilmes tem a participação de EPS e LPS, substâncias poliméricas que atuam na coesão das células e, também, na comunicação intercelular (DONLAN, 2002).

Especificamente para Xcc, estudos recentes têm demonstrado que a motilidade e a adesão são características necessárias aos estágios iniciais da formação de biofilme, enquanto maturação do biofilme depende de LPS e EPS, como a goma xantana (LI; WANG, 2011a, 2011b). Portanto, a participação do gene *xanB* nas vias de biossíntese de LPS e EPS também pode explicar, em parte, o fenótipo apresentado pela linhagem mutante deletada no referido gene.

Ademais, a formação de biofilme atua como uma estratégia para a sobrevivência epifítica de Xcc (RIGANO et al., 2007), e a redução na formação de

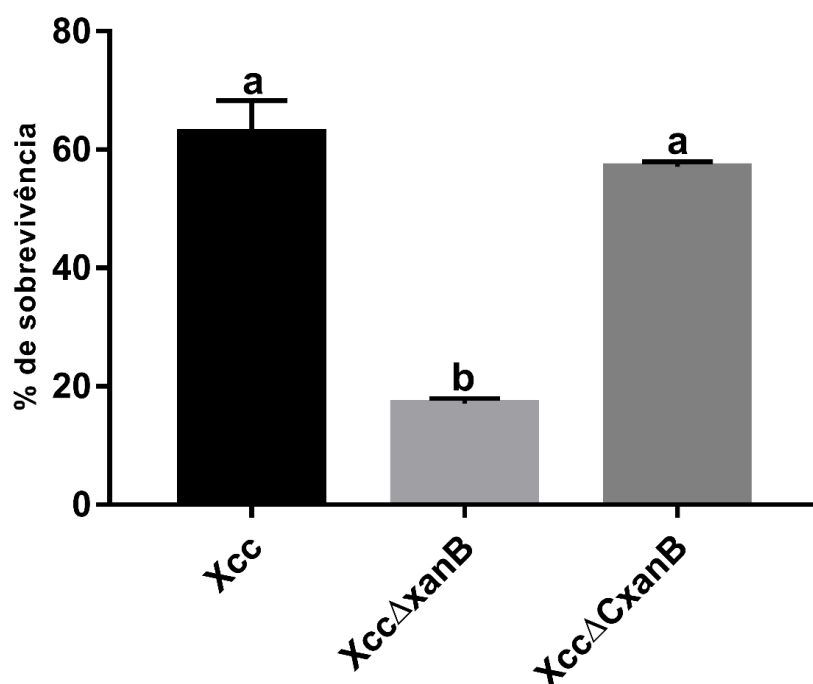
biofilme apresentada por *Xcc* $\Delta$ *xanB* pode explicar a perda de patogenicidade desta linhagem após a deleção do gene *xanB*.

Os biofilmes atuam efetivamente na proteção contra estresses ambientais, como a resistência à radiação ultravioleta, e também na defesa contra os mecanismos responsivos do hospedeiro (KARATAN; WATNICK, 2009).

Complementarmente, as linhagens *Xcc*, *Xcc* $\Delta$ *xanB* e *Xcc* $\Delta$ *CxanB* foram avaliadas quanto à resistência à radiação ultravioleta (UV). Para isso, as linhagens foram cultivadas até que atingissem a mesma densidade celular e foram expostas à luz ultravioleta por 15 minutos a 60 cm da fonte de luz. A porcentagem de sobrevivência de cada linhagem foi calculada em triplicata (Figura 3.27).

A linhagem *Xcc* $\Delta$ *xanB* apresentou uma sobrevivência três vezes menor do que a linhagem selvagem *Xcc*, um fenótipo que foi restaurado pela complementação gênica.

A maior suscetibilidade de *Xcc* $\Delta$ *xanB* à radiação ultravioleta pode ser explicada pela atuação da PMI na via de biossíntese de xantana, uma vez que esse EPS tem sido relacionado à resistência a diversos estresses ambientais, incluindo a exposição à radiação UV (MEYER; BOGDANOVE, 2009).



**Figura 3.27** Ensaio de resistência à radiação ultravioleta. As linhagens *Xcc*, *Xcc* $\Delta$ *xanB* e *Xcc* $\Delta$ *CxanB* foram avaliadas quanto à sobrevivência após exposição à radiação ultravioleta por 15 minutos a uma distância de 60 cm da fonte de luz. Os resultados estão apresentados em porcentagem de sobrevivência (% de sobrevivência), a qual foi calculada a partir dos controles de cada linhagem bacteriana não exposta à radiação ultravioleta. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% por meio do *software* Minitab (15.2). Fonte: próprio autor.

