

Universidade Federal de São Carlos

Departamento de Genética e Evolução

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de
Microrganismos

Análise proteômica diferencial da fração periplasmática
das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp. que diferem na
patogenicidade e espectro de citros hospedeiros

Flávia da Silva Zandonadi

Agosto, 2012

Universidade Federal de São Carlos

Departamento de Genética e Evolução

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de
Microrganismos

Análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp. que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros

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

Mestranda: Flávia da Silva Zandonadi

Orientadores: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur

Profa. Dra. Andréa Soares da Costa Fuentes

Agosto, 2012

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

Z27ap

Zandonadi, Flávia da Silva.

Análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp. que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros / Flávia da Silva Zandonadi. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
119 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Bioquímica. 2. *Xanthomonas*. 3. Proteômica. 4. Eletroforese. I. Título.

CDD: 574.192 (20ª)

Flávia da Silva Zandonadi

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: 17/08/2012

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Maria Teresa Marques N. Mansur (Orientadora)
(UFSCar)



Prof.^a. Dr.^a. Fernanda de Freitas Aníbal (UFSCar)



Prof. Dr. Júlio César Franco de Oliveira (UNIFESP)

AGRADECIMENTOS

Nada se consegue sozinho, a família é a nossa base para tudo. Obrigada:

Ao meu pai, José Ladinis Zandonadi;

À minha mãe, Jeceli da Silva Zandonadi;

Aos irmãos fantásticos e brilhantes, Fábio e Renata;

Ao meu companheiro, amigo e grande amor Guilherme Rodrigo Reis, pelo apoio e compreensão nos momentos mais complicados que passei ao longo de todos estes anos... Você não tem somente um parágrafo especial... Seu espaço na minha vida é maior do que isto... Te amo!

Às grandes companheiras de delíreo científico e amigas, que de algum modo vieram juntar-se a minha família: Araceli Durante (Bagaceli), Juliana Artier, e Carolina Moretto (CaLol) pelos momentos divertidos, desesperadores, de delírio e cômicos que compartilhamos;

À Fernanda Moraes que além de dividir as contas foi uma amiga e companheira das horas mais difíceis na transição que tive no início do mestrado;

Aos amigos de faculdade e de trabalho em especial para Rafaela, Danyella, Mariana (minha aluninha querida), Leandro, André e Fábio que, direta ou indiretamente, contribuíram para conclusão deste trabalho;

Às orientadoras Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes e Dra. Maria Teresa M. Novo Mansur, que me acompanharam e auxiliaram nesta longa caminhada, em especial agradeço à professora Dra. Maria Teresa M. Novo Mansur que me ajudou em toda realização deste trabalho, pela confiança depositada ao longo de todos estes anos e por me fazer desenvolver todas as habilidades que não imaginava ter;

À Dra. Ana Paula Felício, pela paciência, amizade, carinho em me socorrer em diversos momentos;

Aos professores e chefe de departamento que disponibilizaram seus equipamentos e muitas vezes o próprio espaço, como os professores Dr. Gilberto Moraes, Dra. Heloisa S. S. de Araújo e o Dr. Flávio Henrique da Silva;

Ao Fundecitrus, pelo fornecimento das linhagens de *Xanthomonas* spp. utilizadas neste trabalho, especialmente ao professor Dr. José Belasque Júnior;

À professora Dra. Adriana Franco Paes Leme e a técnica Bianca Pauletti do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, pelos constantes ensinamentos sobre as técnicas e conceitos de espectrometria;

À FAPESP pelo auxílio financeiro;

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM-ABTLuS, Campinas-SP, pelo suporte nas análises de espectrometria de massas;

Aos meus anjos da Guarda:

Meu irmão, Leonardo da Silva Zandonadi;

Às avós, Celina Alves de Oliveira e Maria Benedita Barros Zandonadi (vó Bidoca);

Tio Jair de Deus da Silva, que me guardaram e me protegeram por todo este tempo que estive longe de casa...

Amo todos vocês!

Nossos Limites

Certa vez um cão estava quase morto de sede, parado junto à água.

Toda vez que ele olhava o seu reflexo na água, ficava assustado e recuava, porque pensava ser outro cão.

Finalmente, era tamanha a sua sede, que abandonou o medo e se atirou para dentro da água.

Com isto, o reflexo desapareceu. O cão descobriu que o obstáculo - que era ele próprio - a barreira entre ele e o que buscava, havia desaparecido.

Nós estamos parados no meio do nosso próprio caminho. E, a menos que compreendamos isso, nada será possível em direção ao nosso crescimento.

Se a barreira fosse alguma outra pessoa, poderíamos nos desviar, mas nós somos a barreira. Nós não podemos nos desviar – quem vai desviar-se de quem?

Nossa barreira somos nós e nos seguirá como uma sombra.

Esse é o ponto onde nós estamos - juntos da água, quase mortos de sede, mas alguma coisa nos impede, porque nós não estamos saltando para dentro.

Alguma coisa nos segura. O que é? É uma espécie de medo, porque a margem é conhecida, é familiar e pular no rio é ir em direção ao desconhecido.

O medo sempre diz: “agarre-se àquilo que é familiar, não ao que é conhecido”.

E as nossas misérias, nossas tristezas, nossas depressões, nossas angústias, nossos complexos, nos são familiares, são habituais.

Nós vivemos com eles por tanto tempo e nos agarramos a eles como se fossem um tesouro.

O que nós temos conseguido com isso?

Será que não podemos renunciar às nossas misérias?

Já não estivemos o bastante com elas?

Será que já não nos mutilaram demais?

O que nós estamos esperando?

Este é o caso de todos nós. Ninguém nos está impedindo.

Apenas o próprio reflexo entre nós e o nosso destino, entre nós como uma semente e nós como uma flor.

Não há ninguém nos impedindo, criando qualquer obstáculo. Portanto, não continuemos a jogar a responsabilidade nos outros.

Essa é uma forma de nos consolar. Deixemos de nos consolar, deixemos de ter auto-piedade.

Fiquemos atentos. Abramos os olhos. Vejamos o que está acontecendo com nossa vida.

"Escolhamos certo e decidamos dar o salto."

Extraído do livro “Antes que eu morra” de Osho

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a análise proteômica comparativa da fração periplasmática das estirpes-genoma A, B e C de *Xanthomonas* spp, as quais diferem em patogenicidade e gama de citros hospedeiros. A estirpe A (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xac*) é a mais virulenta e infecta todos os tipos de citros, enquanto que a estirpe B (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *Xau-B*) é menos virulenta e a estirpe C (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *Xau-C*) possui um único hospedeiro cítrico. Estas estirpes foram cultivadas em meio XAM-1, conhecido como sendo um meio indutor de patogenicidade para *Xac*, e em meio não indutor de patogenicidade (Caldo Nutriente, CN). Após a extração de proteínas da fração periplasmática em triplicata, as mesmas foram separadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e documentados. A análise proteômica comparativa de *Xau-B* e *Xau-C* relativamente à *Xac* pode nos levar a genes e proteínas envolvidas com patogenicidade e espectro de hospedeiro cítrico, respectivamente. Assim, *Xac* e *Xau-C* foram cultivadas em triplicata em meio XAM-1, conhecido como sendo um meio indutor de patogenicidade para *Xac*, e em meio não indutor de patogenicidade (Caldo Nutriente, CN), sendo as células coletadas ao final da fase exponencial de crescimento, segundo curvas previamente realizadas. Após a extração de proteínas periplasmáticas, as mesmas foram separadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e documentados. Uma análise estatística das diferenças observadas nas intensidades dos spots nos géis 2D foi realizada entre *Xau-C* e *Xac* e entre *Xau-B* e *Xac* (nos mesmos meios de cultura) utilizando o software Image Master 2D-Platinum (GE Healthcare). Para esta última comparação foram utilizados os géis bidimensionais de proteínas periplasmáticas de *Xau-B* obtidos por Carnielli (2011). As proteínas diferenciais entre *Xac* e *Xau-C* e entre *Xac* e *Xau-B* que apresentaram uma expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) foram isoladas a partir dos géis e identificadas por espectrometria de massas (LNBio, Campinas-SP) após pesquisa em banco de proteínas anotadas a partir do genoma de cada uma das linhagens. Inúmeras proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens foram identificadas para as diferentes condições estudadas, demonstrando que algumas foram estirpe-específicas (10 aproximadamente) enquanto outras foram expressas em todas as linhagens, diferindo na sua intensidade. Aquelas proteínas que indicaram alguma potencialidade em relação à patogenicidade e hospedeiro cítrico foram quantificadas com o uso do *software Scaffold v. 3,0*, a partir de dados provenientes da espectrometria de massas. Os resultados obtidos demonstram que *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* apresentam perfis proteicos marcadamente diferentes na fração de periplasma, mesmo em condições de não indução da patogenicidade. A abordagem proteômica evidenciou que embora as estirpes apresentem um padrão de expressão protéica muito distinto na fração rica em proteínas periplasmáticas, as sequências dos genes relacionados às proteínas diferenciais (superóxido dismutase e fosfoglicomutase) estão presentes em todas as estirpes. Com base na análise proteômica, foram

selecionadas proteínas que apresentaram expressão diferencial acentuada entre as linhagens-genomas, nas condições estudadas, sendo sua expressão avaliada por *Western blot* contra extrato protéico periplasmático das três linhagens- genomas, após cultivo das mesmas em meio CN e XAM-1. Os dados obtidos para a superóxido dismutase corroboraram a maioria dos resultados quantitativos gerados pelo *software Scaffold*. Este trabalho evidenciou que a análise proteômica, aliada às ferramentas de análises quantitativas, é um recurso que vem complementar as investigações genômicas destinadas a diferenciar as diferentes espécies de *Xanthomonas* spp. Sob os aspectos biotecnológicos, proteínas biomarcadoras, em especial aquelas relacionadas com patogenicidade e especificidade à hospedeiro, são importantes alvos para produção de drogas no combate ao cancro cítrico.

Palavras-chave: cancro cítrico; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B; *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C; fitopatogenicidade; análise proteômica diferencial; eletroforese bidimensional.

Abstract

The aim of this work was to perform differential proteomic analysis of the periplasmic protein profiles of the genome strains A, B and C of *Xanthomonas* spp, which differ in pathogenicity and host range of citrus. The strain *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) is the most virulent and infects all types of citrus, while the strain B (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *Xau-B*) is less virulent and the strain C (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *Xau-C*) has a unique citrus-host. The comparative proteomic analysis of *Xau-B* and *Xau-C* in relation to *Xac* can reveal genes and proteins involved in pathogenicity and host range of citrus, respectively. The strains A (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xac*) and C (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *Xau-C*) were grown in XAM-1, which is known to be a pathogenicity-inducing medium for *Xac*, and in a non-inducing pathogenicity (Nutrient Broth, NB). Proteins from both types (grown in triplicate using both media), were separated by bidimensional electrophoresis (2D-PAGE) and the gels were stained using Coomassie Brilliant Blue R-250 and documented. A comparative analysis of the protein profiles of *Xac* and *Xau-B*, and *Xac* and *Xau-C*, grown in the same culture medium, was performed using *ImageMaster Platinum software* (GE Healthcare). Statistical analysis (ANOVA) revealed a large number of periplasmic proteins that presented type-specific or differential expression between the two bacteria. For the comparison between *Xac* and *Xau-B* we used the two-dimensional *Xau-B* gels of periplasmic proteins obtained by Carnielli (2011). The differential spots between *Xac* and *Xau-C*, *Xac* and *Xau-B* that showed a significant differential expression ($p < 0.05$) were isolated from gels and identified by ESI-QUAD-TOF mass spectrometry (LNBio, Campinas-SP), employing *Xac*, *Xau-B* and *Xau-C* databases. Several differentially expressed proteins between strains were identified for the different conditions studied, showing that some of them were strain-specific (approximately 10) while others were expressed in all strains, differing only in intensity. Those proteins potentially related to pathogenicity and citrus host were quantified using the software Scaffold v. 3.0, for the mass spectrometry data. The results showed that *Xac*, *Xau-B*, and *Xau-C* had remarkable differences between the periplasm protein profiles for both conditions, even under conditions of no induction of pathogenicity. The proteomics approach showed that even though the strains showed a different pattern of protein expression, the sequences of genes related to the differential proteins are present in all strains. Based on the proteomic analysis, proteins that showed remarkable differential expression between the genome strains were selected, and its expression was evaluated by *Western blot* in periplasmic fraction of the bacteria. The data obtained in the comparative proteomic analysis for the superoxide dismutase corroborated most quantitative results generated by the software *Scaffold*. This work showed that the proteomic analysis, combined with quantitative analysis tools, is an important tool that comes to complement genomic investigations designed to differentiate the species of *Xanthomonas* spp.

Keywords: Citrus canker, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* type B; *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* type C; phytopathogenicity; differential proteomic analysis, two-dimensional electrophoresis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis* ou eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões

AN	Agar Nutriente
MNI	Meio não indutor de patogenicidade (CN)
MI	Meio indutor de patogenicidade (XAM-1)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ou análise de variância
avr/Avr	Gene de avirulência/ proteína efetora do gene avr
BSA	Soro albumina bovina
CN	Caldo Nutriente
DO	Densidade Óptica
IAA	Iodoacetamida
DTT	Ditiotreitol
HR	<i>Hypersensitive Response</i> ou resposta de hipersensibilidade
hrp	<i>hypersensitive Response and Pathogenicity genes</i> ou genes de Resposta de Hipersensibilidade e Patogenicidade
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ou Dodecil Sulfato de Sódio
SSTI	Sistema de Secreção Tipo Um (I)
SSTII	Sistema de Secreção Tipo Dois (II)
SSTIII	Sistema de Secreção Tipo Três (III)
SSTIV	Sistema de Secreção Tipo Quatro (IV)
SSTV	Sistema de Secreção Tipo Cinco (V)
SSTVI	Sistema de Secreção Tipo Seis (VI)
TCA	Ácido Tricloroacético
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>)
<i>Xau-B</i>	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Tipo B (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>)
<i>Xau-C</i>	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Tipo C (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Tabela de diluições realizadas para curva de crescimento. Para cada faixa de D.O._{595nm} foi definida uma diluição correspondente. **Diluição 1** para diluição de alíquotas de cultivos de *Xac* e *Xau-C* em CN (MNI), e **Diluição 2** para *Xac* e *Xau-C* cultivados em XAM-1 (MI), e *Xau-B* cultivados em CN (MNI) e XAM-1 (MI)..... **37**
- Tabela 2:** Protocolo de Programação da 1ª dimensão, etapa de isoeletrofocalização...**40**
- Tabela 3:** Número de *spots* (totais ou diferencialmente expressos) detectados nos géis 2D da fração periplasmática, nas comparações dos perfis de *Xau-B* e *Xau-C* relativamente a *Xac* (análise pelo *software Image Master Platinum* v. 7,0, GE Healthcare).....**52**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cancro cítrico. Os sintomas aparecem em ramos, folhas e frutos (A). Nas folhas, o primeiro sinal é o aparecimento de pequenas manchas amarelas circulares, que se tornam marrons, podendo atingir alguns centímetros de diâmetro. O cancro cítrico induz lesões salientes nos dois lados das folhas (B), o que facilita sua diferenciação das demais doenças. Fonte Fundecitrus, 2010.....18

Figura 2: Sintomas da doença causados por *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* em folha de *Citrus aurantifolia*, 21 dias após a inoculação (extraída de Moreira *et al.*, 2010).....21

Figura 3: Sistemas de Secreção em bactérias Gram-negativas. **Legenda:** (MP) Membrana Plasmática (ME) Membrana Externa (MI) Membrana Interna **Via Sec-Independente (passo único):** Type I, III e VI **Via Sec- Dependente (dois passos/ rota periplasmática):** Type II, Va/b/c e IV (VirB) Fonte: Kegg pathway, 2010.23

Figura 4: Mecanismos de interação planta-patógeno em *Xanthomonas* spp. Bactérias fitopatogênicas utilizam sistemas especializados (Extraído de Büttner and Bonas, 2009) (Sistemas de Secreção, SS) para transportar macromoléculas para o hospedeiro durante o processo de infecção.....25

Figura 5: Estrutura da Parede de bactérias Gram-negativas (MURRAY *et. al.*, 2006).....26

Figura 6: Sistema de secreção tipo III. Estrutura do Injectiossomo/ Complexo “agulha” codificados por fitopatógenos, composto por 8 subunidades homólogas à estruturas flagelares com a função de translocação de fatores de virulência através da espessa parede celular da planta (CORNELIS, 2006).....28

Figura 7: Componentes SSTIV. MI (Membrana interna) e ME (Membrana externa). A) Localização dos componentes do sistema virB T-DNA de transferência no *A. tumefaciens*. Mostrando 3 grupos funcionais: a proteína de localização extracelular formando estruturas de *pillus* adesivo ou outra (B1, B2 e B5), os principais componentes periplasmáticos que formam o canal de translocação (B3, B6, B7, B8, B9 e B10) e as ATPases associadas à MI (B4, B11 e D4). B) Modelo de SSTIV no qual encontram-se associados os componentes geradores de energia da MI e a maquinaria de secreção (núcleo periplasmático). VirB1: proteína responsável pela lise da camada de mureína, facilitando assim, a montagem do complexo periplasmático. Extraído de GONZÁLEZ-PEDRAJO, B., 2003)..... 29

Figura 8: Esquema de cultivo em meios de indução (CN) e não indução de patogenicidade (XAM-1) para a realização de curvas de crescimento e para obtenção de células para extração da fração de proteínas periplasmáticas das linhagens: A) o *Xac* (Artier, 2010); B) *Xau-B* (Carnielli, 2011); C) *Xau-C* (Fernandes,2010).....38

Figura 9: Esquema do procedimento de análise dos géis pelo *software* Image Master 2D Platinum. (A) Detecção dos *spots* das triplicatas biológicas, (B) correspondência dos spots entre as réplicas e (C) Análise de classes entre as condições e análise estatística.....43

Figura 10: (I) Curvas de crescimento por medidas de D.O. (595 nm) de (A₁) *Xac*, (B₁) *Xau-B* e (C₁) *Xau-C* em meio CN (—■—) e XAM-1 (—●—), sendo que as células foram recuperadas para extração de proteínas periplasmáticas nos pontos indicados pelas setas. Para os cultivos (400 mL), o pré-inóculo foi de 20 mL para *Xac* e *Xau-C* e de 80 mL para *Xau-B* e a incubação

foi de 200 rpm e 28°C. Menores inóculos para *Xau-B* não produziram um crescimento satisfatório (Carnielli, 2010). **(II) Curvas de crescimento baseada na contagem de UFC de (A₂) *Xac* e (B₂) *Xau-B* e (C₂) *Xau-C* em meio CN (—■—) e XAM-1 (—●—)** As setas indicam o ponto de recuperação para extração de proteínas periplasmáticas. Para os cultivos (400 mL), o pré-inóculo foi de 20 mL para *Xac* e *Xau-C* e de 80 mL para *Xau-B* e a incubação foi de 200 rpm e 28°C..... **50**

Figura 11: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-C* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **Caldo Nutriente (CN), um meio não indutor de patogenicidade (MNI)**. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner (GE Healthcare)* em resolução de 300 dpi..... **53**

Figura 12: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-C* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **XAM-1, um meio indutor de patogenicidade (MI)**. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner (GE Healthcare)* em resolução de 300 dpi..... **54**

Figura 13: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-B* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **Caldo Nutriente (CN), um meio não indutor de patogenicidade (MNI)**. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner (GE Healthcare)* em resolução de 300 dpi..... **55**

Figura 14: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-B* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **XAM-1, um meio indutor de patogenicidade (MI)**. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner (GE Healthcare)* em resolução de 300 dpi..... **56**

Figura 15: Scatter plots (%volume vs % volume) entre as réplicas dos géis 2D de proteínas periplasmáticas de *Xac*, após cultivo em meio não indutor de patogenicidade **(A)** e meio indutor de patogenicidade **(B)**. Os géis foram obtidos em triplicata e comparados dois a dois..... **58**

Figura 16: Scatter plots (%volume vs % volume) entre as réplicas dos géis 2D de proteínas periplasmáticas de *Xau-C*, após cultivo em meio não indutor de patogenicidade **(A)** e meio indutor de patogenicidade **(B)**. Os géis foram obtidos em triplicata e comparados dois a dois..... **59**

Figura 17: Ampliação de alguns spots que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-C*, cultivadas em meio não indutor de patogenicidade**. Os spots 4 e 39 foram observados em ambas as bactérias. Os spots 429, somente em *Xac*, enquanto os spots 115 e 70 são expressos somente em *Xau-C*. Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b

e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-C*. A linha azul representa a média e as linhas vermelhas os valores mínimo e máximo do desvio padrão.....60

Figura 18: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-C*, cultivadas em meio indutor de patogenicidade**. O *spot* 22 foi observado em ambas as bactérias. Os *spots* 354, 388 e 391 aparecem somente em *Xac*, enquanto o *spot* 66 é expresso somente em *Xau-C*. Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-C*. A linha azul representa à média e as linhas vermelhas o valor mínimo e máximo do desvio padrão.....61

Figura 19: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-B*, cultivadas em meio não indutor de patogenicidade**. Os *spots* 874, 829 e 725 aparecem somente em *Xac*, enquanto os *spots* 71, 157 e 79 são expressos somente em *Xau-B*. Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-B*. A linha azul representa à média e as linhas vermelhas o valor mínimo e máximo do desvio padrão.62

Figura 20: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-B*, cultivadas em meio indutor de patogenicidade**. Os *spots* 57 foram observados em ambas as bactérias. Os *spots* 180 e 223 apareceram somente em *Xau-B* bem como o *spot* 410 em *Xac*. Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-B*. A linha azul representa à média e as linhas vermelhas o valor mínimo e máximo do desvio padrão.....63

Figura 21: Perfis de proteínas periplasmáticas (260 µg) extraídas a partir de células cultivadas em (I) Caldo Nutriente (CN) ou meio não indutor (MNI) ou em (II) XAM-1 ou meio indutor de patogenicidade (MI) para *Xac*, *Xau-B* (Carnielli, 2011) e *XauC*, após a separação por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Os três perfis correspondem a uma das réplicas biológicas obtidas.64

Figura 22: Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas identificadas por ESI-QUAD-Tof/ Mascot, a partir de seus perfis diferenciais entre as duas condições de cultivo (CN e XAM). As categorias funcionais utilizadas foram as descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. Nos gráficos estão evidenciadas apenas as categorias identificadas no subproteoma diferencial periplasmático entre ambas as bactérias cultivadas sob a mesma condição.....69

Figura 23: Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas identificadas por ESI-QUAD-Tof/ Mascot, a partir de seus perfis diferenciais entre as duas condições cultivo (CN e XAM). As categorias funcionais utilizadas foram as descritas no seqüenciamento do genoma da XAC. No gráfico estão evidenciadas apenas as categorias identificadas no subproteoma diferencial periplasmático entre ambas as bactérias cultivadas sob a mesma condição.....70

