

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

**Produção recombinante e estudos funcionais de uma cisteíno
peptidase de *Xanthomonas citri* subspécie *citri***

Rosseli Santos da Silveira

São Carlos –SP

2009

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

**Produção recombinante e estudos funcionais de uma cisteíno
peptidase de *Xanthomonas citri* subspécie *citri***

Rosseli Santos da Silveira

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de São Carlos, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

São Carlos –SP

2009

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

S587pr

Silveira, Rosseli Santos da.

Produção recombinante e estudos funcionais de uma
cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subspécie citri* /
Rosseli Santos da Silveira. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
86 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2009.

1. Biotecnologia. 2. Cancro cítrico. 3. Cisteíno peptidase.
4. *Pichia pastoris*. 5. Caracterização enzimática. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Rosseli Santos da Silveira

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/04/2009

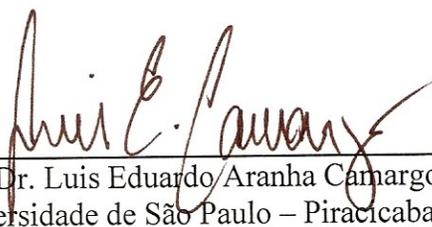
BANCA EXAMINADORA



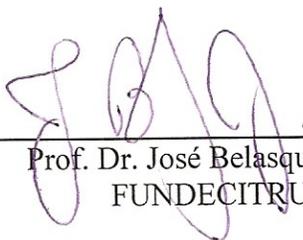
Prof. Dr. Flavio Henrique Silva (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar



Profa. Dra. Andrea Soares Costa
Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar



Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo
Universidade de São Paulo – Piracicaba



Prof. Dr. José Belasque Junior
FUNDECITRUS

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

Co-orientadora:

Dra. Andrea Soares da Costa

Dedico,

aos meus pais Roberto e Regina,

aos meus irmãos Roberto, Rossieni e Rúbio,

a minha sobrinha e afilhada Bruninha

pelo amor dedicado e por sempre estarem presente em minha vida.

Ao meu esposo Antonio Carlos,

pelo carinho, paciência e confiança depositada.

“ Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida e me ajudar a perseverar na busca do meu ideal.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, agradeço primeiramente pela acolhida em seu laboratório como estagiária e conseqüentemente pelo maravilhoso presente que foi desenvolver este trabalho.

À co-orientadora Dra. Andrea Soares da Costa, agradeço a participação ativa e direta com o trabalho e também pelo companheirismo e amizade desenvolvida ao longo dos dois anos de mestrado.

Ao Dr. José Belasque Junior, por sua disponibilidade em nos ajudar com a realização das curvas de crescimento “*in vivo*” e “*in vitro*”.

À Profª Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo (DCF-UFSCar), pela ajuda com o sequenciamento do N-terminal da *HIS*CPXAC.

À Profª. Dra. Adriana K. Carmona (UNIFESP) e ao Dr. Marcio Fernando Madureira Alves pela ajuda nos ensaios enzimáticos e de ativação da enzima.

Aos colegas do laboratório Darlan, Wilson, Kesser e Fernando pelos momentos de convivência e de coleguismo, acima de tudo.

Às amigas e anjos da guarda do laboratório, Márcia, Rinke e Andrea, que em todos os momentos estavam comigo e me mostraram o valor de uma amizade.

As minhas irmãs e agregados da Republica Normais, Mari, Fer, Taci, Meiry, Jaque, Rê, Carol, Thaís, Bruna e Silvia. Muito obrigada pelos momentos de descontração, alegria, confiança, cumplicidade e acima de tudo carinho.

Agradeço de forma especial aos meus pais e irmãos que sempre estiveram ao meu lado e torceram por mim até mesmo nos momentos em que eu já nem acreditava mais que seria possível atingir meus objetivos, muito obrigada pela confiança, carinho e também pelos momentos de alegria. Amo vocês!!!!!!

Ao meu esposo, em especial, gostaria de agradecer e muito pela paciência, companheirismo, incentivo, força, carinho e amor a mim dedicado. Toninho te amo muito e obrigada por estar ao meu lado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar (PPG-Biotec) pelo suporte e auxílio na realização deste estudo.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste trabalho por meio do Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME-CEPID).

Deixo aqui, um muito obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Uma das doenças que afeta a citricultura é o cancro cítrico, causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xac). Os sintomas mais comuns desta doença são a desfolhamento, morte dos galhos e queda prematura dos frutos. O processo de infecção dessa bactéria não foi totalmente elucidado, porém, já existem relatos do envolvimento de peptidases no processo de infecção e virulência. O seqüenciamento do genoma da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*, possibilitou a detecção de um gene que codifica uma enzima do tipo cisteíno peptidase, possivelmente envolvida no processo de infecção. Com o objetivo de caracterizar esta enzima e verificar seu possível envolvimento no processo de infecção foram realizadas: a expressão recombinante em *Pichia pastoris*, purificação da proteína e estudos de caracterização enzimática. A caracterização cinética da enzima recombinante foi realizada, por meio da hidrólise dos substratos sintéticos Z-Leu-Arg-MCA e Z-Phe-Arg-MCA (Z= Carbobenzoxicarbonil; MCA= 7-amino-4-metil-coumarina), assim como dos substratos com supressão intramolecular de fluorescência AbzKVRSSKQ-EDDnp, AbzKLRSSKQ-EDDnp e AbzKIRSSKQ-EDDnp (Abz= ácido *orto*-amino benzóico; EDDnp= N-[2,4-dinitrofenil]-etilenodiamino). A melhor eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) da enzima foi verificada com o uso do substrato AbzKIRSSKQ-EDDnp, o qual possui um resíduo de isoleucina na posição P₂, indicando que a enzima recombinante (_{HIS}CPXAC) tem uma preferência por resíduos de aminoácidos alifáticos nesta posição. Foram realizados também experimentos de inibição da atividade enzimática com diferentes inibidores de cisteíno peptidases incluindo CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4 e E-64 (transepoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano), resultando nas constantes de inibição (K_i) de 84.64, 0.088, 0.10, 0.012 e 1.214 nM, respectivamente. Além disso, foram produzidos anticorpos policlonais anti-_{HIS}CPXAC e análises de *Western blotting* revelaram que esse anticorpo reconheceu a cisteíno peptidase recombinante purificada e também a cisteíno peptidase nativa de *Xanthomonas citri subsp. citri* cepa 306 cultivada em meio indutor de patogenicidade. Os mesmos anticorpos não foram capazes de reconhecer a proteína em uma cepa de Xac que possui o gene da cisteíno peptidase interrompido (*knockout*), a qual, em estudos anteriores, se mostrou ser menos virulenta que a Xac 306. Os presentes resultados sugerem que a cisteíno peptidase em estudo pode estar envolvida no processo de infecção e/ou virulência de *Xanthomonas citri subsp. citri*.

ABSTRACT

The citrus canker disease is caused by a phytopathogenic bacterium *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (Xac). The common symptoms are defoliation, twig die-back and premature fruit drop. The infection process of this bacterium is not totally elucidated although it has been reported that peptidases are involved in the infection and virulence process. The genome sequencing of the bacterium *Xanthomonas citri* ssp. *citri* enabled the detection of a gene that encodes an enzyme cysteine peptidase like, possibly involved in infection. Aiming to characterize this enzyme and determine its possible involvement in the infection process were performed: expression in recombinant *Pichia pastoris*, purification of protein and enzyme studies for characterization were done. The kinetic characterization of recombinant enzyme was performed through the hydrolysis of synthetic substrates Z-Leu-Arg-MCA and Z-Phe-Arg-MCA (Z = Carbobenzoxy; MCA = 7-amido-4-methylcoumarin), as well as the use of substrates with intramolecular fluorescence suppression AbzKVRSSKQ-EDDnp, AbzKLRSSKQ-EDDnp and AbzKIRSSKQ-EDDnp (ABZ = *Ortho*-aminobenzoic acid; EDDnp = Ethylene diamine [2,4-dinitrophenyl]). The best catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) of the enzyme was found using the substrate AbzKIRSSKQ-EDDnp that has a isoleucine residue at position P2, showing that the recombinant enzyme ($_{HIS}CPXAC$) prefer aliphatic amino acid residue in this position. Inhibitory experiments of enzyme activity were performed using different cysteine peptidase inhibitors including CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4 and E-64 (L- transepoxy succinyl-leucylamido-[4-guanidino]butane), resulting in a constant of inhibition (K_i) of 84.64, 0.088, 0.10, 0.012 and 1.214 nM respectively. The polyclonal antibody anti- $_{HIS}CPXAC$ was produced in mouse and Western blotting analysis revealed that the antibody was able to recognize the recombinant purified cysteine peptidase and also the native cysteine peptidase from *Xanthomonas citri* ssp. *citri* strain 306 cultivated in media inductor of pathogenicity. The same antibody did not recognize the protein in a Xac knockout strain for the cysteine peptidase gene. Our results suggest that the cysteine peptidase from *Xanthomonas citri* ssp. *citri* may be involved in the bacteria infection and/or virulence.

LISTA DA FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo do cancro cítrico	4
Figura 2: Sintomas do Cancro cítrico.....	6
Figura 3: Processo de colonização da planta pela bactéria <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> a partir da infecção.....	7
Figura 4: Esquema dos sistemas de secreção tipo I, II, III, IV, V e VI.....	10
Figura 5: Classificação das peptidases de acordo com o tipo de reação de clivagem.....	19
Figura 6: Estrutura tridimensional da cisteíno protease papaína.....	21
Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de catálise das enzimas cisteíno peptidase.....	22
Figura 8: Representação esquemática do modelo proposto por Schechter e Berger (1967).....	23
Figura 9: Alinhamento entre a cisteíno peptidase de <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> (CPXAC) com outras cisteíno peptidases.	26
Figura 10: Diferença no desenvolvimento do processo de infecção da bactéria <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> selvagem e mutante.....	27
Figura 11: Esquema representativo da hidrólise dos substratos MCA e Abz...	40
Figura 12: Gabarito para contagem de colônias.	45
Figura 13: Ensaio de atividade enzimática da <i>HIS</i> CPXAC contra a caseína.....	47
Figura 14: Ensaio de atividade enzimática da cisteíno peptidase de <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> em presença de E-64.....	48
Figura 15: Amplificação da ORF2853 da cisteíno peptidase de <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i>	49
Figura 16: Esquema representativo do vetor pPICZaC_CPXAC e a sequencia da ORF2853	50
Figura 17: Seleção dos recombinantes em <i>Pichia pastoris</i> por PCR de colônia com diferentes combinações de oligonucleotídeos	52
Figura 18: Análises de expressão da <i>HIS</i> CPXAC em <i>Pichia pastoris</i> , purificação e ensaio de imunodeteção.....	55

Figura 19: Gráficos de eficiência catalítica (k_{cat}/k_m) da <i>HIS</i> CPXAC contra alguns substratos fluorogênicos.....	59
Figura 20: Gráficos de inibição da <i>HIS</i> CPXAC utilizando inibidores de cisteíno peptidase Cane-CPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4 e E-64	61
Figura 21: Perfil da atividade enzimática com variações de pH e diferentes concentrações de NaCl	64
Figura 22: Ensaio de temperatura ótima e estabilidade da enzima <i>HIS</i> CPXAC.....	66
Figura 23: Curva de crescimento “in vitro” da bactéria <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i>	67
Figura 24: Ensaio de indução de patogenicidade e análise da expressão da cisteíno peptidase em <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Combinação de oligonucleotídeos utilizados na reação de pcr de colônia.	33
Tabela 2: Eficiência catalítica da enzima HISCPXAC com os substratos Abz e MCA.....	58
Tabela 3: Inibição da atividade da HISCPXAC por diferentes inibidores de cisteíno peptidase.	62
Tabela 4: Desvio padrão referente à curva de crescimento da bactéria Xanthomonas citri subsp. Citri.	68

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

λ_{em} : comprimento de onda de emissão

λ_{ex} : comprimento de onda de excitação

AbzKIRSSKQ-EDDnp: ácido *orto*-amino benzóico N-[2,4-dinitrofenil]-
etilenodiamino; P₂: isoleucina

AbzKLRSSKQ-EDDnp: ácido *orto*-amino benzóico N-[2,4-dinitrofenil]-
etilenodiamino; P₂: leucina

AbzKVRSSKQ-EDDnp: ácido *orto*-amino benzóico N-[2,4-dinitrofenil]-
etilenodiamino; P₂: valina

BGMY: meio complexo contendo glycerol

BMMY: meio complexo contendo metanol

BSA: albumina sérica bovina

CaneCPI-1: inibidor recombinante de cisteíno peptidase da cana-de-açúcar 1

CaneCPI-2: inibidor recombinante de cisteíno peptidase da cana-de-açúcar 2

CaneCPI-3: inibidor recombinante de cisteíno peptidase da cana-de-açúcar 3

CaneCPI-4: inibidor recombinante de cisteíno peptidase da cana-de-açúcar 4

D.O: densidade óptica

dNTPS: desoxirribonucleotídeos trifosfato

DTT: ditioneitol

E-64: transepoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano

g: força G

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

K_{cat}: número de moléculas do substrato que atingem o sítio ativo da enzima por segundo

K_m : quantidade de substrato necessária para a enzima atingir metade da velocidade máxima

L: litro

M: molar

mA: miliamper

mL: mililitros

mM: milimolar

MW: *molecular weight*

NCBI: *National Center Biotechnology Information*

°C: graus Celsius

ORF: *Open reading frame* (fase aberta de leitura)

pb: pares de base

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial de hidrogênio

PVDF: membrana de *Polyvinylidene difluoride*

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato

TBS: solução salina tamponada com Tris

TCA: ácido tricloroacético

UFC: unidades formadoras de colônia

UV: ultravioleta

V: volts

Z-FR-MCA: carbobenzoxicarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina

Z-LR-MCA: carbobenzoic carbonil-Leu-Arg-7-amino-4-metilcoumarina

ng: nanograma

μg: micrograma

μL: microlitros

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DA FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS	VIII
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- <i>Citricultura</i>	1
1.2 – <i>O patógeno causador do cancro cítrico</i>	2
1.2.1 - <i>Ciclo do cancro cítrico</i>	3
1.2.1.1- <i>Disseminação do cancro</i>	4
1.2.1.2- <i>Processo de infecção</i>	5
1.2.1.3- <i>Colonização e reprodução</i>	6
1.2.1.4- <i>Sobrevivência</i>	8
1.3- <i>Sistemas de secreção de bactérias patogênicas</i>	9
1.3.1- <i>Sistema de secreção Tipo I</i>	10
1.3.2- <i>Sistema de secreção Tipo II</i>	11
1.3.3- <i>Sistema de secreção Tipo III</i>	13
1.3.4- <i>Sistema de secreção Tipo IV</i>	13
1.3.5- <i>Sistema de secreção Tipo V</i>	14
1.3.6- <i>Sistema de secreção Tipo VI</i>	15
1.4- <i>Genes associados com patogenicidade e virulência</i>	16
1.5- <i>Peptidases</i>	18
1.5.1- <i>Cisteíno peptidase</i>	20
1.6 - <i>CPXAC – Uma cisteíno peptidase de Xanthomonas citri subsp. citri</i>	24
2- OBJETIVOS	28
3- MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1- <i>Linhagens celulares</i>	29
3.2- <i>Ensaio em placa de atividade enzimática da cisteíno peptidase de Xanthomonas citri subsp. citri expressa em E. coli</i>	29
3.3- <i>Amplificação da ORF da cisteíno peptidase de Xanthomonas citri subsp. citri</i>	30
3.4- <i>Construção do plasmídeo de expressão</i>	31
3.5- <i>Seleção dos clones recombinantes via PCR de colônia</i>	33
3.6- <i>Expressão da cisteíno peptidase em Pichia pastoris</i>	34
3.7- <i>Purificação da cisteíno peptidase de Xanthomonas citri subsp. citri</i>	35
3.8- <i>Produção de anticorpos policlonais anti-HISCPXAC</i>	36

3.9- Ensaio de imunodeteção.....	37
3.10- Ativação da cisteíno peptidase	38
3.11- Ensaio de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m).....	38
3.12- Ensaio de inibição de atividade da cisteíno peptidase	40
3.13- Teste de pH ótimo e NaCl dependente.....	41
3.14- Teste de temperatura ótima e estabilidade da enzima.....	42
3.15- Sequenciamento do N-terminal da cisteíno peptidase	42
3.16- Curva de crescimento da linhagem <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 e mutante (knockout) em meio caldo nutriente e XAM1	44
3.17- Detecção da presença da CPXAC em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> cultivada em meio normal e indutor de patogenicidade.....	43
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1- Ensaio em placa da atividade enzimática da cisteíno peptidase de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> expressa em <i>E.coli</i>	45
4.2- Construção de plasmídeo para expressão da CPXAC em <i>Pichia pastoris</i>	48
4.3- Seleção dos clones recombinantes de <i>Pichia pastoris</i>	51
4.4- Expressão recombinante em <i>Pichia pastoris</i> e posterior purificação da HIS CPXAC	52
4.5- Imunodeteção da CPXAC	54
4.6- Ativação da proteína HIS CPXAC.....	55
4.7- Seqüenciamento da região N-terminal da cisteíno peptidase de CPXAC expressa em <i>Pichia pastoris</i>	56
4.8- Ensaio de eficiência catalítica da HIS CPXAC	57
4.9- Ensaio de inibição da atividade por inibidores cistatínicos e E-64.....	60
4.10- Ensaio de pH e NaCl ótimo.....	62
4.11- Temperatura ótima e de estabilidade	64
4.12- Curva de crescimento da linhagem <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 e mutante nocauteada em meio caldo nutriente e XAM1	66
4.13- Presença da CPXAC em células de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> cultivadas em meio normal e indutor de patogenicidade.....	68
5- CONCLUSÕES	71
6- REFERÊNCIAS.....	74

1– INTRODUÇÃO

1.1- Citricultura

Atualmente o Brasil é o maior produtor de laranjas e o maior exportador mundial de suco de laranja concentrado. A produção do Brasil atinge cerca de 1,7 milhões de toneladas da fruta, à frente da produção dos Estados Unidos, Argentina, China, México e Espanha (PUMPHREY, 2006). Atualmente, o cultivo de *citrus* no Brasil é uma das atividades agrícolas mais importantes e a produção é claramente aumentada em função da indústria. O estado de São Paulo é responsável por cerca de 70% da produção nacional de laranja, contribuindo majoritariamente para a exportação do suco concentrado congelado como também de seus subprodutos, como por exemplo, óleos essenciais, farelo de polpa cítrica, líquidos aromáticos entre outros. Estes produtos são utilizados em indústria de essências, produtos de limpeza e ração animal (ABECITRUS, 2006, a, b).

Alguns fatores podem afetar a produtividade do citrus como, por exemplo: o estresse hídrico, condições climáticas, tipos de solo e patógenos. Atualmente, no Brasil os patógenos têm causado grandes perdas e dentre eles está à bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri subsp. citri*, causadora do cancro cítrico (NEVES *et. al.*, 2001). Este patógeno vem se destacando por afetar a citricultura brasileira, causando grandes prejuízos para esta cultura. Nos últimos anos o Brasil tem gasto cerca de R\$ 300 milhões por ano com o controle do cancro cítrico (VIEGAS E MACHADO, 2006).

Esta patologia foi detectada pela primeira vez no Brasil, na região de Presidente Prudente em 1957, interior do estado de São Paulo. Neste mesmo ano, o país lançou um programa de erradicação do cancro cítrico com o objetivo de controlar a disseminação da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*. A erradicação é feita desde então, através de orientações específicas para o cultivo de citrus em áreas livres do cancro, realização de pulverizações preventivas em máquinas e equipamentos de colheita e também uma desinfecção das vestimentas dos trabalhadores (FUNDECITRUS, 2007; GRAHAM *et al.*, 2004).

1.2 – O patógeno causador do cancro cítrico asiático

A bactéria causadora do cancro cítrico asiático ou tipo A, conhecida por *Xanthomonas axonopodis pv. citri* (VAUTERIN *et al.*, 1995). Devido ao avanço das técnicas em biologia molecular, a taxonomia deste patógeno tem sido bem controversa, por esse motivo o agente causador da doença pode ser também chamado por *Xanthomonas citri* (SCHAAD *et al.*, 2000; BRUNINGS e GABRIEL, 2003). Mais recentemente uma nova reclassificação denominou esta bactéria como sendo *Xanthomonas citri subsp. citri* (SCHAAD *et al.*, 2006). Tendo em vista a grande controvérsia em relação ao nome científico a ser adotado, optamos neste trabalho por *Xanthomonas citri subsp. citri*, para designar o patógeno responsável pelo cancro cítrico.