### 3.7.4 A deleção do gene *xyIA2* aumenta a virulência de *Xcc*

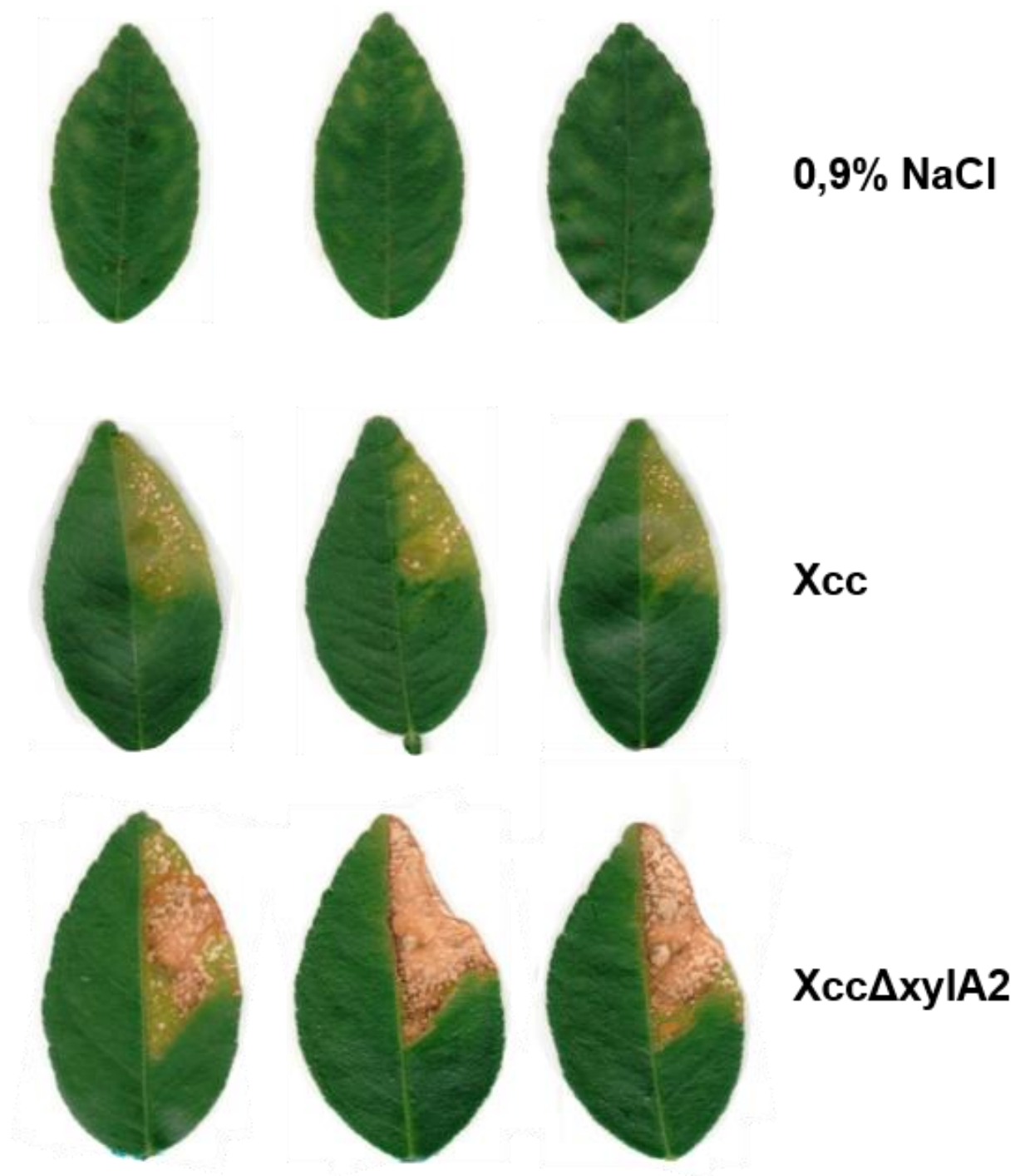
A linhagem mutante *XccΔxyIA2*, juntamente com *Xcc*, foi avaliada quanto à patogenicidade e virulência em *Citrus aurantifolia*. Resumidamente, as linhagens foram cultivadas em caldo LB e infiltradas na superfície abaxial das folhas na concentração de  $10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup>, utilizando quatro plantas, nas quais todos os tratamentos foram testados, a fim de minimizar a variação biológica da resposta de defesa do hospedeiro. Vinte dias após a infiltração, as folhas foram destacadas das plantas e registradas digitalmente para comparação da infecção (Figura 3.28).

Para permitir uma avaliação minuciosa e integral do envolvimento da xilose isomerase no processo infeccioso de *Xcc*, foram avaliadas outras duas linhagens mutantes adicionais, uma mutante deletada na ORF XAC1776 (*XccΔxyIA1*) e outra deletada nas duas ORF codificantes de xilose isomerase (*XccΔxyIA1xyIA2*), ou seja, um duplo mutante (PRIETO, 2019, dados não publicados).

O grau de intensidade dos sintomas apresentados pelas folhas infectadas pelas diferentes linhagens testadas foi visualmente diferente. Como esperado, a infiltração com solução salina (NaCl a 0,9%) não resultou no desenvolvimento de sintomas, mostrando que as plantas utilizadas não estavam infectadas anteriormente (Figura 3.28). Para a linhagem selvagem *Xcc* (Figura 3.28), os sintomas foram característicos do cancro cítrico, com alto grau de encharcamento e clorose, presença de pústulas (principalmente na superfície abaxial) e algumas áreas de tecido necrótico (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Nas folhas infiltradas com *XccΔxyIA1* (PRIETO, 2019, comunicação pessoal), houve um desenvolvimento acentuado dos sintomas, principalmente devido ao aparecimento de regiões mais necróticas quando comparadas ao tipo selvagem, sugerindo que essa deleção implica em aumento da virulência de *Xcc*.

Tanto o *XccΔxyIA2* (Figura 3.28) quanto o *XccΔxyIA1xyIA2* (duplo mutante, resultados não mostrados) apresentaram sintomas semelhantes, que foram consideravelmente mais intensos quando comparados à linhagem selvagem e também à *XccΔxyIA1*. Quando as folhas foram infiltradas com essas linhagens, as porções dos tecidos necróticos das plantas foram mais abundantes, indicando que o metabolismo da xilose está relacionado à virulência de *Xcc* e que há uma variação no envolvimento de cada gene que codifica a xilose isomerase nesse processo.



**Figura 3.28** Ensaio de patogenicidade *in vivo* por infiltração de Xcc e XccΔxylA2 em *Citrus aurantifolia*. Plantas de *Citrus aurantifolia* foram utilizadas para avaliação comparativa da patogenicidade e virulência de Xcc e XccΔxylA2. Para cada uma das condições foram infiltradas quatro folhas de ramos independentes, atentando-se para que todas as plantas tivessem folhas infiltradas com as duas linhagens bacterianas e o controle negativo com solução salina (0,9% de NaCl). As fotografias foram obtidas no vigésimo dia após a infiltração. Fonte: próprio autor.

O processo infeccioso de *Xanthomonas* spp. depende de uma conjuntura de condições que incluem adesão bacteriana (DUNGER et al., 2014), adaptação e sobrevivência ao estresse inerente à filosfera (DARSONVAL et al., 2008), colonização

do apoplasto (FATIMA; SENTHIL-KUMAR, 2015) e degradação da parede celular vegetal (CHOW et al., 2015).

Neste último processo, a bactéria utiliza enzimas de degradação da parede celular (*cell wall degradation enzymes*, CWDEs), as quais atuam na desconstrução dos componentes desta barreira física das células vegetais por meio de enzimas líticas (BÜTTNER; BONAS, 2010). Algumas dessas enzimas atuam na disrupção da estrutura do xilano, uma hemicelulose que compõe a maior parte da parede celular das plantas, usando principalmente sistemas xilanolíticos que incluem xilanases,  $\beta$ -xilosidases, arabinofuranosidases, carboidrato esterases e  $\alpha$ -glicuronidases (CHOW et al., 2015; DÉJEAN et al., 2013).

Na última década, o papel de enzimas envolvidas na degradação de xilano e na utilização de seus produtos tem sido extensamente avaliada em várias espécies do gênero *Xanthomonas*, levando a um entendimento de que tais sistemas enzimáticos estão relacionados à patogenicidade e virulência dessas bactérias (SANTOS et al., 2014).

Após a liberação dos monômeros de xilose pelos sistemas xilanolíticos, as enzimas xilose isomerase e xiluloquinase atuam na conversão de xilose em xilulose e desta em xilulose-5-fosfato, respectivamente, permitindo a integração desta via metabólica com a via das pentoses fosfato (DÉJEAN et al., 2013).

Neste trabalho, a caracterização funcional de um dos genes codificantes da xilose isomerase contribuiu para o estabelecimento da relação desta enzima na patogênese do cancro cítrico, sugerindo que a xilose pode atuar como um fator promotor da virulência de Xcc.

