

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudos funcionais de uma possível cisteíno  
protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Guilherme Rodrigo Reis Monteiro dos Santos

São Carlos – SP  
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudos funcionais de uma possível cisteíno  
protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Guilherme Rodrigo Reis Monteiro dos Santos

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal de São Carlos como pré-  
requisito para a obtenção do grau  
de MESTRE.

São Carlos – SP  
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S194ef

Santos, Guilherme Rodrigo Reis Monteiro dos.  
Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de  
*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* / Guilherme Rodrigo Reis  
Monteiro dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2007.  
76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2007.

1. Biologia molecular. 2. Biotecnologia. 3. Clonagem. 4.  
Expressão gênica. 5. Mutação cromossômica. 6. Bactérias  
fitopatogênicas. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

Orientadores

---

Flávio Henrique da Silva

---

Maria Teresa Marques Novo

“Ao contrário do que se quer fazer crer, os estudantes não se rendem a aprender, eles querem simplesmente o direito de discutir o que lhes é ensinado, de verificar o que está na sua frente, de se assegurar de que não estão perdendo tempo”.

*Autor desconhecido*

Aos meus pais, por tudo.  
Amo vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Teresa Marques Novo pela oportunidade, confiança e as longas conversas de onde saíram inúmeras idéias que resultaram no bom andamento do projeto;

Ao Prof. Dr. Julio Cezar F. de Oliveira, pelo apoio, dicas e sugestões que geraram grandes resultados e perspectivas para o futuro do trabalho;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Inês Tiraboschi Ferro do Laboratório de Biologia Molecular (LBM-UNESP – Jaboticabal) pelas facilidades e disponibilidades oferecidas em seu laboratório durante o período que estive por lá;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Ulian de Araujo do Instituto de Física da USP – São Carlos, pelas facilidades oferecidas em seu laboratório;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Keico Okino Nonaka pela ajuda com o manuseio e sacrifício dos animais utilizados na obtenção dos anticorpos;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloisa A. Sobreiro por manter seu laboratório sempre de portas abertas quando precisei de um socorro imediato;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana K. Carmona, pelas facilidades oferecidas em seu laboratório, nas inúmeras vezes que necessitei realizar os experimentos de atividade enzimática;

À Simone, Doutoranda da UNIFESP, pela disposição de estar realizando os ensaios de atividade enzimática;

Ao Cristiano, mestrando da UNESP – Jaboticabal, por se dispor a ajudar nos experimentos e elaboração da curva de crescimento;

Ao Cláudio e Tatiane, secretários do Departamento de Genética e Evolução, e ao Rodrigo, técnico em computação do Departamento, pelas inúmeras ajudas e facilidades oferecidas quando preciso;

Ao funcionário do Departamento de Genética e Evolução, Ritinha, Piau, Jorjão;

Os secretários da Biotecnologia Adans e Mauro, pelas ajudas quanto às burocracias departamentais;

Aos amigos Otávio, Gustavo, Álvaro, Bruno, Guilherme que mesmo distantes sempre estiveram dispostos a ajudar;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Andréia, Andréa, César, Carol, Simone, Márcia, Rosseli, Mylene, Kelly, Dani, Daniel, Darlan, Vivi, Wendy;

Aos amigos do Departamento de Genética e Evolução, Welington, Ana Karina, Fernando, Paulo, Ervilha, Marcelo, Iderval, Julia, Rosangela, Cervine, Débora, Lelê, Mauricio, Artur;

Aos amigos da Biotecnologia, Sidnei, Luciana, Mabel e Adilson, que enfrentaram o desafio de tornar a Biotecnologia realidade;

Ao amigo Gaúcho e as cachaçadas;

À amiga Flávia, pelos inúmeros momentos agradáveis de descontração e animação;

Aos meus irmãos e familiares pelo apoio e compreensão;

À Flávia, amiga e companheira para todos os momentos.

## Resumo

As cisteíno proteases são enzimas presentes nos diferentes organismos e são caracterizadas pela presença de um resíduo de cisteína em seu sítio ativo. Essas proteases apresentam relevante papel no metabolismo desses organismos. No caso de organismos patogênicos, por exemplo, podem estar envolvidas no processo de patogenicidade por gerar o desequilíbrio das funções biológicas do hospedeiro (regulação bioquímica e fisiológica). Por esta razão, essas enzimas tem sido alvo de grande interesse por parte dos pesquisadores, uma vez que se encontram envolvidas em diversas doenças.

Neste trabalho visamos à expressão em *E. coli* da forma recombinante de uma ORF XAC2853 predita como uma cisteíno protease na anotação do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. Esta bactéria é responsável pelo cancro cítrico, uma infecção que afeta citros, caracterizando-se pelo aparecimento de lesões superficiais e queda precoce de folhas e frutos, resultando em grandes perdas para a agricultura mundial. Uma vez expressa a proteína, a mesma foi purificada por afinidade em coluna de níquel assim como pela solubilização dos corpos de inclusão, pois esta proteína encontra-se quase que exclusivamente insolúvel. A proteína purificada foi utilizada nos estudos de atividade contra os substratos sintéticos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA não sendo verificada atividade proteolítica. No entanto, estudos de atividade realizados *in vivo*, com clones de *E. coli* expressando a proteína recombinante, demonstraram atividade proteolítica contra a caseína.

Na busca de demonstrar o envolvimento desta provável protease na patogenicidade de *Xac*, foi realizado o “nocaute” do gene cromossomal que a codifica na bactéria. Um mutante com o gene inativado pela inserção de um transposon foi obtido e caracterizado, e os ensaios de crescimento desse mutante, comparado com o crescimento da linhagem selvagem, permitem concluir que a cisteíno protease estudada pode estar envolvida na patogenicidade de *Xac*, uma vez que a inativação do seu gene pela inserção do transposon gerou uma linhagem menos virulenta. Desta forma, esta proteína pode ser um alvo promissor para o combate ao cancro cítrico.

## Abstract

Cysteine proteases are enzymes found in many organisms and are characterized by the presence of cysteine residue in their active site. These proteases play an important role in the organism metabolism. In pathogenic organisms, for example, cysteine proteases may be involved in the pathogenicity process by unbalancing of the biological functions of the host (biochemical and physiological regulation). Since they are involved in several diseases, these enzymes have been considered of great interest for many researchers.

The current work aims to express in *E. coli* a recombinant form of an ORF XAC2853 predicted to be a cysteine protease by annotation of the genome of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. This bacterium is responsible for citrus canker, an infection affecting citrus species which can be evidenced by superficial lesions and early fall of leaves and fruits, thus resulting in significant losses to world agriculture. After expression, the protein was purified by nickel column affinity chromatography and inclusion body solubilization, inasmuch as this protein is almost fully insoluble.

The purified protein was used to investigate the activity against such synthetic substrates as Z-FR-MCA and Z-RR-MCA, and no proteolytic activity was found. However, studies *in vivo* using clones of *E. coli* expressing the recombinant protein evidenced proteolytic activity against casein.

In an attempt to demonstrate the involvement of this probable protease in the pathogenicity of *Xac*, the knockout of the chromosomal gene in *Xac* was performed. A mutant having the disrupted gene was obtained and characterized. The assays of the mutant growth, when compared with the wild strain, indicate that the cysteine protease may be involved in the pathogenicity of *Xac*, since the inactivation of its gene by the transposon insertion resulted in a less virulent strain. In this sense, this protein may be a promising target for the combat of citrus canker.

## Índice de Figuras

FIGURA 1. LESÕES CARACTERÍSTICAS DO CANCRO CÍTRICO.	17
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDEO PTZ57R/T.	27
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO PÉT28A.	28
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO PÉT32A.	29
FIGURA 5. REAÇÃO DE INSERÇÃO DO TRANSPOSON.	42
FIGURA 6. MAPA DO TRANSPOSON.	43
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON NA ORF PARA A CISTEÍNO PROTEASE.	45
FIGURA 8. ALINHAMENTO DA ORF DE CISTEÍNO PROTEASE DE XAC.	51
FIGURA 9. ORF PARA A CISTEÍNO PROTEASE E A SEQÜÊNCIA DA PROTEÍNA TRADUZIDA.	52
FIGURA 10. ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO.	53
FIGURA 11. TESTE DE EXPRESSÃO, SOLUBILIDADE E PURIFICAÇÃO DA CISTEÍNO PROTEASE DE XAC SEM O PEPTÍDEO SINAL.	54
FIGURA 12. PURIFICAÇÃO EM CONDIÇÕES DESNATURANTES.	55
FIGURA 13. TESTE DE ATIVIDADE <i>IN VIVO</i> .	58
FIGURA 14. ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS EM <i>E. COLI</i> .	59
FIGURA 15. GEL DE AGAROSE DO PCR DAS COLÔNIAS DE <i>E. COLI</i> CONTENDO O PLASMÍDEO PTZ57R/T_CP-TN-KAN.	60
FIGURA 16. MAPEAMENTO DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO O TRANSPOSON INSERIDO NO GENE PARA CISTEÍNO PROTEASE.	61
FIGURA 17. SEQÜÊNCIA DO GENE DA CISTEÍNO PROTEASE COM INSERÇÃO DO TRANSPOSON.	62
FIGURA 18. ANÁLISE POR PCR DAS COLÔNIAS DE XAC RESISTENTES A CANAMICINA.	63
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SÍTIO DE RECONHECIMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS.	63
FIGURA 20. ANÁLISE POR PCR DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON NO DNA GENÔMICO DE XAC.	64
FIGURA 21. COMPARAÇÃO DO DNA GENÔMICO DA LINHAGEM SELVAGEM E MUTANTE POR <i>SOUTHERN BLOT</i> .	65
FIGURA 22. EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EM FOLHAS DE CITROS.	66
FIGURA 23. CURVA DE CRESCIMENTO <i>IN VIVO</i> : LINHAGENS SELVAGEM E MUTANTE.	68

## Índice de Tabelas

TABELA 1. OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR A ORF (XAC 2853).	32
TABELA 2. OLIGONUCLEOTÍDEOS INTERNOS A ORF (XAC2853).	33
TABELA 3. DESVIO PADRÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO <i>IN VIVO</i> .	67

## Lista de abreviaturas

°C	Grau Celsius
C-terminal	Região carbóxi-terminal da proteína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
D.O.	Densidade óptica
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
E64	<i>Trans</i> -epoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanino)-butano
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
g	Gramas
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilo Dalton
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MW	Molecular Weight (peso molecular)
ng	Nanograma
Ni	Níquel
nm	Nanômetro
N-terminal	Região amino-terminal da proteína
ORF	“ <i>Open Reading Frame</i> ” (“fase aberta de leitura”)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salino fosfatado
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” (“reação em cadeia da polimerase”)
pET28a_CYST	Plasmídeo de expressão contendo a ORF XAC2853 completa

pET28a_CYST-SN	Plasmídeo de expressão contendo a ORF XAC2853 com deleção do provável peptídeo sinal (fragmento N-terminal de 24 pb)
pET28a_CYST_2FR	Plasmídeo de expressão contendo a ORF XAC2853 com deleção de 75 além do peptídeo sinal
pET28a_CYST_3FR	Plasmídeo de expressão contendo a ORF XAC2853 com deleção de 177 pb além do peptídeo sinal
pM	Picomolar
pTZ57R/T_CP-TN-Kan	Plasmídeo de propagação contendo a ORF XAC2853 nocauteada pela inserção do transposon
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TE	Tris-EDTA
Tris	(Hidroximetil) aminometano
U	Unidades
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactosídeo
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Z-FR-MCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amido-4metilcomarina
Z-RR-MCA	Carbobenzoxi-arginina-arginina-7-amido-4metilcomarina
$\Delta$ Xac2358	Linhagem de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> contendo o gene para cisteíno protease inativado pela inserção do transposon
$\mu$ Fa	Micro Faraday
$\mu$ L	Micro litros
$\Omega$	Ohm

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 CISTEÍNO PROTEASES RELACIONADAS À PAPAÍNA	20
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1 LINHAGENS BACTERIANAS	25
3.2 ESTUDO ESTRUTURA-FUNÇÃO DA ORF XAC2853	25
3.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO	26
3.4 PLASMÍDEOS	26
3.5 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL (MINI-PREP)	29
3.6 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>XAC</i>	30
3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> )	31
3.7.1 PCR de DNA genômico	31
3.7.2 PCR de DNA plasmidial	31
3.8 AMPLIFICAÇÃO DA ORF DA CISTEÍNO PROTEASE: SEQÜÊNCIA COMPLETA E SEQÜÊNCIAS PARCIAIS	32
3.9 CLONAGEM DA ORF COMPLETA E DE SEUS FRAGMENTOS	33
3.10 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA CISTEÍNO PROTEASE RECOMBINANTE	35
3.11 PURIFICAÇÃO DA CISTEÍNO PROTEASE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE E RENATURAÇÃO ( <i>REFOLDING</i> )	36
3.12 ENSAIOS DE ATIVIDADE DA CISTEÍNO PROTEASE	37
3.12.1 Ensaio de atividade <i>in vitro</i>	37
3.12.2 Ensaio de atividade <i>in vivo</i>	38
3.13 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	39
3.14 <i>WESTERN BLOTTING</i>	39
3.15 INSERÇÃO <i>IN VITRO</i> DO TRANSPOSON NO GENE DA CISTEÍNO PROTEASE E TRANSFORMAÇÃO DA <i>E. COLI</i>	41
3.16 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>XAC</i> PARA OBTENÇÃO DE LINHAGEM MUTANTE	44
3.17 SELEÇÃO DE <i>XAC</i> MUTANTE NO GENE DA CISTEÍNO PROTEASE	44

3.17.1 Análise da presença do transposon no DNA genômico de <i>Xac</i> por PCR	45
3.17.2 Análise da presença do transposon no DNA genômico de <i>Xac</i> por <i>Southern blot</i>	46
3.18 ESTUDOS FUNCIONAIS DA MUTAÇÃO NA ORF XAC2853	47
3.18.1 Avaliação do efeito da mutação <i>in vivo</i>	47
3.18.2 Avaliação do crescimento das bactérias mutantes <i>in vivo</i>	48
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
4.1 ESTUDO ESTRUTURA-FUNÇÃO DA ORF XAC2853	50
4.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM	52
4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	53
4.4 ENSAIO DE ATIVIDADE	56
4.4.1 Ensaio de atividade <i>in vitro</i>	56
4.4.2 Ensaio de atividade <i>in vivo</i>	56
4.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E <i>WESTERN BLOT</i>	59
4.6 INTERRUÇÃO DO GENE POR INSERÇÃO DE UM TRANSPOSON	59
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE DE <i>XAC</i> ( <i>XAC</i> $\Delta$ <i>XAC2853</i> ) POR PCR	62
4.8 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE DE <i>XAC</i> ( <i>XAC</i> $\Delta$ <i>XAC2853</i> ) PELA ANÁLISE DE <i>SOUTHERN BLOT</i>	64
4.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MUTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	65
4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MUTAÇÃO NA CURVA DE CRESCIMENTO EM CITROS	67
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>6 PERSPECTIVAS</b>	<b>70</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Xanthomonas* compõe um grupo economicamente importante de bactérias flageladas, Gram-negativa, com morfologia de bastonete, de respiração aeróbica e não exigente nutricionalmente (GRAHAM *et al.*, 2004; MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2003). Como produtoras da goma xantana, um polissacarídeo (biopolímero) de ampla utilização na indústria alimentícia, farmacêutica, química e petroquímica, despertam grande interesse biotecnológico (LÓPEZ, MORENO e RAMOS-CORMENZANA, 2001). A goma xantana é utilizada na indústria alimentícia bem como em outros seguimentos como espessante, estabilizante e emulsificante. Na petroquímica é o biopolímero mais utilizado para a recuperação terciária de petróleo.

Outro aspecto importante das bactérias pertencentes a este gênero é o fato destas estarem associadas a diversas patologias de plantas. Dentre as inúmeras doenças agrícolas causadas por bactérias deste gênero encontramos o cancro cítrico, o qual é provocado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). Como agente do cancro cítrico, esta bactéria causa grandes perdas econômicas pelos prejuízos causados à citricultura. Dados do Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura – revelam que, em 2006, foram totalizadas, entre plantações comerciais, não comerciais e viveiros, 3.880 ocorrências do cancro cítrico no estado de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro. Neste mesmo período foram erradicadas das mesmas fontes um total de 1.870.929 plantas para o controle da doença (FUNDECITRUS, 2007).

O cancro cítrico, uma das mais importantes doenças agrícolas, ataca todas as variedades e espécies de citros, em todo o mundo, desde as mais susceptíveis como o *Citrus limon* (limão siciliano, limão galego, entre outros) até as mais resistentes, como é o caso da *Citrus reticulata* Blanco (ponkan) e da *Citrus deliciosa* Tenore (mexerica-do-rio).

A doença é endêmica em alguns países do sudoeste da Ásia, de onde se difundiu para outros produtores de citros (DAS, 2003; CANTEROS, 2004). No Brasil, a primeira ocorrência do cancro cítrico foi registrada em 1957 na região de Presidente Prudente, no estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2007).

A disseminação dessa doença, causada pela bactéria *Xac*, se dá de forma muito simples, tendo como principal agente disseminador o próprio homem, por meio do trânsito indiscriminado de pessoas nos pomares, pelo manuseio de materiais de colheita, veículos, mudas e outros materiais cítricos contaminados. A própria natureza também age como agente dispersor, uma vez que a bactéria pode ser transportada pelo vento, chuva ou mesmo pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), a qual facilita a penetração e o desenvolvimento da bactéria na planta (CANTEROS, 2004; DAS, 2003; FUNDECITRUS, 2007).

A infecção, presente nos tecidos aéreos da planta (folhas, frutos e ramos), se dá, quando em tecidos jovens, por aberturas naturais, como os estômatos. Para o desenvolvimento em tecidos mais velhos é necessária ocorrência de um ferimento por onde a bactéria entra, desencadeando os sinais da doença. Esses ferimentos, que possibilitam a entrada da bactéria no tecido da planta, são, em geral, causados por material de colheita ou veículos que transitam nos pomares.

Os primeiros sinais da doença aparecem nas folhas, tecido de maior prevalência da infecção de onde se alastram para outros segmentos das plantas como nos frutos e nos ramos. Nas folhas, em ambos os lados, os primeiros sinais do cancro cítrico são pequenas lesões salientes, de cor amarelada que com o desenvolvimento vão adquirindo a tonalidade marrom. Nos estágios mais avançados elas se tornam corticosas de centro marrom e com um anel amarelado ao redor da infecção (Figura 1).



**Figura 1. Lesões características do cancro cítrico.** Folha, frutos e ramo infectados por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, apresentando as lesões provocadas em decorrência do cancro cítrico. Fonte da figura: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>.

No fruto, as lesões se manifestam pelo surgimento de pequenas manchas amareladas com um ponto marrom no centro, que aos poucos vão crescendo, podendo ocupar grande parte da casca do fruto (Figura 1). Quando ocorrem em estágios prematuros do desenvolvimento do fruto podem provocar o rompimento da casca, a má formação do fruto ou mesmo a sua queda prematura. Os frutos infectados em estágio de desenvolvimento mais avançado sofrem alterações externas que os tornam sem valor comercial (DAS, 2003). Nos ramos as lesões também são salientes, na forma de crostas de cor parda (Figura 1).

Não há tratamentos nem existe um controle químico eficaz para a doença, de tal modo que o método adotado para o controle do cancro cítrico em São Paulo (Brasil), na Flórida (E.U.A) e em alguns países asiáticos é a erradicação de plantas contaminadas (DAS, 2003; CANTEROS, 2004). Em geral, o que se determina é a erradicação da planta contaminada e de todas as árvores num raio de 30 metros ao redor do foco de identificação da doença. Todavia, quando numa plantação há mais de 0,5% de árvores contaminadas, todo o pomar deve ser erradicado. (Lei Estadual de execução a cargo do Fundecitrus) (FUNDECITRUS, 2007).