A *Xanthomonas citri subsp. citri* é uma Proteobacteria gram-negativa, flagelada, aeróbica e de crescimento lento. A bactéria pode sobreviver e se multiplicar no hospedeiro de maneira epífita, sem causar doença. Entretanto,

possui várias enzimas com atividades celulolítica, pectinolítica e hemicelulolíticas que podem promover a degradação da parede celular facilitando a colonização e dispersão da bactéria para novos tecidos (GRAHAM *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2004). O cancro cítrico, também conhecido como cancrose A ou cancro cítrico asiático, é a forma mais grave da doença (GRAHAM *et al.*, 2004; DUNGER *et al.*, 2005). O patógeno causador do cancro acomete muitas variedades de *citrus* comercialmente importantes, que podem apresentar níveis diferenciados de suscetibilidade à doença (DA SILVA *et al.*, 2002; BRUNINGS e GABRIEL, 2003, GOLMOHAMMADI *et al.*, 2007).

Infelizmente não há um tratamento químico eficaz para o controle do cancro cítrico. Os países Brasil (estado de São Paulo) e Austrália, realizam contínuas campanhas de erradicação, com objetivo de impedir que a doença se dissemine para outras plantas da propriedade afetada como também para propriedades vizinhas. No Brasil, a erradicação das plantas infectadas e demais plantas vizinhas é realizada em um raio mínimo de 30 metros do foco da infecção (DAS, 2003; GOTTWALD *et al.*, 2002; AMARAL, 2003).

1.2.1 - Ciclo do cancro cítrico asiático

A figura 1 ilustra os processos envolvidos no desenvolvimento da patologia que são: disseminação, infecção, colonização e reprodução e sobrevivência. Cada etapa do ciclo será descrita a seguir.

É importante destacar que o ciclo primário ocorre uma única vez em cada período de cultivo, enquanto que o ciclo secundário é formado por ciclos

de infecção recorrentes durante todo o desenvolvimento da planta hospedeira e o final desse ciclo corresponde com a morte da planta ou queda das folhas (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995).

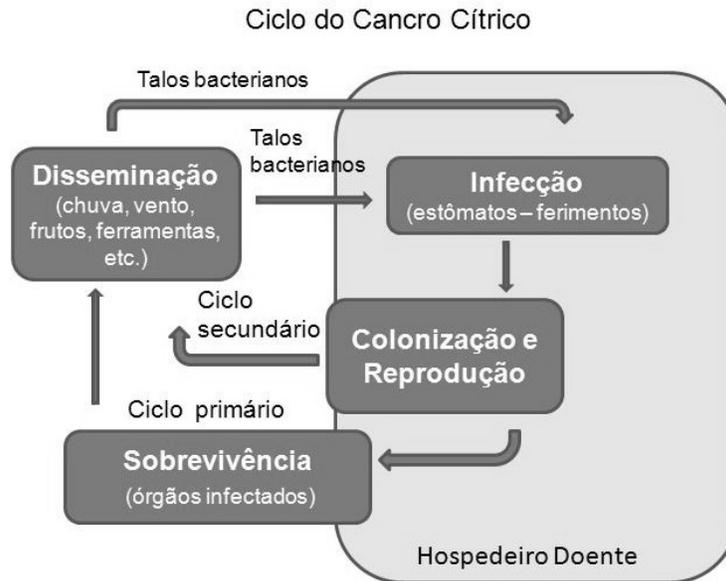


Figura 1: Esquema representativo do ciclo do cancro cítrico. Retirado de Bergamin Filho *et al.*, 1995.

1.2.1.1- Disseminação do cancro

Existem vários agentes responsáveis pela dispersão da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* entre eles estão: o homem e a chuva. O homem é o principal agente disseminador da bactéria em longas distâncias, devido ao trânsito indiscriminado nos pomares, transporte de materiais de colheita, veículos, vestuário contaminado entre outros (FUNDECITRUS, 2007). Já a dispersão a média distância, ocorre devido à chuva e ao vento, pois as chuvas acompanhadas de ventos fortes ao se chocarem com a massa bacteriana dos ramos contaminados espalham gotículas de água contendo células

bacterianas, as quais podem atingir ramos da mesma planta ou de plantas vizinhas (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; GRAHAM *et al.*, 2004).

Há ainda a larva minadora dos *citrus* (*Phyllocnistis citrella* – Hemiptera) que torna a planta mais predisposta à infecção pela bactéria, devido à formação de galerias nas folhas, as quais possibilitam a entrada do patógeno no hospedeiro e ocasiona a formação de grandes áreas necróticas. (SCHUBERT e SUN, 2003; DAS, 2003; BEHLAU *et al.*, 2007; JESUS JUNIOR *et al.*, 2006, GOTTWALD *et al.*, 2002).

1.2.1.2-Processo de infecção

O processo de infecção acomete tecidos jovens da planta hospedeira como ramos, folhas e frutos. Nesta fase do ciclo, a bactéria penetra na planta através de aberturas naturais, como os estômatos ou por ferimentos. É importante ressaltar que o contato direto da bactéria com o mesófilo foliar, através do ferimento, diminui muito a resistência estrutural da planta à infecção, promovendo a colonização do apoplasto e da epiderme foliar e resultando em uma hiperplasia celular (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995; VERNIÈRE *et al.*, 2003; BRUNINGS e GABRIEL, 2003; DUNGER *et al.*, 2005).

Um dos fatores que afetam o processo de infecção e conseqüentemente o desenvolvimento do cancro cítrico é a temperatura, visto que temperaturas baixas têm efeito negativo, enquanto que temperaturas de 20 °C a 30 °C são ótimas para ocorrência da infecção (PRUVOST *et al.*, 2002; DALLA PRIA *et al.*, 2006). Após a infecção os sintomas mais comuns do cancro cítrico são a

presença de uma superfície rugosa nas folhas, ramos e frutos. As lesões são pequenas salientes e amareladas, que posteriormente, adquirem cor marrom no centro e ao redor um halo amarelo. Nos frutos os sintomas se assemelham a verrugas, as quais podem crescer até tomar conta de toda a casca ocasionando a ruptura do fruto. Os ramos quando acometidos apresentam lesões salientes de coloração parda (Figura 2). (DALLA PRIA *et al.*, 2006; GRAHAM *et al.*, 2004; BRUNINGS e GABRIEL, 2003).

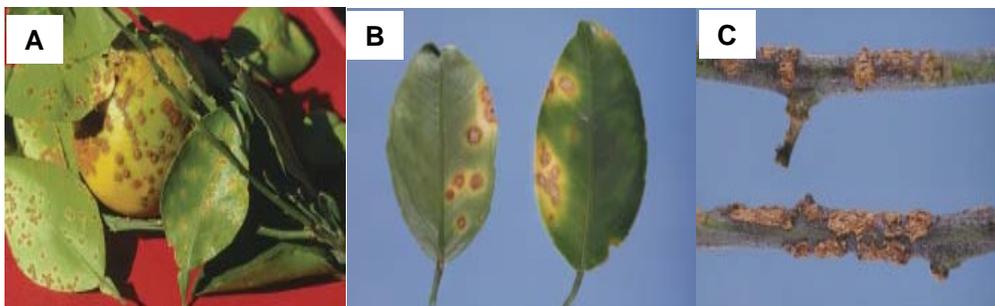


Figura 2: Sintomas do Cancro cítrico. A) Frutos e folhas com manchas amarelas e pontos pardos; B) Folhas em estágio avançado da doença deixando-as com centro marrom envolto por um halo amarelo; C) Ramos com lesões de coloração parda. Fonte: <http://doacs.state.fl.us/canker>

1.2.1.3- Colonização e reprodução

O início da colonização por *Xanthomonas citri subsp. citri*, seja via estômatos ou ferimentos, se restringe ao local da infecção. Após a entrada no espaço intercelular, as bactérias aderem à parede celular das células vegetais e em seguida, se multiplicam no espaço intercelular em presença da matriz polissacarídica extracelular (EPS). Após 1 a 4 semanas de infecção é possível observar a presença de lesões caracterizadas por hipertrofia e hiperplasia das

células do mesófilo foliar (GRAHAM ET AL., 2004; DAS, 2003; MOREIRA et al., 2004).

As lesões originadas pela infecção dos estômatos e/ou ferimentos são visíveis na folha infectada. E ao redor destas lesões há a formação de halos cloróticos ou aquosos. Além disso, a desfolha, queda prematura dos frutos e morte dos galhos é o reflexo do aumento da intensidade da doença (GOTTWALD *et al.*, 1988; GOTO e YAGUCHI, 1979) (Figura 3).

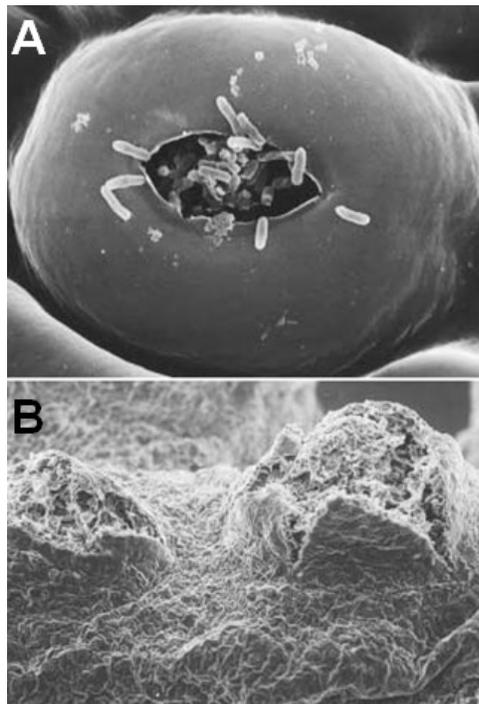


Figura 3: Processo de colonização da planta pela bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* a partir da infecção. A) Presença da bactéria no estômato, 5 dias após a infiltração do mesófilo da folha; B) Erupção do tecido do mesófilo através da epiderme após 30 dias de inoculação. Retirado de Graham *et al.*, 2004.

1.2.1.4- Sobrevivência

A bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* sobrevive principalmente nas lesões que ocorrem naturalmente. Folhas, frutos e ramos lesionados constituem a principal fonte de inóculo dessa patologia. O patógeno pode permanecer viável, enquanto células hospedeiras próximas as lesões estiverem vivas. Sabe-se que a bactéria pode sobreviver mais de seis meses em folhas infectadas enquanto que os ramos doentes podem abrigar por anos bactérias viáveis (DAS, 2003; SCHUBERT e SUN, 2003).

Em condições tropicais ocorre crescimento bacteriano contínuo ao redor das lesões, visto que em condições de temperatura desfavoráveis há o declínio da população bacteriana de forma rápida. A bactéria também sobrevive de maneira epifítica com níveis populacionais menores em associação com ervas e gramíneas e também no solo (PRUVOST *et al.*, 2002; DAS, 2003).

Partes contaminadas como frutos e folhas, ao caírem no solo, promovem uma diminuição da população bacteriana, não sendo detectada a presença do patógeno por até dois meses, devido à competição com microrganismos decompositores. A presença de células bacterianas envolvidas por uma cápsula de polissacarídeo extracelular auxilia a sobrevivência do patógeno por anos, desde que os tecidos infectados estejam secos e livres do solo (GOTO e HYODO, 1985; GOTTWALD *et al.*, 2002; SCHUBERT e SUN, 2003, GRAHAM *et al.*, 2004).

1.3- Sistemas de secreção de bactérias patogênicas

Bactérias gram-negativas patogênicas têm desenvolvido estratégias sofisticadas para explorar os atrativos nutricionais fornecidos tanto por plantas quanto por animais. A maioria das bactérias patogênicas são altamente especializadas para um número limitado de organismos hospedeiros eucarióticos (BÜTTNER e BONAS, 2003).

A secreção de proteínas é um mecanismo fundamental para o sucesso na proliferação da bactéria fitopatogênica. As proteínas secretadas servem para aderir e degradar a parede celular da planta, suprimir a resposta de defesa e integrar DNA bacteriano e proteínas no citoplasma das células vegetais (PRESTON *et al.*, 2005).

As bactérias gram-negativas apresentam uma dupla barreira (espaço periplasmático) entre o citoplasma e o ambiente externo por isso necessita de um sistema de secreção eficiente. Atualmente existem seis tipos de sistemas de secreção e estes são denominados sistemas I, II, III, IV, V e VI como observado na figura 4.

Dentre os sistemas de secreção existentes, somente os sistemas tipo II e V, realizam secreção de proteínas no periplasma, as quais serão transportadas através da membrana externa para o meio extracelular. O sistema tipo II pode utilizar tanto a proteína Sec (translocase Sec), quanto a Tat (translocase dupla arginina), entretanto o sistema de secreção tipo V faz uso somente da proteína Sec. (SAIER JUNIOR, 2006; PRESTON *et al.*, 2005; FILLoux *et al.*, 2008).

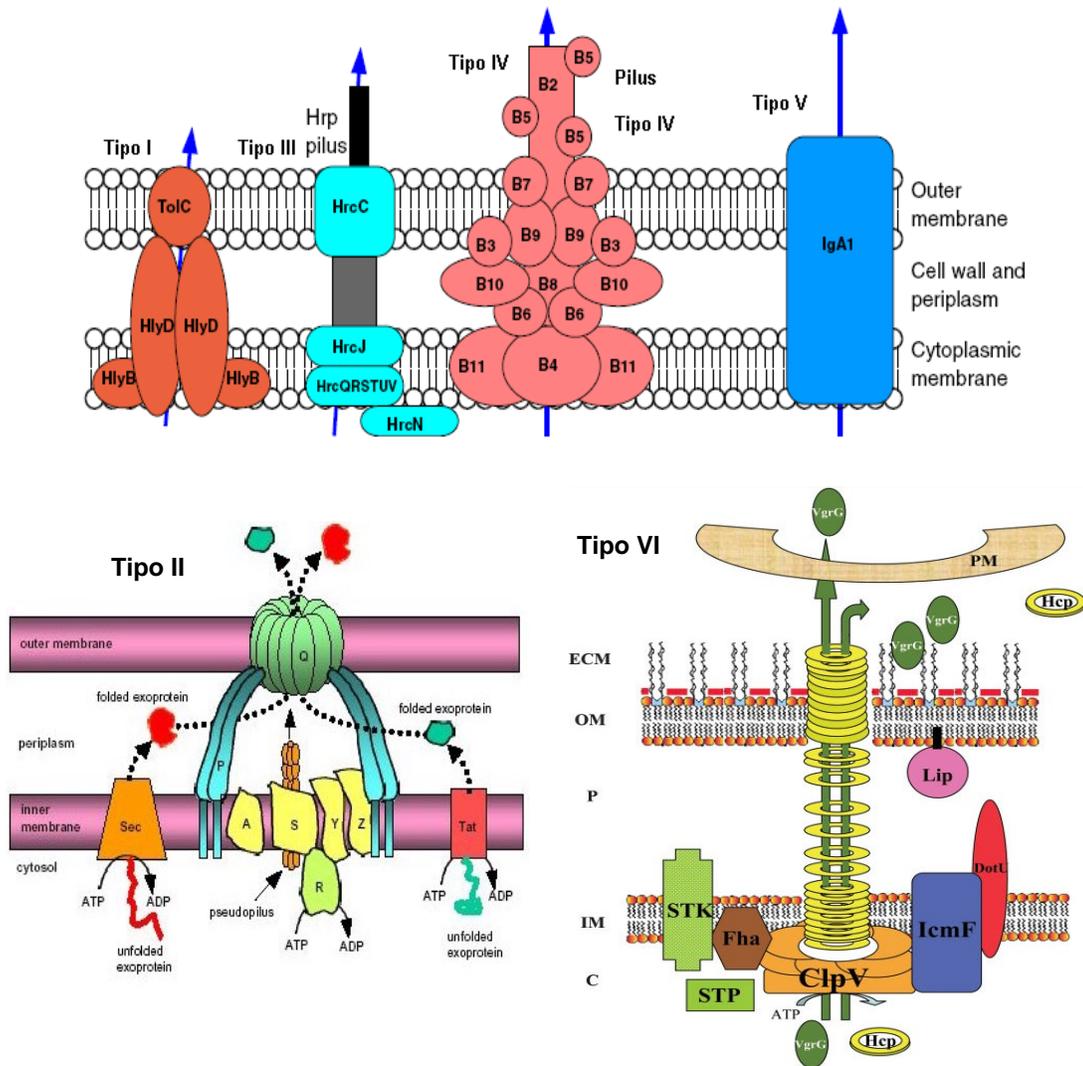


Figura 4: Esquema dos sistemas de secreção tipo I, II, III, IV, V e VI. Adaptado de Filloux *et al.*, 2008; Preston *et al.*, 2005;

1.3.1- Sistema de secreção Tipo I

Trata-se de transportadores de proteínas de membrana que apresentam um cassete de ligação ao ATP (ABC). Os transportadores ABC são proteínas de membrana ubíquas, que realizam o transporte de diversos substratos através da membrana celular a partir da hidrólise do ATP. Estes transportadores realizam várias funções dentre elas estão à regulação

transcricional, transporte de solutos e proteínas através das membranas e até reparo do DNA. Esse sistema de secreção é capaz de secretar proteínas através da dupla membrana da bactéria em um simples passo, independente do sistema Sec. É constituído por três componentes, sendo eles uma proteína ABC de ligação ao ATP, uma proteína de fusão a membrana que serve de ponte entre a membrana externa e interna e uma proteína de canal associada aos poros da membrana, como por exemplo, a TolC proteína de transporte da α -hemolisina de *E. coli*. Todas as proteínas ABC de transporte apresentam uma estrutura comum: domínios hidrofóbicos inseridos nas duas membranas e domínios hidrofílicos associados com o interior da membrana, o qual é bem conservado. O substrato para este tipo de sistema apresenta um sinal de secreção na porção C-terminal, o qual não é removido durante o transporte e determina que as proteínas pertencentes ao sistema tipo I, sejam translocadas postraducionalmente (HOLLENSTEIN *et al.*, 2007; HOLLAND *et al.*, 2005; DELEPELAIRE, 2004; PRESTON *et al.*, 2005).

1.3.2- Sistema de secreção Tipo II

Inicialmente é importante ressaltar a participação do sistema Sec e Tat na primeira parte do processo de secreção via sistema tipo II. O sistema Sec (via de secreção geral) é ubíquo, tem a função de translocar proteínas através da membrana citoplasmática para o periplasma e utiliza a hidrólise de ATP como fonte de energia. (SANDKVIST, 2001; PALLLEN *et al.*, 2003). Em contrapartida o sistema Tat (translocase dupla arginina), exporta uma pequena quantidade de proteínas através da membrana citoplasmática, utilizando como

fonte de energia a força próton motriz (PMF) (VOULHOX et al., 2001; SAIER JUNIOR, 2003; PRESTON et al., 2005; PALLLEN et al., 2003).

A secreção pelo sistema tipo II ocorre em dois passos. No primeiro passo, as proteínas são secretadas através da maquinaria Sec para o espaço periplasmático, isso se deve a presença um peptídeo sinal na porção N-terminal, que permite a translocação Sec dependente da proteína através da membrana citoplasmática. A proteína precursora se liga a chaperona SecB, esta interação é importante para manter o estado não enovelado ou parcialmente enovelado das proteínas precursoras. Em seguida, a SecB apresenta a preproenzima para a proteína ATPase SecA, que direciona as novas preproenzimas sintetizadas até ao complexo SecYEG ligado a membrana formando assim o canal da translocase. Através da hidrólise do ATP as proteínas precursoras atravessam o canal da translocase chegando assim no espaço periplasmático. Para tanto, as proteínas precursoras perdem o peptídeo sinal favorecendo a correta conformação da proteína (CAO e SAIER JUNIOR, 2003; RUSSEL, 1998; STRYER *et al.*, 1996).

No segundo passo, as proteínas são secretadas do espaço periplasmático através da membrana externa para o meio extracelular pelos componentes do sistema de secreção tipo II, os quais são codificados por aproximadamente 16 genes, dependendo da bactéria. Estes genes são organizados em um *cluster*, sendo denominados de A a O e S (FILLOUX, 2004; SANDKVIST, 2001b).

1.3.3- Sistema de secreção Tipo III

Este sistema é também conhecido como sistema de secreção dependente de contato, sendo muito utilizado por bactérias patogênicas gram-negativas de plantas e animais. O sistema tipo III realiza o transporte de proteínas do organismo invasor para o citoplasma das células do hospedeiro, que são responsáveis pela patogenicidade e virulência, como também a elicitação do mecanismo de defesa da planta. Foi observada, no genoma das bactérias fitopatogênicas, a presença do sistema tipo III, que codifica um conjunto de genes HRP, presente nas ilhas de patogenicidade ou em grandes plasmídeos associados à virulência. O sistema de secreção, em questão, apresenta uma região conservada chamada de corpo basal flagelar, constituído por um complexo de proteínas de membrana altamente conservado que formam um canal de membrana, sendo muito similar ao sistema Sec (BÜTTER e BONAS, 2003; HUECK, 1998; PRESTON *et al.*, 2005; GÜRLEBECK *et al.*, 2005).