O genoma de Xcc possui duas ORFs preditas como codificantes de xilose isomerase, anotadas como XAC1776 (*xyIA1*) e XAC4225 (*xyIA2*). Embora as preditas sequências peptídicas resultantes de tais genes sejam 99% idênticas (alinhamento não mostrado), os contextos genômicos e regulatórios de *xyIA1* e *xyIA2* são efetivamente distintos (Figura 1.8). Enquanto *xyIA1* está contido em um *operon*, *xyIA2* apresenta-se como uma região codificante de um RNAm monocistrônico, porém com uma hipotética e regulatória região chamada *xyl-box*. Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DÉJEAN et al., 2013), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (IKAWA et al., 2018), *Caulobacter crescentus* CB15 (HOTTESS et al., 2004; STEPHENS et al., 2007) e *Lactobacillus pentosus* (LOKMAN et al., 1997), *xyl-box* é uma região regulatória à



qual se liga uma proteína repressora denominada XylR, codificada pela ORF XAC4226 em Xcc.

Em *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, a presença de xilose inativa a proteína XylR e desreprime a transcrição dos genes regulados por *xyl-box*, a maioria dos quais é codificante de enzimas envolvidas na degradação de xilano e na utilização de xilose. Também, para *X. oryzae* pv. *oryzae*, a interação entre XylR e xilose resultou em um acúmulo de HrpX, um regulador positivo da expressão de genes *hrp* (DÉJEAN et al., 2013; IKAWA et al., 2018) e de genes do Sistema de Secreção Tipo III (T3SS) em *X. fuscans* subsp. *fuscans* (DARSONVAL et al., 2008).

Então, o mecanismo regulatório de XylR pode fornecer uma explicação para os fenótipos apresentados pela linhagem mutante aqui obtida (XccΔxylA2) e, também, para as linhagens mutantes obtidas por Prieto (2019, dados não publicados). Uma vez que não há rotas metabólicas alternativas para a degradação de xilose em Xcc, a deleção dos genes codificantes da xilose isomerase poderia resultar em aumento da concentração de xilose no ambiente intracelular, permitindo a inativação de XylR, o que levaria a um consequente aumento da expressão de genes envolvidos na degradação de xilano e, também, de genes *hrp*, estes últimos induzidos pelo possível acúmulo de HrpX ocasionado por XylR quando associada à xilose.

O ensaio *in vivo* com *Citrus aurantifolia* revelou que a linhagem XccΔxylA1 é mais virulenta do que Xcc, mas ainda mais branda que XccΔxylA2 e XccΔxylA1xylA2 (linhagem duplo mutante). Neste caso, pode-se inferir que a deleção da ORF XAC1776 (*xylA1*) restringiu o uso de xilose pela xilose isomerase expressa a partir do gene *xylA2*, cuja regulação é dependente de XylR.

Para as infecções com XccΔxylA2 e XccΔxylA1xylA2, os sintomas apresentados foram similares entre as duas linhagens e notadamente mais intensos que XccΔxylA1 e Xcc, indicando que a possível regulação por XylR, que atua apenas em *xylA2*, parece ser determinante na conversão de xilose em xilulose pela xilose isomerase, considerando que seu papel em Xcc seja análogo ao de *X. campestris* e *X. oryzae*. Assim, embora seja necessária uma confirmação adicional de que XylA2 tenha um papel metabólico predominante sobre XylA1, o aumento da virulência causada pela deleção de *xylA2* (XccΔxylA2 e XccΔxylA1xylA2) sugere um papel diferencial dos dois genes codificantes da xilose na patogênese do cancro cítrico causado por Xcc.

Assim, é possível sugerir que a alta disponibilidade de xilose em *XccΔxylA2* e *XccΔxylA1xylA2* devido ao papel principal de XylA2 intensifica a desrepressão de XylR. Portanto, a modulação diferencial da virulência poderia ser explicada pelo aumento hipotético e gradual da disponibilidade de xilose nas linhagens mutantes, o que diminuiria o papel do XylR como repressor dos genes regulados por xyl-box e aumentaria sua atividade como ativador da expressão dos genes *hrp*.

## Capítulo 4 – Conclusões

- ✓ As ORFs XAC3580 e XAC4225 codificam para uma fosfomanose isomerase e uma xilose isomerase, respectivamente;
- ✓ O gene *xanB* é essencial para a patogenicidade *in vivo* de Xcc no hospedeiro *Citrus aurantifolia*, estando inclusive envolvido na formação de biofilme, motilidade e resistência à radiação ultravioleta, aspectos que podem explicar a sua relação com a patogenicidade.
- ✓ A deleção do gene *xyIA2* acentuou a virulência de Xcc, o que pode ser explicado pelo fato de xilose não atuar apenas como um substrato energético metabolizável por Xcc, mas também como uma molécula sinalizadora, cujo acúmulo poderia levar ao aumento da expressão de genes relacionados à patogenicidade, seja pela ligação desse açúcar a proteínas repressoras do operon *hrp*, ou pela regulação positiva da expressão de genes codificantes de proteínas do sistema xilanolítico.
- ✓ *xanB* codifica uma proteína candidata para o desenho de drogas destinadas ao controle do cancro cítrico, inclusive por estar possivelmente acessível na superfície bacteriana; por outro lado, *xyIA2* codifica uma proteína que não pode ser utilizada para tal finalidade.
- ✓ Embora a infecção causada por Xcc esteja relacionada a inúmeros genes e proteínas, inclusive do sistema de secreção tipo III e a mecanismos bastante complexos, a ausência de um único gene, no caso *xanB*, foi capaz de comprometer toda a capacidade infectiva de Xcc no hospedeiro cítrico, o que possivelmente pode indicar um envolvimento desse gene nas fases iniciais da infecção.

## Referências

- ALEXANDRINO, A. V.; GOTO, L. S.; NOVO-MANSUR, M. T. M. TreA codifies for a trehalase with involvement in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathogenicity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.
- AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.
- AMOS, M. R. et al. Influence of the *Photobacterium luminescens* phosphomannose isomerase gene, *manA*, on mannose utilization, exopolysaccharide structure, and biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 3, p. 776–785, 2011.
- ARNAU, J. et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein expression and purification**, v. 48, n. 1, p. 1–13, 2006.
- ARTIER, J. et al. Comparative proteomic analysis of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* periplasmic proteins reveals changes in cellular envelope metabolism during in vitro pathogenicity induction. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 1, p. 143–157, 2018.
- ASTUA-MONGE, G. et al. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1201–1205, 2005.
- AUSUBEL, F. M. **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology**. 5th ed. ed. New York: Wiley, 2002.
- BARBOSA-MENDES, J. M. et al. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 1, p. 109–115, 2009.
- BARCELOS, M. P. et al. Prediction of the Three-Dimensional Structure of Phosphate-6-mannose PMI Present in the Cell Membrane of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* of Interest for the Citrus Canker Control. In: **Emerging Research in Science and Engineering Based on Advanced Experimental and Computational Strategies**. [s.l.] Springer, 2020. p. 259–276.
- BEHLAU, F. et al. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 12, p. 4089–4096, 2011.
- BEHLAU, F. et al. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop protection**, v. 94, p. 185–191, 2017.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JUNIOR, J. Cancro cítrico: a doença e seu controle. **Fundecitrus, Araraquara, Brasil**, 2014.
- BEHLAU, F.; FONSECA, A. E.; BELASQUE JUNIOR, J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, v. 65, n. 8, p. 1390–1399, 2016.
- BELASQUE JUNIOR, J. et al. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, p. 314–317, 2010.
- BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 60, n. 2, p. 280–300, 1996.
- BIANCO, M. I. et al. Xanthan pyruvilation is essential for the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.

