

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

ANA CAROLINA FRANCO SEVERO MARTELLI

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL PARCIAL DE
DOIS GENES DE *Xanthomonas citri*
POTENCIALMENTE RELACIONADOS COM A PATOGENICIDADE:
XAC1006 (MALATO DESIDROGENASE)
E XAC0223 (PROTEÍNA HIPOTÉTICA CONSERVADA)**

**SÃO CARLOS
2019**

ANA CAROLINA FRANCO SEVERO MARTELLI

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL PARCIAL DE
DOIS GENES DE *Xanthomonas citri*
POTENCIALMENTE RELACIONADOS COM A PATOGENICIDADE:
XAC1006 (MALATO DESIDROGENASE)
E XAC0223 (PROTEÍNA HIPOTÉTICA CONSERVADA)**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e
Biologia Molecular- PPGGEv/ UFSCar.**

Orientadora: Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur

**SÃO CARLOS
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Carolina Franco Severo Martelli, realizada em 12/02/2019:

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
UFSCar

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva
UFSCar

Prof. Dr. Mônica Rosas da Costa Iemma
UNIARA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, por todas as oportunidades e bênçãos diárias que tive, por colocar no meu caminho pessoas muito especiais que colaboraram de formas direta ou indireta no processo desta dissertação e às quais serei eternamente grata.

À Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, professora e orientadora deste trabalho, a qual me proporcionou esta oportunidade única, quando nada parecia ser favorável, confiou em mim de coração aberto, com fé e dedicação, me fez acreditar que seria capaz de realizar o que fosse necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brasil – Código de Financiamento 001) e à FAPESP (Proc. 07/50910-2) pela bolsa e apoio financeiro ao LBBMA, respectivamente.

A todos os membros do LBBMA e parceiros: Regina, Inaê, Evandro, Jéssica, Solange, Naiane e Luciana, pelos momentos agradáveis na companhia de vocês e pelas diquinhas essenciais de cada dia e em especial reconhecimento para Vinícius, Yuri e André, que me guiaram com toda prestatividade, sabedoria e experiência nos fundamentos de cada procedimento, durante todas as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora de defesa pelo tempo e sugestões compartilhados e aos professores: Dr. Flávio Henrique Silva, Dra. Silvia Nassif Del Lama, Dra. Fernanda de Freitas Aníbal, Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, pela disponibilização de equipamentos em seus laboratórios, ao Dr. Marco Antonio Del Lama pelo empréstimo de reagentes e ao Dr. Caio Cesar de Melo Freire pelo encaminhamento das análises em bancos de dados.

Por fim, aos meus familiares e marido Rafael, pelo amor, educação, incentivo, oportunidades oferecidas a mim, paciência neste período, apoio incondicional e por compartilharem comigo a alegria desta realização. A eles dedico este trabalho!

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) é causadora do cancro cítrico, uma doença que afeta várias espécies de plantas cítricas, ocasionando queda na produtividade e prejuízos econômicos aos produtores. Muitas proteínas têm sido detectadas por análise proteômica e relacionadas com a invasão e disseminação da bactéria no hospedeiro cítrico. No presente trabalho foram aplicadas técnicas bioquímicas para a obtenção e caracterização funcional parcial de dois genes de XAC: XAC1006 (malato desidrogenase - MDH) e XAC0223 (proteína hipotética conservada), detectados em trabalhos de proteômica prévios realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada (LBBMA)/UFSCar como estando potencialmente envolvidos com a patogenicidade de XAC. A proteína hipotética conservada XAC0223 não possui função descrita na literatura para XAC, mas a análise da sua sequência gênica por ferramentas de bioinformática evidenciou semelhanças com proteínas de membrana e de vesículas de membrana externa (OMVs) de função conhecida em outras espécies. Foi possível caracterizá-la parcialmente por teste de patogenicidade com um mutante de deleção desta ORF, obtido anteriormente, que aparentemente apresentou maior virulência do que XAC selvagem, o que pode corroborar a hipótese de que esta possa ser uma proteína detectada pela planta hospedeira, importante para desencadear suas respostas de defesa. A MDH foi descrita anteriormente como uma proteína de assinatura na superfície de células de XAC sob condições infecciosas *in vivo*, a qual também tem sido descrita para outros organismos patogênicos como uma proteína determinante em seus processos infecciosos. Neste trabalho a MDH recombinante foi obtida na forma nativa e com atividade enzimática confirmada, sendo também produzidos anticorpos anti-MDH, os quais foram utilizados em *Western blot*, levando à constatação de sua possível presença na superfície de XAC sob condições infecciosas. Espera-se, por meio dos resultados obtidos, contribuir para o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade de *Xanthomonas sp.*, confirmando alvos potenciais de interesse biotecnológico contra a doença e auxiliando no seu combate futuro.

Palavras-chave: *Xanthomonas citri* subsp *citri*; cancro cítrico; patogenicidade; proteínas *moonlighting*; malato desidrogenase; proteína hipotética conservada.

ABSTRACT

The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) is the cause of citrus canker, a disease that affects many species of citric plants, causing drop in productivity and losses to producers. Many proteins have been detected by proteomic analysis and related to the invasion and dissemination of the bacterium in the citrus host. In the present work, biochemical techniques were applied for the obtaining and partial functional characterization of two XAC genes: XAC1006 (malate dehydrogenase - MDH) and XAC0223 (conserved hypothetical protein), both detected in previous proteomics studies performed at the Laboratory of Biochemistry and Applied Molecular Biology (LBBMA)/UFSCar as potentially involved in XAC's pathogenicity. The conserved hypothetical protein (XAC0223) does not have a described function in literature for XAC, but its gene sequence analysis by bioinformatics tools shows similarities with membrane proteins and outer membrane vesicles (OMVs) of known function in other species. It was possible to characterize it partially by pathogenicity test with a deletion mutant of this ORF, previously obtained, which apparently presented greater virulence than the wild XAC, which may corroborate the hypothesis that it may be a protein detected by the host plant which can trigger their defense responses. MDH was described as a signature protein in XAC cells surface under *in vivo* infectious conditions, which has also been described for other pathogenic organisms, as a determinant protein in their infectious processes. In this work, a recombinant MDH was obtained in the native form with confirmed enzymatic activity, and anti-MDH antibodies were also produced and used in Western blot, providing more evidence of its possible presence on XAC's surface under infectious conditions. It is hoped, through the obtained results, to contribute to the knowledge of the pathogenicity mechanisms of *Xanthomonas* sp., confirming potential targets of biotechnological interest against the disease and helping in its future combat.

Key words: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; citrus canker; pathogenicity; "moonlighting" proteins; malate dehydrogenase; conserved hypothetical protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Folhas e fruto de laranja apresentando sintomas do cancro cítrico..	11
Figura 2. Bacilos da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> e colônias crescidas em placas com meio LB ágar.....	12
Figura 3. Proteínas de fração enriquecida de periplasma resultantes de análise proteômica diferencial.	15
Figura 4. Proteínas de superfície de XAC detectadas em análise proteômica.....	17
Figura 5. Ciclo do ácido cítrico celular.....	19
Figura 6. Procedimentos realizados no imunoensaio.....	36
Figura 7. Reação de conversão reversível de oxaloacetato em malato, catalisada pela enzima malato desidrogenase NADP- dependente.....	37
Figura 8. Procedimentos para a realização da curva de crescimento das linhagens de <i>Xanthomonas citri</i> 306 (selvagem) e Δ XAC0223 (mutante de deleção para a ORF XAC0223).....	38
Figura 9. Procedimentos realizados no teste de patogenicidade <i>in vivo</i> (<i>Citrus aurantiifolia</i>) para comparação dos sintomas causados pelo mutante Δ XAC0223 e por XAC selvagem.....	39
Figura 10. Peptídeo sinal nos 20 primeiros aminoácidos (pico) da proteína hipotética (XAC0223).....	42
Figura 11. Nenhum peptídeo sinal detectado para a malato desidrogenase (XAC1006) de XAC em análise.....	43
Figura 12. Produtos da amplificação por PCR.	44
Figura 13. Confirmação da clonagem no vetor de propagação pJET das duas regiões de DNA codificadoras das ORFs XAC0223 (Hip) e XAC1006 (MDH).....	45

Figura 14. Confirmação da clonagem no vetor de expressão pET28a das duas regiões de DNA codificadoras das ORFs XAC0223 (Hip) e XAC1006 (MDH).....	45
Figura 15. Análise de expressão e solubilidade da MDH recombinante por SDS-PAGE.....	47
Figura 16. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína MDH recombinante por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel.....	47
Figura 17. Bandas da MDH recombinante enviadas para a síntese do anticorpo anti-MDH policlonal em coelhos.....	48
Figura 18. Análise de expressão e solubilidade da proteína hipotética recombinante por SDS-PAGE.....	49
Figura 19. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína hipotética recombinante por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel.....	49
Figura 20. Primeiro ensaio de atividade da MDH recombinante.....	51
Figura 21. Segundo ensaio de atividade da MDH recombinante.....	52
Figura 22. <i>Western blot</i> com anticorpos residuais anti-MDH após contato de células intactas de XAC crescidas em meios CN e XAM-M.....	53
Figura 23. Curvas de crescimento de XAC 306 (selvagem) e Δ XAC0223 (mutante) crescidas em meio XAM-M.....	54
Figura 24. Folhas do teste de patogenicidade em <i>Citrus aurantiifolia</i> pela inoculação das linhagens selvagem e mutante.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição do meio XAM-M (p.H. = 5,4).....	25
Quadro 2. <i>Primers</i> utilizados na amplificação das ORFs XAC0223 e XAC1006.....	27
Quadro 3. Reagentes utilizados nas reações de PCR.	27
Quadro 4. Programa utilizado na amplificação dos fragmentos gênicos XAC0223 e XAC1006 por PCR.	28
Quadro 5. Ferramentas de bioinformática utilizadas na análise <i>in silico</i> dos genes XAC0223 e XAC1006.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O cancro cítrico e a bactéria <i>Xanthomonas citri</i>	11
1.2 Análise proteômica e funcional de genes relacionados à patogenicidade de XAC	13
1.3 Malato desidrogenase (MDH) e patogenicidade	18
1.4 Proteína hipotética conservada e patogenicidade.....	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Análise <i>in silico</i> das ORFs XAC0223 e XAC1006.....	24
3.2 Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de cultivo	24
3.3 Kits e anticorpos policlonais	25
3.4 Extração de DNA genômico e obtenção dos oligonucleotídeos para PCR	26
3.5 Amplificação dos fragmentos gênicos por PCR	27
3.6 Clonagem dos fragmentos gênicos em vetor de propagação	28
3.7 Sub-clonagem no vetor de expressão.....	29
3.8 Expressão heteróloga, purificação e análise da solubilidade das proteínas recombinantes	31
3.9 Estudos funcionais com as proteínas recombinantes	33
3.9.1 Caracterização funcional da MDH recombinante.....	33
3.9.1.1 Imunoensaio para detecção de MDH na superfície celular de XAC	33
3.9.1.2 Atividade enzimática da MDH	36
3.9.2 Caracterização funcional da proteína hipotética conservada	37
3.9.2.1 Curva de crescimento <i>in vitro</i> de XAC 306 selvagem e XAC mutante Δ XAC0223	37
3.9.2.2 Efeito da deleção do gene XAC0223 na infecção de XAC <i>in planta</i>	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40

4.1 Análise <i>in silico</i> das regiões codificadoras dos genes XAC0223 e XAC1006	40
4.1.1 Análise de XAC0223.....	40
4.1.2 Análise de XAC1006.....	42
4.2 Clonagem das regiões codificadoras dos genes XAC0223 e XAC1006 em vetores de propagação e expressão.....	43
4.3 Expressão, solubilidade e purificação das proteínas recombinantes	46
4.3.1 Expressão, solubilidade e purificação da MDH.....	46
4.3.2 Expressão, solubilidade e purificação da proteína hipotética recombinante	48
4.4 Análise funcional parcial das proteínas recombinantes.....	50
4.4.1. Malato desidrogenase	50
4.4.1.1. Atividade da malato desidrogenase recombinante.....	50
4.4.1.2 Imunoensaio de células intactas de XAC cultivadas em meios CN e XAM-M e <i>Western blot</i> com os anticorpos residuais	52
4.4.2. Proteína hipotética	53
4.4.2.1. Curva de crescimento de XAC selvagem e XAC mutante Δ XAC0223	53
4.4.2.2. Teste de patogenicidade <i>in vivo</i> (<i>Citrus aurantiifolia</i>) do mutante Δ XAC0223 vs XAC selvagem.....	54
5. CONCLUSÕES	56
6. PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO A	62
ANEXO B	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 O cancro cítrico e a bactéria *Xanthomonas citri*

O cancro cítrico é uma doença que acomete muitas espécies vegetais cítricas, por todo o mundo, ocasionando lesões nas folhas, frutos e ramos (DAS, 2003; WAITE et al., 2016). A doença é caracterizada pela formação de lesões circulares, que aumentam em relevo e formam vesículas, crescendo dentro de pústulas que escurecem, podendo causar desfolhamento e queda prematura dos frutos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DAS, 2003) (Figura 1).

Existe uma queda significativa na produtividade de citros com a doença, gerando altos gastos para as indústrias com medidas de prevenção ou de tratamento, tornando-se de extrema importância o uso de métodos de identificação mais rápidos e acessíveis da infecção (WAITE et al., 2016). Dentre as doenças que afetam os citros pelo mundo todo, o cancro cítrico é uma das que mais causam danos econômicos, e é assunto de leis rigorosas de quarentena e erradicação nos Estados Unidos e em muitos outros países (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Um programa de manejo integrado de controle do cancro cítrico em regiões endêmicas envolve o plantio de um estoque de mudas livre de cancro, escolha de cultivares de citros menos suscetíveis, implantação de quebra-ventos arborícolas, pulverização de bactericidas à base de cobre e aplicação de indutores de resistência sistêmica adquirida (FERENCE et al., 2018).

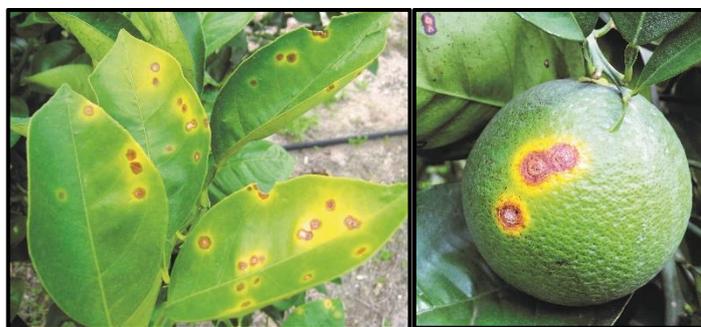


Figura 1. Folhas e fruto de laranja apresentando sintomas do cancro cítrico: lesões circulares marrons com borda amarelada. Fonte: Arquivo Fundecitrus.

A bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) (Figura 2), é gram-negativa, aeróbia obrigatória, com formato de bastonete e um flagelo polar (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Conforme descrito em Gottig et al. (2010), fazem parte dos mecanismos básicos de ataque de XAC ao hospedeiro as proteínas efetoras de patogenicidade introduzidas pela bactéria na planta (sistema de secreção de proteínas tipo III), as quais modulam as respostas de defesa basal da planta e beneficiam o patógeno. Posteriormente, há formação de biofilme com adesinas e xantana (exopolissacarídeo secretado) e o envolvimento de uma proteína semelhante a um peptídeo natriurético de plantas para regular a homeostase do hospedeiro, melhorando, assim, a fotossíntese deste, o que facilita a infecção no tecido devido ao estilo de vida biotrófico de XAC (GOTTIG et al., 2010).

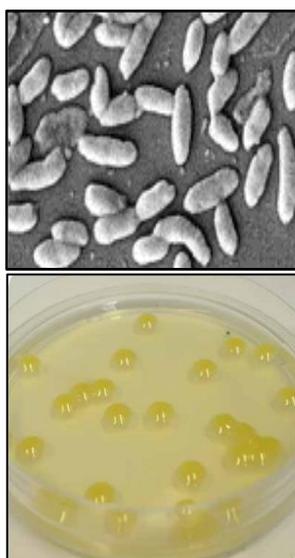


Figura 2. Bacilos da bactéria *Xanthomonas citri* (foto de cima) e colônias amareladas crescidas em placas com meio LB ágar (foto de baixo). Fonte: Adaptado de Behlau; Belasque Jr., (s.d.).