Por se tratar de bactéria de grande importância econômica, *Xac* é alvo de grande interesse por parte dos pesquisadores. A conclusão do seqüenciamento de seu genoma (da SILVA *et al.*, 2002) gerou uma contribuição em potencial para a agricultura de diversos países, pois possibilita ampliar o conhecimento a respeito do microrganismo e das interações moleculares com o seu hospedeiro. Esses novos conhecimentos podem auxiliar no desenvolvimento de produtos e/ou métodos que possam contribuir no controle do cancro cítrico. Inúmeros trabalhos importantes em relação à biologia e patogenicidade de *Xanthomonas* vêm sendo realizados após o seqüenciamento do seu genoma, buscando uma forma rápida e específica para a identificação do patógeno (PARK *et al.*, 2006) como também enfocando a importância de se conhecer os mecanismos de interação entre bactéria/hospedeiro (GÜRLENBECK, THIEME e BONAS, 2006).

Alguns trabalhos descrevem que proteases podem estar envolvidas no estabelecimento e desenvolvimento de doenças causadas por *Xanthomonas* (BÜTTNER *et al.*, 2003; HOTSON, *et al.*, 2003; HOTSON e MUDGETT, 2004; RODEN *et al.*, 2004; ALEGRIA *et al.*, 2005; WEBER e KOEBNIK, 2006). Recentemente Santos e Medrano (2007) demonstraram a expressão, purificação e caracterização de uma aminopeptidase (XAC2987) de *Xac* que apresenta uma vasta

especificidade de substratos. Proteases são enzimas reconhecidamente envolvidas em processos de invasão de hospedeiros por organismos patogênicos (EAKIN *et al.*, 1993; MOTTRAM *et al.*, 1996; APARICIO, SCHARFSTEIN e LIMA, 2004; ROSENTHAL, 2004; JEONG *et al.*, 2006) o que as tornam alvos em potencial para o desenvolvimento de drogas para o combate ao patógeno.

As proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos das proteínas. Elas são encontradas em todos os sistemas biológicos, de vírus a vertebrados e compreendem aproximadamente 2% dos genes expressos (SAJID e MACKERROW, 2002). A atividade destas enzimas é chamada de clivagem proteolítica, podendo inclusive ser um mecanismo de ativação ou inativação de enzimas, o que as tornam enzimas-chave para uma ampla variedade de processos biológicos. As proteases estão envolvidas, por exemplo, na nutrição, regulação do ciclo celular, crescimento celular, diferenciação, invasão do hospedeiro, processamento de antígenos e angiogênese, entre outros, pois catalisam a hidrólise da ligação peptídica entre aminoácidos específicos dentro da cadeia polipeptídica (HOOPER, 2002; LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002; LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 1998).

A ação das proteases é essencial às células e organismos, e sua disfunção está relacionada com o desenvolvimento de várias doenças tais como, desordens neurológicas (Alzheimer), metástases, inflamações, arteriosclerose, artrites doenças imunológicas e uma variedade de parasitoses infecciosas (HOOPER, 2002; LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002; RZYCHON, CHMIEL e STEC-NIEMCZYK, 2004).

As peptidases constituem uma classe enzimática amplamente variada, sendo assim podem ser classificadas de diferentes formas, tendo para isto três principais critérios: (a) tipo da reação de catálise; (b) relacionamento evolutivo da seqüência e estrutura e (c) natureza química do sítio catalítico.

Com base no tipo de reação catalítica as peptidases podem ser classificadas como endopeptidases ou proteínases e exopeptidases, dependendo da posição da ligação peptídica a ser clivada. Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- (amino) e C- (carbóxi) terminal. Quanto às exopeptidases, estas atuam somente nas porções finais das cadeias polipeptídicas, na região N- ou C-terminal (HOOPER, 2002). Aquelas que atuam na região N-terminal podem liberar um, dois ou três peptídeos

(aminopeptidases, dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases respectivamente). As exopeptidases que atuam na região C-terminal podem liberar um ou dois peptídeos (carboxipeptidases e peptidil-dipeptidases respectivamente).

Baseando-se na seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica as proteases são agrupadas dentro das diferentes famílias as quais podem ser novamente subdivididas em “clãs” que acomodam as famílias de peptidases derivados de um ancestral comum (RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2006).

Tendo como base o grupo funcional presente em seu sítio ativo, as proteases podem ser classificadas em cinco principais grupos: serino, aspartil, metalo, treonina e cisteíno proteases (LECAILE, KALETA e BRÖMME, 2002). Serino proteases são caracterizadas pela presença de um grupamento serino em seu sítio ativo. Aspartil proteases ou proteases ácidas são endopeptidases que dependem de um resíduo de ácido aspártico em seu sítio catalítico. Metalo proteases são caracterizadas pelo requerimento da ligação de um íon de metal divalente, em geral o zinco, em seu sítio ativo. Treonina proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de treonina em seu sítio ativo. As cisteíno proteases são proteases que dependem da formação de uma dupla de resíduos no sítio catalítico formada pelo resíduo de cisteína e histidina, podendo ter outros resíduos presentes no sítio catalítico. Considerando que o foco desse trabalho é uma fase aberta de leitura ou ORF (*Open Reading Frame*) predita para cisteíno protease relacionada à família da papaína, a mesma será descrita com maiores detalhes.

### **1.1 Cisteíno proteases relacionadas à papaína**

A primeira purificação e caracterização de uma cisteíno protease ocorreu em 1879 e esta foi denominada de papaína por ser extraída do mamão (*Carica papaya*) (SAJID e MACKERROW, 2002). Atualmente sabe-se que as cisteíno proteases estão presentes em todos os reinos, de vírus a mamíferos, e podem ser agrupadas em 60 famílias. Cada família contém membros que apresentam relacionamento evolutivo entre si, permitindo o agrupamento destas em 13 subfamílias e 9 clãs (RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2006).

Uma característica comum às cisteíno proteases pertencentes à família da papaína é o sítio catalítico conservado que apresenta os resíduos de cisteína, histidina e asparagina (LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002). Outra característica comum à estrutura tridimensional destas enzimas é a existência de uma estrutura bilobada com o sítio catalítico localizado na reentrância dos lobos (WIEDERANDERS, 2003; RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2006).

O mecanismo de ação das cisteíno proteases usualmente segue uma reação em dois passos. Em um primeiro momento (acilação) temos a hidrólise da ligação peptídica e formação de uma ligação covalente resultando no intermediário enzima-peptídeo. A acilação é seguida pela desacilação, processo no qual uma molécula de água promove o ataque nucleofílico do intermediário enzima-peptídeo, provocando a hidrólise do peptídeo e restauração da enzima (RAO *et al.*, 1998).

Muitas cisteíno proteases são sintetizadas como precursores que contêm um pró-domínio e o domínio ativo. A pró-região encontra-se envolvida em diversas funções, entre elas a regulação da atividade enzimática (SAJID e MACKERROW, 2002; WIEDERANDERS, KAULMANN e SCHILLING, 2003).

Inúmeros trabalhos demonstram a importância das cisteíno proteases no ciclo de vida ou patogenicidade de parasitas dentro da célula hospedeira, o que as tornam um interessante alvo no desenvolvimento de quimioterápicos para diversas doenças (DUBIN *et al.*, 2005; EAKIN *et al.*, 1993; HELLBERG *et al.*, 2002; MACKERROW, ENGEL e CAFFREY 1999; OCÁDIZ *et al.*, 2005; SAJID e MACKERROW, 2002; BAH *et al.*, 2006). Estas enzimas possuem uma grande diversidade funcional, como adaptabilidade a diferentes substratos e estabilidade em diversos ambientes biológicos.

Nos organismos primitivos as cisteíno proteases apresentam fundamental importância na digestão de proteínas fagocitadas (WIEDERANDERS, 2003). Em muitos parasitas as cisteíno proteases agem extracelularmente ajudando o parasita na invasão tecidual, ganho de nutrientes, ou evasão do sistema imune do hospedeiro (SAJID e MCKERROW, 2002; RZYCHON, CHMIEL e STEC-NIEMCZYK 2004)

O protozoário *Plasmodium falciparum*, responsável pela transmissão da malária, é um exemplo bem estudado de microrganismo que utiliza proteases para catalisar a degradação de proteínas do hospedeiro. As proteases, incluindo as cisteíno proteases, como, por exemplo, a falcipaina, são responsáveis pela ruptura e

invasão dos eritrócitos. Foi verificado que inibidores desta enzima impedem que ocorra a degradação da hemoglobina, bloqueando o desenvolvimento do parasita (REED, 2000).

Muitas cisteíno proteases produzidas por bactérias patogênicas são consideradas importantes fatores de virulência e algumas de suas funções já são conhecidas no desenvolvimento de algumas doenças. Exemplo disso é a cisteíno protease da bactéria *Porphyromonas gingivalis*, denominada periodontáina, a qual está envolvida na periodontite (MADDEN, CLARK e KURAMITSU, 1995). Esta enzima é responsável pela geração de nutrientes, na forma de pequenos peptídeos, que são fontes indispensáveis de carbono e energia para o microrganismo.

Em virtude da grande importância apresentada pelas proteases em vários processos fisiológicos e na patogenicidade de vários organismos, essa(s) enzima(s) se constituem em um interessante foco de estudo em *Xac*.

Os mecanismos moleculares de patogenicidade da *Xac* em citros ainda não são totalmente esclarecidos. Além disso, ainda não se conhece uma maneira eficaz de combater o patógeno, o que torna urgente a realização de estudos que gerem perspectivas de controle desta praga, uma vez que a medida adotada como controle, a erradicação de citros, acarreta enormes prejuízos aos citricultores. A identificação, caracterização e estudos funcionais de cisteíno protease(s) de *Xac* podem contribuir para o desenvolvimento de instrumentos de combate a este patógeno, considerando que esta proteína pode ter uma provável participação no mecanismo de patogenicidade da *Xac*.

Para tanto é necessária a expressão recombinante e a purificação da proteína, bem como a realização de estudos mutacionais do gene cromossomal que a codifica em *Xac*, que possibilitem comparar *in vivo* e/ou *in vitro* as alterações no crescimento do patógeno mutante em relação ao selvagem quanto à virulência dos mesmos.

Estudos de caracterização de proteínas podem ser realizados pela análise de atividade da proteína após expressão heteróloga e purificação. Já estudos funcionais *in vivo* que permitam a caracterização do papel biológico da proteína no organismo, têm sido feitos, por exemplo, por meio da inserção no gene de interesse de um transposon, ou seqüência móvel de DNA, provocando o chamado nocaute gênico (do inglês, *knockout*). Esta técnica está baseada no fato de que a inserção do transposon provoca a perda de função do gene. Linhagens mutantes, que

apresentam a seqüência do transposon inserida em seu genoma, carregam a marca de resistência presente no transposon, o que permite uma fácil seleção das mesmas para caracterização. A linhagem mutante, no caso de um fitopatógeno, por exemplo, pode ser utilizada em estudos de infecção do hospedeiro, comparativamente à linhagem selvagem, o que possibilita inferir o envolvimento ou não do gene *nocautado* no processo de patogenicidade.

Transposons ou seqüências móveis de DNA estão presentes tanto no genoma de procariontes como de eucariontes. Atualmente, estas seqüências são amplamente reconhecidas como poderosas ferramentas para estudos estruturais e funcionais do genoma (GORYSHIN *et al.*, 2003; REZNIKOFF, 2006) e introdução de marcas físicas ou gênicas dentro de um DNA alvo. Com o objetivo de explicar o papel de fatores envolvidos em diferentes processos biológicos, inúmeros trabalhos têm focado as mutações pela inserção de transposon na identificação de cepas mutantes (EHRMANN *et al.*, 1997; GORYSHIN *et al.*, 2003; REZNIKOFF, 2006).

No entanto, estudos de mutações por meio do *nocaut* de genes que codificam para uma determinada proteína do patógeno freqüentemente têm pouco ou nenhum efeito no desenvolvimento do sinal da doença (TANG *et al.*, 1987; KAMOUN e KADO, 1990; HU *et al.*, 1992; DHARMAPURI e SONTI, 1999) demonstrando que uma somatória de fatores, tanto ambientais como também da variedade de proteínas, estão envolvidos no desenvolvimento do patógeno.

Neste trabalho, além da tentativa de caracterização da ORF (XAC2853) como uma cisteíno protease pela expressão e purificação da proteína recombinante correspondente e investigação da sua atividade catalítica, também foram realizados estudos mutacionais de *nocaut* gênico que permitiram inferir sobre a provável relação desta ORF com o processo de infecção da *Xac* em citros.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Caracterização funcional da ORF (XAC2853) anotada como cisteíno protease no genoma da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Clonagem e expressão da proteína em *E. coli*;
- Purificação da proteína recombinante;
- Estudos de atividade da cisteíno protease purificada;
- Obtenção de anticorpos contra a proteína recombinante;
- Pesquisa da cisteína protease recombinante em subfrações celulares de *E.coli* recombinante sob indução por IPTG e em *Xac* infectante de citros, por *Western Blot* ;
- Obtenção de um clone de *Xac* mutante pela inserção de um transposon no gene cromossomal para a cisteíno protease;
- Estudos do efeito da mutação no gene cromossomal para a cisteíno protease na fitopatogenicidade de *Xac*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens bacterianas

Para a clonagem e propagação dos vetores recombinantes a linhagem de *E. coli* utilizada foi a DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) (NOVAGEN).

A expressão da proteína recombinante foi realizada na linhagem *E. coli* Rosetta DE3 (F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm *lacY1* (DE3) pRARE (*argU*, *argW*, *ilx*, *glyT*, *leuW*, *proL*) (Cm<sup>R</sup>) (NOVAGEN). Esta linhagem bacteriana permite o controle dos níveis de expressão da proteína recombinante uma vez que a mesma apresenta em seu genoma cópia do gene para a T7 RNA polimerase sobre controle do promotor *lacUV5*, induzível por IPTG.

Os estudos funcionais da provável cisteína protease foram realizados com a linhagem 306 de *Xac*, gentilmente fornecida pelo Dr. Julio Cezar F. de Oliveira, Jovem Pesquisador (Programa FAPESP) do Departamento de Tecnologia da UNESP – Jaboticabal e atualmente docente da UNIFESP, Diadema. Esta linhagem (306) é a mesma que foi utilizada no seqüenciamento do genoma de *Xac* (da SILVA *et al.*, 2002).

#### 3.2 Estudo estrutura-função da ORF XAC2853

Para a realização de estudos que visem esclarecer as relações entre estrutura e função da possível cisteína protease de *Xac* 306 (anotada como XAC2853) foram realizados alinhamentos da sua seqüência com seqüências conhecidas, utilizando-se o software BLASTp disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Outros softwares utilizados foram Sinalp (NIELSEN *et al.*, 1997) para predição de seqüência sinalizadora presente na seqüência da proteína e o MULTIALIN (CORPET, 1988) disponível no endereço eletrônico <http://bioinfo.genopole-toulouse.prp.fr/multalin/multalin.html> que permite a

comparação entre as regiões similares da proteína. Para a classificação da enzima foi utilizado o banco de dados MEROPS (RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2006) (<http://www.merops.sanger.ac.uk>).

### 3.3 Meios e condições de crescimento bacteriano

Para o crescimento e expressão da proteína, as bactérias foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L) (USB) a 300 rpm e 37°C para as linhagens de *E. coli* e 28°C para a linhagem de *Xac*. As colônias recombinantes, após crescimento, foram mantidas em freezer -80°C, em solução LB contendo 15% de glicerol.

No caso das linhagens de *E. coli* o meio continha o antibiótico (25 µg/mL) de seleção específico para cada plasmídeo. Já a linhagem de *Xac* selvagem foi crescida na ausência de antibiótico e a linhagem mutante (*Xac* Δ*Xac*2853) foi crescida em meio contendo canamicina (50 µg/mL), marca de seleção do transposon.

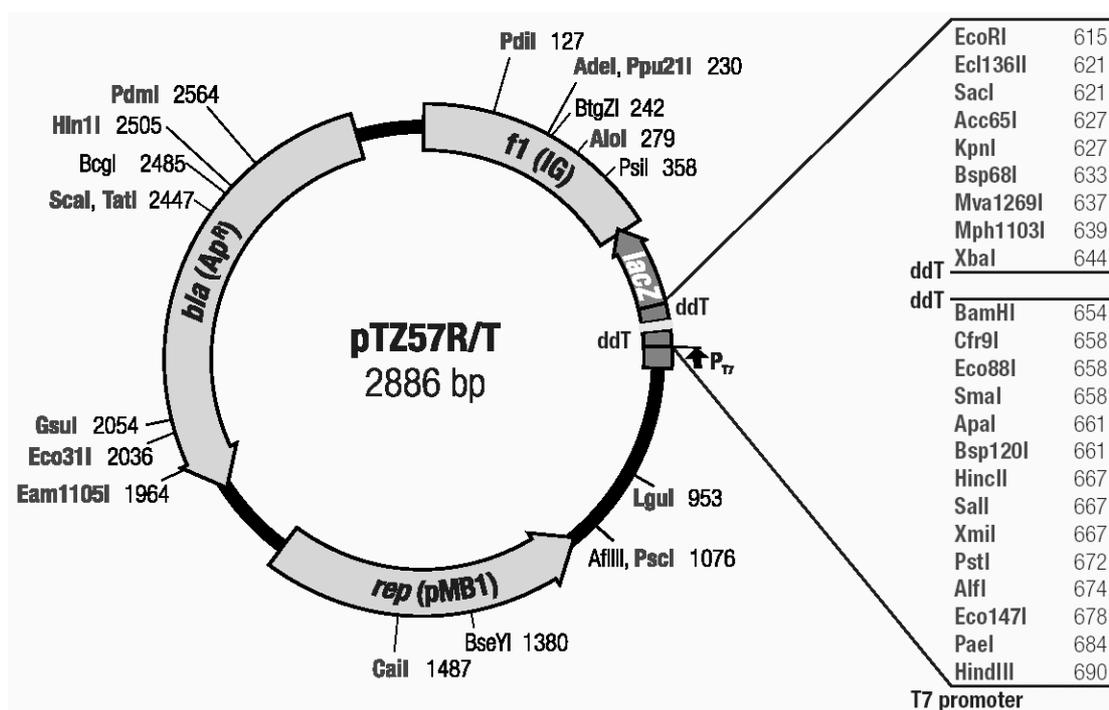
Para obtenção de colônias isoladas, a cultura bacteriana foi plaqueada em meio sólido LB ágar (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, ágar 15 g/L) e colocada para crescer durante 12 horas. As condições de temperatura para o crescimento foram as mesmas acima mencionadas.

Para a contagem no número de colônias viáveis e posterior elaboração da curva de crescimento, as *Xac* foram crescidas em placas de Petri contendo meio TSA sólido (Tryptona 1%, Sacarose 1%, Glutamato de Sódio 0,1%). As condições de crescimento foram as mesmas já descritas acima.