1.3.4- Sistema de secreção Tipo IV

Bactérias gram-negativas patogênicas utilizam este sistema de secreção por estar relacionado com o transporte de DNA como também de proteínas para as células do hospedeiro, o qual contribui para a inserção de fatores de virulência e patogenicidade. Para a transferência de DNA, tanto dentro de uma espécie como entre diversas espécies utiliza-se a conjugação que contribui para a plasticidade do genoma bacteriano. Outra forma de transferência de DNA é a captura ou liberação do DNA, o qual é independente de contato com a célula

alvo, promovendo o intercâmbio genético e, por conseguinte, representa mecanismos potenciais de transferência de características de sobrevivência durante a infecção. Há também o sistema efetor translocador, o qual é necessário para o processo de infecção de vários patógenos de plantas e animais. Este sistema necessita de contato direto com as células alvo. O sistema tipo IV tem como protótipo a maquinaria de transferência T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (VirB/D4), que envia partículas nucleoproteicas oncogênicas para as células da planta. O sistema de secreção em questão é composto por três subestruturas distintas: o engate da proteína homomultimérica, um complexo protéico transenvelope e *pilus* conjugados de transferência ou *T-pilus*. Estas três subestruturas agem coordenadamente como uma única organela supramolecular para mediar os vários estágios de translocação, os quais incluem o recrutamento de DNA cognato e substratos protéicos para a maquinaria de transferência. Os substratos são transferidos, através do envelope celular, sendo entregues a célula alvo (CASCALES e CHRISTIE, 2003; FISCHER *et al.*, 2002; BACKERT e MEYER, 2006; PALLAN *et al.*, 2003; BURNS, 1999; CHRISTIE e VOGEL, 2000; ALEGRIA *et al.*, 2004).

1.3.5- Sistema de secreção Tipo V

Este tipo de sistema de secreção também é conhecido por sistema de autotransporte. Ele tem diversas funções incluindo adesão, agregação, formação de biofilme, resistência da defesa do hospedeiro e virulência. Este sistema de autotransporte contém todas as informações necessárias para a translocação através do envelope celular e/ou requer um único fator acessório

permitindo que as proteínas sejam translocadas através da membrana externa via poro β -barril. As proteínas secretadas por esta via contem uma seqüência sinal na porção N-terminal para translocação através da membrana interna (sistema Sec). Elas possuem também um domínio funcional de passagem que pode ser exposto à superfície ou liberado no meio extracelular. Além disso, apresentam uma região de ligação necessária para a translocação do domínio de passagem através da membrana externa e uma região C-terminal envolvida na formação de um poro transmembrana. Com base nestes critérios podemos citar dois grupos adicionais ao sistema tipo V: o sistema de dois parceiros (TPS) e a família OCA. No TPS o domínio de passagem, é translocado através da membrana externa via um poro β -barril formado pela TpsB. Uma vez na superfície da bactéria, o domínio de passagem pode sofrer processamento proteolítico adicional para alcançar funções fisiológicas. Já a família OCA (“*Oligomeric Coiledcoil Adhesins*”), essa família tem sido descrita como sendo autotransportadores oligoméricos que atacam a superfície (DESVAUX *et al.*, 2004; DAUTIN e BERNSTEIN, 2007; WELLS *et al.*, 2007; JACOB-DUBUISSON *et al.*, 2004; HENDERSON *et al.*, 2004).

1.3.6- Sistema de secreção Tipo VI

Os componentes deste sistema de secreção são codificados por um *cluster* composto por aproximadamente 15 genes, sendo inicialmente denominado IAHP (*IcmF-associated homologous proteins*) por conter genes que codificam proteínas de membrana interna do tipo IcmF e DotU. As proteínas que são mais secretadas pelo sistema tipo VI são as pertencentes às famílias Hcp e VgrG. As proteínas pertencentes à família Hcp não apresentam

um peptídeo sinal, o que indica que elas não são secretadas pela maquinaria dependente de *Sec* ou *Tat* e provavelmente atravessam o envelope celular bacteriano em um simples passo. Também foi verificada que as proteínas Hcp estão envolvidas com a virulência, podendo ser utilizadas para a construção de canais na superfície celular bacteriana favorecendo o transporte de outras moléculas efetoras que podem ser transportadas para a célula hospedeira. As proteínas da família VgrG são caracterizadas pela repetição do motivo Val-Gly dipeptídeo e são compostas por dois domínios que constituem o *tail spike*. Estas proteínas são responsáveis por perfurar o envelope bacteriano ou a membrana celular do hospedeiro permitindo a secreção de proteínas e de componentes estruturais. Acredita-se que o complexo VgrG pode adotar uma estrutura de perfuração, rodeada por anéis Hcp, no qual formariam um tubo que permite a ligação destas proteínas a superfície bacteriana. Para que ocorra o transporte das proteínas Hcp e VgrG é necessária a presença de proteína kinase Serina Treonina (STPK) e uma proteína fosfatase Serina Treonina (STPP) como também a proteína Fha, esta última é responsável pela sinalização dependente da fosforilação (FILLOUX *et al.*, 2008; BINGLE *et al.*, 2008; DUDLEY *et al.*, 2006; PUKATZKI *et al.*, 2006).

1.4- Genes associados com patogenicidade e virulência

As bactérias fitopatogênicas podem expressar sua patogenicidade em vários estádios da infecção como, por exemplo, invasão, multiplicação bacteriana, produção de fatores de virulência e sintomas (GOTO, 1992).

O gênero *Xanthomonas* apresenta genes envolvidos tanto com a patogenicidade quanto com a virulência, que são os genes *avr* (avirulência), *rpf* (regulação dos fatores de patogenicidade) e *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade). Os genes *avr* codificam um grupo de proteínas efetoras responsáveis por controlar a habilidade da bactéria em desenvolver ou restringir a doença em hospedeiros resistentes e pode também participar da patogenicidade e virulência em interações incompatíveis (CHAN e GOODWIN, 1999; AUSTUA-MONGE *et al.*, 2004; DUNGER *et al.*, 2005). Por outro lado, o operon *rpf* controla a produção de importantes fatores de patogenicidade como as proteases, glucanases e polissacarídeos extracelulares. Já os genes *hrp* codificam proteínas envolvidas no sistema de secreção tipo III como também algumas proteínas do sistema tipo II, necessárias para a patogenicidade, garantindo a resposta de hipersensibilidade tanto em hospedeiros resistentes como em plantas não hospedeiras (FURUTANI *et al.*, 2004; YAMAZAKI *et al.*, 2008; FURUTANI *et al.*, 2006).

A atividade de alguns genes de avirulência bacteriano é dependente dos genes *hrp* funcionais, nos quais a expressão é regulada por condições nutricionais e fatores de indução de planta. Um exemplo são os genes *avr* de *Pseudomonas syringae* que apresentam regulação coordenada pelos genes *hrp* (LEACH e WHITE, 1996).

Os produtos dos genes *hrpX* e *hrpG* presentes em *Xanthomonas citri* *subsp. citri* e *Xanthomonas campestris*, controlam a expressão de genes estruturais codificando componentes da maquinaria supramolecular do sistema de secreção tipo III e também alguns genes efetoras. Vários genes que são

regulados pela maquinaria dependente de HrpX, apresentam uma região nucleotídica consenso (TTCGC-N₁₅-TTCGC) sendo conhecida por promotor de planta induzível ou PIP box. A proteína HrpG faz parte de um sistema de dois componentes, a qual funciona como regulador de resposta (DA SILVA *et al.*, 2002; THIEME *et al.*, 2005; WENGELNIK *et al.*, 1996).

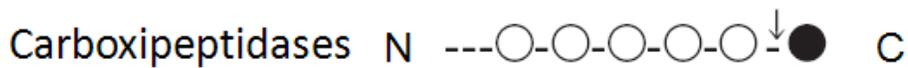
1.5- Peptidases

As peptidases estão presentes em todos os sistemas biológicos, de vírus a vertebrados. Estas enzimas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos de outras proteínas (SAJID e MACKERROW, 2002; TURK *et al.*, 2000). A atividade catalítica destas enzimas pode funcionar como um mecanismo de ativação ou inativação de proteínas, tornando-as importantes em vários processos biológicos como, por exemplo, nutrição, regulação do ciclo celular, crescimento celular, diferenciação, invasão do hospedeiro, processamento de antígenos e angiogênese (HOOPER, 2002; LECAILLE *et al.*, 2002; LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 1998).

As peptidases podem ser classificadas como endopeptidases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada (Figura 5). As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas de proteínas e polipeptídios. Já as exopeptidases atuam nas extremidades N ou C-terminal das cadeias polipeptídicas e podem liberar um, dois ou três peptídeos denominados aminopeptidases, dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases, respectivamente. As exopeptidases que atuam na região C-terminal liberam um ou dois peptídeos denominados carboxipeptidases e

peptidil-dipeptidases, respectivamente (HOOPER, 2002; RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2006).

EXOPEPTIDASES



ENDOPEPTIDASES

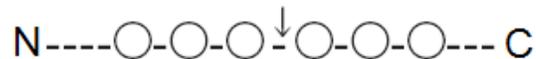


Figura 5: Classificação das peptidases de acordo com o tipo de reação de clivagem. ○ representa os resíduos de aminoácidos que compõem um polipeptídeo; ● representa os aminoácidos que sofreram clivagem. Adaptado de RAO *et al.*, 1998.

Outra forma de classificação das peptidases é através do resíduo de aminoácido presente no sítio ativo, o qual é responsável pelo mecanismo catalítico da enzima. Assim, as peptidases são agrupadas em seis classes principais: serino, aspartil, metalo, treonino, glutamil e cisteíno peptidases (RAWLINGS *et al.*, 2006). As serino, treonino e cisteíno peptidases apresentam resíduos de aminoácidos nucleofílicos no sítio catalítico da enzima, que se encontram alinhados com aminoácidos doadores de prótons. Este mecanismo de catálise resulta na formação de um produto intermediário covalente entre a enzima e parte do substrato. Já no mecanismo catalítico das aspartil, metalo e glutamil peptidases, não ocorre a formação do produto intermediário, visto que estas enzimas apresentam uma molécula de água ativada como sendo o grupo

nucleofílico e, neste caso, os resíduos do sítio catalítico atuam como ácidos e bases (BARRETT *et al.*, 2003; RAWLINGS *et al.*, 2006; TURK, 2006).

1.5.1- Cisteíno peptidase

As cisteíno peptidases podem ser agrupadas em 72 famílias e que estão presentes em todos os reinos, desde organismos mais simples como os vírus até os mais complexos como plantas e mamíferos (WIEDERANDERS, 2003; RAWLINGS *et al.*, 2008).

Uma característica comum as cisteíno peptidases é a estrutura tridimensional bilobada, a qual é composta por dois domínios L e R (Figura 6). No interior destes domínios está o sítio catalítico constituído de um grupo tiol presente no resíduo de cisteína, que atua como nucleófilo na hidrólise da ligação peptídica. Há também um resíduo de histidina, o qual apresenta um anel imidazólico, que funciona como uma base acceptora de prótons. Além disso, a presença de uma glutamina altamente conservada é um fator importante para a atividade proteolítica da enzima, visto que ela é responsável por estabilizar a estrutura tetraédrica intermediária durante a hidrólise do substrato (SAJID e MCKERROW, 2002).

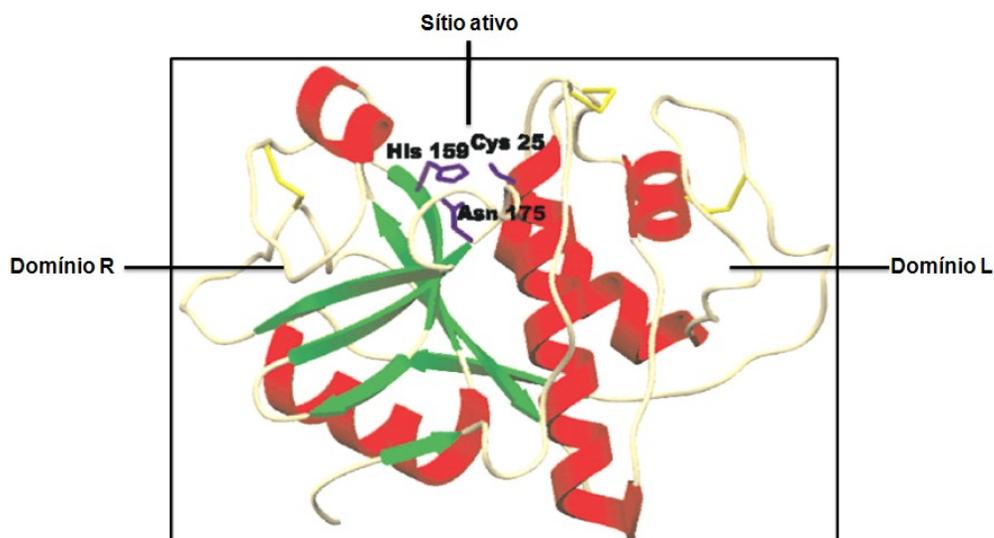


Figura 6: Estrutura tridimensional da cisteína protease papaína. Presença de dois domínios e entre eles o sítio ativo da enzima. O domínio N-terminal é composto por α -hélices, enquanto que o domínio C-terminal apresenta barril- β . Os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio catalítico estão em negrito: Cys 25, His 159 e Asn 175. Adaptado de Grzonka *et al.*, 2001.

O mecanismo de catálise das cisteína proteases está representado na figura 7. Inicialmente é realizada a associação ou ligação da enzima livre com o substrato originando um intermediário covalente denominado acil-enzima, como resultado do ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo sobre a carbonila da ligação peptídica a ser hidrolisada. Em seguida ocorre a liberação da porção C-terminal do substrato e conseqüentemente a acilação da enzima, com a formação e liberação do primeiro produto da enzima (amina R'-NH₂). O próximo passo é a reação de deacilação da enzima, no qual a acil-enzima reage com uma molécula de água liberando a parte N-terminal do substrato originando o segundo produto (RCOOH) e promovendo a regeneração da enzima livre (BARRETT, 1998; LECAILLE *et al.*, 2002).

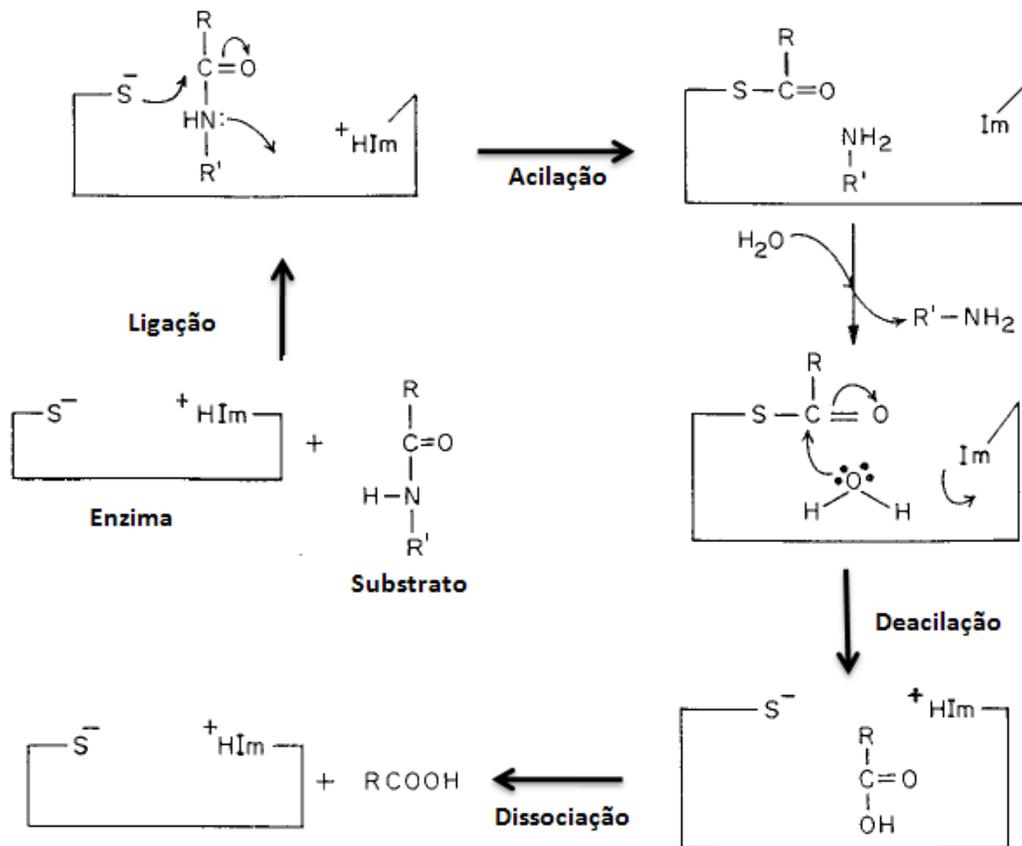


Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de catálise das enzimas cisteíno peptidase. Adaptado de RAO *et al.*, 1998.

A especificidade das cisteíno peptidases é descrita com base no modelo proposto por Schechter e Berger (1967) representado na figura 8. De acordo com este modelo, os subsítios da enzima, identificados pela letra “S”, são locais de ligação da enzima ao substrato. Cada subsítio acomoda apenas um resíduo de aminoácido do substrato. Cada aminoácido dos peptídeos que se acomodam no subsítio é identificado pela letra “P”. Sendo assim, os resíduos de aminoácidos posicionados ao lado da ligação peptídica a ser hidrolisada são numerados P1, P2, P3... Pn em direção ao N-terminal do substrato e P1', P2', P3'... Pn' em direção ao C-terminal. O ponto de clivagem do substrato é identificado pelos resíduos P1 e P1'. De forma semelhante os subsítios da

peptidase são designados por Sn... S3, S2, S1, S1', S2', S3'... Sn'(RAWLINGS *et al.*, 2008; DUBEY *et al.*, 2007).

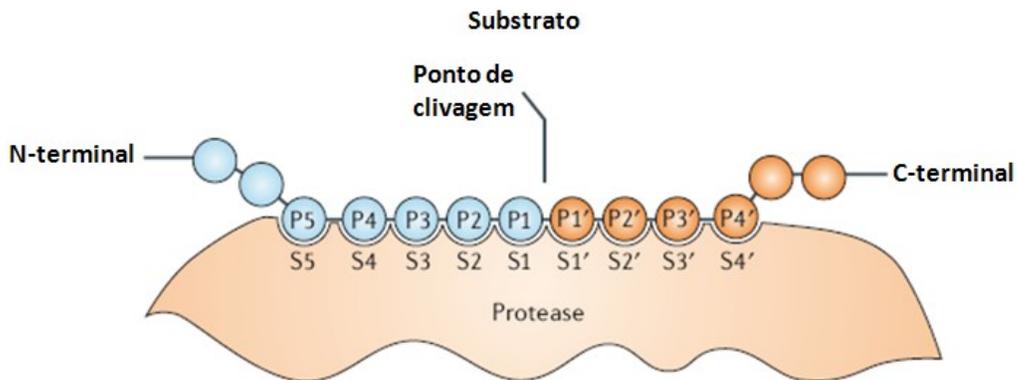


Figura 8: Representação esquemática do modelo proposto por Schechter e Berger (1967). Os resíduos dos peptídeos são designados pela letra “P” e os subsítios com os quais os peptídeos interagem, com a letra “S”. Adaptado de Turk, 2006.

Nas plantas, as cisteíno peptidases estão localizadas no vacúolo e na parede celular. Algumas destas enzimas atuam no sistema de defesa da planta contra a herbivoria. Além disso, participam de importantes processos fisiológicos, como a germinação, maturação de proteínas estocadas, em resposta de estresse biótico e abiótico e senescência de flores e folhas. Foi observado que as enzimas do tipo legumáina estão presentes em vacúolos de armazenamento como também em vacúolos líticos de organismos vegetativos. Já algumas denominadas caspases podem ser encontradas no citosol e não em vacúolos, com a função de promover a morte celular programada como forma de defesa (PECHAN *et al.*, 2004; GRUDKOWSKA *et al.*, 2004; VAN DER HOORN e JONES, 2004, ASP *et al.*, 2004).

Organismos parasitas de plantas e animais apresentam enzimas do tipo cisteíno peptidase, que podem estar envolvidas com a invasão celular, degradação de proteínas do sistema defesa do hospedeiro, patogenicidade e presença no ciclo de vida de parasitas e a obtenção de aminoácidos essenciais para o crescimento e desenvolvimento. Alguns organismos e suas enzimas podem ser citados, como por exemplo: as bactérias *Porphyromonas gingivalis* (gingipaína), *Clostridium histolyticum* (clostripaina); os vermes *Schistosoma mansoni* (catepsinas D e F - catalisa a degradação de hemoglobina), *Trypanosoma cruzi* (cruzapaína); os protozoários *Plasmodium vivax* (vivapaína), *Fasciola hepática* (catepsina L1 e L2), *Leishmania mexicana* (2 catepsinas L e 1 catepsina B); os fungos *Aspergillus flavus* (catepsina B) e *Pyrenopeziza brassicae* (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997; JULIANO *et al.*, 2004; NA *et al.*, 2004; CORDOVA *et al.*, 2001; BALL *et al.*, 1991).

Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* e atualmente ainda não é conhecida uma maneira eficaz de se combater este patógeno. Sendo assim, estudos de enzimas possivelmente envolvidas na patogenicidade podem ajudar no entendimento dos processos de infecção da bactéria e contribuir na busca por um método de controle eficiente para esta praga.

1.6. - CPXAC – Uma cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* (ORF 2853)

Após o seqüenciamento do genoma da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*, foi possível verificar a presença de um gene que codifica uma enzima do tipo cisteíno peptidase. A proteína predita pela tradução da fase aberta de leitura (ORF, *Open Reading Frame*) tem aproximadamente 28 kDa e

possui similaridade com outras cisteíno proteases publicadas e/ou presentes em bancos de dados (figura 9). A proteína apresenta um peptídeo sinal composto por 24 resíduos de aminoácidos, o que sugere ser secretada por mecanismo de secreção do tipo II. Além disso, a enzima possui resíduos de aminoácidos conservados comuns a cisteíno proteases.

Este trabalho é uma continuidade de estudos funcionais realizados por Santos, 2007, no qual foi gerado um mutante de *Xanthomonas citri subsp. citri* com o gene da cisteíno peptidase nocauteado. As análises mostraram que a bactéria *Xanthomonas* nocauteada apresentou menor virulência que a não nocauteada (Figura 10), visto que seu crescimento foi menor e conseqüentemente seu processo de infecção é menos agressivo em relação à cepa selvagem. Entretanto, não foi possível a obtenção da proteína recombinante, e conseqüentemente, informações sobre sua atividade, inclusive, a confirmação dela como sendo uma cisteíno peptidase.

Baseado nestas informações a expressão recombinante e estudos funcionais desta cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* foram propostos neste trabalho, permitindo entender o envolvimento desta proteína no mecanismo de patogenicidade e/ou virulência da bactéria.

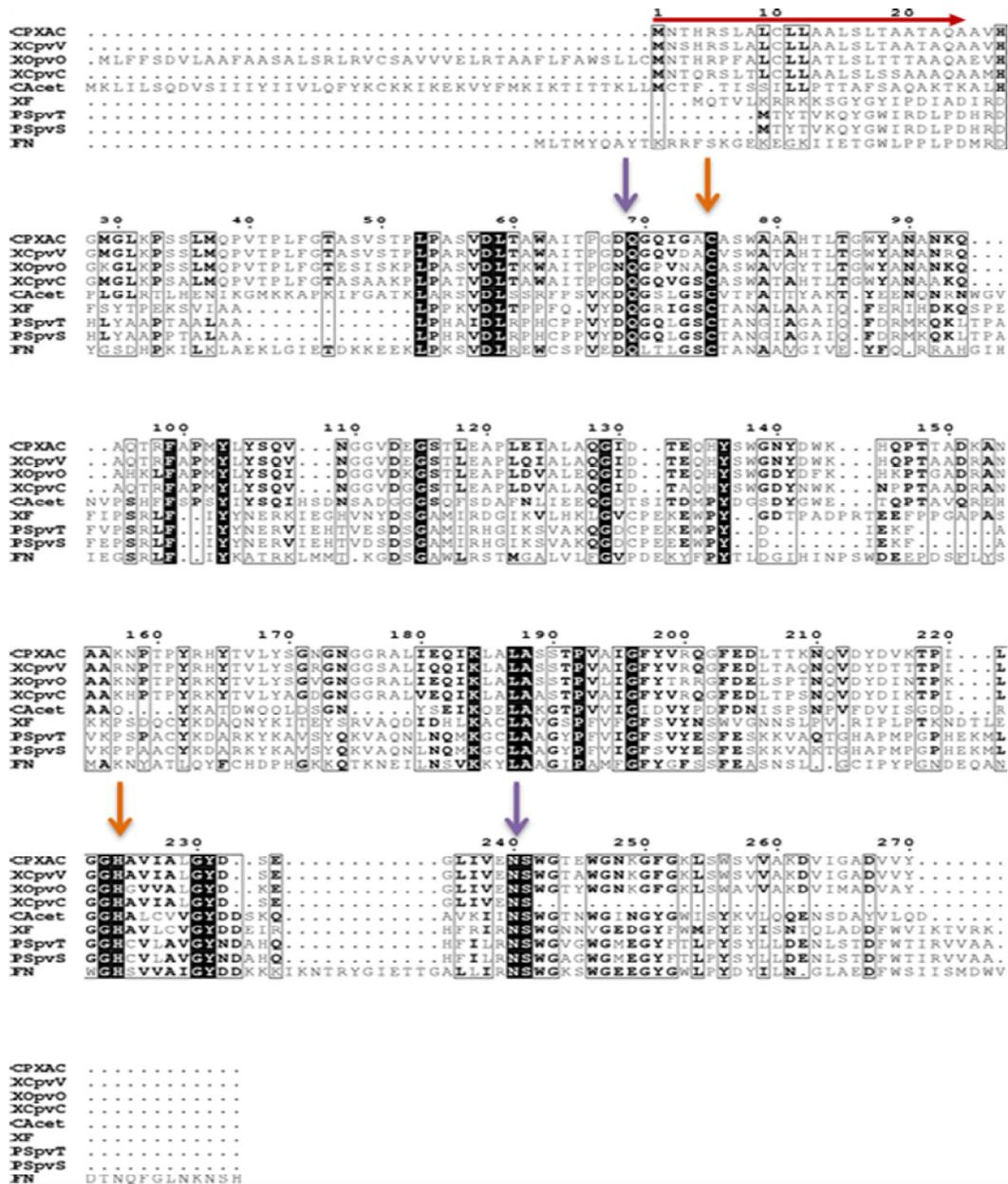


Figura 9: Alinhamento entre a cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (CPXAC) com outras cisteíno peptidases. O alinhamento foi realizado com a cisteíno peptidase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (CPXAC) e outras de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCpvV), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOpvO), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCpvC), *Clostridium acetobutylicum* (CAcet), *Xylella fastidiosa* 9a5c (XF), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000 (PSpvT), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (PSpvS) e *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586 (FN). A seta vermelha apresenta a região correspondente ao provável peptídeo sinal como indicado pelo programa SignalP 3.0. As setas em laranja, sinalizam os resíduos pertencentes a díade catalítica e as setas em roxo os resíduos de aminoácidos que flanqueiam a região do sítio catalítico. As caixas pretas correspondem a regiões conservadas entre as proteínas com identidade de 100% e as caixas vazias apresentaram uma identidade de 50 a 90%. Adaptado de SANTOS, 2007.



Figura 10: Diferença no desenvolvimento do processo de infecção da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* selvagem e mutante. Teste in vivo realizado em folhas de citrus, utilizando a bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* selvagem e mutante (nocauteada), no qual podemos observar um maior crescimento da cepa selvagem em relação a mutante.

2- OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização de uma cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* através de ensaios de atividade enzimática, estabilidade, ensaios de inibição da atividade enzimática e ensaios de patogenicidade. Desta forma, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Refinamento dos testes de atividade enzimática em placa;
- Expressão heteróloga da cisteíno protease em *Pichia pastoris*;
- Purificação da proteína recombinante expressa em *Pichia pastoris*;
- Produção de anticorpos policlonais contra a proteína purificada e sua utilização na análise da expressão da proteína em *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 e mutante (nocauteada para o gene), cultivadas em meio normal e indutor de patogenicidade;
- Estudos cinéticos da cisteíno peptidase purificada;
- Ensaio de inibição da atividade da proteína por inibidores cistatinicos recombinantes de cana-de-açúcar CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4 e o inibidor sintético de cisteíno peptidases E-64;
- Ensaio de estabilidade da enzima em diferentes temperaturas e determinação de pH ótimo e concentração de NaCl;
- Estabelecimento da curva de crescimento em meio de cultura utilizando as linhagens *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 e mutante;

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Linhagens celulares

A cepa de *Escherichia coli* DH5a [F⁻, f 80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1] (NOVAGEN), foi utilizada para propagação dos vetores pET28a, pET28acyst e o pPICZaC.

A cepa de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) [F-ompT hsdSB (Rb- MB-) Gal dcm (DE3) pRARE6] com resistência ao antibiótico cloranfenicol, foi utilizada nos testes de atividade em placa.

A cepa Km71H de *Pichia pastoris* (Invitrogen) foi utilizada para expressão da cisteíno peptidase recombinante.

A linhagem celular *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 (gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo) foi isolada de plantas de laranja com sintomas do cancro cítrico e crescidas em meio caldo nutriente (0,5% peptona e 0,3% extrato de carne) a 28°C por 3 dias.

3.2- Ensaio em placa de atividade enzimática da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* expressa em *E. coli*

Para o ensaio de atividade proteolítica da enzima *HIS*CPXAC *in vivo*, foi utilizada a proteína do leite (caseína) como substrato para a enzima. Para isso, foram utilizadas células bacterianas de *E. coli* Rosetta (DE3) transformadas com os plasmídeos pET28a e pET28cyst contendo o gene da cisteíno peptidase (construção realizada por Santos, 2007).

Foram feitas quatro placas de LB ágar suplementado com 1% de leite desnatado e a estas placas foram adicionadas as culturas celulares (Tang *et al.*, 1987). A primeira placa continha células bacterianas Rosetta (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a, a segunda células Rosetta (DE3) transformadas com plasmídeo pET28cyst sem o indutor IPTG, a terceira placa continha as células Rosetta (DE3) transformadas com plasmídeo pET28cyst com adição do indutor IPTG (0,2 mM) e uma última placa continha células Rosetta (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28cyst com adição do indutor IPTG (0,2 mM) acrescido do inibidor de cisteíno peptidase E-64 para concentração final 30 µM. As placas foram mantidas a 37 °C por 24 horas para o crescimento das colônias. Neste ensaio a atividade proteolítica da enzima sobre a caseína foi detectada visualmente pela formação de um halo ao redor da colônia.

3.3- Amplificação da ORF 2853 da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri*

A ORF 2853 que codifica a cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* foi amplificada utilizando como molde o DNA genômico da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* e os oligonucleotídeos específicos *EcoRI*_F: 5'CGGAATTCCATGAACACGCACCGTTCGCTC3' e *XbaI*_R: 5'CTCTAGAGCGTACACCACGTCGGCGCCGAT3', os quais foram desenhados com base na seqüência depositada no GenBank (número de acesso: AE011926). O amplificado inclui todos os aminoácidos da proteína, inclusive aqueles do peptídeo sinal. Para esta reação foram utilizados 20 ng de DNA genômico, 1U *Taq* DNA polimerase (Fermentas), tampão para PCR 1x

(Tris-HCl 10 mM pH 8,5, KCl 50 mM), dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM e 20 pmoles de cada oligonucleotídeo. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) com uma temperatura inicial de 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 57 °C e 1 minuto a 72 °C, e extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto de amplificação obtido foi analisado em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (1 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

3.4- Construção do plasmídeo de expressão

O produto da PCR foi purificado utilizando o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e clivado com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* (Pharmacia), assim como o plasmídeo pPICZaC. Para isso foram realizadas reações de clivagem individuais com cada enzima devido à diferença de tampões, visto que para a enzima *EcoRI* foi usado o tampão H (Tris-HCl 500 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, dithiothreitol 10 mM, NaCl 1M) enquanto que para a enzima *Xba I* foi usado o tampão M (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, dithiothreitol 10 mM, NaCl 500 mM, 0,01% BSA). As reações foram incubadas por duas horas a 37 °C e analisadas em gel de agarose 1% para confirmação da clivagem. Os fragmentos correspondentes à ORF da cisteíno peptidase e o vetor pPICZaC foram recuperados do gel de agarose e purificados com o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega). Os produtos purificados foram ligados em um volume final de 10 µL contendo 20 ng de plasmídeo, 60 ng do inserto, 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima 1X, a 4°C por 16 horas.

O produto da ligação foi utilizado para transformação por choque térmico de células de *E. coli* DH5- α competentes com adição do antibiótico zeocina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em meio LB low salt agar pH= 7,5 (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl), permitindo a seleção do clone recombinante. Em seguida, os clones recombinantes foram seqüenciados pelo método dideoxi (SANGER, 1977) em seqüenciador automático MegaBaceTM1000 (GE Healthcare).

Uma vez selecionado o clone recombinante, o plasmídeo foi purificado pelo método de lise alcalina e clivado com a enzima *PmeI*, que permite a linearização do plasmídeo para posterior integração ao genoma da levedura.

Para a reação de clivagem com volume final de 100 μL foram utilizados 20 μg de DNA plasmidial, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, tampão de reação 1x (acetato de potássio 50 mM, tris-acetato 20 mM, acetato de magnésio 10 mM e dithiothreitol 1 mM) e 20 U de *PmeI*. A reação foi incubada por 2 horas a 37 °C com posterior análise em gel de agarose 1%. Após a clivagem foi realizada a precipitação do DNA plasmidial em etanol segundo SAMBROOK e RUSSEL (2001). O DNA plasmidial linearizado foi utilizado para transformar células de *Pichia pastoris* KM71H competentes por eletroporação (Bio-Rad GenePulser II) de acordo com o manual *EasySelectTM Pichia Expression Kit* e a seleção do clone recombinante foi feito em meio YPD contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do antibiótico zeocina com incubação por 30 °C de 3 a 10 dias.

3.5- Seleção dos clones recombinantes via PCR de colônia

Foi utilizada a técnica de “PCR de colônia” para verificar se o gene de interesse havia sido integrado ao genoma da levedura. Para isso, 15 colônias foram repicadas com auxílio de palitos estéreis em 15 tubos de 1,5 mL contendo 30 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,2%. Os tubos foram *vortexados* por 15 minutos permitindo a homogeneização do material com posterior incubação por 5 minutos a 90 °C e centrifugação por 30 segundos em velocidade máxima. Esse procedimento permite a ruptura da parede celular da levedura e liberação do DNA genômico. Deste material foi utilizado 1 µL do sobrenadante como molde para as 15 reações de amplificação em volume final de 25 µL. Para isso, foram utilizados 10 pmoles dos oligonucleotídeos mostrados na tabela 1, tampão da reação 1x , 1,25 U *Taq* DNA polimerase (Fermentas), dNTPs 0,2 mM , MgCl₂ 1.5 mM e 25 % de Triton X-100. Para a amplificação foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) com o programa: 94 °C por 6 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%.

AOX F: 5' GACTGGTTCCAATTGACAAG 3'

AOX R: 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

AOX F: 5' GACTGGTTCCAATTGACAAG 3'

*Xba*I _ R: 3'CTCTAGAGCGTACACCACGTCGGCGCCGAT 3'

*Eco*RI_ F: 5'CGGAATTCATGAACACGCACCGTTCGCTC 3'

AOX R: 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

Tabela 1: Combinação de oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR de colônia.

3.6- Expressão da cisteíno peptidase em *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* utiliza o metanol como fonte de carbono. Neste sistema a regulação da expressão é feita pela presença do promotor da enzima álcool oxidase (AOX) que é induzido pela presença de metanol, permitindo que o gene de interesse seja expresso.

O vetor pPICZaC utilizado permite a clonagem do gene de interesse em fase com uma seqüência nucleotídica que codifica o sinal de secreção (fator a), o qual fica na região N-terminal da proteína expressa, permitindo que a proteína de interesse seja secretada para o meio extracelular. Este vetor permite ainda que o gene de interesse esteja em fase com uma região que codifica seis histidinas na extremidade C-terminal, permitindo a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

A cepa de levedura utilizada para a expressão heteróloga da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* foi a KM71H. Esta linhagem celular apresenta um fenótipo Mut^S, tendo uma atividade baixa da enzima álcool oxidase codificada por um gene AOX 1 mutado, e que utiliza pouco metanol, tendo somente o gene AOX 2 selvagem. Assim a expressão do gene de interesse será regulada pelo metanol que irá controlar em níveis transcricionais a expressão do gene da enzima álcool oxidase e por consequência do gene de interesse.

O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar as células competentes de *Pichia pastoris* KM71H. Um clone foi crescido em 10 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, de fosfato de potássio 100 mM pH 6.0, YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} %, glicerol 1%) por 24 horas a 30 °C

com agitação de 250 rpm. Posteriormente a cultura foi utilizada para inocular 500 mL de meio BMGY, sendo mantida sob agitação constante de 250 rpm a 30 °C até que fosse atingida a densidade óptica em torno de 2 a 6 com comprimento de onda de 600 nm. A cultura foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente as células foram ressuspensas em 100 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} e metanol 0,5%) e mantidas a 30 °C, 250 rpm por 48 horas. A expressão do gene de interesse foi induzido com adição de metanol 100% a cada 24 horas para concentração final de 0,5% (v/v). Alíquotas foram retiradas da cultura a cada 24 horas, antes de nova adição de metanol, para posterior análise da expressão das proteínas em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970).

3.7- Purificação da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A cultura contendo células de levedura expressando a cisteíno peptidase, denominada a partir daqui por *HIS*CPXAC, foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos. O sobrenadante apresentando a proteína secretada *HIS*CPXAC foi filtrado em filtro de 0,45 µm (Millipore) e a cisteíno peptidase foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A *HIS*CPXAC foi expressa em fusão com seis histidinas (His-Tag) provenientes do vetor pPICZaC, as quais apresentam uma afinidade pelo níquel o que permitiu a purificação da proteína em um único passo. Para isso 100 mL de meio de cultura contendo a proteína expressa foi passado pela coluna contendo 3,5 mL de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), previamente equilibrada com 5 volumes (17,5 mL)

de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e NaH₂PO₄ 50 mM). Em seguida, a resina foi lavada com 3 volumes (10,5 mL) de tampão de lise e a proteína foi eluída da coluna com 2 volumes de tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). Sabe-se que o imidazol tem uma forte afinidade pelo níquel competindo com as histidinas pelo mesmo e isso permite que a proteína de fusão se desligue do metal promovendo a eluição da proteína recombinante. As proteínas purificadas foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

As frações contendo a proteína purificada foram dialisadas em membranas (Spectrum Laboratories) de 14.000 MW contra 1 litro de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e mantidas a 4 °C com troca do tampão a cada 60 minutos (total de três trocas). Posteriormente, as proteínas foram esterilizadas pela passagem da solução em filtro Millex[®] GV de 0,22 µm / 25 mm (Millipore). A concentração da *HIS*CPXAC foi determinada pelo método BCA (SMITH *et al.*, 1985) utilizando o Kit *BCA Protein Assay* (Pierce).

3.8- Produção de anticorpos policlonais anti-*HIS*CPXAC

A produção de anticorpos policlonais foi realizada utilizando a proteína purificada *HIS*CPXAC, de acordo com o procedimento padrão (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Cerca de 50 µg da proteína recombinante purificada foi inoculada em um camundongo juntamente com adjuvante completo de Freund (Sigma) que é responsável pela resposta imune primária por ser um composto formado por uma emulsão de óleo e água com bactérias (*Mycobacterium*) atenuadas, que são responsáveis por atrair os macrófagos para o local da

injeção e assim permite uma resposta localizada do antígeno por um período maior. Após 45 dias a mesma amostra de proteína foi inoculada agora com adjuvante incompleto de Freund (Sigma), sendo responsável pela resposta imune secundária e este não contém as bactérias atenuadas, sendo apenas composto por uma emulsão de óleo e água. Depois de 15 dias o camundongo imunizado foi sacrificado e o sangue foi coletado. Este foi centrifugado a 15700 x g por 5 minutos para a separação do soro, sendo utilizado posteriormente em ensaios de imunodeteção.

3.9- Ensaio de imunodeteção

Para a realização dos testes de imunodeteção, as amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de *Polyvinylidene difluoride* (PVDF- Termo Scientific) por *electroblotting* em tampão de transferência contendo Tri-HCl 200 mM, glicina 50 mM e 20% de metanol, por duas horas com 150 V e 150 mA. Após a transferência a membrana foi corada com solução de Ponceau (Ponceau 0,5% e ácido acético 0,1%) por 5 minutos permitindo a visualização das bandas. Em seguida a membrana foi incubada por 16 horas a 4 °C em solução de bloqueio contendo 5% leite desnatado diluído em TBS 1x (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0). Depois da incubação a membrana foi lavada 3 vezes de 5 minutos com TBS 1x sob agitação e incubada com o anticorpo anti-*HIS*CPXAC diluído 1:15.000 em TBS 1x por 90 minutos com suave agitação e em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada com TBS e incubada com anticorpo secundário Anti- Mouse IgG conjugado com fosfatase alcalina (Sigma

A-3562) diluído 1:10.000 em TBS 1x e mantida sob suave agitação em temperatura ambiente. Ao final a membrana foi lavada e as bandas referentes às proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas com o kit *NBT-BCIP substrate for Alkaline Phosphatase* (Pierce # 34042).