Em Sena-Vélez et al. (2016), o DNA extracelular (eDNA) foi considerado um fator muito importante para a virulência e sobrevivência de XAC em citros, devido à sua atuação na formação do biofilme. De acordo com uma revisão da literatura apresentada por Ference et al. (2018), estudos têm demonstrado que a regulação do grupo de genes denominados fatores de patogenicidade (*rpf*) é responsável pela síntese de enzimas extracelulares, como proteases, endoglucanases e também pela produção de xantana, a qual, juntamente com o eDNA, são importantes nos primeiros

estágios de formação do biofilme de *Xanthomonas*. Apontam ainda que a xantana pode contribuir para a suscetibilidade da planta suprimindo a calose (deposição de polissacarídeo que obstrui os poros dos vasos da planta em situações desfavoráveis, como uma infecção), além de fornecer proteção à bactéria tanto contra a dessecação como de compostos antimicrobianos.

Resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa sugerem que um fator que possa contribuir para a patogenicidade de XAC pode também estar relacionado à habilidade de regulação rigorosa das vias de metabolismo do carbono por XAC, capacitando-a de maneira vantajosa na utilização de fontes orgânicas como a xilose, componente presente nas paredes celulares do hospedeiro vegetal (ZANDONADI et al., resultados não publicados).

1.2 Análise proteômica e funcional de genes relacionados à patogenicidade de XAC

Com o objetivo de buscar alternativas ao controle do cancro cítrico, muitos trabalhos têm utilizado técnicas de proteômica e biologia molecular para identificação e caracterização de proteínas possivelmente relacionadas à fitopatogenicidade de XAC. O sequenciamento completo do genoma da estirpe 306 de XAC (DA SILVA et al., 2002) permitiu disponibilizar um banco de proteínas anotadas a partir do genoma, o qual é imprescindível para identificação de proteínas por espectrometria de massas em abordagens proteômicas.

Em um estudo de proteômica comparativo do biofilme de XAC e células planctônicas utilizando Eletroforese 2D em Gel Diferencial (2D-DIGE), foram detectadas grandes variações na composição das proteínas de membrana externa, entre elas proteínas receptoras ou transportadoras, bem como outras proteínas conhecidas por estarem envolvidas na formação do biofilme bacteriano (ZIMARO et al., 2013). Facincani et al. (2013) utilizaram uma abordagem proteômica chamada MudPIT, para analisar proteínas que são encontradas diferencialmente ao longo do tempo, quando o patógeno ataca a planta hospedeira ou é cultivada em meio indutor de patogenicidade XAM-1, avaliando a adaptação e a virulência do patógeno.

Em pesquisa realizada por Artier e co-autores (2016), de análise proteômica diferencial de fração enriquecida de periplasma de células de XAC crescidas em meio indutor de patogenicidade (XAM-M) e em meio não indutor de patogenicidade (NB) várias foram as proteínas diferencialmente expressas que foram identificadas por espectrometria de massas (Figura 3), sendo também demonstrado que o meio XAM-M é capaz de induzir genes *hrp* (de resposta à patogenicidade e hipersensibilidade) em XAC. Várias proteínas foram apresentadas como potencialmente relacionadas à virulência de XAC, por serem encontradas exclusivamente sob condições de indução de patogenicidade, ou terem sua abundância aumentada em meio XAM-M, como a superóxido dismutase (SOD), transglicosilase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a fosfoglicomutase. Estes autores verificaram ainda que a adaptação de XAC à condição infecciosa *in vitro* tem um impacto significativo na atividade metabólica do envelope celular, levando a drásticas alterações na abundância e/ou localização de muitas enzimas, a maioria não reportada previamente como estando envolvida na patogenicidade de XAC.

Estudos funcionais com essas proteínas de XAC descritas como estando potencialmente envolvidas na sua patogenicidade podem ser muito importantes tanto para validação da análise proteômica, como também para confirmação da anotação de genes do genoma, e ainda, para a obtenção de mais informações sobre o metabolismo bacteriano que possam levar ao controle ou prevenção do cancro cítrico.

Vários estudos funcionais têm sido relatados de caracterização de alvos importantes para a patogenicidade de XAC. Xia et al. (2016) reportaram o requerimento de uma endoglucanase extracelular (BgIC3) na virulência de XAC, visto que a deleção deste gene, que resultou na completa perda da atividade de carboximetil-celulase extracelular, atrasou o início dos sintomas do cancro e demonstrou que a densidade celular do mutante foi menor do que o tipo selvagem. O gene *pthA* foi destacado por Brunings e Gabriel (2003) como um gene codificador de uma proteína efetora de patogenicidade em XAC, e também em qualquer estirpe de *Xanthomonas* causadora do cancro cítrico, gene este que possui muitos alelos e serve como ferramenta diagnóstica da doença.

Spot	Condition (more abundant spot)	Open reading frame (ORF)	Protein ID (exclusive peptide count)*
1	NB	XAC0002	DNA polymerase III subunit β (0)
2	NB	XAC0818	Ribokinase (2)
3	NB	XAC2546	Ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase (2)
4	NB	XAC3556	Aminopeptidase A/I (10)
		XAC1204	Alanyl dipeptidyl peptidase (8)
		XAC3651	ATP synthase subunit α (5)
		XAC2378	Conserved hypothetical protein (0)
5	NB	XAC1838	Enolase-phosphatase (2)
6	NB	XAC0554	Putative NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase (5)
7	NB	XAC1012	Outer membrane protein (12)
		XAC3556	Aminopeptidase A/I (2)
		XAC0104	Metalloprotease (2)
8	NB	XAC1078	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (13)
		XAC2067	Keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase (2)
9	NB	XAC1012	Outer membrane protein (18)
10*	NB	XAC0957	Elongation factor Tu
		XAC1348	Acetoacetyl-CoA thiolase
		XAC0868	Hypothetical protein XAC0868
11*	NB	XAC0541	10-kDa chaperonin (9)
12*	NB	XAC0542	60-kDa chaperonin (32)
13	XAM-M	XAC3345	Pyruvate kinase type II
14	XAM-M	XAC0823	Outer membrane hemin receptor
15*	XAM-M	XAC0025	Xanthomonas conserved hypothetical protein
		XAC3583	dTDP-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase
16	XAM-M	XAC3442	Inorganic pyrophosphatase
		XAC0296	Monoxygenase
17	XAM-M	XAC0470	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
		XAC1421	Elongation factor Ts
18	XAM-M	XAC3352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
		XAC0124	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1
		XAC4367	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
		XAC2638	Hypothetical protein

Figura 3. Proteínas de fração enriquecida de periplasma resultantes de análise proteômica diferencial de células de XAC crescidas em meio indutor de patogenicidade (XAM-M) e em meio não indutor de patogenicidade (NB). Fonte: Adaptado de Artier et al. (2016).

A expressão e caracterização da cisteína peptidase (CPXAC) de XAC foi realizada por Soares-Costa et al. (2012), identificando-a como alvo potencial para

estudos de interação planta-patógeno, por ter sido detectada em meio indutor de patogenicidade.

Alexandrino et al. (2016) geraram um mutante de deleção da enzima trealase de XAC (*XccΔtreA*), com a finalidade de verificar a relação do gene, que codifica enzima para hidrólise da trealose, um dissacarídeo de glicose, com a patogenicidade de XAC. Os autores expressaram o produto gênico recombinante em *E. coli* e caracterizaram as estruturas secundária e quaternária da trealase, além de sua atividade enzimática. Em lisados de XAC e *X. fuscans aurantifolii* – tipo C (XauC), foi verificada a maior expressão da trealase na estirpe XauC, o que pode estar relacionado com a redução da patogenicidade de XauC relativamente a XAC, uma vez que a trealose é reconhecida como um carboidrato promotor de patogenicidade em outros organismos, além de possível reserva energética. Os autores sugerem que a enzima trealase pode ser um agente modulador da disponibilidade da trealose, mas pouco ainda se conhece sobre os mecanismos envolvidos e o papel dessa enzima com a fitopatogenicidade.

Em análise funcional realizada por Goto et al. (2016), foi feita a caracterização da enzima fosfoglicomutase (PGM) recombinante de XAC, desde a estrutura e determinação de parâmetros cinéticos até a relação com o desenvolvimento do cancro cítrico. A obtenção de um mutante por deleção do gene da PGM contribuiu para a constatação de que a fosfoglicomutase, necessária na síntese de polissacarídeo xantano (reconhecido como relacionado com a patogênese da doença), não é mandatória no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico, mas, de acordo com o estudo, interfere no desenvolvimento da doença causando sintomas mais amenos do que o observado na linhagem de XAC selvagem (linhagem 306).

Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBMA) do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar identificaram, por meio da análise proteômica, várias proteínas potencialmente relacionadas com a fitopatogenicidade de XAC, as quais poderiam ser alvos para o controle ou mesmo para o diagnóstico do cancro cítrico.

Em um destes trabalhos, células cultivadas *in vivo* e *in vitro* apresentaram mudanças nas proteínas da superfície de XAC, em resposta à infecção no hospedeiro, dentre elas: DnaK, 60 kDa-chaperonina, fosfomanose isomerase, protease Clp ATP-

dependente, receptores de enterobactinas férricas e malato desidrogenase (MDH) (Figura 4) (CARNIELLI et al., 2017).

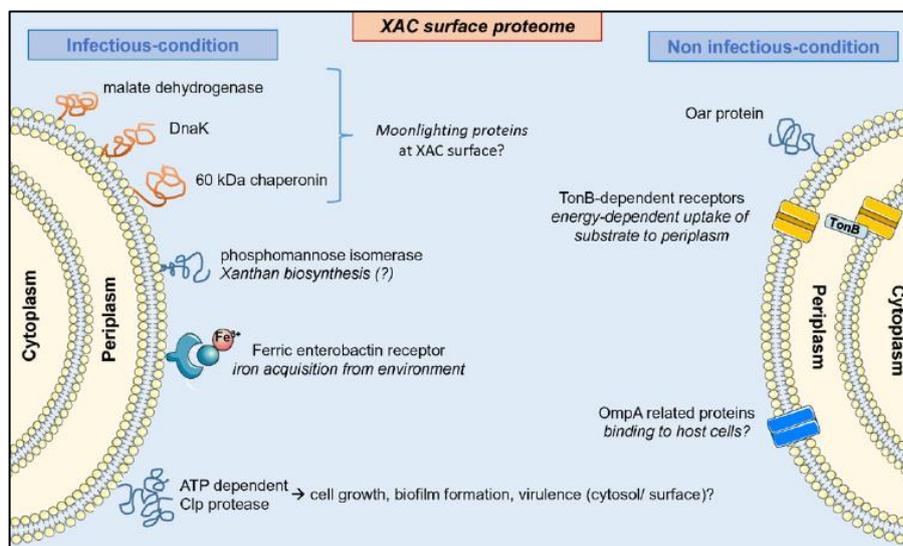


Figura 4. Proteínas de superfície de XAC detectadas em análise proteômica, diferencialmente expressas quando as células foram cultivadas em condição de infecção ao hospedeiro (*in vivo*), à esquerda, ou em condição não-infecciosa, à direita (*in vitro*), no LBBMA da UFSCar (São Carlos/SP). Fonte: Carnielli et al (2017).

Com base nos resultados de análise proteômica diferencial de frações enriquecidas de periplasma de XAC e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (XauB - bactéria causadora da cancrese, uma versão mais amena do cancro cítrico), foram evidenciadas em XAC enzima da via de síntese de lipídeos polares, que supostamente pode estar relacionada com a síntese de OMVs, e outras proteínas envolvidas com o efluxo de compostos tóxicos, as quais devem distinguir XAC de estirpes menos patogênicas como XauB (ZANDONADI et al., resultados não publicados). Dentre as proteínas identificadas nesta análise, na fração enriquecida de periplasma de XAC, estão: 6-fosfogluconato desidrogenase, NAD(P)H-3-fosfato desidrogenase dependente de glicerol, duas proteínas hipotéticas conservadas (uma delas sendo a ORF – Open Reading Frame - XAC0223), succinil-CoA sintetase β -subunidade, adenilossuccinato sintetase, transglicosilase, enolase, fator de alongação Tu (EF-Tu), fosfoglicomutase/fosfomanomutase, TolC e xilose isomerase.

Podemos observar várias proteínas potencialmente associadas à patogenicidade de XAC nos trabalhos supracitados, as quais necessitam de validação da análise proteômica prévia e/ou de caracterização funcional, como já realizado no

LBBMA para outras duas proteínas de XAC, fosfoglicomutase (GOTO et al., 2016) e trealase (ALEXANDRINO et al., 2016), como detalhado acima. O presente estudo teve, portanto, o intuito de dar continuidade a esses trabalhos, por meio da análise funcional parcial da malato desidrogenase (XAC1006) e da proteína hipotética conservada (XAC0223) de XAC.

1.3 Malato desidrogenase (MDH) e patogenicidade

Por meio da tecnologia 2D-DIGE aplicada a células intactas de XAC para garantir a marcação de proteínas pouco abundantes da superfície celular, foram detectadas mudanças nas proteínas constituintes da superfície de XAC, em resposta à infecção no hospedeiro, ao se fazer a comparação de células cultivadas *in vivo* (folhas destacadas de citros) e *in vitro* (meio de cultivo não indutor de patogenicidade). Dentre outras proteínas, a malato desidrogenase (MDH) foi encontrada na superfície de XAC em resposta à infecção no hospedeiro (*in vivo*), sendo, ainda, nesse mesmo trabalho, reportada pela primeira vez na literatura como uma proteína de assinatura das células infecciosas exsudadas das folhas (CARNIELLI et al., 2017).

É imprescindível, entretanto, um melhor entendimento do envolvimento da MDH na superfície celular com a patogenicidade de XAC, uma vez que tal proteína é conhecida como característica do citosol, onde catalisa a interconversão de L-malato a ácido oxaloacético dependente de NAD(P)⁺/NAD(P)H em muitas vias metabólicas celulares (ROZOVA et al., 2015) (Figura 5). Assim, embora o gene de MDH (XAC1006) seja único no genoma de XAC (NCBI), os resultados de Carnielli e colaboradores mencionados acima indicam duas possíveis localizações com funções aparentemente distintas para a MDH de XAC, sendo sua possível função na superfície celular ainda não compreendida.

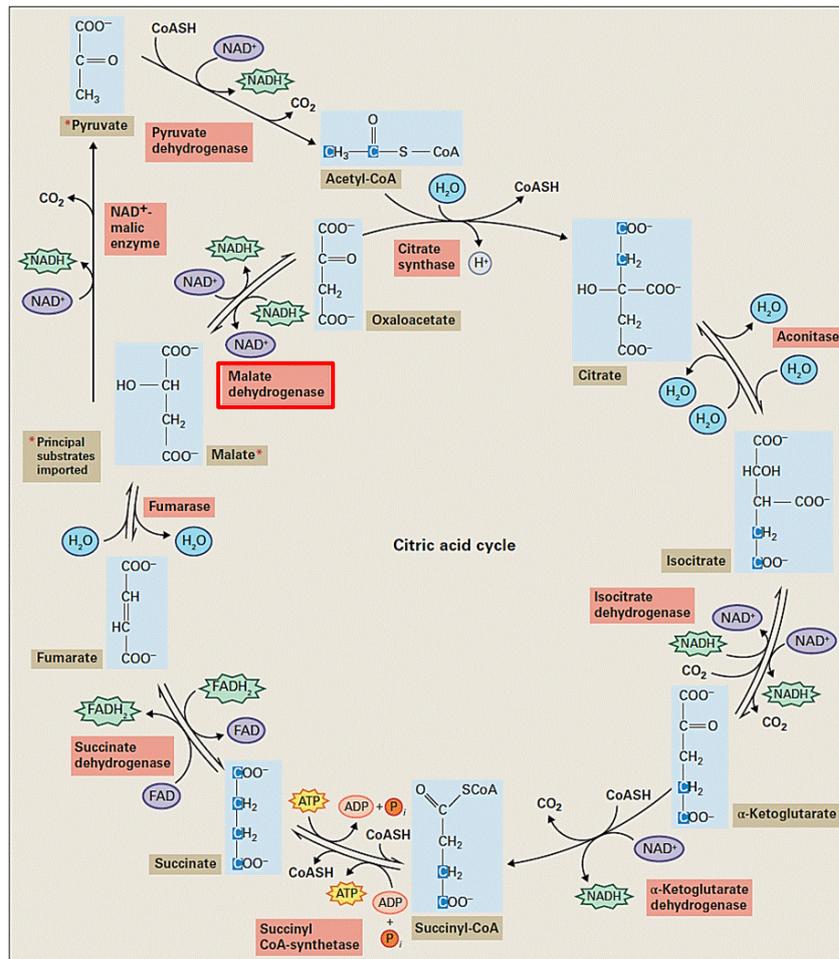


Figura 5. Ciclo do ácido cítrico celular em que a enzima malato desidrogenase (quadro vermelho com borda) atua catalisando a reação reversível de conversão malato/oxaloacetato. Fonte: Buchanan (2015).