### 3.4 Plasmídeos

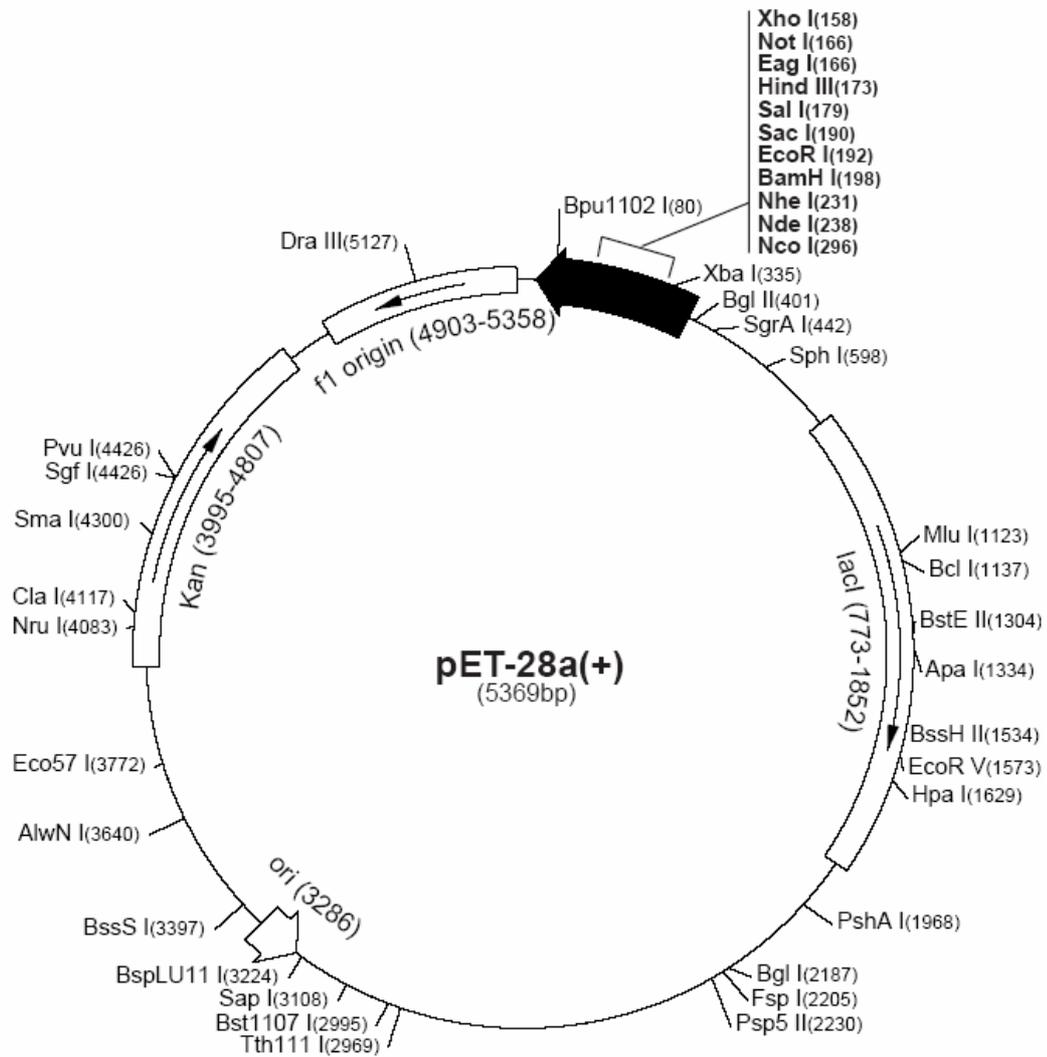
Para a clonagem da seqüência codificadora da cisteíno protease foi utilizado o plasmídeo pTZ57R/T (Fermentas) (Figura 2). Este plasmídeo apresenta a

característica de ser previamente clivado com *Eco32I* e tratado com a desoxinucleotídeo transferase deixando ambas as extremidades livres com 3'-ddT. A clonagem neste plasmídeo é favorecida pela característica da *Taq* DNA polimerase adicionar na extremidade 3' do produto amplificado um nucleotídeo extra de adenina permitindo assim o pareamento entre as extremidades livres do plasmídeo e do fragmento amplificado.

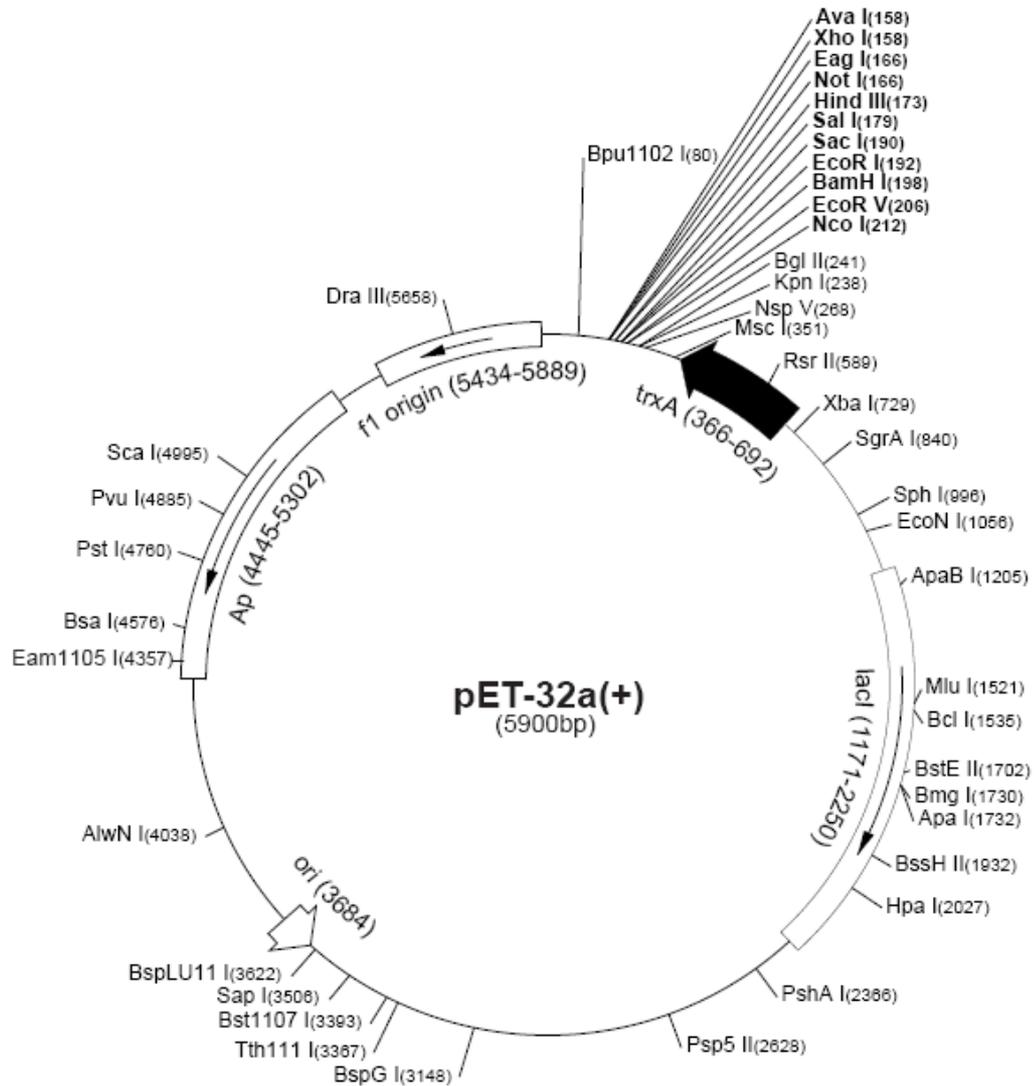


**Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo pTZ57R/T.** Plasmídeo usado para a clonagem da ORF da cisteína protease e de seus diferentes fragmentos.

A expressão da proteína foi feita utilizando-se os plasmídeos pET28a (Figura 3) e pET32a (Figura 4) (Novagen). Estes plasmídeos apresentam como característica o fato de a proteína recombinante ser expressa com uma cauda extra na porção N-terminal composta por seis histidinas, denominada de “His-Tag” que facilita a purificação da proteína em coluna de afinidade ao níquel. No caso do plasmídeo pET32a, além do “His-Tag” a expressão neste vetor também possibilita a fusão da proteína recombinante com a proteína tioredoxina possibilitando uma maior solubilidade da proteína expressa.



**Figura 3. Representação do plasmídeo de expressão pET28a.** Plasmídeo usado na expressão da cisteíno protease e de seus diferentes fragmentos.



**Figura 4. Representação do plasmídeo de expressão pET32a.** Plasmídeo usado na expressão do fragmento para a cisteína protease sem o peptídeo sinal.

### 3.5 Extração do DNA plasmidial (mini-prep)

Para as extrações do DNA plasmidial, realizadas no decorrer deste trabalho, as células de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foram crescidas em 5 mL de meio LB a 300 rpm e 37°C durante 12 horas. Após o crescimento, 2 ml da cultura foram centrifugados a 12000 g por 2 minutos em tubos de 1,5 mL. O precipitado foi suspenso em 200 µL do tampão de suspensão (Tris-HCL 100 mM, pH 7,5 e EDTA 10mM) e 5 µL de RNase a 10 ng/mL foram adicionados. Após 5 minutos de

incubação adicionou-se 200  $\mu$ L da solução de lise celular (NaOH 0,2 M; SDS 1%). Após homogeneização (5 inversões do tubo) foram adicionados 200  $\mu$ L da solução neutralizadora (acetato de potássio 3 M pH 4,8). O material foi precipitado por centrifugação a 12000  $g$  e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado em tubo de 1,5 mL novo onde foram adicionados 2 volumes de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada por inversão e novamente levada a centrífuga por 10 minutos a 12000  $g$  e 4°C para a precipitação do DNA plasmidial. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e foi realizada nova centrifugação a 12000  $g$ , 4°C durante 5 minutos. Feita a lavagem o sobrenadante foi descartado e após secagem o precipitado foi suspenso em 20  $\mu$ L de água Milli-Q.

### **3.6 Extração do DNA genômico de *Xac***

O DNA genômico foi extraído para ser utilizado na amplificação por PCR (item 3.7.1) da ORF da cisteíno protease (item 3.8) e para caracterização do clone mutante de *Xac* após inserção de transposon no gene cromossomal da cisteíno protease (item 3.17).

Após 48 horas de crescimento em meio LB, as células (5 mL) foram coletadas por centrifugação a 12000  $g$  em tubos de 1,5 mL, sendo congeladas em nitrogênio líquido e em seguida maceradas com o auxílio de um pistilo. Após adição de 400  $\mu$ L do tampão TNES (Tris-HCl 250mM, pH7,5; NaCl 0,2 M; EDTA 100 mM; SDS 2%) incubou-se durante 3 horas a 55°C. Após incubação foram adicionados 25% do volume de NaCl 5 M para a precipitação das proteínas. O material foi centrifugado a 12000  $g$  por 30 minutos e o sobrenadante recuperado em um tubo de 1,5 mL novo. O DNA foi precipitado pela adição de 1 mL de isopropanol gelado e centrifugado por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% durante 5 minutos de centrifugação a 12000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, após secagem, foi suspenso em 100  $\mu$ L de água Milli-Q.

### **3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)**

As ampliações por PCR foram realizadas neste trabalho a partir do DNA genômico, para a amplificação inicial da seqüência completa da ORF XAC2853 como de seus fragmentos e na caracterização do clone mutante de *Xac* (item 3.17.1) como também a partir do DNA plasmidial (PCR de colônia), durante a clonagem em *E. coli* dessas seqüências nos vetor de propagação (PTZ57R/T) e de expressão (pET28a e pET32a).

#### **3.7.1 PCR de DNA genômico**

Cada reação de PCR (50 µL) continha 5 µL de DNA genômico, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (FERMENTAS), 10 µL de dNTPs 1,25 mM, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2 µM de oligonucleotídeos (direto e reverso) e 5 µL do tampão reação (Tris-HCl 100 mM, pH 8.5 e KCl 500 mM), fornecido junto com a enzima. Após desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, foram realizados 40 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, hibridização a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. A extensão final foi feita a 72°C durante 10 minutos.

#### **3.7.2 PCR de DNA plasmidial**

Cada PCR (volume final de 20 µL) continha aproximadamente 10 ng do DNA plasmidial, 0,5 U *Taq* DNA polimerase (Fermentas), dNTPs 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,5 µM dos oligonucleotídeos (direto e reverso) e 2 µL do tampão reação (Tris-HCl 100 mM, pH 8.5 e KCl 500 mM) fornecido junto com a enzima. Após desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, foram realizados 35 ciclos com 45 segundos de desnaturação a 95°C, hibridização a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi feita a 72°C durante 6 minutos.

### 3.8 Amplificação da ORF da cisteína protease: seqüência completa e seqüências parciais

As etapas iniciais de obtenção da ORF por amplificação, clonagem em plasmídeo de propagação (pTZ57R/T), posterior clonagem em plasmídeo de expressão (pET28a) e ensaios iniciais de expressão e purificação foram previamente realizadas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Marques Novo no “I Curso de Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes: *Bring your gene, take your protein!*”, realizado no LBM-DGE/UFSCar em 2003.

A ORF completa da cisteína protease (e fragmentos) foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de *Xac*. Para a amplificação foram desenhados oligonucleotídeos diretos e reverso (CYS\_F e CYS\_R, Tabela 1), tendo como base a seqüência de nucleotídeos depositada no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) durante a anotação dos genes de *Xac*. A inserção de sítios de reconhecimento para endonucleases na seqüência dos oligonucleotídeos (Tabela 1) teve o objetivo de facilitar a clonagem posterior em plasmídeo de expressão pET28a. Vale a pena lembrar que estes sítios de restrição não estão presentes na seqüência da ORF.

**Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar a ORF (XAC 2853).** Seqüência dos oligonucleotídeos contendo sítios de restrição (sublinhado) para facilitar a clonagem em plasmídeo de expressão.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'→3')	Endonuclease/ sítio de restrição
CYST_F	AGGCAC <u>CATATGA</u> ACACGCACCGTTTCG	<i>Nde</i> I (ca↓tatg)
CYST_R	CAGGAC <u>GATCC</u> CTAGTACACCACGTC	<i>Bam</i> HI (g↓gatcc)

Como as análises computacionais da ORF predizem a existência de uma seqüência peptídeo-sinal na extremidade 5' da região codificadora (SignalP – NIELSEN *et al.*, 1997), a qual poderia estar interferindo na solubilidade da proteína recombinante, foi desenhado um oligonucleotídeo SN\_F (interno ao códon inicial da ORF em 5') (Tabela 2) tendo como objetivo a amplificação de um fragmento sem o peptídeo-sinal. Oligonucleotídeos adicionais (2FR\_F e 3FR\_F na extremidade 5', Tabela 2) também foram utilizados para a amplificação (com subsequente clonagem

e expressão das seqüências obtidas) tendo como intuito obter fragmentos da proteína na forma mais solúvel, o que facilitaria a obtenção de maiores quantidades da mesma para a produção de anticorpos.

**Tabela 2. Oligonucleotídeos internos a ORF (XAC2853).** Seqüência dos oligonucleotídeos usados para a retirada do peptídeo sinal (SN\_F) e de outras porções mais internas (2FR\_F e 3FR\_F) na extremidade 5' da ORF, e os sítios de restrição introduzidos (sublinhados) para facilitar a clonagem em plasmídeo de expressão.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'→3')	Endonuclease/ sítio de restrição
SN_F	CCAAGGC <u>CATATGGC</u> AGTGCACGGCATG	<i>Nde</i> I (ca↓tatg)
2FR_F	ACCGC <u>CATATG</u> AGCACACCGCTGCCT	<i>Nde</i> I (ca↓tatg)
3FR_F	GCCGCT <u>CATATG</u> TTGACCGGTTGGTAT	<i>Nde</i> I (ca↓tatg)

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando o *kit* GFX<sup>tm</sup> DNA and Gel Band Purification Concert (GE HEALTHCARE).

### 3.9 Clonagem da ORF completa e de seus fragmentos

Os produtos purificados das amplificações foram utilizados para ligação no plasmídeo de propagação pTZ57R/T. Para a ligação em pTZ57R/T utilizou-se 50 ng do plasmídeo, 150 ng de produto amplificado purificado, 1 U da enzima T4 DNA ligase (INVITROGEN) e 2 µL do tampão de ligação (Tris-HCl 250 mM pH 7,6; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% massa/volume de polietilenoglicol-8000) fornecido com a enzima ligase, em volume total de 10 µL de reação. A reação de ligação foi mantida a 4°C durante 12 horas. O produto da ligação (5 µL) foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α (200 µL) previamente tratadas com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) para torná-las competentes. A transformação foi feita por choque térmico (42°C por 90 segundos, seguidos por incubação em gelo por um minuto). Após o choque térmico adicionou-se 800 µL de meio LB e a cultura foi incubada a 37°C com suave agitação durante 45 minutos. Após incubação, 200 µl da cultura

foram plaqueados em meio LB ágar contendo 25 µg/mL de ampicilina, além de X-Gal e IPTG.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 12 horas para crescimento das colônias. As possíveis colônias recombinantes (brancas) foram distinguidas visualmente das colônias não recombinantes (azuis). As colônias não recombinantes são azuis porque apresentam atividade inalterada da β-galactosidase codificada no plasmídeo (devido a ausência de inserto), o que permite a quebra do substrato X-Gal em galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol (produto de coloração azul), o mesmo não ocorrendo nos clones recombinantes. A inserção do fragmento de interesse no DNA plasmidial das colônias recombinantes foi confirmada por meio de PCR de colônia, ou seja, o DNA molde é obtido por fervura (5 minutos) de uma pequena fração da colônia em 20 µL de água. Cada PCR (20 µL) continha 3 µL do DNA molde. Os demais parâmetros da reação foram realizados conforme descrito no item 3.6.2, sendo aqui utilizado os oligonucleotídeos direto (M13 *forward*), cuja seqüência de reconhecimento encontra-se no plasmídeo, e reverso (CYST\_R) com seqüência de reconhecimento na extremidade 3' da ORF.

Identificada uma colônia recombinante cujo fragmento de amplificação apresentava o tamanho esperado, foi feita uma extração do DNA plasmidial como descrito no item 3.4 e o mesmo foi digerido com as enzimas de restrição capazes de reconhecer as seqüências presentes nos oligonucleotídeos específicos para a ORF em estudo. O produto da clivagem foi purificado a partir de gel de agarose 0,8% com o *kit* GFX<sup>tm</sup> DNA and Gel Band Purification Concert (GE HEALTHCARE). Cada fragmento purificado (ORF completa, ORF sem peptídeo sinal e os dois outros fragmentos), proveniente da clivagem, foi ligado ao vetor de expressão pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas utilizadas para retirar o inserto do plasmídeo pTZ57R/T.

Para clonagem em pET32a, o fragmento a ser ligado foi obtido por clivagem do vetor recombinante pET28a\_CYST\_SN (contendo a ORF sem o peptídeo- sinal), com as enzimas *Nco*I, presente no sítio de policlonagem dos vetores e a enzima *Bam*HI, com sítio presente em ambos os vetores como também na seqüência do oligonucleotídeo reverso do gene, possibilitando desta forma a transferência do inserto intacto entre os plasmídeos. O inserto foi recuperado do gel de agarose 0,8% com o *kit* GFX<sup>tm</sup> DNA and Gel Band Purification Concert (GE HEALTHCARE).

Após a ligação do inserto ao vetor, foi feita a transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$  CaCl<sub>2</sub> competentes, as cepas recombinantes foram selecionadas por PCR de colônia, como descrito acima. Para esta PCR foram utilizados os oligonucleotídeos direto T7 *promoter* (TAATACGACTCACTATAGGG) do plasmídeo pET28a e pET32a e o reverso (CYST\_R) da própria ORF, nas condições descritas no item 3.7.2.

Para a confirmação da inserção da ORF completa da cisteína protease e de seus fragmentos nos vetores de expressão, foi feito o seqüenciamento pelo método dos dideoxinucleotídeos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1997) utilizando-se os oligonucleotídeos T7 *promoter* e T7 *reverse* (ambos com seqüência de reconhecimento no plasmídeo), no seqüenciador automático ABI *Prism* 377 (Applied Biosystems).

### 3.10 Expressão e purificação da cisteína protease recombinante

Para expressar a proteína, as construções plasmidiais pET28a e pET32a foram utilizadas na transformação da linhagem Rosetta de *E. coli*.

Após o crescimento a 37°C e 300 rpm de um pré-inóculo (5mL) das bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante codificador da proteína (ou de seus fragmentos), o mesmo foi adicionado a 500 mL de meio LB com 25  $\mu$ g/mL do antibiótico canamicina para o pET28a ou 100  $\mu$ g/mL ampicilina para o pET32a. A cultura foi mantida sob agitação de 300 rpm a 37°C até atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>= 0,5). Uma vez atingida a D.O.<sub>600</sub> 0,5, a expressão foi induzida pela adição de IPTG para concentração final 0,2 mM. Neste momento a agitação passou a ser de 200 rpm e a temperatura de 30°C.