Figura 24: Níveis de expressão relativa (%) das proteínas-alvo identificadas e quantificadas pelo *software Scaffold Q+*. (1 e 3) *Xac/Xau-C* e *Xac/Xau-B*, respectivamente, cultivadas em meio não indutor de patogenicidade (MNI/ CN). (2e 4) *Xac/Xau-C* e *Xac/Xau-B*, respectivamente, cultivadas em meio indutor de patogenicidade (MI/ XAM-1).....76

Figura 25: Gel SDS. (1) MNI/CN e (2) MI/XAM-1; (A) Superoxidase Dismutase e (B) Fosfoglicomutase (cedidas por Leandro Seiji). Réplica do gel SDS usado para *Western blot*,

corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e documentado. Os extratos da fração de proteínas periplasmáticas das linhagens- genoma (**XAC**, **Xau-B** e **Xau-C**) (60 µg cada).....79

Figura 26: *Western blot* entre as linhagens-genoma **Xac** e **Xau-C** para validação dos níveis de expressão da proteína **superóxido dismutase** (para cada linhagem foram aplicadas amostras de extratos de periplasma em dois poços nos géis de SDS que foram transferidos para membrana de nitrocelulose).....79

Figura 27: *Western blot* entre as linhagens-genoma **Xac**, **Xau-B** e **Xau-C** a identificação de β -*Lactamase* como marcador constitutivo para todas as linhages cultivadas em todas as condições de estudo. A presença desta proteína só foi verificada em **Xau-B** em MI (XAM) (para cada linhagem foram aplicadas amostras de extratos de periplasma em um poço nos géis de SDS que foram transferidos para membrana de nitrocelulose).....79

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Aspectos gerais.....	18
1.2. A bactéria	20
1.3. Interações planta-patógeno.....	21
1.4. Era pós-genômica: a análise proteômica	31
2. OBJETIVO.....	34
2.1. Objetivos Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Linhagens de <i>Xanthomonas</i> spp. e meios de cultivo.....	35
3.2. Reativação e pré-cultivo de <i>Xac</i> , <i>Xau-B</i> e <i>Xau-C</i>	36
3.3. Curvas de crescimento das linhagens em meio indutor e não indutor de patogenicidade... 36	
3.4. Cultivo das linhagens em meio indutor e não indutor de patogenicidade para a extração de proteínas periplasmáticas	37
3.5. Extração de proteínas periplasmáticas.....	39
3.6. Análise proteômica.....	40
3.6.1. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	40
3.6.2. Análise dos géis pelo <i>Software ImageMaster 2D Platinum 7.0</i> (GE).....	41
3.6.3. Identificação de proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas.....	43
3.6.4. Quantificação pelo <i>software Scaffold Q+ v. 3,0</i>	45
3.6.5. Validação da expressão das proteínas diferenciais das linhagens genômicas pela técnica de <i>Western blot</i>	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Curvas de crescimento.....	48
4.2.1. Comparação dos perfis protéicos em gel 2D.....	51
4.2.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massa e.....	65
4.2.3. Proteínas identificadas na análise diferencial entre <i>Xac</i> e <i>Xau-C</i>	66
4.2.4. Proteínas identificadas na análise diferencial entre <i>Xac</i> e <i>Xau-B</i>	68
4.2.5. Quantificação das proteínas pela contagem espectral	74
4.2.5. Validação da expressão de proteínas diferenciais entre as linhagens genômicas pela técnica de <i>Western blot</i>	77
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS	82
ANEXO I	89
ANEXO II	94
ANEXO III.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

O cancro cítrico, causado pela bactéria Gram negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (anteriormente denominada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), é considerado uma das principais doenças da citricultura nacional e mundial, devido à susceptibilidade do hospedeiro e por não existirem métodos de controle eficientes.

A cancrose cítrica afeta várias espécies de citros em regiões tropicais e subtropicais, onde o clima e a umidade favorecem o seu desenvolvimento (SCHUBERT *et al.*, 2001). É uma doença caracterizada por lesões necróticas salientes em caules, folhas e frutos, sendo comum o aparecimento de um halo amarelo ao redor da área necrosada nestes últimos (SUN *et al.*, 2004) (Figura 1). Infecções severas podem levar à perda de folhas, queda prematura dos frutos por aumento dos níveis de etileno, e destruição dos frutos, o que reduz a produção e o valor comercial dos mesmos por serem rejeitados pelos consumidores (SUN *et al.*, 2004).

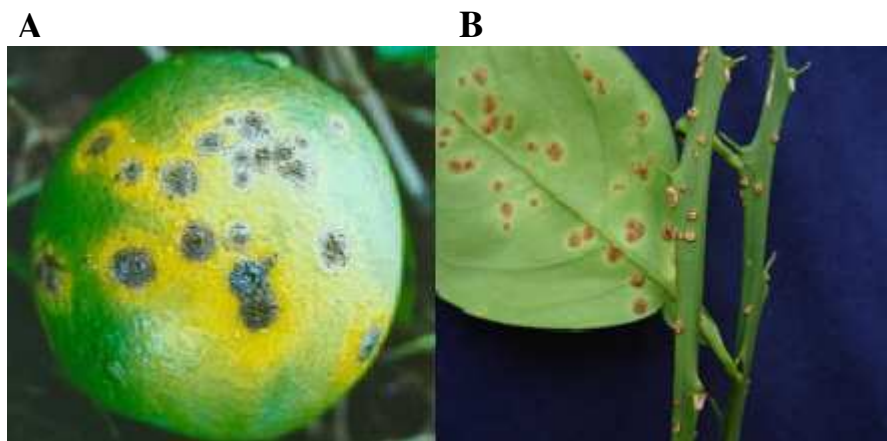


Figura 1. Cancro cítrico. Os sintomas aparecem em ramos, folhas e frutos (A). Nas folhas, o primeiro sinal é o aparecimento de pequenas manchas amarelas circulares, que se tornam marrons, podendo atingir alguns centímetros de diâmetro. O cancro cítrico induz lesões salientes nos dois lados das folhas (B), o que facilita sua diferenciação das demais doenças. Fonte: Fundecitrus, 2010.

Embora os principais sintomas sejam observados nas folhas e frutos, todos os órgãos aéreos da planta podem ser acometidos. Os sintomas envolvem lesões corticosas em ambos os lados das folhas, que se manifestam de uma semana a dois meses após a inoculação, dependendo das condições ambientais, podendo também se desenvolver nos frutos e caules infectados (FUNDECITRUS).

A disseminação pode ocorrer pela ação das chuvas que encharcam as superfícies das lesões (cancros) permitindo que o agente causador da cancrese seja liberado de uma matriz extracelular de polissacarídeos e seja carregado pelos ventos, podendo alcançar plantas previamente não infectadas (GOTTWALD *et al.*, 2001), bem como pelo tráfego de veículos e manuseio de instrumentos contaminados pela bactéria nas regiões de cultivo.

O processo de controle e erradicação do cancro cítrico nos EUA vem sofrendo alterações nos procedimentos adotados, dado seu ciclo de erradicações e ressurgimento desde 1910. A partir de janeiro de 2006, com o *Citrus Health Response Plan (CHRP)*, a prática da erradicação de árvores contaminadas foi abolida. Assim, atualmente os produtores devem usar seu próprio julgamento na gestão do cancro cítrico. Todo o estado da Flórida está sob quarentena, sendo que o tráfego de frutos está sujeito a regulamentos específicos, dependendo do destino de mercado (DEWDNEY and GRAHAM, 2012).

No Brasil, até o primeiro semestre de 2009, a erradicação da cancrese era realizada através da remoção e destruição de árvores infectadas e de árvores possivelmente expostas à doença num raio em torno de 38 m, pois nenhum método químico conhecido é efetivo para controlar a disseminação do cancro, a qual é feita, principalmente, através de chuvas direcionadas por ventos excedendo 8m/s (GOTTWALD *et al.*, 2001).

A partir de junho de 2009, a legislação de controle da doença foi atenuada, deixando de ser uma obrigação a erradicação de todas as plantas de um talhão que apresentasse índice de contaminação superior a 0,5%. De acordo com os dados do Fundecitrus a incidência da doença passou de 0,14% para 0,44% nos talhões do parque cítrica paulista (FUNDECITRUS, 2010). No período de 2010 as exportações geraram cerca de 3,6 bilhões de dólares com uma produção superior a 19 milhões de toneladas de laranja (FAO, 2010). A citricultura no país é um dos setores de grande importância

econômica, desde suas primeiras exportações no ano de 1962, pois tem contribuído para o desenvolvimento do país (NEVES, 2010).

1.2. A bactéria

O agente etiológico do cancro cítrico é uma bactéria fitopatogênica, aeróbica obrigatória, com metabolismo oxidativo, não fixadora de nitrogênio, Gram-negativa, pertencente ao gênero *Xanthomonas* (HAASE, 1915). A cancrose apresenta cinco formas da doença, as quais têm sido referidas como cancro “A”, “B”, “C”, “D” e “E”, ao mesmo tempo em que uma grande diversidade genética de agentes causadores destas cinco formas das doenças tem sido descritas e sustentadas por uma grande diversidade taxonômica (SCHAAD, 2005).

A cancrose A (cancro cítrico asiático) é a forma mais severa da doença, sendo causada pela bactéria atualmente classificada como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), originária da Ásia, que possui a maior gama de espécies cítricas hospedeiras como, por exemplo, *Citrus sinensis* (laranja doce), *C. limon* (limão), *C. reticulata* (tangerina) e *C. aurantifolia* (lima ácida) (STALL and SEYMOUR, 1983).

A cancrose B, causada pela bactéria atualmente classificada como *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (*Xau-B*) é menos severa e de menor importância que a cancrose A e foi primeiramente descoberta na América do Sul. A bactéria tem como hospedeiros as espécies de limões, principalmente *C. limon*, ocorrendo no Uruguai, Paraguai e Argentina (STALL and SEYMOUR, 1983).

A cancrose C tem como único hospedeiro a lima ácida e ocorre somente no Brasil, restrita a apenas alguns municípios do Estado de São Paulo (NOCITI *et al.*, 2006). *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (*Xau-C*), agente etiológico do cancro cítrico C em lima ácida “Galego” (*Citrus aurantifolii* “Swingle”), foi observada pela primeira vez em 1963, em algumas regiões do Estado de São Paulo, induzindo sintomas hiperplásicos, como lesões salientes, corticosas, circundadas muitas vezes por halo amarelo na superfície de ramos, folhas e frutas, semelhantes aos causados pela *Xac* (NOCITI *et al.*, 2006).

Segundo o trabalho de reclassificação feito por Schaad *et al.* (2006), ficou determinada a nomenclatura da bactéria causadora da cancrose A como *X. citri* subsp

citri, proposta anteriormente por Gabriel *et al.* (1989), bem como das bactérias causadoras da cancrose B e C como *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (B ou C). Estas diferem da *X. citri* subsp. *citri* com relação à hibridização DNA-DNA, características fenotípicas, produção de pigmento marrom solúvel em água, tempo de crescimento e susceptibilidade aos bacteriófagos CP1 E CP2 (SCHAAD *et al.*, 2006).

Como exposto acima, a bactéria *Xac* é patogênica a quase todas as espécies de citros, apresentando uma ampla gama de hospedeiros, enquanto que *Xau-C* ataca um único hospedeiro, a lima ácida galego. Considerando essa diferença, a comparação entre esses dois patógenos possivelmente levará à identificação de genes e proteínas relacionados aos diferentes tipos de cancro cítrico e à especificidade de hospedeiros. Por outro lado, a estirpe *Xau-B* infecta seus hospedeiros de forma menos agressiva e mais lenta que *Xac* (Figura 2), de modo que a comparação de ambas as bactérias poderá fornecer informações sobre genes (MOREIRA *et al.*, 2010) e proteínas relacionados ao grau de virulência desses patógenos.



Figura 2: Sintomas da doença causados por *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* em folha de *Citrus aurantifolia*, 21 dias após a inoculação (extraída de Moreira *et al.*, 2010).

1.3. Interações planta-patógeno

A identificação de fatores de virulência que contribuam ou mesmo que determinem a interação planta-patógeno é um dos principais desafios para os estudos moleculares relativos a estes mecanismos (BÜTTNER and BONAS, 2009).

Inúmeros são os fatores celulares do patógeno responsáveis, por exemplo, pela adesão à superfície da planta hospedeira, a capacidade de invasão do espaço intercelular da mesma, captação de nutrientes para a manutenção das suas funções e mesmo para se proteger da ação das defesas da planta hospedeira. Assim, o sucesso da infecção frequentemente depende de sistemas de secreção (Figura 3) que possuem as funções de transporte de proteínas ao meio extracelular e/ou mesmo introdução de DNA ao citossol do respectivo hospedeiro (BÜTTNER and BONAS, 2009).

Em bactérias Gram-negativas a secreção envolve a translocação através das membranas internas e externas (TSENG *et al.*, 2009):

- em um único passo via SSTI, SSTIII, SSTIV ou SSTVI;
- em dois passos:
 - ✓ exportação para o espaço periplasmático via Sec ou Tat;
 - ✓ translocação através da membrana externa via SSTII, SSTV
 - ✓ ou, menos comumente, pelo SSTI ou SSTIV

As interações planta-patógeno são de dois tipos: compatíveis, quando o patógeno é virulento e o hospedeiro suscetível; e incompatíveis, quando o patógeno é avirulento e o hospedeiro resistente (STAKAWICZ *et al.*, 1995). A infecção por patógenos avirulentos induz uma série de respostas de hipersensibilidade (HR) que frequentemente resultam no colapso localizado de células vegetais infectadas e das circunvizinhas, sendo a incompatibilidade dessas interações consequência da presença de um gene de resistência dominante na planta (R) e um gene de avirulência dominante no patógeno (*avr*) (STAKAWICZ *et al.*, 1995). Dessa forma, a distinção entre interações compatíveis e incompatíveis é feita através da presença, ausência ou não funcionalidade do gene de resistência na planta ou do gene de avirulência no patógeno (WHITE *et al.*, 2000).

A maioria das bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas possuem dois grupos de genes moduladores de suas interações com os hospedeiros, os genes *avr* (avirulência), que determinam a especificidade do hospedeiro através de uma interação genótipo-genótipo, e os genes *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) envolvidos na patogenicidade e indução de respostas de hipersensibilidade em plantas não-hospedeiras (BONAS, 1994).

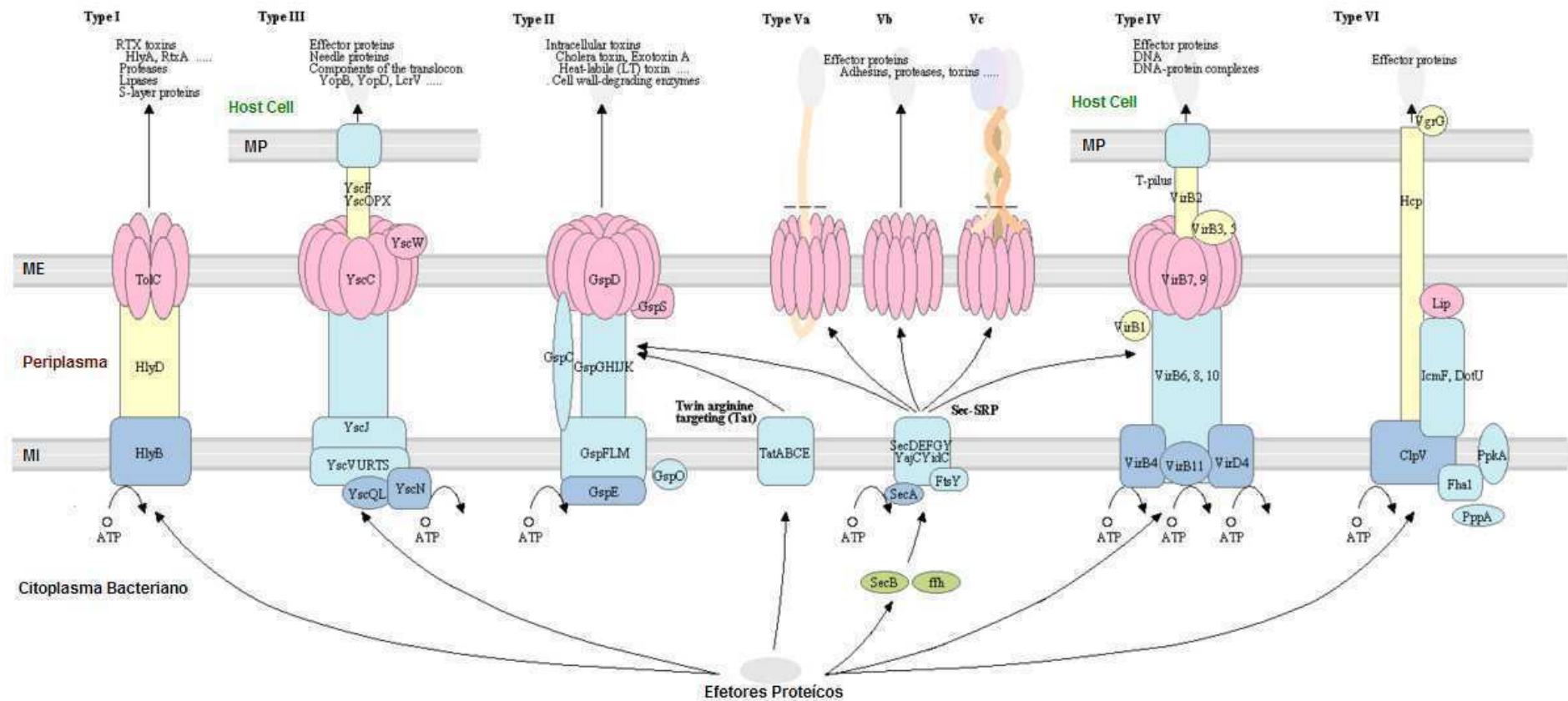


Figura 3: Sistemas de Secreção em bactérias Gram-negativas. **Legenda:** (MP) Membrana Plasmática (ME) Membrana Externa (MI) Membrana Interna **Via Sec-Independente (passo único):** Type I, III e VI **Via Sec- Dependente (dois passos/ rota periplasmática):** Type II, Va/b/c e IV (VirB) Fonte: Kegg pathway, 2010.

As espécies de *Xanthomonas* fitopatogênicas utilizam genes *hrp* para promover o desenvolvimento da cancrrose, sendo estes importantes genes que codificam o Sistema de Secreção do Tipo III (YACOUBI, 2005) (Figura 4). Este tipo de sistema de secreção é um dos fatores-chave de patogenicidade de bactérias Gram-negativas (GHOSH, 2004) e importante para a virulência e a modulação de respostas de defesa da planta por mediar a translocação de proteínas efetoras da membrana da bactéria para o citoplasma do hospedeiro (GÁLAN and COLLMER, 1999).

Além desse sistema de secreção, as espécies de *Xanthomonas* utilizam mecanismos de conjugação para exportar moléculas efetoras (proteínas ou complexos DNA-proteína) durante a infecção (YACOUBI, 2005). Esses sistemas são denominados de Sistemas de Secreção do Tipo IV (“Conjugação” Adaptada) (Figura 4) e secretam proteínas efetoras para o meio extracelular ou para o citosol das células hospedeiras, envolvendo o contato direto célula-célula (YACOUBI, 2005).

Muitas bactérias gram-negativas patogênicas são capazes de infectar e causar doenças nos seus hospedeiros, sendo eles plantas ou animais. A infecção começa com atuação dos sistemas de secreção, onde fatores macromoleculares de virulência, normalmente proteínas ou complexos de ácidos nucleicos com proteínas, são excretados para o citosol da célula hospedeira (no caso dos sistemas do tipo III e IV, já descritos anteriormente) ou diretamente do citoplasma para fora da membrana externa da bactéria, como o sistema de secreção tipo I.

É importante ressaltar que em bactérias gram-negativas, o envoltório bacteriano consiste de em duas camadas membranosas, sendo o espaço entre elas denominado por periplasma. As proteínas são exportadas do citoplasma para se ancorar no envoltório celular interno ou externo, permanecer no espaço periplasmático ou ser secretadas.

O espaço periplasmático (Figura 5) consiste, na verdade, de um compartimento com um rico conteúdo enzimático hidrolítico importante para a quebra de moléculas complexas importantes ao metabolismo bacteriano. Estas enzimas são caracterizadas como lípases, fosfatases, nucleases e enzimas de degradação de carboidratos. Em bactérias Gram-negativas patogênicas, muitos dos fatores de virulência, como colagenases, hialuronidases, proteases e β -lactamases estão presentes neste compartimento (MURRAY *et. al*, 2006)

O sistema de secreção tipo I, bem como o SSTIII e SSTIV são vias de secreção sec-independentes (THANASSI and HULTGREN, 2000; BUTTNER and BONAS, 2002) e assim, não envolvem o processamento da porção amino-terminal das proteínas

secretadas. Além disso, a secreção de proteínas através destas vias ocorre de forma contínua, sem a presença de intermediários periplásmicos. O sistema de secreção tipo I requer três proteínas secretoras: uma ATPase de transporte da membrana interna (denominada proteína ABC para o ATP-binding cassette) que fornece a energia para a secreção de proteínas; uma proteína de membrana externa, que é exportado através da via *sec*, e uma proteína de fusão de membrana, que é ancorada na membrana interna e atravessa o espaço periplásmico (Figura 3)(HUECK,1998). Este sistema é descrito para a secreção de alfa-hemolisina de *Escherichia coli*, a qual se insere na membrana plasmática de células hospedeiras eucarióticas, causando a formação de poros e liberação dos conteúdos citoplasmáticos. Outros fatores secretados por este sistema incluem metaloprotease de *Erwinia chrysanthemi*, a leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*, e da adenilato-ciclase de *Bordetella pertussi* (HENDERSON et.al,2004).