Algumas proteínas potencialmente envolvidas na patogenicidade de XAC e características de citosol também apresentaram localização atípica na fração enriquecida do periplasma (ARTIER et al., 2016). A denominação “Proteínas *moonlighting*” tem sido utilizada para proteínas detectadas em localizações distintas na célula com múltiplas funções (FLODEN; WATT; BRISSETTE, 2011). Jeffery (2015) realizou um dos estudos pioneiros e de referência sobre proteínas *moonlighting* e as descreve como sendo um subconjunto de proteínas multifuncionais em que uma cadeia polipeptídica exibe mais de uma função bioquímica ou biofísica fisiologicamente relevante. O estudo ainda aponta que as múltiplas funções não são devidas a fusões de genes ou múltiplos fragmentos proteolíticos.

Foram identificadas várias centenas de proteínas *moonlighting* nos últimos anos, incluindo um conjunto diversificado de proteínas com uma grande variedade de

funções (MANI et al., 2015). Algumas participam de múltiplos processos bioquímicos usando um bolso de sítio ativo para catálise e uma parte diferente da superfície da proteína para interagir com outras proteínas, podendo adquirir funções diferentes dentro e fora da célula, além de desempenharem papel central em muitas doenças (JEFFERY, 2015). Já existem alguns bancos de dados para proteínas *moonlighting* (CHEN et al., 2018; MANI et al., 2015), os quais facilitam a busca destas e conectam as sequências de aminoácidos à estrutura e funções possíveis da proteína, auxiliando no entendimento da sua evolução. Proteínas de membrana, entretanto, têm suas estruturas e funções menos conhecidas por serem mais insolúveis e desafiadoras na sua expressão e purificação.

As funções variadas das proteínas *moonlighting* pareciam ser restritas aos eucariotos, pois eram, frequentemente, consequência de eventos de *splicing* alternativos (LEIMKÜHLER, 2017). Bactérias e outros patógenos comumente usam proteínas citosólicas na superfície celular para formar e manter interações com as espécies hospedeiras, algumas com papel central, seja na infecção, invasão, virulência e formação de biofilme (JEFFERY, 2017).

Wang et al. (2015) descreveram a malato desidrogenase como um substrato da quinase de proteínas serina/treonina (PknD) em *Mycobacterium tuberculosis* e, nesta mesma bactéria, a malato sintase, proteína de interação da malato desidrogenase, foi identificada como proteína *moonlighting* originária do citoplasma e encontrada na superfície da bactéria em ligação com laminina e fibronectina, associadas à adesão da bactéria ao hospedeiro humano (HENDERSON; MARTIN, 2011).

Em González-Fernández et al. (2015), vários estudos sobre o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* foram reunidos e a MDH foi menos expressa em experimentos de secretoma *in vitro* em uma estirpe menos virulenta quando comparada à mais virulenta e categorizada como uma proteína relacionada com a produção e secreção de toxinas. A MDH também foi encontrada nas proteínas do micélio de seis linhagens selvagens deste fungo, com diferenças quantitativas significativas, sendo maior nas linhagens isoladas do material verde, implicando que esta desempenha um papel fundamental na biossíntese do ácido oxálico para produzir um nicho ecológico mais adequado para as atividades do fungo.

No fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, a MDH é caracterizada como importante antígeno, com expressão induzida de duas isoformas na superfície do fungo na deficiência do íon ferro (PHILIPSEN, 2011). Em *Cryptococcus neoformans*, a MDH está presente não apenas no citoplasma celular, mas também foi encontrada em vesículas na superfície e relacionada com fatores de virulência do microrganismo (RODRIGUES et al. [2007] apud PHILIPSEN, [2011]).

Com exceção do relato de Carnielli et al (2017), não existem outros relatos na literatura sobre a relação da MDH e a patogenicidade de XAC, demandando mais investigações sobre sua confirmação na superfície de XAC e seu possível papel na patogenicidade da bactéria.

1.4 Proteína hipotética conservada e patogenicidade

Quanto à proteína hipotética conservada XAC0223, esta foi identificada em Zandonadi et al. (resultados não publicados) no periplasma de XAC, quando cultivadas em meio indutor de patogenicidade (XAM-M), comparativamente a XauB, linhagem pouco virulenta. Esta proteína possui peptídeo sinal na porção N-terminal e 94% de identidade da sua sequência nucleotídica com uma proteína de membrana externa de *X. oryzae* (PXO_03968) (PARK et al., 2014), pertencente à família Ax21, composta de moléculas ativadoras da imunidade mediada por XA21 (BAHAR et al., 2014) e classificadas como pertencentes ao padrão molecular associado a patógenos (SHUGUO et al., 2012).

Dada esta semelhança, foi sugerido em Zandonadi et al. (resultados não publicados) que a proteína hipotética pode estar presente em OMVs de XAC, como uma estratégia do processo de infecciosidade. Porém, sua função biológica ainda não foi determinada, sendo necessárias mais investigações sobre a ORF XAC0223 em XAC. Algumas informações são conhecidas a respeito da ORF em outras bactérias, como descrito a seguir.

Ferreira et al. (2016) identificaram um gene relacionado à XAC0223 em *X. campestris* pv. *campestris* (meio XVM2), envolvido com OMVs, juntamente com outras proteínas de membrana e com secreção direcionada por um peptídeo sinal. Os autores sugeriram a requisição desta para sobrevivência da bactéria e adaptação no

interior do hospedeiro. Ainda neste estudo, ortólogos em *X. campestris* e *X. oryzae* foram caracterizados como ativadores da imunidade mediada pela família Ax21, como moléculas detectadas por receptores na planta, e classificadas como PAMP (Padrões Moleculares Associados à Patogenia), os quais agregam uma série de moléculas envolvidas na dinâmica entre patógenos e hospedeiros através da motilidade, formação de biofilme, virulência, sistema *quorum-sensing* (sinalização inter-celular).

Shuguo et al. (2012) estudaram um gene ortólogo de XAC0223, PXO_RS02705 de *X. oryzae*, e verificaram que os hospedeiros possuem habilidades em perceber a Ax21 sulfatada e com isso ativar respostas de resistência. Em trabalho de Park et al. (2014), o gene PXO_03968, antes classificado como um Ax21, foi identificado como uma proteína de membrana externa em *X. oryzae* (*Xoo*), sendo renomeado como gene Omp1X. A proteína por ele codificada foi caracterizada como semelhante a uma porina, com domínio β -barril e peptídeo sinal em N-terminal, assim como o apresentado para XAC0223 *in silico*. O mutante de deleção do gene PXO_03968 foi comparado com a linhagem selvagem de *Xoo* verificando-se proteínas diferencialmente expressas envolvidas na transdução de sinal, motilidade celular e formação de biofilme (reduzidos no mutante).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir com a análise funcional de dois genes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, XAC0223 e XAC1006, os quais codificam duas proteínas descritas como potencialmente envolvidas com a patogenicidade de XAC em análise proteômica prévia, as quais foram anotadas no genoma como proteína hipotética conservada e malato desidrogenase (MDH), respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

- Análise *in silico* das ORFs XAC0223 e XAC1006;
- Clonagem das regiões codificantes dos genes XAC0223 e XAC1006 a partir do DNA genômico de XAC 306;
- Expressão das proteínas em sistema heterólogo seguida de purificação e análise de solubilidade das proteínas recombinantes;
- Confirmação da atividade enzimática da MDH (XAC1006);
- Verificação da presença da MDH na superfície de XAC por imunoenensaio em células intactas associado a *Western blot*, em situação de indução da patogenicidade *in vitro*, comparativamente à não indução da patogenicidade.
- Estudo do efeito da deleção do gene XAC0223 no crescimento celular *in vitro* e na patogenicidade de XAC *in vivo*, utilizando o mutante obtido anteriormente em nosso grupo de pesquisa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise *in silico* das ORFs XAC0223 e XAC1006.

Alinhamentos locais (BLAST/ NCBI) de sequências nucleotídicas dos genes XAC0223 e XAC1006 foram realizados com base no genoma completo de *Xanthomonas axonopodis citri* subsp. *citri* 306 (DA SILVA et al., 2002) e no genoma parcialmente descrito das demais estirpes de *Xanthomonas*. Com as sequências de aminoácidos foi feita uma busca por mais informações sobre as proteínas codificadas por estes genes como localização celular, função, identidade com outras proteínas, sítios de fosforilação, peso molecular e presença de peptídeo sinal, utilizando bancos de dados de proteínas e outras ferramentas de bioinformática (*in silico*) disponibilizadas em ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal, CBS Prediction Servers, European Bioinformatics Institute (EBI) e ELIXIR Core Data Resources.

3.2 Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de cultivo

A linhagem bacteriana de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) foi fornecida pelo Fundecitrus (XAC 306). As linhagens de *E. coli* DH5 α e BL21 (DE3) foram utilizadas para a clonagem / propagação dos genes recombinantes de *X. citri* e para expressão das proteínas recombinantes, respectivamente. A linhagem de *X. citri* com deleção do gene XAC0223, denominada Δ XAC0223, foi obtida por Lima (2018) no LBBMA, segundo metodologia de deleção publicada em Alexandrino et al. (2016) e em Goto et al. (2016). O estoque de XAC foi mantido a -80°C em meio LB (Luria *Broth*, SIGMA-ALDRICH - 10 g/L triptona, 5 g/L extrato levedura, 5 g/L NaCl) contendo glicerol a 20%. Os cultivos em meio líquido (LB) foram realizados em incubadoras *Innova* 44 (*New Brunswick*) a 30°C e 250 rpm para XAC e a 37 °C e 250 rpm para *E. coli*, enquanto que em meio sólido (LB-ágar - Acumedia) a incubação também ocorreu nas temperaturas descritas.

Para as curvas de crescimento de XAC e da linhagem mutante de deleção da ORF XAC0223, as células foram cultivadas em meio indutor de patogenicidade XAM-M (Quadro 1) a 30°C e 200 rpm em agitadora *Innova* 44 (*New Brunswick*).

Para o imunoenensaio, XAC foi repicada em LB-ágar e em seguida cultivada nos meios CN (caldo nutriente Difco - extrato de carne bovina 3 g/L; peptona 5 g/L) e XAM-M, a 28°C e 250 rpm.

Quadro 1. Composição do meio XAM-M (p.H. = 5,4).

Reagentes	Concentração final
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,57 mM
KH ₂ PO ₄	33,06 mM
K ₂ HPO ₄	60,28 mM
Citrato de sódio (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	1,7 mM
MgSO ₄	1,0 mM
Casaminoácidos	0,03% (m/v)
Frutose	10 mM
Sacarose	10 mM
BSA	1,0 mg/mL

Fonte: Adaptado de Artier et al (2016).

3.3 *Kits* e anticorpos policlonais

Para a extração e purificação de fragmentos de DNA amplificados e de DNA plasmidial a partir do gel de agarose foram utilizados os *kits* Agarose Gel-extraction e Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (ambos fornecidos pela Cellco, São Carlos-SP), respectivamente. Os anticorpos anti-MDH foram produzidos em coelho pela empresa Proteimax (São Paulo-SP) contra a proteína recombinante MDH purificada, obtida neste trabalho.

3.4 Extração de DNA genômico e obtenção dos oligonucleotídeos para PCR

A extração de DNA genômico de XAC foi realizada por método de fenol/clorofórmio, a partir de 1 mL das células do pré-inóculo, centrifugado por 30 segundos e ressuspenso o pellet em 467 µL de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8). Foram adicionados 30 µL de SDS 10% e 3 µL de lisozima (SIGMA-ALDRICH) a 50 mg/mL, homogeneizados levemente e com incubação de 30 minutos a 37°C. Para os 500 µL de solução obtida, foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1) e após uma homogeneização muito lenta, o conteúdo foi centrifugado por 5 minutos (a 15.000 xg) e o sobrenadante foi separado em outro Eppendorf de 2 mL para repetição da extração com mais 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugação. O novo sobrenadante obtido foi transferido para outro Eppendorf para a extração apenas com clorofórmio, ambos com o mesmo volume. Após homogeneização e centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi transferido para um Eppendorf de 1,5 mL para precipitação com 0,1 volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2), ou seja, para os 500 µL de DNA adicionou-se 50 µL de NaAc, e 0,6 volume (300 µL) de isopropanol. O conteúdo foi centrifugado por 1 minuto (a 5.000 xg) e o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado, seguindo nova centrifugação de 1 minuto e descarte do sobrenadante com secagem do microtubo. Por fim, o *pellet* contendo o DNA genômico foi ressuspenso em 150 µL de TE e utilizado como molde para amplificação dos genes na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Os oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação das sequências codificadoras dos genes alvos foram desenhados com base na sequência depositada no GenBank do NCBI, com sítios de restrição para *NdeI* e *HindIII* (Quadro 2), sítios estes que, pela verificação com o *software WebCutter 2.0*, não estão presentes nas sequências dos genes alvos.

Foram excluídos os 60 primeiros nucleotídeos apenas da ORF XAC0223 no desenho do *primer forward*, referentes à codificação do peptídeo sinal da proteína hipotética conservada, conforme previsto por análise pelas ferramentas PHobius (ExpASy) e SignalP (CBS Prediction Servers) .

Os *primers* foram analisados com o *software OligoAnalyzer 3.1* (ThermoFisherScientific) quanto à temperatura de hibridização e formação de *hairpin*

ou dímeros, sendo ainda realizadas simulações das PCRs com os *primers in silico* utilizando o *software WebPCR*.

A síntese dos *primers* foi realizada por empresa especializada (Exxtend, Campinas-SP) e o estoque liofilizado foi diluído em água Milli-Q para concentração de 100 µM.

Quadro 2. Primers utilizados na amplificação das ORFs XAC0223 e XAC1006. Os nucleotídeos sublinhados são referentes aos sítios de restrição das enzimas NdeI (5'-CA[^]TATG-3') e HindIII (5'-A[^]AGCTT-3').

PROTEÍNA HIPOTÉTICA (XAC0223)
Primer Forward: 5' - <u>CA[^]TATG</u> GCT GAA AAC CTC TCC TAC - 3'
Primer Reverse: 5' - <u>A[^]AGCTT</u> TTA CCA GCT GAA GC - 3'
MALATO DESIDROGENASE (XAC1006)
Primer Forward: 5' - <u>CA[^]TATG</u> AAA GCA CCT GTT CGT G - 3'
Primer Reverse: 5' - <u>A[^]AGCTT</u> TCA GCC CAG CAG - 3'

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Amplificação dos fragmentos gênicos por PCR

O isolamento das regiões codificantes relativas aos genes XAC0223 e XAC1006, a partir do DNA genômico de XAC306 foi feito por PCR, conforme reação indicada no Quadro 3.

Quadro 3. Reagentes utilizados nas reações de PCR. São indicados os volumes dos reagentes utilizados para 50µL de volume total na amplificação dos fragmentos gênicos XAC0223 e XAC1006.

REAGENTES	VOLUME (µL)
H2O Milli-Q	31
Buffer 10x	10
dNTPs 10 mM	1
Primer F 10 µM	2,5
Primer R 10 µM	2,5
DNA molde 1 ng/µL	2,5
DNA polimerase - Phusion Green High-Fidelity (ThermoFisherScientific)	0,5

Fonte: elaborado pela autora.

As amplificações foram realizadas em um termociclador C1000 *Touch Thermal Cycler* (BIO-RAD) conforme programa descrito no Quadro 4.

Quadro 4. Programa utilizado na amplificação dos fragmentos gênicos XAC0223 e XAC1006 por PCR.

Etapa da PCR	Tempo	Ciclos
Desnaturação a 98 °C	30 s	34 repetições
Desnaturação a 98 °C	10 s	
Hibridização*	10 s	
Extensão a 72 °C	15 - 30 s (a cada 1000 pares de bases)	
Extensão a 72 °C	5 min	
Conservação a 4 °C	∞	

*As temperaturas de hibridização foram específicas para cada conjunto de primers, para cada ORF: 56°C para XAC0223 e 58°C para XAC1006. Fonte: elaborado pela autora.

Em seguida, os produtos resultantes da PCR foram checados por eletroforese em gel de agarose 1%, onde as bandas referentes aos fragmentos gênicos de cada ORF foram excisadas e purificadas com *kit agarose gel-extraction* (Cellco).

3.6 Clonagem dos fragmentos gênicos em vetor de propagação

Os procedimentos de biologia molecular realizados neste trabalho foram baseados em protocolos descritos pelo manual *Molecular Cloning: A laboratory manual* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), ou descritos conforme são citados.