Após 12 horas de indução, a cultura bacteriana foi centrifugada (centrífuga Sorvall RC 5C *PLUS*) a 15.000 g, 4°C, durante 5 minutos em tubos de 250 ml. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 25 mL de tampão de lise (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8,0). As células suspensas foram lisadas com 8 pulsos de sonicação de 1 minuto com 30 segundos de intervalo entre cada pulso em sonicador *SONIC DISMEMBRATOR MODEL 500* (FISHER SCIENTIFIC). O produto da sonicação foi centrifugado durante 15 minutos a 20.000 g e 4°C. O sobrenadante, contendo a fração solúvel, foi separado do precipitado e

as análises de expressão e solubilidade foram realizadas em SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970), utilizando-se 10 µl do sobrenadante e 10 µl do precipitado após dissolução deste em 25 mL de água. A purificação da fração protéica solúvel, a partir do sobrenadante resultante da centrifugação após a sonicação, foi feita por cromatografia de afinidade em uma coluna contendo 5 mL de resina de níquel (Ni-NTA superflow) (QIAGEN). A eluição da proteína recombinante, ligada ao níquel por afinidade do “His-Tag”, foi realizada pela lavagem da coluna com 2 volumes do tampão de lise contendo concentrações crescentes de 10 a 500mM de imidazol. Um volume de 10 µL de cada fração da eluição foi analisado em SDS-PAGE 10% para verificação da fração (ou das frações) contendo a proteína purificada.

As frações contendo a proteína purificada foram dialisadas em uma membrana de 14000 MW (PIERC) durante 12 horas a 4°C, utilizando 1 litro de tampão para diálise (NaCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 8,0) para a remoção do imidazol e sais que poderiam influenciar os testes de atividade. Após a diálise a concentração da proteína foi determinada utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### **3.11 Purificação da cisteína protease em condição desnaturante e renaturação (*refolding*)**

Devido à proteína sem o peptídeo sinal ser também pouco solúvel, foi realizada tentativa de recuperá-la diretamente dos corpos de inclusão, seguida por diálise e “*refolding*” protéico.

Após expressão da proteína recombinante e obtenção do precipitado de células, como descrito no item 3.10, este foi suspenso em 25 mL PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) contendo 1% de Triton X-100. As células suspensas em PBS foram lisadas por sonicação (10 pulsos) como descrito no item 3.10. A solução sonicada foi centrifugada 15 minutos a 20.000 g e 4°C e o precipitado foi novamente suspenso em 25 mL do tampão PBS para lavagem dos corpos de inclusão. Após suspendida, a solução foi novamente centrifugada durante 15 minutos a 20.000 g e 4°C. Os passos de suspensão e centrifugação foram repetidos por quatro vezes em tampão PBS para garantir uma

boa lavagem dos corpos de inclusão e assim permitir uma boa purificação da proteína recombinante. Após as lavagens o precipitado foi suspenso em cerca de 50 mL de tampão de solubilização (Tris-Cl 0,01 M pH 8,5, NaCl 100 mM e uréia 6 M) sendo a concentração final de proteína ajustada para 1 mg/mL. Após 30 minutos de incubação, com suave agitação, a temperatura ambiente, a solução foi diluída em mesmo volume de tampão redutor (Tris-Cl 0,05 M, pH 8,5 e DTT 10 mM) e dialisada em 1 litro de tampão de diálise A (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5 e 3 M de uréia). Passadas 12 horas o tampão de diálise foi trocado pelo tampão B (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5 e 1M de uréia). Após 12 horas de diálise no tampão B a diálise foi trocada para um tampão C (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5) o qual foi trocado a cada 2 horas totalizando 5 trocas, sendo que a ultima diálise em tampão C foi realizada durante 12 horas. Após o término da diálise, alíquota de 10  $\mu$ L da amostra foi analisada em SDS-PAGE 10% e a proteína quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### **3.12 Ensaios de atividade da cisteíno protease**

#### **3.12.1 Ensaios de atividade *in vitro***

A proteína sem o peptídeo sinal resultante da diálise, tanto proveniente da purificação por afinidade como a purificação a partir dos corpos de inclusão, foi encaminhada para o laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Karaoglanovic Carmona, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde foram realizados os testes de atividade contra os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA (MELO *et al.*, 2001). Estes substratos são excitados em comprimento de onda de  $\lambda_{ex} = 380$  nM e a hidrólise dos mesmos faz com que a porção MCA libere fluorescência a qual é monitorada continuamente no comprimento de  $\lambda_{em} = 480$  nM. O contínuo aumento da fluorescência indica a atividade enzimática. Os testes foram realizados em tampão acetato de sódio, em pH variando de 4,5 a 6. Para os ensaios a proteína foi pré-ativada com adição de 2,5 mM de DTE (um isômero do DTT) (CLELAND, 1964) durante 5 minutos a 37°C. A adição de DTE tem por finalidade proteger o grupo tiol da oxidação pelo ar e da formação de pontes de dissulfeto que impossibilita a

atividade catalítica da enzima (CLELAND, 1964). Após ativação foi adicionado o substrato sintético (Z-FR-MCA ou Z-RR-MCA) à solução para a detecção da possível atividade proteolítica da enzima purificada.

### 3.12.2 Ensaio de atividade *in vivo*

Devido à obtenção de quantidade muito reduzida da forma solúvel da proteína e ao uso de uréia para solubilização dos corpos de inclusão (a fim de se obter maior quantidade de proteína), os testes de atividade enzimática *in vitro* ficaram prejudicados. Assim, foi realizada uma investigação da atividade enzimática da proteína recombinante por meio de ensaios *in vivo* para atividade proteolítica contra a caseína, uma proteína presente no leite. Para este ensaio, os clones recombinantes de *E. coli* foram plaqueados e crescidos em meio LB ágar contendo 0,2 mM de IPTG e suplementado com 1% de leite desnatado Mólico (TANG *et al.*, 1987).

Basicamente, após transformação de *E. coli* com o plasmídeo de expressão contendo a seqüência para a proteína, as bactérias foram plaqueadas da seguinte forma: em uma placa foi gotejado 5 µL da cultura de bactérias contendo o plasmídeo pET28a sem a inserção de qualquer seqüência gênica; 5 µL da cultura de bactérias transformadas com o plasmídeo pET28a\_CYST\_SN, ou seja, a construção contendo a ORF sem o peptídeo sinal e 5 µL da cultura de bactérias transformadas com o plasmídeo pET28a\_CYST, ou seja, a construção contendo a ORF completa.

As colônias foram crescidas a 37°C durante 24 horas. Após o período de crescimento as células foram lisadas pela exposição ao vapor de clorofórmio durante 20 minutos. Após a lise celular, a placa foi novamente colocada a 37°C, onde permaneceu por mais 12 horas. A lise celular visa liberar possíveis enzimas proteolíticas não exportadas para o meio extracelular.

Neste ensaio a atividade proteolítica sobre a caseína é detectada pelo aparecimento de um halo translúcido ao redor da colônia, resultante da hidrólise enzimática da caseína, que na sua forma não hidrolisada proporciona ao meio um aspecto opaco.

### 3.13 Produção de anticorpos policlonais

Por se tratar de uma proteína pouco solúvel, a produção de anticorpos foi feita utilizando-se a proteína recuperada a partir do SDS-PAGE 10%. Para este procedimento, a expressão da proteína sem o peptídeo sinal foi induzida em *E. coli*, as células foram recuperadas por centrifugação em tubos de 1,5 mL, suspensas em 100 µL de tampão Laemmli e fervidas por 5 minutos. Uma alíquota de 20 µL desta solução foi aplicada em cada canaleta do gel. Depois da eletroforese, o gel foi corado com azul Coomassie e as bandas correspondentes à proteína induzida foram trituradas e eluídas em 1 mL de água durante 12 horas. Após eluição a solução foi filtrada em membrana SNAP (INVITROGEN) e a proteína foi quantificada no filtrado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para a obtenção de anticorpos contra a proteína, foram feitas duas inoculações de 50 µg da proteína purificada em camundongos com 20 dias de idade (Biotério-UFSCar). Para a primeira imunização foi utilizada a proteína suplementada com igual volume do adjuvante completo de Freund (Sigma). Após 45 dias da primeira inoculação foi feita a segunda inoculação. Para esta inoculação a proteína foi suplementada com igual volume do adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). Após 10 dias da segunda inoculação os camundongos foram sacrificados por guilhotinamento pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos. O sangue foi coletado e centrifugado (15.700 g por 5 minutos a 4°C) para obtenção do soro contendo os anticorpos.

### 3.14 Western blotting

O ensaio de *Western blotting* foi realizado com as seguintes amostras de *E. coli* recombinante: lisado celular total após a indução da proteína completa ou de seus fragmentos, proteínas precipitadas do meio extracelular após a indução da expressão da proteína completa e proteínas precipitadas da fração solúvel do lisado celular após indução da proteína completa. Proteínas presentes no macerado de

folhas infectadas com *Xac* no oitavo dia após inoculação de citros também foram analisadas.

A obtenção de cada amostra foi feita da seguinte forma:

- Lisado celular total: após indução as bactérias foram recuperadas por centrifugação e uma pequena alíquota de bactérias foi suspensa em 30  $\mu\text{L}$  de tampão Laemmli. A amostra foi fervida por 10 minutos e aplicada no SDS-PAGE 10%.
- Proteínas precipitadas do meio extracelular: após a indução e recuperação das bactérias por centrifugação o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e as proteínas contidas no meio foram precipitadas com o uso de TCA 100%. Para tal procedimento foi adicionado 1 volume de TCA 100% para cada 4 volumes de meio. A mistura (proteína, TCA) foi incubada a 4°C durante 10 minutos e então centrifugada a 12.000 g, 4°C durante 5 minutos. O precipitado foi então lavado com acetona gelada com centrifugação a 12.000 g, 4°C durante 5 minutos. Após 2 lavagens com acetona o precipitado resultante foi seco e suspenso em 50  $\mu\text{L}$  de tampão Laemmli. A amostra foi fervida por 10 minutos antes de ser aplicada em SDS-PAGE 10%.
- Proteínas precipitadas da fração solúvel do lisado celular: após retirada da alíquota utilizada na análise do lisado celular, o restante das bactérias foram suspensas em 5 mL de tampão de lise (NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 8,0) e as células rompidas com 8 pulsos de sonicação de 1 minuto com 30 segundos de intervalo entre cada pulso. Feita a sonicação a fração insolúvel foi separada por centrifugação, o sobrenadante filtrado em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e as proteínas presentes no tampão foram precipitadas com TCA 100% como descrito acima. O precipitado formado foi suspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão Laemmli. A amostra foi fervida por 10 minutos e aplicada no SDS-PAGE 10%.
- Proteínas presentes no macerado de folhas infectadas com *Xac*: oito dias após provocar a infecção de citros (limão cravo) com *Xac* foram retirados 3 discos de 0,75 cm de diâmetro e os mesmos foram macerados em 100  $\mu\text{L}$  de tampão Laemmli. A amostra foi fervida por 10 minutos e aplicada no SDS-PAGE 10%.

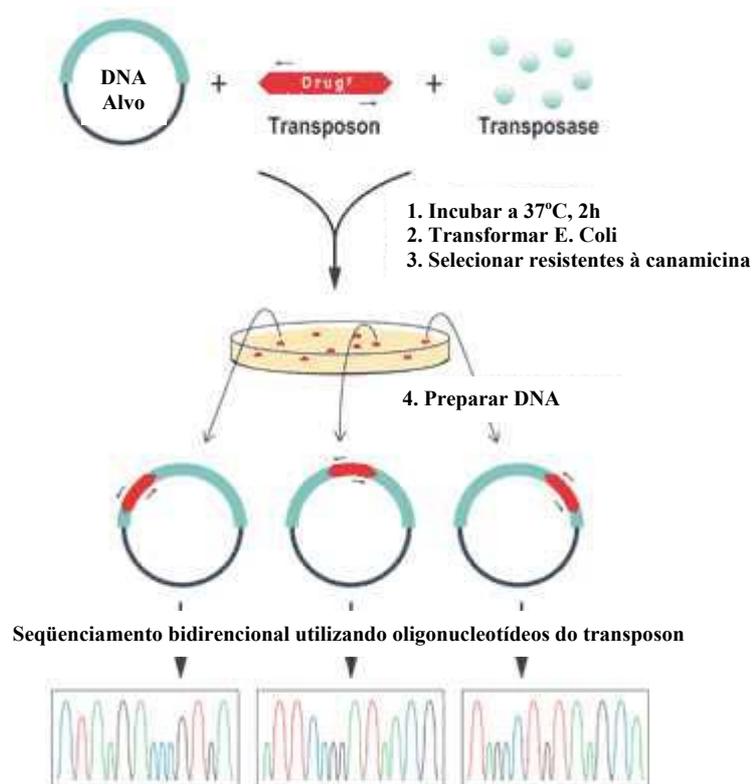
As amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 10%. A transferência para membrana de nitrocelulose (INVITROGEN) foi realizada em sistema Mini-Protean (LIFE TECHNOLOGIES), em tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM e metanol 20%) a 150 V e 150 mA durante duas horas. A membrana foi corada em solução de Ponceau (250 µL de solução estoque de Ponceau - Merck, 50 µL de ácido acético em volume final de 50 mL) possibilitando checar a eficiência da transferência e realizar a marcação da membrana, com o auxílio de uma agulha, do local esperado de reconhecimento pelos anticorpos. Feita a marcação, a membrana foi lavada em água e incubada durante 12 horas em solução de bloqueio (2,5 g de leite em pó desnatado para volume final de 50 mL de tampão TBS – Tris 5 mM, NaCl 75 mM, pH 8.0). Em seguida a membrana foi lavada três vezes durante 5 minutos em tampão TBS pH 8 e então incubada com o anticorpo anti-cisteína protease (1:2000 em TBS) por 90 min. Após nova lavagem em TBS, como descrito anteriormente, a membrana foi incubada com *anti-mouse* IgG (1:10000 em TBS) (SIGMA) por 90 min. A membrana foi novamente lavada com TBS e a revelação foi realizada por adição de 10 mL do substrato - *AP Color Development reagent*, Bio Rad - para a enzima conjugada ao anticorpo secundário (*anti-mouse*), a fosfatase alcalina.

### **3.15 Inserção *in vitro* do transposon no gene da cisteína protease e transformação da *E. coli***

Com o objetivo de estudar o papel do gene para a cisteína protease na patogenicidade de *Xac*, a inativação do gene foi realizada pela inserção de um transposon na ORF para a cisteína protease. A reação da inserção *in vitro* do transposon (Figura 5) foi realizada com o *kit* EZ::TN™ <KAN-2> (EPICENTRE) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista do Campus de Jaboticabal (FCAV, UNESP) com a colaboração do Dr. Julio Cezar F. de Oliveira. Para a reação, 0,2 µg do DNA plasmidial (PTZ57R/T\_CYST) foram adicionados a 1,0 µL do tampão do *kit* (10X),

0.081  $\mu\text{g}$  do transposon EZ::TN <KAN-2>, 1 U de transposase EZ::TN e água Milli-Q para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a 37°C durante duas horas.

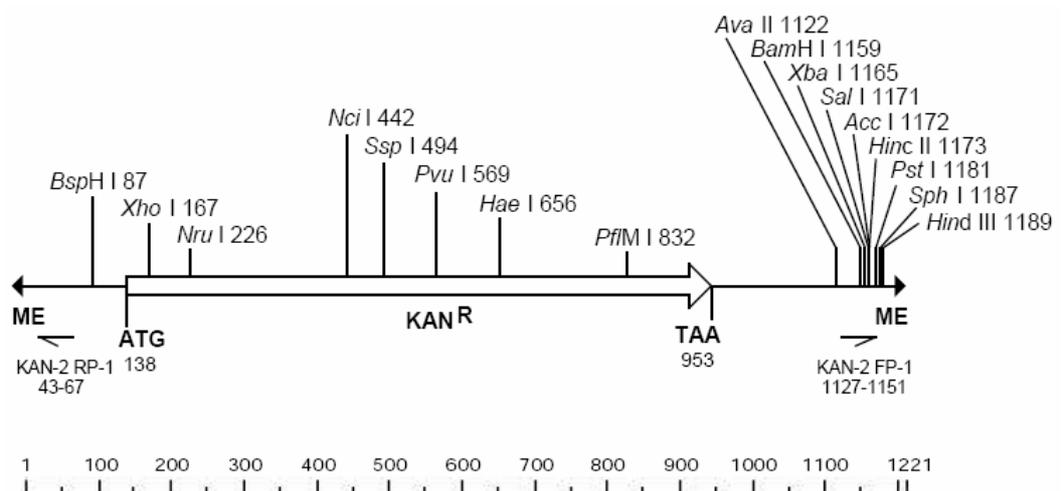
Um volume de 1  $\mu\text{L}$  da reação *in vitro* foi utilizado para a eletroporação de *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes (Gene Pulser II, Bio-Rad). As condições de eletroporação foram: 2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$ a e 200  $\Omega$ . Após a eletroporação adicionou-se 1 mL de meio LB à cultura e a mesma foi incubada a 37°C com suave agitação durante 1 hora. Após incubação, 200  $\mu\text{L}$  da cultura foram plaqueados em meio LB ágar contendo 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina, marca de resistência do transposon. As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 12 horas para crescimento das colônias.



**Figura 5. Reação de inserção do transposon.** Esquema resumido da reação de inserção *in vitro* do transposon no plasmídeo (fonte: Kit Epicentre).

Treze colônias foram selecionadas, o DNA plasmidial foi extraído como descrito no item 3.5 e utilizado para a verificação do local de inserção do transposon.

Uma primeira análise foi feita por PCR utilizando oligonucleotídeos do gene (CYST\_F e CYST\_R) para verificar se a inserção do transposon ocorreu dentro da ORF ou se a mesma ocorreu na seqüência de DNA do plasmídeo. O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose 0,8%. Os plasmídeos cujos fragmentos amplificados foram de aproximadamente 2000 pb (em número de 5), foram utilizados para mapeamento de restrição com a enzima *Bam*HI, a qual apresenta sítio de clivagem tanto na seqüência do transposon (Figura 6) como também na seqüência do oligonucleotídeo utilizado na amplificação da cisteíno protease (Tabela 1). O mapeamento de restrição teve a finalidade de selecionar aqueles plasmídeos cujo transposon estava em uma posição central do gene. O produto da clivagem foi analisado em gel de agarose 0,8%. O plasmídeo cuja clivagem indicou para a inserção do transposon em uma região central foi seqüenciado (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1997) para verificar o local exato dessa inserção utilizando-se os oligonucleotídeos 3FR e CYST\_R. Feito o mapeamento e seqüenciamento da inserção do transposon a construção foi utilizada para transformação de *Xac* eletrocompetentes a fim de inativar, por recombinação homóloga, o seu gene cromossomal para cisteíno protease (item 3.16).



**Figura 6. Mapa do transposon.** Esquema representando a seqüência do transposon e os sítios de restrição presentes dentro da seqüência (fonte: Kit Epicentre).

### 3.16 Transformação de células de *Xac* para obtenção de linhagem mutante

Uma vez obtido o plasmídeo contendo a ORF com o transposon (pTZ57R/T\_CP-TN-Kan) inserido em sua posição média, foi realizada a transformação de *Xac* para a inativação do seu gene cromossomal da cisteíno protease. Eventos de recombinação homóloga, entre o DNA plasmidial e o DNA genômico no locus para a cisteíno protease permitem a obtenção de uma linhagem mutante de *Xac* ( $\Delta Xac2853$ ) contendo o gene cromossomal *cyst* inativado pela inserção do transposon.