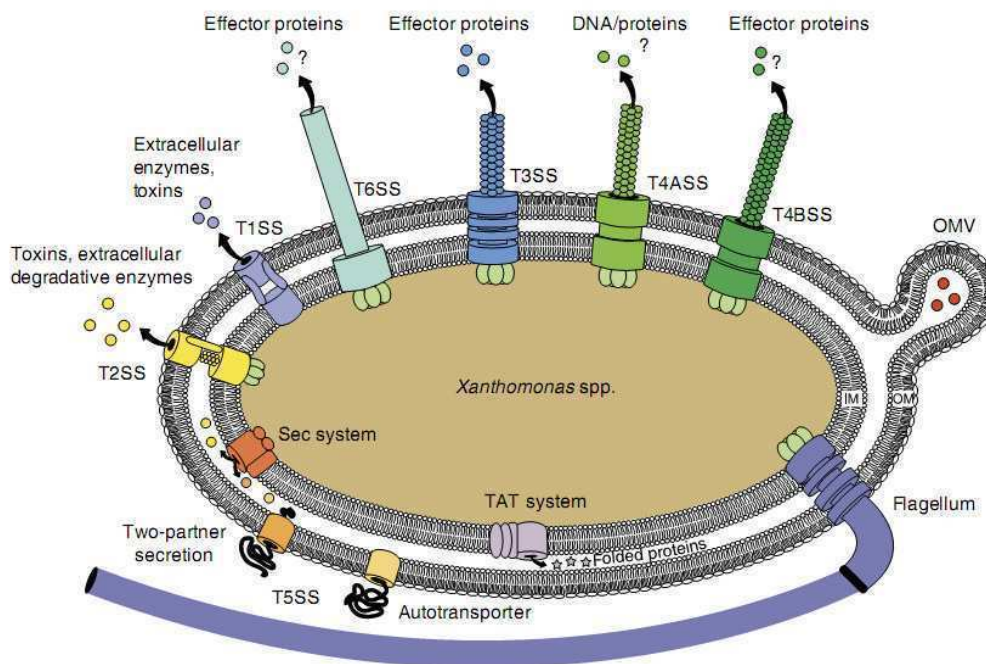


Figura 4: Mecanismos de interação planta-patógeno em *Xanthomonas* spp. Bactérias fitopatogênicas utilizam sistemas especializados (Extraído de Büttner and Bonas, 2009) (Sistemas de Secreção, SS) para transportar macromoléculas para o hospedeiro durante o processo de infecção.

Os Sistemas de Secreção Tipo II e IV, por sua vez, são utilizados para a exportação de proteínas como enzimas e toxinas, para o ambiente através da membrana

externa. Num primeiro momento, as proteínas a serem exportadas são sintetizadas como um precursor contendo uma sequência amino-terminal sinal, característica de exportação *Sec*-dependente (HUECK, 1998). Assim que as proteínas alcançam o periplasma, o peptídeo-sinal é clivado por uma peptidase-sinal periplasmática, permitindo que essas proteínas adquiram suas conformações nativas (enovelamento).

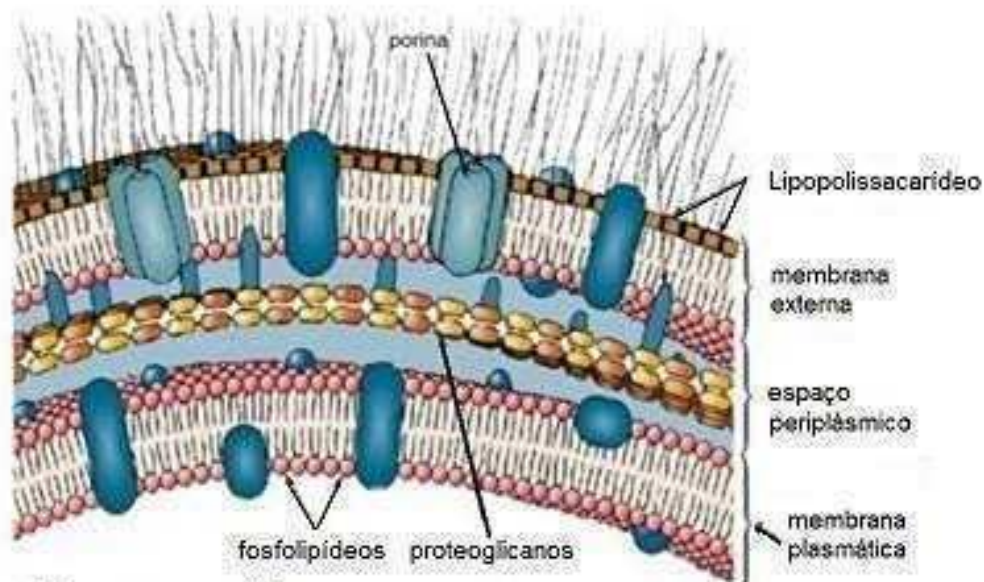


Figura 5: Estrutura da Parede de bactérias Gram-negativas (MURRAY *et. al*, 2006).

Assim, esse sistema de secreção, composto por aproximadamente 12 diferentes proteínas em bactérias Gram-negativas é responsável pela translocação de proteínas do periplasma para o meio através da membrana externa da bactéria (FILLOUX, 2004). Um exemplo interessante deste mecanismo de secreção de bactérias do gênero *Xanthomonas* é a exportação de poligalacturonase, enzima responsável por catalisar a hidrólise das ligações α 1-4 entre os resíduos de ácido galacturônico da pectina (importante no amadurecimento de frutos) por *Xanthomonas campestris* (HUECK, 1998).

Vários estudos sobre os mecanismos específicos das interações de *Xac* com seus citros hospedeiros vêm sendo feitos a fim de elucidar a maneira pela qual a bactéria utiliza o Sistema de Secreção do Tipo III (SSTIII) e o Sistema de Secreção do Tipo IV (SSTIV) para interagir e modificar o metabolismo das plantas infectadas. Genes associados à patogenicidade e virulência vêm sendo descobertos em *Xac* e dentre esses, o *avr* (avirulência), o *rpf* (fatores de regulação de patogenicidade) e o *hrp* (resposta de

hipersensibilidade e patogenicidade) são os mais amplamente estudados (ASTUAMONGE *et al.*, 2005).

O sistema de secreção III (Figura 6) é um mecanismo de secreção independente de Sec, e essencial para a patogenicidade de várias espécies bacterianas. Em especial foi descoberto no gênero *Yersinia*, no qual está bem estudado. As proteínas secretadas são chamadas de Yops, e existem mais de 14 tipos, estas apresentam sinal na porção amino terminal, o qual não é processado. Existe homologia entre proteínas constituintes da máquina de secreção e proteínas de flagelos (HUECK, 1998). O mecanismo tipo III permite não somente uma secreção de proteínas para fora da célula, mas também uma transferência direta de proteínas para o interior de células do hospedeiro (CORNELIS, 2000). Algumas destas atuam como fatores intracelulares, por exemplo, YopH de *Yersinia* e SptP de *Salmonella*, as quais são tirosina fosfatases que catalisam a desfosforilação rápida e específica de proteínas de macrófagos, sendo que a fosforilação transiente de tirosina parece ser necessária para fagocitose. (ANDERSSON *et al.*, 1996).

Interações proteína-proteína envolvendo componentes e proteínas derivadas do SSTIII de *Xac* foram delimitadas por Alegria *et al.* (2004) por meio de experimentos de duplo híbrido em levedura, utilizando proteínas específicas de *Xac* como “iscas”. Os autores identificaram um número de potenciais interações fisiologicamente relevantes entre subunidades, reguladores e substratos do SSTIII da bactéria. Também encontraram interações entre proteínas previamente suspeitas de estarem envolvidas na patogenicidade de *Xac* e codificadas pelo locus *hrp*, como por exemplo, HrpG, HpaA, HpaB, etc.

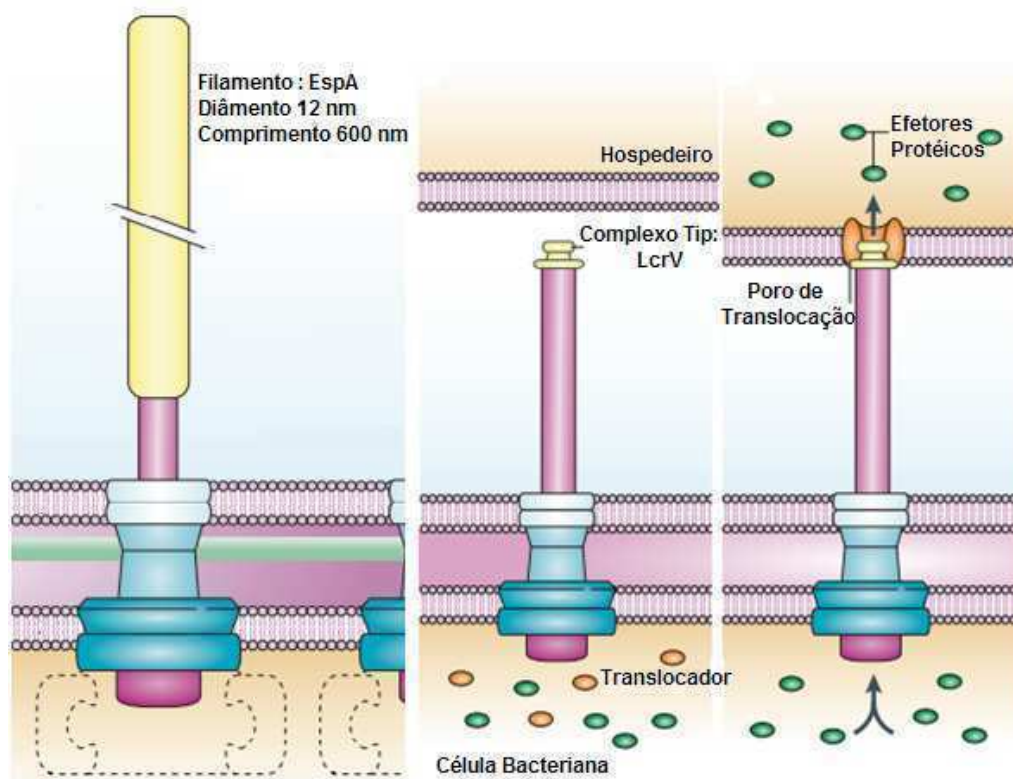


Figura 6: Sistema de secreção tipo III. Estrutura do Injectiossomo/ Complexo “agulha” codificados por fitopatógenos, composto por 8 subunidades homólogas à estruturas flagelares com a função de translocação de fatores de virulência através da espessa parede celular da planta (CORNELIS, 2006).

O sistema de secreção IV (Figura 7) é um mecanismo de secreção que transfere material diretamente do interior da célula para fora, com a formação de estruturas de superfície. As proteínas envolvidas nesta secreção não têm, no entanto, homologia com as proteínas do tipo III ou proteínas flagelares. Elas apresentam homologia com componentes de conjugação nos quais são transferidas proteínas, ou nucleoproteínas, ou seja, DNA associado a proteínas. Estas transferências podem ser entre organismos afastados filogeneticamente, por exemplo, de bactérias para fungos, plantas ou animais. Um exemplo importante é a passagem do DNA T (Figura 4 vide SST4A) de *Agrobacterium tumefaciens* para o núcleo de células de plantas. No caso do DNA T de *Agrobacterium*, este passa para a célula da planta junto com a proteína VirD2, que direciona o DNA para o núcleo da célula. Desta forma, estes sistemas servem de modelos para o entendimento dos detalhes desses tipos de mecanismos bacterianos

Evidências moleculares de interações específicas proteína-proteína envolvendo componentes dos dois tipos de Sistemas de Secreção do Tipo IV de *Xac*, codificados pelos loci *virB* cromossômico e pelo cromossomo plasmidial (pXAC0064) em *Xac*, foram descritas por Alegria *et al.* (2005). As interações encontradas apontaram para funções distintas e independentes desses dois SSTIV: funções clássicas de conjugação para o SSTIV codificado pelo plasmídeo e funções ainda desconhecidas para o SSTIV codificado pelo cromossomo (ALEGRIA *et al.*, 2005).

Por outro lado, há poucos estudos sobre os mecanismos específicos de interação de *Xau-C* com *C. aurantifolii*. Nociti *et al.* (2006) avaliaram a agressividade de linhagens de *Xau-C* produtoras e não-produtoras de pigmento escuro quando inoculadas em lima ácida. Segundo os autores, as linhagens produtoras de pigmento escuro em meio de cultura (PP) se mostraram menos agressivas que as não-produtoras e ambas apresentaram menor agressividade quando comparadas à *Xac*.

Cernadas *et al.* (2008) avaliaram os perfis transcricionais de *Citrus sinensis* (laranja doce) infectada por *Xac* e *Xau-C* a fim de compreender os mecanismos moleculares de hipertrofia e hiperplasia causados pelas bactérias e também de compreender as bases da reação de resistência da laranja doce quando infectada por *Xau-C*. Através da expressão gênica de *C. sinensis* em resposta a esses patógenos, os autores encontraram 100 genes relacionados ao desenvolvimento do cancro e à resistência à doença. Foram observadas mudanças nos perfis transcricionais dos genes relacionados à defesa, parede celular, tráfego de vesículas e crescimento celular em folhas infectadas por *Xac* entre 6 a 48 horas após a infecção (CERNADAS *et al.*, 2008). Essas observações foram consistentes com a noção de que *Xac* suprime as defesas do hospedeiro muito cedo durante a infecção e ao mesmo tempo muda o estado fisiológico das células do hospedeiro cítrico, reprogramando-as para divisão e crescimento. Ao contrário, *Xau-C*, através da ativação de proteínas quinases sinalizadoras e fatores transcricionais responsivos ao etileno, ativa genes de defesa da planta (CERNADAS *et al.*, 2008).

1.4. Era pós-genômica: a análise proteômica

O termo proteína vem do grego “*proteios*” e significa “*a mais importante*”. As proteínas compõem um conjunto de moléculas indispensáveis para todos os seres vivos do planeta, ocorrendo em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais, receptores celulares, entre outras funções (LEHNINGER *et al.*, 2006). Em decorrência da grande diversidade funcional, as proteínas exercem papéis fundamentais em inúmeros eventos biológicos tais como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica e reprodução.

Proteoma é um termo relativamente novo, que significa o conjunto de PROTEÍNAS expressas por um genOMA. O proteoma é, dessa forma, o resultado da expressão de um conjunto de genes e das manifestações pós-transcricionais produzidas em resposta ao estado de desenvolvimento, da presença de ativadores ou inibidores, isto é, dependendo das condições ambientais definidas (SOUSA *et al.* 2007). Além disso, sabe-se que, após serem sintetizadas, as proteínas podem sofrer importantes modificações chamadas pós-traducionais, como glicosilações e fosforilações. Tais informações não podem ser retiradas exclusivamente da seqüência dos genes, havendo necessidade de estudos diretos das proteínas. Do mesmo modo, o estudo do genoma não permite saber quais proteínas estão expressas realmente em uma determinada célula em um dado momento (SOUSA *et al.*, 2007).

Dentro desse contexto, torna-se importante o estudo em larga escala das proteínas por meio da análise de proteomas. Se por um lado, o seqüenciamento de genes revela muito pouco sobre como as proteínas de um organismo operam individualmente ou em conjunto para exercer suas funções, a disponibilidade da seqüência genômica tem sido um requisito importante para a realização de proteomas e tem dado novo impulso para tais estudos.

Ao longo das décadas, especificamente nos últimos vinte anos, a Bioquímica sofreu uma verdadeira revolução, principalmente devido aos espetaculares avanços na área da Genômica, que vem disponibilizando uma incrível gama de informações moleculares sobre os sistemas biológicos. Destaca-se a enorme quantidade de seqüências de DNA fornecida pelos projetos de seqüenciamento total de genomas. Hoje já são conhecidas as seqüências completas dos genomas de cerca de 1000

microorganismos como *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma genitalium*, *Escherichia coli* e *Sacharomyces cerevisiae*.

Devido à fácil disseminação, ao alto potencial destrutivo, à falta de controles curativos eficientes para o cancro cítrico e à grande importância econômica da citricultura para o país, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), causadora da cancriose A, teve seu genoma completamente sequenciado por laboratórios da rede ONSA da FAPESP (SILVA *et al*, 2002). Os resultados mostraram que o genoma dessa fitobactéria apresenta 5.175.554 nucleotídeos que codificam 4.313 proteínas.

Facincani (2007) realizou trabalhos relacionados à análise proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, no qual obteve resultados relacionados à primeira construção de mapa proteômico da *Xac* em meios indutor de virulência e não indutor. A autora encontrou 39% de todas as proteínas prováveis pelo genoma da *Xac*, em condições não infectantes (meios CN e TSB, meios basais não indutores), estando as mesmas distribuídas em todas as categorias funcionais. Além disso, 25% das proteínas designadas como hipotéticas conservadas do genoma foram detectadas. Outro objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de expressão proteico durante a patogênese decorrente do contato *Xac*/cítricos. De um total de 57 proteínas diferenciais associadas à patogenicidade e virulência, 17 foram detectadas pela técnica de eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massa e 40 pela tecnologia de *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT), as quais forneceram resultados complementares, porém com diferenças inerentes a cada uma destas estratégias. Dentre essas proteínas, destacam-se as proteínas dos Sistemas de Secreção Tipo II, III e IV, efetoras do SSTIII, proteínas relacionadas a estresse, goma xantana, carência nutricional, entre outras.

Também no Brasil foi realizado, com o suporte da FAPESP e do Fundecitrus, o seqüenciamento dos genomas dos tipos *Xau-B* e *Xau-C*, os quais foram parcialmente finalizados (USP-SP e UNESP-Jaboticabal) e ancorados no genoma finalizado (*finished*) da *Xac*. Os resultados do seqüenciamento da *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* estão disponíveis *on-line* em banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Por meio de recursos de bioinformática, Moreira *et al.* (2010) realizou uma análise comparativa *in silico* entre os genomas, evidenciando a relação de muitos genes com cada tipo de cancro cítrico. Como por exemplo, regiões específicas do genoma de *Xac* (XACSR7, XACSR9, XACSR14) foram identificadas como

reponsáveis pela formação de biofilme quando comparado com *Xau-B* e *Xau-C*, bem como genes relacionados à adesão facilitada pela formação de hemaglutinina.

Desta forma, a comparação proteômica entre as estirpes A e C, por exemplo, poderá possibilitar a identificação de genes relacionados à especificidade de hospedeiro, dado o maior espectro da estirpe A, comparativamente à especificidade da estirpe C, capaz de atacar somente a lima ácida galego. Por outro lado, a estirpe *XauB* infecta a planta de maneira menos agressiva e mais lenta que *Xac*.

Segundo Simpson (2002), a análise de um extrato proteico sem fracionamento celular geralmente não é bem sucedida devido à incapacidade das técnicas existentes, como 2D-PAGE, em resolver tais amostras. O fracionamento do extrato celular é importante para a redução da complexidade da amostra e para seu enriquecimento em certas proteínas, o que possibilita a detecção de um número maior de proteínas pouco abundantes. Especificamente em bactérias fitopatogênicas, a utilização do fracionamento é particularmente interessante, visto que certas subfrações podem apresentar envolvimento importante no processo infeccioso de plantas, como por exemplo, o periplasma e a membrana (SIMPSON, 2002).

Do ponto de vista de análise da expressão de proteínas entre as linhagens-genoma dos tipos A, B e C não há estudos publicados. Neste sentido a análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp objetiva complementar a análise genômica comparativa. Um dos objetivos da nossa proposta é justamente contribuir nesse aspecto, por meio da análise proteômica diferencial da fração proteica periplasmática, ou seja, utilizando a estratégia de fracionamento celular seguida da separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Tal procedimento permitirá a detecção e resolução de um número maior de proteínas pouco abundantes, comparativamente ao extrato celular total não fracionado.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi a análise proteômica diferencial da fração periplasmática de *Xac* e *Xau-C* e de *Xac* e *Xau-B* nas mesmas condições de cultivo, tanto em condição de indução de patogenicidade (meio XAM-1) como em condição de não indução de patogenicidade (meio Caldo Nutriente, CN).

2.1. Objetivos Específicos

- Obter as curvas de crescimento (D.O. e UFC) de *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* em meio indutor (XAM-1) e em meio não indutor de patogenicidade (CN), a fim de inferir o final da fase exponencial de crescimento bacteriano para obtenção de células para a extração de proteínas;
- Realizar novas extrações da fração periplasmática de *Xac* e *Xau-C* [relativamente aos trabalhos de Artier (2010) e Fernandes (2010)], em ambos os meios de cultivo (CN/ XAM-1), a fim de se padronizar a metodologia de extração (utilizando agora PMSF como inibidor de proteases em substituição ao coquetel de inibidores utilizado nos trabalhos anteriores citados), para possibilitar comparações entre os dois tipos de bactérias e de *Xac* com *Xau-B* (*Xau-B*: Carnielli, 2011);
- Comparar os perfis de proteínas periplasmáticas entre *Xac* e *Xau-B* e entre *Xac* e *Xau-C*, por meio de eletroforese bidimensional (2D-PAGE), após cultivo em meio CN e em meio XAM-1 (em triplicata);
- Análise estatística da expressão das proteínas diferencialmente expressas entre *Xac* e *Xau-C* e entre *Xac* e *Xau-B*, em cada um dos meios de cultura (CN e XAM-1) e isolamento/ digestão trípica das proteínas com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$);
- Identificação das proteínas diferenciais por espectrometria de massas (LNBio, Campinas-SP)/pesquisa em banco de proteínas anotadas a partir da sequência genômica de cada bactéria;

- Quantificação das proteínas componentes dos principais *spots* diferenciais analisados por espectrometria de massas, por meio do *software Scaffold Q+ v.3*;
- Validação da expressão das principais proteínas identificadas como diferenciais entre as linhagens-genoma por meio de *Western blot* utilizando anticorpos obtidos comercialmente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens de *Xanthomonas* spp. e meios de cultivo

As bactérias *Xac* (linhagem 306), *Xau-B* linhagem IBSBF 1631) e *Xau-C* (linhagem IBSBF 338) foram gentilmente cedidas pelo Dr. José Belasque Júnior, pesquisador do Fundo de Defesa da Citricultura- FUNDECITRUS (Araraquara- SP).

O meio líquido utilizado para preparar as culturas permanentes, para o pré-inóculo dos ensaios e como meio não indutor de patogenicidade (para a análise proteômica), foi o Caldo Nutriente (CN), constituído de 5g/L de peptona e 3g/L de extrato de carne.

As culturas permanentes de *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* foram obtidas pelo crescimento em meio Caldo Nutriente com adição de 16% de glicerol e manutenção a -80°C. Os meios de cultura sólidos utilizados para reativar as células de *Xac* e *Xau-C* provenientes de cultura permanente foram respectivamente Ágar Nutriente (AN), cuja composição é a mesma do CN, acrescido de 2% de Agar, e meio LPGA, composto de 7g/L de extrato de levedura, 7g/L de peptona, 7g/L de glicose e 16g/L de ágar bacteriológico.

Para a comparação dos perfis protéicos, o meio utilizado como indutor de patogenicidade foi o XAM-1 (CARVALHO, 2006) com modificações. O meio é composto de 7,57mM (NH₄)₂SO₄; 33,06mM KH₂PO₄; 60,28mM K₂HPO₄; 1,7 mM citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O); 1M MgSO₄; 0,03% casaminoácidos; 10mM Frutose, 10mM Sacarose; 1 mg/mL BSA; pH 5,4. O meio descrito por Carvalho (2006) foi baseado em modificações do meio sintético XVM2 elaborado por Wengelnik *et al.* (1996).