Para a clonagem, os produtos da PCR, purificados do gel de agarose, foram ligados ao vetor de propagação pJET1.2/blunt (Anexo A) do *kit* comercial *CloneJet PCR Cloning* (*ThermoFisherScientific*) utilizando a enzima T4 ligase (1U/μL) e tampão do próprio *kit*, sendo a incubação realizada por 5 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a proporção molar 3:1 para a razão do inserto: vetor, ou seja, 29,85 ng do inserto da proteína hipotética (597 pb) e 49,4 ng da MDH (988 pb), ligados a 50 ng/μL de pJET1.2, gerando as construções pJET_0223 e pJET_1006.

Para cada construção, 2 μL da reação de ligação foram adicionados à uma alíquota de células de *E.coli* DH5 α quimiocompetentes (preparadas previamente com CaCl_2) e a mistura incubada por 20 minutos em banho de gelo, sem a necessidade de realização de choque térmico. Logo em seguida, as células foram plaqueadas em 10 mL de LB-ágar contendo 10 μL do antibiótico ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SIGMA-ALDRICH), para selecionar os transformantes, sendo incubadas em estufa a 37°C *overnight*. Uma colônia de cada placa foi inoculada em 10 mL de LB com ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo o crescimento realizado *overnight* a 37°C e 250 rpm em *shaker*.

Dos inóculos contendo as células cultivadas, 500 μL foram adicionados a glicerol 20% e armazenados a -80°C, a fim de garantir o estoque de células contendo as construções com o plasmídeo de propagação. Com o restante do volume dos inóculos foram realizadas minipreps com *kit* comercial *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (Cellco), ressuspendendo-se o DNA em 30 μL de água Mili-Q. As quantificações foram realizadas em espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare).

As soluções de plasmídeos (com cerca de 300 ng/ μL cada) foram triadas por análise de restrição do DNA plasmidial com as enzimas *NdeI* e *HindIII* seguida de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, em sistema *Mini-Sub Cell GT* (BIO-RAD). Amostras dos clones pJET_0223 e pJET_1006, que confirmaram presença do inserto de tamanho esperado, foram enviadas para sequenciamento de DNA pelo método de Sanger no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (USP – S. Paulo-SP). As sequências obtidas foram analisadas com a ferramenta de bioinformática Unipro UGENE.

3.7 Sub-clonagem no vetor de expressão

O vetor de expressão utilizado para a sub-clonagem dos genes alvos foi o pET28a (Novagen – Anexo B), o qual tem sob controle do promotor lac a RNA polimerase do bacteriófago T7, que reconhece o promotor viral para expressão do gene de interesse, além de conter uma sequência codificadora da cauda de histidina na porção N-terminal, a qual possibilita a purificação das proteínas recombinantes por coluna de afinidade. Este vetor também conferiu resistência ao antibiótico canamicina para as células transformadas.

O pET28a foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* e tampão 10x *Green buffer fast digest* (*ThermoFisherScientific*) e recuperado em gel de agarose 1%, assim como os insertos XAC0223 e XAC1006 dos clones recombinantes em pJET propagados anteriormente. Foram preparadas reações de ligação (10 µL) na proporção molar 3:1 para a razão do inserto:vetor, utilizando 67,11 ng de pET28a, 22,4 ng para a ligação do inserto XAC0223 e 37 ng para a do inserto XAC1006, a enzima T4 ligase e tampão 10x do mesmo *kit* (*ThermoFisherScientific*), e estas foram mantidas a 22°C, *overnight*. Através destas ligações, duas novas construções de vetor_inserto foram obtidas, agora do vetor de expressão pET28a com os insertos respectivos de cada ORF.

Toda a reação de ligação para cada construção foi usada na transformação de *E. coli* DH5α quimiocompetentes, com incubação em gelo por 30 minutos, choque térmico a 42°C por 30 segundos e recuperação de células em 120 µL de meio LB, a 37°C em *shaker* e 250 rpm, por uma hora. Em seguida, todo o conteúdo foi plaqueado em LB ágar contendo o antibiótico canamicina a 50 µg/mL (SIGMA-ALDRICH) e as placas foram incubadas a 37°C *overnight*. Uma colônia foi inoculada em 5 mL de LB com canamicina (50 µg/mL), com incubação *overnight* a 37°C e 250 rpm. Células desses clones de expressão também foram estocadas em glicerol 20% a -80°C.

Os clones transformantes foram confirmados por análise de restrição em eletroforese em gel de agarose 1% e os plasmídeos de clones confirmados foram obtidos por miniprep (*Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* - Cellco) e usados para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes da linhagem de expressão BL21(DE3), novamente utilizando o banho de gelo, choque térmico e recuperação de células em LB, seguidos do plaqueamento em LB ágar com canamicina (50 µg/mL).

3.8 Expressão heteróloga, purificação e análise da solubilidade das proteínas recombinantes

Com a obtenção da linhagem de expressão contendo cada ORF, seguiu-se para as etapas de indução da expressão, purificação e caracterização dos produtos de expressão heteróloga.

Os clones de *E. coli* para expressão foram cultivados em 5 mL de LB com canamicina (50 µg/mL) a 37°C e 250 rpm, *overnight*, e, no dia seguinte, transferidos para cultivo de 250 mL (também com canamicina), mantido nas mesmas condições, até a fase log de crescimento, medida pela densidade óptica do cultivo ($D.O_{595nm} = \sim 0,3-0,6$) em equipamento iMark Microplate Absorbance Reader e com o *software Microplate Manager 6* (BIO-RAD). Uma alíquota de 50 µL de “pré-indução” foi guardada para análise futura. Em seguida, acrescentou-se IPTG para concentração final de 0,1 mM para induzir a expressão da proteína recombinante, e incubou-se a 18°C durante 16 horas.

Após este período de indução, uma alíquota de 50 µL de “pós-indução” foi guardada. A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C, e o precipitado ressuspense em 12,5 mL de tampão de sonicação (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0). Em banho de gelo, as células bacterianas foram lisadas em equipamento *Sonic Dismembrator Model 500* (*Fisher Scientific*) com oito pulsos de ultrassom de trinta segundos, separados por intervalos de trinta segundos, totalizando quatro minutos, e amplitude de 23%. Após sonicação da amostra, seguiu-se para a centrifugação a 5.000 xg, por 30 minutos e 4°C.

Separou-se o sobrenadante (porção solúvel) do *pellet* (porção insolúvel) e o *pellet* foi ressuspense em 12,5 mL de água destilada. Uma alíquota de 50 µL de cada porção foi guardada para análise.

A porção solúvel, supostamente contendo a proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidina, seguiu para a purificação usando uma coluna de afinidade com níquel imobilizado IMAC (GOTO et al., 2016), com fluxo gravitacional manual, de acordo com os passos numerados a seguir:

1. Lavagem da resina da coluna (Ni^{2+} , SIGMA-ALDRICH) com 10 mL de água destilada, que corresponde a 10x o volume da coluna com a resina de níquel

- (VC = 1 mL). Passagem de 5 VC do tampão de sonicação, para preparo do pH da coluna;
2. Passagem da fração solúvel do lisado celular (todo o volume) e retirada de uma alíquota de 50 µL após a passagem pela coluna (“pós-coluna”);
 3. Três lavagens da coluna com 3 VC de tampão de sonicação com coleta de alíquotas de 50 µL em cada lavagem;
 4. Aplicação de 3 VC de cada solução de imidazol - gradiente de concentrações: 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM e 500 mM (preparadas previamente com o mesmo tampão) para eluição e recuperação da proteína recombinante ligada à resina, em tubos Falcon de 15 mL, com coleta de alíquotas de 50 µL, após a passagem de cada solução pela coluna;
 5. Passagem de 2 mL de imidazol 2M, e em seguida, de 10 mL de água destilada para limpar a coluna, e adição de 6 mL de etanol 20% para preservação da resina e manutenção com tampa, na geladeira.

Todas as alíquotas de 50 µL guardadas no processo de purificação das proteínas recombinantes foram acrescidas de 10 µL de tampão Laemmli 6x (300 µL de Tris-HCl 1M, pH 6,8; 450 µL de glicerol; 200 µL de SDS 10%; 50 µL de Beta-mercaptoetanol; traços de azul de bromofenol), fervidas por 15 minutos e centrifugadas rapidamente.

As alíquotas foram analisadas quanto à expressão heteróloga, purificação por cromatografia de afinidade e solubilidade das duas proteínas recombinantes, por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Para isto, utilizou-se o tampão de corrida 1x (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 0,1% SDS) e 15 µL de cada amostra, junto com o marcador de tamanho molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIO-RAD) ou equivalente. A eletroforese foi realizada em sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO-RAD), com corrente fixa de 399 mA. Os géis foram corados *overnight* com *Silver Blue* (sulfato de alumínio 50 g/L, etanol 96%, *Comassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 0,2 g/L, ácido fosfórico 2%), descorados no dia seguinte com solução descorante (etanol 96% e ácido fosfórico 85%) e analisados.

A malato desidrogenase recombinante, obtida da fração solúvel e eluída em 150 mM de imidazol, foi dialisada para remoção do imidazol contra o mesmo tampão de sonicação utilizado na purificação. A quantificação da MDH recombinante foi

realizada em aparelho *NanoVue Plus* (GE Healthcare), a 280 nm, considerando caminho óptico de 0,5 mm normalizado e coeficiente de extinção molar da proteína de 0,931 (obtido com a ferramenta ProtParam - ExPASy).

3.9 Estudos funcionais com as proteínas recombinantes

3.9.1 Caracterização funcional da MDH recombinante

Para a caracterização funcional da MDH recombinante foram realizados imunoenaios em células intactas com detecção de anticorpos remanescentes por *Western blot*, além de ensaio de atividade enzimática.

3.9.1.1 Imunoensaio para detecção de MDH na superfície celular de XAC

Para a produção de anticorpos policlonais em coelhos contra a MDH recombinante de XAC, várias alíquotas da proteína recombinante (~20 µg cada) foram separadas por SDS-PAGE e o gel corado com *Silver Blue*. As 10 bandas correspondentes à proteína, foram excisadas do gel e recolhidas em tampão de corrida, sendo enviadas à Proteimax (São Paulo-SP) para a produção do soro pós-imune. Ensaio preliminar com os soros pré e pós imunização, fornecidos pela empresa, indicou a melhor concentração para se utilizar nas análises de *Western blot*, ou seja, diluição de 5.000 vezes em TBS (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH = 8,0). O *Tween* foi excluído do TBST, pois por sua ação detergente poderia lisar a membrana celular.

Para verificação da presença da proteína MDH na superfície celular de XAC e se esta presença depende da condição de crescimento da bactéria, células de XAC foram crescidas em meio indutor de patogenicidade (XAM-M) e em meio não indutor de patogenicidade (CN). As células intactas obtidas foram utilizadas para imunoensaio por meio de contato com anticorpos policlonais anti-MDH, sendo os anticorpos residuais não ligados detectados em sequência por *Western blot* contra a proteína recombinante imobilizada em membrana. O protocolo desse imunoensaio (Figura 6)

foi baseado em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (FUZISSAKI, 2017) e é descrito a seguir.

Células de XAC mantidas em glicerol foram estriadas em placa de Ágar Nutriente (AN) e incubadas a 28°C por 48 horas. Uma colônia foi repicada para um pré-inóculo de 10 mL em meio CN, e a incubação realizada a 28°C e 250 rpm até atingir uma $DO_{595nm} = 0,7$, em aproximadamente 12 horas. Centrifugou-se 2 mL deste cultivo em dois microtubos a 5.000 xg por 15 minutos e o restante foi armazenado em geladeira (4°C) para sua utilização posterior no crescimento em CN. Cada *pellet* foi ressuspensão em meio XAM-M e passados para dois tubos Falcon contendo um total de 15 mL de meio XAM-M, sendo o cultivo incubado a 28°C e 250 rpm, por 24 horas, até $DO_{595nm} = \sim 0,6$.

Em meio CN as células crescem mais rapidamente em comparação ao meio XAM-M. Portanto, no mesmo dia de ressuspensão dos pellets no meio XAM-M, porém, à noite, centrifugou-se 2 mL do cultivo armazenado na geladeira em dois microtubos a 5.000 xg por 15 minutos e cada *pellet* foi ressuspensão em CN e passados para dois tubos Falcon contendo um total de 15 mL de meio CN, sendo os mesmos incubados a 28°C e 250 rpm, por 12 horas, até $DO_{595nm} = \sim 0,6$. Assim, os dois cultivos (XAM-M e CN) foram obtidos com a mesma densidade óptica, no dia seguinte. Foram juntados os conteúdos dos dois cultivos de XAC em XAM-M, obtendo um volume total de 30 mL num tubo Falcon e o mesmo foi feito com os cultivos de XAC em CN.

Os cultivos de 30 mL de XAC na $DO_{595nm} = \sim 0,6$ foram centrifugados a 8.000 xg por 15 minutos. Os *pellets* foram lavados três vezes com 5 mL de solução de lavagem (10 mM Tris, 0,9% NaCl), cuidadosamente para que não se rompessem as células, com centrifugação a 5000 xg por 5 minutos após cada lavagem.

Para a realização do imunoenensaio, foi preparada uma solução com 50 mL de TBS sem *tween*, contendo 10 µL de anticorpos primários anti-MDH (diluição 1:5.000). Cada *pellet* de células (crescidas em CN ou XAM-M) foi ressuspensão em 15 mL dessa solução e a suspensão resultante mantida a 25°C e em agitação leve (60 rpm) por 20 minutos. Uma solução controle (TBST + anti-MDH) de mesmo volume foi mantida nas mesmas condições, porém sem contato com células. Em seguida, as duas suspensões foram centrifugadas a 8.000 xg por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recuperados sendo a eles adicionados 5 mL de solução de TBST, este preparado com

Tween 20 concentrado para os 20 mL resultantes para compensar a falta do *Tween* na solução anterior.

Várias alíquotas de ~20 µg de MDH recombinante purificada (item 3.8) foram submetidas a SDS-PAGE em sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO-RAD), em dois géis iguais de poliacrilamida 14%, utilizando tampão de corrida por duas horas, com corrente fixa de 0,4 A. Um gel foi corado com Silver Blue para registro das bandas das proteínas, e a partir do outro gel foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose, no mesmo sistema e sob as mesmas condições de corrida, porém, em tampão de transferência (25 mM Tris, 190 mM glicina, 20% metanol, 0,1% SDS e pH = 8,3). Após a transferência a membrana foi corada com solução Ponceau S (0,2 % Ponceau S, 1% ácido acético glacial), por 5 minutos, para a visualização das bandas e marcação das mesmas com uma agulha, sendo a membrana lavada novamente com TBST até descorar. Seguiu-se com o bloqueio da membrana *overnight* com solução de 9% de leite em pó desnatado em TBST.

O *Western blot* foi realizado com a solução de anticorpos primários residuais (anti-MDH), os quais restaram após contato descrito com células de XAC crescidas em cada meio (Figura 6, itens B e C). Com as três soluções obtidas: “TBST_anti-MDH de XAC em CN”; “TBST_anti-MDH de XAC em XAM-M”; e “TBST_anti-MDH controle”, realizou-se o contato destas soluções com a membrana bloqueada. Três lavagens com 20 mL de TBST (cinco minutos cada), foram realizadas após retirada do leite, sendo a membrana cortada em três partes. Cada parte foi incubada por uma hora com uma das soluções acima à temperatura ambiente e agitação leve (60 rpm).

Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBST e incubadas por mais uma hora com uma solução de TBST acrescida do anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de coelhos (*Imuny Biotechnology*), conjugado com HRP (*Horseradish Peroxidase*), diluído a 1:10.000. Mais três lavagens de cinco minutos com TBST foram feitas e acrescentou-se sobre as membranas o substrato da enzima peroxidase, do kit comercial *Clarity Western ECL* (BIO-RAD), por cinco minutos, para que a revelação da membrana de *Western blot* pudesse ser fotodocumentada em *ChemiDoc XRS+* com *software Image Lab* (BIO-RAD).