3.10- Ativação da cisteíno peptidase

Como foi observando que a enzima *HIS*CPXAC purificada encontrava-se na forma inativa, foi realizado um procedimento de ativação da enzima de acordo com a metodologia descrita por Brömme e colaboradores (2004) com algumas modificações. Para isso a enzima foi incubada em tampão acetato de sódio pH 4,5 contendo 5 mM de ditioneitol (DTT, ICN Biomedicals Inc., USA) a 37 °C por 30 minutos. Depois disso, a enzima foi mantida a temperatura ambiente por 6 horas e neste período alíquotas foram retiradas a cada 60 minutos para verificar a atividade da enzima pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-Leu-Arg-MCA que foi monitorada utilizando o espectrofluorímetro Hitachi F-2500.

3.11- Ensaio de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m)

Para detecção da atividade foi utilizado o procedimento descrito por Anastasi e colaboradores (1983). A concentração da cisteíno peptidase foi determinada pela titulação do sítio ativo com inibidor E-64, baseado no Barrett e Kirschke (1981).

Para o teste de eficiência catalítica da *HIS*CPXAC foi utilizada cubeta de quartzo de 1 mL, à qual foi adicionado 990 µL de tampão acetato de sódio 100

mM pH 5,5, 2,5 mM final do agente redutor DTT e a 20 μ M da enzima *HISCPXAC* com incubação por 3 minutos a 30 °C. A adição do DTT é necessária para que ocorra a redução dos resíduos de cisteína existentes no sítio ativo da enzima. Depois disso, foram adicionados, em reações separadas, os substratos fluorogênicos Z-Phe-Arg-MCA (0,16 μ M) e Z-Leu-Arg-MCA (0,047 μ M) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) e também os substratos AbzKVRSSKQ-EDDnp (0,1 μ M), AbzKLRSSKQ-EDDnp (0,88 μ M) e AbzKIRSSKQ-EDDnp (0,39 μ M), sintetizados pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto, da Unifesp. Estes substratos foram gentilmente cedidos pela professora Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona. As medidas de fluorescência foram detectadas e utilizadas para o cálculo de regressão não linear usando o programa GraFit (LEATHERBARROW, 1992).

A fluorescência detectada quando se utiliza substrato como o Z-Leu-Arg-MCA (figura 11A) é resultante da hidrólise do substrato que ao ser clivado libera a molécula MCA. Com a excitação desta molécula no comprimento de onda de 380 nm, esta emite uma fluorescência detectável pelo fluorímetro no comprimento de onda de 460 nm. Já os substratos do tipo AbzKLRSSKQ-EDDnp (figura 11B), apresentam um grupo fluorescente Abz e um grupo apagador EDDnp que impede que a fluorescência seja detectada enquanto o grupo apagador estiver ligado, porém quando em presença de uma enzima que hidrolisa o substrato este grupo é retirado e emite uma fluorescência que será detectada pelo fluorímetro. Este substrato tem um comprimento de onda de excitação de 320 nm e emite uma fluorescência no comprimento de onda de 420 nm. O aumento da fluorescência detectada equivale à velocidade da

reação. Para determinar a constante k_{cat}/K_m foi utilizada a condição de pseudo primeira ordem quando a $[S] < K_m$.

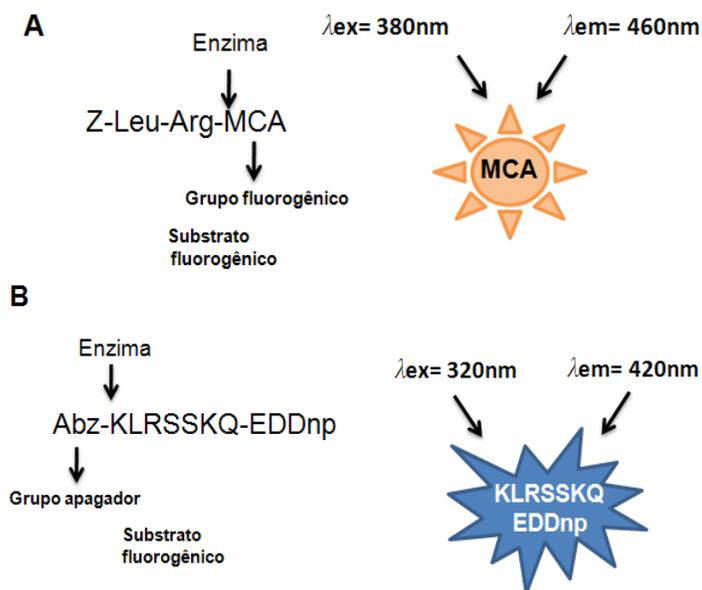


Figura 11: Esquema representativo da hidrólise dos substratos MCA e Abz. A- Hidrólise do substrato MCA com comprimento de onda de 380nm de excitação e 460nm de emissão. B- Hidrólise do substrato Abz com comprimento de onda de 320nm de excitação e 420nm de emissão.

3.12- Ensaios de inibição de atividade da cisteína peptidase

Para verificar a inibição da atividade da cisteína peptidase foi realizado um procedimento como descrito no item anterior, sendo adicionado à cubeta de quartzo 990 μL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,5), 2,5 mM de DTT e 0,17 mM da enzima com incubação a 30 °C por 5 minutos.

A atividade inibitória foi verificada pela determinação da atividade hidrolítica residual da cisteína peptidase, a partir da adição de inibidores de

cisteíno peptidases nas concentrações 0,02 μ M CaneCPI-1 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), 1,4 η M CaneCPI-2, 0,2 η M CaneCPI-3 (GIANOTTI *et al.*, 2006), 0,02 η M CaneCPI-4 (GIANOTTI *et al.*, 2008) e o 1,1 η M E-64. Em seguida, foi calculada a constante de inibição (K_i), determinada pela formula $V_0 / V_i - 1$, na qual V_0 é a velocidade de hidrólise em ausência de inibidor e V_i velocidade de hidrólise em presença de inibidor. Estes dados foram utilizados para a construção dos gráficos de inibição usando o programa GraFit (LEATHERBARROW, 1992).

3.13- Teste de pH ótimo e NaCl dependente

Para determinar as condições de pH ótimo da *HISCPXAC* foram utilizados os tampões acetato de sódio 100 mM (pH 3,0 - 5,5); fosfato de sódio (pH 6.0 - 7.0) e Tris- HCl (pH 7.5 – 8.0). Foi adicionado à cubeta de quartzo a enzima (0,70 mM), 2,5 mM de DTT e tampão, seguido de incubação por 3 minutos. Em seguida foi adicionado o substrato Z-Leu-Arg-MCA (0,05 μ M) e atividade da enzima foi detectada pelo fluorímetro Hitachi F-2500.

A dependência do NaCl para a atividade enzimática da *HISCPXAC* foi verificada utilizando concentrações crescentes de NaCl que variaram de 0 a 600 mM e a atividade da enzima foi detectada como descrito anteriormente.

3.14- Teste de temperatura ótima e estabilidade da enzima

A atividade enzimática *HISCPXAC* foi continuamente quantificada pelo fluorímetro Hitachi F-2500 ($\lambda_{ex}=380$ nm e $\lambda_{em}=460$ nm) utilizando o substrato fluorogênico Z-Leu-Arg-MCA. Para isso foi utilizado tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5, 2,5 mM de DTT e enzima na concentração final de 0,35 mM em volume final de 1 mL, em diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C).

O teste de estabilidade da foi realizado nas mesmas temperaturas, com prévia incubação da enzima por 60 minutos em cada temperatura. Em seguida a atividade enzimática foi detectada de acordo com a metodologia descrita por Nagamori e colaboradores (1990).

3.15- Sequenciamento do N-terminal da cisteíno peptidase

A proteína *HISCPXAC* foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE 15% em seguida, foi transferida para a membrana de PVDF por *eletroblotting*. Posteriormente a membrana foi corada com solução Ponceau (0,1 g Ponceau, 1% de ácido acético) por 1 minuto e lavada com água destilada por 3 minutos. Com a coloração da membrana foi possível visualizar e recortar a banda referente à proteína *HISCPXAC*. Em seguida, o fragmento de membrana contendo a proteína de interesse foi analisado no *Protein Sequencer (PPSQ-23A Shimadzu)* de acordo com o procedimento do fabricante. O seqüenciamento do N-terminal da proteína foi realizado pela professora Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, do Departamento de Fisiologia da UFSCar.

3.16- Detecção da presença da CPXAC em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cultivada em meio normal e indutor de patogenicidade

Foram utilizadas para o teste as cepas *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e a mutante que teve o gene que codifica a CPXAC nocauteado (linhagem desenvolvida por SANTOS, 2007).

Inicialmente as cepas bacterianas selvagem e mutante foram crescidas em 20 mL de meio caldo nutriente (CN - 0,5% peptona e 0,3% extrato de carne) a 28 °C por 16 horas até atingir a D.O. $_{600nm}$ = 0.8. A massa celular de cada cepa bacteriana foi coletada por centrifugação utilizando a centrífuga Eppendorf 5810 R com 4.000 x g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as células selvagem e mutante foram ressuspensas em meio XAM 1 ((NH₄)₂SO₄ 7.57 mM; KH₂PO₄ 33.06 mM; K₂HPO₄ 60.28 mM; citrato de sódio 1.7 mM; MgSO₄ 1M; casamino ácidos 0.03%; frutose 10 mM; sacarose 10 mM; BSA 1 mg/ml; pH 5.4) e em meio CN, respectivamente. As culturas foram mantidas a 28 °C por 16 horas até atingir a D.O. $_{600nm}$ = 1.0. As proteínas secretadas no meio extracelular foram coletadas por centrifugação na centrífuga Sorvall RC5C plus a 16.000 x g por 15 minutos a 4°C. A massa celular foi descartada e o meio de cultura foi filtrado utilizando o filtro de 0,45 µm (Millipore). Em seguida, as proteínas foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) em concentração final de 10%, mantendo a solução (proteínas e TCA) a 4 °C sob agitação por 30 minutos. Posteriormente a solução foi centrifugada a 10.000 g por 30 minutos (Sorvall RC5C plus). O sobrenadante foi descartado e as proteínas coletadas foram lavadas duas vezes com acetona 80% e depois de cada lavagem foram centrifugadas a 10.000 g x por 20 minutos. Ao final as

proteínas totais secretadas foram ressuspensas em tampão de corrida e analisadas em SDS-PAGE 15 %. (LAEMMLI, 1970). As proteínas obtidas foram utilizadas para a realização do ensaio de imunodeteção, utilizando o anticorpo anti-*HIS*CPXAC.

3.17- Curva de crescimento da linhagem *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 e mutante (nocauteado) em meio caldo nutriente e XAM1

A curva de crescimento foi realizada no Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) em colaboração com o Dr. José Belasque Junior. Inicialmente foram preparados os pré-inóculos das bactérias *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 selvagem e mutante nos meio caldo nutriente (CN) e XAM (meio indutor de patogenicidade), os quais foram incubadas a 28 °C por 72 horas. Em seguida, foi feito o inóculo com 100 µL da cultura saturada ($D.O_{600nm} = 1.0$) em 10 mL de meio caldo nutriente e XAM1.

Para verificar a quantidade de células presentes no meio foram realizadas coletas dos inóculos nos seguintes tempos de crescimento: 0, 2, 4, 6, 8, 14, 17, 18 e 21 horas. Foram realizadas diluições seriadas na ordem de 10^3 para cada hora de coleta. Em seguida, 50 µL da diluição foi plaqueado em meio ágar nutriente de forma espiral (exponencial), utilizando o inoculador Spiral Biotech Autoplate 4000 (Spiral Biotech), sendo realizadas três repetições para cada diluição, e as placas foram mantidas a 28 °C. Após 48 h procedeu-se a contagem do número de colônias de *Xanthomonas citri subsp. citri* selvagem e mutante utilizando um gabarito como ilustrado na figura 12.



Figura 12: Gabarito para contagem de colônias.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Ensaio em placa da atividade enzimática da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* expressa em *E.coli*

Com o objetivo de verificar a atividade proteolítica da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri*, denominada a partir daqui por *HISCPXAC*, foram utilizadas colônias de bactérias *E.coli* Rosetta (DE3) contendo o plasmídeo pET28acyst para a expressão da proteína de interesse. O plasmídeo pET28acyst foi construído por SANTOS (2007), o qual realizou alguns experimentos similares em seu trabalho de mestrado. No entanto, naquela ocasião não foram analisados os efeitos da indução por IPTG e nem do inibidor de cisteíno peptidase E-64. O estudante verificou ainda que a enzima é secretada pela *E.coli*, ou seja, que o peptídeo sinal de Xac funcionou como tal nesta bactéria, e que a proteína secretada era capaz de hidrolizar a caseína. Por este motivo, resolvemos refinar as análises, incluindo outras variáveis. É importante ressaltar que não foi possível produzir a proteína de

forma recombinante em *E.coli*, visto que quando expressa em bactérias a maior parte se encontrava na forma insolúvel.

Com este experimento foi possível verificar que na placa contendo apenas o plasmídeo pET28a não houve a formação de halo, ou seja, não ocorreu atividade peptidásica contra caseína, como esperado. Na placa contendo a construção pET28cyst sem a adição do indutor IPTG, também não houve formação de halo, indicando que quando não há expressão da proteína não ocorre hidrólise de caseína no meio. Já com a adição do indutor IPTG à placa contendo o plasmídeo pET28cyst, houve a formação de halo, indicando a expressão da *HIS*CPXAC e que, pelo menos parte dela, está ativa. Por outro lado, estes resultados confirmam aqueles obtidos por SANTOS, 2007.

Também foi possível observar que houve secreção da proteína *HIS*CPXAC para o meio extracelular (figura 13.1, 13.2 e 13.3). Isso ocorreu devido à presença do peptídeo sinal de Xac que estaria funcionando como tal em células de *E.coli*. Vale também ressaltar que a ausência do peptídeo sinal prejudica o enovelamento da proteína, deixando-a inativa como observado por SANTOS, 2007.

Para verificar se a proteína responsável pela formação do halo tratava-se de uma cisteíno protease, o inibidor de cisteíno protease E-64 foi adicionado às placas contendo as células de *E.coli* Rosetta (DE3). Nesta placa foi possível observar que não houve a formação do halo, devido à ação inibitória do E-64 sobre a *HIS*CPXAC, isso mostra a especificidade da enzima frente ao inibidor (figura 13.4).

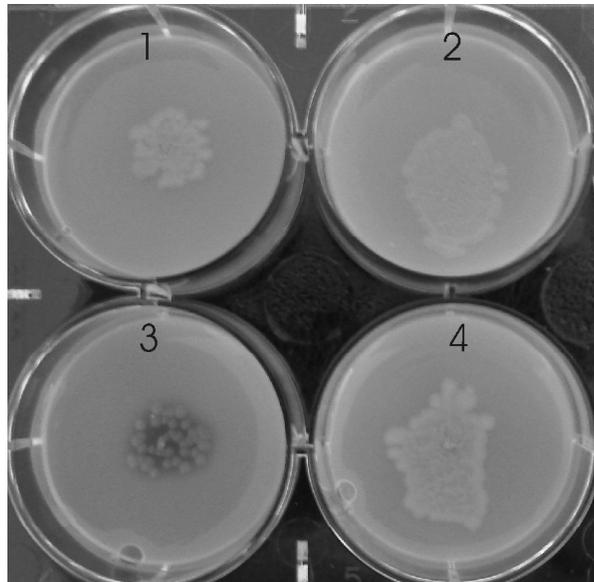


Figura 13: Ensaio de atividade enzimática da *HISCPXAC* contra a caseína. 1- *E.coli* (Rosetta DE3) transformada com o plasmídeo pET28a (controle) em meio de cultura contendo caseína e IPTG; 2- *E.coli* (Rosetta DE3) transformada com pET28cyst em meio de cultura contendo caseína sem adição de IPTG; 3- *E.coli* (Rosetta DE3) transformada com pET28cyst em meio de cultura contendo caseína e IPTG; 4- *E.coli* (Rosetta DE3) transformada com pET28cyst em meio de cultura contendo caseína, IPTG e E-64 (30 μ M). Notar em 4 que a presença do E-64 impede a formação do halo.

Para verificar a concentração ideal de inibidor de cisteíno peptidase E-64 para inibir a formação do halo, foram adicionadas concentrações crescentes deste inibidor (5, 10, 15, 20 25 e 30 μ M) às placas nas quais foram inoculadas células de *E.coli* transformadas com o pET28cyst, como mostrado na figura 14. Foi possível observar que nas placas contendo baixas concentrações de E-64 houve formação de halo (placas 1 a 4), portanto ocorreu a produção da *HISCPXAC*, secreção no meio e hidrólise de caseína. Nas placas 5 e 6 que continham altas concentrações de E-64 no meio não houve a formação de halo, confirmando que a atividade enzimática da enzima foi bloqueada pelo inibidor E-64. Além disso, é possível observar que nas placas 5 e 6 houve maior crescimento celular, enquanto que nas placas de 1 a 4 o crescimento celular foi menor devido a presença da enzima ativa que pode, ser tóxica para

a célula. Desta forma, com a realização destes experimentos, confirmamos os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório e mostramos que a enzima produzida em *E.coli* deve ser mesmo uma cisteíno peptidase. No entanto, eram necessários experimentos de atividade com a enzima pura, e como a proteína expressa em *E.coli* apresentava a formação de corpos de inclusão, os quais afetavam a solubilidade da enzima e conseqüentemente sua purificação, escolhemos outro sistema de expressão.

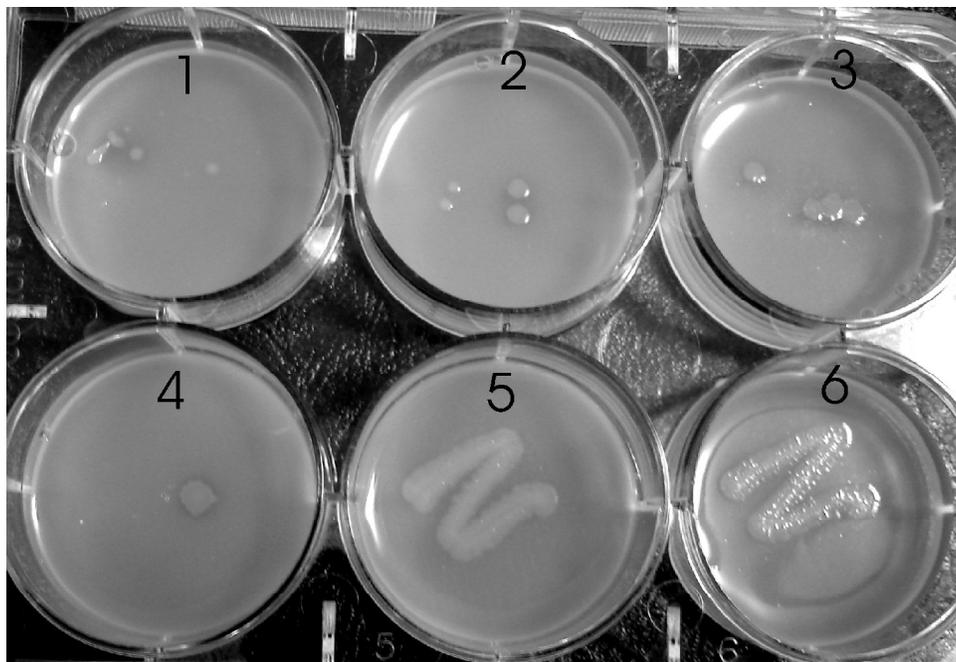


Figura 14: Ensaio de atividade enzimática da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* em presença de E-64. 1. pET28Cyst (Rosetta DE3) em meio de cultura contendo caseína, IPTG e E-64. 1: (5 μ M), 2: (10 μ M), 3: (15 μ M), 4: (20 μ M), 5 (25 μ M) e 6: (30 μ M).

4.2- Construção de plasmídeo para expressão da CPXAC em *Pichia pastoris*

Com base nos estudos iniciais realizados com esta proteína, foi observada uma solubilidade baixa e alta toxicidade da cisteíno peptidase para

células bacterianas *E. coli* Rosetta (DE3). Assim, foi proposto neste trabalho uma mudança no sistema de expressão da proteína que inicialmente foi testada em *E. coli* para ser produzida agora em *Pichia pastoris*. Com a mudança do sistema de expressão esperava-se a obtenção da proteína em sua forma solúvel, o que possibilitaria a purificação e conseqüentemente sua utilização nos ensaios de caracterização de atividade enzimática.

Com o objetivo de realizar uma nova estratégia de clonagem utilizando o sistema de expressão de levedura, foi possível a obtenção da ORF da cisteíno peptidase através da amplificação do DNA genômica. A análise em gel de agarose do produto amplificado mostrou um fragmento de 813 pares de base, que corresponde a ORF completa da cisteíno peptidase (figura 15).

