

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ BRAMBILA

**Predição de proteínas parceiras de interação da trealase,
enzima relacionada com a patogenicidade de
Xanthomonas citri subsp. *citri***

SÃO CARLOS - SP

2021

BEATRIZ BRAMBILA

**Predição de proteínas parceiras de interação da trealase,
enzima relacionada com a patogenicidade de
Xanthomonas citri subsp. *citri***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Teresa Marques
Novo Mansur

SÃO CARLOS - SP

2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Monica e Marcos, por todo o amor, exemplo e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão, Lucas, pela amizade e pelo incentivo nessa trajetória.

Ao meu namorado, Victor, pelo carinho e pelo companheirismo em todos os momentos.

A Professora Maria Teresa por toda sua paciência, incentivo e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e desenvolver esse projeto.

Aos meus colegas de laboratório, em especial a Regina e a Solange que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho, também ao André por ter me fornecido a enzima recombinante para o trabalho, assim como o Evandro, Jéssica, Vinícius, Naiane e Yuri, com os quais pude compartilhar cafés e ótimas lembranças.

Aos professores que gentilmente cederam seus laboratórios e equipamentos, especialmente os professores Dr. Flávio Henrique da Silva, Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza e Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira.

Aos meus colegas de graduação, em especial a Beatriz e a Gabriella, que tornaram a trajetória mais leve e prazerosa.

RESUMO

Conhecida como uma das principais fitopatologias que assolam a citricultura mundial, o cancro cítrico é causado, principalmente, pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) e é responsável por ocasionar a queda prematura e redução na qualidade dos frutos, afetando diretamente a produtividade e acarretando em um relevante impacto econômico. Por meio de análise proteômica anterior de nosso grupo de pesquisa foi possível identificar a enzima trealase periplasmática (codificada pelo gene XAC 0604) como uma proteína expressa em XAC quando cultivada em meio indutor de patogenicidade (XAM-M). Para fins de estudos funcionais, foi também obtida anteriormente em nosso grupo uma linhagem mutante deletada no gene que codifica a enzima trealase (XAC Δ 0604), assim como construído o vetor para a obtenção da proteína trealase recombinante por expressão heteróloga em *E. coli*. Considerando a escassez de trabalhos na literatura sobre a funcionalidade dessa enzima, especialmente em XAC, o presente trabalho teve como objetivo verificar se ocorre interação entre a trealase e outras proteínas celulares e se há alteração no perfil da interação quando se utiliza o lisado da linhagem mutante (XAC Δ 0604), comparativamente à linhagem selvagem (XAC). Assim, a trealase recombinante foi imobilizada em coluna para experimento de *pull-down* (*in vitro*), seguida da adição do lisado de células das linhagens selvagem (XAC306) ou mutante (XAC Δ 0604), cultivadas em duplicata (réplicas A e B) em meio indutor de patogenicidade (XAM-M). Após sucessivas lavagens o complexo foi eluído da coluna com imidazol 250 mM e 2 M. A análise dos perfis das proteínas constituintes do eluato foi realizada por meio de SDS-PAGE, sendo isoladas as bandas mais evidentes e as mesmas digeridas por tripsina para posterior análise por espectrometria de massas. Para a linhagem selvagem foram observadas bandas que co-eluíram com a banda de tamanho esperado para a trealase (~61kDa) para a réplica A, com valores de massa molecular aproximados de 51, 46, 27 e 19 kDa, enquanto que para a réplica B, as bandas que se destacaram foram as com valores de 51, 46 e 27 kDa. O eluato obtido com o lisado da linhagem mutante apresentou pelo SDS-PAGE bandas de 51 e 27 kDa, similares para ambos os cultivos A e B (réplicas), além da banda predita para a trealase. Dessa forma, as bandas de 51 e 27 kDa foram recorrentes entre as duas linhagens. A etapa de identificação por espectrometria de massas das proteínas presentes nas bandas isoladas foi impossibilitada devido à interrupção das atividades do LNBio-Campinas durante a pandemia da COVID-19, o que foi um contratempo importante para a finalização do presente trabalho. Assim, realizamos a predição de interação proteína-proteína pela ferramenta de bioinformática STRING, onde pôde-se antever que uma provável parceira de interação da trealase em XAC é a proteína trealose-6-fosfato fosfatase (OtsB), envolvida na biossíntese de trealose, a qual possui massa molecular de 27,0 kDa que corresponde à massa de uma das bandas recorrentes identificadas pelo *pull-down* tanto no selvagem como no mutante. Os resultados de *pull-down*, após posterior identificação das proteínas parceiras da trealase de XAC por espectrometria de massas, poderão complementar a análise proteômica diferencial realizada anteriormente em nosso grupo, entre o mutante de deleção de trealase e XAC, e poderá contribuir para uma maior compreensão da funcionalidade da trealase em XAC e da sua relação com a patogenicidade.

Palavras-chave: *Xanthomonas*; cancro cítrico; trealase; *pull-down*.

ABSTRACT

Known as one of the main phytopathologies that affect the citrus industry worldwide, citrus canker is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) and is responsible for causing premature drop and reduction in fruit quality, directly affecting productivity and causing a relevant economic impact. Through previous proteomic analysis of our research group, it was possible to identify the periplasmic trehalase enzyme (encoded by the XAC 0604 gene) as a protein expressed in XAC when cultivated in pathogenicity-inducing medium (XAM-M). For the purpose of functional studies, a mutant strain deleted in the gene encoding the trehalase enzyme (XAC Δ 0604) was previously obtained by our group, as well as the construction of the vector to obtain the recombinant trehalase protein by heterologous expression in *E. coli*. Considering the scarcity of works in the literature about the functionality of this enzyme, especially in XAC, the present work aimed to verify if there is an interaction between trehalase and other cellular proteins and if there is a change in the interaction profile when using the mutant strain lysate (XAC Δ 0604), compared to the wild strain (XAC). Thus, the recombinant trehalase was immobilized in a column for a pull-down experiment (*in vitro*), followed by the addition of cell lysate from wild (XAC306) or mutant (XAC Δ 0604) strains, cultivated in duplicate (A and B) in pathogenicity-inducing medium (XAM-M). After successive washing steps, the complex was eluted from the column with 250 mM and 2 M imidazole. Analysis of the profiles of the constituent proteins of the eluate was performed by SDS-PAGE, the most evident bands were isolated and digested using trypsin for further analysis by mass spectrometry. For the wild strain, bands that co-eluted with the expected size band for trehalase (~61kDa) for replica A were observed, with approximate molecular mass values of 51, 46, 27 and 19 kDa, while for the replica B, the bands that stood out were those with values of 51, 46 and 27 kDa. The eluate obtained with the mutant strain lysate showed bands of 51 and 27 kDa by SDS-PAGE, similar for both cultures A and B (replicas), in addition to the band predicted for trehalase. Thus, the 51 and 27 kDa bands were recurrent between the two strains. The identification step by mass spectrometry of the proteins present in the isolated bands was made impossible due to the interruption of LNBio-Campinas activities during the COVID-19 pandemic, which was an important setback for the completion of the present work. Thus, we performed the protein-protein interaction prediction by the STRING bioinformatics tool, where it could be foreseen that a likely interaction partner of trehalase in XAC is the protein trehalose-6-phosphate phosphatase (OtsB), involved in trehalose biosynthesis, which has a molecular mass of 27.0 kDa, which corresponds to the mass of one of the recurrent bands identified by the pull-down both in the wild and in the mutant. The pull-down results, after further identification of the XAC trehalase partner proteins by mass spectrometry, may complement the differential proteomics analysis previously performed in our group, between the trehalase deletion mutant and XAC, and may contribute to greater understanding the functionality of trehalase in XAC and its relationship to pathogenicity.

Keywords: *Xanthomonas*; citrus canker; trehalase; pull-down

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Ciclo do cancro cítrico. Condições favoráveis para a disseminação da doença e os sintomas nas diferentes partes da planta. 13
- Figura 2 - Esquema da principal rota de biossíntese da trealose (OtsA-OtsB). 17
- Figura 3 - Esquema da reação de hidrólise da trealose por ação da enzima trealase. A enzima catalisa a hidrólise da ligação α -O-glicosídica do dissacarídeo trealose liberando duas moléculas de D-glicose. 19
- Figura 4 - Ensaio *in vivo* em *Citrus aurantifolia*. Utilizou-se uma planta de *Citrus aurantifolia* para avaliação comparativa da patogenicidade de XAC e XAC Δ 0604. Para cada uma das condições foram infiltradas quatro folhas de um ramo independente. A | XAC selvagem. B | XAC Δ 0604. C | Água destilada estéril. As fotografias foram obtidas no quinto dia após as infiltrações. 19
- Figura 5 - Esquema da metodologia de *pull-down*. Os números de 1 a 6 representam as principais etapas do processo e as setas indicam as correntes de saída que são individualmente coletadas ou, no caso da fração solúvel obtida pela etapa 2, redirecionada para uma etapa posterior. Etapas: 1 | Centrifugação do cultivo celular. 2 | Lise das células por ultrassom e obtenção da fração solúvel. 3 | Adesão da enzima recombinante da trealase na coluna de níquel por meio de sua cauda de Histidina. 4 | Percolação da fração solúvel pela coluna contendo a enzima recombinante. 5 | Eluição da coluna com imidazol 200 mM em tampão. 6 | Eluição da coluna com imidazol 2 M. Correntes de saída: PC1 | Pós-coluna após percolação da enzima contida em tampão. L1 | Percolado após lavagem da coluna com tampão. L2a e L2b | Percolado de duas lavagens consecutivas com tampão contendo imidazol 10 mM. PC2 | Pós-coluna após percolação da fração solúvel. L3a, L3b e L3c | Percolado de três lavagens consecutivas com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 200 mM. LE | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM. E2 | Eluato com imidazol 2 M. 28
- Figura 6 - SDS-PAGE das amostras obtidas a partir de *pull-down* para os lisados A e B de XAC306 (selvagem). MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). PC1 | Pós-coluna da enzima recombinante. L1 | Lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8. L2 (a e b) | Lavagens da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. FS | Fração solúvel do lisado celular. PC2 | Pós-coluna da fração solúvel do lisado. L3 (a, b e c) | Lavagens consecutivas da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 250 mM. LE | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM. E2 | Eluato com imidazol 2M. É possível identificar a presença de quatro principais bandas de 51, 46, 27 e 19 kDa que co-eluíram com a banda de ~61kDa (tamanho esperado da trealase) para as eluições do cultivo A e três bandas 51, 46 e 27 kDa para o cultivo B, cada qual indicada por uma seta. 31
- Figura 7 - SDS-PAGE das amostras obtidas por *pull-down* para os lisados A e B de XAC306 (selvagem) em trabalho anterior realizado por Antão (2019). MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). PC1 | Pós-coluna da enzima recombinante. L1 | Lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8. L2 (a e b) | Lavagens da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. FS | Fração solúvel do lisado celular. PC2 | Pós-coluna da fração solúvel do

lisado. L3 (a, b e c) | Lavagens consecutivas da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 250 mM. E2 | Eluato com imidazol 2M. A seta vermelha indica a banda em comum de aproximadamente 27 kDa obtida pelo presente trabalho na eluição com imidazol 2 M para ambos os cultivos A e B, enquanto a segunda banda de 15 kDa (indicada pela seta preta) não foi recorrente.33

Figura 8 - SDS-PAGE das amostras obtidas a partir de *pull-down* para os lisados A e B do mutante de deleção XACΔ0604. SDS-PAGE das amostras obtidas a partir de *pull-down* para os lisados A e B do mutante de deleção XACΔ0604. MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). PC1 | Pós-coluna da enzima recombinante. L1 | Lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8. L2 (a e b) | Lavagens da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. FS | Fração solúvel do lisado celular. PC2 | Pós-coluna da fração solúvel do lisado. L3 (a, b e c) | Lavagens consecutivas da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 250 mM. LE | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM. E2 | Eluato com imidazol 2M. É possível identificar a presença de três principais bandas de 51 e 27 kDa que co-eluíram com a banda de ~61kDa (tamanho esperado da trealase) para as eluições dos cultivos A e B, cada qual indicada por uma seta.34

Figura 9 – SDS-PAGE para comparação entre os eluatos da linhagem selvagem (XAC306) e mutante (XACΔ0604). MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). E1.1 | Eluato com imidazol 250 mM no cultivo A. E1.2 | Eluato com imidazol 250 mM no cultivo B. E2.1 | Eluato com imidazol 2M no cultivo A. E2.2 | Eluato com imidazol 2M no cultivo B. As bandas que constituem possíveis proteínas parceiras da trealase estão indicadas pelas setas.35

Figura 10 - Géis de SDS-PAGE obtidos do *pull-down* para os cultivos A e B da linhagem selvagem com demarcação das bandas excisadas para digestão *in gel* para posterior análise por espectrometria de massas.37

Figura 11 - SDS-PAGE de eluatos obtidos do *pull-down* para cultivos A e B da linhagem mutante com demarcação das bandas excisadas para digestão *in gel* para posterior análise por espectrometria de massas.37

Figura 12 - Perfil de interação proteína-proteína da enzima trealase em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 fornecido pelo STRING com linhas conectoras baseadas em evidências de interação (*evidence*). É possível visualizar a conexão de 10 proteínas. As associações fornecidas pelas linhas conectoras entre as proteínas são derivadas de interações baseadas em: contexto genômico, que abrange vizinhança (verde), fusão de genes (vermelho, não presente nas interações obtidas) e coocorrência de genes (azul escuro), interações conhecidas por curadoria em banco de dados (azul esverdeado) ou determinadas experimentalmente (rosa), ou por outros tipos de contextos incluindo co-expressão (preto), *text-mining* (amarelo) e homologia de proteína (azul claro) (SZKLARCZYC *et al.* 2019).....40