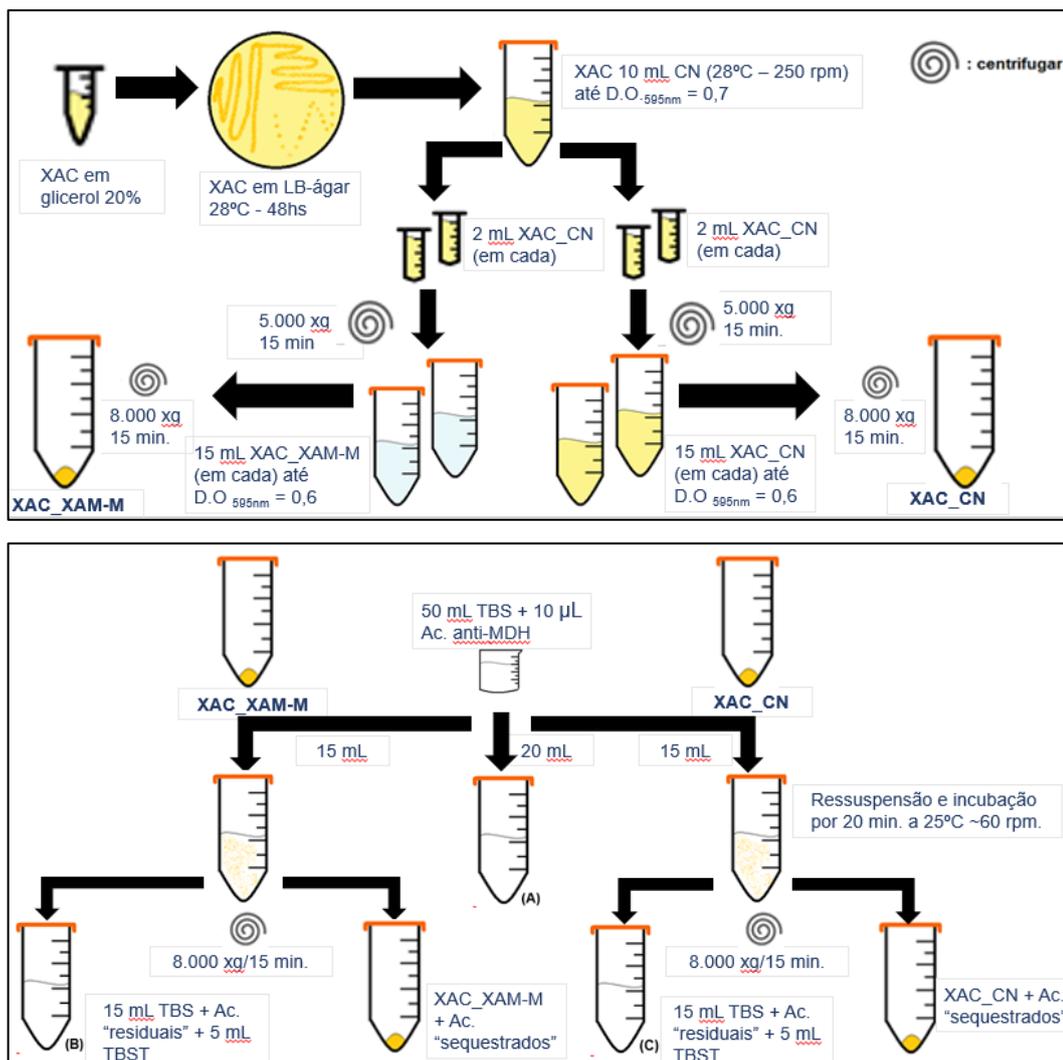


Figura 6. Procedimentos realizados no imunoenensaio para a obtenção das soluções: (A) solução controle de anticorpos anti-MDH sem contato com as células; (B) solução de anticorpos residuais após contato com células de XAC crescidas em meio XAM-M e (C) solução de anticorpos residuais após contato com células de XAC crescidas em meio CN. Fonte: Adaptado de Fuzissaki (2017).

3.9.1.2 Atividade enzimática da MDH

A MDH recombinante dialisada foi submetida a dois ensaios para a confirmação de sua atividade biológica, conforme a reação catalisada pela MDH (Figura 7), com metodologia baseada em Rozova et al. (2015).

Os ensaios se deram pela montagem de duas reações, uma delas com 0,5 µg/µL da MDH dialisada de 1,3 µg/µL, 5 mM de oxaloacetato (OAA, SIGMA-ALDRICH), tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) e 0,25 mM de

NADH (SIGMA-ALDRICH); a outra reação com 5 mM de malato (SIGMA-ALDRICH), 0,17 mM de NAD⁺ (SIGMA-ALDRICH), tampão de sonicação e 0,5 µg/µL da mesma solução de MDH. O primeiro ensaio foi realizado pelo monitoramento da absorbância de NADH a 340 nm e da absorbância de NAD⁺ a 259 nm por espectrofotômetro Multiskan GO (*Thermo Scientific*), de forma manual, por 72 minutos e o segundo ensaio pelo monitoramento da absorbância apenas de NADH (reação de formação de oxaloacetato) nos primeiros 4 minutos da reação, imediatamente após adição da enzima.

Além das reações contendo todos os reagentes, foram montadas reações “branco” como controles, tanto sem a enzima, como sem o substrato, além da enzima MDH isolada.

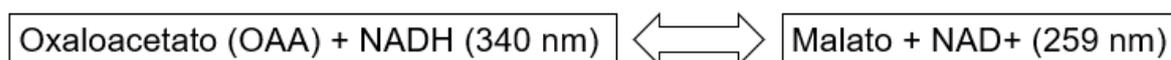


Figura 7. Reação de conversão reversível de oxaloacetato em malato, catalisada pela enzima malato desidrogenase NADP- dependente. Fonte: Elaborada pela autora.

3.9.2 Caracterização funcional da proteína hipotética conservada

Para estudo da relação da proteína hipotética com a patogenicidade de XAC foi utilizada uma linhagem mutante com deleção desta ORF, nomeada Δ XAC0223, a qual foi obtida por Lima (2018) no LBBMA/ UFSCar, segundo metodologia de deleção publicada em Alexandrino et al. (2016) e em Goto et al. (2016)

3.9.2.1 Curva de crescimento *in vitro* de XAC 306 selvagem e XAC mutante Δ XAC0223

Células das linhagens de XAC 306 e Δ XAC0223 (armazenadas a -80 °C com glicerol a 20%) foram plaqueadas para crescimento em meio LB-ágar sem antibiótico, por 48 horas a 30°C. A partir de uma colônia de cada placa, fez-se um pré-inóculo em

10 mL de meio LB sem antibiótico, e estes foram incubados por 24 horas a 30°C e 200 rpm. Fez-se a normalização de células para D.O.= 0,03, centrifugando-se as alíquotas em microtubos de 1,5 mL e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 500 µL de XAM-M e transferidos para três frascos contendo 100 mL de meio XAM-M (triplicatas para cada linhagem). Fez-se o monitoramento do crescimento por medições de D.O._{595nm} a cada 4 horas aproximadamente, com alíquotas de 200 µL, por 97 horas totais (Figura 8).

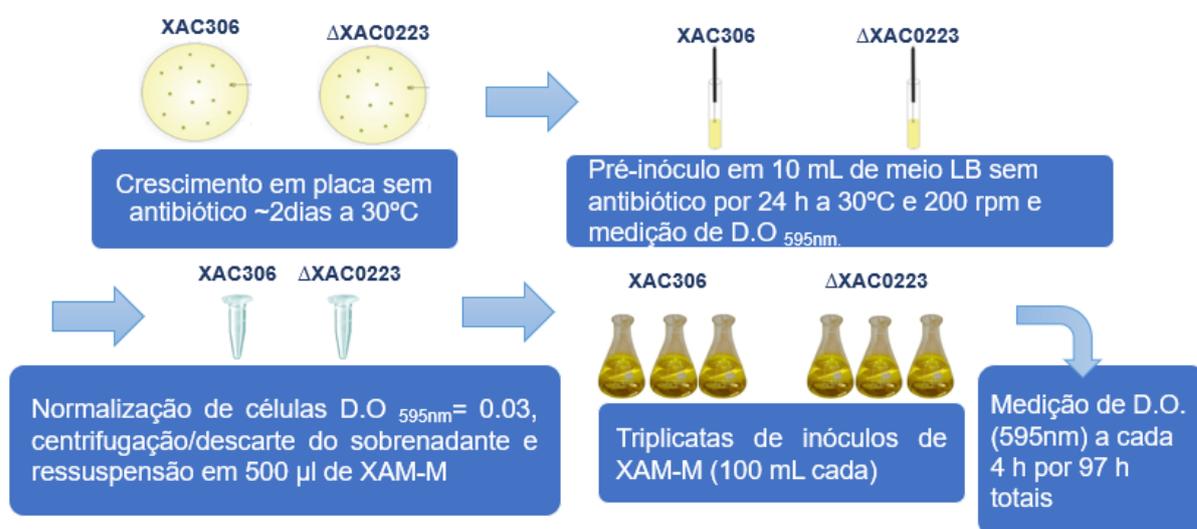


Figura 8. Procedimentos para a realização da curva de crescimento das linhagens de *Xanthomonas citri* 306 (selvagem) e ΔXAC0223 (mutante de deleção para a ORF XAC0223) para observação do efeito da deleção do gene da proteína hipotética no crescimento celular pela comparação do padrão de crescimento das duas linhagens. Fonte: Elaborada pela autora.

3.9.2.2 Efeito da deleção do gene XAC0223 na infecção de XAC in planta

Visando verificar a relação da proteína hipotética com a virulência de XAC, foi realizado um estudo *in vivo* do efeito da deleção do gene da proteína hipotética na patogenicidade de XAC. As linhagens de XAC mutante ΔXAC0223 e de selvagem (XAC 306) foram utilizadas na infecção artificial de mudas de limas ácidas (*Citrus aurantiifolia*), cedidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), de Araraquara/SP.

Para isto, as duas linhagens foram propagadas em meio LB (em duplicatas) e cultivadas até a fase midi-log (D.O.= ~0,3). Alíquotas destes cultivos foram

centrifugadas e ressuspensas em solução salina de NaCl (0,9%) para concentração celular de 10^6 UFC/mL (Figura 9). Oito mudas da lima ácida tiveram duas folhas inoculadas para cada linhagem (selvagem e mutante), utilizando seringas para o encharcamento da folha e diferenciando as folhas de cada tratamento por linhas de barbante de cores distintas. Com dezesseis folhas infectadas para cada linhagem, obteve-se um total de trinta e duas folhas infectadas mais dezesseis folhas (duas por muda) inoculadas com a mesma solução salina (0,9%), como controle sem a bactéria.

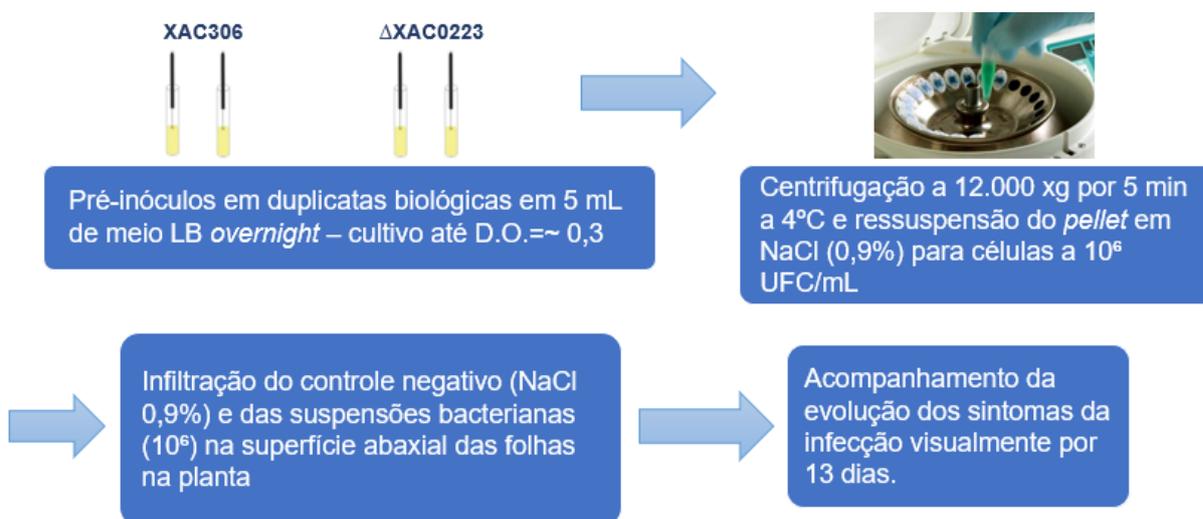


Figura 9. Procedimentos realizados no teste de patogenicidade *in vivo* (*Citrus aurantiifolia*) para comparação dos sintomas causados pelo mutante Δ XAC0223 e por XAC selvagem. Fonte: elaborada pela autora.

As mudas foram mantidas na estufa do Fundecitrus, localizada no campus da UNESP de Araraquara/SP e a comparação da infecção foi feita visualmente, registrando fotograficamente as alterações nos locais das infecções (GOTO et al., 2016), ao longo de 13 dias. O experimento *in vivo* foi realizado com a colaboração do Dr. Franklin Behlau e da Ms. Tamiris Garcia da Silva (Fundecitrus, Araraquara-SP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise *in silico* das regiões codificadoras dos genes XAC0223 e XAC1006

Análise das duas ORFs de XAC deste trabalho por ferramentas de bioinformática (Quadro 5) forneceu várias informações sobre as proteínas alvo, as quais contribuíram para o conhecimento das características gerais associadas com as sequências de cada proteína, uma vez que não foram ainda caracterizadas na literatura.

Quadro 5. Ferramentas de bioinformática utilizadas na análise *in silico* dos genes XAC0223 e XAC1006.

FERRAMENTA BIOINFORMÁTICA	DE	INFORMAÇÃO DETECTADA
BLASTx		Alinhamento de nucleotídeos traduzidos
InterProScan		Correspondência das sequências nucleotídicas com bancos de dados de assinatura de proteínas
PROPSEARCH		Análise de semelhança da sequência de aminoácidos
Psort		Sítios de localização de proteínas na célula
NetPhosBac		Sítios de fosforilação em proteínas de bactérias
ProTPParam		Parâmetros físicos e químicos para sequências de aminoácidos
PHobius e SignalP		Peptídeo sinal

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Análise de XAC0223

O uso da ferramenta BLASTx permitiu a comparação desta proteína hipotética de XAC com ORFs análogas presentes nas linhagens XauB e XauC (*X. fuscans* causadoras de cancrese, de menor virulência que XAC), sendo detectada 99% de identidade entre elas. Foi detectada também homologia com uma proteína hipotética de XauB (XauB_35460) e de proteínas da família Ax21 (de outras espécies), de acordo com a ferramenta InterProScan (EBI).

Segundo esta mesma ferramenta, a proteína hipotética XAC0223 de XAC apresentou características de componente integral de membrana e transmembrana, devido à sua similaridade de assinatura com a superfamília das porinas, tendo possível relação de homologia com proteínas de função conhecida, como a caracterizada em Park et al. (2014). E a assinatura de transmembrana encontrada foi representada por um domínio beta(8,10)-barril, o qual é característico de proteínas de membrana externa como as OmpA, OmpX e NspA, bem como de uma enzima de membrana externa conhecida como PagP, sendo esta última responsável por ajudar na evasão de bactérias patogênicas às respostas imunes de seus hospedeiros (InterProScan EBI).

A ferramenta PROPSEARCH (ExpPASy) confirmou a sequência de aminoácidos da proteína hipotética XAC0223 como sendo característica de uma porina de membrana externa como OmpD, com mais de 87% de chances de ambas pertencerem à mesma família, o que implica na maioria dos casos em uma função similar entre elas, embora seja necessária a checagem futura de resíduos funcionais que forem conhecidos na proteína OmpD para verificação de similaridade de conservação destes na proteína hipotética.

Em bactérias Gram-negativas, um subgrupo de proteínas de membrana interna da Superfamília Facilitadora Principal (MFS), incluindo a OmpD, atuam tanto na homeostase do periplasma, como têm papel de bombas de efluxo para diminuir as concentrações intracelulares de múltiplos substratos tóxicos, conferindo resistência a múltiplos fármacos (SANTIVIAGO et al., 2002). Na bactéria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a OmpD é descrita como facilitadora da absorção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CALDERÓN et al., 2011) e como um canal de membrana externa que trabalha com a bomba de membrana interna YddG para expelir o composto orgânico *metil viologen* (SANTIVIAGO et al., 2002). A mesma associação também foi obtida através do Psort (ExpPASy), programa que prediz sítios de localização de proteínas na célula, como proteína de membrana ou periplásmica.

A ferramenta NetPhosBac (CBS Prediction Servers) previu dois sítios potenciais de fosforilação em serinas da proteína hipotética (XAC0223) e o programa ProTPParam (ExpPASy) indicou massa molecular estimada de 21.906 Da, ponto isoelétrico teórico de 4,60, grau de instabilidade de 11,12 (classificando-a como

estável quanto a seu enovelamento), grau alifático de 68.54 e GRAVY de -0,447 (mais hidrofílica).

O desenho dos *primers* para a clonagem da região codificadora da proteína hipotética XAC0223 exigiu análise prévia da sequência de aminoácidos nas ferramentas PHobius (ExPASy) e SignalP (CBS Prediction Servers), sendo detectado peptídeo sinal nos 20 primeiros aminoácidos (Figura 10). Como mencionado posteriormente, essa região não foi incluída na clonagem do gene XAC0223.