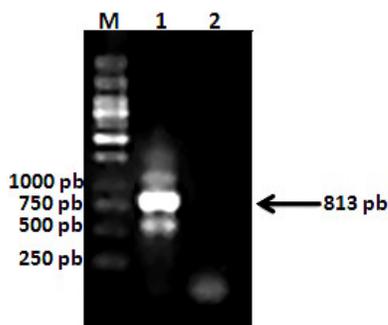


Figura 15: Amplificação da ORF2853 da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A ORF da cisteíno peptidase foi amplificada a partir do DNA genômico da bactéria com a utilização de primers desenhados com base no banco de dados (GenBank). M- Marcador de peso molecular; 1- Produto amplificado; 2- Controle negativo.

A partir da ORF2853 amplificada foi possível a construção do vetor de expressão em *Pichia pastoris*, sendo esta etapa realizada com sucesso. Podemos observar na figura 16, um modelo esquemático da construção do plasmídeos pPICZaC e a sequência obtida no sequenciamento.

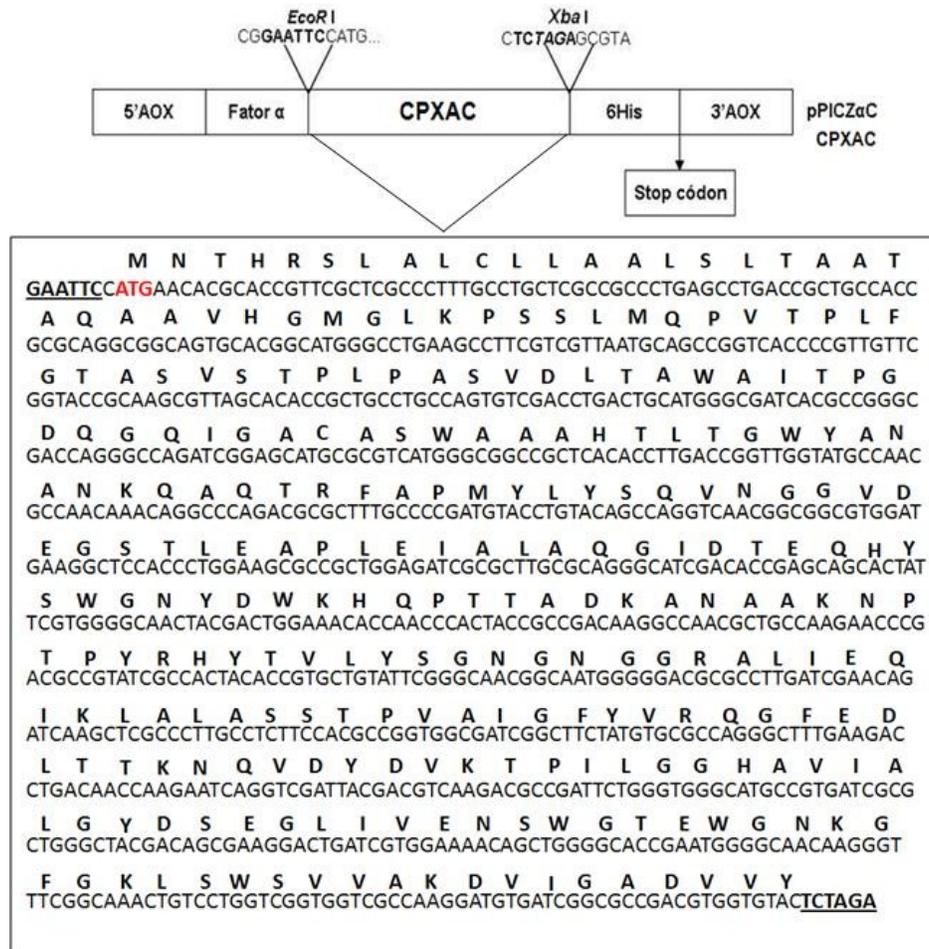


Figura 16: Esquema representativo do vetor pPICZαC_CPXAC e a sequência da ORF2853. 5'AOX - extremidade 5' do gene AOX e região de recombinação; Fator α - fator de secreção; 6His - “cauda” de 6 histidinas; 3'AOX -extremidade 3' do gene AOX. Na sequência do gene CPXAC estão representados os sítios de restrição para cada enzima, utilizadas tanto no vetor de expressão quanto na amplificação da ORF 2853.

A ORF 2853 clonada no plasmídeo pPICZαC, o qual apresenta uma região correspondente ao peptídeo sinal e também uma cauda de seis histidina, resulta em uma proteína com massa molecular de aproximadamente 31 kDa.

4.3- Seleção dos clones recombinantes de *Pichia pastoris*

Para a seleção dos clones recombinantes utilizamos a técnica de PCR de colônia. Para tanto, foram realizadas amplificações utilizando três combinações diferentes de oligonucleotídeos já descritas anteriormente. Assim, observamos na figura 17A a ocorrência de amplificação positiva em quatro clones (1, 2, 14 e 15) com fragmento de aproximadamente 1300 pb. Na figura 17B observamos a amplificação positiva em três clones (1, 2, 6) com fragmento de aproximadamente 1000 pb e em 17C todos os clones apresentaram amplificação positiva com aproximadamente 982 pb, sendo um indicativo de que o gene da cisteíno peptidase integrou no genoma da *Pichia pastoris* de forma correta. Em 17D, observamos a amplificação de um fragmento de aproximadamente 593 pb. Esta reação de amplificação foi feita a partir do vetor pPICZaC sem o gene da cisteíno peptidase utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene AOX (controle negativo). Com base nestes resultados de amplificação, conseguimos cinco clones recombinantes.

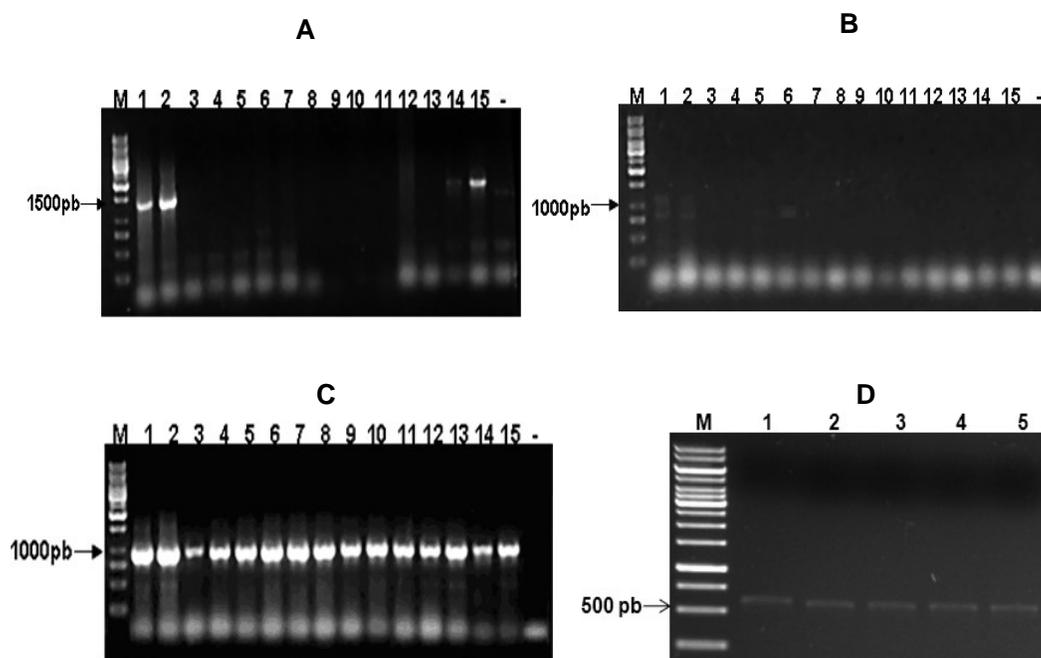


Figura 17: Seleção dos recombinantes em *Pichia pastoris* por PCR de colônia com diferentes combinações de oligonucleotídeos. A - Produto de amplificação a partir do pPICZaC_CPXAC com os oligonucleotídeos foward e reverse do gene AOX; B- Produto de amplificação a partir do pPICZaC_CPXAC com oligonucleotídeo foward do gene AOX e reverse do gene CPXAC; C- Produto de amplificação a partir do pPICZaC_CPXAC com os oligonucleotídeo foward do gene CPXAC e reverse do gene AOX; D- Produto de amplificação a partir do pPICZaC sem o gene CPXAC utilizando os oligonucleotídeos foward e reverse do gene AOX; (controle negativo).

4.4- Expressão recombinante em *Pichia pastoris* e posterior purificação da *HIS*CPXAC

A proteína recombinante, denominada *HIS*CPXAC, foi expressa após 48 horas de indução em *Pichia pastoris* linhagem celular KM71H. A secreção da *HIS*CPXAC para o ambiente extracelular foi realizado devido a presença do fator de secreção (fator a) presente no plasmídeo pPICZaC. Através das análises em SDS-PAGE 15%, verificou-se a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 31 kDa que corresponde a proteína *HIS*CPXAC com peptídeo sinal e em fusão com as seis histidinas (figura 18A). Ainda podemos observar o perfil da expressão, o qual demonstra que a proteína com 48 horas de indução apresentou uma expressão semelhante à de 72 horas, o

que permitiu a finalização do ensaio de expressão com apenas 48 horas de indução da proteína *HIS*CPXAC.

Para a purificação da enzima foi utilizado o meio de cultura contendo a proteína recombinante secretada na forma solúvel. A partir disso foi realizada a cromatografia de afinidade em coluna de níquel, devido à presença de uma cauda de seis histidinas fusionada a enzima permitindo sua purificação. A proteína foi eluída da coluna em tampão de lise com imidazol, a partir da fração contendo 75 mM de imidazol. De acordo com as análises em SDS-PAGE 15% o sistema de purificação se mostrou eficiente, devido à presença de uma única banda de aproximadamente 31,2 kDa que corresponde a *HIS*CPXAC (figura 18B).

O rendimento da proteína *HIS*CPXAC purificada foi cerca de 10 mg por litro de cultura. Em geral, o rendimento de proteínas produzidas em *Pichia pastoris* é maior quando comparado com outros sistemas de expressão, dependendo, no entanto, da proteína. Alguns estudos relatam um rendimento de proteínas produzidas em *Pichia pastoris* com cerca de 60 mg por litro de cultura, enquanto outros relatam 12 mg por litro (AOKI *et al.*, 2003; PHILIP *et al.*, 2007). O rendimento da *HIS*CPXAC obtida de forma pura através deste sistema foi considerável, visto que a quantidade de proteína produzida foi suficiente para a realização de todos os experimentos de caracterização da enzima. Além disso, o rendimento é suficiente para produzir proteína o bastante para realização de estudos estruturais, o que é intenção do laboratório.

4.5- Imunodeteccão da CPXAC

Foi observado através das análises de imunodeteccão, que o anticorpo policlonal de camundongo contra a proteína recombinante *HIS*CPXAC foi capaz de reconhecer a proteína recombinante produzida em *Pichia pastoris* e secretada em meio extracelular e como também a proteína purificada por cromatografia de afinidade (figura 18C). Assim, foi verificada a especificidade do anti-*HIS*CPXAC pela proteína recombinante, visto que, o anticorpo policlonal não apresentou nenhum tipo de reação cruzada. Por outro lado, foram também produzidos anticorpos utilizando proteína insolúvel produzida em *E.coli*, que também foi capaz de reconhecer a proteína expressa em *Pichia pastoris*, confirmando a natureza da proteína expressa em *Pichia* (dados não mostrados). A opção por produzir mais anticorpos utilizando a proteína expressa em *P. pastoris* foi devido ao baixo título obtido para o primeiro anticorpo produzido a partir da proteína expressa em *E.coli*.

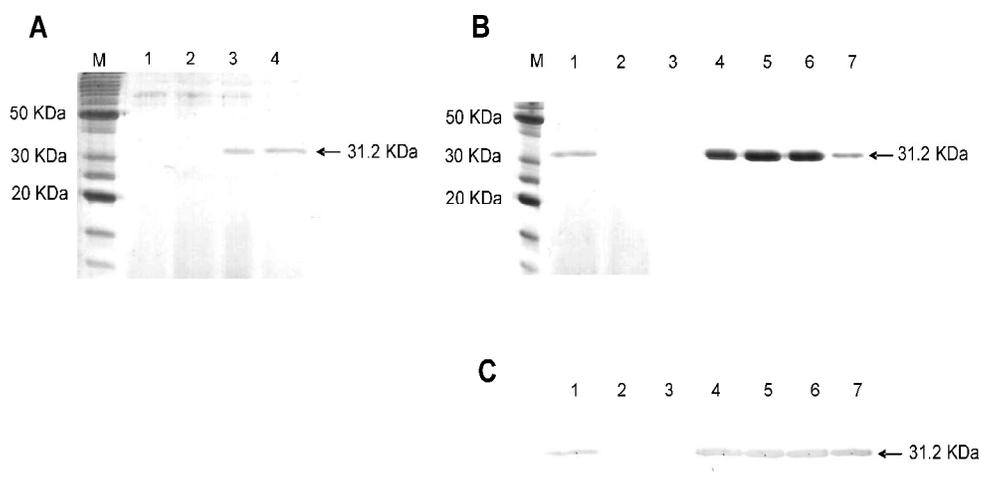


Figura 18: Análises de expressão da *HIS*CPXAC em *Pichia pastoris*, purificação e ensaio de imunodeteção. (A) SDS-PAGE 15% corado com Coomassie blue, mostrando a indução da *HIS*CPXAC suplementada com metanol 0,5%. M-marcador de peso molecular; 1- sobrenadante 0 hora de indução; 2- sobrenadante 24 horas de indução; 3- sobrenadante 48 horas de indução; 4- sobrenadante 72 horas de indução. (B) SDS-PAGE 15% corado com Coomassie blue mostrando a indução e subsequente purificação da Xanina por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. M-marcador de peso molecular; 1- sobrenadante 48 horas de indução; 2- eluato; 3- eluato 1; 4- eluição da proteína em 75 mM imidazol; 5- eluição da proteína em 100 mM imidazol; 6- eluição da proteína em 100 mM imidazol; 7- eluição da proteína em 250 mM imidazole. (C) Ensaio de imunodeteção realizado com as mesmas amostras descritas acima.

4.6- Ativação da proteína *HIS*CPXAC

Testes preliminares de atividade mostraram que a enzima recombinante encontrava-se na forma inativa. Assim, foi necessária a ativação da enzima recombinante para remover a provável proregião da enzima.

A *HIS*CPXAC foi ativada autocataliticamente em presença de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 com adição de 5 mM de DTT (agente redutor). Foi observado que em condições ácidas a enzima *HIS*CPXAC é ativada e mostra-se capaz de hidrolizar o substrato Z-Leu-Arg-MCA. Uma vez ativada a proteína madura pode processar outras moléculas precursoras, ocorrendo uma reação em cadeia que permite a remoção da proregião da proteína não madura (VERNET *et al.*, 1991).

4.7- Seqüenciamento da região N-terminal da cisteíno peptidase CPXAC expressa em *Pichia pastoris*

Com o objetivo de se determinar a seqüência N-terminal da proteína expressa em *Pichia pastoris*, confirmando a natureza da proteína, e seu N-terminal após a secreção, foi realizado o seqüenciamento de sua região N-terminal. Este experimento mostrou que a *HIS*CPXAC apresenta a região inicial AVHGM, tendo como base a seqüência de resíduos de aminoácidos codificada pela ORF. Essa seqüência tem início no 25º resíduo de aminoácido. De acordo com a predição do programa SignalP 3.0 (BARRETT et al., 1998) o provável peptídeo sinal, tem início no primeiro aminoácido e termina no resíduo 24 (MNTHRSLALCLLAALSLTAATAQA).

A presença do peptídeo sinal na região amino terminal é uma característica intrínseca das proteínas pertencentes ao sistema de secreção tipo II (SANDKVIST, 2001). Este sistema é comum em bactérias gram-negativas e o processo de secreção ocorre em dois passos. Inicialmente a maquinaria de secreção transloca a proteína através da membrana interna, através da enzima translocase, para o periplasma. Em seguida, a proteína é transportada pela membrana externa pelo sistema de secreção tipo II (PRESTON et al., 2005; VAN SLUYS et al., 2002; BRUNNINGS e GABRIEL, 2001). Foi observado que os genes *hrpX* e *hrpG* regulam a expressão de proteínas envolvidas na patogenicidade e pode regular a secreção de proteínas do sistema tipo III e algumas do tipo II (FURUTANI et al., 2004; YAMAZAKI et al., 2008).

Em trabalho recente, Yamazaki e colaboradores (2008) relataram a presença de uma cisteíno peptidase extracelular secretada pela bactéria

Xanthomonas axonopodis pv. citri (cepa NA-1) em meio indutor do gene *hrp*. A região N-terminal desta peptidase secretada apresentou a seqüência AVHGMGLKPSSLMQPV que se mostrou idêntica à região inicial da proteína madura CPXAC, e também identificada em nosso trabalho. Portanto a presença do peptídeo sinal na CPXAC sugere que ela seja secretada pelo sistema de secreção tipo II e que pode ser regulada pelos genes *hrpX* e *hrpG*. Por outro lado, esperava-se que a proteína expressa em *Pichia pastoris* utilizasse o α -peptídeo como sinal, gerando uma seqüência N-terminal com a presença do peptídeo sinal da CPXAC. No entanto, os resultados mostraram que a clivagem ocorreu no peptídeo sinal da própria CPXAC, indicando que o peptídeo sinal desta enzima funcionou como tal em *Pichia pastoris*. Para responder definitivamente esta questão seria necessário expressar a proteína completa, sem fusão com o α -peptídeo.

4.8- Ensaio de eficiência catalítica da *HIS*CPXAC

A eficiência catalítica (k_{cat}/k_m) da cisteíno peptidase *HIS*CPXAC foi determinada utilizando os substratos fluorogênicos AbzKLRSSKQ-EDDnp, AbzKVRSSKQ-EDDnp, AbzKIRSSKQ-EDDnp, Z-Leu-Arg-MCA e Z-Phe-Arg-MCA.

De acordo com a tabela 2, podemos observar que a enzima *HIS*CPXAC, apresentou um maior valor de k_{cat}/K_m para o substrato AbzKIRSSKQ-EDDnp de $5,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este substrato possui um resíduo de isoleucina na posição P₂, isso nos leva a sugerir que ela possa ser uma enzima do tipo papaína. Os outros substratos do tipo Abz apresentaram um valor de k_{cat}/k_m menor e tem

um resíduo de valina e leucina na mesma posição da isoleucina. Já os substratos do tipo MCA o único que apresentou hidrólise foi substrato que tem uma leucina na posição P₂, enquanto que o substrato com fenilalanina na mesma posição se mostrou resistente. Isto é um indicativo de que a enzima tem uma preferência por resíduos hidrofóbicos de cadeia lateral ramificada (alifáticos) na posição P₂, que demonstra uma especificidade do substrato por interações P₂ e S₂, sugerindo que a enzima pode pertencer à família da papaína (TURK *et al.*, 1998; HASNAIN *et al.*, 1993).

SUBSTRATO	k_{cat}/k_m ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
AbzKLRSSKQ-EDDnp	1,2
AbzKVRSSKQ-EDDnp	1,9
AbzKIRSSKQ-EDDnp	5,1
Z-LR-MCA	0,0046
Z-FR-MCA	Resistente

Tabela 2: Eficiência catalítica da enzima *HIS*CPXAC com os substratos Abz e MCA.

Como observado o substrato Z-Phe-Arg-MCA não foi hidrolisado pela *HIS*CPXAC, devido à presença de um resíduo de aminoácido hidrofóbico aromático na posição P₂, que determina um a resistência pela enzima *HIS*CPXAC na hidrólise deste substrato. Embora a maioria das cisteíno peptidases lisossomais, aceitem resíduos hidrofóbicos aromáticos e alifáticos na posição P₂ (BÜHLING *et al.*, 2004), a enzima *HIS*CPXAC tem um

comportamento diferente, e parece aceitar somente resíduos hidrofóbicos de cadeia lateral ramificada (alifáticos) na posição P₂ como é o caso da isoleucina, leucina e valina. Esta preferência da enzima por substratos com resíduos hidrofóbicos alifáticos com cadeia lateral ramificada é uma característica específica, que sugere uma interação restrita entre o sítio ativo da *HIS*CPXAC com este tipo de resíduos de aminoácidos presentes no substrato (figura 19). Estudos mais detalhados com relação à especificidade do substrato são necessários para caracterizar de forma completa a especificidade da enzima *HIS*CPXAC por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral ramificada.