Figura 13 - Perfil de interação proteína-proteína da enzima trealase no organismo *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 fornecido pelo STRING com linhas conectoras baseadas em complexos físicos (*physical network*).41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre a classificação das espécies, suas variantes (Cancroses A, B, C e D), hospedeiros e distribuição mundial.....	15
Tabela 2 – Reprodutibilidade das bandas entre as linhagens selvagem e mutante em suas respectivas réplicas de cultivo (A/B).	36
Tabela 3 – Dados das bandas isoladas para digestão <i>in gel</i> e espectrometria de massas. Os nomes representam a demarcação da banda no gel de seus respectivos cultivos e linhagens, e a descrição indica seu local de eluição no <i>pull-down</i> . A massa molecular aproximada é também indicada.	38
Tabela 4 – Parceiras funcionais preditas pelo STRING, seu score de interação e suas massas moleculares averiguadas através do UniProt. A pontuação ou <i>Score</i> gerada pelo STRING representa a confiança aproximada (em uma escala de 0 a 1) de ser uma associação verdadeira baseada em evidências aferidas em bancos de dados disponíveis (SZKLARCZYK <i>et al.</i> 2019).	41

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE	Gel de eletroforese em gel bidimensional
2D-PAGE/2D-DIGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina de soro bovino
CANECC	Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico
CN	Caldo nutriente
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
FUNDECITRUS	Fundo Paulista de Defesa da Citricultura
GST	Glutathione-S-transferase
His-tag	Etiqueta de poli-histidina
IAA	Iodocetamida
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
kDa	Quilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten.
LB	Meio Lúria-Bertani
LBBMA	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada.
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
NB	<i>Nutrient broth</i>
Ni-NTA -	Coluna de níquel imobilizado
rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ou Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SMR	Sistema de mitigação de risco
STRING	<i>Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
TPP	Trealose-6-fosfato fosfatase
TPS	Trealose-6-fosfato sintase
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima
XAC	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>

XAC Δ 0604	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> com deleção do gene que codifica para a trealase periplasmática
XAM-M	Meio de cultivo indutor de patogenicidade
Xau-B	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Tipo B (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>)
Xau-C	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Tipo C (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>)
Xcc Δ otsA	Linhagem mutante com deleção do gene <i>otsA</i> .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	O CANCRO CÍTRICO.....	12
1.1.1	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	13
1.2	A PROTEÔMICA E O CANCRO CÍTRICO.....	15
1.3	METABOLISMO DE TREALOSE	17
1.4	ANÁLISE FUNCIONAL DA TREALASE DE XAC.....	19
1.5	INTERAÇÕES PROTEICAS E SUAS FERRAMENTAS DE ANÁLISE.....	21
2	OBJETIVO	24
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	LINHAGENS BACTERIANAS.....	25
3.2	CULTIVO DAS LINHAGENS BACTERIANAS.....	25
3.3	PROTEÍNA TREALASE RECOMBINANTE.....	25
3.4	<i>PULL-DOWN</i> E SDS-PAGE DOS ELUATOS.....	26
3.5	DIGESTÃO <i>IN GEL</i> DAS PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	29
3.6	STRING	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	<i>PULL-DOWN</i>	31
4.1.1	Linhagem selvagem	31
4.1.2	Linhagem mutante.....	33
4.1.3	Comparação dos perfis de interação.....	35
4.2	DIGESTÃO <i>IN GEL</i> DAS PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	37
4.3	STRING.....	40
5	CONCLUSÃO	44
6	PERSPECTIVAS	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO I	50
	ANEXO II	51

1 INTRODUÇÃO

Dentre as adversidades que afligem o setor de produção agrícola mundial, o cancro cítrico é considerado uma das mais importantes fitopatologias responsável por acometer uma grande variedade de citros de interesse comercial, tais como laranjas, lima, limão, dentre outros (AMARAL, 2003), afetando diretamente a produtividade e acarretando em relevante impacto econômico. Com relação a sua origem geográfica, diversos estudos sugerem que áreas tropicais da Ásia, como sul da China, Indonésia e Índia tenham sido territórios primordiais do surgimento da doença, posteriormente disseminada para outros continentes (DAS, 2003).

O cancro cítrico é uma das doenças mais antigas que acometem a citricultura mundial (OLIVEIRA *et al.*, 2008), tendo como principal espécie causadora a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC). Os principais danos causados pelo patógeno nas plantas infectadas estão associados à desfolha e conseqüente comprometimento da área fotossintética da planta, como também lesões significativas nos frutos que podem provocar queda prematura dos mesmos, reduzindo a qualidade do produto e o potencial de comercialização da fruta (MANEIRA; DANELLA NETO, 2019).

Os primeiros indícios da doença em território brasileiro remetem ao ano de 1957 no município de Presidente Prudente no estado de São Paulo, tendo a introdução ocorrido por meio de material propagativo de citros contaminados vindos do Japão (BITANCOURT, 1957). Logo em seguida, o patógeno se disseminou para outras regiões, assim como para os estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (NAMEKATA *et al.*, 1996). Em 1975, foi criada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), pelo Ministério da Agricultura, e, em 1977, o Fundo Paulista de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), por iniciativa do setor produtivo e com o apoio da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo (OLIVEIRA *et al.*, 2008), sendo esses responsáveis por inúmeras iniciativas no combate e controle da doença em território nacional.

A maior concentração de laranjais do país encontra-se no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, no chamado cinturão citrícola, região altamente favorável ao cultivo e detentora de mão de obra qualificada. Entretanto, há uma ampla difusão da citricultura por outros estados brasileiros, o que auxiliou o país a tornar-se o maior exportador de suco de laranja do mundo. De janeiro a novembro de 2016 foram exportados US\$ 765,9 milhões em suco de laranja concentrado e congelado (477,4

mil toneladas), US\$ 437,66 milhões do suco não concentrado, pronto para beber (1,3 milhões de toneladas), e US\$ 524,17 milhões de outras bebidas derivadas do suco de laranja, como refrescos e águas saborizadas (338 mil toneladas) (FRANCO, 2016).

Dada a grande relevância econômica dessa fitopatologia, desde 1957 os governos federal e estadual possuem legislações específicas para o controle e medidas legais, implementadas com a finalidade de reduzir os impactos causados pela doença. Contudo, no estado de São Paulo o índice de talhões contaminados aumentou 893%, entre 2009 e 2012, logo após alterações na legislação paulista (SANCHES *et al.*, 2014).

Nos últimos anos observou-se um aumento significativo do cancro cítrico no estado de São Paulo e em outros estados, o que resultou em alterações na legislação federal que regula o controle da doença e permitindo que, pela primeira vez, o cancro cítrico fosse controlado através de medidas de manejo em substituição à erradicação de árvores em áreas com alta incidência da doença (BEHLAU, 2020). Dessa forma, em 2017 foi adotado o *status* de sistema de mitigação de risco (SMR) do cancro cítrico no estado, possibilitando a produção e comercialização de frutas livres de sintomas da doença. Entretanto, observa-se uma tendência de aumento no número de plantas infectadas, uma vez que o programa de erradicação tornou-se insustentável e foi paralisado (BEHLAU, 2019).

A constante incidência do cancro cítrico atrelada ao seu impacto negativo na produtividade e conseqüente prejuízo econômico ao setor agrícola evidenciam a importância de pesquisas realizadas na área, podendo estas contribuir com o desenvolvimento de novas políticas de defesa agropecuária. Não obstante, o presente trabalho busca agregar novos conhecimentos a fim de complementar o acervo científico dedicado ao combate dessa doença e seus males.

1.1 O CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é uma doença bacteriana que acomete diversas espécies importantes para a citricultura mundial, causando prejuízos econômicos significativos e preocupantes, principalmente por se tratar de uma patologia de difícil manejo, ter um alto custo de controle e não possuir cura (AMARAL, 2003).

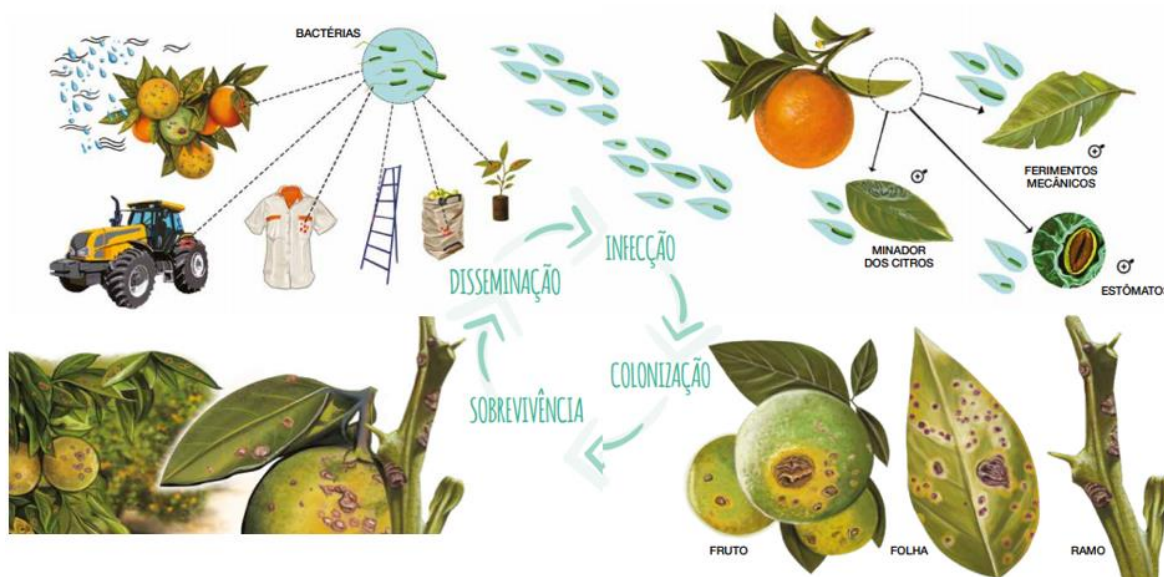
A disseminação do patógeno é auxiliada pela incidência de chuvas associadas com a ação de ventos, que resulta na formação de um aerossol de gotículas d'água que transportam as células bacterianas em seu interior. Entretanto, o homem é considerado o principal agente de disseminação, uma vez que pode transportar as bactérias em suas roupas, por meio do deslocamento de mudas, equipamentos contaminados e restos de cultura (EFROM; SOUZA, 2018). As condições favoráveis para a disseminação e o ciclo da doença estão ilustradas pela Figura 1.

Quando em contato com a planta, a bactéria penetra nos tecidos vegetais através de aberturas naturais como os estômatos, ou então por meio de ferimentos causados por equipamentos agrícolas, atritos entre partes da própria planta e pela atividade de insetos, como o minador dos citros e outros mastigadores. A existência de lesões pré-existentes no vegetal favorece significativamente a infecção pelo patógeno, assim como a presença de água na superfície do tecido também é um fator agravante (BEHLAU, 2019).

A infecção bacteriana acomete toda a parte aérea da planta, causando lesões e erupções características na superfícies dos frutos, o que inviabiliza a manipulação e comercialização do fruto contaminado (AMARAL, 2003). O maior impacto econômico é, contudo, proveniente da queda prematura dos frutos (SCHUBET, 2001) decorrente de um aumento na produção do fito-hormônio etileno como uma tentativa de resposta à infecção (CROZIER, 2001).

Os sintomas de cancro cítrico manifestam-se também em folhas e ramos sendo que, de modo geral, as lesões da doença são semelhantes nas diferentes partes da planta. Os sintomas tornam-se visíveis em folhas de duas a cinco semanas após a infecção pela bactéria enquanto que nos ramos as lesões surgem quando ainda estão jovens e tenros. É importante salientar que o cancro cítrico não provoca a morte das árvores doentes (BEHLAU, 2019).

Figura 1 - Ciclo do cancro cítrico. Condições favoráveis para a disseminação da doença e os sintomas nas diferentes partes da planta.



Fonte: BEHLAU, 2019.

O controle da doença pode se dar a partir de medidas como a seleção de mudas saudáveis e certificadas para a formação dos pomares, plantio de variedades mais resistentes ou menos suscetíveis ao desenvolvimento da doença, uso de quebra-ventos como medida protetiva, aplicação de cobre a fim de reduzir a quantidade de sintomas assim como a queda dos frutos nas plantas contaminadas, e também pelo controle da incidência de insetos como os mineradores de citros (MANEIRA; DANELLA NETO, 2019).

Visto a dificuldade de se interferir no ciclo propagativo da doença, as estratégias básicas de manejo para o cancro cítrico consistem em métodos baseados no princípio de evitar, excluir, proteger tecidos suscetíveis à infecção ou erradicar a existência do patógeno (CIVEROLO, 1982). Ou seja, minimizar a disseminação reduzindo a quantidade de possíveis fontes de infecção.

1.1.1 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

No meio ambiente, as bactérias do gênero *Xanthomonas* encontram-se sempre associadas a uma planta hospedeira, sendo quase todas de crescimento endófito. Em relação a outras variedades de bactérias fitopatogênicas, *Xanthomonas* possuem uma grande diversidade em relação a sua gama de hospedeiros, incluindo ao menos 68 famílias e mais de 240 gêneros de plantas. Entretanto, cada cepa é estritamente

limitada ao seu hospedeiro em específico, o que torna esse grupo de fitobactérias ideal para o estudo de especificidades na relação entre planta e patógeno (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

O agente causal do cancro cítrico é uma bactéria gram-negativa, aeróbia restrita, baciliforme e que pode ser facilmente isolada e cultivada em meios de cultura laboratorial. O crescimento bacteriano ocorre em uma faixa ótima de temperatura entre 28°C e 32°C, sendo as colônias visíveis a olho nu entre 48 a 72 horas após o inóculo. Em meio de cultura sólido as colônias bacterianas apresentam bordas lisas, aspecto viscoso (BEHLAU; BELASQUE JÚNIOR, 2014) e coloração amarelada ocasionada pela produção do pigmento xantomadina (STALL; CIVEROLO, 1991).