- 29, n. 9, p. 688–699, 2016.
- BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1575–1588, 2012.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, v. 23, n. 10, 1957.
- BOCK, C. H. et al. Factors affecting infection of citrus with *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. S14, 2006.
- BRAMUCCI, M. G.; NAGARAJAN, V. Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 11, p. 3948–3953, 1996.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, v. 4, n. 3, p. 141–157, 2003.
- BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial xylanase: a review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335–342, 2016.
- BUSSE-WICHER, M. et al. Evolution of xylan substitution patterns in gymnosperms and angiosperms: implications for xylan interaction with cellulose. **Plant physiology**, v. 171, n. 4, p. 2418–2431, 2016.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 107–133, 2010.
- CABREJOS, D. A. L. et al. Structural characterization of a pathogenicity-related superoxide dismutase codified by a probably essential gene in *Xanthomonas citri* subsp. citri. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0209988, 2019.
- CADMUS, M. C. et al. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 7, p. 942–948, 1976.
- CARMONA, J. A. et al. Rheology and structural recovery kinetics of an advanced performance xanthan gum with industrial application. **Applied Rheology**, v. 27, n. 2, p. 19–27, 2017.
- CARNIELLI, C. M. et al. Interaction network and mass spectrometry data of *Xanthomonas citri* subsp. citri surface proteins from differential proteomic analysis of infectious and non-infectious cells. **Data in brief**, v. 8, p. 1400–1411, 2016.
- CARNIELLI, C. M. et al. *Xanthomonas citri* subsp. citri surface proteome by 2D-DIGE: ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 251–263, 2017.
- CARVALHO, F. M. DE S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira** Universidade de São Paulo, , 2006.
- CHAWLA, R. **Practical clinical biochemistry: methods and interpretations**. [s.l.] JP Medical Ltd, 2014.
- CHOU, F.-L. et al. The *Xanthomonas campestris* gumD Gene Required for Synthesis of Xanthan Gum Is Involved in Normal Pigmentation and Virulence in Causing Black Rot. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 233, n. 1, p. 265–269, 1997.
- CHOW, V. et al. Xylan utilization regulon in *Xanthomonas citri* pv. citri strain 306: gene expression and utilization of oligoxylosides. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 6, p. 2163–2172, 2015.
- CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus [*Xanthomonas campestris*]. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 1984.
- DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459, 2002.
- DAHL, M. K.; SCHMIEDEL, D.; HILLEN, W. Glucose and glucose-6-phosphate

- interaction with Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 19, p. 5467–5472, 1995.
- DARSONVAL, A. et al. The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 9, p. 2669–2678, 2008.
- DAS, A. K. Citrus canker-A review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.
- DE OLIVEIRA, A. G. et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.
- DÉJEAN, G. et al. The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. **New Phytologist**, v. 198, n. 3, p. 899–915, 2013.
- DEWDNEY, M. M.; GRAHAM, J. H.; ROGERS, M. E. Citrus canker. **Florida Citrus Pest Management Guide**, v. 2014, p. 93–96, 2014.
- DHARMAPURI, S.; SONTI, R. V. A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. **FEMS microbiology letters**, v. 179, n. 1, p. 53–59, 1999.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- DOPSON, R. N. The eradication of citrus canker. **Pl. Dis. Rept**, v. 48, p. 30–31, 1964.
- DUNGER, G. et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of microbiology**, v. 188, n. 2, p. 127–135, 2007.
- DUNGER, G. et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 10, p. 1132–1147, 2014.
- FAO STAT. **Commodities by country**. Disponível em: <[http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities\\_by\\_country](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country)>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- FATIMA, U.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 750, 2015.
- FERENCE, C. M. et al. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 6, p. 1302–1318, 2018.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.
- FONSECA, N. P. et al. Detection and identification of *Xanthomonas* pathotypes associated with citrus diseases using comparative genomics and multiplex PCR. **PeerJ**, v. 7, p. e7676, 2019a.
- FONSECA, N. P. et al. Analyses of seven new genomes of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* strains, causative agents of citrus canker B and C, show a reduced repertoire of pathogenicity-related genes. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2361, 2019b.
- FUNDECITRUS. Levantamento da incidência das doenças dos citros: Greening, CVC e cancro cítrico. p. 57, 2018.
- FUWA, H. A New Method For Microdetermination Of Amylase Activity By The Use Of

- Amylose As The Substrate. **The journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954.
- GOTO, L. S. et al. Structural and functional characterization of the phosphoglucomutase from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, 2016.
- GOTTIG, N. et al. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 1, n. 13, p. 196–204, 2010.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 3, n. 1, p. 15, 2002.
- GRAHAM, J. H. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of Asiatic Citrus Canker (ACC), Processing of the International Citrus Canker Research Workshop, June 20-22, 2000, Ft. **Pierce, Florida**, p. 7, 2000.
- GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.
- GRAHAM, J.; MYERS, M. **Soil drenches of imidacloprid, thiamethoxam and acibenzolar-S-methyl for induction of SAR to control citrus canker in young citrus trees**. Phytopathology. **Anais...AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA**, 2009
- GRONDIN, J. M. et al. Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. **Journal of bacteriology**, v. 199, n. 15, p. e00860-16, 2017.
- HALL, D. G.; GOTTWALD, T. R.; BOCK, C. H. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. **Florida Entomologist**, v. 93, n. 4, p. 558–566, 2010.
- HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 249–273, 2003.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: **Xanthomonas**. [s.l.] Springer, 1993. p. 1–119.
- HEO, G.-Y. et al. Deletion of *xylR* gene enhances expression of xylose isomerase in *Streptomyces lividans* TK24. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 18, n. 5, p. 837–844, 2008.
- HOTTES, A. K. et al. Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1448–1461, 2004.
- HOY, M. A.; NGUYEN, R. U. Classical biological control of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): Theory, practice, art and science. 1997.
- HUANG, T.-P.; SOMERS, E. B.; WONG, A. C. L. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 8, p. 3116–3120, 2006.
- HUTCHISON, J. R. et al. Polysaccharide-based liquid storage and transport media for non-refrigerated preservation of bacterial pathogens. **PloS one**, v. 14, n. 9, 2019.
- IBGE. **Censo Agro 2017**. Disponível em: <<https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>>.
- IKAWA, Y. et al. Concomitant regulation by a LacI-type transcriptional repressor XylR on genes involved in xylan and xylose metabolism and the type III secretion system in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 31, n. 6, p. 605–613, 2018.
- JENSEN, S. O.; REEVES, P. R. Domain organisation in phosphomannose