3.2. Reativação e pré-cultivo de *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C*

As bactérias provenientes de culturas armazenadas a -80°C foram reativadas por estriamento de 1 alça cheia ($\sim 10\ \mu\text{L}$) em meios Ágar Nutriente-AN (para *Xac*) e LPGA sólido (para *Xau-C*) e as placas foram mantidas em estufa a 28°C por dois e três dias para as respectivas bactérias. Uma alça de biomassa ($\sim 10\ \mu\text{L}$) de cada bactéria obtida a partir de colônias do meio sólido foi inoculada em 80 mL de pré-inóculo de Caldo Nutriente (CN). O pré-inóculo foi incubado à 28°C e 200 rpm (*shaker* SOLAB). O crescimento de *Xac* e *Xau-C* no pré-inóculo foi acompanhado por leituras de densidade ótica (D.O.) por aproximadamente 17 horas e 27 horas, respectivamente.

O pré-inóculo foi utilizado tanto para inocular os meios para as curvas de crescimento (item 3.3) como também para cultivo das bactérias para a extração de proteínas para a análise proteômica (item 3.4).

3.3. Curvas de crescimento das linhagens em meio indutor e não indutor de patogenicidade

As curvas de crescimento *in vitro* foram realizadas a partir de pré-inóculos correspondentes a 20 mL de cultivo para *Xac* (ARTIER, 2009) e *Xau-C* (FERNANDES, 2009) e 80 mL de cultivo para *Xau-B* (CARNIELLE, 2010) (Figura 8). Os cultivos (400 mL) para cada condição (CN e XAM-1) e para cada linhagem foram preparados em triplicata e incubados à 28°C e 200 rpm (*shaker* Innova). O crescimento bacteriano foi monitorado por 72 horas (intervalos de 4h) por meio de medidas de $\text{D.O.}_{595\text{nm}}$, sendo plaqueado um volume de $50\ \mu\text{L}$ em meio Ágar Nutriente alíquotas de diluições apropriadas de cada meio (Tabela 1) para a contagem das UFC (Unidade Formadora de Colônia).

Tabela 1: Tabela de diluições realizadas para curva de crescimento. Para cada faixa de D.O._{595nm} foi definida uma diluição correspondente. **Diluição 1** para diluição de alíquotas de cultivos de *Xac* e *Xau-C* em CN (MNI), e **Diluição 2** para *Xac* e *Xau-C* cultivados em XAM-1 (MI), e *Xau-B* cultivados em CN (MNI) e XAM-1 (MI).

D.O.	Diluição 1	Diluição 2
0 a 0,150	10 ⁻⁴	10 ⁻³
0,150 a 0,300	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴
0,300 a 0,600	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶
0,600 a 1,0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹

3.4. Cultivo das linhagens em meio indutor e não indutor de patogenicidade para a extração de proteínas periplasmáticas

O cultivo para extração de proteínas periplasmáticas de *Xac* e *Xau-C* foi realizado da mesma forma que foi realizada a curva de crescimento (item 3.3.), a partir do inóculo de 1 alça de biomassa bacteriana em 80 mL ou 160 mL de meio CN, respectivamente, (Figura 8), sendo a incubação realizada à 28°C e 200 rpm até que a D.O._{595nm} atingisse valor 1,0, exceto para os cultivos de *Xau-C* em meio XAM-1 onde a D.O._{595nm} atingisse valor máximo 0,4. Nesse ponto, o pré-inóculo foi dividido em 2 partes iguais, sendo estas centrifugadas à 10.000 x g e 4°C (centrífuga Sorvall RC5C Plus) por 20 minutos para a obtenção das células. Após descarte do sobrenadante, uma das partes foi suspensa em 2 mL de meio não indutor (CN) e a outra parte em 2 mL de meio indutor de patogenicidade (XAM-1). Um volume de 0,5 mL (para *Xau-C*) e 1 mL (para *Xac*) de cada uma dessas suspensões (correspondente a 20 mL de pré-cultivo) foi utilizado para inocular 400 mL de meio não indutor (CN) e 400 mL de meio indutor de patogenicidade (XAM-1), respectivamente (figuras 8 A e C). A incubação foi realizada à 28°C e 200 rpm.

A obtenção das células de *Xau-B* para a extração das proteínas da fração periplasmática foi realizada por Carnielli (2011), segundo o procedimento da figura 8B.

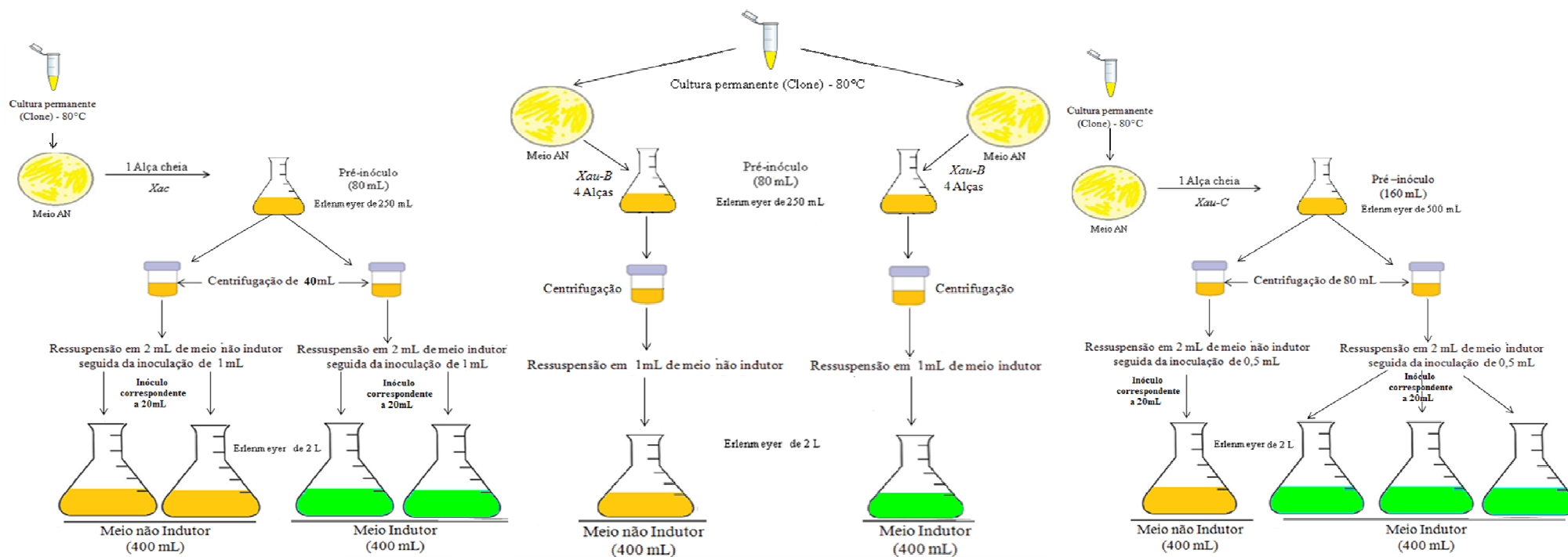


Figura 8: Esquema de cultivo em meios de indução (CN) e não indução de patogenicidade (XAM-1) para a realização de curvas de crescimento e para obtenção de células para extração da fração de proteínas periplasmáticas das linhagens: **A)** *Xac* (ARTIER, 2010); **B)** *Xau-B* (CARNIELLI, 2011); **C)** *Xau-C* (FERNANDES, 2010).

3.5. Extração de proteínas periplasmáticas

A extração de proteínas periplasmáticas de *Xac* e *Xau-C* foi realizada segundo o procedimento descrito por Lee *et al.* (2001) e Teixeira *et al.* (2008), com modificações. Durante o procedimento foi adicionado PMSF (inibidor de protease) e EDTA e excluído NaCl (Artier, comunicação pessoal). A concentração das proteínas obtidas nos extratos protéicos foi determinada segundo metodologia descrita por Bradford (1976). Já a extração das proteínas periplasmáticas de *Xau-B* foi realizado por igual procedimento, por Carnielli (2010).

Em final da fase exponencial de crescimento, 800 mL (com D.O_{595nm} de aproximadamente 1,0) de cultura de cada condição foi centrifugada a 10.000 x g (*Sorvall RC5C*) por 20 min a 4°C para a obtenção das células. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas brandamente, duas vezes, em 2 mL de solução contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), sacarose 20%, 1mM EDTA (pH 8,0), 1mM de PMSF em gelo e centrifugada a 10.000 x g, 20 min a 4°C. O *pellet* celular foi ressuspenso novamente em 8mL de 10 mM Tris-HCl (pH 8), sacarose 20%, 1mM EDTA (pH 8,0), 1mM de PMSF e após este procedimento, foram adicionados 2mL desta mesma solução contendo lisozima 3 mg/mL e a suspensão foi mantida em gelo por 1 hora (para ação da lisozima, resultando na liberação do periplasma e originando os esferoplastos). Após 1 hora em gelo a solução foi centrifugada a 11.000 x g por 30 min a 4°C (*Sorvall RC5C*), para sedimentação dos esferoplastos resultantes da ação da lisozima.

Ao sobrenadante foi adicionado TCA 20% (concentração final na solução TCA 10%), homogeneizado em *vortex* (*Phoenix AP56*) e mantidos em gelo por 30 min. Após este tempo, a solução foi submetida à centrifugação (*Sorvall RC5C*) à 16.000 x g por 10 min e a 4°C, e o precipitado lavado 4 vezes com etanol *Merck* 70% gelado e transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Após a total secagem, o precipitado foi ressuspenso em 300 µL tampão contendo 7M uréia, 2M Thiouréia, 4% CHAPS, 40 mM DTT, 1mM EDTA (pH8,0) e 1mM de PMSF.

3.6. Análise proteômica

3.6.1. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Foi realizada a separação por 2D-PAGE das proteínas periplasmáticas de *Xac* e *Xau-C* obtidas nas duas condições de cultivo (meio CN e XAM-1), em 3 réplicas biológicas. Já para a comparação de *Xac* vs *Xau-B*, os géis de *Xau-B* utilizados foram, para ambas as condições, os obtidos por Carnielle (2011).

As amostras contendo 260µg de proteínas foram purificadas por precipitação, utilizando-se o *kit 2-D Clean Up (GE Healthcare)*. As proteínas precipitadas, então, foram ressuspendidas em tampão contendo 8M uréia, 4%CHAPS, 50µL *DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare)* e 1,25 µL IPG Buffer (*GE Healthcare*) pH 3-10, para o volume total de 250 µL. Estas soluções foram aplicadas em tiras de 13 cm de gradiente linear de pH 3-10 (*Immobiline DryStrip*, *GE Healthcare*). As tiras foram hidratadas, *overnight*, e em seguida submetidas à isoeletrofocalização no sistema *Ettan IPGphorIII (GE Healthcare)*. O protocolo seguido está descrito na tabela 2.

As tiras, então focalizadas, foram equilibradas em tampão contendo 6M uréia, 75mM Tris-HCL pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol e 10mg/mL DTT para a redução das proteínas. Em seguida neste mesmo tampão foi adicionado 25 mg/mL de iodoacetamida (IAA), substituindo o DTT da etapa anterior, para a alquilação das proteínas, sendo que cada incubação das tiras levou 15 min em baixa agitação.

Tabela 2: Protocolo de Programação da 1ª dimensão, etapa de isoeletrofocalização.

Modo	Voltagem (V)	Voltagem/hora (Vh) ou tempo (h)
<i>Step-n-hold</i>	100 V	1:00 h
<i>Step-n-hold</i>	500 V	500 Vh
<i>Gradient</i>	1000 V	800 Vh
<i>Gradient</i>	8000 V	11300 Vh
<i>Step-n-hold</i>	8000 V	2900 Vh
<i>Step-n-hold</i>	100 V	10:00 h

A segunda dimensão foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel 12,5% de poli(acrilamida) no sistema *Hoefer SE600* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante e em tampão de corrida 0,3% de Tris, 1,5% de glicina e 0,1% SDS, a 15°C (sistema *MultiTemp III*, GE Healthcare). A corrida foi mantida nos primeiros 30 min a 10 mA/gel e após os 30min a corrente foi aumentada para 45 mA/gel até que completasse a corrida.

Os géis obtidos foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e as imagens adquiridas em resolução de 300 dpi foram documentadas com *ImageScanner* (GE Healthcare) software *LabScan* 6.0. Na análise comparativa dos perfis protéicos obtidos por 2D-PAGE foi utilizado o software *Image Master Platinum* v. 7,0 (GE Healthcare). Nestas análises, *bookmarks* foram usados para o alinhamento dos géis, assim os *spots* foram detectados automaticamente. A comparação inicial foi estabelecida entre as triplicatas das respectivas bactérias *Xac* e *Xau-C*, e posteriormente entre os géis *Xac* e *Xau-C* nas duas condições de cultivo (meio CN e XAM-1), em 3 réplicas biológicas.

Os valores experimentais de pI (ponto isoelétrico) e MM (Massa Molecular) foram obtidos segundo os pontos inicial e final da tira *DryStrip* (pH3-10) (GE Healthcare) e o padrão de peso molecular *BenchMark* (Invitrogen), respectivamente. A quantificação dos spots foi dada em termos de porcentagem de volume (%volume), onde 100% representam o volume de todos os spots no gel. A análise estatística da expressão diferencial foi realizada segundo o teste ANOVA ($p < 0,05$) no software *Image Master Platinum* v. 7,0 (GE Healthcare). Todos os experimentos foram realizados em triplicata para ambas as bactérias e condições experimentais.

As análises de comparação estabelecida entre as triplicatas das respectivas bactérias *Xac* e *Xau-B*, obtidas nas duas condições de cultivo (meio CN e XAM-1), foram realizadas por Carnielli (2011) sob as mesmas condições das triplicatas das respectivas bactérias *Xac* e *Xau-C*.

3.6.2. Análise dos géis pelo Software *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE)

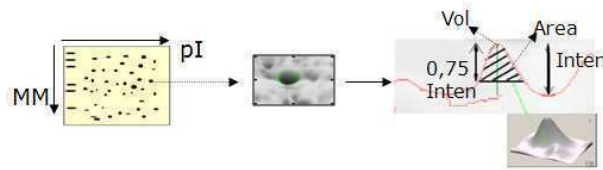
O software *ImageMaster 2D Platinum* foi utilizado por oferecer uma solução flexível para a visualização abrangente, exploração e análise de dados em géis bidimensionais convencionais.

Os géis foram obtidos em triplicata para cada uma das bactérias cultivadas sob a mesma condição e analisados para a detecção dos *spots* e determinação experimental (no gel) dos valores de pI e massa molecular (Figura 9 A). Em seguida, foi realizada a correspondência (*matching*) entre os *spots* das réplicas de uma mesma bactéria e uma tentativa de encontrar correspondência entre os *spots* que fossem comuns para as diferentes bactérias (cultivadas sob a mesma condição) (Figura 9 B).

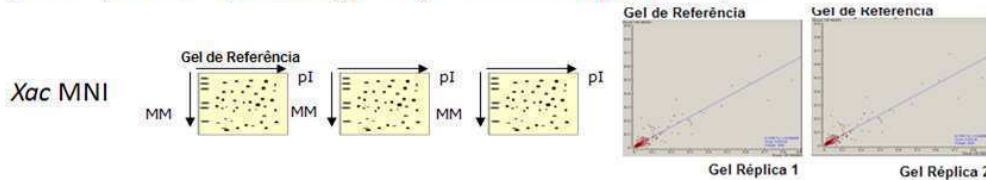
O estudo das variações na expressão de proteínas entre os géis foi realizado pela medida da intensidade do *spot* (pixels) tanto entre réplicas biológicas para cada tipo bacteriano como entre as condições estudadas. Essas intensidades foram expressas em termos de porcentagem de volume (% vol), definida como o volume do *spot* em relação à soma dos volumes dos *spot* em um gel, obtendo-se dessa forma uma normalização entre géis que possuam eventuais diferenças na intensidade geral dos *spots*. A comparação entre as réplicas de uma triplicata foi realizada duas a duas, sendo as intensidades de *spots* correspondentes foram plotadas em gráficos de dispersão (*Scatterplots*) (Figura 9 A). Para comparação entre as condições estudadas foram gerados gráficos de barras (histogramas).

O *software* oferece três testes estatísticos: ANOVA, Mann-Whitney U, e o teste de Kolmogorov-Smirnov. Estes testes são usados para analisar as diferenças em expressão da proteína (*spots*) entre as classes (condições) de géis, com o objetivo de obter informações relativas às alterações de expressão de proteína por extrapolação de informações a partir dos dados coletados. Para a análise dos dados deste trabalho foi utilizada a análise de variância (ANOVA) (Figura 9 C).

(A) Detecção dos *spots* (massa molecular e pI);



(B) Correspondência (*Matching*) dos *spots* entre as réplicas dos géis



(C) Análise de Classes entre os géis da condição estudada (*Xac/MNI vs Xau-CMNI*) e Análise estatística (ANOVA) para seleção de *spots* com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$).

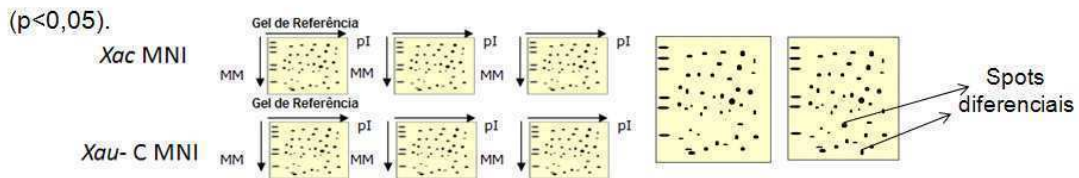


Figura 9: Esquema do procedimento de análise dos géis pelo *software* Image Master 2D Platinum. (A) Detecção dos *spots* das triplicatas biológicas, (B) correspondência dos *spots* entre as réplicas e (C) Análise de classes entre as condições e análise estatística.

3.6.3. Identificação de proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas

Os *spots* que apresentaram expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) entre as linhagens analisadas [*Xac* e *Xau-C*; *Xac* e *Xau-B* (Carnielli, 2010), obtidas nas duas condições de cultivo, em meio CN e XAM-1] foram isolados do gel e inseridos individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (*Axygen*), previamente lavados com metanol, água ultrapura e novamente com metanol.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas - LNBio, em Campinas, SP, com o auxílio das técnicas Bianca Pauletti, Thaís Dombroski e Romênia Ramos Domingues e sob coordenação da Dra. Adriana Franco Paes Leme. O procedimento prévio de descoloração dos *spots*, redução e alquilação das proteínas contidas nestes *spots*, tiveram a finalidade de preparação para a etapa posterior de hidrólise das proteínas com tripsina, como descrito a seguir.

Os *spots* foram descorados com 50% metanol e 2,5% ácido acético por 2h a temperatura ambiente, sendo este processo repetido por 1h. Após a desidratação em acetonitrila 100% por 5 min, por duas vezes, o restante foi evaporado em equipamento *Speedy Vac (BOC Edwards)*. Posteriormente, foi realizada a redução das proteínas com 10 mM DTT em 100 mM bicarbonato de amônio e posterior alquilação com 50 mM IAA em 100 mM bicarbonato de amônio (no escuro), por 30 min em cada etapa. Os *spots* foram lavados com bicarbonato de amônio por 10 min e novamente desidratados em acetonitrila (100%), por 5 min a temperatura ambiente. Após a reidratação com 100 mM bicarbonato de amônio por 10 min e novamente desidratação em acetonitrila (100%), este passo foi repetido. O restante da solução foi evaporada em *Speed Vac (BOC Edwards)*.

Então foi adicionada solução contendo 20ng/ μ L de tripsina em 50 mM bicarbonato de amônio gelado, por 30 min, para reidratação do gel, e o mesmo foi incubado *overnight* a 37°C para a ação da tripsina. Para a extração dos peptídeos do gel, os *spots* foram incubados por 10 min em 5% ácido fórmico, sendo posteriormente adicionado solução de 5% ácido fórmico em 5% acetonitrila, reagindo por 10 min a temperatura ambiente, por duas vezes. A amostra foi evaporada deixando cerca de 1 μ L, sendo ressuspensa em 0,1% ácido fórmico.

As amostras inicialmente foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa separadas em colunas de C18 (*Waters*) para separação dos peptídeos trípticos. Os peptídeos foram então analisados por um espectrofotômetro de massas *Q-Tof Ultima (MicroMass/Waters)*, com fonte de ionização *eletrospray (ESI)* (voltagem do capilar de 3,5 kV) e analisador quadrupolo/tempo de vôo em séries (*Q-Tof*) acoplado ao sistema de cromatografia. O controle do instrumento e aquisição dos dados foram realizados pelo *software MassLynx* (versão 4.1, *Waters*).

Os espectros MS/MS foram obtidos a partir da fragmentação dos íons precursores, sendo analisados por meio do *software Mascot (Matrix Science)*. Os parâmetros usados foram: valores de massas monoisotópicas dos espectros MS/MS (*MS/MS Ion Search*), carbamilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação da metionina como modificação variável. Na hidrólise por tripsina foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos MS e MS/MS foi de 0,1 Da. As buscas foram realizadas utilizando-se banco de dados não-redundante do *National Center for Biotechnology Information (NCBIInr)*, *SwissProt High* e de contaminantes (*Common contaminants compiled by Max Planck*

Institute of Biochemistry, Martinsried). Consideramos os peptídeos identificados quando o valor da pontuação (*score*) da comparação, calculado pelo Mascot, foi superior ao nível de significância de homologia extensiva ou identidade da proteína analisada com as proteínas de banco de dados.

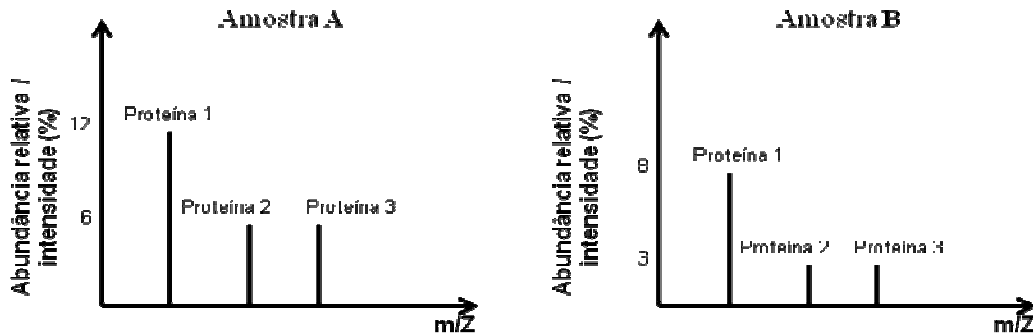
3.6.4. Quantificação pelo software Scaffold Q+ v. 3,0

As análises de espectrometria de massas realizadas nos *spots* isolados a partir dos géis 2D (ver resultados) evidenciaram que vários deles eram constituídos por mais de uma proteína. Para que as diferenças de intensidade dos *spots* entre as condições estudadas pudessem ser atribuídas à determinada proteína presente nesse *spot*, foi necessário quantificá-la por meio dos dados de espectrometria de massas.