As células de *Xac* da linhagem 306 foram preparadas para serem transformadas por eletroporação pelo Dr. Julio Cezar F. de Oliveira (Unesp/Jaboticabal – UNIFESP/Diadema) como descrito por Sun e colaboradores (2003). Para a eletroporação foi usado 1  $\mu$ g da construção plasmidial (pTZ57R/T\_CP-TN-Kan). As células foram eletroporadas nas seguintes condições: 2400 volts, capacitância de 25  $\mu$ Fa e resistência de 300  $\Omega$  em um eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad). Feita a eletroporação adicionou-se 1 mL de meio TSA e a cultura foi incubada a 28°C durante duas horas, sob suave agitação. Passado o período de incubação as células foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 50  $\mu$ g/mL de canamicina (seleção para o transposon). As colônias de *Xac* obtidas foram então crescidas em meio LB (7,5 mL) contendo 50  $\mu$ g/mL de canamicina. Uma alíquota de cada cultura (800  $\mu$ L) proveniente de cada um dos clones obtidos foi estocada em solução de glicerol 15% no freezer -80°C e o restante utilizou-se para a extração do DNA genômico como descrito no item 3.6.

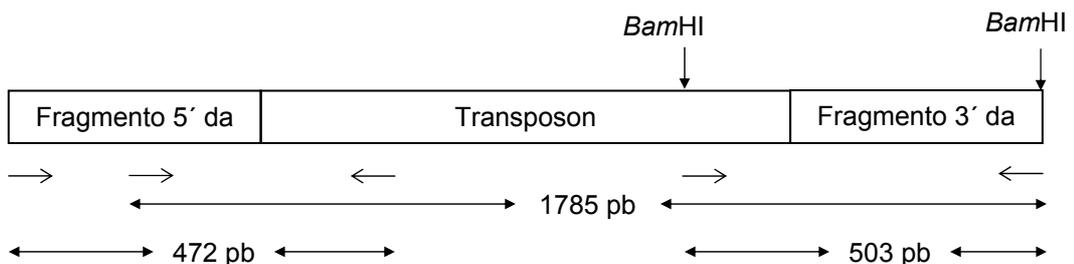
### 3.17 Seleção de *Xac* mutante no gene da cisteíno protease

Para a análise dos clones de *Xac* quanto à inserção do transposon no gene cromossomal de cisteíno protease, foi realizada inicialmente a extração do DNA genômico como descrito no item 3.6. As análises para a presença do transposon

interrompendo o gene da cisteíno protease no DNA genômico dos clones de *Xac* foram feitas por PCR e *Southern blot*.

### 3.17.1 Análise da presença do transposon no DNA genômico de *Xac* por PCR

Para a amplificação e verificação da inserção do transposon no DNA genômico de *Xac* foram utilizados os oligonucleotídeos que flanqueiam o gene (CYST\_F, 3FR\_F e CYST\_R – Tabelas 1 e 2) como também oligonucleotídeos cujas seqüências alvo encontram-se presentes na seqüência do transposon (KAN2\_F, 5' ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC 3' e KAN2\_R, 5' GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG 3'). Na figura 7 temos uma representação esquemática dos locais de reconhecimento dos oligonucleotídeos usados para a PCR e verificação da inserção do transposon no DNA genômico de *Xac*. Como controle positivo, foi utilizado o DNA plasmidial da construção contendo a ORF da cisteíno protease interrompida pela inserção do transposon (pTZ57R/T\_CP-TN-Kan). A PCR foi realizada como descrito no item 3.7.1.



**Figura 7. Representação da inserção do transposon na ORF para a cisteíno protease.** As setas na vertical indicam o sítio de clivagem para *Bam*HI. As setas na horizontal representam o sítio de ligação para os oligonucleotídeos CYST\_F, CYST\_3FR, KAN2\_F, KAN2\_R e CYST\_R, respectivamente. Os fragmentos indicados (pb) correspondem a amplificados obtidos a partir dos oligos correspondentes

### 3.17.2 Análise da presença do transposon no DNA genômico de *Xac* por *Southern blot*

Para a análise de *Southern blot* 2 µg do DNA genômico da cepa selvagem como também da cepa mutante (selecionada com base no resultado de PCR) foram clivados com as enzimas de restrição *Nco*I e *Sac*II (GE HEALTHCARE). Como estas enzimas reconhecem seqüências que não estão presentes na ORF XAC2853 e nem no transposon, a clivagem do DNA com as mesmas resultaria, para a região de estudo, em fragmentos de aproximadamente 3 kb (linhagem selvagem) e de aproximadamente 4 kb (linhagem mutante). O levantamento do tamanho dos fragmentos gerados foi realizado a partir da análise da seqüência depositada no *GenBank* (AE011926) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Após a digestão o DNA foi aplicado em um gel de agarose 0,8% e visualizado em luz UV. Com o auxílio de uma régua fluorescente foi feita a marcação da distância migrada com relação ao poço de aplicação para posterior localização das bandas marcadas no *Southern blot*. O gel foi então colocado em tampão de desnaturação (0,4 N NaOH, 1 M NaCl) para desnaturação da dupla fita de DNA (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Depois da desnaturação, o DNA foi transferido, por capilaridade, para uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente (*Nucleic Acid Transfer Membranes Hybon-N+*) (GE HEALTHCARE). A transferência foi feita utilizando também o tampão de desnaturação à temperatura ambiente durante 12 horas (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Após a transferência a membrana foi neutralizada durante 15 minutos à temperatura ambiente em tampão de neutralização (0,5 M Tris pH 7,2; 1 M NaCl) e colocada para hibridizar a 55°C durante 12 horas com sondas previamente marcadas diretamente com fosfatase alcalina (*kit "Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System"* GE HEALTHCARE).

Como sondas foram utilizados os produtos de PCR da ORF completa para cisteína protease e o produto da amplificação do transposon com os oligonucleotídeos (TRANS\_F 5' CTGCAGCTGTCTCTTATACACATC 3' e TRANS\_R CTGTCTCTTATACACATCTCA). A hibridização foi feita no tampão de hibridização fornecido junto ao *kit "Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System"*

(GE HEALTHCARE) suplementado com 0,5 M de NaCl e 4% do reagente de bloqueio também fornecido junto a esse *kit*.

Feita a hibridização a membrana foi lavada duas vezes a 55°C, durante 10 minutos cada lavagem, em tampão A (2 M uréia; SDS 0,1%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5 M, pH 7; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM e 2% reagente de bloqueio) e então lavada por duas vezes, durante 5 minutos cada lavagem, a temperatura ambiente no tampão B (Tris 0,02 M; NaCl 0,04 M e MgCl<sub>2</sub> 2 mM; pH 10) . Após as lavagens o excesso de tampão foi escorrido da membrana e no lado da membrana colocada em contato com o gel durante a transferência foi adicionado o volume necessário do substrato CDP-*Star* (GE HEALTHCARE) para a fosfatase alcalina usada na marcação das sondas de DNA para hibridização. Após 5 minutos de reação à temperatura ambiente, o excesso do substrato foi retirado e a membrana foi colocada em um cassete de revelação juntamente com um filme para Raio-X (T-MAT G/RA Film) (Kodak). Após 1 hora de exposição o filme foi revelado para a visualização de bandas que apresentaram hibridização com a sonda.

### **3.18 Estudos funcionais da mutação na ORF XAC2853**

#### **3.18.1 Avaliação do efeito da mutação *in vivo***

Os estudos funcionais da mutação na ORF XAC2853 foram realizados na casa de vegetação vinculada ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia (FCAV, Unesp, Jabaticabal) sob supervisão do Dr. Julio Cezar F. de Oliveira.

Após crescimento em meio LB ágar uma alíquota das bactérias, tanto selvagem como mutante, foi diluída em solução de MgCl<sub>2</sub> 1 mM de tal modo a ajustar a D.O.<sub>600</sub> da solução em 0,3. O ajuste da D.O. foi feito com o uso de um Biofotômetro da Eppendorf.

Com o propósito de causar a infecção dos citros por *Xac* selvagem e mutante, foi realizada uma pequena lesão na folha do citros a ser infectado (limão cravo e laranja pêra-doce). Com o auxílio de uma seringa sem agulha, a solução contendo

as bactérias foi inoculada por pressão até que se notasse uma região mais umida ao redor da lesão.

Do lado esquerdo da nervura central da folha foi inoculada a bactéria mutante e do lado direito da mesma nervura foi inoculada a bactéria selvagem. Depois de inoculadas, as mudas foram mantidas na casa de vegetação, a 28°C com luz artificial e ar filtrado (filtro HEPA). A comparação das alterações no crescimento foi feita visualmente e registrada por fotografias.

### **3.18.2 Avaliação do crescimento das bactérias mutantes *in vivo***

Para as análises quantitativas das alterações no crescimento das bactérias selvagens e mutantes em citros, a inoculação foi feita como descrito no item 3.18.1 com alteração na D.O.<sub>600</sub> da solução inoculada. Neste experimento a D.O.<sub>600</sub> foi primeiramente ajustada para 0,01 em um Biofotômetro (Eppendorf) e posteriormente diluída 10X para obter a concentração desejada (teoricamente D.O.<sub>600</sub> de 0,001 a qual representa o ponto inicial da curva de crescimento para *Xanthomonas*, onde a unidade formadora de colônia (UFC) está na ordem de  $10^3$  a  $10^4$ /cm<sup>2</sup>) antes ser aplicada nas folhas.

Para dados estatísticos o experimento foi realizado em triplicata. Para isto, 3 colônias selvagens e 3 colônias mutantes foram usadas para inocular as folhas de limão, sendo que cada colônia foi usada para inocular um total de 25 folhas totalizando, entre inóculo selvagem e mutante 150 folhas em um total de 24 mudas de limão cravo. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada dois dias possibilitando, desta forma, realizar a construção de uma curva de crescimento a partir do dia zero (dia da inoculação do citros).

Para o acompanhamento e contagem celular, a cada dois dias foram retirados três discos de 0,75 cm de diâmetro do local infectado da folha. Cada disco era retirado de uma folha, sendo que as folhas escolhidas para se retirar os discos pertenciam a mudas distintas. Os discos foram retirados nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. Cada disco era esterilizado em etanol 70% durante 30 segundos e lavado em água Milli-Q pelo mesmo período. Após a lavagem dos discos os mesmos foram macerados em 1 mL de solução 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e da solução resultante foram feitas

diluições seriadas até  $10^{-7}$ . Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi gotejada em meio TSA sólido contendo o antibiótico canamicina, nas placas onde foram feitos os testes com a linhagem mutante. Após 48 horas de crescimento foi realizada a contagem das bactérias viáveis em cada diluição. Quando a quantidade de bactéria presente em uma determinada diluição tornava-se extremamente grande, impedindo a contagem das colônias, esta diluição era tida como tendo um número infinito ( $\infty$ ) de colônias.

Após obtenção dos dados brutos da contagem de colônias, o número obtido foi multiplicado pela sua ordem de diluição como também por  $10^2$ , já que as microgotas compostas de 10  $\mu\text{L}$  provém de suspensão originada a partir de um disco de folha processado em 1 mL e portando sendo expressa por UCF/ mL. Desta forma foi estimado o número de bactérias existentes em 1 mL. Os valores obtidos foram tratados de forma estatística usando a plataforma MICROSOFT EXCEL 2003. A partir destes dados foi possível obter o Log UFC/ mL e construir o gráfico da curva de crescimento *in vivo* e comparar as diferenças dos valores obtidos no crescimento da *Xac* selvagem e mutante (TEIXEIRA, 2006).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo estrutura-função da ORF XAC2853

O seqüenciamento e a anotação do genoma da linhagem 306 da *Xac* (da SILVA *et al.*, 2002) (<http://genoma4.iq.usp.br>) revelaram a presença de um gene que codifica uma provável cisteína protease. A proteína predita pela tradução da ORF XAC2853, tem aproximadamente 28 kDa. Análises no banco de dados MEROPS revelam que esta provável protease apresenta seqüência similar àquelas pertencentes à família C1 e clã CA das cisteína proteases (RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2006) e tem grande similaridade com cisteína proteases de outras *Xanthomonas* bem como de outros organismos (Figura 8). O alinhamento da seqüência desta proteína como seqüência de outras cisteína proteases mostra regiões onde se tem mais de 90% de similaridade entre os resíduos de aminoácidos. Em uma destas regiões estão presentes os resíduos formadores do sítio catalítico da enzima, entre eles o resíduo de cisteína na posição 75 e o de histidina na posição 224 que são responsáveis pela formação da díade catalítica (Figura 8). Outros aminoácidos conservados, e de grande importância para a correta formação do sítio catalítico, são os da posição 69 e 240 (glutamina e asparagina, respectivamente).

Análises da seqüência de aminoácidos da proteína no software SinalP predizem a existência de um peptídeo sinal em sua região amino-terminal, o qual se estende até o aminoácido de número 24. Entretanto, análises da seqüência da proteína no banco de dados MEROPS indicam que a unidade peptídica da enzima se estende do aminoácido de número 16 ao aminoácido de número 270 (Figura 9) o que torna necessário maiores análises em relação à seqüência tida como peptídeo sinal.

```

1          10          20
Iac      .....MNTHRSLALCLLLAALSLSLTAATAQAQAVH
Icv      .....MNSHRSALCLLLAALSLSLTAATAQAQAVH
Xoo      .MLFFSDVLAFAAASALSRLRVCSAVVVVLRTAAPLPAWSLLCMNTHRPFALCLLATLSLTTTAAQAQAEVH
Xcc      .....MNTQRSLTLCLLLAALSLSLTAATAQAQAAAMH
C.acet   MKLILSQDVSIIIIYIVLQFYKCKIKIKVYFMKIKITITTKLLMCTFTISSI.LLPTTAFSAQAQAKTKALH
Flavobacteria MKFKIAFPPTVIIIPSLI..FYSCNSDLDDCCGGG.DNINSPVIDVPPFTPEBI.N.PTNDPLA.....
Pseudomonas .....
Xyl      .....MNTQLKRRKKS
consensus>50 .....mnt.r...lclla.lsl.a..aqaavh

30          40          50          60          70          80          90
Iac      GMCLKPSLSLMQPVTPLFGTASVSTPDPASVVDLTAWAITPGDCCQIGACA.SWAAAHTLTGWYANANKQA..
Icv      GMCLKPSLSLMQPVTPLFGTASVSTPDPARVDLTAWAITPGDCCQVDACVSWATAHTLTGWYANANRQA..
Xoo      GKCLKPSLSLMQPVTPLFGTESISKPTDPASVDLTKWAITPGNCCQPVNACASWAVGYTLTGWYANANKQA..
Xcc      GMCLKPSALMQPVTPLFGTASAAKPTDPATVDLTAWAITPGDCCQVGS CASWATAHTLTGWYANAANKQA..
C.acet   PLGLRTLHENIKGMKAPKIFGATKDPARSVDLSRRFPSPVKDCCSLGSCVTFPATTY.AKTYERNQRNRRWGV
Flavobacteria .LIGNCDWNTAVSCKSIDYPLNLNPAVYDLCFLMPAPRSQCAQGS CVSWATHYLLATYMDNIRNDSII
Pseudomonas QYQWIRDLPDHRDHLAAPPALAAAPHRVDLRPHCPVYDCCQLGSC TANGIAGAIQ.FDRMKQKLTTPA
Xyl      GYGYIPDIADIRDFSYTPEKSVIAAPPKVDLTPSFQ.VYDCCRIGSC TANALAAAIQ.FERIHDKQSPE
consensus>50 gmGklps.lmqpvtplfgt.sv..pLpa.vDLt.waitpgdCCqvgcS.swata.tlgyyanankqa..

100         110         120         130         140         150
Iac      ...QTRFAPMYLYSQV...NGGVDCCSTLEAPLEIALAQCIDTEQHYSWGNY..DWRKHQPTTADKANAA
Icv      ...QTRFAPMYLYSQV...NGGVDCCSTLEAPLQIALAQCIDTEQHYSWGNY..DWRKHQPTAADRANAA
Xoo      ...HKLFPAPMYLYSQI...DGGVDRGSTLEAPLDVALEQCIDTEQHYSWGDI..DFKHKPTGADRANAA
Xcc      ...QTRFAPMYLYSQV...NGGVDCCSTLEAPLDVALLAQCIDTAQHYSWGDI..NWKNPPTAADRANAA
C.acet   NVPSHFFSPSYIYSQIH.SDNSADCCGQSPSDAFNLIEEQDTSITDMPYDGS..DYGWETQPTAVQR..
Flavobacteria SSIQEIIMSPSPFAPNQIKASDGSNNCFSTIAQNLDLLINTCALPLSEFSYNDT..TCAPQPDMIQLANTR
Pseudomonas PEPSSRLF...IYNERVIEHTVDSGSCAMIRHGKISVAKQGDCEPEEWPYD...IEKF...AV
Xyl      FIPSRLF...IYNERKIEGHVNYDSCAMIRDGKIKVLHKLCCVCEKEWYPYGDTPADQKTEEPFGAPASK
consensus>50 ...q..fapmyl%sv...nggvd.Gstleapldval.qGidteqeysygydy..d.k.qpt.ad.anaa

160         170         180         190         200         210
Iac      KNPTPYRHYTVLY...SNGNGGGRALIEQIKLALASSTPVAIGFYVRQGFEDLTTKN...QVDYDVKTP
Icv      RNPTPYRHYTVLY...SGRNGGGSALIQQIKLALASSTPVAIGFYVRQGFEDLTAQN...QVDYDVTTP
Xoo      KNPTPYRKYTVLY...SGVNGGGRALIEQIKLALASSTPVLIGFYTRRQGFEDLSPTN...QVDYDINTP
Xcc      KHPTPYRKYTVLY...ACDGNNGGRALVEQIKLALAASTPVAIGFYVRQGFEDLTPSN...QVDYDIKTP
C.acet   .....EHAAGV...KATDQQQLDSCNYSEIKQELAKGTPVVIGIDVYDFDNISPSN...VDFDVISCD
Flavobacteria NNLISSYENICPVTFLEPTTQESLIASSLNEVKSALFDNRPFVIVSMLTDEAFGRHRNEDVPTVSEINEAT
Pseudomonas KPPAACYKDARKY...KAVSYQVACNLNQMKGC LAAGYFPVIGFSVYESFESKKVAKTGHAMPMPGPH
Xyl      KPSDQCYKEARNY...KITEYSRVAQDIDHLKACLAAAGSPFVFGFSVYNSWVGNNSLPV.KIPLPTKND
consensus>50 knptpyrkytvly.....gngngg.alieqiKlaLa.stPvvigfyvrqgfedl...n..qvydyi.tp

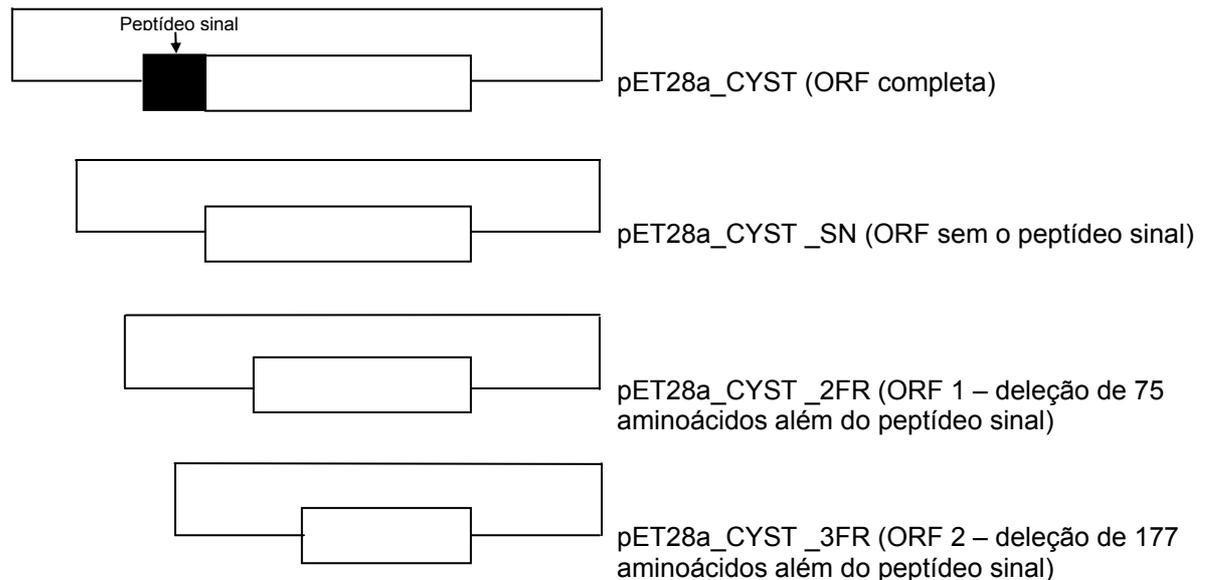
220         230         240         250         260         270
Iac      IL.GGHAVIALCYDSE..GLIVENSWGTEWGNKGFCKLSWSVVAKDVIGADVYV.....
Icv      IL.GGHAVIALCYDSE..GLIVENSWGTAWGNKGFCKLSWSVVAKDVIGADVYV.....
Xoo      KL.GGHCVVALCYDKE..GLIVENSWGTYWGNKGFCKLSWAVVAKDVIMADVAY.....
Xcc      IL.GGHAVIALCYDSE..GLIVENS.....
C.acet   DR.GGHALCVVGYDSDKQAVKIINSWGTNNGINGYGWISYKVLQQENS DAYVVLQD.....
Flavobacteria VR.GGHAMTIVGYNDLNAFRVLNSWGD SWANDGYVYVSYDFFMASDNPKYQKGVQLQTVAFND
Pseudomonas KMLGGHCVLAVCYNDAHQHFILNSWGAGWGMEGYFTLPYSYLLDENLSTDFWTRVVA.....
Xyl      KLEGGHAVLCVGYDDEIRHFRI RNSWGNVGENGYFWMPEYBYIRNRQLADDFWVIKTRK....
consensus>50 il.GGHaviavGY#de..gliveNSwgt.wgnngy.lsy.vv..dn..adv.....