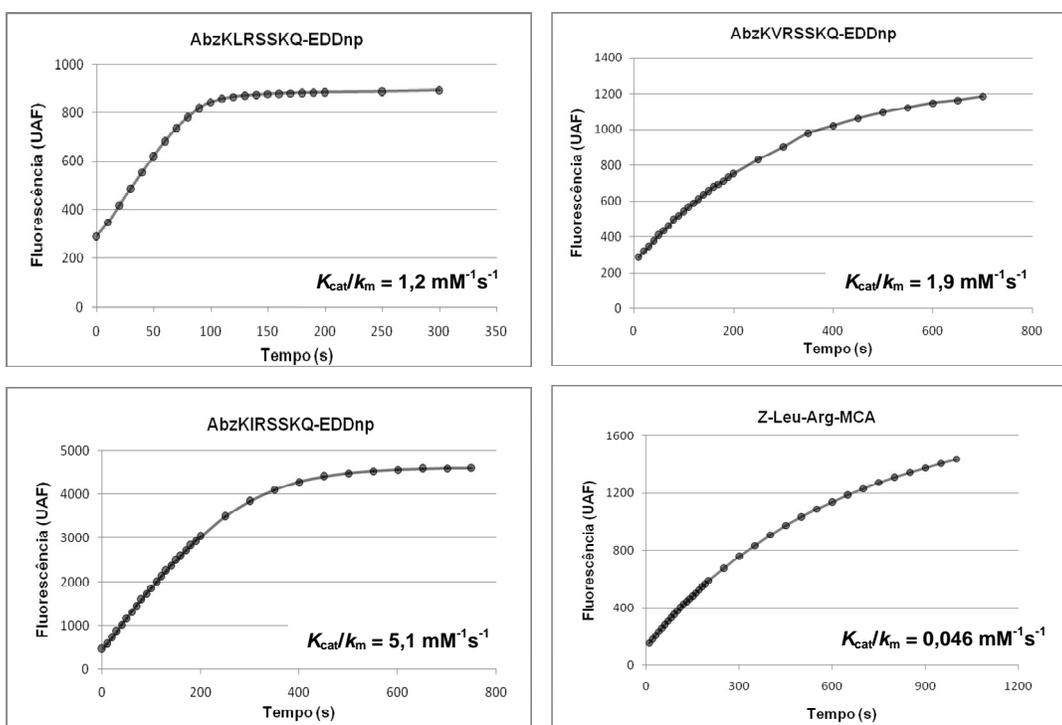


Figura 19: Gráficos de eficiência catalítica (k_{cat}/k_m) da *HIS*CPXAC contra alguns substratos fluorogênicos. A eficiência catalítica da enzima *HIS*CPXAC foi calculada a partir da hidrólise dos substratos (UAF) pelo tempo (segundos).

4.9- Ensaio de inibição da atividade por inibidores cistatínicos e E-64

Os objetivos destes ensaios eram confirmar a natureza da enzima como sendo uma cisteína protease (e algumas de suas características) e também identificar, entre os inibidores que nosso laboratório possui, quais poderiam ser eleitos para o desenvolvimento de possíveis plantas transgênicas mais resistentes à *Xanthomonas citri subsp. citri*. Para os ensaios de inibição de atividade da enzima *HIS*CPXAC foram utilizados os inibidores cistatínicos recombinantes da cana-de-açúcar, CaneCPI-1 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), CaneCPI-2, CaneCPI-3 (GIANOTTI *et al.*, 2006), Cane-CPI-4 (GIANOTTI *et al.*, 2008) e o inibidor sintético E-64 ([trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano]).

Os resultados da inibição estão representados graficamente na figura 20. Estes dados mostram que as quatro cistatinas recombinantes testadas foram capazes de inibir a atividade da cisteína peptidase com as constantes de inibição (K_i) relatadas na tabela 3. A constante de inibição é definida como a concentração de inibidor necessária para diminuir em 50% a hidrólise do substrato pela enzima.

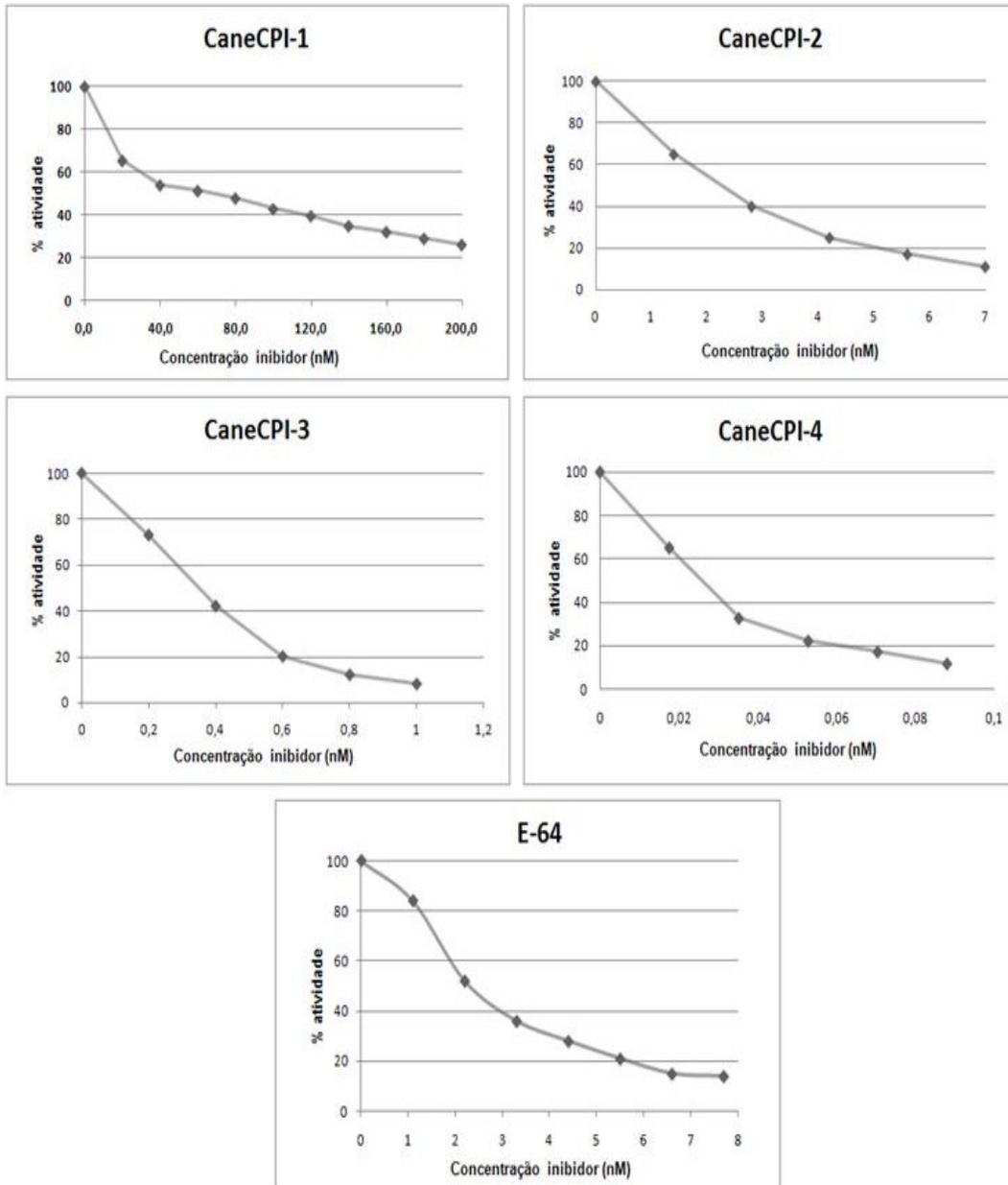


Figura 20: Gráficos de inibição da *HIS*-CPXAC utilizando inibidores de cisteíno peptidase CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4 e E-64. A atividade residual da enzima *HIS*-CPXAC foi detectada pelo fluorímetro F 2500 Hitachi utilizando o substrato fluorogênico Z-Leu-Arg-MCA.

<i>Inibidores</i>	<i>K_i (nM)</i>
CaneCPI-1	84.64
CaneCPI-2	0.088
CaneCPI-3	0.10
CaneCPI-4	0.012
E-64	1.214

Tabela 3: Inibição da atividade da *HIS*CPXAC por diferentes inibidores de cisteíno peptidase.

De acordo com os valores de *K_i* apresentados na tabela 3, observamos que todas as cistatinas inibem eficientemente a CPXAC, confirmando ser ela uma cisteíno protease. A melhor inibição foi obtida com a CaneCPI-4 (*K_i*= 0,012 nM) e o menos eficiente, foi a CaneCPI-1. Com exceção da CaneCPI-1, todas as outras cistatinas foram melhores inibidores que o inibidor clássico E-64.

A caracterização da cisteíno peptidase de *Xanthomonas citri subsp. citri* pode ser usada em estudos futuros para entender a interação entre a planta e o patógeno, em busca de um inibidor específico e também no desenvolvimento de citrus transgênicos mais resistentes a essa bactéria.

4.10- Ensaio de pH e NaCl ótimo

Para determinar o valor de pH ótimo para a atividade enzimática foi utilizado o substrato fluorogênico Z-Leu-Arg-MCA. De acordo com o gráfico da figura 21A, o melhor valor de pH para a enzima *HIS*CPXAC foi de 5,5 no qual

apresentou 100% de atividade. Em valores de pH 4,5 e 6,5 a enzima apresentou de 60% de atividade, demonstrando uma diminuição da atividade da enzima. É observado que no intervalo entre 4,5 a 6,0 as cisteíno peptidases geralmente são mais ativas, sendo que elas podem ser completa ou parcialmente inativadas em pH 7,0 (CORDOVA *et al.*, 2001). Desta forma, a CPXAC possui um comportamento típico de cisteíno proteases.

Para verificar a dependência de NaCl para a atividade da enzima *HIS*CPXAC, o ensaio enzimático foi realizado nas mesmas condições descritas acima. Este ensaio tem como objetivo determinar as melhores condições experimentais para o estudo desta enzima. No gráfico da figura 21B foi possível observar que a atividade da enzima foi de 100% em ausência de NaCl. Em 100 mM de NaCl a atividade da enzima foi de 70% e em presença de 600 mM do sal a enzima apresentou somente 10% de atividade. Baseado na curva de NaCl podemos concluir que a presença deste sal promove uma influência negativa na atividade catalítica da enzima. Desta forma, em ensaios futuros, devemos considerar a utilização apenas do tampão acetato.

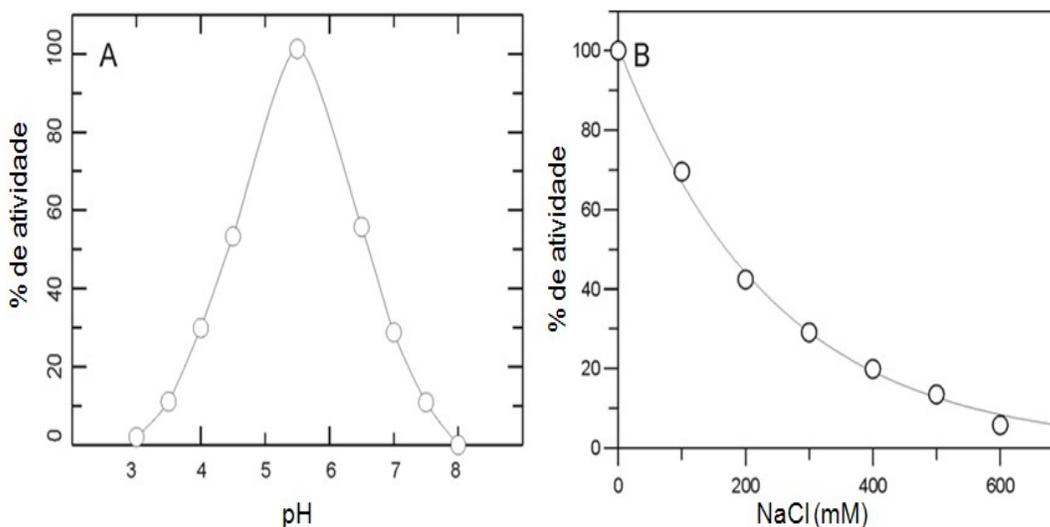


Figura 21: Perfil da atividade enzimática com variações de pH e diferentes concentrações de NaCl. O teste foi realizado com a hidrólise do substrato Z-Leu-Arg-MCA pela *HIS*CPXAC. (A) A atividade da enzima foi quantificada utilizando diferentes tampões: acetato de sódio 100 mM (pH 3.0 - 5.5); fosfato de sódio (pH 6.0- 7.0) e Tris-HCl (pH 7.5 - 8.0). (B) A atividade enzimática foi detectada em crescentes concentrações de NaCl (0 to 600 mM).

4.11- Temperatura ótima e de estabilidade

Este experimento teve como objetivo determinar qual a melhor temperatura para a atividade da enzima *HIS*CPXAC e também verificar se essa enzima pode se manter estável ao ser incubada por um período maior nesta mesma temperatura. A atividade enzimática da *HIS*CPXAC foi determinada em várias temperaturas variando entre 10 a 40 °C, com e sem períodos de incubação. Após 60 minutos de incubação foi possível observar melhor atividade da enzima na temperatura de 20 °C. Já nos testes realizados sem a incubação da enzima, observamos uma melhor atividade na temperatura de 30 °C. Pode-se verificar que a enzima *HIS*CPXAC é bastante ativa a temperatura de 30 °C, porém sua atividade diminui quando mantida nesta temperatura por um período de uma hora. Já em temperaturas abaixo ou acima de 30 °C, a

atividade é menor. Por outro lado, quando a enzima é mantida por uma hora a temperatura de 20 °C ela se mantém estável durante todo o período de incubação mantendo sua atividade máxima (figura 22). Da mesma forma, incubações seguidas de medidas de atividade em temperaturas acima ou abaixo desta provocam uma diminuição da atividade. Assim, podemos concluir que as melhores condições são a 30 °C sem incubação ou a 20 °C com incubação na mesma temperatura, sendo a enzima mais estável nesta última.

Estudos têm mostrado que a temperatura ótima para o desenvolvimento do cancro cítrico é entre 25 a 35 °C com rápida proliferação e 100% de incidência (DALLA PRIA *et al.*, 2006). A *HIS*CPXAC apresentou uma melhor atividade a 30 °C, justamente na temperatura que favorece o aparecimento de infecção na planta pela bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*. Ou seja, a atividade da enzima pode estar relacionada com o sucesso da infecção e proliferação.

Por outro lado a enzima apresentou uma melhor estabilidade a 20 °C. De acordo com estudos de *Xanthomonas citri subsp. citri* em condições subtropicais, as células bacterianas são mantidas viáveis por longos períodos ao redor da lesão (forma latente) a temperaturas em torno de 20 °C (GRAHAM *et al.*, 2004; PRUVOST *et al.*, 2002). Foi verificado também que em baixas temperaturas a bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* tem a infecção afetada de forma negativa, bem como o desenvolvimento do cancro cítrico, o que explica a pouca atividade da enzima *HIS*CPXAC na temperatura de 10 °C (DALLA PRIA *et al.*, 2006; PRUVOST *et al.*, 2002). Estas informações condizem com os dados de atividade obtidos com a *HIS*CPXAC, sob diferentes condições de temperatura e tempos de incubações.

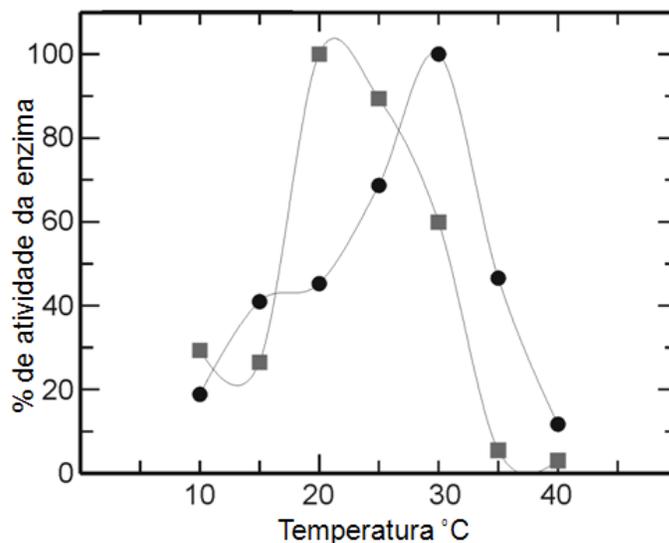


Figura 22: Ensaio de temperatura ótima e estabilidade da enzima *HIS*CPXAC. Para os testes temperatura e estabilidade foi usado o substrato fluorogênico Z-Leu-Arg-MCA e tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.5 com 2.5 mM DTT. O ensaio foi realizado em diferentes temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40° C. O gráfico mostra a curva de temperatura ótima sem incubação da enzima (●) e a curva de estabilidade com incubação da enzima por 60 minutos nas mesmas temperaturas (◻).

4.12- Curva de crescimento da linhagem *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 e mutante nocauteada em meio caldo nutriente e XAM1

Os objetivos deste experimento foram verificar se há alteração do crescimento da *Xanthomonas citri subsp. citri* mutante, causada pelo nocaute do gene da CPXAC, e também verificar se há diferença de crescimento nos dois meios de cultivo utilizados. Com a realização da curva de crescimento “*in vitro*”, foi possível observar que as bactérias *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 selvagem e mutante crescidas nos meios caldo nutriente e XAM1 apresentaram o mesmo crescimento e que o meio XAM1 não apresentou influência no crescimento bacteriano (Figura 23 e tabela 4). Desta forma, podemos

sugerir que a enzima não deve desempenhar papel importante no crescimento da bactéria, mas deve provavelmente, ser importante para o processo de infecção e/ou virulência. Estes resultados são essenciais para a realização da curva de crescimento da *Xanthomonas citri subsp. citri* mutada em plantas, inclusive, na determinação do tempo de cultivo necessário para obtenção de células em número suficiente para a realização do experimento.

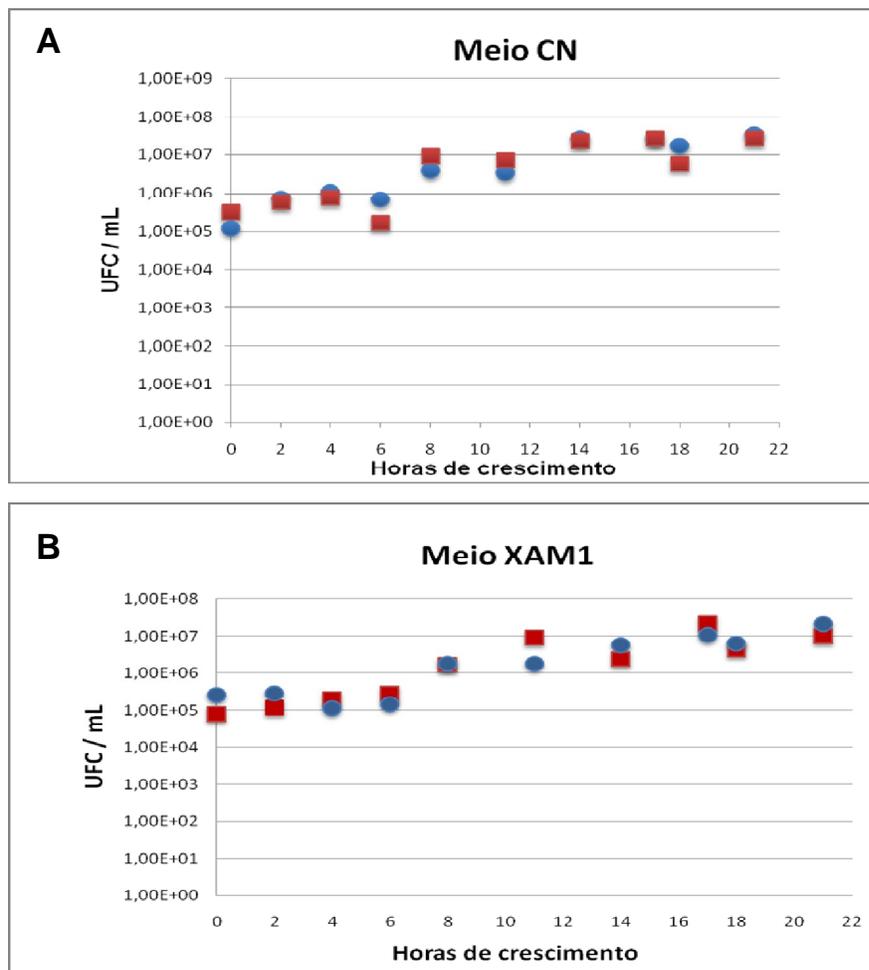


Figura 23: Curva de crescimento “in vitro” da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*. As bactérias *Xanthomonas citri subsp. citri* 306 selvagem e mutante crescidas em meios de cultura. A- Bactérias crescidas em meio CN (caldo nutriente). B- Bactérias crescidas em meio XAM1. ●bactéria selvagem; ■ bactéria mutante;

DESVIO PADRÃO				
Caldo Nutriente			XAM1	
<u>Dias</u>	<u>Selvagem</u>	<u>Mutante</u>	<u>Selvagem</u>	<u>Mutante</u>
0 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2 h	2,83E+04	1,13E+05	0,00E+00	0,00E+00
4 h	4,24E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6 h	1,69E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
8 h	2,55E+05	2,40E+05	1,41E+05	5,00E+04
11 h	1,39E+06	4,74E+05	9,90E+04	0,00E+00
14 h	7,71E+05	7,71E+05	5,16E+05	3,11E+05
17 h	0,00E+00	4,67E+06	9,90E+05	2,90E+06
18 h	1,41E+05	1,29E+06	1,51E+06	6,43E+05
21 h	6,51E+06	2,90E+06	1,38E+07	1,21E+06

Tabela 4: Desvio padrão referente à curva de crescimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

4.13- Presença da CPXAC em células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cultivadas em meio normal e indutor de patogenicidade

Este experimento foi realizado para determinar em que condições a proteína CPXAC é produzida, ou seja, se é produzida de forma constitutiva ou apenas em alguma condição específica, por exemplo, em contato com a planta. Além disso, a análise na cepa nocauteada permitirá confirmar a perfeita interrupção do gene. Para tanto, foram utilizados cultivos em dois meios, um normal (caldo nutriente), e outro reconhecidamente indutor de patogenicidade (XAM1). As proteínas secretadas nestas duas condições foram detectadas utilizando o anticorpo anti-*HIS*CPXAC.