Por meio da identificação e busca pelo *software* Mascot, foram gerados arquivos de saída em formato específico (.mgf), sendo convertidos em seguida para extensão .dat pelo mesmo *software*. Tais arquivos contêm agrupamentos dos espectros dos peptídeos que obtiveram *matching* com as várias proteínas no banco de dados. Estes arquivos foram analisados por meio do *software Scaffold Q + v. 3,0* (*Proteome Software, Portland, OR*), para a quantificação de cada proteína, utilizando contagens espectrais.

A contagem de espectros é atribuída à intensidade (abundância relativa) e um procedimento de normalização é realizado, pois as quantidades de espectros diferem para cada um dos *spots* (obtido em cada condição). Desta forma a normalização (**N**) baseia-se na média da soma do número de todos os espectros de peptídeos (**X**) entre as amostras analisadas [(*Xac vs Xau-C* em MNI e MI) e (*Xac vs Xau-B* em MNI e MI)] dividida pela soma do número de espectros (**Y**) de cada amostra biológica (MNI ou MI), multiplicando-se pela contagem de espectros para cada peptídeo (proteína) de cada amostra ou categoria.

Exemplo: Duas amostras biológicas A e B, cada uma delas apresentando 3 proteínas em comum: Proteína 1, 2 e 3.



Proteína 1: A: 12 espectros e B: 8 espectros;

Proteína 2: A: 6 espectros e B: 3 espectros;

Proteína 3: A: 4 espectros e B: 3 espectros;

W é a quantidade relativa (%) de uma proteína dentro de uma amostra

E é a abundância relativa ou intensidade (em %, eixo Y dos espectros) para cada proteína

Y é a soma do número de espectros de cada amostra: $Y_A = 22$ e $Y_B = 14$

X é a média do número de espectros entre as duas amostras: $X = 18$

N é o fator de normalização para cada proteína, dentro de cada amostra ($= X/Y$):

$$N_A = 18/22 \text{ e } N_B = 18/14$$

Portanto:

$$W = E \cdot \frac{X}{Y} \text{ ou } W = E \cdot N$$

Considerando os espectros mostrados como exemplos, teremos:

$$\text{Proteína 1- } W_A = 12 \cdot (18/22) \text{ e } W_B = 8 \cdot (18/14)$$

$$\text{Proteína 2- } W_A = 6 \cdot (18/22) \text{ e } W_B = 3 \cdot (18/14)$$

$$\text{Proteína 3- } W_A = 4 \cdot (18/22) \text{ e } W_B = 3 \cdot (18/14)$$

3.6.5. Validação da expressão das proteínas diferenciais das linhagens genômicas pela técnica de *Western blot*

Dos *spots* diferenciais analisados por espectrometria de massas, algumas proteínas foram identificadas como potencialmente relacionados à patogenicidade e gama de citros hospedeiros nas condições estudadas. Algumas destas proteínas foram selecionadas para validação do resultado por análise de sua expressão nas condições de

indução e não indução de patogenicidade *in vitro*, segundo a técnica de *Western blot* pelo uso de anticorpos específicos (*abcam*) para cada proteína selecionada.

Os extratos da fração de proteínas periplasmáticas das linhagens- genoma (XAC, Xau-B e Xau-C) (60 µg cada) foram previamente quantificados com o *Kit 2D-Quant* (*GE Healthcare*) e submetidas em duplicata à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 14%; Laemmli, 1970). A corrida foi realizada em sistema “Mini-Protean II” (Bio-Rad) em tampão 0,3% Tris, 1,5% glicina e 0,1% SDS sob voltagem constante de 110V, por 2 horas. O padrão de massa molecular usado foi o *High Range Rainbow* RPN76E (12 a 225 kDa) (*GE Healthcare*). Um dos géis foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, descorado com descorante (30% de metanol, 10% ácido acético glacial) e documentado.

O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (*GE Healthcare*), no sistema já citado, em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol e 0,1% SDS), a 300 mA durante 2 horas. A membrana foi corada com Ponceau (0,5% de Ponceau e 0,1% de ácido acético), lavada em água (um vez) e tampão de lavagem TBST (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl e 0,05% v/v de Tween-20, Sigma, acertado com HCl para pH 7,4) por 3 vezes durante 5 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* em solução de bloqueio (9% de leite em pó desnatado em tampão TBST), lavada 3 vezes em TBST e incubada por 2 horas com um dos anticorpos primários: **anti-superóxido dismutase** (anti-SOD2 humano policlonal/ coelho, código ab13533, *abcam*), em diluição 1:5000 em TBST e 3% de leite em pó e **anti-fosfoglicomutase** (anti-PGM1 *E. coli* monoclonal/ camundongo; código ab55616, *abcam*) em diluição 1: 100 em TBST e 3% de leite em pó. Em seguida a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 5 minutos em TBST e então incubada por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários (anti- IgG de coelho ou camundongo, respectivamente) em diluição 1:5000 em TBST e 3% de leite em pó (*kit ECL Western Blotting*, *GE Healthcare*). A membrana foi novamente lavada no mesmo tampão por 3 vezes durante 5 minutos e revelada com luminol (*kit ECL Western Blotting*, *GE Healthcare*) por 5 minutos. A detecção foi realizada em filme radiográfico *Hyperfilm ECL* no hipercassete de autoradiografia (*GE Healthcare*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento baseadas na contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foram realizadas visando verificar a viabilidade das células (coletadas para a análise proteômica) por meio da correlação da UFC com a DO_{595nm} . Os resultados são apresentados na Figura 10.

Para ambas as curvas baseadas em DO e UFC foi verificada uma correlação no ponto de recuperação da massa celular para a extração de proteínas (Figura 10, setas). Carnielle (2010), a partir da otimização do inóculo de 80 mL para o crescimento de *Xau-B* em meio CN e XAM-1, determinou por medidas de DO que o final da fase exponencial de crescimento (recuperação das células para extração) ocorria em aproximadamente 50 e 72 horas, respectivamente. Neste trabalho foi observado que as medidas de DO aqui obtidas foram equivalentes às daquela autora.

Para o experimento da curva de crescimento de *Xau-C*, repetiu-se o mesmo procedimento realizado por Fernandes (2010), a qual visava estabelecer as condições de cultivo para a extração de proteínas desta bactéria por meio de equivalentes a 20 mL e 60 mL dos pré-inóculos. Observou-se que, tanto para uma inoculação de menor volume (20 mL) quanto de maior volume (60 mL), os valores de DO_{595nm} atingiam o mesmo valor máximo ($D.O_{595nm}$ 0,4) no cultivo de *Xau-C* em 400 mL de XAM-1, como relatado por Fernandes (2010). Assim, foi estabelecido o cultivo com o pré-inóculo correspondente a 20 mL, o mesmo do cultivo de *Xac* (Figura 8A). No entanto, foi necessário, para garantir a obtenção de massa celular suficiente, o aumento do volume para um total de 1,2L (Figura8C).

As curvas de crescimento de *Xau-C* nos meios não indutor e indutor estão apresentadas na Figura 10, tendo sido acompanhadas por medidas de DO_{595nm} [Fig.10 (I) C₁] e UFC/mL [Fig.10 (I) C₂]. *Xau-C* apresentou melhor crescimento ([Fig.10 (I) C₁]) em meio não-indutor do que em meio indutor de patogenicidade, já que a DO_{595nm} máxima observada a 595 nm (no final da fase exponencial de crescimento) foi de aproximadamente 1,0 e 0,4, respectivamente, corroborando dados de Fernandes (2010) para o inóculo de 20 mL. Este fato evidencia que o meio indutor é um meio que não

satisfaz as condições ideais de crescimento da bactéria, comparativamente ao meio rico (CN). Estão em fase de conclusão as curvas de medidas de UFC para *Xau-C*, as quais não foram anteriormente realizadas por Fernandes (2010).

Mesmo para tempos maiores de cultivo (> 80h), não foi observado para *Xau-C* um aumento exponencial característico no meio XAM-1 (resultados não mostrados). Embora não evidenciado de maneira direta a viabilidades das células de *Xau-C* nas curvas de crescimento baseada em UFC/mL para o meio indutor, no ponto correspondente à DO_{595nm} no tempo de aproximadamente 48 horas, estas se encontravam viáveis. Este resultado evidencia a maior dificuldade de *Xau-C* de crescimento nesse meio, quando comparado ao crescimento de *Xac* no mesmo, conforme demonstra as curvas de crescimento para esta última, obtida nas mesmas condições, em ambos os meios [Fig.10 (I) A₁ e A₁].

Apesar da dificuldade de crescimento de *Xau-C* no meio XAM-1 (que é uma modificação do meio sintético XVM2 descrito por Wengelnick *et al.*,1996) e da ausência de uma fase logarítmica análoga à observada para *Xac* e *Xau-B* [Fig.10 (I) A₁ e B₂], ainda assim esse meio foi utilizado para crescimento de *Xau-C*, a fim de se manter as mesmas condições nas análises proteômicas comparativas entre os tipos de bactérias.

O meio XVM2 mimetiza os espaços apoplásticos do hospedeiro de *Xanthomonas campestris* subsp. *vesicatoria*, induzindo genes *hrp* quando essas bactérias são cultivadas neste meio. O meio XAM-1 foi descrito como sendo capaz de simular as condições intercelulares do hospedeiro de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, induzindo a expressão de genes *hrp* da bactéria (CARVALHO, 2006). Provavelmente, em *Xau-C* tal tipo de resposta (indução de genes *hrp*) provavelmente não é tão efetiva, mas não há trabalhos na literatura que de fato expliquem o comportamento de *Xau-C* nesse meio.

Por meio das curvas de crescimento por meio de medidas (Figura 10C) de *Xau-C*, pôde-se estabelecer as condições de cultivo da bactéria para a extração de proteínas para a análise proteômica. O cultivo da bactéria em meio XAM-1 (indutor) foi realizado em volume três vezes maior do que o volume do cultivo em meio CN (não indutor) (Fig. 10C), visto que *Xau-C* atinge em meio XAM-1 uma DO_{595nm} cerca de três vezes menor do que a DO_{595nm} em meio CN (Figura10). Isto possibilitou obter a mesma quantidade de células nos dois meios, no mesmo momento fisiológico (supostamente para *Xau-C*, em final da fase exponencial de crescimento – fase log).

(I)

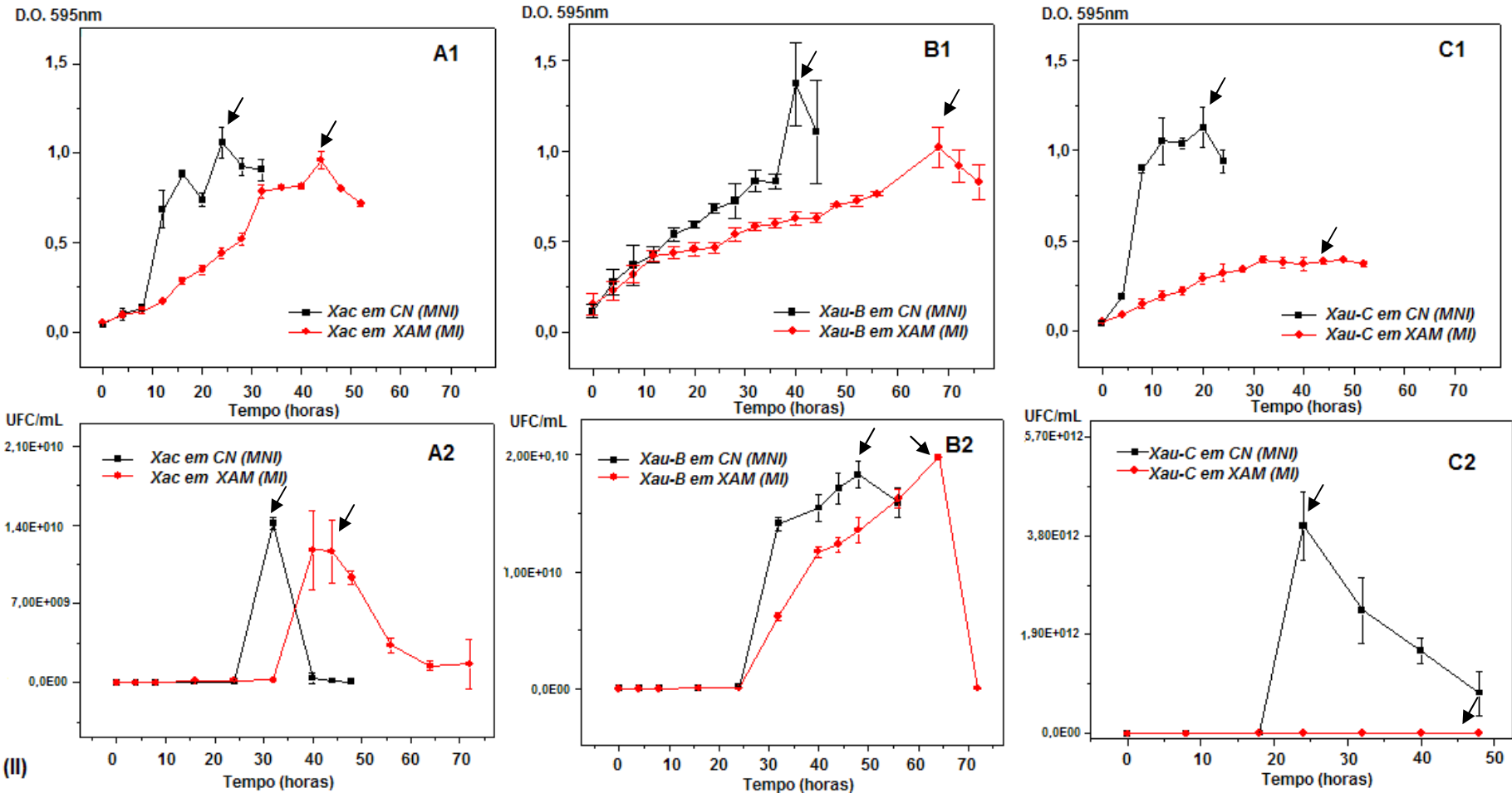


Figura 10: (I) Curvas de crescimento por medidas de D.O. (595 nm) de (A1) *Xac*, (B1) *Xau-B* e (C1) *Xau-C* em meio CN (—■—) e XAM-1 (—●—), sendo que as células foram recuperadas para extração de proteínas periplasmáticas nos pontos indicados pelas setas. Para os cultivos (400 mL), o pré-inóculo foi de 20 mL para *Xac* e *Xau-C* e de 80 mL para *Xau-B* e a incubação foi de 200 rpm e 28°C. Menores inóculos para *Xau-B* não produziram um crescimento satisfatório (Carnielli, 2010). (II) Curvas de crescimento baseada na contagem de UFC de (A2) *Xac* e (B2) *Xau-B* e (C2) *Xau-C* em meio CN (—■—) e XAM-1 (—●—) As setas indicam o ponto de recuperação para extração de proteínas periplasmáticas. Para os cultivos (400 mL), o pré-inóculo foi de 20 mL para *Xac* e *Xau-C* e de 80 mL para *Xau-B* e a incubação foi de 200 rpm e 28°C.

4.2.1. Comparação dos perfis protéicos em gel 2D

Inicialmente, optamos por refazer os géis da *Xac* anteriormente realizados por Artier (2010), em ambas as condições, para efeito de comparação com *Xau-C* devido a modificações no protocolo de extração para *Xau-C* em que foi substituído o coquetel inibidor de protease (*GE Healthcare*), utilizado por Artier (2010), pelo PMSF. Além disso, no procedimento de lavagens das células, retirou-se do respectivo tampão o NaCl, que constava do procedimento utilizado por essa autora, na tentativa de melhorar a resolução do gel 2D. Assim, a comparação proteômica entre as linhagens foi realizada sob as mesmas condições de extração das proteínas periplasmáticas, pois este também foi o procedimento adotado por Carnielli (2011) para extração de proteínas de *Xau-B*.

Adotando-se as modificações citadas, realizaram-se então as respectivas extrações da fração celular enriquecida em proteínas periplasmáticas das bactérias *Xac* e *Xau-C*, as quais foram separadas por eletroforese bidimensional, resultando nos perfis protéicos apresentados nas figuras 11 e 12. Já os perfis de *Xau-B* (Carnielli, 2011), comparativamente à *Xac*, estão representados nas figuras 13 e 14.

Para a realização dos experimentos de comparação dos perfis protéicos, a linhagem *Xau-C* e a linhagem *Xau-B* foram cultivadas em meio não indutor de patogenicidade (CN) e em um meio descrito como indutor de patogenicidade para *Xac* (XAM-1), pois induz a expressão de genes *hrp* nesta bactéria. Embora o fato do meio XAM-1 não ter sido descrito na literatura como comprovadamente indutor de patogenicidade para *Xau-C* e *Xau-B*, e sim, apenas para *Xac*, este meio foi usado também para aquelas duas linhagens para fins de comparação com *Xac*.

Os perfis destacados nas figuras 11 e 12 em triplicatas foram adquiridas usando o *ImageScanner* (*GE Healthcare*) em resolução de 300 dpi. A intensidade (% volume), massa molecular e ponto isoelétrico foram obtidos para cada *spot* de proteína utilizando-se o *Software ImageMasterTM 2D Platinum 7.0* (*GE Healthcare*).

Foi possível notar a presença de inúmeros *spots* diferenciais entre as duas bactérias, quando cultivadas no mesmo meio (CN ou XAM-1), sendo alguns *spots* encontrados somente em *Xac* e outros apenas em *Xau-C*. Embora aparentemente alguns *spots* sejam comuns às duas bactérias (quando submetidas a uma mesma condição de crescimento), seus perfis apresentam um acentuado grau de diferenciação.

Para a comparação *Xac* e *Xau-B*, foram utilizados os géis de *Xau-B* obtidos por Carnielli (2011) (Figuras 13 e 14) nos quais foi possível notar, assim como para os *spots*

diferenciais entre *Xac* e *Xau-C*, alguns *spots* comuns às duas bactérias (quando submetidas a uma mesma condição de crescimento), bem como vários que foram específicos de cada uma delas.

A tabela 3 apresenta o número de *spots* diferencialmente expressos ($p < 0,05$), alguns presentes apenas em cada uma das linhagens e outros comuns entre elas, encontrados pela análise de ANOVA realizada pelo *software Image Master Platinum v. 7,0 (GE Healthcare)*. Um total de 1024 e 756 *spots* (totais) foram detectados por esse *software* para a análise comparativa entre *Xac* e *Xau-B* nos meios CN e XAM-1 respectivamente, enquanto que 624 e 490 *spots* (totais) foram detectados para a análise *Xac* e *Xau-C* nos respectivos meios.

Tabela 3: Número de *spots* (totais ou diferencialmente expressos) detectados nos géis 2D da fração periplasmática, nas comparações dos perfis de *Xau-B* e *Xau-C* relativamente a *Xac* (análise pelo *software Image Master Platinum v. 7,0, GE Healthcare*).

<i>Nº Spots</i>	Condição de cultivo	Exclusivos de <i>Xac</i> ou <i>Xau-B</i>	Exclusivos de <i>Xac</i> ou <i>Xau-C</i>	Comuns entre <i>Xac</i> e <i>Xau-B</i>	Comuns entre <i>Xac</i> e <i>Xau-C</i>
Diferenciais* ($p < 0,05$)	CN (MNI)	27/29	25/17	2	1
	XAM-1 (MI)	13/22	04/08	7	0

* Os *spots* foram diferenciais em termos de presença/ ausência (exclusivos das linhagens) ou diferiram em intensidade (quando foram comuns entre as linhagens); os *spots* diferenciais ($p < 0,05$) foram analisados por espectrometria de massas (Tabelas 1 a 4, do Anexo II)

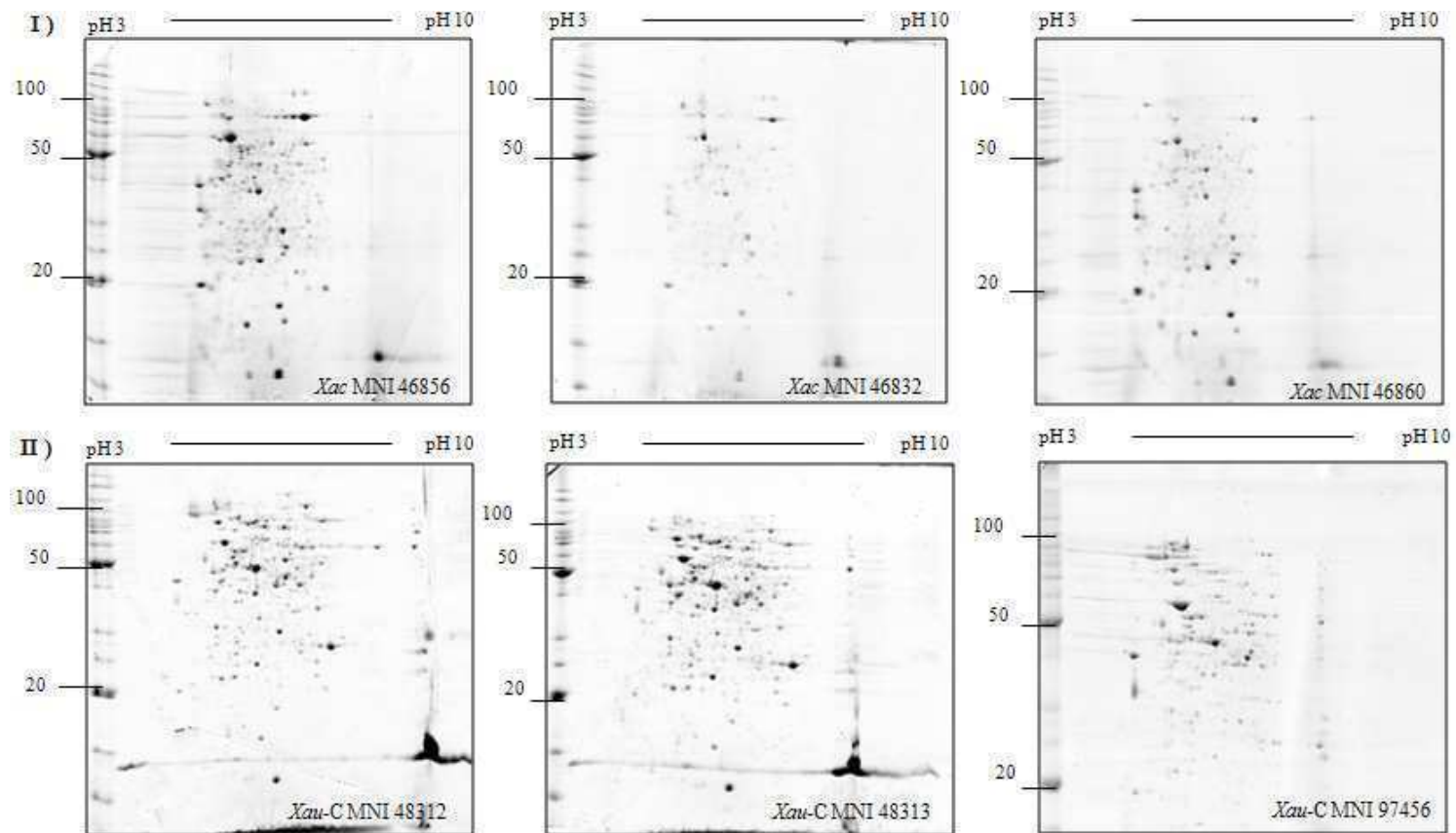


Figura 11: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-C* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **Caldo Nutriente (CN), um meio não indutor de patogenicidade (MNI). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner™* (*GE Healthcare*) em resolução de 300 dpi.**