Essas proteobactérias são responsáveis pela produção de goma xantana, um polissacarídeo com relevante aplicação nos mais diversos ramos industriais, incluindo a indústria farmacêutica, química e alimentícia (LOPEZ *et al.*, 2001). Todavia, em sua produção natural, acredita-se que esse polissacarídeo desempenha papéis importantes relacionados com a patogenicidade e a sobrevivência do organismo, proporcionando proteção contra raios UV e dessecação (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

A atual classificação das bactérias do gênero *Xanthomonas* é baseada em análise do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e homologia DNA-DNA, o que permite a distinção dos organismos em três espécies distintas: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (= *X. axonopodis* pv. *citri*), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (= *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*) e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (= *X. axonopodis* pv. *citrumelo*) (JACIANI, 2012). Além disso, possuem variantes distribuídas em cinco grupos descritos como cancroses A, B, C e D (EFROM; SOUZA, 2018).

Em território brasileiro ocorre uma ampla incidência da *X. citri* subsp. *citri* responsável pela cancrose do tipo A (XAC), considerada a forma mais agressiva da doença, enquanto a *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* do tipo C (Xau-C) ocorre restritamente em pomares do estado de São Paulo, sendo específica da limeira ácida "Galego". A cancrose B ou sul americana ocorre na Argentina, Paraguai e Uruguai e é causada pela *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xau-B). Ademais, a *X. citri* subsp. *aurantifolii* é o agente etiológico da cancrose D, incidente no território mexicano, e a *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* é responsável por causar a denominada mancha bacteriana dos citros, ou cancrose E, que acomete pomares em regiões da Flórida

(SCHUBERT *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2017; EFROM; SOUZA, 2018). A relação entre os dados de espécies, variantes, hospedeiros e distribuição mundial pode ser melhor visualizada na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre a classificação das espécies, suas variantes (Cancroses A, B, C e D), hospedeiros e distribuição mundial.

Espécie	Cancrose	Hospedeiro	Distribuição
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	A A* A ^w	Muitas espécies da família Rutaceae, laranjas doces, tangerina, limão doce, pomelo e grapefruit	Ampla distribuição Sudeste da África Sul da Flórida
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	B	Limão-galego, laranja azeda, limão-verdadeiro	Argentina, Paraguai e Uruguai
	C	Limão-galego, laranja azeda, limão-verdadeiro	Brasil (São Paulo)
	D	Lima-comum	México
<i>X. alfaiae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	E	<i>Citrus</i> spp.	Flórida

FONTA: EFROM; SOUZA, 2018

1.2 A PROTEÔMICA E O CANCRO CÍTRICO

A sequência dos resíduos de aminoácidos das proteínas é determinante para sua estrutura tridimensional, especificidade e função dentro do organismo. Além disso, as proteínas são capazes de interagir umas com as outras, assim como com outras macromoléculas biológicas, formando montagens complexas e promovendo atividades não observadas quando desempenham seu papel individual (STRYER *et al* 2002; LEHNINGER *et al.*, 2006).

O termo “proteômica” foi cunhado no ano de 1995, sendo definido como uma caracterização em larga escala de todo o conteúdo proteico de uma linhagem celular, tecido ou organismo. Suas abordagens podem se restringir a análises sistemáticas envolvendo unicamente as proteínas resultantes de um produto gênico, ou então combinar o estudo das moléculas proteicas com seu contexto genético (GRAVES& HAYSTEAD, 2002).

Contudo, a definição mais ampla abrange o estudo de interações proteína-proteína, modificações estruturais das moléculas, análise de função e localização celular de proteínas (GRAVES& HAYSTEAD, 2002), sendo essa última considerada uma estratégia determinante para a compreensão da função de proteínas inseridas em redes celulares complexas (PHIZICKY *et al.* 2003). Essas análises podem ser realizadas, por exemplo, pela combinação de técnicas como gel de eletroforese em

gel bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas (GYGI; PENG, 2001), as quais permitem identificar proteínas de interesse em meio a extratos proteicos complexos.

Impulsionadas pela importância do patógeno e seu poder devastador nas lavouras de citros atrelado aos grandes impactos econômicos gerados pela doença, diversas pesquisas surgiram e promoveram avanços significativos por meio das abordagens “ômicas”. Esses trabalhos foram iniciados com o projeto de sequenciamento completo do genoma das bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (SILVA *et al.*, 2002), duas espécies de grande relevância do gênero *Xanthomonas*. Em 2010 foi publicado o primeiro mapa de referência proteômica para a linhagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) (SOARES *et al.*, 2010), enquanto outras abordagens utilizaram ferramentas da proteômica para agregar informações a respeito de biofilmes e sua importância no processo de infecção e virulência bacteriana (ZIMARO *et al.*, 2013).

Ao longo dos anos, trabalhos de proteômica também foram desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada - LBBMA) no departamento de Genética e Evolução – UFSCar. Em 2010, foi realizada uma análise de proteômica diferencial da fração periplasmática obtida após cultivo *in vitro* de XAC em meio XAM-M indutor de patogenicidade, comparada com a mesma fração resultante de células de XAC cultivadas em condições não indutoras (meio NB) (ARTIER *et al.*, 2017). A adaptação das células em condições induzidas de patogenicidade mostrou uma drástica alteração na quantidade e também na localização de muitas enzimas que não haviam sido, até então, correlacionadas com a capacidade de infecção do organismo (ARTIER *et al.*, 2017).

Ferramentas da proteômica foram também utilizadas para comparar frações periplasmáticas entre as estirpes XAC e XauB como também entre XAC e XauC quando cultivadas em meio indutor e não indutor de patogenicidade, XAM-M e CN (Caldo Nutriente) respectivamente. A fração proteica de cada cultivo foi extraída e as proteínas separadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) (ZANDONADI, 2012). A análise de expressão diferencial demonstrou um perfil proteômico muito distinto das frações periplasmáticas entre XAC e XauB, sendo que algumas proteínas diferenciais foram exclusivas ou aumentadas para XAC apenas em condições infecciosas (ZANDONADI *et al.*, 2020). Uma das proteínas apontadas como diferentemente

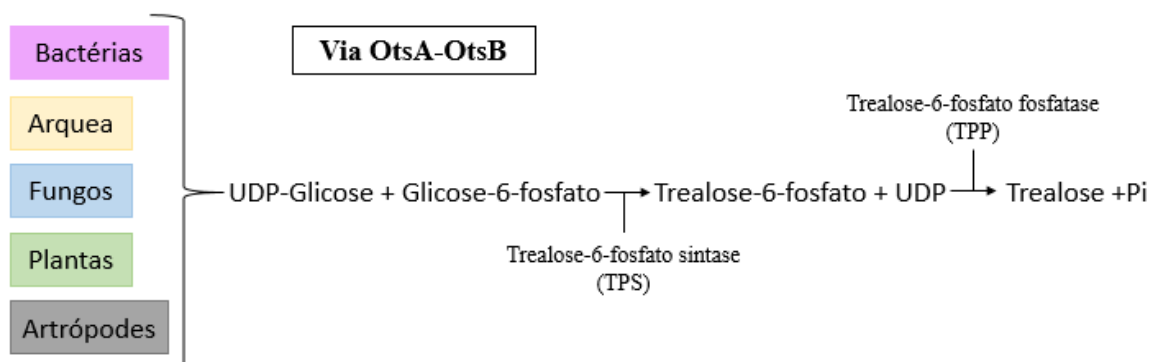
expressas entre XAC e XauC, em condição de indução da patogenicidade *in vitro*, foi a trealase periplasmática de XAC (ZANDONADI, 2012).

1.3 METABOLISMO DE TREALOSE

A trealose é um dissacarídeo não redutor composto por duas moléculas de glicose que se apresenta altamente distribuído na natureza, podendo ser isolado de organismos como bactérias, fungos, invertebrados e plantas. Nas plantas, esse dissacarídeo mostra-se essencial para seus estágios de desenvolvimento, regulação do metabolismo de carbono, fotossíntese e também na interação com microrganismos. Por conta de suas propriedades físico-químicas, a trealose possui uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizada, por exemplo, na preservação de alimentos e vacinas (ITURRIAGA; SUAREZ; NOVA-FRANCO, 2009).

A biossíntese natural de trealose pode ocorrer por meio de três rotas distintas, sendo a via que envolve a expressão dos genes que codificam para a trealose-6-fosfato sintase (*otsA*) e trealose fosfatase (*otsB*) considerada a mais difundida entre os organismos procarióticos e eucarióticos e a única encontrada em plantas (PAUL *et al.*, 2008). Conforme mostrado na Figura 2, essa reação envolve a formação de trealose-6-fosfato a partir da UDP-glicose e glicose-6-fosfato pela ação da enzima trealose-6-fosfato sintase (TPS), sendo esse produto posteriormente defosforilado em trealose pela enzima trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (CABIB; LELOIR, 1958; GODDIJN; SMEEKENS, 1998).

Figura 2 - Esquema da principal rota de biossíntese da trealose (OtsA-OtsB).



FONTE: Adaptado de PAUL *et al.*, 2008.

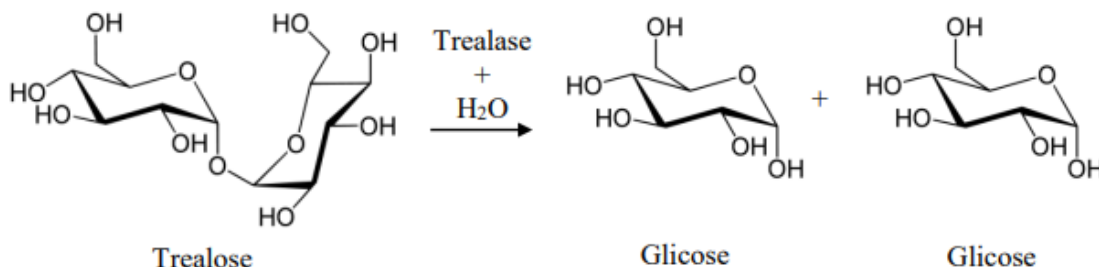
Um estudo publicado por Piazza *et al.* no ano de 2015 permitiu a identificação de uma natureza dual da trealose em relação ao cancro cítrico. A via metabólica para a síntese da trealose em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi eliminada pela deleção do gene *otsA*, permitindo a construção da linhagem mutante *XccΔotsA*. Como resultado, posteriores análises evidenciaram que a linhagem obtida produziu uma quantidade significativamente menor de trealose em comparação com sua linhagem selvagem, como também apresentou baixa resistência a estresse salino e oxidativo e foi menos capaz de colonizar os tecidos da planta hospedeira em ensaios *in vivo*.

Em conclusão, observou-se que a trealose de origem bacteriana sintetizada pela via *otsA-otsB* tem o papel de modificar o metabolismo da planta hospedeira de acordo com as suas necessidades, possibilitando que a bactéria sobreviva nas superfícies inóspitas do vegetal até ser capaz de consumir a infecção. Ao mesmo tempo, funciona como um sinal de aviso, alertando sobre a presença do patógeno ao hospedeiro e ativando os mecanismos de defesa da planta contra a infecção (PIAZZA *et al.*, 2015).

Uma segunda via de grande importância no metabolismo da trealose é a sua hidrólise, a qual também pode correr de diferentes maneiras de acordo com o organismo. Como exemplo, em *Euglena gracilis* e *Pichia fermentans* a reação ocorre por intermédio da trealose fosforilase, já em *Escherichia coli* sucede-se pela fosforilação e subsequente hidrólise pela trealose-6-fosfato hidrolase. Enquanto que em animais, plantas, fungos e bactérias, essa reação se dá por ação da enzima trealase (GODDIJN; SMEEKENS, 1998), sendo essa, portanto, a responsável por hidrolisar a molécula de trealose em XAC.

De forma geral, como ilustrado pela Figura 3, a enzima trealase catalisa a reação de hidrólise da ligação α -O-glicosídica da molécula de trealose (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosídeo) liberando duas moléculas de D-glicose como produto (PAUL *et al.*, 2008).

Figura 3 - Esquema da reação de hidrólise da trealose por ação da enzima trealase. A enzima catalisa a hidrólise da ligação α -O-glicosídica do dissacarídeo trealose liberando duas moléculas de D-glicose.



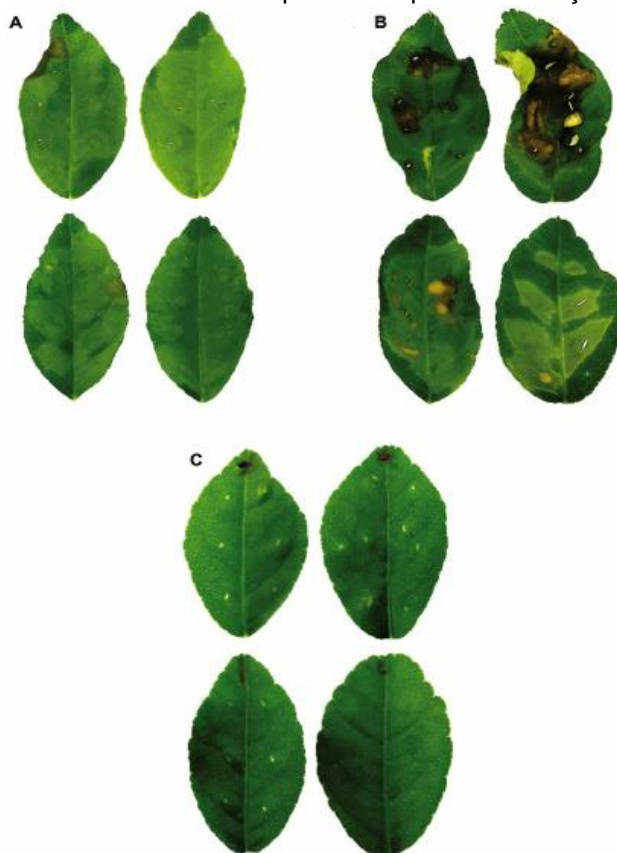
Fonte: ALEXANDRINO, 2015

1.4 ANÁLISE FUNCIONAL DA TREALASE DE XAC

Como previamente mencionado, estudos anteriores inferiram a relação entre a patogenicidade bacteriana com as funções do metabolismo de trealose assim como a expressão diferencial da enzima trealase em condições indutoras de patogenicidade (PIAZZA *et al.*, 2015; ZANDONADI, 2012). Nesse contexto, utilizando a metodologia de nocaute gênico na dupla recombinação homóloga entre o DNA genômico e o vetor suicida pNPTS138, tornou-se possível a obtenção da linhagem mutante deletada no gene que codifica a trealase periplasmática (XAC Δ 0604) (ALEXANDRINO, 2015; ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016). Como pode ser visualizado na Figura 4, o mutante obtido permitiu análises da funcionalidade do gene pela realização de ensaios *in vivo* em *Citrus aurantifolia*, os quais demonstraram uma acentuada patogenicidade de XAC Δ 0604 em relação a linhagem selvagem XAC (ALEXANDRINO, 2015; ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016), o que reforçou os indícios de que a trealose, substrato da reação catalisada pela trealase, seja promotora de patogenicidade em fitopatógenos.