```

**Figura 8. Alinhamento da ORF de cisteína protease de Xac.** Alinhamento da ORF XAC 2853 com a ORF de outras *Xanthomonas* e outros organismos, como a *Xylella fastidiosa*. Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Xcv – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; Xoo – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; Xcc - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; C. acet – *Clostridium acetobutylicum*; Flavobacteria – *Flavobacterieia bacterium*, Pseudomonas – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e Xyl – *Xylella fastidiosa*. As caixas de fundo preto representam regiões com identidade acima de 90% e as caixas de fundo branco regiões de identidade entre 50 e 90%. Alinhamento feito no software Multialin (CORPET, 1988 – <http://bioinfo.genopole-toulouse.prp.fr/multalin/multalin.html>).



codificadora para o peptídeo sinal) e pTZ57R/T\_CYST\_3FR (ORF que apresentava a maior deleção, retirando a seqüência para o peptídeo sinal e mais 177 nucleotídeos). Com os plasmídeos de expressão pET28a e pET32a foram obtidas as seguintes construções: pET28a\_CYST, pET28a\_CYST\_SN, pET28a\_CYST\_2FR, pET28a\_CYST\_3FR e pET32a\_CYST\_SN (Figura 10).

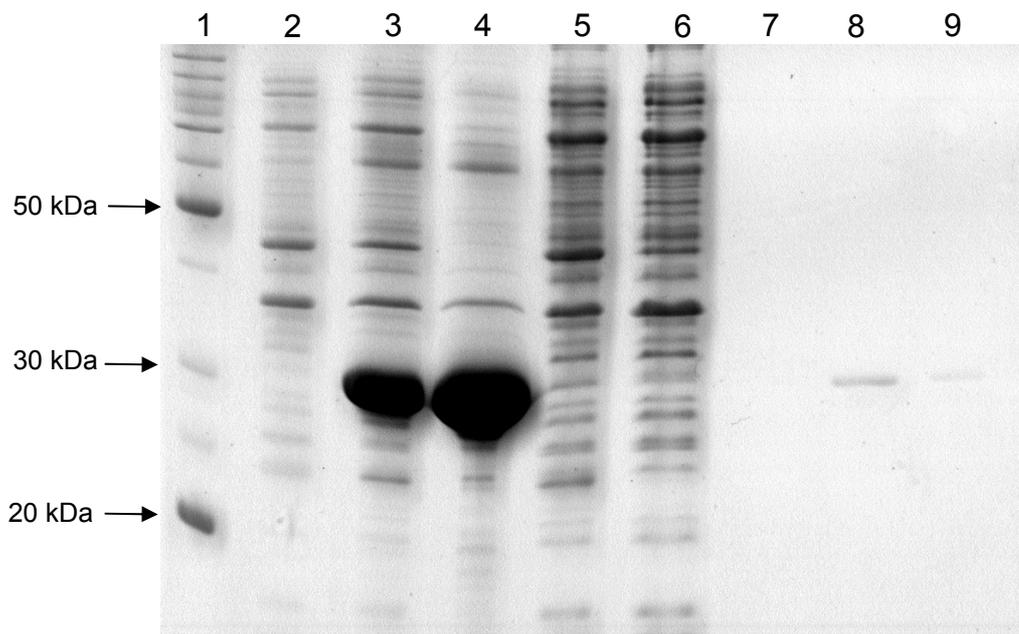


**Figura 10. Esquema ilustrativo dos plasmídeos de expressão.** Diferentes fragmentos amplificados e clonados no plasmídeo de expressão pET28a.

### 4.3 Expressão e purificação da proteína recombinante

Os diferentes fragmentos para a proteína recombinante foram expressos no vetor pET28a. Os testes de solubilidade, após indução no vetor pET28a, realizados pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Marques Novo, e repetidos neste trabalho, mostraram baixa solubilidade da proteína. As deleções e construções dos plasmídeos de expressão com fragmentos menores da proteína não resultaram em proteínas mais solúveis. Por este motivo os resultados de expressão e purificação, aqui apresentados, referem-se apenas à construção sem o peptídeo sinal. O resultados obtidos demonstram que o sistema pET de expressão foi bastante eficiente na expressão da proteína, entretanto a mesma se apresenta pouco solúvel (Figura 11).

Apesar da maior parte da proteína estar insolúvel, foi possível, com o uso da coluna de afinidade ao níquel Ni-NTA (QIAGEN), recuperar uma pequena fração que permanecera solúvel. A fração purificada da proteína foi eluída com 250 e 500 mM de imidazol, sendo que a massa molecular esperada para a proteína recombinante era de ~30 kDa (Figura 11). Com essa estratégia foi possível purificar um total de 1 mg de proteína por litro de cultura induzida.

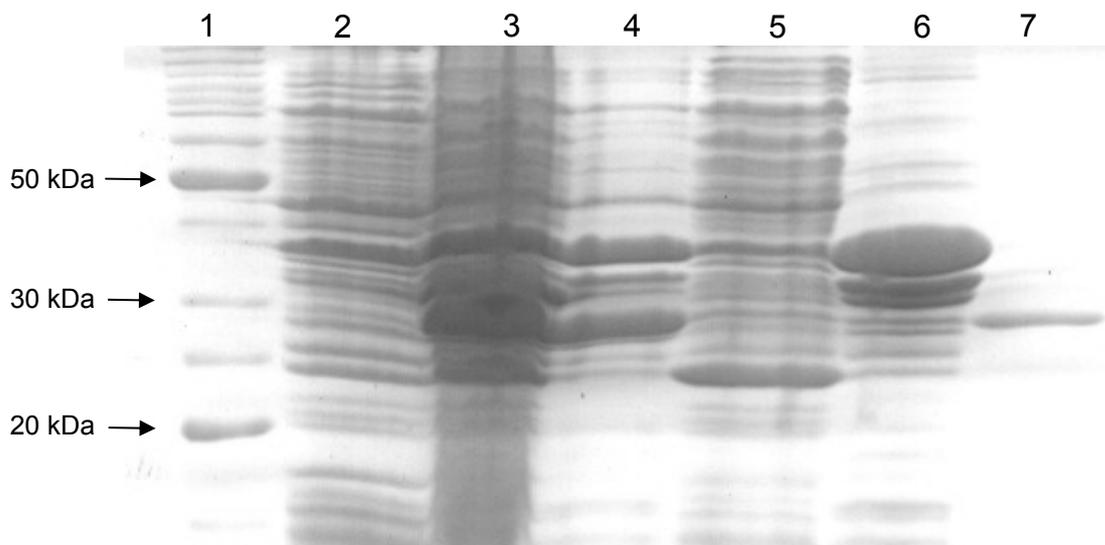


**Figura 11. Teste de expressão, solubilidade e purificação da cisteína protease de *Xac* sem o peptídeo sinal.** Gel SDS-PAGE 10% mostrando a expressão da proteína, o teste de solubilidade e a purificação por cromatografia de afinidade da cisteína protease sem o peptídeo sinal expressa em *E. coli* com a utilização do vetor pET28-a\_CYST\_SN. 1, padrão de massa molecular (Invitrogen); 2, fração não induzida; 3, fração induzida; 4, precipitado e 5, sobrenadante; 6, primeira lavagem com 15 mL do tampão sem imidazol; 7 e 8 eluição com 250 mM de imidazol; 9, eluição com 500 mM de imidazol.

Na tentativa de obter maior quantidade de proteína solúvel, foi realizada a inserção do fragmento sem o peptídeo sinal no vetor pET32a (pET32a\_SN), no entanto, os resultados obtidos foram semelhantes àqueles obtidos com o pET28a\_SN (dados não mostrados). Desta forma, decidimos manter a expressão utilizando o pET28\_SN.

Para se obter maior quantidade da proteína recombinante, a fim de se estudar a atividade da mesma, foi feita a lavagem dos corpos de inclusão em tampão PBS

contendo 1% de TritonX-100 e solubilização dos mesmos em tampão PBS contendo 6 M de uréia para purificação da proteína recombinante em condições desnaturantes seguida pela renaturação (*refolding*) (Figura 12).



**Figura 12. Purificação em condições desnaturantes.** Gel SDS-PAGE 10% da solubilização da proteína sem o peptídeo sinal com 6M uréia. 1, padrão de massa molecular (Invitrogen); 2 fração não induzida; 3, fração induzida; 4, precipitado antes do tratamento com uréia; 5, sobrenadante; 6 precipitado remanescente após tratamento com uréia 6 M; 7, sobrenadante resultante do tratamento do precipitado com 6 M uréia.

O uso de condições desnaturantes foi bastante eficiente para obtenção de boa quantidade da proteína pura. Porém, pela metodologia empregada, esta quantidade de proteína se encontrava muito diluída (0,2 mg/ mL, totalizando 20 mg da proteína por litro de cultura induzida) e desnaturada o que prejudica os estudos de atividade. A grande diluição é necessária para que o enovelamento possa ocorrer de maneira correta (SINGH e PANDA, 2005) o que viria a possibilitar estudos de atividade da mesma. Por este motivo, a quantidade de proteína na canaleta 7 da figura 12 é pequena.

## 4.4 Ensaio de atividade

### 4.4.1 Ensaios de atividade *in vitro*

A proteína recombinante sem o peptídeo-sinal, purificada tanto por afinidade em coluna de níquel como em condições desnaturantes com uréia (seguida do *refolding*), foi encaminhada para o laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana K. Carmona, onde os ensaios de atividade foram realizados. Os resultados obtidos nestes ensaios não demonstraram qualquer atividade proteolítica desta enzima contra os substratos sintéticos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA. É possível que a falta de atividade seja resultado do enovelamento não perfeito da proteína após a purificação na forma desnaturada e/ou ao fato do peptídeo-sinal (ou parte dele) ser importante para a atividade catalítica. Análises realizadas no banco de dados do MEROPS indicam que a provável seqüência peptídica ativa vai do aminoácido 16 ao aminoácido 270 (Figura 9) e a deleção feita para a retirada do peptídeo sinal foi até o aminoácido 24, local predito para o término do peptídeo sinal pelo software SinalP. Desta forma, podem ter sido excluídos alguns aminoácidos importantes para a atividade no N-terminal da proteína.

Outra possibilidade é o fato do pH utilizado durante a purificação da proteína (pH 8) ter possibilitado uma auto-hidrólise da mesma. De fato, muitas cisteíno proteases de organismos parasitas agem, em contraste com as cisteíno proteases de mamíferos, em pH neutro ou alcalino (LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002; SAJID e MCKERROW, 2002; WIEDERANDERS, KAULMANN e SCHILLING, 2003). Portanto, haveria necessidade de se tentar a purificação da proteína em tampão com pH diferente do utilizado neste trabalho.

### 4.4.2 Ensaios de atividade *in vivo*

Apesar de não ter sido observada atividade enzimática em experimentos *in vitro*, foi possível verificar atividade proteolítica *in vivo* sobre a caseína, uma proteína

do leite. A figura 13 mostra o teste de atividade *in vivo*. Na placa foi gotejado em (1) a cultura de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28a sem nenhum inserto, em (2) cultura de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28a\_CYST\_SN, ou seja, a ORF sem o peptídeo sinal e em (3) a cultura de *E. coli* com o plasmídeo pET28a\_CYST, ou seja, a ORF completa. Este experimento foi realizado com o intuito de se observar a hidrólise da caseína após a lise celular por clorofórmio. Porém, observa-se que a expressão da proteína completa possivelmente faz com que a mesma seja exportada para o meio extracelular, pois o halo de hidrólise da caseína aparece antes de se efetuar a lise celular *in situ* (Figura 13).

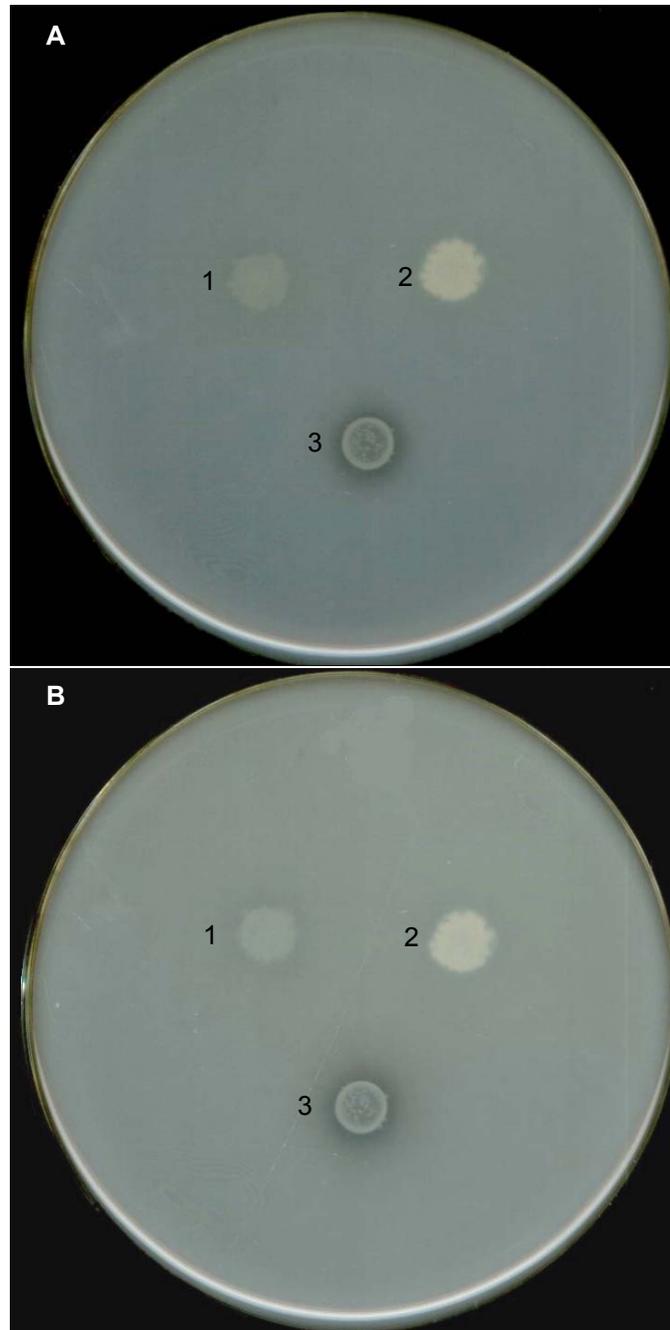
Após a lise celular, feita com vapor de clorofórmio, não foi observada nenhuma alteração no meio, demonstrando que as células transformadas com o plasmídeo pET28a não recombinante continuavam a não apresentar atividade catalítica sobre a caseína, como esperado (Figura 13 B). Os resultados *in vivo* também reforçam a perspectiva de que a proteína tem pH ótimo próximo do pH neutro a alcalino, pois o meio utilizado apresenta pH 7,5.

Contrariamente ao esperado, no entanto, foi o fato de os clones contendo a proteína sem o peptídeo sinal não apresentarem atividade mesmo depois da lise celular. Isto pode refletir uma possível importância da seqüência predita do peptídeo sinal na atividade da enzima.

Estes resultados demonstram a necessidade de maiores estudos em relação à seqüência tida como sendo o peptídeo sinal desta proteína, bem como a necessidade de se otimizar as condições de se obter a proteína pura (por exemplo, condição de pH) para os ensaios de atividade *in vitro*. Só assim poderemos inferir de forma conclusiva que a proteína em estudo realmente se trata de uma cisteína protease.

No entanto, o indício de exportação da proteína é interessante, pois indica que o provável peptídeo sinal da proteína de *Xac* está funcionando como tal em *E. coli*. Construções utilizando um gene repórter fundido a este peptídeo sinal poderão responder se realmente ele funciona como sinal de exportação em *E. coli*, o que seria muito interessante do ponto de vista biotecnológico considerando a falta de sistemas de expressão em *E. coli* capazes de exportar proteínas para o meio. Um sistema deste tipo facilitaria muito processos de purificação de proteínas diretamente do meio de cultura, além de poder ser utilizado em experimentos nos quais se

necessite de proteína secretada, como experimentos de evolução *in vitro* de proteínas via *DNA Shuffling*.

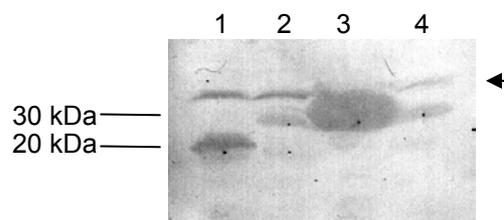


**Figura 13. Teste de atividade *in vivo*.** Células de *E.coli* plaqueadas em meio LB ágar contendo 1% de leite Mólico e IPTG. (A) placa antes de ser exposta ao vapor de clorofórmio e (B) placa após exposição em vapor de clorofórmio. Em cada figura (A e B) observa-se as gotas das culturas de *E. coli*: (1) *E. coli* transformada com pET28a desprovido de qualquer inserto; (2) *E. coli* transformada com pET28a\_CYST\_SN e (3) *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28a\_CYST, onde podemos notar a atividade proteolítica pela presença de halo transparente no meio ao redor das colônias.

#### 4.5 Produção de anticorpos policlonais e *Western blot*

Considerando os indícios da exportação da proteína recombinante em *E. coli*, a presença da mesma foi investigada no meio extracelular, entre outras frações, como descrito em Materiais e Métodos item 3.14.

A imunização dos camundongos feita com a proteína expressa a partir do clone pET28a\_CYST\_SN (ORF sem o peptídeo sinal) forneceu anticorpos capazes de reconhecer uma proteína de aproximadamente 30 kDa, bem como os outros diferentes fragmentos da proteína expressa, sendo o menor deles de aproximadamente 20 kDa (Figura 14). As demais frações (macerado de folhas infectadas por *Xac* e proteínas precipitadas do meio extracelular e da fração solúvel do lisado celular) não apresentaram resposta à imunização, o que pode ser devido à baixa concentração da proteína presente nestas amostras.