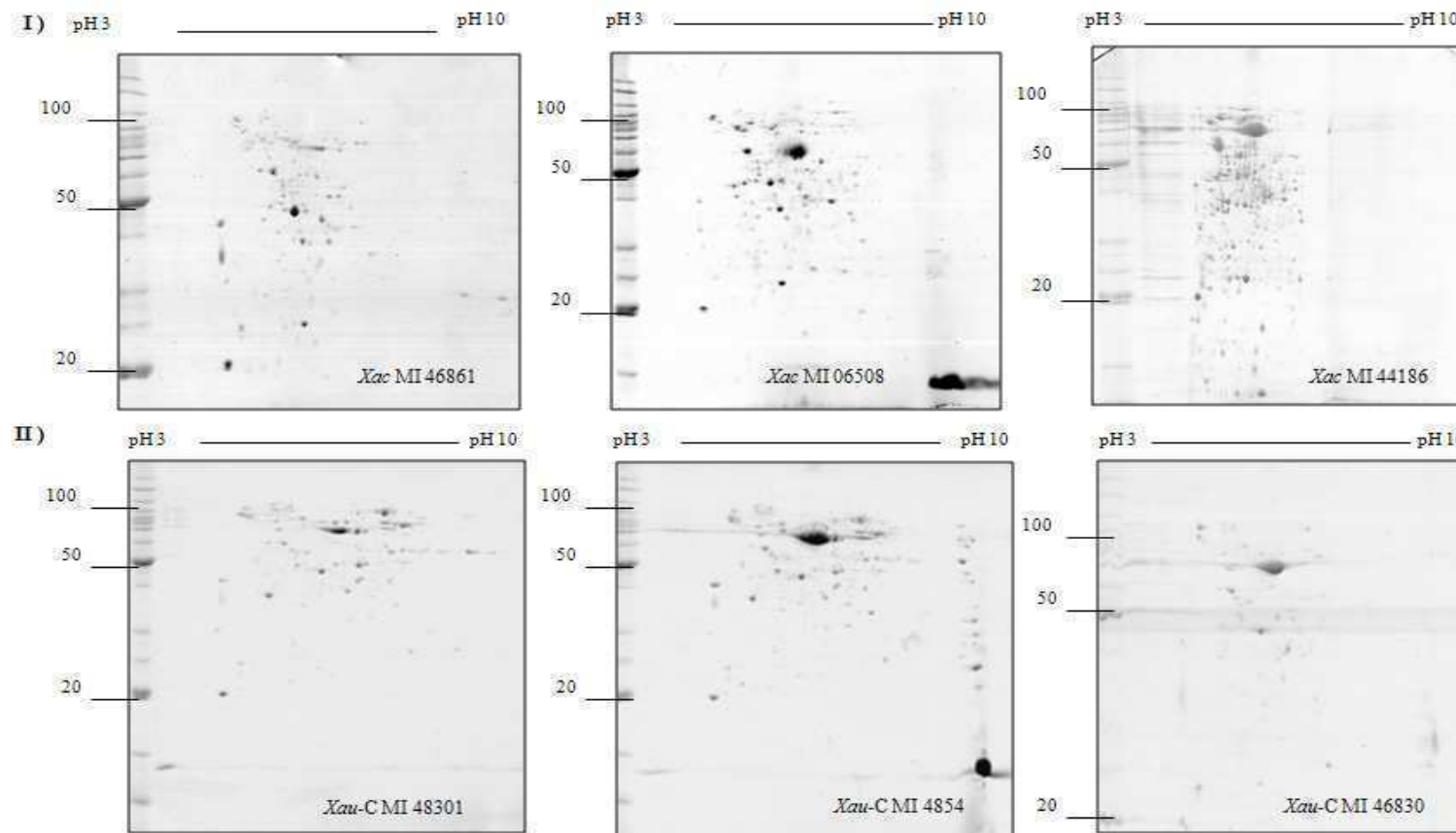


Figura 12: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-C* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **XAM-1, um meio indutor de patogenicidade (MI). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner™* (*GE Healthcare*) em resolução de 300 dpi.**

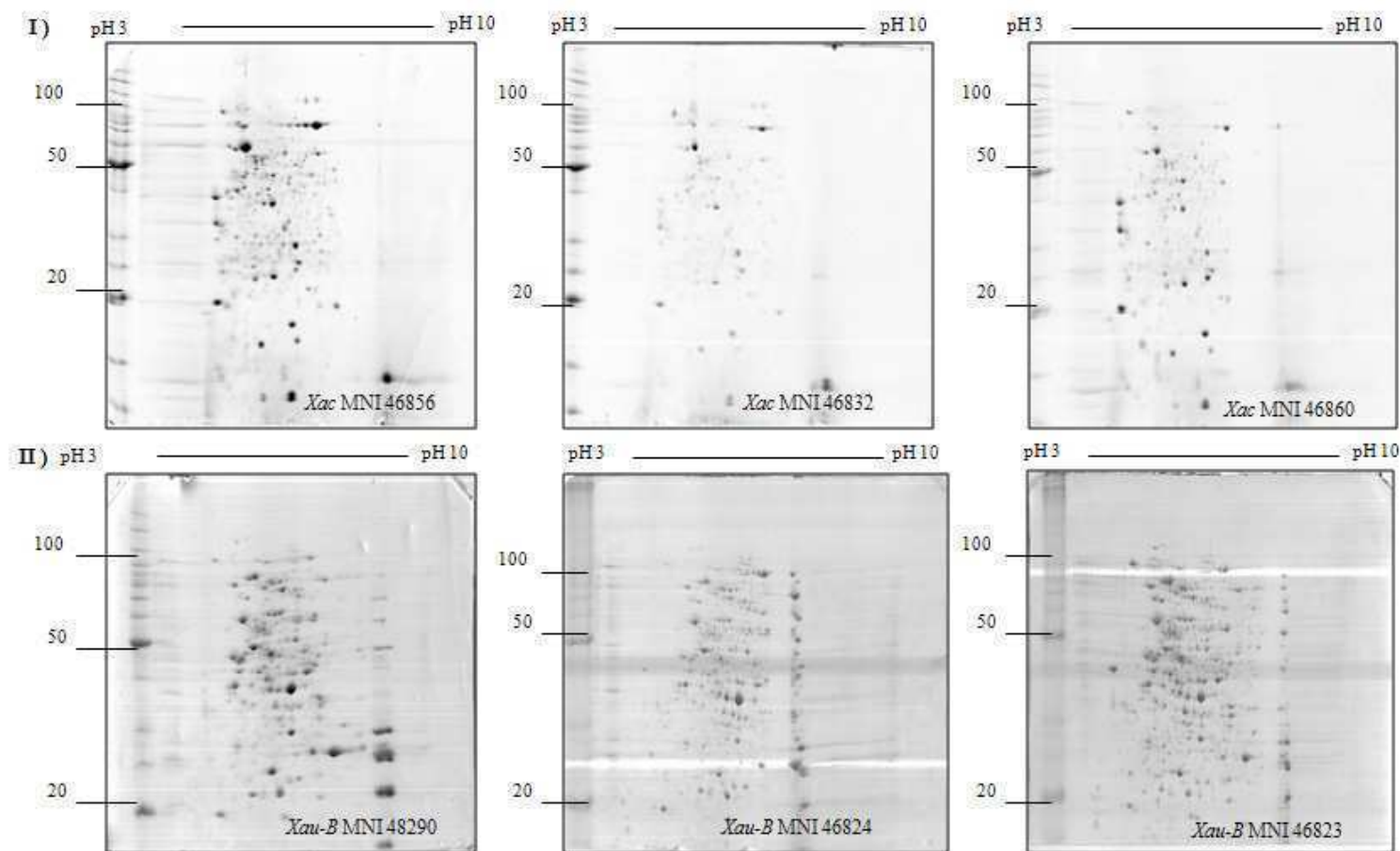


Figura 13: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-B* (II), após a separação de 260 µg por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **Caldo Nutriente (CN), um meio não indutor de patogenicidade (MNI)**. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScanner (GE Healthcare)* em resolução de 300 dpi.

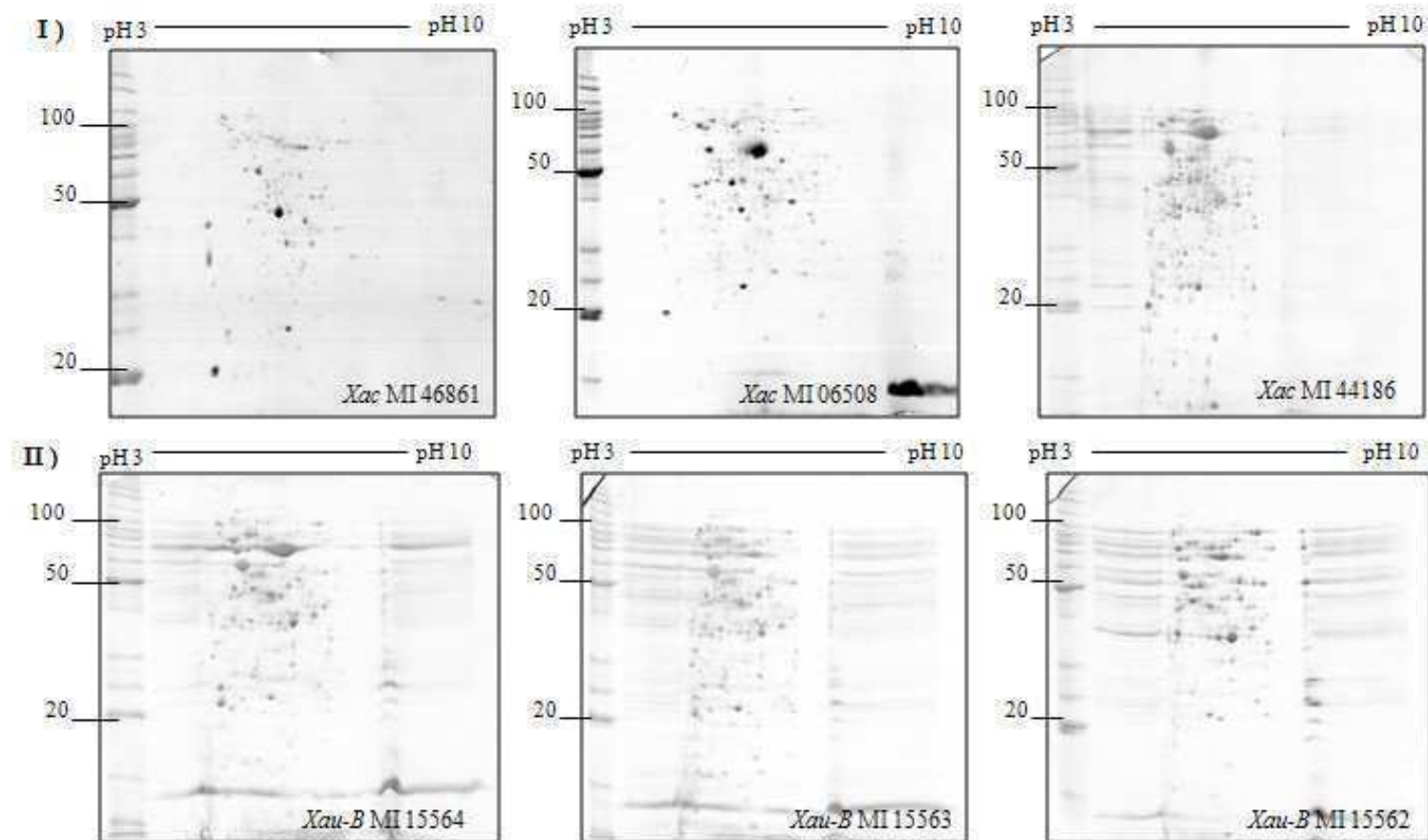


Figura 14: Perfis protéicos da fração periplasmática de *Xac* (I) e *Xau-B* (II), após a separação de 260 μ g por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os três perfis correspondem a réplicas biológicas de proteínas periplasmáticas extraídas a partir de células cultivadas em **XAM-1, um meio indutor de patogenicidade (MI). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas usando o *ImageScannerTM* (*GE Healthcare*) em resolução de 300 dpi.**

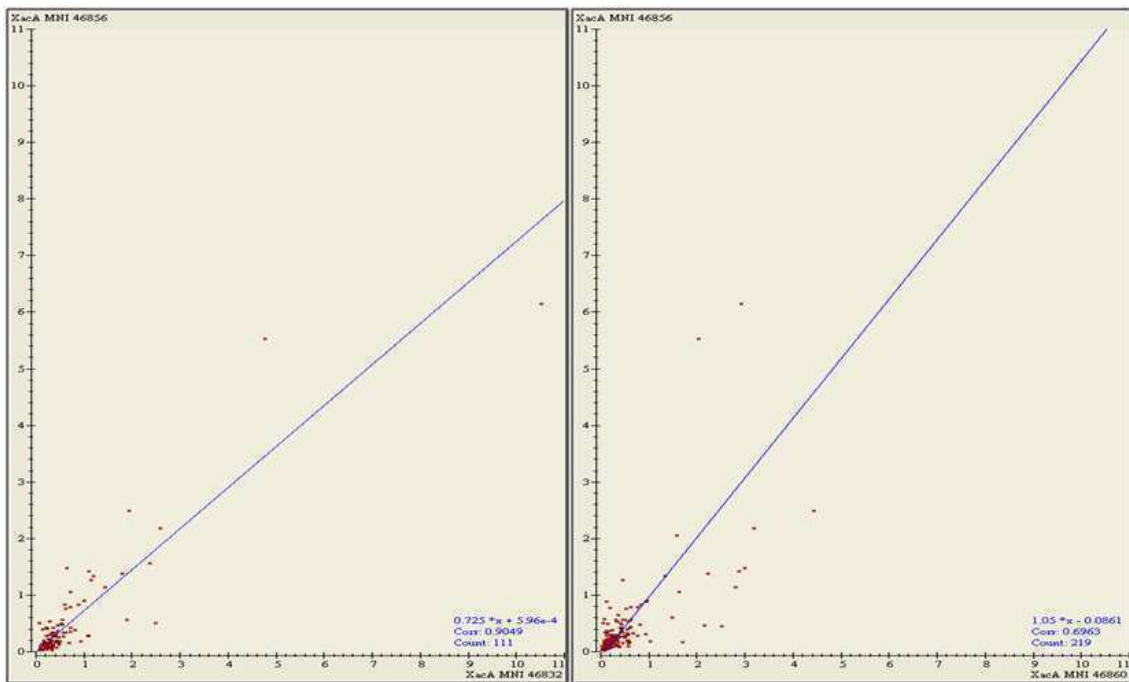
A reprodutibilidade das triplicatas dos géis de *Xac* e *Xau-C* em cada meio de cultivo (CN e XAM-1) pode ser verificada a partir dos gráficos de dispersão ou *scatter plots* (Figura 15 para *Xac* e 16 para *Xau-C*). As correlações apresentaram valor a partir de 0,8. Para *Xac*, Artier (2010) obteve valores de correlação a partir de 0,71. A mesma reprodutibilidade e correlações foram verificadas por Carnielli (2011), para as triplicatas dos géis de *Xac* e *Xau-B*.

Cerca de um total de 624 *spots* foram detectados pelo *software ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare)* para as bactérias *Xac* e *Xau-C*, e 1082 para *Xac* e *Xau-B*, na mesma condição de não indução (CN). Analogamente, 490 e 756, respectivamente, foram detectados para o meio de indução de patogenicidade (XAM-1). Dentre estes *spots* diferenciais apenas os que apresentaram valor de ANOVA dentro dos limites de significância estatística ($p < 0,05$) foram isolados para a identificação de proteínas por espectrometria de massas (Tabela 2, Anexo II). O aumento no *zoom* de alguns *spots* na triplicata pode ser observado nas figuras 17 (*Xac vs Xau-C* em CN), 18 (*Xac vs Xau-C* em XAM-1), 18 (*Xac vs Xau-B* em CN), e 19 (*Xac vs Xau-B* em CN) e 20 (*Xac vs Xau-B* em XAM-1), bem como os respectivos valores de média e desvio padrão da intensidade (% volume) destes *spots* (considerando-se a triplicata).

Os histogramas de cada *spot* diferencial mostram as variações de expressão para as duas bactérias em comparação, quando cultivadas no mesmo meio (CN ou XAM-1) (figuras 17 a 20). Embora existam variações entre as três réplicas de uma mesma condição de cultivo (meio indutor e não indutor), essas variações são ainda maiores entre as condições evidenciando que os *spots* representados pelos histogramas são significativamente diferenciais entre os dois tipos de meio.

De uma maneira geral, estas diferenças são evidenciadas quando observamos lado a lado os mesmos géis para *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* (Figura 21), dessa forma podemos concluir que os perfis (para cada condição CN e XAM) apresentados para ambas as bactérias, entre elas e entre as condições de estudo, diferenciam-se, apenas *Xau-B* e *Xau-C* apresentam alguma similaridade, o que é esperado pelo fato de ambas estarem classificadas atualmente como pertencentes à mesma espécie, diferentemente da *Xac*.

A)



B)

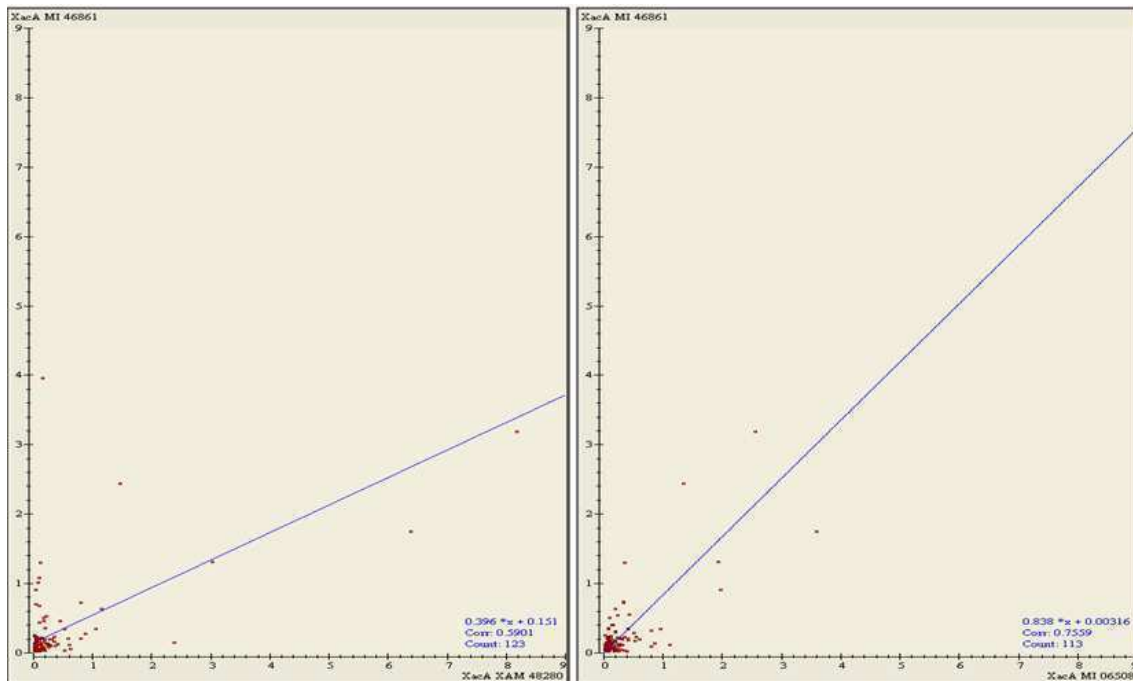
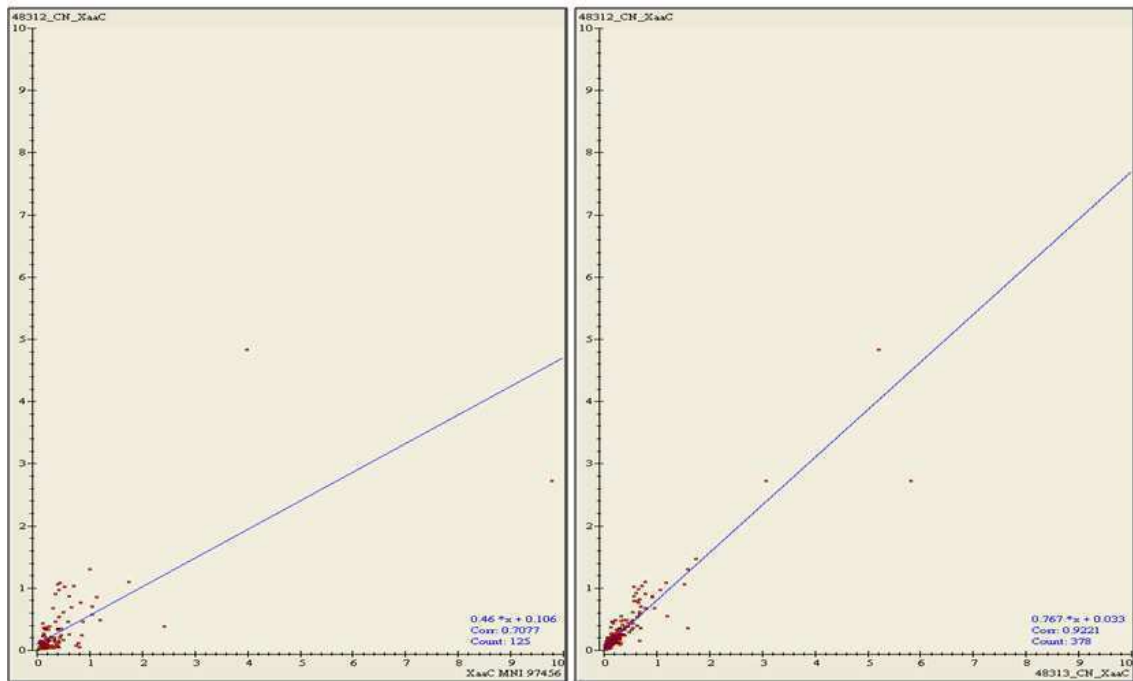


Figura 15: Scatter plots (%volume vs % volume) entre as réplicas dos géis 2D de proteínas periplasmáticas de *Xac*, após cultivo em meio não indutor de patogenicidade (A) e meio indutor de patogenicidade (B). Os géis foram obtidos em triplicata e comparados dois a dois.