- isomerases (types I and II). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1382, n. 1, p. 5–7, 1998.
- JIA, H. et al. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I Cs LOB 1 promoter using Cas9/sg RNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating Xcc $\Delta$ pthA4: dCs LOB 1.3 infection. **Plant biotechnology journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 2016.
- JIA, H. et al. Genome editing of the disease susceptibility gene Cs LOB 1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017.
- JUNIOR, S. **Expressão e purificação do domínio 3XMBT-GST para uso como ferramenta no enriquecimento e identificação de sítios de metil-lisina em Trypanosoma cruzi**. [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina). Universidade Federal do Paraná, 2017.
- KAPPAUN, K.; MARTINELLI, A. H. S.; RITT, A. B. B. Expressão de urease ubíqua de soja em Escherichia coli. **Salão de Iniciação Científica (20.: 2008 out. 20-24: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2008.**, 2008.
- KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.
- KATOCH, R. **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011.
- KATZEN, F. et al. Promoter analysis of the Xanthomonas campestris pv. campestris gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4313–4318, 1996.
- KATZEN, F. et al. Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1607–1617, 1998.
- KAY, S. et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. **Science**, v. 318, n. 5850, p. 648–651, 2007.
- KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. [s.l.] Rigel Porto Alegre, 1994.
- KOOL, M. M. et al. The influence of the primary and secondary xanthan structure on the enzymatic hydrolysis of the xanthan backbone. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 368–375, 2013.
- KÖPLIN, R. et al. Genetics of xanthan production in Xanthomonas campestris: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 1, p. 191–199, 1992.
- LACERDA, L. A. et al. Protein depletion using the arabinose promoter in Xanthomonas citri subsp. citri. **Plasmid**, v. 90, p. 44–52, 2017.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LAGAERT, S. et al.  $\beta$ -Xylosidases and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 316–332, 2014.
- LANZA, F. E. et al. Characteristics of citrus canker lesions associated with premature drop of sweet orange fruit. **Phytopathology**, v. 109, n. 1, p. 44–51, 2018.
- LEITE JR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by Xanthomonas campestris pv. citri in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v. 9, n. 1, p. 3–7, 1990.
- LI, J.; WANG, N. The wxacO gene of Xanthomonas citri ssp. citri encodes a protein