Figura 4 - Ensaio *in vivo* em *Citrus aurantifolia*. Utilizou-se uma planta de *Citrus aurantifolia* para avaliação comparativa da patogenicidade de XAC e XAC Δ 0604. Para cada uma das condições foram

infiltradas quatro folhas de um ramo independente. **A** | XAC selvagem. **B** | XAC Δ 0604. **C** | Água destilada estéril. As fotografias foram obtidas no quinto dia após as infiltrações.



Fonte: ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016.

Dessa forma, conclui-se que uma suposta maior quantidade de trealose, ocasionada pela falta da enzima trealase que atua em sua hidrólise, é fator relevante para um aumento no nível de patogenicidade da bactéria (ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016), assim como uma menor produção dessa molécula pelo patógeno o torna menos capaz de colonizar os tecidos do hospedeiro (PIAZZA *et al.*, 2015). Portanto, os resultados obtidos por Alexandrino *et al.* (2016) corroboram com aqueles alcançados por Piazza *et al.* (2015), validando a premissa de que o dissacarídeo possui papel fundamental na relação entre a bactéria e a planta hospedeira.

Uma segunda ferramenta importante decorrente das pesquisas de Alexandrino *et al.* (2016) foi a produção da enzima recombinante da trealase, sendo essa produzida através da subclonagem do gene que a codifica em vetor de expressão para produção heteróloga, seguida da purificação do produto recombinante por cromatografia de afinidade. A proteína recombinante apresentou 42.7% das estruturas secundárias em α -hélices e 13% em folhas- β e uma constante de Michaelis-Menten

(K_M) de 0,077 mM com $V_{m\acute{a}x}$ de 55.308 glicose.min⁻¹.mg proteina⁻¹ por molécula de trealose.

Utilizando-se da ferramenta de 2D-DIGE, Antão (2019) realizou uma análise proteômica diferencial entre a linhagem mutante XAC Δ 0604 deletada no gene que codifica a enzima trealase e sua linhagem selvagem XAC306, após ambas serem cultivadas em meio indutor de patogenicidade (*in vitro*). O comparativo entre os dois perfis indicou diferenças significativas atreladas à deleção do gene, uma vez que manifestou perturbações na expressão de pelo menos uma dezena de proteínas existentes no proteoma total. A identificação das proteínas diferencialmente expressas detectadas por esse trabalho está em andamento pelo emprego da técnica de espectrometria de massas.

1.5 INTERAÇÕES PROTEICAS E SUAS FERRAMENTAS DE ANÁLISE

O perfil de conexões entre as proteínas e suas inexploradas funções constituem uma das aplicações mais ambiciosas e potencialmente promissoras dentro da proteômica. Análises sobre a interação entre proteínas podem fornecer dados valiosos não apenas associados a atividade individual de uma proteína específica como também a respeito de todas as vias e possíveis complexos relacionados a ela (TWYMAN; GEORGE, 2007; LIEBLER, 2002).

As abordagens que se relacionam diretamente com a proteômica são capazes de caracterizar com precisão um maior número de complexos e as associações entre eles por meio das técnicas de captura por afinidade associadas aos métodos de proteômica analítica (LIEBLER, 2002). Algumas técnicas mostram-se fundamentais para a expansão desta área de pesquisa, incluindo ensaios genéticos como o sistema de duplo híbrido realizado *in vivo*, que consiste na detecção de sinais transcricionais através da interação entre uma proteína fusionada a um domínio de ligação de DNA com outra proteína fusionada a um domínio de ativação de transcrição (YANG; WU; FIELDS, 1995).

O método de duplo híbrido foi primordialmente desenvolvido no ano de 1989 e revolucionou o processo de investigação e identificação das interações proteicas (FIELDS; SONG, 1989), tendo sido amplamente modificado e melhorado nos últimos anos, uma vez que o sistema apresenta notórias vantagens por analisar as proteínas

em suas conformações nativas, o que proporciona um aumento na sensibilidade e maior precisão de detecção (LIN; LAI, 2017). Pode-se ressaltar também a aplicação desse sistema para complementar metodologias como o *pull-down* seguido por análise de espectrometria de massas, afim de se obter um mapa de interações mais completo e confiável (STASI; LUCA; BUCCI, 2015)

As técnicas de captura por afinidade denominadas “*pull-down*” podem abordar diferentes metodologias e procedimentos no intuito de identificar possíveis interações entre uma proteína sonda e alvos desconhecidos. Um exemplo da aplicação desse tipo de técnica é o GST *pull-down*, no qual a proteína sonda é uma fusão GST, cuja sequência codificadora é clonada em vetores de expressão induzidos por IPTG, e as proteínas alvo são geralmente provenientes de lisados celulares. O lisado celular e a proteína de fusão GST são incubados com grânulos de agarose-glutationa para que os complexos formados possam ser recuperados desses grânulos por eluição, sendo posteriormente resolvidos por SDS-PAGE e examinados por *Western blotting*, autorradiografia ou coloração (LIRA, 2011). Um esquema geral de um ensaio de *pull-down* é apresentado no ANEXO I.

Até o presente momento não foram identificadas proteínas capazes de interagir fisicamente com a enzima trealase de XAC em um contexto de patogenicidade, fator que vem motivando nosso grupo de pesquisa a investir no desenvolvimento de metodologias que possam verificar *in vitro* possíveis parceiras com essa proteína, de modo a colaborar no entendimento sobre o papel da enzima e sua relação com a fitopatogenicidade da bactéria.

Em nosso grupo de pesquisa, Antão (2019) elaborou um protocolo de *pull-down* com o intuito de encontrar proteínas no lisado de células de XAC que interagissem *in vitro* com a enzima trealase recombinante. Esse sistema consistiu na imobilização da trealase recombinante de XAC em uma coluna contendo níquel por intermédio de sua cauda de histidinas. A coluna foi então percolada com o lisado celular de XAC permitindo que proteínas presentes no citoplasma bacteriano interagissem e se ligassem à enzima recombinante aderida na coluna. Após etapas de lavagens para retirada de interações não específicas, as possíveis proteínas que interagiram no sistema foram eluídas com uma alta concentração de imidazol, podendo ser separadas por SDS-PAGE, isoladas e posteriormente identificadas por espectrometria de massas.

A espectrometria de massas tornou-se um recurso analítico indispensável em diversos campos da química e ciências da vida, particularmente na área da proteômica, onde existe uma necessidade vigente de se gerar e trabalhar com grandes quantidades de dados (MARQUIONI; NUNES; NOVO-MANSUR, 2021). Essa ferramenta compreende algoritmos e bancos de dados projetados para a identificação de proteínas, permitindo com que milhares dessas moléculas possam ser separadas, quantificadas e caracterizadas, possibilitando também análises de expressões diferenciais e caracterização de modificações pós-traducionais (TWYMAN; GEORGE, 2007).

Em um emprego típico da técnica, uma única proteína ou um pequeno conjunto de proteínas é isolado pela excisão de uma banda presente em um gel de poliacrilamida ou por outro método. Essa molécula é então fragmentada em peptídeos por meio de tratamento com protease, geralmente a enzima tripsina, produzindo assim um grupamento específico de peptídeos, os quais são determinados pela especificidade de digestão da enzima empregada (MARQUIONI; NUNES; NOVO-MANSUR, 2021). Utilizando-se da técnica denominada Tandem MS ou MS/MS, torna-se possível então sequenciar esses peptídeos por comparação de suas sequências com bancos de proteínas anotadas a partir do genoma do organismo em questão, extraindo assim uma vasta gama de informações das sequências presentes na amostra (LEHNINGER, 2006).

Estudos baseados em dados proteômicos podem redefinir a compreensão sobre os sistemas biológicos, assim como revelar novas conexões entre os processos e vias bioquímicas atuantes (AEBERSOLD; MANN, 2003), permitindo com isso a concepção de novas hipóteses sobre o funcionamento dos organismos e possíveis aplicações de moléculas biológicas na biotecnologia.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo verificar possíveis proteínas parceiras de interação da enzima trealase de XAC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

- Verificar a existência de interação entre a trealase recombinante com proteínas provenientes do lisado de células de XAC306 cultivadas *in vitro* em meio indutor de patogenicidade (XAM-M) por meio de *pull-down*;
- Verificar a existência de interação entre a trealase recombinante com proteínas provenientes do lisado de células de XAC Δ 0604 cultivadas *in vitro* em meio indutor de patogenicidade (XAM-M) por meio de *pull-down*;
- Analisar e comparar perfis de interação da trealase recombinante com o lisado celular das linhagens selvagem (XAC306) e mutante (XAC Δ 0604) por meio de SDS-PAGE;
- Avaliar o perfil de interação da trealase de XAC fornecido pelo STRING e comparar com as massas das proteínas parceiras obtidas por *pull-down*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS

Foram utilizadas para as análises a linhagem selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC306) e a linhagem mutante XAC Δ 0604 com deleção no gene que codifica para a enzima trealase, a qual foi obtida por nosso grupo de pesquisa (ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016).

3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Alíquotas das bactérias descritas no item 3.1 foram armazenadas a -80°C em meio Lúria Bertani (LB, Difco) adicionado de glicerol 20%. Para o crescimento em meio sólido e obtenção das colônias foi utilizado meio Ágar Lúria Bertani (Ágar-LB, Difco) incubando-se a uma temperatura de 30°C por, aproximadamente, 3 dias. As colônias obtidas foram inoculadas em 100 mL de meio líquido indutor de patogenicidade XAM-M, cuja constituição é: 7,57 mM (NH₄)₂SO₄; 33,06 mM KH₂PO₄; 60,28 mM K₂HPO₄; 1,7 mM citrato de sódio, 1 mM MgSO₄; 0,03% (m/v) casaminoácidos; 10 mM frutose; 10 mM sacarose; 1 mg/mL BSA; pH 5,4 (ARTIER *et al.*, 2017). Tais cultivos foram incubados a 28°C sob uma agitação de 250 rpm e o crescimento aferido por meio de leitura da densidade óptica (D.O._{590nm}).

3.3 PROTEÍNA TREALASE RECOMBINANTE

A enzima recombinante da trealase foi produzida por Alexandrino A.V. a partir de clone contendo o gene XAC0604 de XAC (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1154675>), inserido entre os sítios *Nde*I e *Xho*I do vetor pET28a, excluindo a porção codificadora do peptídeo-sinal predita pela ferramenta SignalP 4.0 (ALEXANDRINO, 2015; ALEXANDRINO *et al.*, 2016). Sua obtenção deu-se por um sistema de expressão heteróloga induzível por isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) em *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, no qual um gradiente crescente de concentrações de imidazol

foi aplicado para eluição da proteína recombinante (ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016).

O gene da trealase de XAC codifica uma proteína de 530 resíduos com massa molecular de 61,48 kDa quando adicionados 2 kDa referentes à cauda de histidina N-terminal, e possui coeficiente de extinção molar $\lambda_{280\text{nm}}=113345/\text{cm}\cdot\text{M}^{-1}$ em 280 nm ($\text{Abs}_{280\text{nm}} 0.1\% (\text{g/L}) = 1,904$) (ALEXANDRINO; GOTO; NOVO-MANSUR, 2016).

3.4 PULL-DOWN E SDS-PAGE DOS ELUATOS

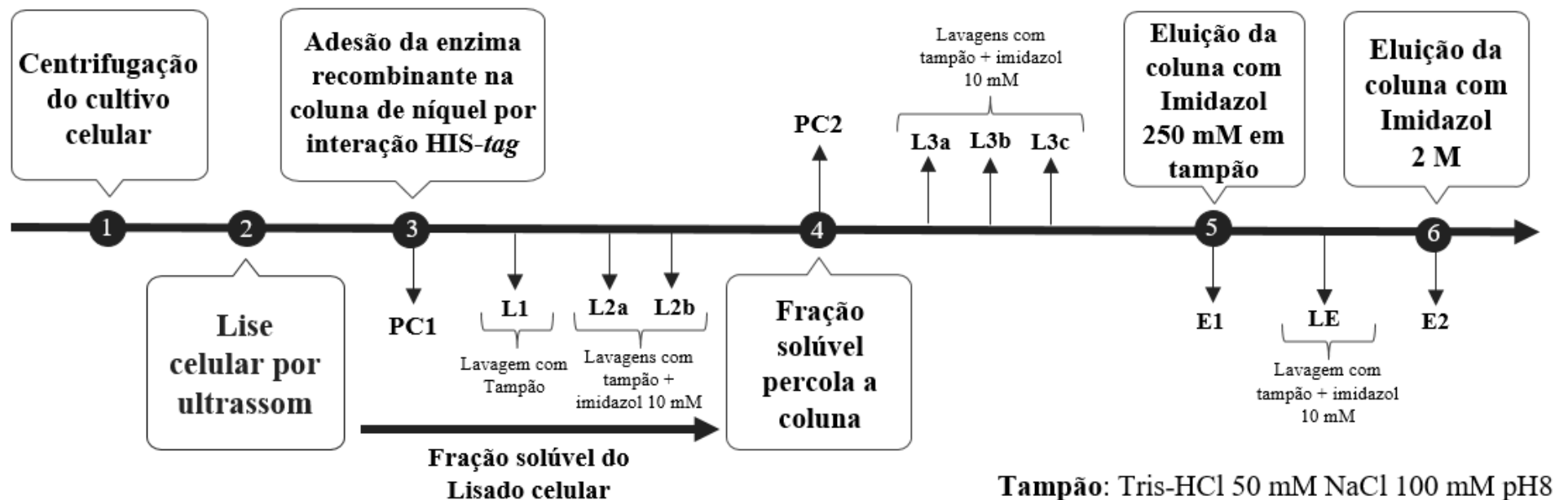
Os procedimentos foram realizados segundo a metodologia descrita por Antão (2019) e conforme ilustrado pela Figura 5. Ambas as linhagens, mutante e selvagem, foram cultivadas em duplicata (réplicas A e B) em 100 mL de meio XAM-M até atingir uma D.O._{590nm} 0,6. As células foram centrifugadas a 10.000 xg durante 15 minutos, o sobrenadante foi então descartado e o pellet ressuspendido em 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8 para posterior lise por 5 pulsos de ultrassom (30s *on* ~ 30s *off*) em equipamento *Sonic Desmembrator* 500 (Fisher Scientific) obtendo-se, após uma nova centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos, a fração solúvel do lisado celular. Ao mesmo tempo, a coluna de níquel (Ni-NTA – Novagen), previamente equilibrada com tampão, foi incubada por uma hora a temperatura ambiente com 330 µg de trealase recombinante (item 3.3) contida em 6 mL de tampão para adesão da proteína à coluna por interação His-tag.