A)



B)

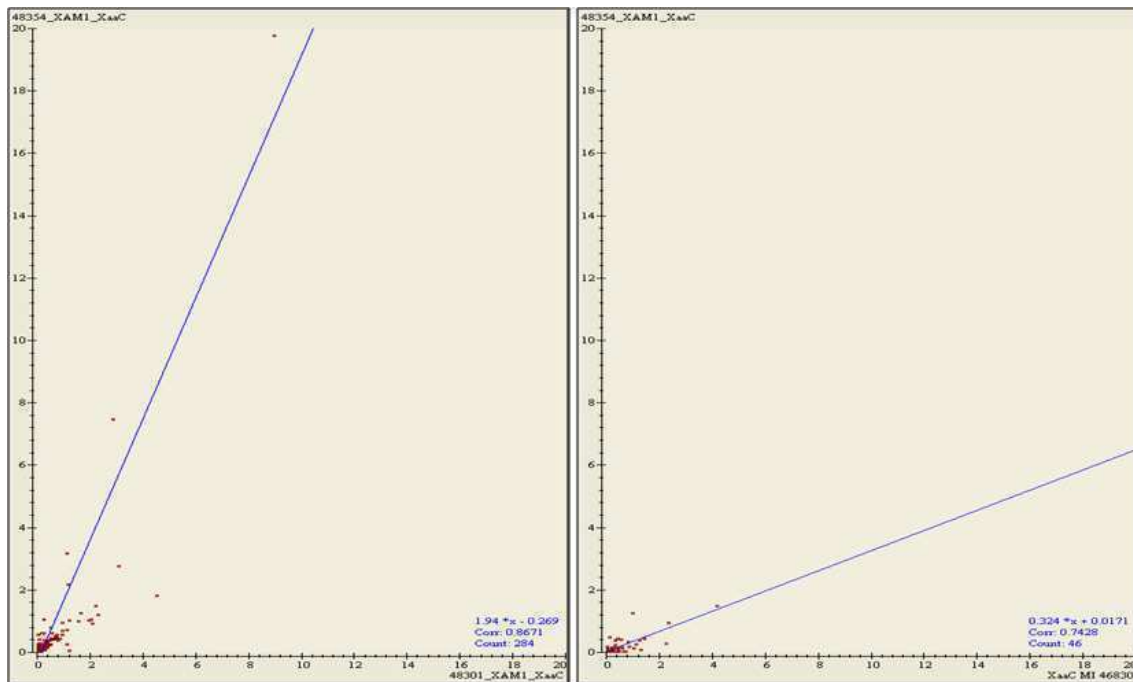
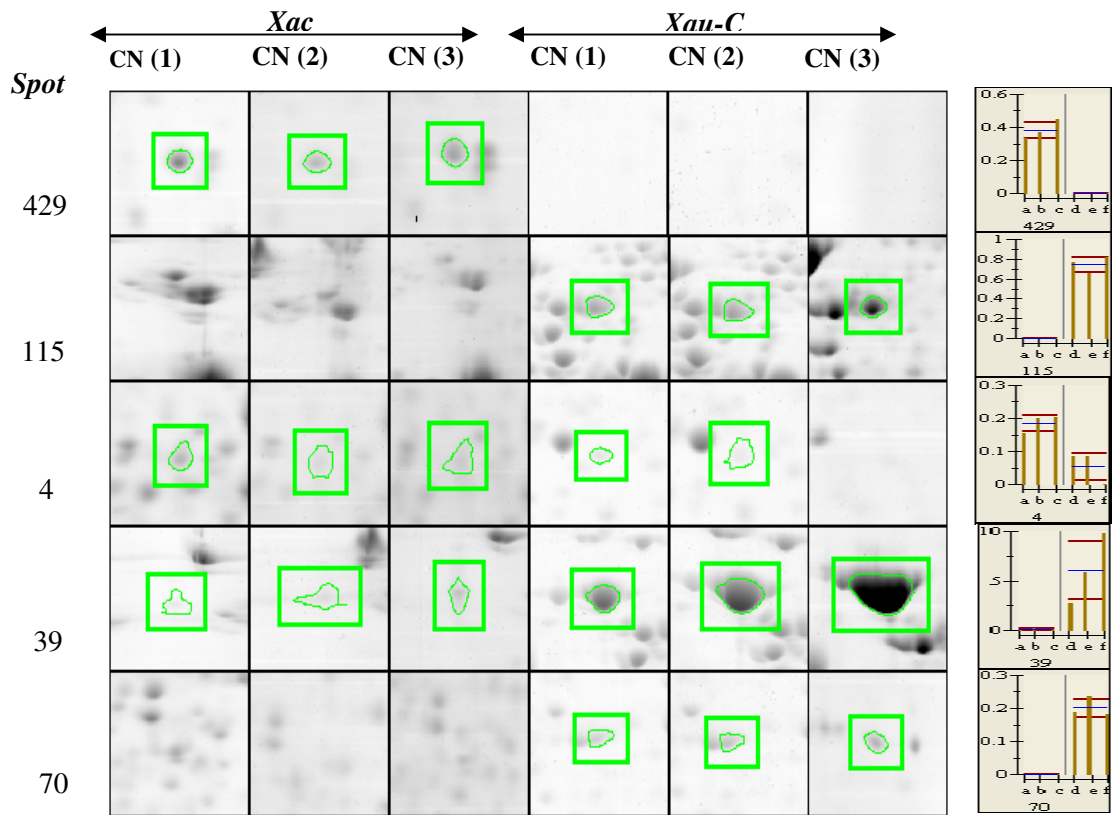


Figura 16: Scatter plots (%volume vs % volume) entre as réplicas dos géis 2D de proteínas periplasmáticas de *Xau-C*, após cultivo em meio não indutor de patogenicidade (A) e meio indutor de patogenicidade (B). Os géis foram obtidos em triplicata e comparados dois a dois.



Figura

17: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-C*, cultivadas em meio não indutor de patogenicidade.** Os *spots* 4 e 39 foram observados em ambas as bactérias. Os *spots* 429, somente em *Xac*, enquanto os *spots* 115 e 70 são expressos somente em *Xau-C* (Anexo III, Tabela 1 e 2). Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-C*. A linha azul representa a média e as linhas vermelhas os valores mínimo e máximo do desvio padrão.

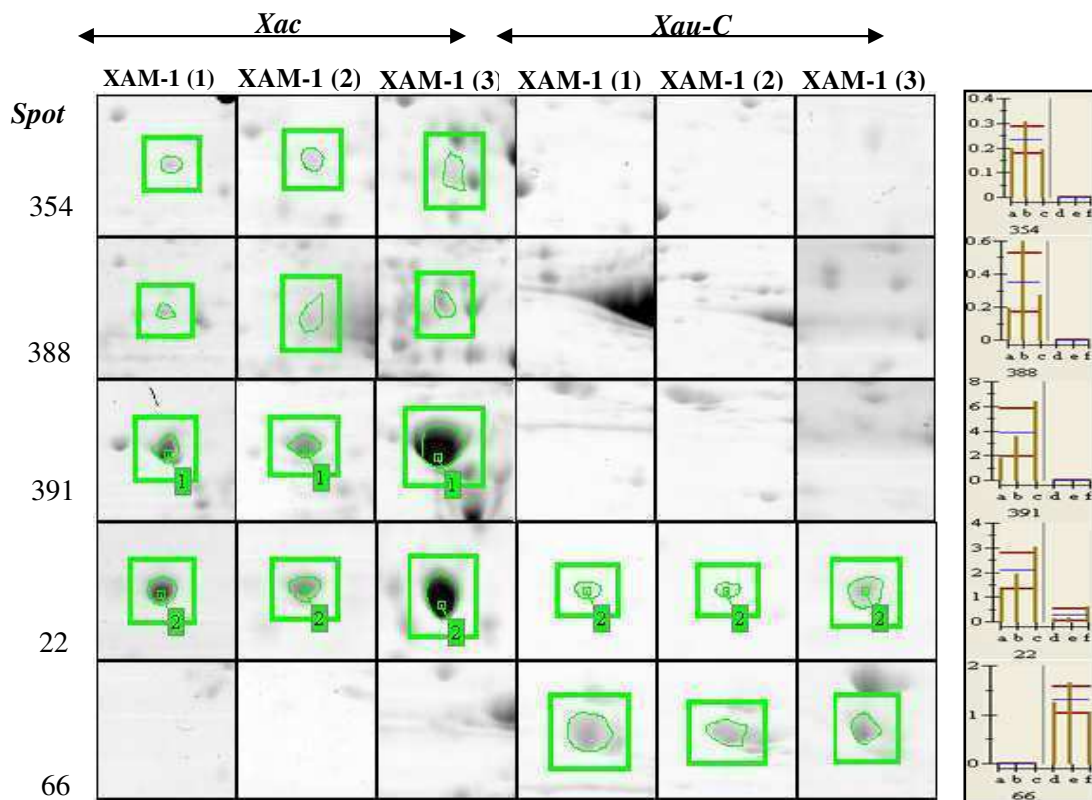


Figura 18: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-C*, cultivadas em meio indutor de patogenicidade.** O *spot* 22 foi observado em ambas as bactérias. Os *spots* 354, 388 e 391 (Anexo II, Tabela 1) aparecem somente em *Xac*, enquanto o *spot* 66 (Anexo II, Tabela 2) é expresso somente em *Xau-C*. Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-C*. A linha azul representa à média e as linhas vermelhas o valor mínimo e máximo do desvio padrão.

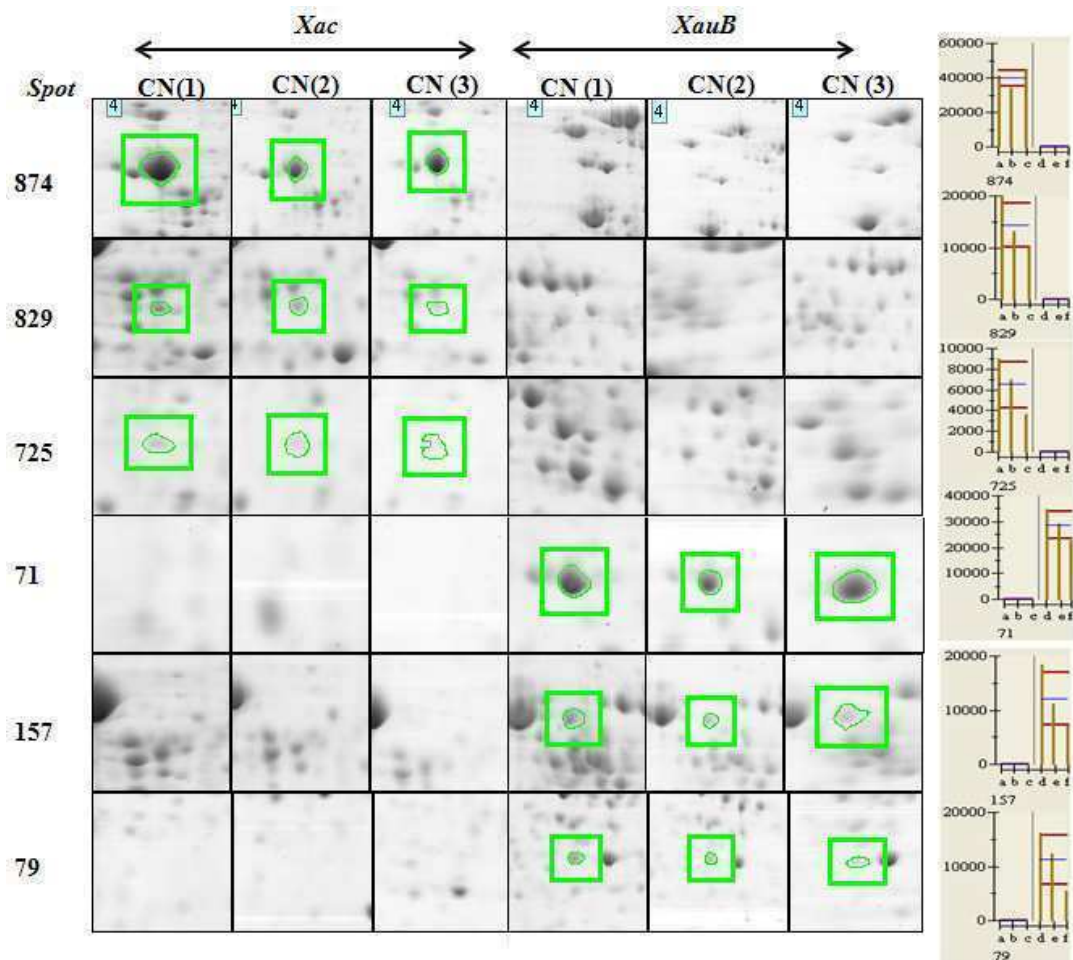


Figura 19: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-B*, cultivadas em meio não indutor de patogenicidade.** Os *spots* 874, 829 e 725 aparecem somente em *Xac*, enquanto os *spots* 71, 157 e 79 são expressos somente em *Xau-B* (Anexo III, Tabela 3 e 4). Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-B*. A linha azul representa à média e as linhas vermelhas o valor mínimo e máximo do desvio padrão.

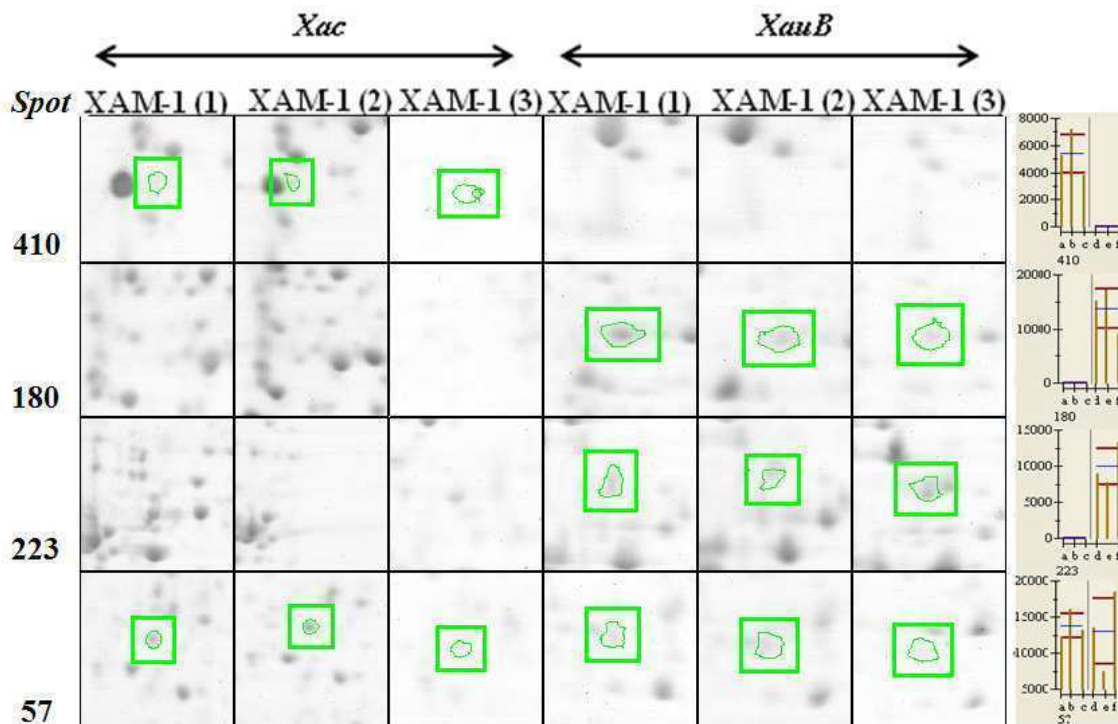


Figura 20: Ampliação de alguns *spots* que se mostraram diferencialmente expressos **entre *Xac* e *Xau-B*, cultivadas em meio indutor de patogenicidade.** Os *spots* 57 (Anexo II, Tabela 3) foram observados em ambas as bactérias. Os *spots* 180 e 223 (Anexo II, Tabela 4) apareceram somente em *Xau-B* bem como o *spot* 410 em *Xac*. Os histogramas ao lado mostram a média da intensidade (expressa em % volume) e os desvios-padrão da triplicata de cada *spot* diferencial. As letras a, b e c indicam as réplicas de *Xac* e as letras d, e, e f indicam as réplicas de *Xau-B*. A linha azul representa à média e as linhas vermelhas o valor mínimo e máximo do desvio padrão.

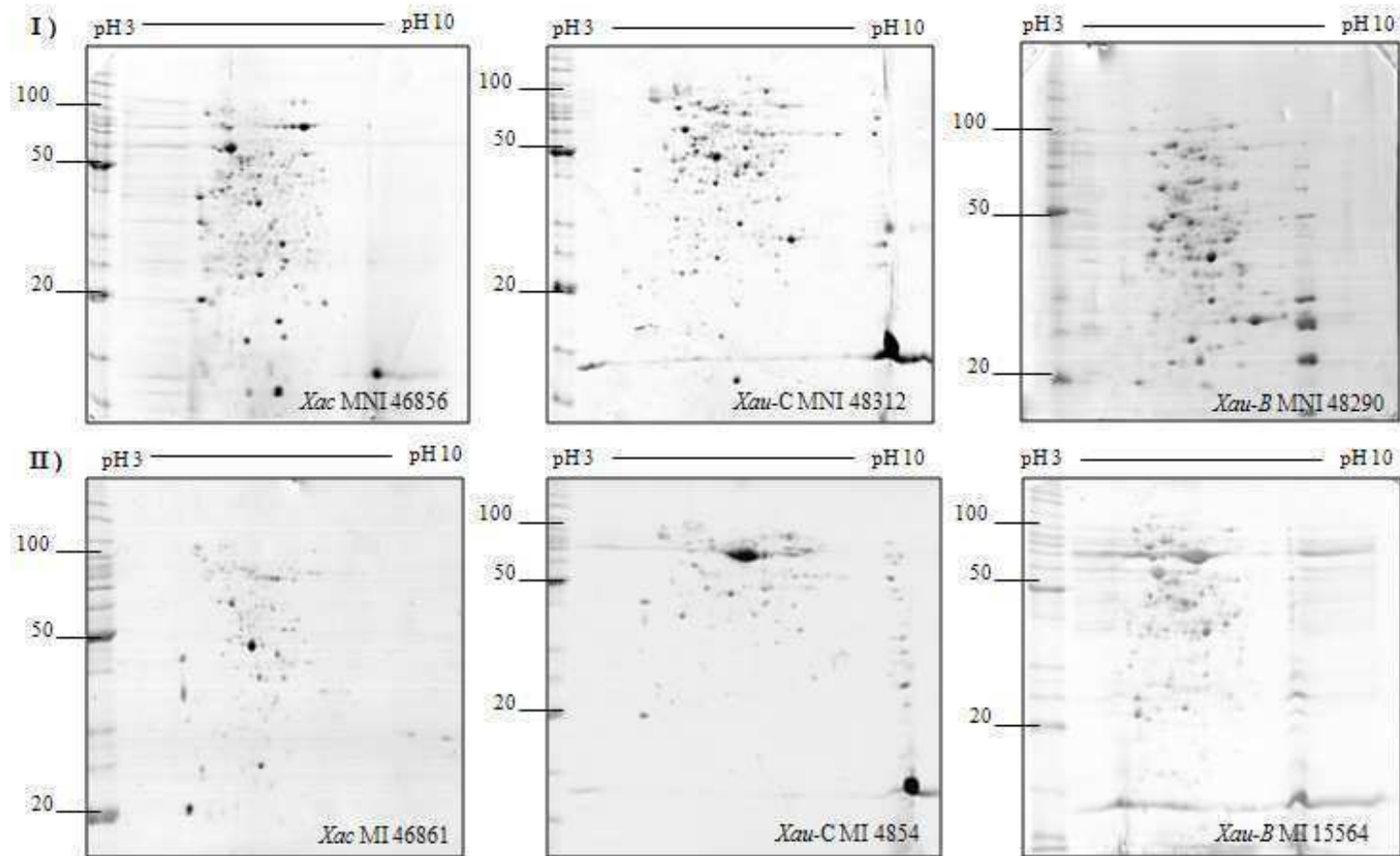


Figura 21: Perfis de proteínas periplasmáticas (260 µg) extraídas a partir de células cultivadas em **(I)** Caldo Nutriente (CN) ou meio não indutor (MNI) ou em **(II)** XAM-1 ou meio indutor de patogenicidade (MI) para *Xac*, *Xau-B* (Carnielli, 2011) e *Xau-C*, após a separação por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Os três perfis correspondem a uma das réplicas biológicas obtidas. À esquerda de cada imagem está representado o padrão de peso molecular em kDa (*Benchmark, Invitrogen*) e na parte superior, a faixa de pH. Imagens adquiridas com o *ImageScannerTM* (*GE Healthcare*) em resolução de 300 dpi.

4.2.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massa e categorização funcional.

Dos *spots* dentro do valor de significância (segundo teste de ANOVA realizado pelo *software*, com $p < 0,05$) um total de 146 *spots* (Tabela 2 do AnexoII, total de *spots* diferenciais) com expressão diferencial entre *Xac* e *Xau-C* e entre *Xac* e *Xau-B* (cultivadas no mesmo meio CN ou XAM-1) (Anexo I, figuras Suplementares 1 a 4), foram selecionados e analisados por espectrometria de massa (LC/MS-MS). Tais análises foram realizadas no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (ABTLuS/MCT) do LNBio-Laboratório de Massas (Campinas-SP), sendo os resultados obtidos confrontados pelo *software* Mascot com banco de proteínas anotadas a partir da sequência genômica de cada bactéria (NCBI). Estas proteínas estão apresentadas nas Tabelas de 1 a 4 do anexo II para as bactérias cultivadas no meio de indução de patogenicidade. Nestas tabelas são apresentadas apenas proteínas que apresentaram a maioria das seguintes características: concordância do pI e da massa molecular da proteína do banco (“teórica”) e da posição da proteína no gel 2D, score relativamente alto, número de peptídeos detectados para a proteína ser preferencialmente maior que 1.

A partir da identificação dos *spots* tanto para *Xau-C* quanto para *Xau-B*, pelo *software* Mascot, foi necessária a categorização funcional das proteínas pelo *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Main Chromosome Gene and Plasmid List (<file:///C:/DOCUME~1/User/CONFIG~1/Temp/Gene%20List%20categorias.htm> e <file:///C:/DOCUME~1/User/CONFIG~1/Temp/Plasmid%20Gene%20List%20categorias.htm>). Entretanto esta lista é baseada no gene ID e no produto gênico para esta bactéria, os quais diferem para as estirpes. Assim, foi realizada uma análise de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para proteínas (BLASTp) identificadas para *Xau-C* e *Xau-B*, em ambas as condições de cultivo, contra o banco de proteínas anotadas a partir do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 (*X. citri* subsp. *citri*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/geblast.cgi?gi=242>) a fim de se adotar os mesmos critérios de classificação contidos nesta lista.