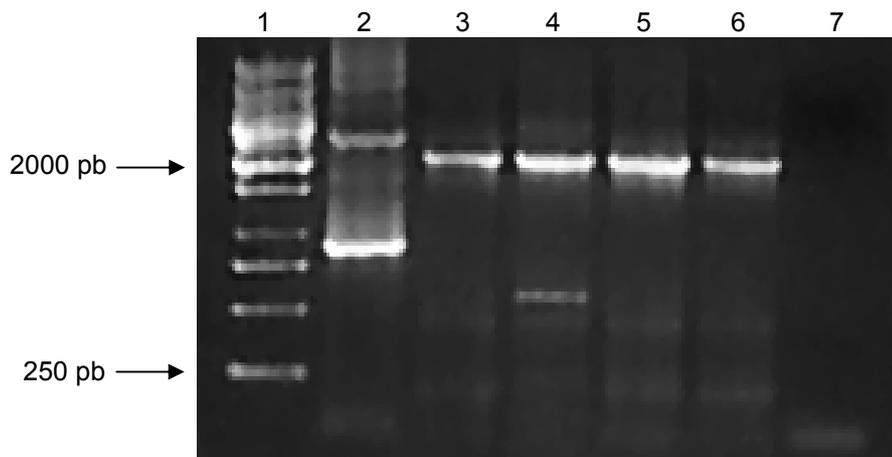
**Figura 14. Análise por *Western blot* das proteínas expressas em *E. coli*.** Hibridização do anticorpo anti cisteíno protease com os diferentes fragmentos da proteína expressa em *E. coli* recombinante. 1, hibridização com a proteína proveniente da expressão do pET28a\_CYST\_3FR; 2, hibridização com a proteína proveniente da expressão do pET28a\_CYST\_2FR; 3, Hibridização com a proteína proveniente da expressão do pET28a\_CYST\_SN; 4 hibridização com a proteína proveniente da expressão do pET28a\_CYST. A seta indica bandas não específicas.

#### 4.6 Interrupção do gene por inserção de um transposon

Com o objetivo de estudar o papel desta cisteíno protease no mecanismo de patogenicidade, o gene cromossomal de *Xac* foi inativado pela inserção de um transposon.

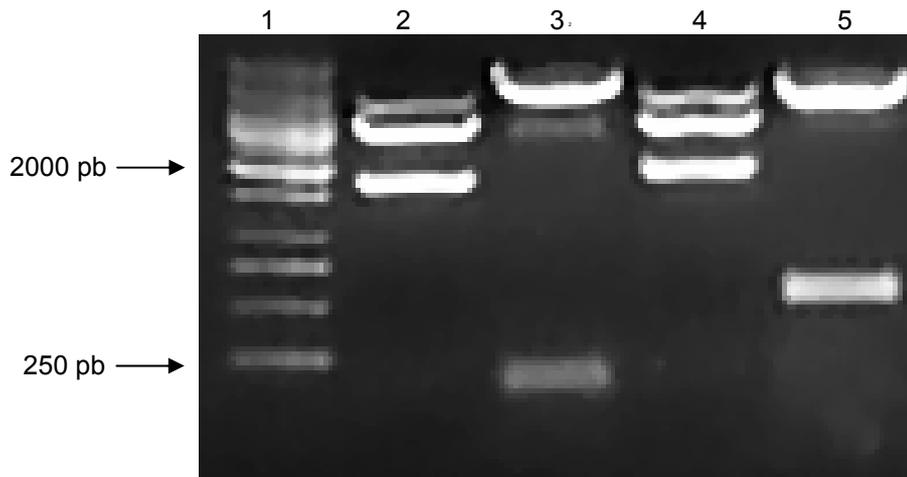
Utilizando a construção plasmidial pTZ57R/T\_CYST, foi gerada uma nova construção, sendo esta denominada de pTZ57R/T\_CP-TN-Kan. Esta nova

construção apresentou o transposon inserido na seqüência da ORF para a provável cisteíno protease. A inserção do transposon foi confirmada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos direto (CYST\_F) e reverso (CYST\_R). A PCR resultou em um fragmento de aproximadamente 2034 pb (Figura 15), o qual foi o resultado da soma entre o transposon (1221 pb) e o gene para cisteíno protease (813 pb).



**Figura 15. Gel de agarose do PCR das colônias de *E. coli* contendo o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan.** Gel de agarose 0,8% mostrando na canaleta 1, padrão de massa molecular; 2 PCR tendo como molde o DNA plasmídial pTZ57R/T\_CYST; 3 a 6, PCR das colônias transformadas com o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan; 7, controle negativo (amostra sem DNA).

A posição de inserção do transposon no plasmídeo também foi confirmada pelo mapeamento de restrição com a enzima *Bam*HI. A inserção no centro do gene geraria bandas de aproximadamente 500 pb, ao contrário, inserções próximas às extremidades 5' ou 3' gerariam bandas de tamanho diferente disso. Caso a orientação do transposon estivesse invertida o fragmento esperado para a inserção do mesmo na região central do gene seria de aproximadamente 1600 pb. A clivagem de um dos plasmídeos resultou em um fragmento de aproximadamente 500 pb que foi visualizado em gel de agarose 0,8% (Figura 16). Este resultado sugere que a orientação do transposon segue a mesma do gene.



**Figura 16. Mapeamento de restrição dos plasmídeos contendo o transposon inserido no gene para cisteíno protease.** Clivagem com *Bam*HI do DNA plasmidial das colônias de *E. coli* com inserção do transposon dentro da ORF. 1, padrão de massa molecular; 2 a 5, clivagem do plasmídeo das colônias que apresentaram a inserção do transposon dentro da ORF para cisteíno protease.

Para confirmar tanto a inserção como também a posição central do transposon inserido no gene, o clone cuja PCR foi positiva, e que ao ser digerido com *Bam*HI apresentou uma banda de aproximadamente 500 pb, foi submetido ao seqüenciamento. O seqüenciamento demonstrou que o transposon havia se inserido a partir da posição 406 pb da ORF (Figura 17), ou seja, exatamente no meio do gene, como desejado. Este plasmídeo (pTZ57R/T\_CP-TN-Kan) foi utilizado na transformação da linhagem 306 da *Xac* por eletroporação.

```

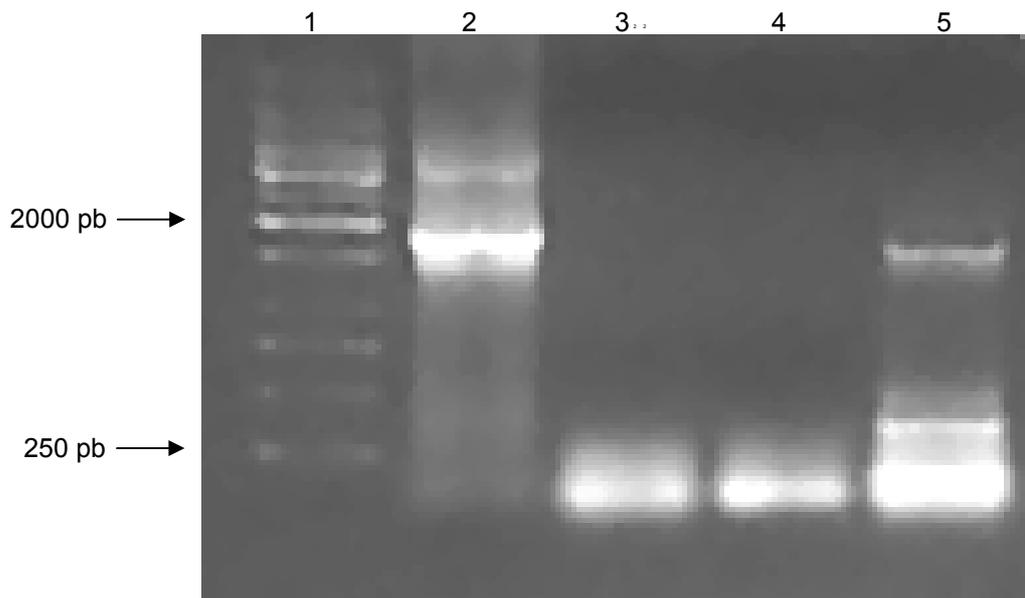
ATGAACACGCACCGTTTCGCTCGCCCTTTGCCTGCTCGCCGCCCTGAGCCTGACCGCTGCCACCGCGCAGGC
GGCAGTGCACGGCATGGGCCTGAAGCCTTCGTGTTAATGCAGCCGGTCAACCCGTTGTTTCGGTACCGCAA
GCGTTAGCACACCGCTGCCTGCCAGTGTTCGACCTGACTGCATGGGCGATCACGCCGGGCGACCGAGGGCCAG
ATCGGAGCATGCGCGTCATGGGCGGCCGCTCACACCTTGACCGTTGGTATGCCAACGCCAACAAACAGGC
CCAGACGCGCTTTGCCCGATGTACCTGTACAGCCAGGTCAACGGCGGGCGTGGATGAAGGCTCCACCCCTGG
AAGCGCCGCTGGAGATCGCGCTTGCCGAGGGCATCGACACCGAGCAGCACCTGTCTTTATACACATCTCAA
CCATCATCGATGAATTGTGTCTCAAAAATCTCTGATGTTACATTGCAACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAA
TAAAATGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGCTTTGCTCG
AGGCCGCGATTAAATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAAT
CAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTA
GCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAAATGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCAT
CAAGCATTTTATCCGTAATCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCGGAAAAACAGCATTCCAG
GTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATT
CGATTCCTGTTTGAATTTGCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTCGTTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAAT
AACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAA
TGCATAAACTTTGCCATTCTACCGGATTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTTCTCACTTGATAACCTATTTTTG
ACGAGGGGAAATTAATAGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCAT
CCTATGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATC
CTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATGGTTAATTGTTGTAAC
ACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAAATTTTCTGAGTTGAAG
GATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAGTTCAAATCACCAACTGGT
CCACCTACAACAAGCTCTCATCAACCCTGGCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTC
AGGTTGAGATGTGATAAGAGACAGTATTCGTGGGGCAACTACGACTGGAAACACCAACCCACTACCGCCG
ACAAGGCCAACGCTGCCAAGAACCAGCGCCGATCGCCACTACCCGTGCTGTATTGGGCAACGGCAATG
GGGGACGCGCCTTGATCGAACAGATCAAGCTCGCCCTTGCCTCTTCCACGCGCGTGGCGATCGGCTTCTATG
TGCAGGAGGCTTTGAAGACCTGACAACCAAGAATCAGGTGATTACGACGTCAGACGCGGATTCTGGGTG
GGCATGCCGTGATCGCGCTGGGCTACGACAGCGAAGGACTGATCGTGGAAAAACAGCTGGGGCACCGAATGG
GGCAACAAGGTTTCGGCAAACTGTCTGTCGGTGGTCGCCAAGGATGTGATCGGCGCCGACGTGGTGTGTA
CTAG

```

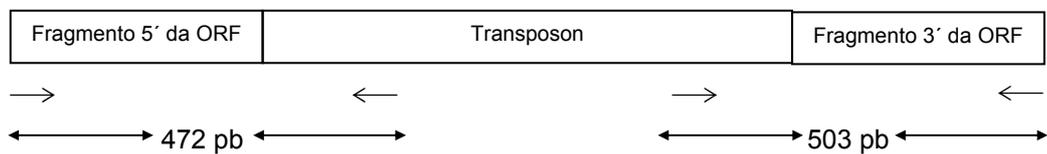
**Figura 17. Seqüência do gene da cisteíno protease com inserção do transposon.** Na região hachurada encontra-se a seqüência do transposon. A posição 1159 do transposon corresponde ao primeiro nucleotídeo da seqüência GGATCC sublinhada, seqüência esta reconhecida pela *Bam*HI. Em negrito estão representados os locais de reconhecimento dos oligonucleotídeos (reverso KAN2\_R e KAN2-F e direto, respectivamente), utilizados para caracterização do clone mutante de *Xac*.

#### 4.7 Caracterização da linhagem mutante de *Xac* (*Xac* $\Delta$ *Xac2853*) por PCR

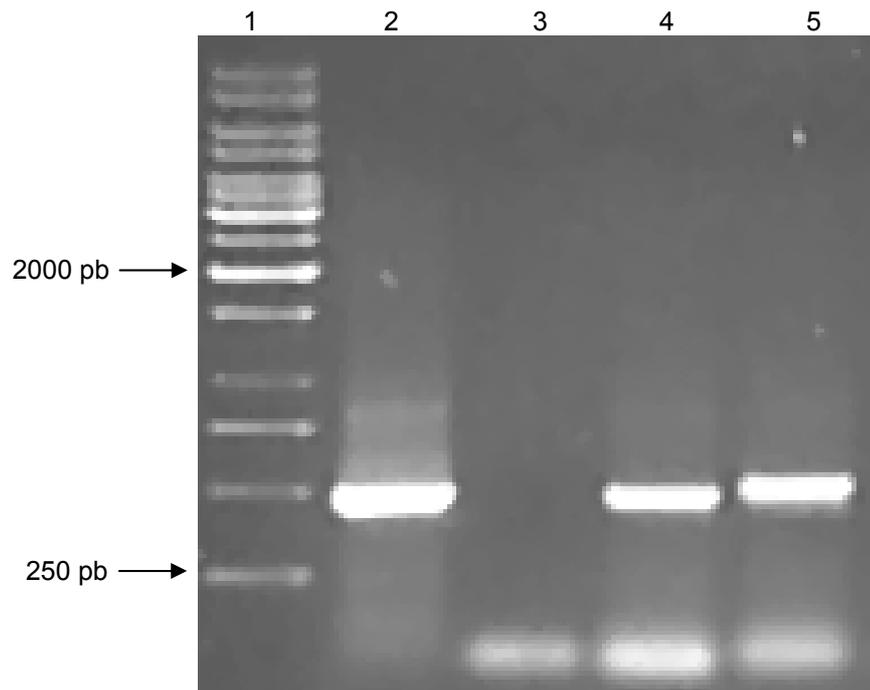
Foram obtidos 5 clones de *Xac* resistentes à canamicina (marca do transposon) após a eletroporação da bactéria com o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan. Análises por PCR com os oligonucleotídeos 3FR\_F e CYST\_R demonstraram que um dos clones obtidos apresentava a inserção do transposon no gene para a cisteíno protease de *Xac*, o que foi detectado pela presença da banda de 1785 pb (Figura 18, canaleta 5). Este clone foi novamente caracterizado por PCR com os oligonucleotídeos direto e reverso tanto para a seqüência do transposon como para a seqüência da ORF (Figura 19). Como resultados foram observados fragmentos de tamanho aproximado ao esperado, ou seja, de aproximadamente 472 pb e 503 pb, os quais demonstram a inserção do transposon no genoma da *Xac* próximo à posição central do gene para a possível cisteíno protease (Figura 20).



**Figura 18. Análise por PCR das colônias de *Xac* resistentes a canamicina.** PCR a partir do DNA genômico das colônias de *Xac* transformadas com o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan, utilizando-se os oligonucleotídeos 3FR\_F e CYST\_R. 1, padrão de massa molecular; 2, PCR usando o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan como molde; 3-5, PCR usando o DNA genômico de *Xac* transformadas com o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan, que foram capazes de crescer em meio seletivo.



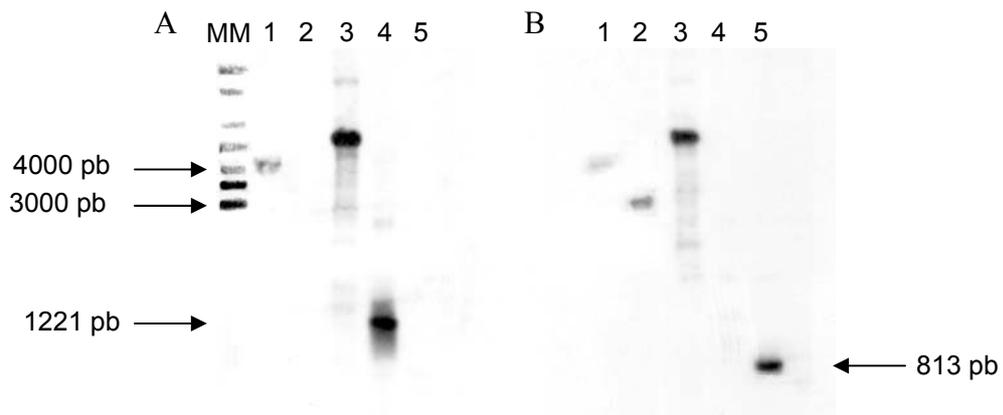
**Figura 19. Representação esquemática do sítio de reconhecimento dos oligonucleotídeos.** As setas representam os oligonucleotídeos. Da esquerda para direita temos: CYST\_F, KAN2\_R, KAN2\_F e CYST\_R. Os locais de hibridização na seqüência do transposon estão representados na Figura 17.



**Figura 20. Análise por PCR da inserção do transposon no DNA genômico de *Xac*.** Gel de agarose 0,8% da PCR do DNA genômico de *Xac* contendo o transposon no gene para cisteína protease. 1 padrão de massa molecular; 2 controle positivo (PCR a partir do plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan) amplificado com os oligonucleotídeos CYST\_F e KAN2\_R; 3 Controle negativo, 4 e 5 amplificação do DNA genômico com os oligonucleotídeos CYST\_F/ KAN2\_R e KAN2\_F/ CYST\_R respectivamente.

#### **4.8 Caracterização da linhagem mutante de *Xac* (*Xac* $\Delta$ Xac2853) pela análise de *Southern blot***

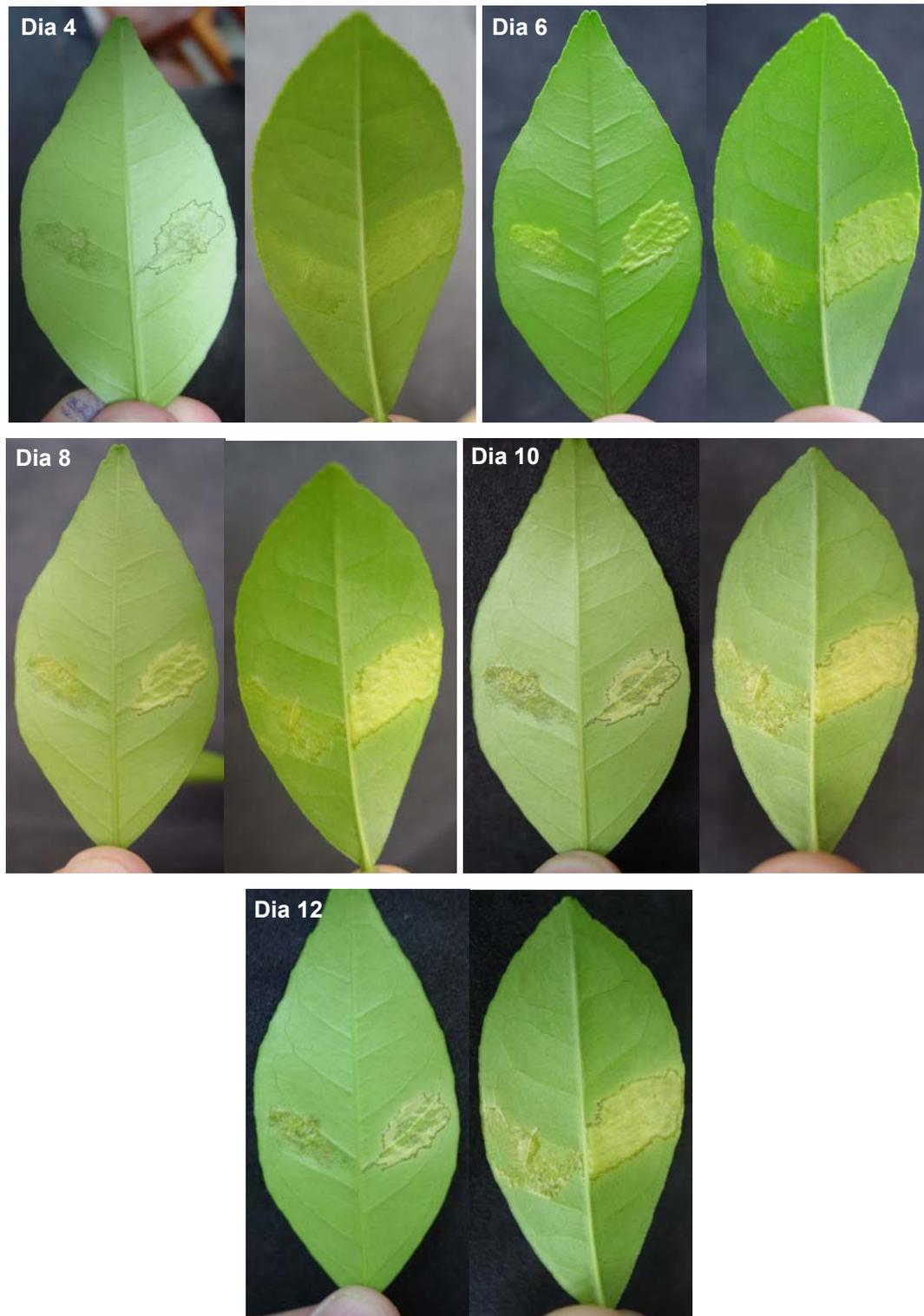
Os ensaios de *Southern blot* demonstram que a inserção do transposon no DNA genômico de *Xac* ocorreu por recombinação dupla, ou seja, apenas a seqüência do transposon se integrou ao DNA genômico, não tendo ocorrido a inserção do plasmídeo. Os ensaios de *Southern blot* também revelam que o transposon foi inserido apenas na ORF para a cisteína protease não havendo inserção múltipla do transposon (Figura 21), o que viria a prejudicar as análises de crescimento *in vivo*.