Após o período de adesão, seguido da liberação da solução da coluna, adicionou-se 10 mL do mesmo tampão já citado e seguiu-se duas lavagens, cada uma das quais com 15 mL de tampão contendo imidazol 10 mM. A fração solúvel coletada do lisado celular foi então adicionada, permanecendo em contato com a coluna por uma hora a temperatura ambiente. Em sequência à liberação da solução, foram realizadas três lavagens para remover possíveis ligações não específicas, todas com 10 mM de imidazol contido em 15 mL do tampão. Por fim, as proteínas retidas na coluna foram eluídas com imidazol 250 mM contido em 15 mL de tampão e com 3 mL de solução de imidazol 2 M, respectivamente, sendo essas etapas entremeadas por uma quarta lavagem com imidazol 10 mM semelhante às anteriores. Todas as soluções de percolação e lavagens descritas foram individualmente coletadas.

Para cada amostra, uma alíquota de 41,7 μ L foi retirada e adicionou-se 8,3 μ L de tampão *Laemmli 6x* (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0,004% *bromophenol blue* e 0,125 M Tris HCl, pH ~ 6,8), tais soluções foram mantidas a 100°C em banho por 10 minutos e, em seguida, aplicou-se um volume de 10 μ L em SDS-PAGE 12%. Os mesmos passos aplicaram-se para a trealase recombinante, sendo utilizados 41,7 μ L de solução contendo 3,3 μ g de proteína, a fim de utilizá-la como controle positivo.

A corrida foi realizada em sistema *Mini-Protean II* (BioRad) em tampão 0,3% Tris, 1,5% glicina e 0,1% SDS sob voltagem constante de 150V por, aproximadamente, 1h30 minutos utilizando como padrão de massa molecular o marcador *BlueEye Prestained Protein Marker* (11 a 245 kDa) (Cellco). O gel obtido foi corado com *Silver Blue*, descorado com solução contendo 10% de etanol e 2% ácido fosfórico 85%, e documentado em equipamento *ChemiDoc MP Imaging System* (BioRad).

Figura 5 - Esquema da metodologia de *pull-down*. Os números de 1 a 6 representam as principais etapas do processo e as setas indicam as correntes de saída que são individualmente coletadas ou, no caso da fração solúvel obtida pela etapa 2, redirecionada para uma etapa posterior. Etapas: **1** | Centrifugação do cultivo celular. **2** | Lise das células por ultrassom e obtenção da fração solúvel. **3** | Adesão da enzima recombinante da trealase na coluna de níquel por meio de sua cauda de Histidina. **4** | Percolação da fração solúvel pela coluna contendo a enzima recombinante. **5** | Eluição da coluna com imidazol 200 mM em tampão. **6** | Eluição da coluna com imidazol 2 M. Correntes de saída: **PC1** | Pós-coluna após percolação da enzima contida em tampão. **L1** | Percolado após lavagem da coluna com tampão. **L2a e L2b** | Percolado de duas lavagens consecutivas com tampão contendo imidazol 10 mM. **PC2** | Pós-coluna após percolação da fração solúvel. L3a, **L3b e L3c** | Percolado de três lavagens consecutivas com tampão contendo imidazol 10 mM. **E1** | Eluato com imidazol 200 mM. **LE** | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM. **E2** | Eluato com imidazol 2 M.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

3.5 DIGESTÃO *IN GEL* DAS PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As bandas obtidas nos géis foram cuidadosamente excisadas com auxílio de um bisturi e depositadas em tubos *ependorff* de 1,5 mL, cada qual devidamente identificado para realização da digestão com tripsina segundo metodologia descrita pelo protocolo do Laboratório Nacional de Biociências - LNBio, CNPEM/Campinas-SP.

A fim de realizar a descoloração das bandas, adicionou-se, em cada tubo, 0,5 mL de solução *Destain* (metanol 50% ácido acético 2,5 % em água purificada) e manteve-se incubado por 2h à temperatura ambiente. A solução foi então descartada e a etapa repetida com uma incubação de 1h à temperatura ambiente. Para a desidratação das bandas, a solução de *Destain* foi removida e adicionou-se 200 µL de acetonitrila (100%), deixando-a em contato com o gel por 5 minutos, removendo-a e repetindo novamente esta etapa.

Em seguida, adicionou-se 30 µL de solução ditioneitol (DTT) 10 mM (1 mL de DTT em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM), mantendo incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, os tubos foram centrifugados em um rápido *spin* e a solução retirada, sendo os mesmos direcionados à etapa de alquilação, na qual são adicionados 30 µL de solução iodocetamida (IAA) 50 mM (10 mg de IAA em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM). A solução foi mantida em contato com os géis por 30 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram rapidamente centrifugados e a solução removida.

Os fragmentos de géis foram então lavados com a adição de 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM (100 mM de bicarbonato de amônio em água purificada), permanecendo em contato por 10 minutos e sendo prontamente descartado. Em sequência, foram submetidos a uma terceira desidratação adicionando-se 200 µL de acetonitrila 100%. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente a acetonitrila foi removida e os géis reidratados por 10 minutos em uma solução de 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM, sendo esta retirada após um rápido *spin* em centrifuga. Seguidamente, a etapa de desidratação com acetonitrila foi executada por mais duas vezes consecutivas.

A protease tripsina foi utilizada em uma concentração de 20 ng/ μ L (20 μ L de tripsina em 1000 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM gelado). Adicionou-se 50 μ L dessa solução em cada tubo, reidratando os géis por 30 minutos em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados em um rápido *spin*, o excesso de solução de tripsina foi removido e adicionou-se 20 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM, mantendo a solução em contato com os géis *overnight* a uma temperatura de 37°C em estufa.

Para a posterior etapa de extração utilizou-se uma primeira solução contendo ácido fórmico 5% em água purificada e uma segunda solução contendo ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Respectivamente, adicionou-se 30 μ L da primeira solução incubando-a por 10 minutos à temperatura ambiente, um *spin* rápido foi então realizado e o sobrenadante coletado em um tubo sobressalente, sendo o mesmo realizado duas vezes para a segunda solução. As amostras resultantes da coleta dos sobrenadantes foram armazenadas em freezer -20°C e serão analisadas no LNBio em Campinas (SP) quando do reinício das atividades, as quais se encontram paralisadas devido à pandemia da COVID-19 (ANEXO II).

3.6 STRING

No intuito de buscar evidências sobre as interações proteicas da enzima trealase em XAC, foi utilizada a ferramenta STRING, a qual pode ser acessada gratuitamente através do link: <https://string-db.org/>, fornecendo como *input* os respectivos nomes da proteína alvo (*Trehalase*) e organismo (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306)

O STRING consiste em um banco de dados que busca coletar, pontuar e integrar todas as fontes publicamente disponíveis que contenham informação acerca de interação proteína-proteína em mais de cinco mil organismos, como também complementá-las com predições computacionais, incluindo referências sobre interações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) (SZKLARCZYK *et al.* 2019).

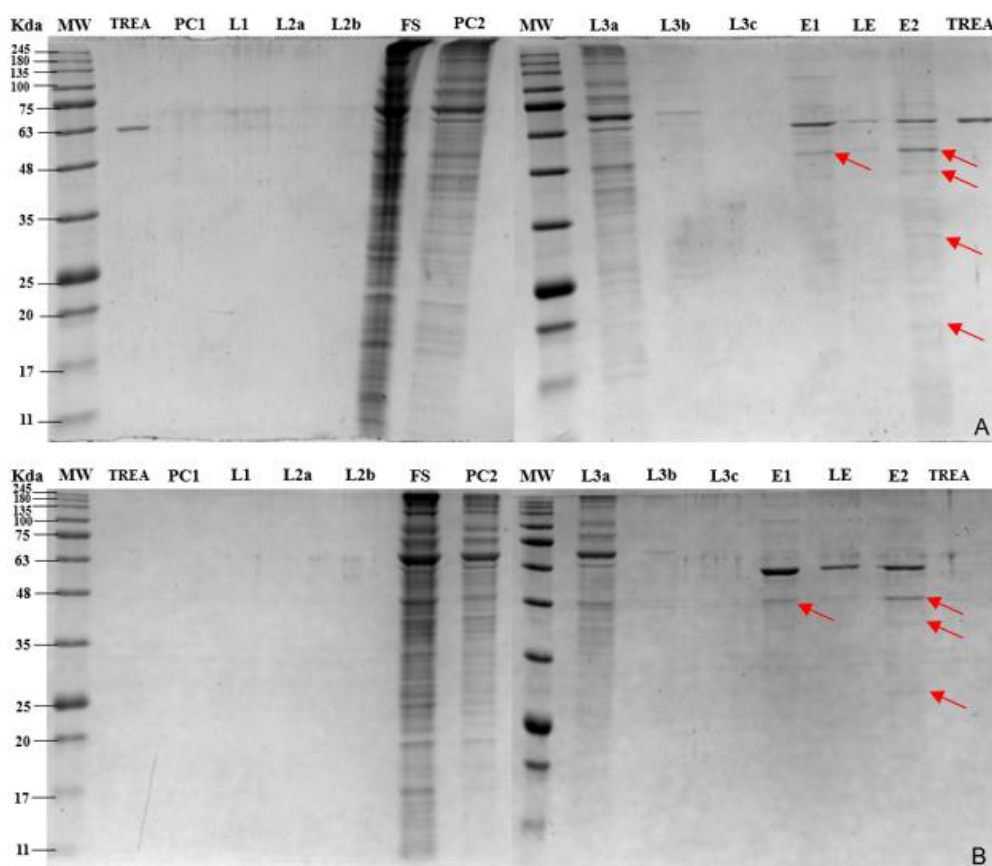
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PULL-DOWN

4.1.1 Linhagem selvagem

Para verificar a existência de interação entre a trealase recombinante com proteínas provenientes do lisado de células da linhagem XAC306 cultivadas em meio indutor de patogenicidade, foi realizado o *pull-down* para dois cultivos celulares (réplicas A e B), obtidos nas mesmas condições de crescimento, sendo os eluatos de cada uma das etapas submetidos à SDS-PAGE conforme apresentados na Figura 6.

Figura 6 - SDS-PAGE das amostras obtidas a partir de *pull-down* para os lisados A e B de XAC306 (selvagem). MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). PC1 | Pós-coluna da enzima recombinante. L1 | Lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8. L2 (a e b) | Lavagens da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. FS | Fração solúvel do lisado celular. PC2 | Pós-coluna da fração solúvel do lisado. L3 (a, b e c) | Lavagens consecutivas da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 250 mM. LE | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM. E2 | Eluato com imidazol 2M. É possível identificar a presença de quatro principais bandas de 51, 46, 27 e 19 kDa que co-eluíram com a banda de ~61kDa (tamanho esperado da trealase) para as eluições do cultivo A e três bandas de 51, 46 e 27 kDa, para o cultivo B, cada qual indicada por uma seta.

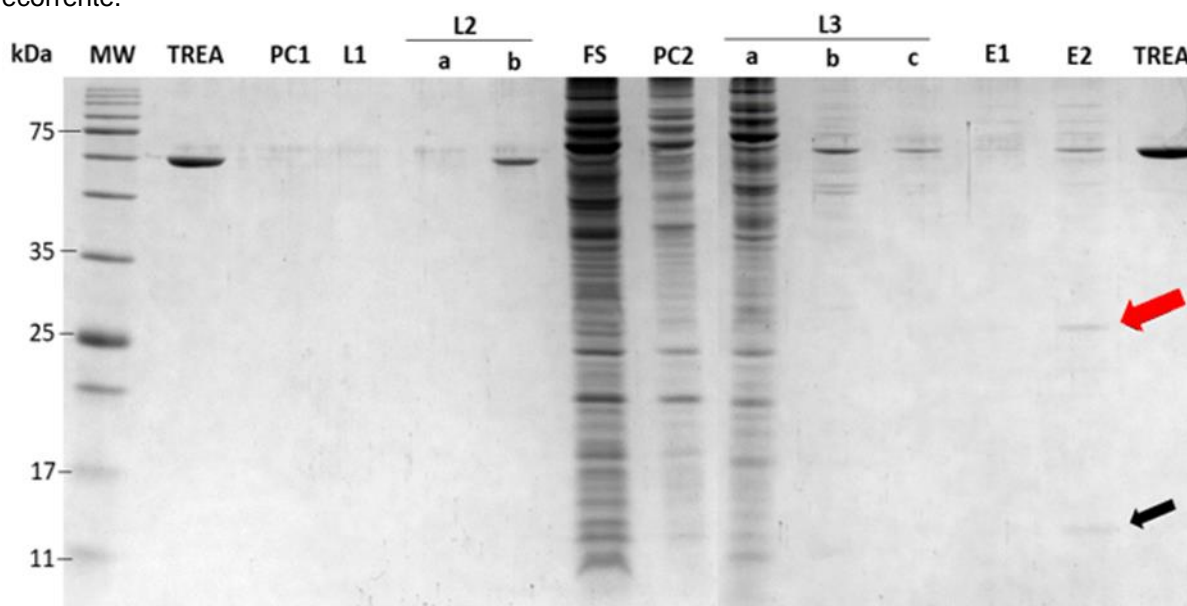


Como é possível observar pela Figura 6, as bandas em destaque que co-eluíram com a banda de ~61kDa esperada para a trealase apresentaram valores de massa molecular aproximados de 51, 46, 27 e 19 kDa para o cultivo A, enquanto para o cultivo B são observadas três bandas de 51, 46 e 27 kDa.