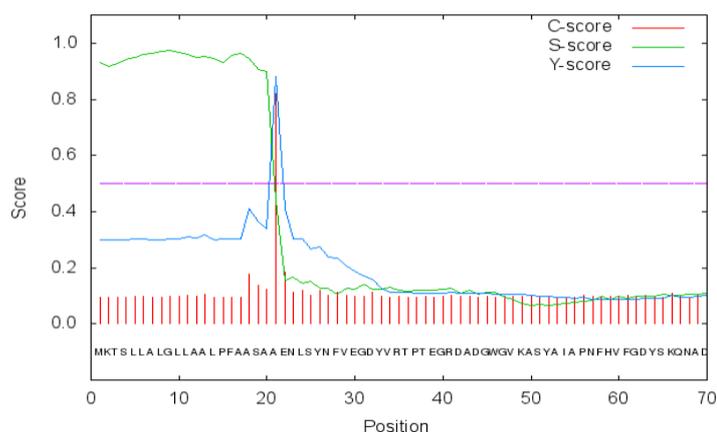


Figura 10. Peptídeo sinal nos 20 primeiros aminoácidos (pico) da proteína hipotética (XAC0223).
Fonte: PHobius e SignalP.

4.1.2 Análise de XAC1006

Os resultados da análise pela ferramenta InterproScan confirmaram a enzima MDH como membro das famílias: L-lactato/malato desidrogenase e Malato desidrogenase, tipo 2, com domínio de ligação-NAD(P). O Psort (ExPASy), teve como localizações preditas o citoplasma e outras organelas típicas de células eucariotas.

Pelo ProTPParam (ExPASy), a MDH possui peso molecular estimado de 34.851 Da, ponto isoelétrico teórico de 5,37, grau de instabilidade de 25,84 (classificando-a como estável quanto a seu enovelamento), grau alifático de 95,27 e GRAVY de 0,026 (pouco hidrofóbica). O NetPhosBac (CBS Prediction Servers) previu quatro sítios potenciais de fosforilação em serinas e um sítio de treonina.

O desenho dos *primers* para a clonagem da região codificadora da MDH também exigiu análise prévia da sequência de aminoácidos *in silico* para verificação

da presença de peptídeo-sinal, o mesmo não sendo detectado na sequência (Figura 11).

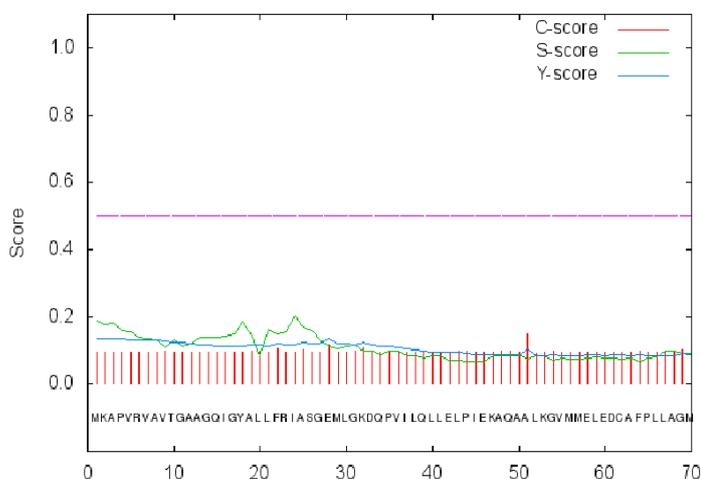


Figura 11. Nenhum peptídeo sinal detectado para a malato desidrogenase (XAC1006) de XAC em análise. Fonte: PHobius e SignalP.

O uso das ferramentas de bioinformática trouxe informações relevantes sobre as proteínas de interesse tais como a identidade com outras proteínas de função conhecida, a localização celular possível, tamanho e peso moleculares, além da presença/ausência de peptídeo sinal, as quais contribuíram no direcionamento do desenho experimental e das análises funcionais realizadas posteriormente.

4.2 Clonagem das regiões codificadoras dos genes XAC0223 e XAC1006 em vetores de propagação e expressão

Os fragmentos amplificados de ambas as regiões codificadoras dos genes XAC0223 e XAC1006 a partir do DNA genômico de XAC306 foram analisados (Figura 12) e apresentaram os tamanhos moleculares próximos aos esperados, de 597 pb e de 988 pb, respectivamente.

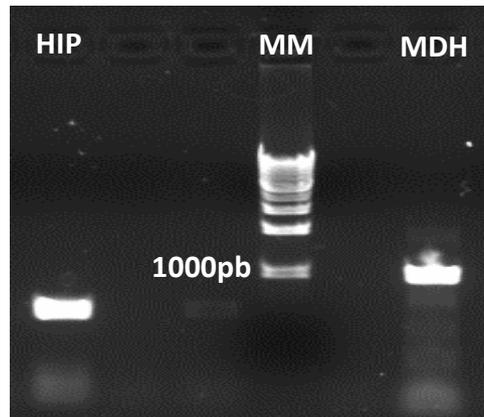


Figura 12. Produtos da amplificação por PCR a partir de DNA genômico de XAC306 das regiões codificantes da proteína hipotética (HIP) e da proteína malato desidrogenase (MDH) após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As bandas do centro (MM) representam o marcador de tamanho molecular *GeneRuler* 1 kb *Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher); à esquerda do marcador está a banda do amplicon do gene XAC0223 (HIP), codificador da proteína hipotética (597pb); à direita está a banda do amplicon do gene XAC1006 (MDH), codificador da proteína MDH (988pb). Fonte: fotodocumentação em *ChemIDoc XRS+* com *software Image Lab* (BIO-RAD).

Os amplicons de cada gene foram inseridos no plasmídeo pJET e, após a transformação da *E. coli* DH5 α e seleção dos clones em ampicilina, realizou-se a *miniprep* e digestão dos plasmídeos “pJET_HIP” e “pJET_MDH” com as enzimas de restrição *Hind*III e *Nde*I. A confirmação da presença dos insertos foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Figuras 13). Esses plasmídeos tiveram seus insertos sequenciados, confirmando 100% da sequência esperada para os produtos amplificados correspondentes aos genes alvos XAC0223 e XAC1006 (resultados não mostrados), demonstrando que os fragmentos gênicos foram clonados com sucesso.

Os insertos obtidos nas digestões foram recuperados do gel e ligados ao vetor de expressão pET28a, os quais foram linearizados com as mesmas enzimas de restrição (*Hind*III e *Nde*I), para a realização da subclonagem em *E. coli* DH5 α , sendo os transformantes selecionados em canamicina. A confirmação da subclonagem dos insertos no plasmídeo de expressão, gerando os plasmídeos pET28a_Hip e pET28a_MDH, é mostrada na Figura 14.

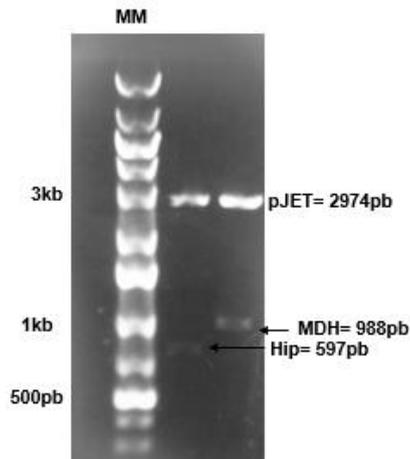


Figura 13. Confirmação da clonagem no vetor de propagação pJET das duas regiões de DNA codificadoras das ORFs XAC0223 (Hip) e XAC1006 (MDH), após digestão dos plasmídeos pJET_Hip e pJET_MDH com *Hind*III e *Nde*I e eletroforese em gel de agarose. As bandas da esquerda (MM) representam o marcador de tamanho molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Cellco); as bandas ao centro representam a digestão pJET_Hip (seta no fragmento da proteína hipotética = 597pb); e as bandas à direita representam a digestão do pJET_MDH (seta no fragmento da MDH = 988pb). Fonte: fotodocumentação em *ChemiDoc XRS+* com *software Image Lab* (BIO-RAD).

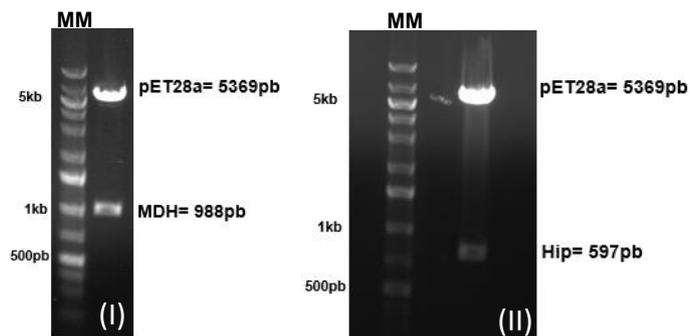


Figura 14. Confirmação da clonagem no vetor de expressão pET28a das duas regiões de DNA codificadoras das ORFs XAC0223 (Hip) e XAC1006 (MDH), após digestão dos plasmídeos pET28a_Hip e pET28a_MDH com *Hind*III e *Nde*I e eletroforese em gel de agarose. Em (I) as bandas da esquerda (MM) representam o marcador de tamanho molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Cellco) e à direita as bandas da digestão do pET28a_MDH, com a banda da MDH na região dos 988 pb; em (II) as bandas da esquerda (MM) representam o mesmo marcador de tamanho molecular e à direita as bandas da digestão pET28a_Hip, com a banda da proteína hipotética entre 500 e 1000 pb. Fonte: fotodocumentação em *ChemiDoc XRS+* com *software Image Lab* (BIO-RAD).

Com a subclonagem bem sucedida em *E. coli* DH5 α , *minipreps* dos cultivos foram feitos para a purificação dos plasmídeos de expressão pET28a_HIP e pET28a_MDH e transformação da *E.coli* BL21 (DE3) para a obtenção da linhagem de expressão das proteínas recombinantes hipotética e MDH.

4.3 Expressão, solubilidade e purificação das proteínas recombinantes

Células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo pET28a_HIP ou pET28a_MDH foram induzidas à expressão das proteínas recombinantes com IPTG (0,1mM), sendo as proteínas purificadas por cromatografia de afinidade com Ni²⁺ imobilizado e analisadas quanto à expressão, solubilidade e purificação.

4.3.1 Expressão, solubilidade e purificação da MDH

A análise das amostras antes e após indução da expressão da MDH recombinante indicou a presença de uma banda diferencial, correspondente ao tamanho esperado para a proteína MDH recombinante na amostra “pós-indução” (Figura 15), o que demonstrou que o sistema de expressão funcionou adequadamente. A MDH foi também encontrada na fração solúvel e a análise de sua eluição com diferentes concentrações de imidazol indicou que a proteína MDH foi eluída com maior pureza e concentração em solução de imidazol a 150 mM (Figura 16). Após diálise, a MDH recombinante foi quantificada com base no coeficiente de extinção molar da MDH (0,931), sendo igual a 1,3 mg/mL (ou 1300 µg/µL), o que viabilizou a obtenção de quantidade solúvel suficiente para a realização dos ensaios de atividade enzimática e para a produção do soro anti-MDH em coelhos (Figura 17).

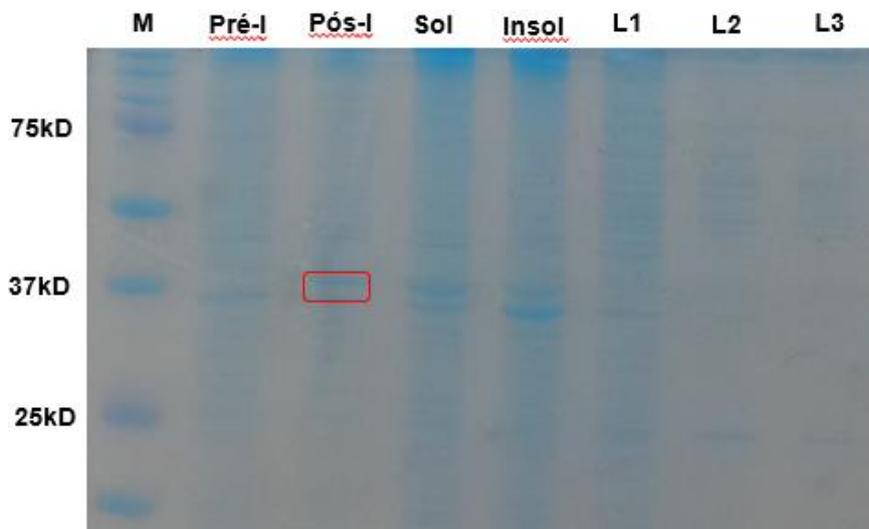


Figura 15. Análise de expressão e solubilidade da MDH recombinante por SDS-PAGE. A banda da proteína MDH (peso molecular = 34.851kD) foi evidenciada pelo retângulo na fração de pós-indução (Pós-I) por IPTG e também foi detectada na fração solúvel (Sol) de proteínas. **M**= marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD); **Pré-I**= pré-indução; **Pós-I**= pós-indução com IPTG; **Sol**= fração solúvel; **Insol**= fração insolúvel; **L1, L2 e L3** = lavagens da coluna com tampão de sonicação. Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 16. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína MDH recombinante por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel. A MDH recombinante foi melhor purificada e eluída com imidazol 150 mM (retângulo). **M**= marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD); **Sol-A**= fração solúvel antes da coluna; **Sol-P** = fração solúvel pós-coluna; **25mM, 50mM, 75mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM** = concentrações de gradiente de imidazol utilizadas na eluição da MDH recombinante. Fonte: Elaborada pela autora.

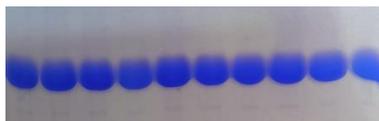


Figura 17. Bandas da MDH recombinante enviadas para a síntese do anticorpo anti-MDH policlonal em coelhos. Dez alíquotas da proteína recombinante, com ~20 µg cada, foram separadas por SDS-PAGE e o gel corado com *silver blue*. As bandas foram excisadas do gel e colocadas em um Falcon, com gotas de tampão de corrida e enviadas à Proteimax (São Paulo-SP). Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Expressão, solubilidade e purificação da proteína hipotética recombinante

A análise das amostras antes e após indução da expressão da proteína hipotética recombinante indicou a presença de uma banda diferencial, correspondente ao tamanho esperado (~22.000 Da) para a proteína hipotética recombinante na amostra “pós-indução” (Figura 18), o que demonstrou que este sistema de expressão também funcionou adequadamente. Entretanto, a proteína hipotética foi encontrada em grande quantidade na fração insolúvel e praticamente ausente na fração solúvel, o que seria esperado dada a semelhança desta proteína com proteínas de membrana ou de vesícula de membrana externa, segundo as análises *in silico*. A análise da sua sequência de aminoácidos *in silico* apresentou índice GRAVY com valor negativo (-0,447), o que determinaria ser mais hidrofílica do que hidrofóbica, de forma contraditória ao esperado para proteínas de membrana externa, fato a ser posteriormente investigado em maior detalhe.

A análise de sua purificação e eluição com diferentes concentrações de imidazol (Figura 19) indicou que a proteína hipotética recombinante não foi eluída em nenhuma das soluções de imidazol em concentração suficiente para o envio de bandas e produção de anticorpos. Devido à falta de tempo hábil não foi possível otimizar sua purificação com protocolos apropriados para proteínas de difícil solubilidade. Portanto, a análise funcional desta ORF prosseguiu apenas com os testes de patogenicidade do mutante de deleção deste gene, já disponível em nosso grupo de pesquisa.