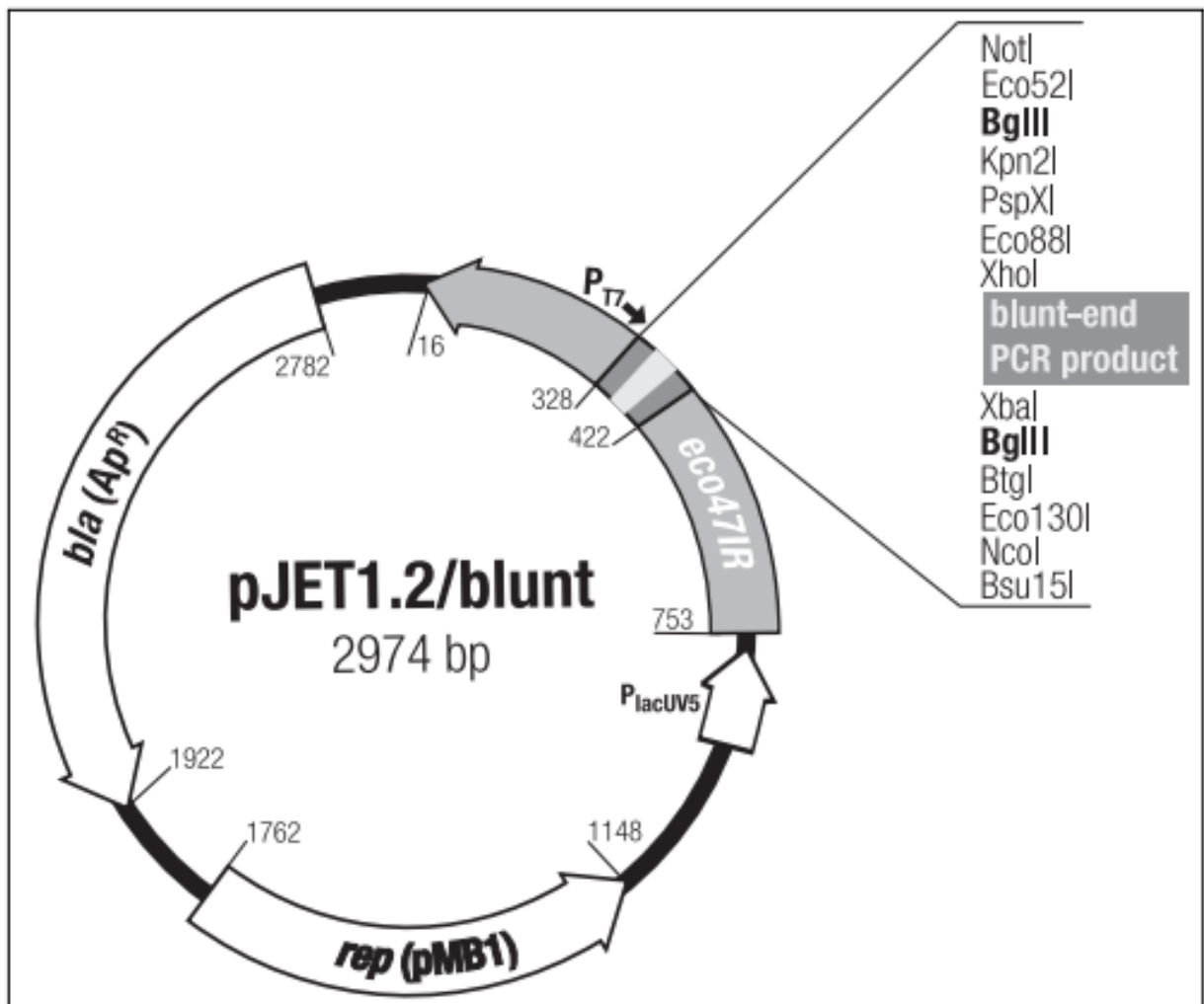


- with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 4, p. 381–396, 2011a.
- LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21804, 2011b.
- LOKMAN, B. C. et al. Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus* xylAB operon. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5391–5397, 1997.
- LOPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Water research**, v. 35, n. 7, p. 1828–1830, 2001.
- MALAMUD, F. et al. The *Xanthomonas axonopodis* pv. citri flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 819–829, 2011.
- MEYER, D. F.; BOGDANOVA, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular Biology**, v. 147, p. 161, 2009.
- MILES, J. S.; GUEST, J. R. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 32, n. 1–2, p. 41–48, 1984.
- MOREAU, C. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 156, 2019.
- MOREIRA, L. M. et al. Proteomics-based identification of differentially abundant proteins reveals adaptation mechanisms of *Xanthomonas citri* subsp. citri during *Citrus sinensis* infection. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 155, 2017.
- NAMEKATA, T.; ROSSI, A. C.; CERAVOLO, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja, Cordeirópolis**, v. 17, n. 1, p. 67–78, 1996.
- NAZARÉ, A. et al. Design of Antibacterial Agents: Alkyl Dihydroxybenzoates against *Xanthomonas citri* subsp. citri. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3050, 2018.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. Anuário da citricultura 2017. **São Paulo: CitrusBR**, 2017.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449–461, 1998.
- PAPOUTSOPOULOU, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A. Phosphomannose isomerase of *Xanthomonas campestris*: a zinc activated enzyme. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 177, n. 1–2, p. 183–191, 1997.
- PEDRAS, M. S. C.; MINIC, Z. Differential protein expression in response to the phytoalexin brassinin allows the identification of molecular targets in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 5, p. 483–493, 2012.
- PENG, A. et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *Cs LOB 1* promoter in citrus. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 2017.
- PEREIRA, A. L. A. et al. Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 157, 2014.
- ROE, J. H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 15–22, 1934.

- ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. [s.l.] Fealq/Fundecitrus, 2001.
- SANCHES, A. L. R. et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 3, p. 549–566, 2014.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANTOS, C. R. et al. Molecular mechanisms associated with xylan degradation by *Xanthomonas* plant pathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 32186–32200, 2014.
- SÃO PAULO. Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 147, de 31 de outubro de 2013. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 1º de novembro de 2013, Seção 1. p. 50. . 2013.
- SÃO PAULO. Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 13, de 03 de março de 2017. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 4 de março de 2017. Seção 1. p. 21. . 2017.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria**. [s.l.] American Phytopathological Society (APS Press), 2001.
- SCHMIDT, M. et al. The *Rhizobium meliloti* pmi gene encodes a new type of phosphomannose isomerase. **Gene**, v. 122, n. 1, p. 35–43, 1992.
- SCHUBERT, T. S. et al. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. **Plant disease**, v. 85, n. 4, p. 340–356, 2001.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.
- SIEVERT, C. et al. Experimental evolution reveals an effective avenue to release catabolite repression via mutations in XylR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 28, p. 7349–7354, 2017.
- SILVA, I. C. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 85–94, 2013.
- SMITH, D. J. et al. PMI40, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation. **Molecular and cellular biology**, v. 12, n. 7, p. 2924–2930, 1992.
- SOUSA, S. A. et al. The *Burkholderia cepacia* bceA gene encodes a protein with phosphomannose isomerase and GDP-D-mannose pyrophosphorylase activities. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 1, p. 200–206, 2007.
- STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual review of phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 399–420, 1991.
- STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. **Plant Disease**, v. 67, n. 5, p. 581–585, 1983.
- STANKOWSKI, J. D.; MUELLER, B. E.; ZELLER, S. G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate research**, v. 241, p. 321–326, 1993.
- STEPHENS, C. et al. Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 8828–8834, 2007.
- STEVIS, P. E.; HO, N. W. Y. Overproduction of D-xylose isomerase in *Escherichia coli* by cloning the D-xylose isomerase gene. **Enzyme and microbial technology**, v. 7, n. 12, p. 592–596, 1985.

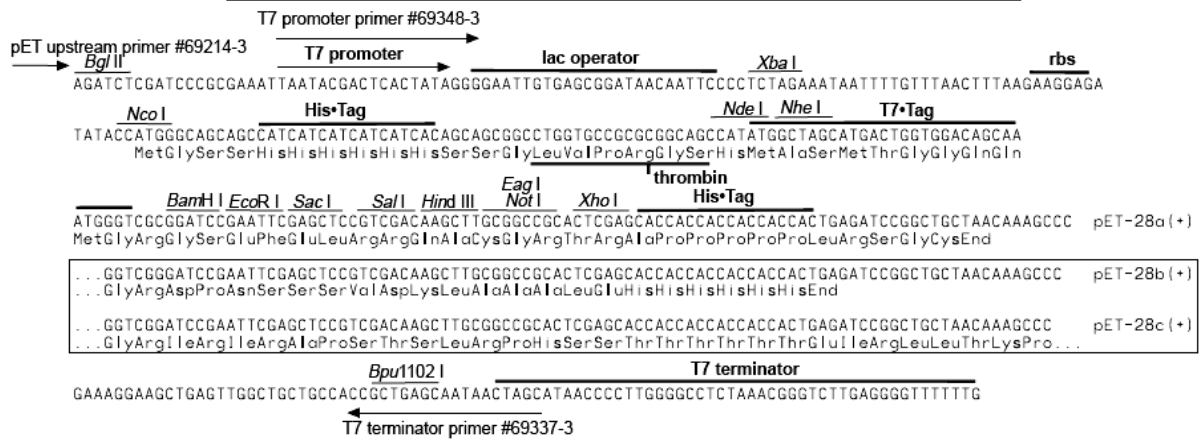
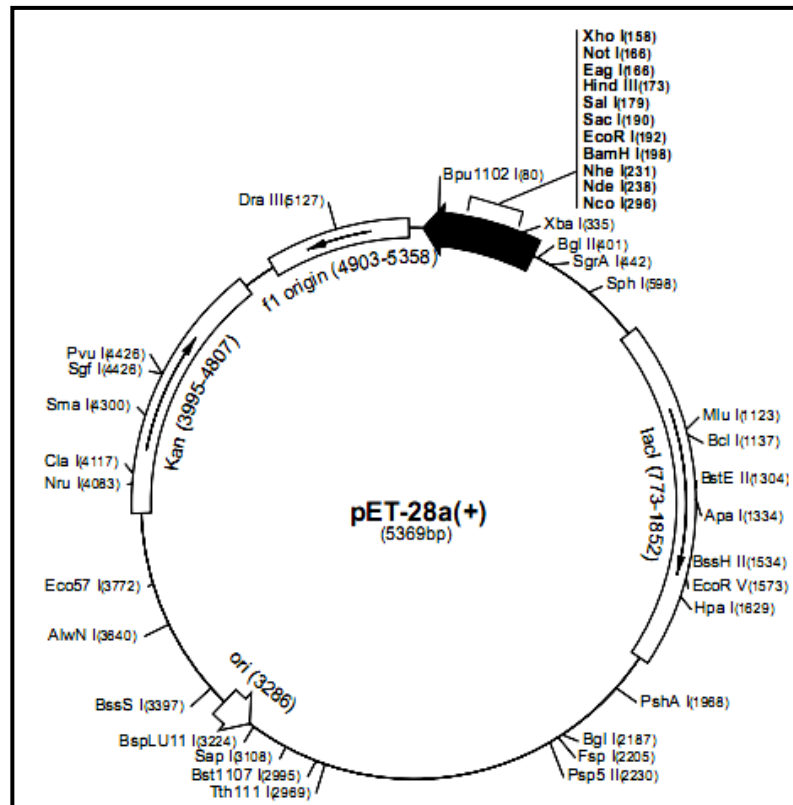
- SWARUP, S. et al. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 5, n. 3, p. 204–213, 1992.
- TEIXEIRA, E. C. et al. The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. **Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 402–412, 2008.
- TEIXEIRA, R. D. et al. A bipartite periplasmic receptor–diguanylate cyclase pair (XAC2383–XAC2382) in the bacterium *Xanthomonas citri*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10767–10781, 2018.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of clinical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 24–27, 1969.
- UCCI, A. P. et al. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 1, p. 29–41, 2014.
- VORHÖLTER, F.-J.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, n. 1, p. 79–95, 2001.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: Progress, problems, and perspectives. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, p. 679–696, 2013.
- WOOD, D. W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. **Current opinion in structural biology**, v. 26, p. 54–61, 2014.
- YANG, L. et al. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA*-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 1–2, p. 11–23, 2011.
- ZANDONADI, F. DA S. Análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp. que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros. 2012.
- ZHANG, Z.; CHEN, H. Fermentation performance and structure characteristics of xanthan produced by *Xanthomonas campestris* with a glucose/xylose mixture. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1653–1663, 2010.