As bandas oriundas das eluições com imidazol 250 mM e 2 M, para ambos os cultivos, podem compreender proteínas que possuem interações com a enzima trealase, uma vez que não foram detectadas nas demais etapas de lavagem com 10 mM de imidazol da coluna. Dessa forma, as proteínas permaneceram interagindo com o sistema até o momento em que maiores concentrações de imidazol (250 mM e 2 M), capazes de competir com a enzima recombinante pelo níquel da coluna, foram aplicadas; os eluatos assim obtidos indicam uma possível interação física entre certas proteínas do lisado e a enzima recombinante imobilizada. A presença de uma banda adicional no cultivo A em relação ao cultivo B pode ser talvez explicada por uma interação instável ou de menor intensidade com a trealase e portanto não reprodutível.

Comparando esses resultados com o *pull-down* realizado por Antão (2019) para a linhagem selvagem, pode-se verificar uma recorrência da banda de aproximadamente 27 kDa na eluição com imidazol 2 M, indicada por uma seta vermelha na Figura 7.

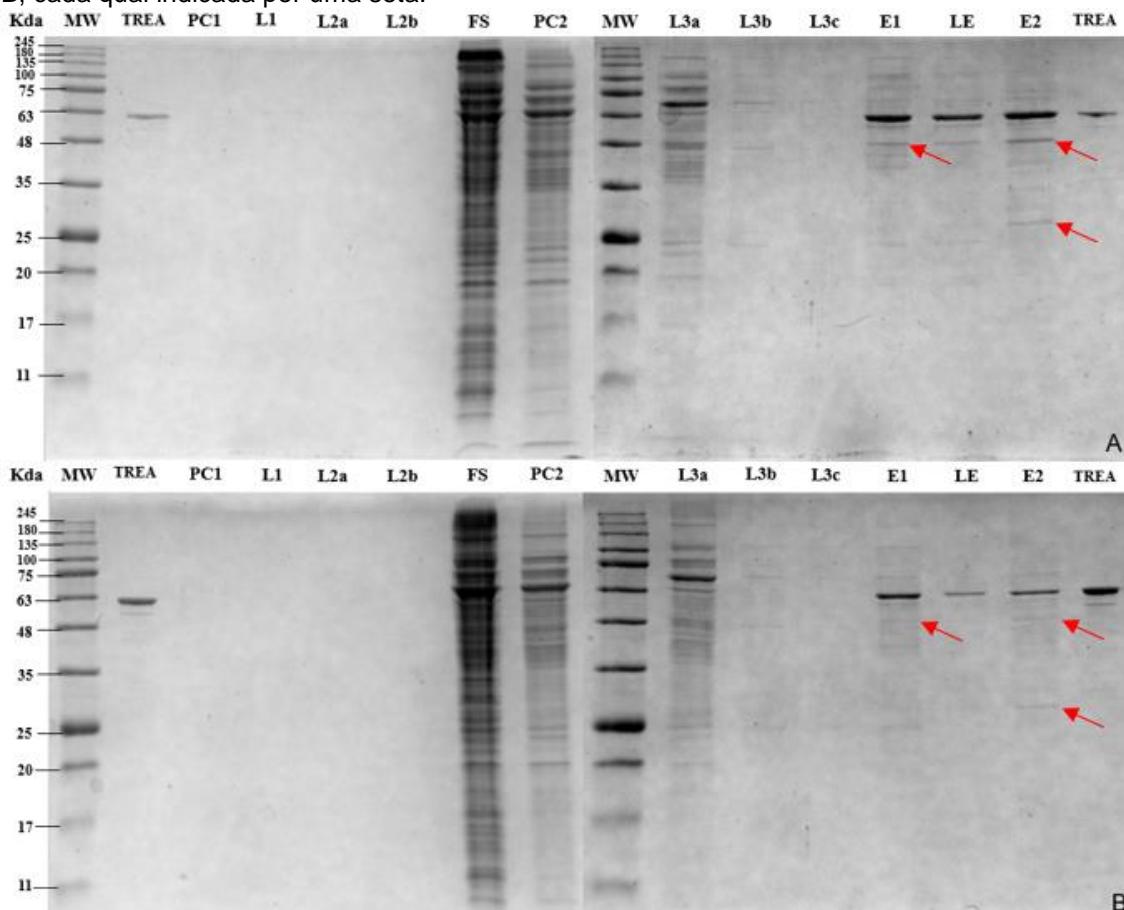
Figura 7 - SDS-PAGE das amostras obtidas por *pull-down* para os lisados A e B de XAC306 (selvagem) em trabalho anterior realizado por Antão (2019). MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). PC1 | Pós-coluna da enzima recombinante. L1 | Lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8. L2 (a e b) | Lavagens da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. FS | Fração solúvel do lisado celular. PC2 | Pós-coluna da fração solúvel do lisado. L3 (a, b e c) | Lavagens consecutivas da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 250 mM. E2 | Eluato com imidazol 2M. A seta vermelha indica a banda em comum de aproximadamente 27 kDa obtida pelo presente trabalho na eluição com imidazol 2 M para ambos os cultivos A e B, enquanto a segunda banda de 15 kDa (indicada pela seta preta) não foi recorrente.



4.1.2 Linhagem mutante

A fim de verificar a existência de interação entre a trealase recombinante com proteínas provenientes do lisado de células da linhagem XAC Δ 0604 cultivadas em meio indutor de patogenicidade, foi realizado o *pull-down* para dois cultivos celulares (réplicas A e B) obtidos nas mesmas condições de crescimento, sendo os eluatos de cada uma das etapas submetidos à SDS-PAGE conforme apresentados pela Figura 8.

Figura 8 - SDS-PAGE das amostras obtidas a partir de *pull-down* para os lisados A e B do mutante de deleção XACΔ0604. SDS-PAGE das amostras obtidas a partir de *pull-down* para os lisados A e B do mutante de deleção XACΔ0604. MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). PC1 | Pós-coluna da enzima recombinante. L1 | Lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 100 mM pH8. L2 (a e b) | Lavagens da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. FS | Fração solúvel do lisado celular. PC2 | Pós-coluna da fração solúvel do lisado. L3 (a, b e c) | Lavagens consecutivas da coluna com tampão contendo imidazol 10 mM. E1 | Eluato com imidazol 250 mM. LE | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM. E2 | Eluato com imidazol 2M. É possível identificar a presença de três principais bandas de 51 e 27 kDa que co-eluíram com a banda de ~61kDa (tamanho esperado da trealase) para as eluições dos cultivos A e B, cada qual indicada por uma seta.

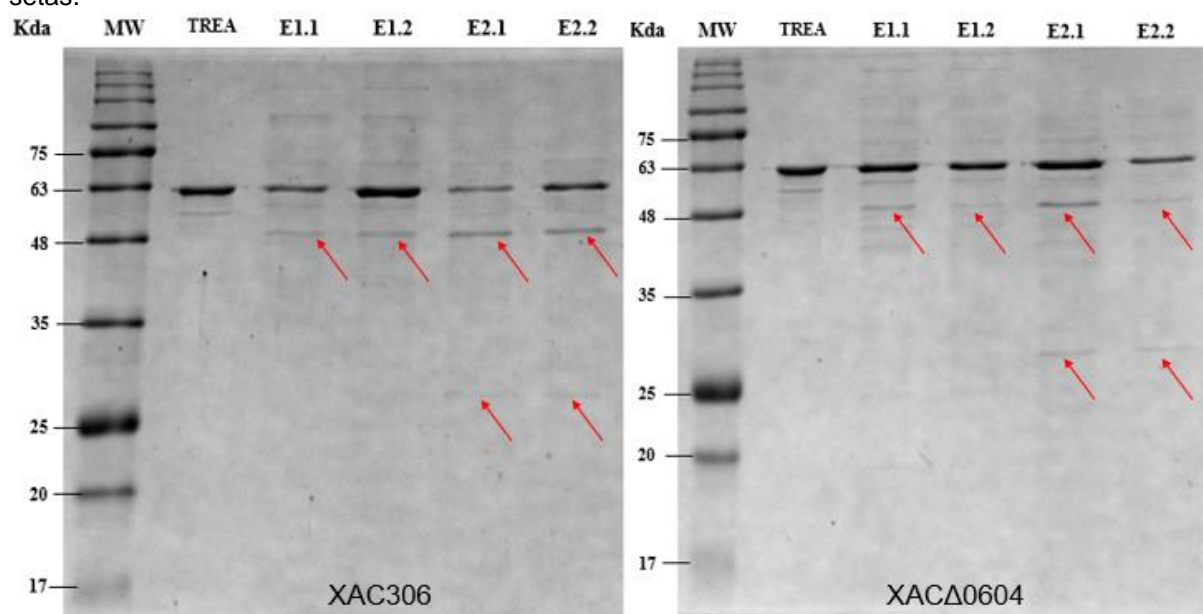


Os géis SDS-PAGE permitem visualizar a presença de três bandas de 51 e 27 kDa que eluíram em conjunto com a banda de tamanho esperado para a trealase (~61kDa) em ambos os cultivos A e B nas eluições com imidazol 250 mM e 2 M. Da mesma forma que para a linhagem selvagem, tais bandas (destacadas na Fig. 8) devem possuir uma interação física com a enzima trealase periplasmática recombinante de XAC.

4.1.3 Comparação dos perfis de interação

Para fins comparativos entre os *pull-down* realizados com linhagens mutante e selvagem foram obtidos géis SDS-PAGE apenas dos eluatos com imidazol 250 mM e 2 M para ambos os cultivos de suas respectivas linhagens. As bandas em evidência foram devidamente apontadas como se pode visualizar na Figura 9.

Figura 9 – SDS-PAGE para comparação entre os eluatos da linhagem selvagem (XAC306) e mutante (XAC Δ 0604). MW | Padrão de massa molecular (11 a 245 kDa). TREA | Trealase recombinante (controle). E1.1 | Eluato com imidazol 250 mM no cultivo A. E1.2 | Eluato com imidazol 250 mM no cultivo B. E2.1 | Eluato com imidazol 2M no cultivo A. E2.2 | Eluato com imidazol 2M no cultivo B. As bandas que constituem possíveis proteínas parceiras da trealase estão indicadas pelas setas.



Os géis de eluatos demonstram as similaridades entre as bandas resultantes para ambos os cultivos das linhagens selvagem e mutante, sendo a banda para o eluato com imidazol 250 mM com tamanho aproximado de 51 kDa e duas bandas para o eluato com imidazol 2 M com tamanhos aproximados de 51 e 27 kDa, além das bandas com tamanho previsto para a trealase de aproximadamente 61 kDa.

Embora os eluatos da Figura 9 tenham sido retirados das mesmas amostras que constituíram os géis de *pull-down* apresentados pelas Figuras 6 e 8, pode-se observar que, para a linhagem selvagem, duas bandas estão ausentes para o cultivo A e uma está ausente para o cultivo B. É provável que a as amostras possam ter se alterado até esta segunda aplicação no gel. Além disso, tais bandas poderiam ser indicadas como diferencialmente expressas entre as linhagens através de uma posterior análise dos eluatos totais por espectrometria de massas, especialmente pela

análise do eluato com 2 M de imidazol. Na eluição prévia com 250 mM de imidazol eventuais proteínas ainda ligadas inespecificamente à coluna (e não na trealase imobilizada) poderiam ter sido eluídas da coluna, estando, portanto, ausentes no eluato final de 2 M.

Para fins comparativos da reprodutibilidade das bandas entre as linhagens selvagem e mutante em suas respectivas réplicas de cultivo (A e B) foi elaborada a Tabela 2. Pode-se observar a banda de eluição esperada para a trealase recombinante de ~61 kDa em todos os eluatos, a banda de 51 kDa presente nas duas eluições para ambas as réplicas (A/B) de mutante e selvagem, a banda de 46 kDa visualizada apenas no eluato 2 das réplicas (A/B) da linhagem selvagem, a banda de 27 kDa reprodutível no eluato 2 em ambas as réplicas (A/B) para a selvagem e mutante e a banda de 19 kDa presente no eluato 2 apenas para a réplica A da linhagem selvagem.

Tabela 2 – Reprodutibilidade das bandas entre as linhagens selvagem e mutante em suas respectivas réplicas de cultivo (A/B).

Banda (kDa)	SELVAGEM A/B		MUTANTE A/B	
	Eluato 1 (E1) (imidazol 250 mM)	Eluato 2 (E2) (imidazol 2 M)	Eluato 1 (E1) (imidazol 250 mM)	Eluato 2 (E2) (imidazol 2 M)
61	+/+	+/+	+/+	+/+
51	+/+	+/+	+/+	+/+
46		+/+		
27		+/+		+/+
19		+		

(+) representa presença de banda, conforme tamanho determinado pelo SDS-PAGE, em cada uma das condições/amostras indicadas.

4.2 DIGESTÃO *IN GEL* DAS PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para a digestão foram selecionadas as bandas de maior evidência a partir dos géis de *pull-down* para a linhagem selvagem e para a linhagem mutante. Cada banda foi delimitada e propriamente nomeada de acordo com as Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Géis de SDS-PAGE obtidos do *pull-down* para os cultivos A e B da linhagem selvagem com demarcação das bandas excisadas para digestão *in gel* para posterior análise por espectrometria de massas.