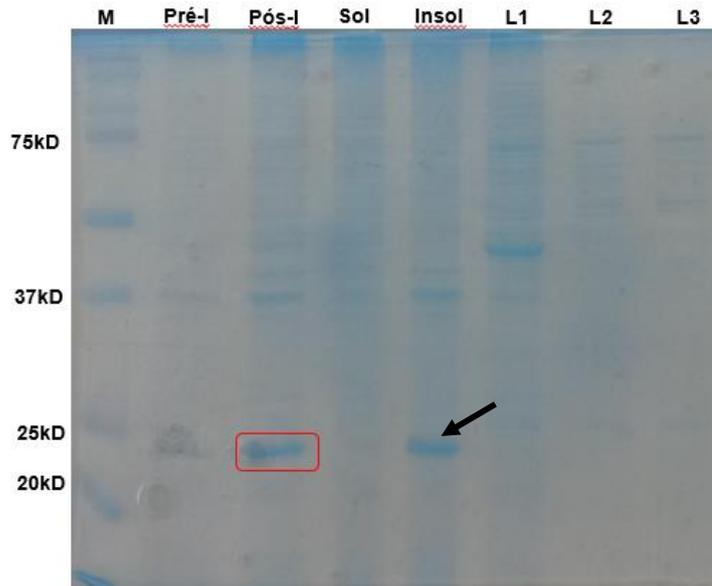


Figura 18. Análise de expressão e solubilidade da proteína hipotética recombinante por SDS-PAGE. A banda da proteína hipotética (peso molecular = 21.906kD) foi evidenciada pelo retângulo na fração de pós-indução (Pós-I) por IPTG, porém, foi inexpressiva na fração solúvel (Sol) de proteínas e detectada de forma intensa na fração insolúvel (seta). **M**= marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD); **Pré-I**= pré-indução; **Pós-I**= pós-indução com IPTG; **Sol**= fração solúvel; **Insol**= fração insolúvel; **L1, L2 e L3** = lavagens da coluna com tampão de sonicação. Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 19. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína hipotética recombinante por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel. O retângulo grande evidenciou a baixa eluição da proteína hipotética recombinante em todas as soluções de imidazol utilizadas. **M**= marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD); **Sol-A**= fração solúvel antes da coluna; **Sol-P**= fração solúvel pós-coluna; **10mM, 25mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM** = concentrações de imidazol utilizados no gradiente de eluição. Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Análise funcional parcial das proteínas recombinantes

4.4.1. Malato desidrogenase

A caracterização funcional parcial da MDH recombinante se deu através dos ensaios de atividade da enzima recombinante e pela realização do imunoensaio com proteínas de superfície em células de XAC crescidas em meios CN e XAM-M, seguido de *Western blot* com os anticorpos residuais desse contato com as células intactas.

4.4.1.1. Atividade da malato desidrogenase recombinante

Apenas a malato desidrogenase recombinante foi caracterizada com relação à sua atividade biológica como uma enzima, diferentemente da proteína hipotética conservada, que pelas análises *in silico* demonstrou ser uma possível porina.

No ensaio de monitoramento manual da absorvância de NADH e de NAD⁺ a 340nm e 259 nm respectivamente, por 72 minutos, foi observada a diminuição sutil nos valores de absorvância de NADH, a 340 nm, e aumento também sutil nos valores de absorvância de NAD⁺, o que possivelmente demonstra a atividade da MDH na transformação de oxaloacetato em malato, com consumo de NADH e produção de NAD⁺ (Figura 20).

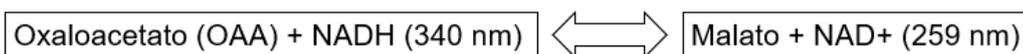
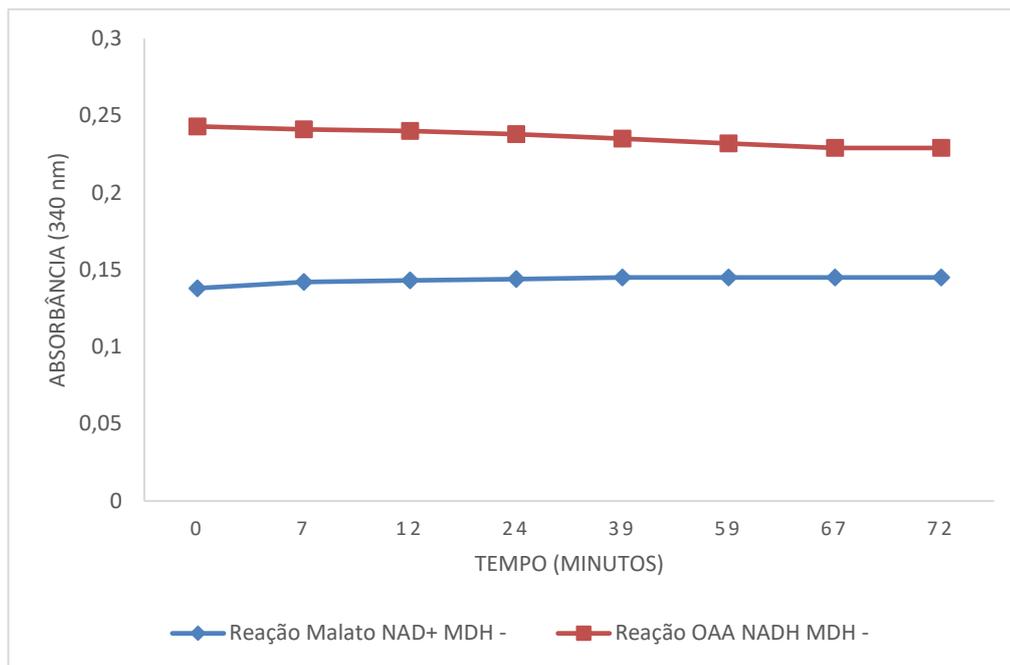


Figura 20. Primeiro ensaio de atividade da MDH recombinante. Na reação inicial de malato, NAD⁺ e MDH recombinante (linha azul com losangos) foi possível observar um aumento nos valores de absorbância a 340 nm ao longo do tempo, referente ao NADH gerado concomitantemente à formação de oxaloacetato. Na reação inicial de oxaloacetato, NADH e MDH recombinante (linha laranja com quadrados) foi possível observar a diminuição nos valores de absorbância a 340 nm ao longo do tempo, referente ao consumo de NADH requisitado na formação de malato. As alterações observadas demonstraram que a MDH recombinante estava ativa e catalisou ambas as reações. Fonte: elaborada pela autora.

No ensaio posterior, de monitoramento da absorbância de NADH (a 340nm) nos primeiros 4 minutos da reação preparada (OAA + NADH + MDH + tampão), foi possível observar uma diminuição mais acentuada que no ensaio precedente nos valores de absorbância (Figura 21), o que permitiu concluir que possivelmente a reação foi catalisada mais intensamente em seus minutos iniciais e pode atingir posteriormente um equilíbrio dinâmico de transformação de um substrato em outro.

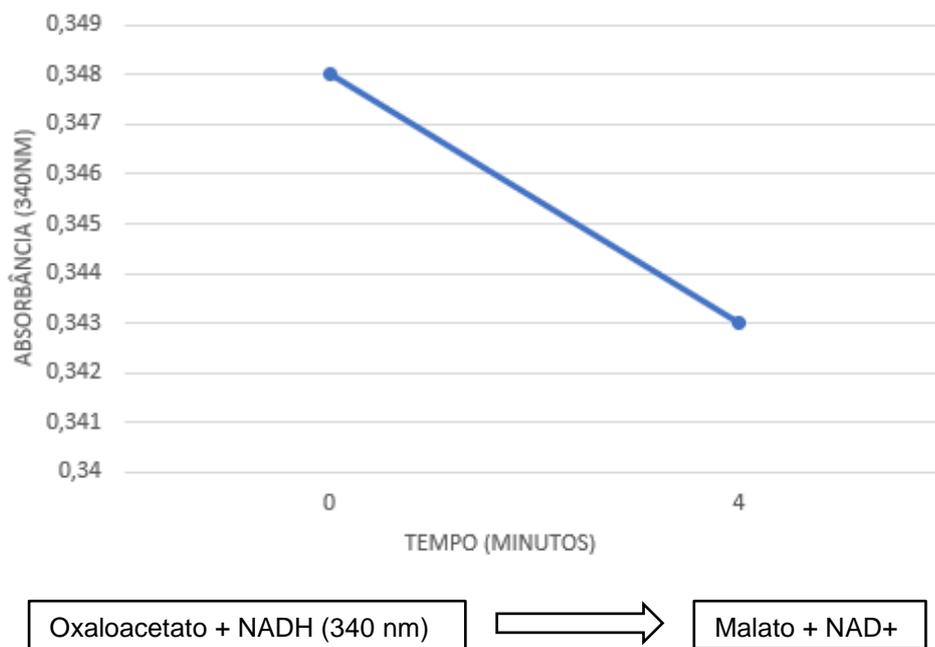


Figura 21. Segundo ensaio de atividade da MDH recombinante. Ao longo dos primeiros quatro minutos após o preparo da reação de oxaloacetato, NADH e MDH recombinante, observou-se um declínio nos valores de absorbância a 340nm, referente ao consumo de NADH, mostrando a catálise desta pela MDH recombinante de forma acentuada nos minutos iniciais de reação. Fonte: elaborado pela autora.

Para obtenção de melhores resultados de leitura e escala gráfica, posteriormente serão feitos novos testes de confirmação da atividade da MDH recombinante utilizando programas de medição automática e maior concentração da enzima MDH.

4.4.1.2 Imunoensaio de células intactas de XAC cultivadas em meios CN e XAM-M e Western blot com os anticorpos residuais

Com os anticorpos IgG anti-MDH, e a malato desidrogenase recombinante em mãos, foi realizado o imunoensaio de detecção de MDH na superfície celular utilizando anticorpos anti-MDH em contato com células intactas de XAC crescidas em meios CN e XAM-M, seguido de *Western blot* para detecção de diferenças nas quantidades dos anticorpos residuais pós-contato. Uma diminuição nos anticorpos residuais indicaria a maior captação destes pelas células de XAC com proteína MDH expressa em sua superfície, de forma diferencial em cada meio, o que validaria a análise proteômica

prévia (CARNIELLI et al., 2017) na qual se detectou a presença da MDH na superfície de células de XAC sob condições de infecciosidade.

O resultado do *Western blot* (Figura 22) demonstrou menor intensidade das bandas de XAC crescida em XAM-M, o que nos levou a deduzir que, sob esta condição de crescimento, uma maior quantidade de MDH foi captada na superfície de XAC infecciosa, restando menos anticorpos residuais na solução analisada no *Western blot*. As bandas de anticorpos residuais de XAC crescida em CN demonstraram maior intensidade e, similar ao controle, o que nos levou a concluir que a MDH esteja ausente na superfície de XAC, em condição não infecciosa.



Figura 22. *Western blot* com anticorpos residuais anti-MDH após contato de células intactas de XAC crescidas em meios CN e XAM-M. Nas duas bandas centrais, observou-se menor intensidade dos anticorpos residuais após contato com células de XAC crescidas em XAM-M do que nas bandas à esquerda, de anticorpos residuais após contato com células de XAC crescidas em CN, e à direita, bandas do controle com solução de TBS+anti-MDH sem contato com células de XAC. Os anticorpos residuais de células crescidas em CN aparentemente demonstraram a mesma intensidade do controle. As amostras, como mostrado, foram analisadas em duplicatas.

4.4.2. Proteína hipotética

A análise funcional parcial da proteína hipotética se deu com a utilização do mutante de deleção da ORF deste gene em XAC (LIMA, 2018) e sua caracterização frente à linhagem selvagem (XAC 306), com execução de uma curva de crescimento das duas linhagens e de testes de patogenicidade *in vivo* para comparação dos sintomas gerados nas folhas de *Citrus aurantifolia*.

4.4.2.1. Curva de crescimento de XAC selvagem e XAC mutante Δ XAC0223

Para analisar o padrão de crescimento dos cultivos de XAC selvagem (linhagem 306) e do mutante Δ XAC0223, realizou-se uma curva de crescimento

comparativa destas duas linhagens em meio indutor de patogenicidade, conforme descrição no item 3.9.2.1, a qual visou, principalmente, a verificação dos efeitos da deleção no crescimento das células de XAC em condição de indução da patogenicidade *in vitro*. Foram obtidos os valores de densidade óptica dos cultivos crescidos em triplicatas no meio XAM-M, os quais foram utilizados na elaboração da curva de crescimento (Figura 23). Na curva, foi possível notar um crescimento próximo das duas linhagens, sem diferenças significativas nas primeiras horas de cultivo, notando-se um pequeno atraso no crescimento do mutante apenas na fase log (entre 12 e 28 horas de cultivo).

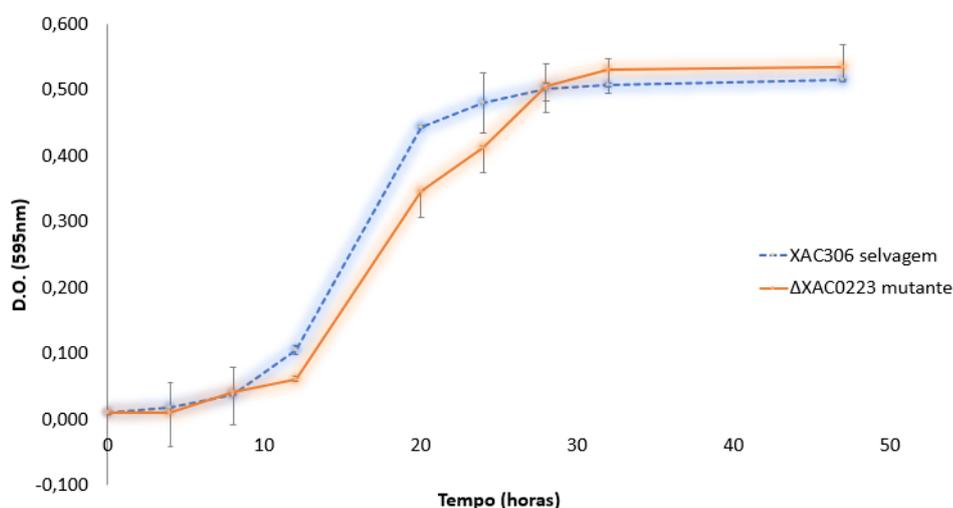


Figura 23. Curvas de crescimento de XAC 306 (selvagem) e Δ XAC0223 (mutante) crescidas em meio XAM-M. Observou-se o crescimento dos cultivos de XAC selvagem (linha pontilhada azul) e de Δ XAC0223 (linha lisa laranja), por medições de D.O._{595nm}, cujos valores geraram suas curvas de crescimento. Fonte: elaborada pela autora.

4.4.2.2. Teste de patogenicidade *in vivo* (*Citrus aurantiifolia*) do mutante Δ XAC0223 vs XAC selvagem

Os estudos de infecção em folhas de citros com o mutante Δ XAC0223 e a linhagem selvagem (XAC 306) visaram a verificação do efeito da deleção do gene da proteína hipotética na patogenicidade de XAC *in vivo*. Pela análise das folhas cortadas após 13 dias da infecção, pôde-se observar diferenças nos sintomas desenvolvidos por cada linhagem (Figura 24). Nas folhas inoculadas com o mutante, os sintomas

aparentaram ser mais intensos, na maioria das folhas infectadas, em relação aos sintomas das folhas inoculadas com a linhagem selvagem. Este resultado talvez possa ser parcialmente explicado com base no possível papel descrito para proteína Ax21 de outras espécies de *Xanthomonas*, de ser secretada pela bactéria selvagem e detectada por receptores da planta hospedeira, desencadeando uma pequena resposta de resistência da planta à infecção (Ferreira et al., 2016). Com a deleção do gene da proteína hipotética, é possível que receptores da planta não detectaram a infecção de forma efetiva como em XAC selvagem.

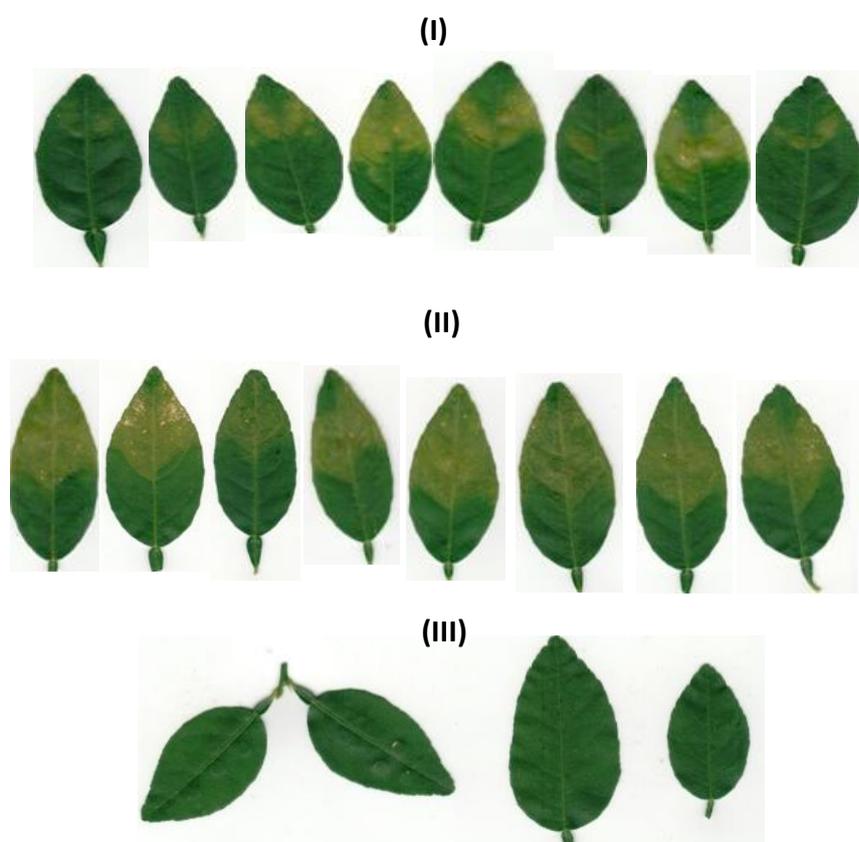


Figura 24. Folhas do teste de patogenicidade em *Citrus aurantiifolia* pela inoculação das linhagens selvagem e mutante. Em (I) as folhas inoculadas com XAC 306 (selvagem) demonstraram sintomas amarelados, com algumas folhas demonstrando sintomas brandos após o 13° dia da inoculação, quando todas as folhas foram retiradas da planta. Os sintomas vistos nas folhas inoculadas pelo mutante Δ XAC0223 (II), pareceram se desenvolver mais intensamente na maioria das folhas e nas folhas utilizadas como controles, inoculadas com NaCl (0,9%) (III) não foi observado nenhum sintoma, como previsto. Fonte: elaborada pela autora.