## ANEXO I



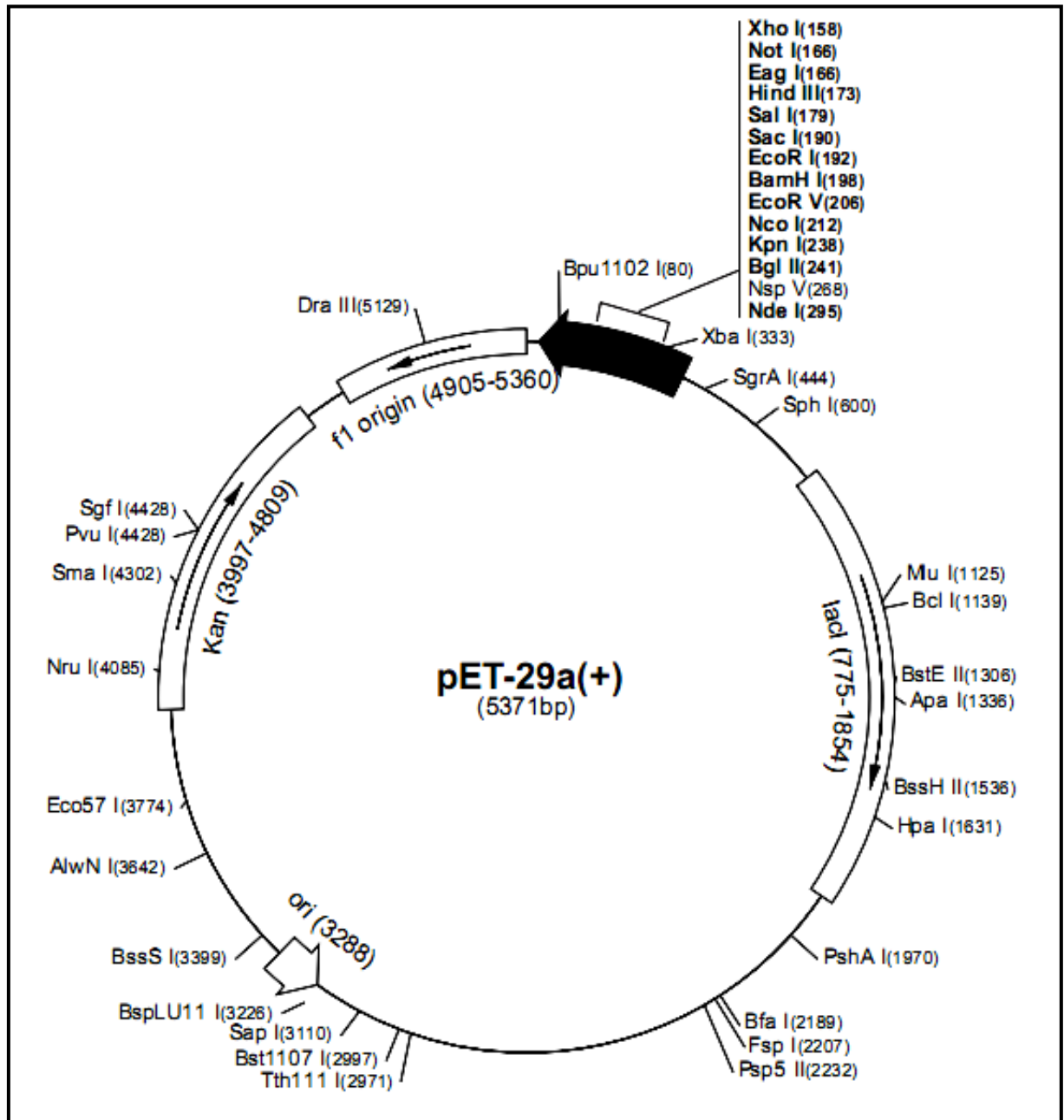
Mapa do vetor pJET 1.2 (Fermentas)