**Figura 21. Comparação do DNA genômico da linhagem selvagem e mutante por *Southern blot*.** A - Hibridização usando a sonda do transposon, B - Hibridização usando a sonda da ORF XAC2853. MM – padrão de massa molecular; 1 – Clivagem DNA genômico linhagem mutante; 2 – Clivagem DNA genômico linhagem selvagem; 3 – Plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan aberto com *Nde*I; 4 – produto de PCR da seqüência do transposon; 5 – Produto de PCR da ORF XAC2853.

#### 4.9 Avaliação do efeito da mutação *in vivo*

Após 4 dias da inoculação na folha de citros, já era possível notar uma menor hiperplasia na região das folhas infectadas com a linhagem mutante, comparativamente à linhagem selvagem, tanto nas folhas de laranja pêra-doce como de limão cravo infectados (Figura 22), o que indica uma menor virulência das cepas mutantes. As alterações de hiperplasia foram acompanhadas e fotografadas até o 12<sup>o</sup> dia após a infecção (Figura 22). Estes resultados demonstram que o nocaute gênico não ocorreu em um gene essencial para o desenvolvimento da bactéria, mas demonstra que o mesmo possivelmente está relacionado ao mecanismo de patogenicidade.



**Figura 22. Evolução da infecção em folhas de citros.** No lado esquerdo de cada folha foi feita a infecção da linhagem mutante e o lado direito a infecção da linhagem selvagem. Cada par de folhas (esquerda laranja e direita limão) mostra a evolução da infecção a cada dois dias, a partir do quarto dia, momento no qual já é possível notar uma ligeira diferença no padrão de crescimento das duas linhagens.

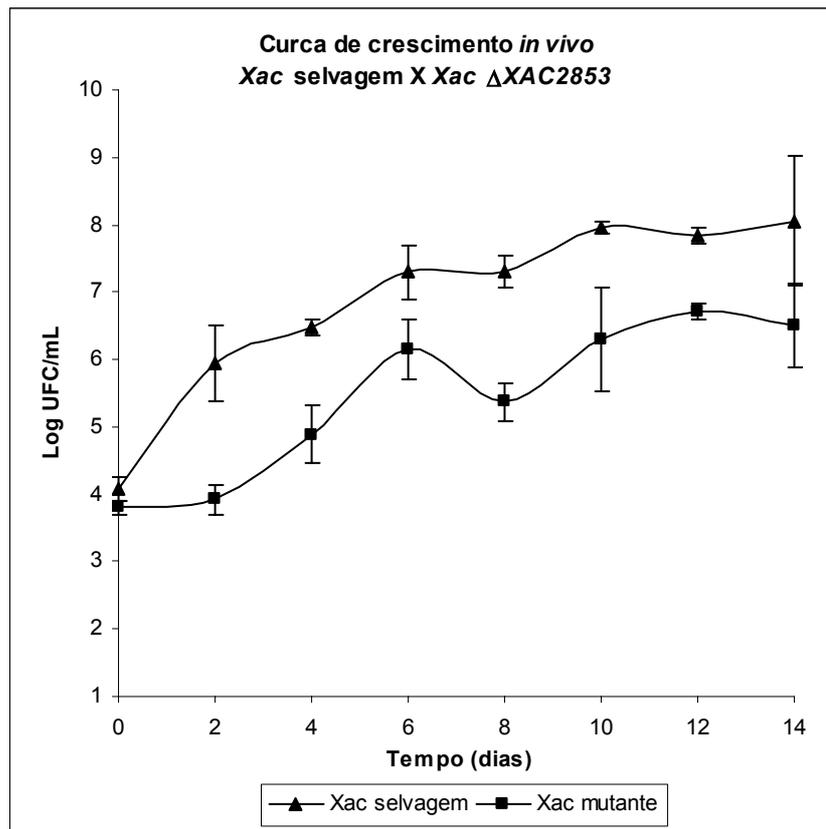
#### 4.10 Avaliação do efeito da mutação na curva de crescimento em citros

A partir dos dados brutos de cada ponto amostral para a elaboração da curva de crescimento, foi possível estabelecer o desvio padrão de cada ponto da curva (Tabela 3) utilizando a ferramenta DESVAP do software Microsoft Excel 2003.

**Tabela 3. Desvio padrão das curvas de crescimento *in vivo*.** Os valores do desvio padrão para cada dia de contagem do número de colônias viáveis para a linhagem selvagem ( $X_{ac}$ ) e a mutante ( $X_{ac} \Delta X_{ac2853}$ )

Dias	Desvio padrão	
	$X_{ac}$	$X_{ac} \Delta cys$
0	0,172862	0,109503
2	0,557976	0,222538
4	0,13194	0,426598
6	0,39626	0,438758
8	0,233025	0,276221
10	0,09065	0,771475
12	0,118228	0,127208
14	0,960858	0,62191

As médias diárias de bactérias viáveis em cada ponto amostral foram convertidas em escala logarítmica permitindo a construção do gráfico comparativo entre as curvas de crescimento da linhagem selvagem e mutante (Figura 23). A análise do gráfico, permite inferir que a linhagem mutante apresenta mudanças no padrão crescimento visíveis a partir do segundo, quando foi possível notar que o número de bactérias da linhagem selvagem havia aumentado aproximadamente 100 vezes e o número de bactérias mutantes permaneceu praticamente constante. Este resultado demonstra que a proteína em questão apresenta importante papel no estabelecimento da interação parasita/hospedeiro e conseqüentemente no desenvolvimento da doença.



**Figura 23. Curva de crescimento *in vivo*: linhagens selvagem e mutante.** Comparação do crescimento entre a linhagem de *Xac* selvagem e a mutante.

O grande aumento no número de células viáveis da linhagem mutante entre o 2º e 6º dia mostra que a função desta proteína pode não ser um fator determinante no desenvolvimento bacteriano na planta quando já estabelecida a interação parasita/hospedeiro. Entretanto, a variação no número de bactérias mutantes observada entre o 6º e 10º dia pode refletir uma possível função da proteína nos estágios tardios de desenvolvimento da bactéria em citros, o que acarretaria em uma proteína envolvida não apenas no estabelecimento da interação parasita/hospedeiro, como também na sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Novos estudos que permitam comparar estágios mais tardios entre as duas curvas de crescimento devem ser realizados o que irá permitir uma melhor comparação da influência desta proteína em diferentes estágios da infecção de citros pela bactéria *Xac*.

## 5 CONCLUSÕES

- Os diferentes fragmentos para a ORF da cisteína protease de *Xac*, bem como a ORF completa, foram clonados no vetor de expressão pET28a e pET32a e a expressão em *E. coli* foi bem sucedida;
- A proteína completa, bem como todos os fragmentos obtidos da proteína foram pouco solúveis, o que prejudica a sua purificação em coluna de afinidade e, conseqüentemente, a obtenção de maiores quantidades;
- Pela metodologia de purificação a partir dos corpos de inclusão foi possível a obtenção de maiores quantidades da proteína recombinante sem o peptídeo-sinal na forma desnaturada;
- Embora a atividade *in vitro* com a proteína recombinante sem o peptídeo-sinal não tenha sido detectada, indícios da atividade foram observados nos testes *in vivo* com o clone de *E. coli* expressando a ORF completa.
- Bactérias transformadas com o plasmídeo pET28a\_CYST (expressando a ORF completa) deram indícios de que o peptídeo sinal age como tal em *E. coli*;
- Será necessária a padronização dos passos de expressão da ORF completa e purificação da proteína para a obtenção de quantidades suficientes e em condições adequadas para a sua caracterização quanto à atividade *in vitro*;
- A inoculação de camundongos com a proteína purificada forneceu anticorpos capazes de reconhecer a proteína expressa no lisado celular;
- Foi feita a inserção do transposon no gene para a cisteína protease na posição 406 da ORF clonada no plasmídeo pTZ57R/T;
- A transformação de *Xac* com o plasmídeo pTZ57R/T\_CP-TN-Kan resultou na obtenção de uma linhagem mutante denominada de *Xac*  $\Delta$ Xac2853 a qual apresenta a ORF (XAC2853) interrompida pela inserção do transposon;
- Ensaio *in vivo* comparando a patogenicidade da linhagem mutante e selvagem mostram que o nocaute na ORF XAC2853 resulta em uma linhagem menos virulenta, tanto em limão quanto em laranja doce.

## 6 PERSPECTIVAS

- Os resultados até agora obtidos *in vivo* indicam atividade proteolítica da enzima, mas há necessidade de novos estudos *in vitro* que possam caracterizar de maneira conclusiva que a ORF estudada codifica para uma cisteíno protease. Estes estudos podem contribuir para identificar os alvos da protease na planta;
- Caso realmente o peptídeo sinal esteja agindo como tal em *E. coli*, este fato é de grande importância do ponto de vista biotecnológico, uma vez que atualmente são raros os sistemas de expressão em bactérias que permitem a purificação da proteína diretamente do meio extracelular. Estudos com gene repórter poderão confirmar se o peptídeo sinal realmente funciona como sinal de exportação em *E. coli*;
- Os anticorpos obtidos poderão ser utilizados para testar os níveis de expressão da proteína em diferentes situações, por exemplo, em outras linhagens ou tipos selvagens de *Xac* que apresentem virulência diferenciada da linhagem 306 aqui utilizada.
- Uma outra possibilidade seria a utilização da proteína recombinante para estudos de estrutura, por exemplo, por meio de cristalografia de Raio-X.
- Desenvolvimento de drogas baseadas na estrutura tridimensional da cisteíno protease de *Xac* que possam inativar a sua atividade e, conseqüentemente, auxiliar no combate ao cancro cítrico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P., ANDRADE, M. O., DOCENA, C., KHTER, L., RAMOS, C. H. I., da SILVA, A. C. R., FARAH, C. S. **Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid-encold type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.** J. Bacteriol., 187: 2315-2325, 2005.
- APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J., LIMA, A. P. C. A. **A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes.** Infect. Immun., 72: 5892-5902, 2004.
- BAH, S.; PAULSEN, B. S.; DIALLO, D.; JOHANSEN, H. T. **Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants.** J. Ethnopharmacol., 2006.
- BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach.** Oxford University Press, 1989.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., 72: 248-254, 1976.
- BLUNDELL, T. L. **Metalloproteinase super-families and drug design.** Nature Struct. Biol., 1: 73-75, 1994.
- BÜTTNER, D.; NOËL, L.; THIEME, F.; BONAS, U. **Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes.** J. Biotechnol, 106: 203-214, 2003.
- CANTEROS, B. I. **Management of citrus canker in Argentina. A review.** Proc. Int. Soc. Citriculture. 90, 2004.
- CLELAND, W. W. **Dithiothreitol, a new protective reagent for sh groups.** Biochemistry, 3: 480-2, 1964.
- CORPET, F. **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.** Nucle. Acids. Res., 16: 10881-10890, 1988.

- CULLIMORE, R. D. **Practical atlas for bacterial identification**. Lewis Publishers in an Imprint of CRC Press LLC. 2000.
- DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C., *et al.* **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities**. *Nature*, 417: 459-463, 2002.
- DAS, A. K. **Citrus canker – A review**. *J. App. Hort.*, 5: 52-60, 2003.
- DHARMAPURI, S.; SONTI, R. V. **A transposon insertion in *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence**. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 53-59, 1999.
- DUBIN, A.; MAK, P.; DUBIN, G.; RZYCHON, M.; STEC-NIERMCZYK, J.; WLADYKA, B.; MAZIARKA, K.; CHMIEL, D. **New generation of peptide antibiotics**. *Acta Biochim. Pol.*, 52: 633-638, 2005.
- EAKIN, A. E.; MCGRATH, M. E.; MCKERROW, J. H.; FLETTERICK, R. J., CRAIK, C. S. **Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi***. *J. Biol. Chem.*, 268: 6115-6118, 1993.
- EHRMANN, M.; BOLEK, P.; MONDIGLER, M.; BOYD, D.; LANGE, R. **TnTIN and TnTAP: mini-transposons for site-specific proteolysis *in vivo***. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 13111-13115, 1997.
- FUNDECITRUS. **Cancro cítrico**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>>. Acesso em: 14 jan., 2007.
- GORYSHIN, I. Y., NAUMANN, T. A., APODACA, J., REZNIKOFF, W. S. **Chromosomal deletion formation system based on tn5 double transposition: use for making minimal genomes and essential gene analysis**. *Genome Res.*, 13: 644-653, 2003.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. ***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker**. *Mol. Plant Pathol.*, 5: 1-15, 2004.

- GÜRLEBECK, D.; THIEME, F.; BONAS, U. **Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant.** J. Plant Physiol., 163: 233-255, 2006.
- HELLBERG, H.; NOWAK, N.; LEIPPE, M.; TANNICH, E.; BRUCHHAUS, I. **Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** Protein Expr. Purif., 24: 131-137, 2002.
- HOOPER, N. M. **Proteases: a primer.** Essays in Biochem., 38: 1-8, 2002.
- HOTSON, A.; CHOSY, R.; SHU, H.; ORTH, K.; MUDGETT, M. B. ***Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in plant.** Mol. Microbiol., 50: 377-389, 2003.
- HOTSON, A.; MUDGETT, M. B. **Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity.** Curr. Opin. Plant Biol., 7: 384-390, 2004.
- HU, N.-T.; HUNG, M.-N.; CHIOU, S.-J.; TNAG, F.; CHIANG, D.-C.; HUANG, H.-Y.; WU, C.-Y. **Cloning and characterization of gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** J. Bacteriol., 174: 2679-2687, 1992.
- JEONG, J.-J.; KUMAR, A.; HANADA, T.; SEO, P.-S.; LI, X.; HANSPAL, M.; CHISHTI, A. H. **Cloning and characterization of *Plasmodium falciparum* cysteine protease, falcipain-2B.** Blood Cells, Mol. Diseases, 36: 429-435, 2006.
- KAMOUN, S.; KADO, C. I. **A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts.** J. Bacteriol., 172: 5165-5172, 1990.
- LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. **Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design.** Chem. Rev., 102, 4459-4488, 2002.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227: 680-685, 1970.

LEUNG-TOUNG, R.; LI, W.; TAM, T. F.; KARIMIAN, K. **Thiol-Dependent enzymes and their inhibitors: A review**. *Curr. Med. Chem.*, 9: 979-1002, 2002.

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. **Xanthomonas campestris strain selection for xanthan production from olive mill**. *Wat. Res.*, 35: 1828–1830, 2001

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Pearson Education, Inc. 10ed., 2003.

MADDEN, J. C.; CLARK, V. L.; KURAMITSU, H. K. **Revised sequence of the *Porphyromonas gingivalis* prtT cysteine protease/hemagglutinin gene: homology with streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal proteinase**. *Infect. Immun.*, 63: 238-247, 1995.

MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. **Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections**. *Bioorg. Med. Chem.*, 7: 639-644, 1999.

MELO, R. L.; ALVES, L. C.; NERY, E. L.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. **Synthesis and hydrolysis by cisteine and serine proteases of short internally quenched fluorogenic peptides**. *Anal. Biochem.*, 293: 71-77, 2001.

MOTTRAM, J. C.; SOUZA, A. E.; HUTCHISON, J. E.; CARTER, R.; FRAME, M. J.; COOMBS, H. G. **Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 6008-6013, 1996.

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites**. *Protein Eng.*, 10, 1-6, 1997.

OCÁDIZ, R.; OROZCO, E.; CARRILLO, E.; QUINTAS, L. I.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; *et al.* **EhCP112 is na *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence**. *Cell. Microbiol.*, 7: 221-232, 2005.

PARK, D. S.; HYUN, J. W.; PARK, Y. J.; KIM, J. S.; KANG, H.W.; HAHN, J. H.; GO, S. J. **Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequence**. *Microbiol. Res.*, 161: 145-149, 2006.

- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 597-635, 1998.
- RAWLINGS, N. D. e BARRETT, A.J. **Evolutionary families of peptidases**. Biochem. J., 290: 205-218, 1993.
- RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R. & BARRETT, A.J. **MEROPS: the peptidase database**. Nucleic Acids Res., 34: D270-D272, 2006.
- REED, C. H. **Diagnostic applications of cystatin C**. Br. J. Biomed. Sci., 57: 323-329, 2000.
- REZNIKOFF, W. S. **Tn5 transposition: a molecular tool for studying protein structure-function**. Biochem. Soc. Trans., 34: 320-323, 2006.
- RODEN, J.; EARDLEY, L.; HOTSON, A.; CAO, Y.; MUDGETT, M. B. **Characterization of the *Xanthomonas AvrXv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells**. Mol. Plant. Interact., 17: 633-643, 2004.
- ROSENTHAL, P. J. **Cysteine proteases of malaria parasites**. Intern. J. Parasitol., 34: 1489-1499, 2004.
- RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. **Modes of inhibition of cysteine proteases**. Acta Biochim. Pol., 51: 861-873, 2004.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. **Cysteine proteases of parasitic organisms**. Mol. Biochem. Parasitol, 120: 1-21, 2002.
- SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 5463-5467, 1977.
- SAMBROOK, J; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SANTOS, K.; MEDRANO, F. J. **Expression, purification, and characterization of an aminopeptidase (XAC2987) with broad specificity from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Protein Expr. Purifi., 52: 117-122, 2007.

- SINGH, S. M.; PANDA, A. K. **Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins.** J. Biosci. Bioeng., 99: 303-310, 2005.
- SUN, Q; WU, W.; QIAN, W; HU, J; FANG, R.; HE, C. **High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system.** FEMS Microbiol. Lett., 226: 154-150, 2003.
- TANG, J. L.; GOUGH, C. L.; BARBER, C. E.; DOW, J. M.; DANIELS, M. J. **Molecular cloning of gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity.** Mol. Gen. Genet., 210: 443-448, 1987.
- TEIXEIRA, E. C. **Resistencia a cobre em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. Estudos de caracterização molecular e bioquímica de genes e proteínas.** Tese apresentada ao Instituto de Química da UNESP – Araraquára, 156 pag., 2006.
- WEBER, E.; KOEBNIK, R. **Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*.** J. Bacteriol., 188: 1405-1410, 2006.
- WIEDERANDERS, B. **Structure-function relationships in class CA1cysteine peptidase propeptides.** Acta Biochim. Pol., 50: 691-713, 2003.
- WIEDERANDERS, B.; KAULMANN, G. e SCHILLING, K. **Function of propeptide parts in cysteine proteases.** Curr. Protein Pept. Sci., 4: 309-326, 2003.