5. CONCLUSÕES

Análise funcional parcial realizada com a malato desidrogenase recombinante produzida no presente trabalho, demonstra que a mesma foi expressa na forma nativa, pois apresentou atividade catalítica na transformação de seus substratos. Os anticorpos policlonais anti-MDH produzidos foram eficazes na identificação da MDH e o *Western blot* confirmou a expressão diferencial da MDH, sob condição de infecciosidade, na superfície celular, corroborando com o proposto em Carnielli et al. (2017) de que a proteína MDH pode ser uma proteína *moonlighting* na superfície de células infecciosas de *Xanthomonas citri*. Outras abordagens devem ainda ser realizadas para confirmação desse fato.

A análise funcional do produto de expressão heteróloga do gene de XAC1006 permitiu a confirmação da anotação deste no genoma de XAC e aponta para a validação da análise proteômica realizada por Carnielli et al., (2017). Um possível envolvimento da proteína hipotética na relação de XAC com seu hospedeiro também ficou mais evidente, contribuindo, assim, para uma nova etapa do entendimento sobre os mecanismos de sua patogenicidade e gerando informações que poderão facilitar estudos funcionais futuros.

Quanto à análise parcial da ORF XAC0223, concluiu-se que a proteína hipotética conservada tem possível relação com a virulência de XAC, corroborando com a hipótese de que essa proteína hipotética conservada pode estar relacionada com sinalização para defesa da planta contra o processo de infecção de XAC.

6. PERSPECTIVAS

Muitas análises posteriores da localização celular da proteína MDH de XAC se tornam viáveis com a proteína heteróloga e o anticorpo anti-MDH disponíveis, como análises de microscopia e citometria de fluxo em estudos com células intactas de XAC sob condição infecciosa (*in vivo* ou *in vitro*) para confirmação da MDH na superfície de XAC. Com a MDH recombinante, ativa e solúvel, será possível testar sua cristalização para estudo de sua estrutura tridimensional e auxiliar a pesquisa de inibidores *in silico* da MDH, o que pode ser útil na inativação da sua função na

superfície celular, contribuindo em testes de patogenicidade futuros. Mutações neste gene não serão realizadas pela possibilidade da proteína ter dupla função no citosol e superfície celular de XAC, como discutido anteriormente.

Para o mutante Δ XAC0223, podem ainda ser feitas otimizações nos protocolos de purificação da proteína recombinante, para sua obtenção em forma solúvel. Também serão realizados testes com o mutante para detecção da alteração na motilidade celular e na formação de biofilme, resultantes do efeito de deleção do gene da proteína hipotética, o que dará indícios da relação desta proteína com as necessidades de adaptação da bactéria no processo infeccioso.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, A. V.; GOTO, L. S.; NOVO-MANSUR, M. T. M. TreA codifies for a trehalase with involvement in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathogenicity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2016.

ARTIER, J. et al. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp *citri* periplasmic proteins reveals changes in cellular envelope metabolism during in vitro pathogenicity induction. **Molecular plant pathology**, p. 1–15, 2016.

BAHAR, O. et al. The *Xanthomonas* Ax21 protein is processed by the general secretory system and is secreted in association with outer membrane vesicles. **PeerJ**, v. 2, p. e242, 2014.

BEHLAU, FRANKLIN; BELASQUE JR., J. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Fundecitrus. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/cancro-citrico-a-doenca-e-seu-controle/49. Acesso em: 31 mar. 19.

Bioinformatics services | European Bioinformatics Institute. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/services>. Acesso em: 25 jan. 2019.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri* citri: breaking the surf **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 141–157, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**, John Wiley & Sons, 1280 p., 2015.

CALDERÓN, I. L. et al. Response regulator ArcA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium downregulates expression of OmpD, a porin facilitating uptake of hydrogen peroxide. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 214–222, 1 fev. 2011.

CARNIELLI, C. M. et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* surface proteome by 2D-DIGE: Ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 251–263, 2017.

CBS Prediction Servers. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/>. Acesso em: 25 jan. 2019.

CHEN, C. et al. MoonProt 2.0: An expansion and update of the moonlighting proteins database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D640–D644, 2018.

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

DAS, A. K. Citrus canker - a review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.

ELIXIR Core Data Resources | ELIXIR. Disponível em: <https://www.elixir-europe.org/platforms/data/core-data-resources>. Acesso em: 25 jan. 2019.

ExpASY: SIB Bioinformatics Resource Portal - Home. Disponível em: <<https://www.expasy.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

FACINCANI, A. P. et al. Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Functional and Integrative Genomics**, v. 14, n. 1, p. 205–217, 2013.

FERENCE, C. M. et al. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, 2018.

FERREIRA, R. M. et al. Unravelling potential virulence factor candidates in *Xanthomonas citri* . subsp. *citri* by secretome analysis. **PeerJ**, v. 4, p. e1734, 2016.

FLODEN, A. M.; WATT, J. A.; BRISSETTE, C. A. Borrelia burgdorferi enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

FUZISSAKI, Y. N. **Expressão heteróloga e imunodeteção da DnaK na superfície celular de Xanthomonas citri.** Apresentação de Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a formação em Bacharelado em Biotecnologia na Universidade Federal de São Carlos, 2017.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Unraveling the in vitro secretome of the phytopathogen *Botrytis cinerea* to understand the interaction with its hosts. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. October, p. 1–7, 2015.

GOTO, L. S. et al. Structural and functional characterization of the phosphoglucomutase from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, p. 1658–1666, 2016.

GOTTIG, N. et al. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv . *citri* in citrus canker disease. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, 2010.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial virulence in the moonlight: Multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3476–3491, 2011.

JEFFERY, C. J. Why study moonlighting proteins? **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. JUN, 2015.

JEFFERY, C. J. What Is It and Why Is It Important? **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 8, n. November, p. 308–313, 2017.

LEIMKÜHLER, S. Shared function and moonlighting proteins in molybdenum cofactor biosynthesis. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 9, p. 1009–1026, 2017.

LIMA, I. C. M. DE. **Obtenção de mutante de deleção para a ORF XAC0223 potencialmente envolvida com a fitopatogenicidade em *Xanthomonas citri* subsp . *citri***. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos, 2018.

MANI, M. et al. MoonProt: A database for proteins that are known to moonlight. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D277–D282, 2015.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

PARK, H. J.; LEE, S. W.; HAN, S. W. Proteomic and functional analyses of a novel porin-like protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 1030–1035, 2014.

PHILIPSEN, H. K. **Influência de ferro na composição de proteínas de superfície não covalentemente ligadas de *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 2011.

ROZOVA, O. et al. Role of NAD⁺-Dependent Malate Dehydrogenase in the Metabolism of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z and *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Microorganisms**, v. 3, n. 1, p. 47–59, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3^a ed., 2001. Disponível em: <<http://library.wur.nl/WebQuery/clc/2011050>>

SANTIVIAGO, C. A. et al. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 687–698, 2002.

SENA-VÉLEZ, M. et al. Presence of extracellular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains with different host range. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2016.

SHUGUO, H. et al. One-step expression and tyrosine O-sulfonation of Ax21 in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 1368–1379, 2012.

SOARES-COSTA, A. et al. Recombinant expression and characterization of a cysteine peptidase from *Xanthomonas citri* subsp *citri*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 4, p. 4043–4057, 2012.

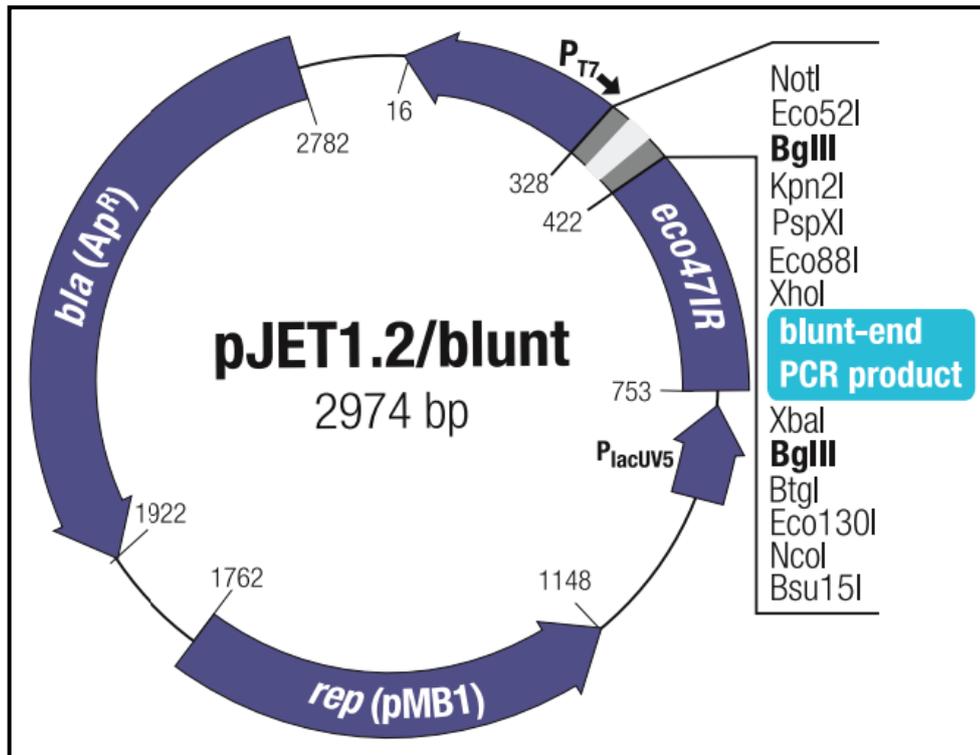
WAITE, D. W. et al. Rapid and accurate identification of *Xanthomonas citri* subspecies *citri* by fluorescence in situ hybridization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 315–321, 2016.

WANG, X. M. et al. Biochemical Analysis of the NAD⁺-Dependent Malate Dehydrogenase, a Substrate of Several Serine/Threonine Protein Kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0123327, 2015.

XIA, T. et al. Identification of an extracellular endoglucanase that is required for full virulence in *xanthomonas citri* subsp. *citri*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–7, 2016.

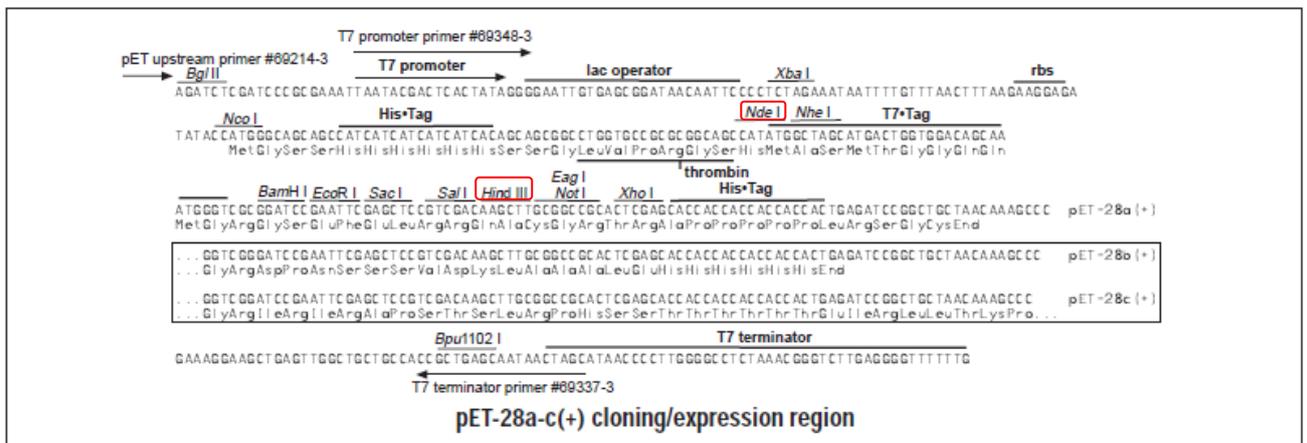
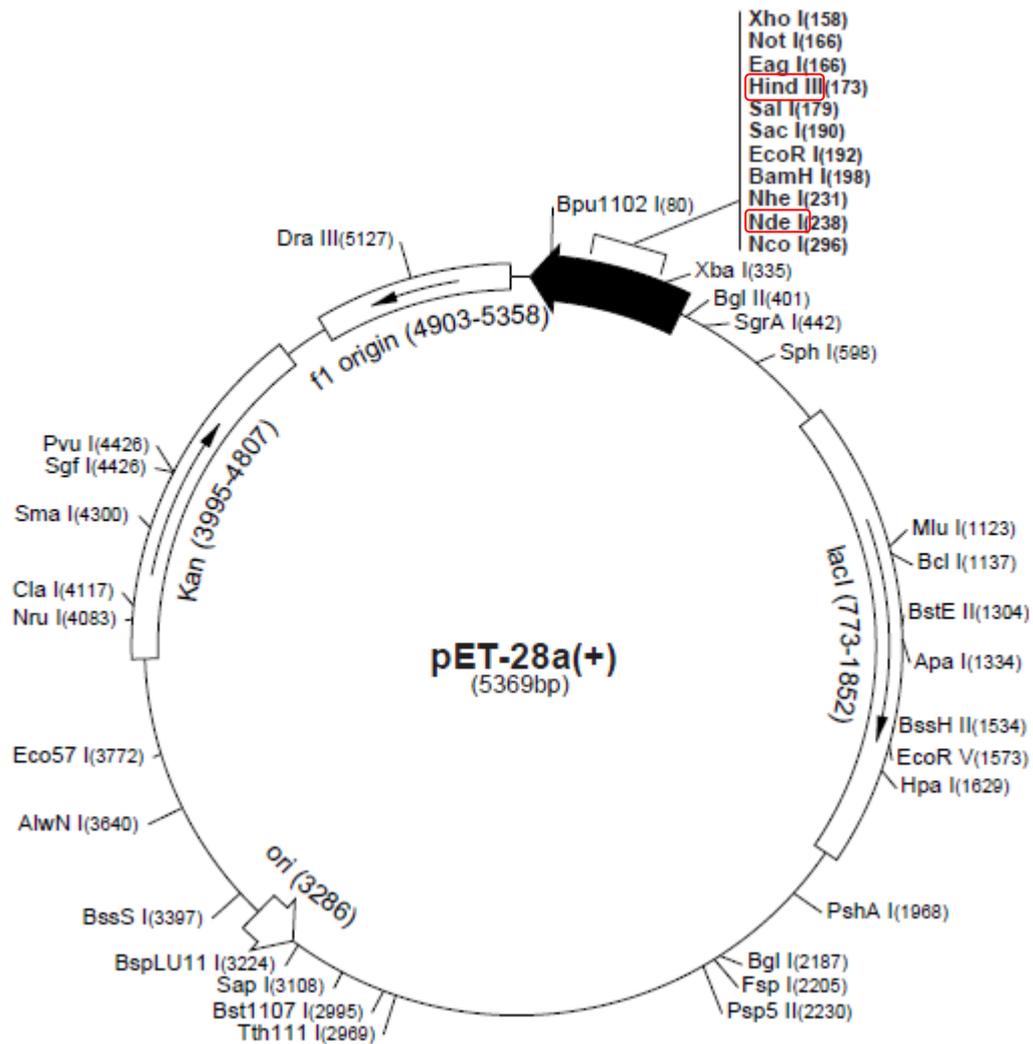
ZIMARO, T. et al. Insights into *xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* biofilm through proteomics. **BMC Microbiology**, 2013.

ANEXO A



Anexo A. Mapa do vetor de propagação pJET. Fonte: CloneJet PCR Cloning Kit - ThermoFisher Scientific.

ANEXO B



Anexo B. Mapa do vetor de expressão pET28a. Os sítios de restrição utilizados estão destacados em vermelho. Abaixo do mapa está o sítio de policonagem. Fonte: Novagen.