ANEXO II



Mapa do vetor pET28

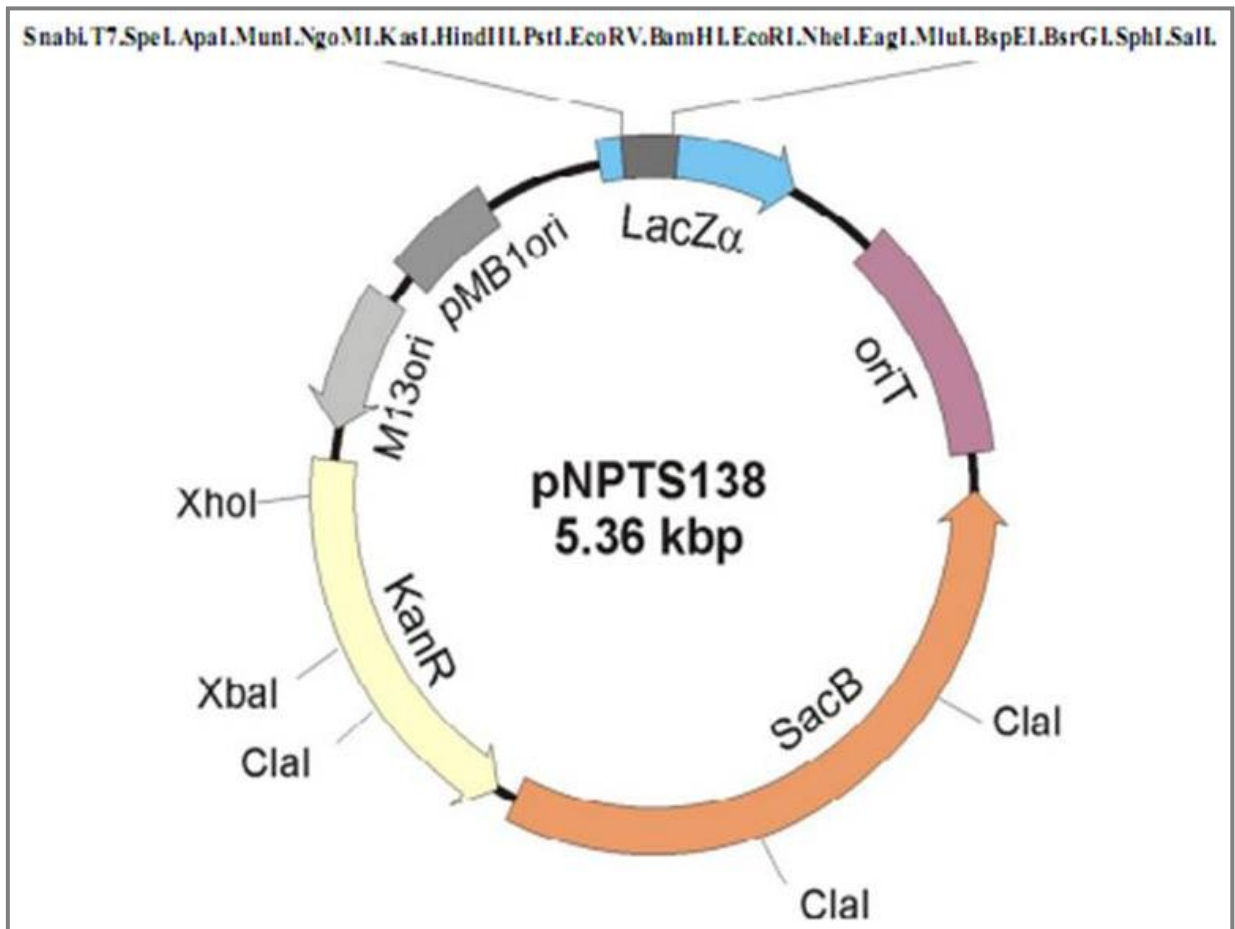
ANEXO III



Mapa do vetor pET29



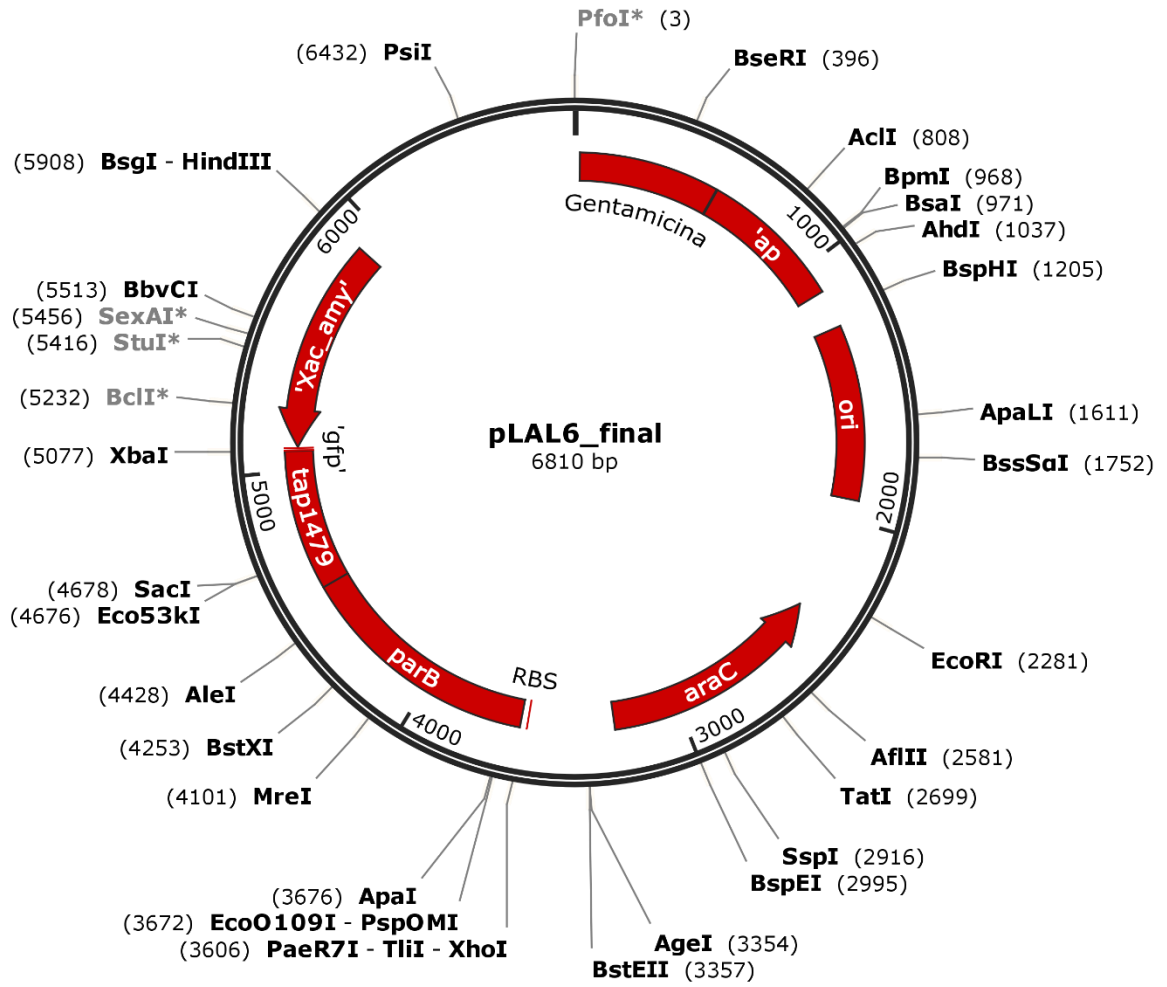
## ANEXO V



Mapa do vetor suicida pNPTS138 (Dickon Alley M. R. K., trabalho não publicado)



ANEXO VI



Mapa do vetor pLAL6 (FERREIRA, comunicação pessoal).