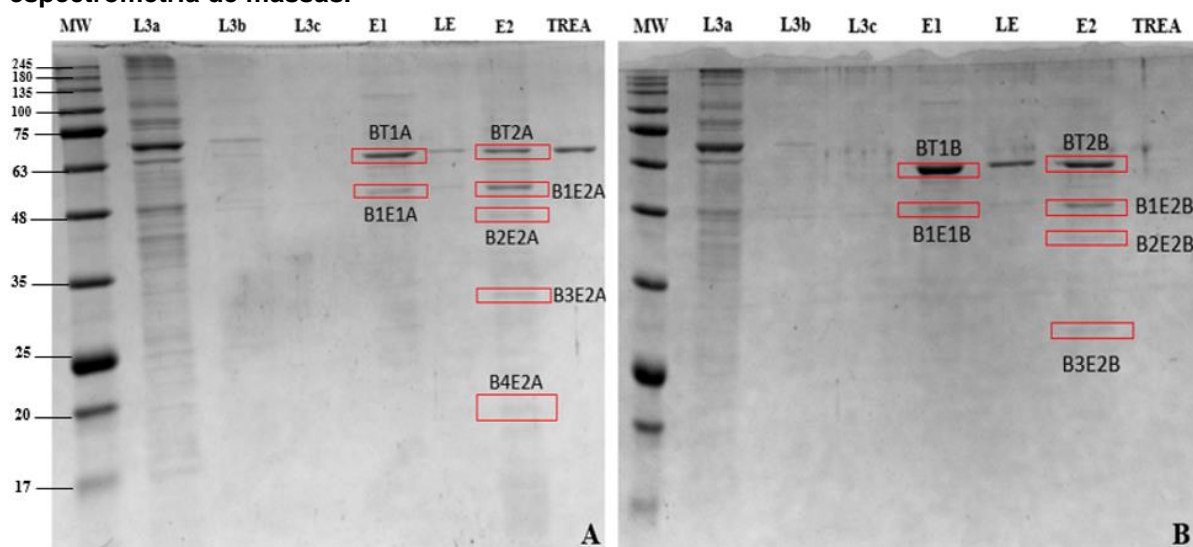
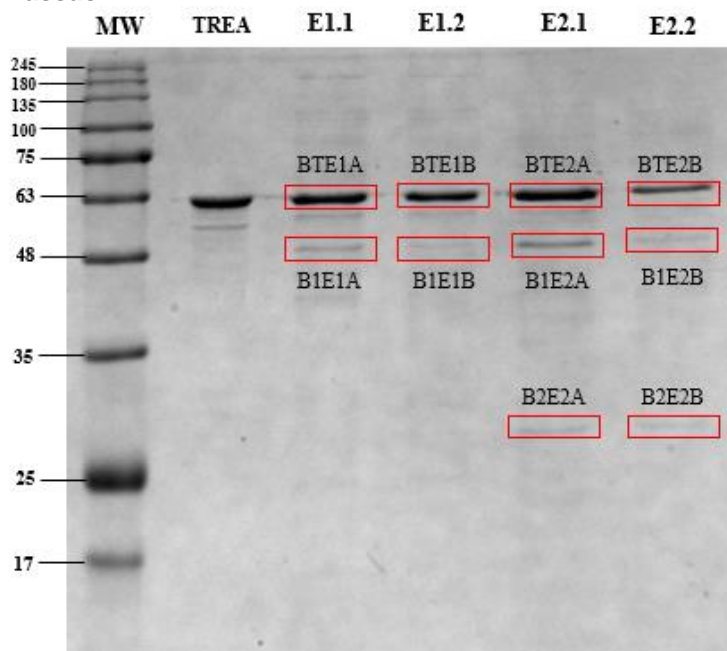


Figura 11 - SDS-PAGE de eluatos obtidos do *pull-down* para cultivos A e B da linhagem mutante com demarcação das bandas excisadas para digestão *in gel* para posterior análise por espectrometria de massas.



As demarcações permitiram a construção da Tabela 3 contendo os nomes das bandas, sua descrição quanto ao local de eluição no *pull-down*, suas respectivas linhagens e cultivos, e a massa aproximada calculada pela relação linear entre o logaritmo da massa molecular aferida pelo marcador e a distância (mm) de migração da banda no gel (resultados não mostrados).

Tabela 3 – Dados das bandas isoladas para digestão *in gel* e espectrometria de massas. Os nomes representam a demarcação da banda no gel de seus respectivos cultivos e linhagens, e a descrição indica seu local de eluição no *pull-down*. A massa molecular aproximada é também indicada. (continua)

XAC306			
Nome	Descrição	Massa aproximada (kDa)	Cultivo
BT1A	Banda da trealase na eluição com imidazol 250mM	61	A
B1E1A	Banda 2 no Eluato 1 com imidazol 250mM	51	
BT2A	Banda da trealase na eluição com imidazol 2M	61	
B1E2A	Banda 1 no Eluato 2 com imidazol 2M	51	
B2E2A	Banda 2 no Eluato 2 com imidazol 2M	46	
B3E2A	Banda 3 no Eluato 2 com imidazol 2M	27	
B4E2A	Banda 4 no Eluato 2 com imidazol 2M	19	
BT1B	Banda da trealase na eluição com imidazol 250mM	61	B
B1E1B	Banda no Eluato 1 com imidazol 250mM	51	
BT2B	Banda da trealase na eluição com imidazol 2M	61	
B1E2B	Banda 1 no Eluato 2 com imidazol 2M	51	
B2E2B	Banda 2 no Eluato 2 com imidazol 2M	46	
B3E2B	Banda 3 no Eluato 2 com imidazol 2M	27	
XACΔ0604			
Nome	Descrição	Massa aproximada (kDa)	Cultivo
BTE1A	Banda da trealase na eluição com imidazol 250mM	61	A
B1E1A	Banda no Eluato 1 com imidazol 250mM	51	
BTE2A	Banda da trealase na eluição com imidazol 2M	61	
B1E2A	Banda 1 no Eluato 2 com imidazol 2M	51	
B2E2A	Banda 2 no Eluato 2 com imidazol 2M	27	

Tabela 3 – Dados das bandas isoladas para digestão *in gel* e espectrometria de massas. Os nomes representam a demarcação da banda no gel de seus respectivos cultivos e linhagens, e a descrição indica seu local de eluição no *pull-down*. A massa molecular aproximada calculada também é indicada.

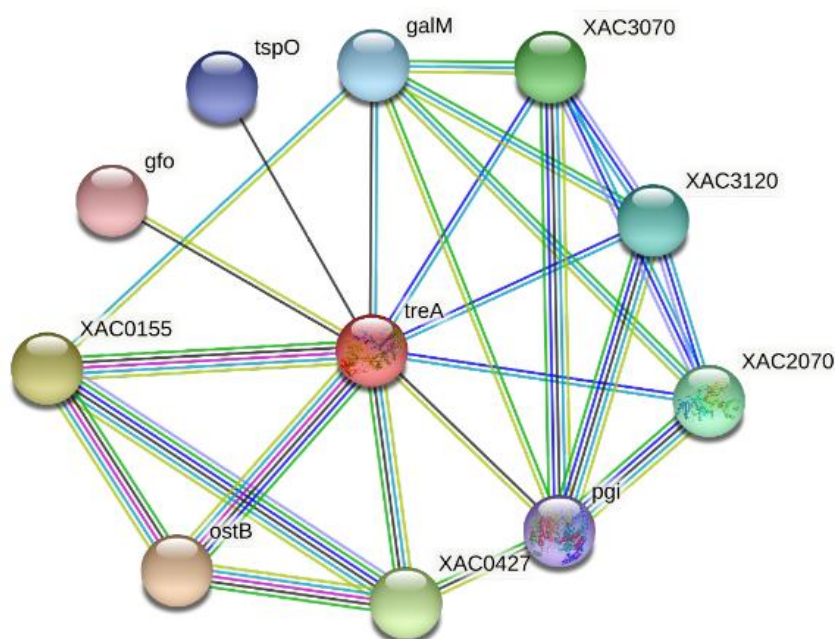
(conclusão)

Nome	Descrição	Massa aproximada (kDa)	Cultivo
BTE1B	Banda da trealase na eluição com imidazol 250mM	61	B
B1E1B	Banda no Eluato 1 com imidazol 250mM	51	
BTE2B	Banda da trealase na eluição com imidazol 2M	61	
B1E2B	Banda 1 no Eluato 2 com imidazol 2M	51	
B2E2B	Banda 2 no Eluato 2 com imidazol 2M	27	

4.3 STRING

O perfil de interação proteína-proteína da enzima trealase no organismo XAC306 obtido pelo STRING pode ser observado na Figura 12. A lista das parceiras funcionais previstas e suas massas moleculares averiguadas através do UniProt (www.uniprot.org) foi adaptada na Tabela 4.

Figura 12 - Perfil de interação proteína-proteína da enzima trealase em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 fornecido pelo STRING com linhas conectoras baseadas em evidências de interação (evidence). É possível visualizar a conexão de 10 proteínas. As associações fornecidas pelas linhas conectoras entre as proteínas são derivadas de interações baseadas em: contexto genômico, que abrange vizinhança (verde), fusão de genes (vermelho, não presente nas interações obtidas) e coocorrência de genes (azul escuro), interações conhecidas por curadoria em banco de dados (azul esverdeado) ou determinadas experimentalmente (rosa), ou por outros tipos de contextos incluindo co-expressão (preto), *text-mining* (amarelo) e homologia de proteína (azul claro) (SZKLARCZYC *et al.* 2019).



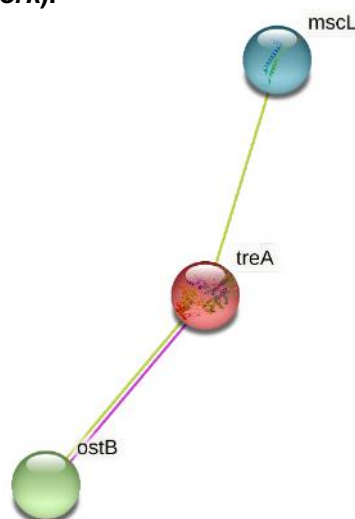
É importante ressaltar que, de acordo com instruções fornecidas pelo próprio site da ferramenta, as linhas conectoras que caracterizam as associações entre proteínas evidenciadas pela Figura 12 devem ser analisadas como específicas e significativas, ou seja, as proteínas contribuem conjuntamente para funções compartilhadas, o que não significa, necessariamente, que elas possam estar fisicamente vinculadas umas às outras.

Tabela 4 – Parceiras funcionais previstas pelo STRING, seu score de interação e suas massas moleculares averiguadas através do UniProt. A pontuação ou *Score* gerada pelo STRING representa a confiança aproximada (em uma escala de 0 a 1) de ser uma associação verdadeira baseada em evidências aferidas em bancos de dados disponíveis (SZKLARCZYK *et al.* 2019).

Parceira funcional prevista		Score	kDa
ostB	Trealose-6-fosfato fosfatase	0,980	27,030
XAC0155	Trealose sintase	0,936	125,383
XAC0427	Malto-oligosiltrealose trealohidrolase	0,929	63,914
XAC3070	Glicose quinase	0,922	36,532
XAC2070	Glucosquinase	0,920	35,183
XAC3120	Glicose quinase	0,919	36,532
galM	Aldose 1-epimerase	0,901	40,147
tspO	<i>Tryptophan-rich sensory protein</i>	0,794	18,522
pgi	Glicose-6-fosfato isomerase	0,687	54,454
gfo	Glicose-frutose oxidoreductase	0,641	41,619

Uma alteração nos parâmetros das linhas conectoras de *evidence* para *physical network* nos traz indicações de interação entre proteínas que fazem parte de um complexo físico, sendo o perfil resultante ilustrado pela Figura 13. Enquanto as interações fornecidas pela ferramenta são definidas como funcionais, a organização das proteínas em um complexo físico provê fortes evidências de um relacionamento biológico entre elas (SZKLARCZYK *et al.* 2021).

Figura 13 - Perfil de interação proteína-proteína da enzima trealase no organismo *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 fornecido pelo STRING com linhas conectoras baseadas em complexos físicos (*physical network*).



A restrição no tipo de interação fornece como resultado apenas duas proteínas preditas. Uma delas é a proteína com massa molecular de 15,39 kDa (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8PHE9>) responsável por formar o canal iônico mecanossensível de larga condutância (mscL) encontrado na membrana citoplasmática de bactérias gram-negativas e responsável por proteger as células de possíveis lises causadas por alterações no ambiente osmótico (BLOUNT *et al.* 2007). Curiosamente, uma banda correspondente a esse tamanho de proteína parceira foi observado no resultado de *pull-down* realizado por Antão (2019) embora não tenha sido reproduzível (Figura 7); outra curiosidade é que a trealose tem sido descrita como conferindo proteção contra estresse osmótico (ALEXANDRINO *et al.*, 2016). Mais estudos são necessários, no entanto, para confirmar tal proteína como sendo parceira de interação da trealase.

A segunda interação obtida é com a proteína trealose-6-fosfato fosfatase ou TPP (OstB) com uma massa molecular anotada de 27,030 kDa de acordo com o UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8PHP0>). A trealose-6-fosfato fosfatase é uma enzima fundamental na via de biossíntese conhecida como OtsBA, atuando na remoção do fosfato da molécula de trealose-6-fosfato e permitindo a produção do dissacarídeo trealose (CROSS *et al.* 2017), sendo este o substrato da reação catalisada pela enzima trealase.

Em vista aos resultados obtidos pelo STRING, corroboram-se evidências de uma possível interação entre a OstB e a trealase, uma vez que os géis de *pull-down* para ambas as linhagens mutante e selvagem em duplicata apresentaram bandas com tamanho molecular de aproximadamente 27 kDa. Apesar das conexões apontadas pelo STRING indicarem uma relevante associação de funções biológicas entre as duas proteínas, até o presente momento não foram encontrados dados na literatura que indiquem a existência de uma interação física entre as moléculas proteicas da trealase e trealose-6-fosfato fosfatase.

Outras proteínas que se destacaram por apresentarem massas moleculares similares ou próximas às bandas obtidas nas eluições com imidazol do *pull-down* foram a malto-oligosiltrealose trealohidrolase com massa de 63,9 kDa, podendo esta ter co-eluído com a banda esperada para a trealase recombinante, de massa similar, e a proteína sensorial rica em triptofano (*Tryptophan-rich sensory protein*) com massa

de 18,5 kDa, sendo possível observar uma banda com esse valor aproximado (~19 kDa) no gel para o cultivo A da linhagem selvagem.