É possível observar na figura 24, que o anticorpo policlonal é capaz de reconhecer a cisteíno peptidase (CPXAC) na linhagem de *Xanthomonas* selvagem crescida em meio XAM 1 (meio indutor de patogenicidade) e não na linhagem crescida em meio caldo nutriente (CN). Isto sugere que a expressão

da proteína pode ocorrer apenas sob determinadas condições nutricionais, visto que o meio XAM1 possui uma composição nutricional diferente do meio caldo nutriente. Além disso, o fato da proteína ser expressa somente em meio XAM 1 é uma indicação de que a enzima pode estar envolvida no processo de patogenicidade, já que o meio XAM 1 promove a expressão de genes com ela relacionados .

Provavelmente, a expressão de proteínas em meio XAM 1 é regulada pelos genes associados com a patogenicidade e virulência como o gene *hrp*. A regulação dos genes *hrp* pode ser influenciada por fatores induzíveis de planta que ocorrem pela presença do promotor induzível pela planta conhecido por PIP box (TTCGC (N₁₅) TTCGC) e pelas condições nutricionais do meio (DA SILVA *et al.*, 2002; LEACH E WHITE, 1996). Os genes de patogenicidade *hrpX* e *hrpG* são responsáveis pela secreção de proteínas do tipo III e algumas do sistema tipo II (FURUTANI *et al.*, 2004; YAMAZAKI *et al.*, 2008). O fato da proteína CPXAC ser expressa em meio XAM 1, sugere que esta possa ser regulada por genes envolvidos com a patogenicidade, visto que, foi detectada a presença de um promotor PIP box imperfeito para o gene CPXAC (YAMAZAKI *et al.*, 2008).

Finalmente, a linhagem celular Xac 306 nocaute, quando cultivada em meio XAM 1, não apresentou a expressão da cisteíno peptidase, confirmando o sucesso da interrupção do gene. Desta forma este mutante poderá ser utilizado em ensaios *in vivo*.

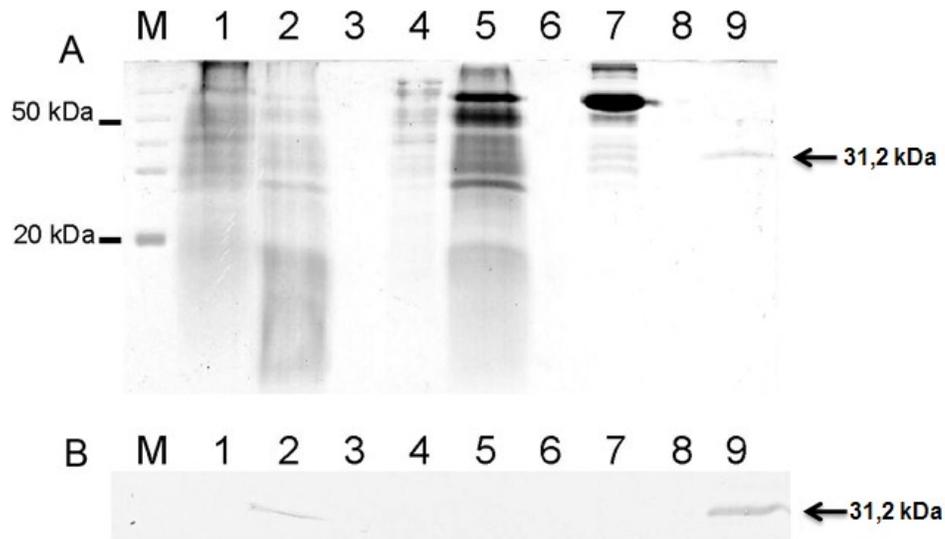


Figura 24: Ensaio de indução de patogenicidade e análise da expressão da cisteíno peptidase em *Xanthomonas citri subsp. citri*. (A) SDS-PAGE 15% corado com Coomassie blue mostrando a expressão de proteínas em meio. M- marcador de peso molecular; 1- *Xanthomonas citri subsp. citri* linhagem 306 selvagem crescida em meio caldo nutriente; 2- *Xanthomonas citri subsp. citri* linhagem 306 selvagem crescida em meio XAM 1; 3- não há amostra; 4- *Xanthomonas citri* linhagem 306 mutante crescida em meio caldo nutriente; 5- *Xanthomonas citri subsp. citri* linhagem 306 mutante crescida em meio XAM 1; 6- não há amostra; 7- controle negativo (meio XAM1); 8- não há amostra; 9- proteína recombinante purificada HIS_{CPXAC} . (B) Ensaio de imunodeteção realizado com as mesmas amostras descritas acima.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão da proteína CPXAC em *Pichia pastoris* foi realizada com sucesso.

A purificação da proteína CPXAC foi realizada com sucesso por cromatografia de afinidade e a proteína pura apresentou um rendimento de 10 mg/L de cultura. Este rendimento foi suficiente para a realização dos testes de caracterização bem como para a produção de anticorpos policlonais.

Com o seqüenciamento da região N-terminal foi possível verificar que o peptídeo sinal da CPXAC se estende do primeiro ao 24^o resíduo de aminoácidos, sendo que a proteína sem ele se inicia na seqüência AVHGM. Assim, podemos sugerir que a enzima *HIS*CPXAC apresenta o sistema de secreção tipo II caracterizado pela presença do peptídeo sinal. Além disso, o peptídeo sinal de CPXAC funcionou como tal em *Pichia pastoris*, visto que se a levedura tivesse utilizado o α -peptídeo seria esperado a seqüência completa da CPXAC, incluindo seu peptídeo sinal.

Os ensaios de cinética enzimática permitiram caracterizar esta enzima como sendo uma cisteíno peptidase e que esta enzima possui uma característica intrínseca de aceitar preferencialmente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral ramificada na posição P2 do substrato, principalmente resíduos de isoleucina, sugerindo uma interação restrita entre o substrato e o sítio ativo da enzima.

Os ensaios de inibição de atividade enzimática realizados com os inibidores de cisteíno peptidase de cana-de-açúcar recombinantes, demonstraram que o melhor inibidor foi a CaneCPI-4, porém as CaneCPI-2 e CaneCPI-3 também se mostraram bons inibidores, até melhores que o E-64.

A partir dos resultados obtidos com os testes de atividade enzimática em diferentes condições de pHs, podemos determinar que o melhor pH é o 5,5, o que é típico de uma cisteíno protease.

Nos testes de atividade em diferentes concentrações de NaCl, foi observado melhor atividade em ausência desse sal.

Nos ensaios de atividade realizados para a determinação da temperatura ótima e estabilidade foi observado que a temperatura ótima para a atividade da enzima recombinante *HIS*CPXAC é de 30 °C. Já a temperatura de 20 °C a enzima apresentou maior estabilidade.

Foi possível verificar no teste de expressão via Western Blotting que a CPXAC não é expressa (ou possui expressão muito baixa) na cepa Xac 306 cultivada em meio caldo nutriente. No entanto, ela é expressa quando cepa Xac 306 é cultivada em meio indutor de patogenicidade (XAM 1). Por outro lado, nenhuma expressão foi detectada na cepa nocaute, fosse ela cultivada em caldo nutriente ou meio XAM1, o que confirma o nocaute do gene nesta cepa mutante.

As curvas de crescimento, tanto em meio caldo nutriente, quanto em meio XAM1, mostram que o nocaute do gene da CPXAC não influencia no crescimento da *Xanthomonas citri subsp. citri*, sugerindo que a enzima não é

importante para o crescimento, mas provavelmente, esteja envolvida no processo de infecção.

Assim é possível sugerir que a cisteíno peptidase está envolvida com a patogenicidade e/ou virulência da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*.

6- REFERÊNCIAS

ABECITRUS. **Exportação da laranja.** Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/exp_laranja.html>. Acesso em: 19 jan. 2008a.

ABECITRUS. **Subprodutos da laranja.** Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/subprodutos_br.html>. Acesso em: 19 jan. 2008b.

ALEGRIA, M. C. et al. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal Bacteriology**, v.187, n. 3, p. 1201-1205, 2005.

AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado técnico**, v. 86, p. 1 – 5, 2003.

ANASTASI, A. et al. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. **Biochemical Journal**, v. 211, p.129-138, 1983.

AOKI, H. H.; AHSAN, M. N.; WATABE, S. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. **Protein Expression and Purification**, v. 31, p. 213 – 221, 2003.

ASP, T. et al. Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymatic characterisation of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1699, p.111 –122, 2004.

AUSTUA-MONGE, G. et al. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1201-1205, 2005.

BACKERT, S.; MEYER, T.F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 207–217, 2006.

BALL, A. M. et al. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 38, p. 147-161, 1991.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Handbook of proteolytic enzymes. **Academic Press**, New York, 1998.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J.F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, 2. ed. Elsevier Academic Press, London, 2004.

BARRETT, A.J.; KIRSCHKE, H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. **Methods Enzymology**, v. 80, p. 535-561, 1981.

BEHLAU, F. et al. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 311 – 317, 2007.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Agronomica Ceres Ltda, v. 1, p. 327 - 328, 3 ed., 1995.

BHATTACHARYA, S. et al. Insight to structural subsite recognition in the plant thiol protease-inhibitor complexes: understanding the basis of differential inhibition and the role of water. **BMC Structure Biology**, v. 1, p.1-4, 2001.

BINGLE, L. E. H.; BAILEY, C. M.; PALLAN, M. J. Type VI secretion: a beginner's guide. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 3 – 8, 2008.

BRÖMME, D.; NALLASETH, F. S.; TURK, B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine peptidase. **Science Methods**, v. 32, p. 199-206, 2004.

BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. Pathogen profile *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

BÜHLING, F. et al. Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. **European Respiratory Journal**, v. 23, p. 620 – 628, 2004.

BURNS, D. L. Biochemistry of type IV secretion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 25 – 29, 1999.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 312–319, 2003.

CAO, T. B.; SAIER JR, M. H. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1609, p. 115–125, 2003.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 137-149, 2003.

CHAN, J. W. Y. F.; GOODWIN, P. H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 489–508, 1999.

CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 354-360, 2000.

CORDOVA, M. et al. Characterization of two cysteine proteinases secreted by *Fasciola hepatica* and demonstration of their kininogenase activity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, p. 109 -115, 2001.

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

DALLA PRIA, M. et al. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. **Plant Pathology**, v. 55, p. 657–663, 2006.

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

DAUTIN, N.; BERNSTEIN, H. D. Protein secretion in Gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. **Annual Review Microbiology**, v. 61, p. 89–112, 2007.

DELEPELAIRE, P. Type I secretion in Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 149 – 161, 2004.

DESVAUX, M.; PARHAM, N. J.; HENDERSON, I. R. The autotransporter secretion system. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 53 – 60, 2004.

DUBEY, V. K. et al. Papain-like proteases: applications of their inhibitors. **African Journal Biotechnology**, v. 6, n. 9, p. 1077-1086, 2007.

DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267 – 1282, 2006.

DUNGER, G. et al. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *hrp* cluster in citrus canker and nonhost plant responses. **Plant Pathology**, v. 54, p. 781-788, 2005.

FILLOUX, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 163 – 179, 2004.

FILLOUX, A.; HACHANI, A.; BLEVES, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**, v. 154, p. 1570 – 1583, 2008.

FISCHER, W.; HAAS, R.; ODENBREIT, S. Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. **Internacional Journal Medical Microbiology**. v. 292, p. 159 – 168, 2002.

FUNDECITRUS. Cancro cítrico. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>>. Acesso em: 20 fev. 2007.

FURUTANI, A. et al. Evidence for HrpXo-dependent expression of type II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. **Journal Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1374-1380, 2004.

FURUTANI, A. et al. Identification of novel HrpXo regulons preceded by two cis-acting elements, a plant-inducible promoter box and a -10 box-like sequence, from the genome database of *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*. **FEMS Microbiology Lett**, v. 259, p.133 – 141, 2006.

GIANOTTI, A. et al. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin caneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biological Chemistry**, v. 389, p. 447 - 453, 2008.

GIANOTTI, A. et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 2, p. 483-489, 2006.

GOLMOHAMMADI, M. et al. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2309 - 2315, 2007.

GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic Press, Inc., v.1, p. 142, 1992.

GOTO, M.; HYODO, H. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris pv. citri* in the early stage of infection. **Annual Phytopathology Society Japan**, v. 51, p. 22 – 31, 1985.

GOTO, M.; YAGUCHI, Y. Relationship between defoliation and disease severity in citrus canker. **Annual Phytopathology Society Japan**, v. 45, p. 689 – 694, 1979.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online, **Plant Health Progress** 2002. Disponível em <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>>. Acesso em: 14 maio 2007.

GOTTWALD, T.R.; McGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic citrus canker: Spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739 – 745, 1988.

GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 1 – 15, 2004.

GRUDKOWSKA, M.; ZAGDANSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p. 609 – 624, 2004.

GÜRLEBECK, D.; THIEME, F.; BONAS, U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 233 – 255, 2006.

HASNAIN, S. et al. Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. **Journal Biology Chemical**, v. 268, n. 1, p. 235-240, 1993.

HENDERSON, I. R. et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 692 – 744, 2004.

HIRANO, S.S; UPPER,C.D. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* - a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 624 – 653, 2000.

HOLLAND, I.B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). **Molecular Membrane Biology**, v. 22, n. 1 – 2, p. 29 – 39, 2005.

HOLLENSTEIN, K.; DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v.17, p. 412 – 418, 2007.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays in Biochemistry**, v. 38, p. 1 – 8, 2002.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plant. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 379 - 433, 1998.

JACOB-DUBUISSON, F.; FERNANDEZ, R.; COUTTE, L. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 235 – 257, 2004.

JESUS JUNIOR, W. C. et al. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 277 - 283, 2006.

JULIANO, M. A. et al. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. **European Journal Biochemistry**, v. 271, p. 3704 – 3714, 2004.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Bacterial avirulence genes. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, p. 153 - 179, 1996.

LEATHERBARROW, R. J. Grafit, Version 5.0. Staines, UK: Erithacus Software, 1992.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4459 - 4488, 2002.

LEUNG-TOUNG, R. et al. Thiol-Dependent enzymes and their inhibitors: A review. **Current Medical Chemistry**, v. 9, p. 979 - 1002, 2002.

MARTINEZ, M. et al. Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2914 – 2918, 2007.

MOREIRA, L. M. et al. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 163-184, 2004.

NA, B.; KIM, T.; ROSENTHAL, P. J.; LEE, J.; KONG, Y. Evaluation of cysteine proteases of *Plasmodium vivax* as antimalarial drug targets: sequence analysis and sensitivity to cysteine protease inhibitors. **Parasitology Research**, v. 94, p. 312 – 317, 2004.

NAGAMORI, Y.; FUJISHIMA, N.; OKADA, S. Purification and some properties of dipeptidyl carboxypeptidase from *Bacillus pumilus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 999 -1005, 1990.

NEVES, E. M. et al. Citricultura brasileira: Efeitos econômico-financeiros, 1996 – 2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 432 - 436, 2001.

NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. California: AAAI Press, 1998.

NOCITI, L. A. S. et al. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* tipo C em lima ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 140 – 146, 2006.

NOGAROTO, V. et al. Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. **FEMS Microbiology Lett**, v. 261, p. 187–193, 2006.

OTTO, H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 133 - 171, 1997.

PALLEN, M. J.; CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. Genomic analysis of secretion systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 519 – 527, 2003.

PECHAN, T.; MA, P. W. K.; LUTHE, D. S. Heterologous expression of maize (*Zea mays* L.) Mir1 cysteine proteinase in eukaryotic and prokaryotic expression systems. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 134 - 141, 2004.

PHILIP, J. M. D. et al. Characterization of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 589 – 600, 2007.

POTEMPA, J.; PIKE, R. N. Bacterial peptidases. In: Russell W, Herwald H. **Concepts in Bacterial Virulence**. Contrib. Microbiology Basel Karger, v. 12, p. 132 - 180, 2005.

PRESTON, G. M.; STUDHOLME, J. D.; CALDELARI, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 331 - 360, 2005.

PRUVOST, O. et al. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculums. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 336 - 346, 2002.

PUKATZKI, S. et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **PNAS**, v. 5, n. 103, p. 1528 – 1533, 2006.

PUMPHREY, D.A. **Total citrus production in the top producing countries.** Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/htp/Hort_Circular/2006/02-06/02-20-06%20Citrus%20Feature.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2008.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597 - 635, 1998.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D320 –D325, 2008.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 205 - 218, 1993.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. *MEROPS*: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D270 - D272, 2006.

RUSSEL, M. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: Type II protein secretion systems. **Journal Molecular Biology**, v. 279, p. 485 - 499, 1998.

RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 4, p. 861 – 873, 2004.
SAIER JUNIOR, M.H. Protein secretion systems in Gram-negative Bacteria. **Microbe**, v. 9, n. 1, p. 414 - 419, 2006.

SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1 - 21, 2002.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York : Cold Spring Harbor, 2001.

SANDKVIST, M. Biology of type II secretion. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 271 - 283, 2001a.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 69, p. 3523 – 3535, 2001b.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**, v. 74, p. 5463 - 5467, 1977.

SANTOS, G. R. R. M. **Estudos funcionais de uma possível cisteíno protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SCHAAD, N. W. et al. Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. **Phytopathology**, v. 3, n. 90, p. 208 - 213, 2000.

SCHAAD, N. W. et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 494 – 518, 2005.

SCHUBERT, T. S.; SUN, X. Bacterial citrus canker. **Plant Pathology Circular**, v. 377, n. 5, p. 1 – 6, 2003.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76 - 85, 1985.

SOARES-COSTA, A. et al. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, p. 1194 - 1199, 2002.

STRYER, L. Endereçamento de proteínas. In:_____. Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 869 – 904.

TANG, J. L. et al. Molecular cloning of gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. **Molecular General Genetics**, v. 210, p. 443 - 448, 1987.

THIEME, F. et al. Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Revealed by the Complete Genome Sequence. **Journal of Bacteriology**, v. 21, n. 187, p. 7254 – 7266, 2005.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 785 – 799, 2006.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 98 - 111, 2000.

TURK, D. et al. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. **Biological Chemistry**, v. 379, p. 137 - 147, 1998.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p. 400 – 407, 2004.

VAN SLUYS, M. A. et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 40, p. 169 - 189, 2002.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 3, n. 45, p. 472 – 489, 1995.

VERNET, T. et al. Processing of the papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21451 - 21457, 1991.

VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, v. 93, p. 832 - 843, 2003.

VIEGAS, F.; MACHADO, M. A. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Citricultura. In: BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Contribuições das câmaras setoriais e temáticas à formulação de políticas e privadas para o agronegócio**. Brasília: Ministério Agricultura e Abastecimento, 2006. p. 264-291.

VOULHOUX, R. et al. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. **European Molecular Biology Organization**, v. 23, n. 20, p. 6735 - 6741, 2001.

WELLS, T. J. et al. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. **FEMS Microbiology Lett**, v. 274, p.163 - 172, 2007. WENGELNIK, K.; BONAS, U. **HrpXv, an AraC-Type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***. *Journal Bacteriology*, 178(12): 3462-3469, 1996.

WIEDERANDERS, B. Structure-function relationships in class CA1cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 691-713, 2003.

YAMAZAKI, A.; HITARA, H.; TSUYUMU, S. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p.138 - 150, 2008.