Contudo, a relação entre os resultados obtidos experimentalmente por este trabalho com as informações prospectadas de bancos de dados só poderá ser validada futuramente por meio da identificação das proteínas das bandas por espectrometria de massas, etapa que foi impossibilitada pela pandemia de COVID19. Tal identificação permitirá traçar novas estratégias para o estudo de interação entre a trealase e as proteínas identificadas. Adicionalmente, os eluatos totais também serão analisados por espectrometria de massas a fim de que possam ser identificadas proteínas parceiras não detectadas pela análise do gel.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho cumpriu com seu objetivo de evidenciar a existência de possíveis proteínas parceiras de interação *in vitro* da enzima trealase de XAC através da metodologia de *pull-down* para os lisados celulares de ambas as linhagens selvagem e mutante cultivadas em meio indutor de patogenicidade, e também possibilitou verificar semelhanças entre os perfis de interação obtidos entre o selvagem e o mutante de deleção da trealase. Dessa forma, é possível concluir que existem proteínas que, em um contexto de indução de patogenicidade, possuem afinidade e interagem com a enzima trealase de XAC.

6 PERSPECTIVAS

No intuito de cumprir com os objetivos propostos anteriormente à pandemia de COVID19, sendo eles identificar por espectrometria de massas as proteínas de interação obtidas nos perfis mutante e selvagem assim como apontar as proteínas diferencialmente expressas entre os dois perfis, as bandas digeridas, bem como os eluatos totais, serão encaminhadas para um laboratório externo ao LBBMA para ser dada continuidade às análises. Com esses resultados esperamos ser possível obter uma maior elucidação do papel da trealase e suas relações com outras proteínas no metabolismo e patogenicidade de XAC.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD R.; MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, [S. l.], v. 422, p. 198-207, 2003.
- 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**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. e0162886, 9 set. 2016.
- ALEXANDRINO, A., **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização parcial da trealase periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e do seu envolvimento com a fitopatogenicidade**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- AMARAL, A. M. **Cancro cítrico**: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília, DF: Embrapa, Comunicado Técnico 86, p. 1–5, nov. 2003. ISSN 0102-0099.
- ANTÃO, S. C. **Análise comparativa entre os perfis proteicos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Selvagem e seu mutante de deleção da trealase e interação in vitro da trealase recombinante**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
- 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**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 143–157, jan. 2017.
- BEHLAU, F. **Manual de cancro cítrico**: Medidas essenciais de controle. 4. ed. atual. Araraquara: FUNDECITRUS, set. 2019. ISBN: 978-85-68170-13-7. 51 p.
- BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. doi:10.1007/s40858-020-00377-2 (2020).
- BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J. **Cancro cítrico**: a doença e seu controle. 1. ed., Araraquara: FUNDECITRUS, jun. 2014. DOI: 10.13140/RG.2.1.1207.0485. ISBN: 978-85-68170-00-7. 87 p.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, [S. l.], v. 23, p. 101-111, 1957.
- BLOUNT, P. *et al.* MscL: The Bacterial Mechanosensitive Channel of Large Conductance. **Current Topics in Membranes**, [S. l.], v. 58, p. 201–233, 2007. DOI:10.1016/s1063-5823(06)58008-1.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.
- CABIB, E.; LELOIR, L. F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 231, n. 1, p. 259-275, 1958. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)77303-7.

CIVEROLO, E. L. Citrus bacterial canker disease: An overview. **Procediments of the International Society of Citriculture**, Tokyo, v. 1, p. 390-394, 1982.

CROSS, M. *et al.* Enzyme characteristics of pathogen-specific trehalose-6-phosphate phosphatases. **Scientific reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1-9, 17 maio 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02220-2.

CROZIER, A. *et al.* Biosynthesis of hormones and elicitor molecules, in Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, Maryland, p. 829-850, 2001.

DAS, A. K. Citrus canker-A review. **Journal of Applied Horticulture**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

EFROM, C. F. S.; SOUZA, P. V. D. de (Orgs.). **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. 1. ed. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAPI; DDPA, 2018.

FIELDS S.; SONG O. A novel genetic system to detect protein–protein interactions. **Nature** 340:245–246, 1989.

FRANCO, A. S. M. O Suco de laranja brasileiro no mercado global. **Análise Conjuntural**, [S. l.], v. 38, p. 11-12, 2016. Disponível em: http://www.ipardes.gov.br/biblioteca/docs/bol_38_6_c.pdf. Acesso em 20 out. 2020.

GODDIJN O.; SMEEKENS S. Sensing trehalose biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 143–146, 1998.

GRAVES, P. R., & HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, 66(1), 39–63. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.39-63> (2002).

ITURRIAGA, G.; SUAREZ, R.; NOVA-FRANCO, B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 10, p. 3793–3810, 2009.

LIN, Jer-Sheng; LAI, Erh-Min. Protein–Protein Interactions: Yeast Two-Hybrid System. *In*: LAURE, Journet; ERIC, Cascales (ed.). **Methods in Molecular Biology: Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols**. [S. l.: s. n.], 2017. v. 1615, cap. 14, p. 177-187.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**, 4. ed. São Paulo: Savier. 2006.

LIEBLER, D. C. **Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology**. 1. ed. Totowa: Humana Press, 2002.

LIRA, N. P. V. Identificação de complexos protéicos de citros associados ao fator de patogenicidade PthA de *Xanthomonas citri*. **20º programa bolsas de verão**, CNPEM, [S. l.], 2011.

LOPEZ, M. J. *et al.* *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Water Research**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 1828-30, 2001.

MANEIRA R; DANELLA NETO P. **Cancro cítrico**: estratégias na prevenção e controle da doença. 22. ed. **Informativo Técnico Nortox**, jul. 2019.

MARQUIONI V.; NUNES F. M. F.; NOVO-MANSUR, M. T. M. Protein Identification by Database Searching of Mass Spectrometry Data in the Teaching of Proteomics. **Journal of Chemical Education** 98 (3), 812-823 (2021) DOI: 10.1021/acs.jchemed.0c00853

MEYER, D. F.; BOGDANOVE, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular Biology**, [S. l.], v. 147, p. 161, 2009.

NAMEKATA, T. *et al.*; Avaliação de novos métodos de erradicação de CC. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n.1, p.67-78, 1996.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* (Ed.). **Cancro cítrico**: epidemiologia e controle. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 40 p. ISSN 1516-8840.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* (Eds.). **Sistema Integrado de Medidas Fitossanitárias para o Manejo do Cancro Cítrico no Rio Grande do Sul**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2017. ISSN 1516-8840. 78 p.

PAUL, M. J.; PRIMAVESI, L. F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. H. Trehalose metabolism and signaling. **Annual Review of Plant Biology**, 2008. 59:417–441.

PENG, J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. **Journal of mass spectrometry**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1083-1091, 2001. DOI: 10.1002/jms.229.

PHIZICKY, E., BASTIAENS, P., Zhu, H. *et al.* Protein analysis on a proteomic scale. **Nature** 422, 208–215 (2003).

PIAZZA A. *et al.* The dual nature of trehalose in citrus canker disease: a virulence factor for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and a trigger for plant defence responses. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 66, n. 9, p. 2795–2811, 2015.

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**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 549–566, 2014.

SCHUBERT, T. S. *et al.* Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida—Again. **Plant Disease**, [S. l.], v. 85, n. 4, p. 340–356, abr. 2001.

SILVA, A. C. R. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, [S. l.], v. 417, p. 459-463, 2002.

SOARES, M. R. *et al.* Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **Proteome Science**, [S. l.], v. 8, n. 55, 2010. 11 p.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 399–420, 1991.

STASI M.; DE LUCA M.; BUCCI C. Twohybrid-based systems: powerful tools for investigation of membrane traffic machineries. **J Biotechnol** 202:105–117, 2015.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 47, n. D1, p. D607-D613, 2019. DOI:10.1093/nar/gky1131

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. D1, p. D605-612, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074.

TWYMAN, R.; GEORGE, A. **Principles of proteomics**. Nova Iorque: Garland Science, 2007.

YANG, M.; WU, Z.; FIELDS, S.; Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], Vol. 23, No. 7, p. 1152-1156, 1995.

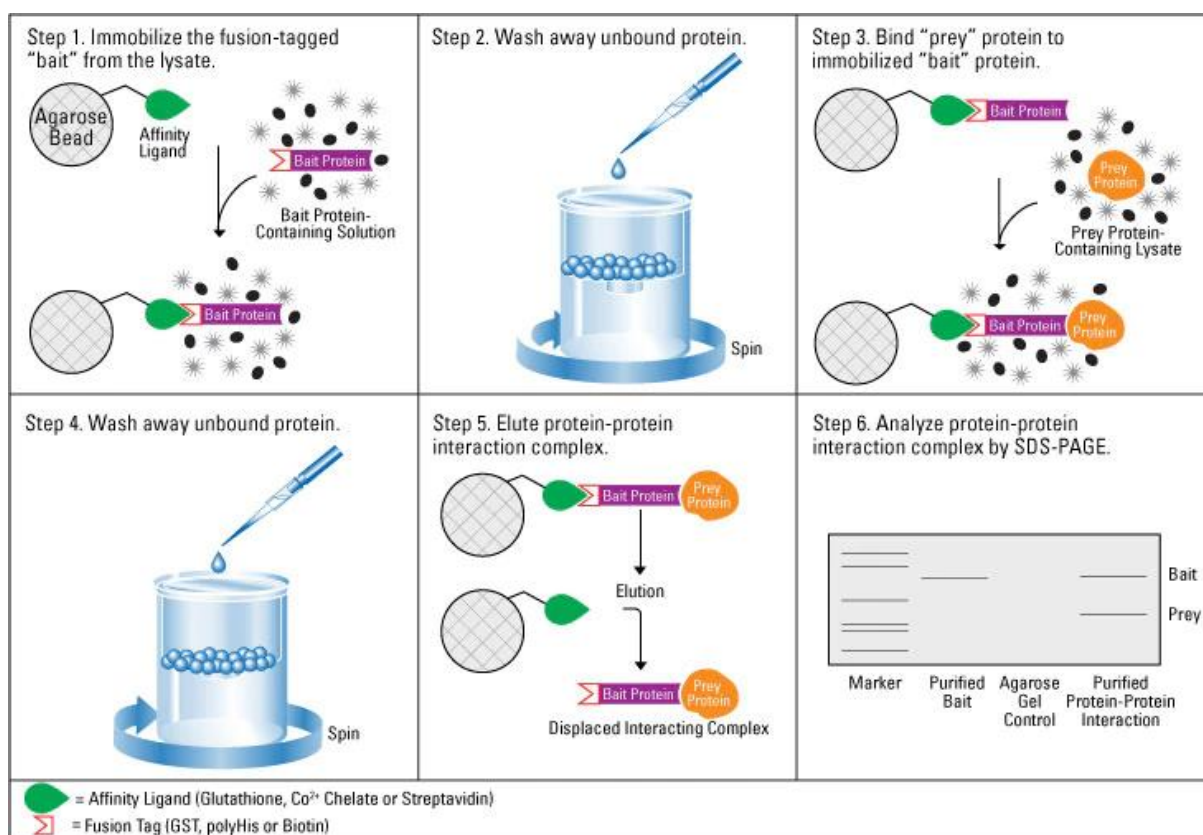
ZANDONADI F. S. *et al.* Periplasm-enriched fractions from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type A and *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* type B present distinct proteomic profiles under *in vitro* pathogenicity induction. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. e0243867, 2020.

ZANDONADI, F. 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. 119f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

ZIMARO, T. *et al.* Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 13, n.186, 2013. DOI: 10.1186/1471-2180-13-186.

ANEXO I

Esquema geral de um ensaio de *pull-down*. Um ensaio de *pull-down* consiste em uma técnica de captura por afinidade em pequena escala semelhante à imunoprecipitação, exceto ao fato de que o anticorpo é substituído por outro sistema de afinidade envolvendo uma proteína. Neste caso em específico, o sistema de afinidade consiste em uma proteína fusionada com glutatona s-transferase (gst) ou estreptavidina marcada ou domínio de ligação que é capturado e imobilizado por glutatona, quelato de metal (cobalto ou níquel) ou grânulos de agarose revestidos com biotina, respectivamente. A proteína imobilizada atua então como uma “isca” para capturar parceiros de interação. Em um típico ensaio de *pull-down*, a proteína “isca” é incubada com um lisado celular e, após sucessivas etapas de lavagens, os complexos são eluídos seletivamente utilizando analitos competitivos, tampões redutores ou diminuição de pH, sendo então redirecionados para análise em gel ou *western blot*.



Fonte: THERMOFISHER SCIENTIFIC. **Pull-Down Assays**. Disponível em: <https://bityli.com/dOSa5>



Maria Teresa Marques Novo Mansur <marinovo@ufscar.br>

Propostas de Pesquisa Adiadas para 2021

Servicos de Apoio ao Usuario <sau@cnpem.br>

9 de novembro de 2020 11:23

“Prezado usuário,

Devido a pandemia de COVID-19 o LNBio está com uma força tarefa instalada para atender as demandas necessárias para enfrentamento dessa situação. Por esse motivo não será possível o atendimento da sua proposta esse ano. Informamos que sua proposta será automaticamente alocada para execução em 2021 seguindo as disponibilidades das agendas da instalação MAS.

Qualquer dúvida, estamos à disposição.

Atenciosamente,

SAU – Serviços de apoio ao usuário. “

Aviso Legal: Esta mensagem e seus anexos podem conter informações confidenciais e/ou de uso restrito. Observe atentamente seu conteúdo e considere eventual consulta ao remetente antes de copiá-la, divulgá-la ou distribuí-la. Se você recebeu esta mensagem por engano, por favor avise o remetente e apague-a imediatamente.

Disclaimer: This email and its attachments may contain confidential and/or privileged information. Observe its content carefully and consider possible querying to the sender before copying, disclosing or distributing it. If you have received this email by mistake, please notify the sender and delete it immediately.