Com base nos resultados obtidos nas análises dos géis 2D, coletamos todos *spots* diferenciais com significância estatística ($p < 0,05$), entre as bactérias *Xac/Xau-C* e *Xac/Xau-B* cultivadas sob as mesmas condições, para análise por espectrometria de massas. Foram detectados 43 *spots* diferenciais para a condição *Xac/Xau-C*-MNI, 11

spots para *Xac/Xau-C*-MI, 85 *spots* para *Xac/Xau-B*-MNI e 42 para *Xac/Xau-B*-MI (Tabela 2). Destes, pela busca em banco de dados das respectivas bactérias utilizando o *software* Mascot, apresentaram *score* satisfatório proteínas de 11 *spots* para a condição *Xac/Xau-C* MI (Anexo II, Tabelas 1 e 2), 35 para *Xac/Xau-B* MI (Anexo II, Tabelas 3 e 4), 37 para *Xac/Xau-C* MNI (Anexo III, Tabelas 1 e 2) e 81 *Xac/Xau-B* MNI (Anexo III, Tabelas 3 e 4).

As proteínas que apresentaram identificação significativa (*score* maior que o limite de significância) a partir das análises por espectrometria de massas, com proteínas de *Xac*, *Xau-C* e *Xau-B* quando testados com seus respectivos bancos de dados, foram analisadas e categorizadas para melhor compreendermos a dinâmica estabelecida pelo o conjunto de proteínas nas condições específicas (não patogenicidade e patogenicidade). Vários *spots*, ainda que aparentemente isolados, apresentam mais de uma proteína identificada, mas com massas moleculares e *pI* muito próximos (Tabelas Suplementares 1 a 4 dos Anexos II e III).

4.2.3. Proteínas identificadas na análise diferencial entre *Xac* e *Xau-C*.

De acordo com a categorização funcional das proteínas identificadas por espectrometria neste trabalho para *Xac/Xau-C* e *Xac/Xau-B* nos meios CN e XAM-1, foi construído um histograma que demonstra o porcentual de proteínas para cada categoria identificada (relativamente a todas as proteínas diferenciais identificadas para cada bactéria) dentro de cada respectiva condição de cultivo (Figuras 22 e 23). Pôde-se observar, para *Xac/Xau-C*, entre as duas condições de cultivo, que as proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário, à biossíntese de pequenas moléculas e metabolismo macromolecular apresentaram diminuição no meio XAM-1 para ambas as bactérias (figura 22). Já as proteínas associadas a processos celulares, hipotéticas (para *Xac*) e patogenicidade, tiveram um aumento para os meios XAM-1.

Pelo fato do meio XAM-1 (indutor de patogenicidade) ser a condição que melhor se aproxima da situação infectante (*in vivo*), as proteínas diferencialmente expressas neste meio foram consideradas como particularmente interessantes do ponto de vista biológico, razão pela qual uma discussão a elas direcionada é realizada a seguir.

Do total de 14 *spots* levados para análise de massas para *Xac* e *Xau-C* em XAM-1, cultivadas respectivamente por 24 e 48 h, 11 *spots* foram identificados contra o

banco de dados para suas respectivas bactérias (Tabelas 1 e 2 do Anexo II). Destes, 2 *spots* diferenciais para *Xac* (tabela 1 do Anexo II) foram identificadas como sendo proteínas relacionadas ao espaço periplasmático, segundo a localização predita pelo *software* pSortB v.3.0, como a XAC2386 (superóxido dismutase), está relacionada à categoria funcional VII (Patogenicidade, Virulência e adaptação). Esta mesma proteína foi identificada no *spot* 8 de *Xau-C* o qual apresentava menor intensidade quando comparado com o *spot* 4 (de *Xac*) no qual foi identificado esta mesma proteína.

XAC2386 (superóxido dismutase) foi identificada para *Xac* e *Xau-C*, bem como para *Xau-B*, em meio indutor e de não indução. Esta mesma proteína que possui função antioxidante, transformando superóxidos em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio, foi encontrada por Artier (2010) com seus níveis de expressão aumentados em *Xac* sob indução de patogenicidade (XAM-1).

Além desses 2 *spots* (tabela 1 do AnexoII) foram identificadas proteínas com localização predita não relacionada ao periplasma bem como a outras categorias funcionais (não relacionadas à Patogenicidade, Virulência e adaptação).

A proteína XAC0542, encontrada apenas em *Xac* relativamente à *Xau-C* e referida como sendo a chaperonina 60 kDa ou *GroEL*, pertence à classe de proteínas responsáveis pelo *folding* e *refolding* de outras proteínas sob condições de estresse, estando associada à renaturação de proteínas intracelulares.

Embora não pertencente ao espaço periplasmático, segundo *pSortP v3.0*, nem à categoria relacionada à patogenicidade, Ranford (2000) demonstrou que as chaperoninas 10 kDa e 60 kDa podem ser encontradas na superfície de inúmeras células procarióticas e eucarióticas, podendo até mesmo ser secretadas. A presença da chaperonina de 60 kDa na superfície de células bacterianas pode estar relacionada com aspectos de virulência, como demonstrado por Gardunõ (1998) cujos resultados mostraram que essa proteína em *Legionella pneumophila* medeia a invasão em células hospedeiras animais, e além disso, desempenha um papel de reorganizar o tráfego de organelas nas células hospedeiras.

4.2.4 Proteínas identificadas na análise diferencial entre *Xac* e *Xau-B*.

Dentre os 35 *spots* levados para análise de massas para *Xac* e *Xau-B* em XAM-1, cultivadas respectivamente por 24 e 72 h, todos foram identificados contra bancos de dados para suas respectivas bactérias. Observando-se a categorização funcional das proteínas de *Xac* e *Xau-B* nos meios CN e XAM-1 (figura 23), cujas intensidades estão representadas em porcentagem como do total de proteínas identificadas para *Xac* e *Xau-C* (item 4.2.3., tabela 20), pôde-se verificar aumento significativo das proteínas hipotéticas, ou seja, com funções desconhecida, para ambas as bactérias no meio XAM-1, bem como as de patogenicidade para *Xac*, exceto para *Xau-B* que manteve os níveis de identificação em relação à condição de não indução, CN.

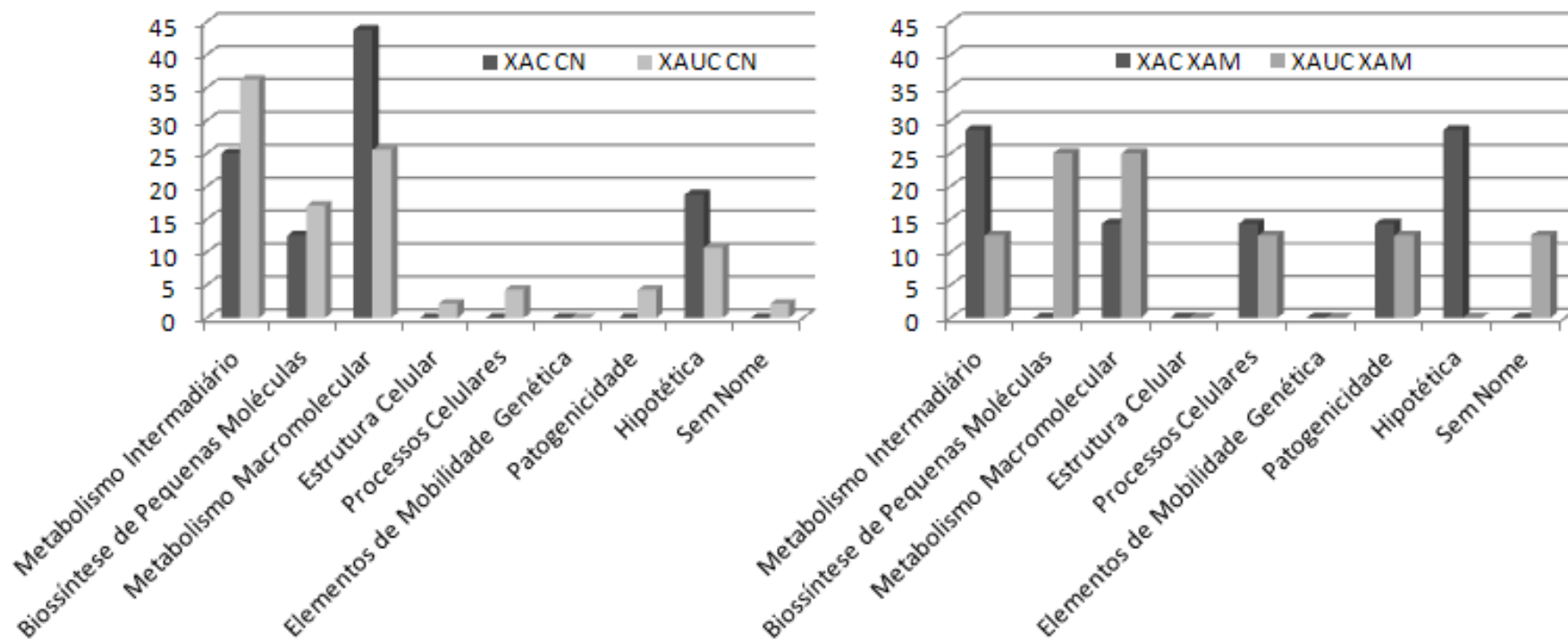


Figura 22: Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas identificadas por ESI-QUAD-Tof/ Mascot, a partir de seus perfis diferenciais entre as duas condições de cultivo (CN e XAM). As categorias funcionais utilizadas foram as descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. Nos gráficos estão evidenciadas apenas as categorias identificadas no subproteoma diferencial periplasmático entre ambas as bactérias cultivadas sob a mesma condição.

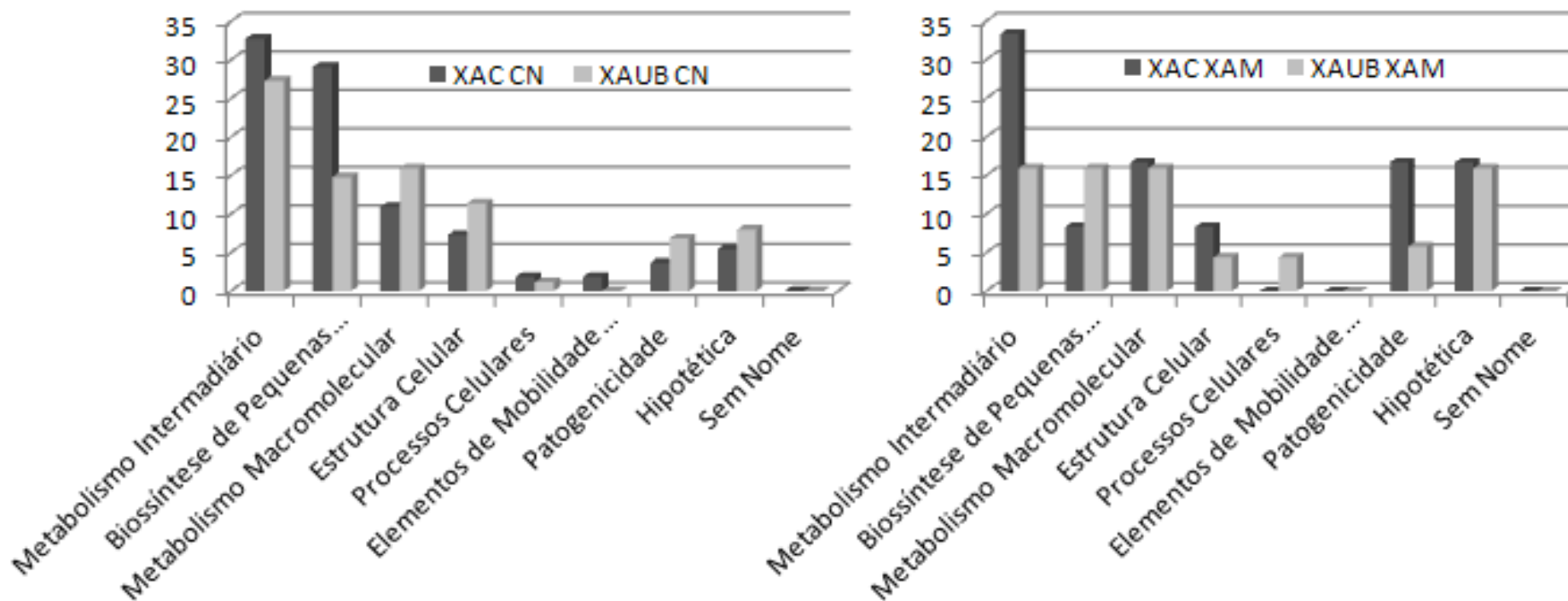


Figura 23: Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas identificadas por ESI-QUAD-Tof/ Mascot, a partir de seus perfis diferenciais entre as duas condições cultivo (CN e XAM). As categorias funcionais utilizadas foram as descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. No gráfico estão evidenciadas apenas as categorias identificadas no subproteoma diferencial periplasmático entre ambas as bactérias cultivadas sob a mesma condição.

Os *spots* nos quais identificamos proteínas cuja localização correspondesse ao espaço periplasmático, que foram induzidas em *Xac* e *Xau-B* em meio de indução de patogenicidade, respectivamente, foram *Phosphoglucomutase/ phosphomannomutase* (*spot 3/* Tabela 3- Anexo II) pertencente à categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) e *carbamoyl-phosphate synthase large subunit* (*spot 3/* Tabela 4- Anexo II) categoria II (biossíntese de pequenas moléculas).

Entretanto, foi detectada a presença de proteínas que tiveram suas localizações celulares não relacionadas com o espaço periplasmático, mas que por outro lado, com estreita relação aos eventos de patogenicidade (categoria VII), como: *TolC protein* (*spot 3/* Tabela 3- Anexo II), *NonF-related protein* (*spot 4 /* Tabela 4- Anexo II) (localização desconhecida) e *GDP-mannose pyrophosphorylase* (*spot 5 e 22/*tabela 4- Anexo II) .

A proteína *Phosphoglucomutase/ phosphomannomutase* (XAC3579), identificada para a bactéria *Xac* em meio indutor (XAM-1) (*spot 3/* tabela 3- Anexo II), está envolvida com a síntese e utilização de glicogênio, e é responsável pela conversão de D-glicose- 1P para D-glicose- 6P, bem como apresenta relação à síntese de goma xantana e biossíntese de nucleotídeos UDP- glicose e GDP-manose em *X. campestris* subsp *campestris* (KÖPLIN *et al.*, 1992). Esta mesma proteína foi identificada por Artier (2010) quando realizou estudos no qual foi verificado aumento da expressão desta proteína quando a bactéria *Xac* foi cultivada em XAM-1, relativamente ao meio CN.

TolC protein, também encontrada apenas para *Xac* (em relação a *Xau-B*) em meio de indução (XAM-1) (*spot 3/* Tabela 3- Anexo II), é uma proteína helicoidal transperiplasmática, bem caracterizada em bactérias Gram-negativas, sendo um constituinte do SSTI o qual não está relacionado com o espaço periplasmático, isto é, as proteínas que são translocadas por este sistema são exportadas diretamente sem passar pelo periplasma. Entretanto, para Koronakis *et al.* (2004) em *E. coli* sua expressão é intensificada nas condições de estresse ambiental (presença de detergentes, sais biliares e solventes orgânicos), desempenhando a função de expulsão de toxinas de natureza protéica e produtos antibacterianos, a partir da célula. *TolC* é, portanto, chave no problema crescente de resistência a múltiplas drogas e é importante para o sobrevivência de agentes patogênicos durante infecções. No entanto, ainda não é possível saber ao certo sua relação com a maior patogenicidade de *Xac*.

Para as proteínas diferenciais de *Xac* cultivadas sob condição de patogenicidade (XAM-1) (Tabela 3), relativamente à *Xau-B*, isto é, proteínas induzidas somente para

Xac em XAM-1, *Phosphoglucomutase/ phosphomannomutase* (XAC3579) e *TolC protein* (XAC3463) estão relacionadas à categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) e aparentemente estão associadas aos distintos graus de virulência entre os patógenos *Xac* e de *Xau-B*.

Phosphoglucomutase/ phosphomannomutase (XAC3579) e *TolC protein* (XAC3463) foram identificadas no extrato total (FANCINCANI, 2007) durante o processo de infecção, bem como no estudo de proteínas diferenciais de *Xac* relacionadas com a indução da patogenicidade *in vitro* Artier (2010). Nossos resultados demonstram que, em *Xau-B*, menos patogênica, tais induções não acontecem, o que pode nos levar a concluir que a ausência de indução de XAC3579 e XAC3463 em *Xau-B* sob mesma condição, o que nos fornece informações em relação a sua menor patogenicidade frente a *Xac*. Da mesma forma que as proteínas exclusivas de *Xac*, em relação às proteínas exclusivas de *Xau-B* cultivadas sob condição de patogenicidade (XAM-1) (Tabela 3), foram identificadas as proteínas como *NonF-related protein* e *GDP-mannose pyrophosphorylase* relacionadas à categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação).

Segundo Smolka *et al.* (2003), *NonF-related protein* esta envolvida na produção de policetídeos, conhecidos como metabólitos secundários precursor de coronatina, fitotoxina relacionada com aumento de virulência, severidade da doença, clorose na folhas, alterações no metabolismo e na célula do hospeiro (BENDER and RANGASWANY, 1999), e encontrava-se abundantemente presente tanto na extrato de célula completa e na fração extracelular nos estudos proteômicos de *Xylella fastidiosa*. Outra dado interessante é que coronatina é uma molécula indutora de abertura estomatal, fazendo com que ao serem sintetizadas permitam o acesso das bactérias ao interior da planta já que diferente de fungos, que conseguem atravessar a superfície foliar facilmente, as bactérias precisam encontrar caminhos abertos – naturais ou provocados por ferimentos – para colonizar tecidos internos (MELOTTO, 2006).

NonF-related protein, umas das proteínas encontradas como diferencial para *Xau-B* (somente em *Xau-B*) quando cultivada em MI, é uma proteína destinada à síntese de um indutor de abertura estomatal das células hospedeiras. Provavelmente as células de *Xau-B* necessitam dessa estratégia para que possam ter acesso ao apoplasto do hospedeiro.

Na biossíntese de GDP-manose, *GDP-mannose pyrophosphorylase* (GMPP) é uma enzima responsável pela manutenção da organização e integridade da parede

celular, pois sua atividade é fundamental para a formação GDP-manose, um precursor para os resíduos de manose para galactomanano, glicoproteínas e para a molécula âncora fosfatidilinositol (JIAN *et al.*, 2008). Segundo Jian *et al.* (2008), a ativação de manose necessita de três enzimas: *isomerase phosphomannose* e *phosphomannomutase*, estas se encontram mais induzida em *Xac* em relação à *Xau-B* em meio indutor, e *GDP-manose pyrophosphorylase* (GMPP). Estudos em mutantes para o gene *Afsrb1* em *Aspergillus fumigatus*, codificador de GMPP, mostraram-se em condições de cultivo aumento significativo de lises celulares, tornando-se sensíveis à antifúngicos. Só não sabemos como explicar no momento porque tais proteínas relacionadas a patogenicidade foram mais expressas em *Xau-B*, menos patogênica que *Xac*.

Embora não saibamos da especificidade funcional das proteínas (acima descritas) no processo de patogênese, já que muitas destas dependem de uma relação proteína-proteína, na instalação da doença, no grau de virulência de cada linhagem, bem como a especificidade ao hospedeiro, sua detecção nas condições estudadas de alguma forma nos fornecem indícios do seu envolvimento com os processos de patogenicidade, virulência, adaptação e de especificidade a hospedeiros.

Por este trabalho, pudemos observar que algumas proteínas identificadas como sendo expressas por *Xac* apenas em condição de patogenicidade (XAM-1), não o foram em *Xau-B* e *Xau-C*, na mesma condição. Para proteína fosfoglicomutase, embora não detectada a sua expressão em *Xau-C* em ambas as condições de cultivo, o gene correspondente estava presente em seu genoma e possuem alta similaridade com os genes de *Xac*, como evidenciado por alinhamento das sequências (resultados não mostrados).

4.2.5. Quantificação das proteínas pela contagem espectral

Os itens 4.2.3 e 4.2.4 evidenciaram as proteínas identificadas na análise diferencial entre as bactérias em estudo *in vitro*, particularmente aquelas potencialmente relacionadas à virulência e especificidade de hospedeiro. Entretanto, não foi possível até então fornecer dados relativos à expressão específica de cada uma das proteínas, pois, como podemos observar nas tabelas 1 a 4 (Anexo II e III) em vários casos mais de uma proteína foi identificada em cada um dos *spots*. Assim, mesmo conhecendo-se a constituição de proteínas de cada um, não se pôde definir e até mesmo diferenciar a contribuição dada por cada proteína à quantidade de coloração (ou intensidade) do *spot* (EIDHAMMER, 2007).

Por esta razão, optou-se pela utilização de ferramentas computacionais que nos pudessem fornecer aspectos quantitativos da análise proteômica deste trabalho, por meio da interpretação dos dados de espectrometria de massas. O *software Scaffold Q+* (Proteome Software, Portland, OR) é uma ferramenta muito utilizada em experimentos de proteômica quantitativa, pois possibilita que amostras diferentes possam ser comparadas por meio do uso das informações de abundância relativa correspondente à variação de peptídeos dentro e entre cada amostra.

A partir dos arquivos de saída em formato específico (.dat) provenientes dos dados processados no *software* Mascot, os espectros de massas de cada uma das condições estudadas foram analisados por meio do *software Scaffold Q + v 3,0*. Nesse sentido, foi possível quantificar as principais proteínas diferencialmente expressas para as bactérias cultivadas sob a mesma condição e reconstruir histogramas quantitativos relacionados às proteínas de interesse (Figura 24).

Podemos observar no gráfico de barras (Figura 24) que para a condição de indução patogenicidade [Fig.24 (2) e (4)] houve aumento da representatividade de proteínas associadas à virulência (Anexos II, Tabelas 1 a 4) e/ ou aumento dos níveis de expressão [Fig.24 (4)].

Neste ponto iremos discutir os níveis de expressão para as proteínas *superoxidase dismutase*, *chaperonin GroEL* e *phosphoglucomutase*, pois foram proteínas que nos despertaram grande interesse como descrito no itens 4.2.3 e 4.2.4 e foram as únicas proteínas cujos anticorpos comerciais foram testados para validação de seus níveis de expressão.

De acordo com as análises em relação à intensidade (% volume) de *spots*, aqueles no qual identificamos a proteína *superoxidase dismutase* para *Xac/Xau-C*, diferiram em relação à intensidade (% volume de 1,92 e 1,3, respectivamente em XAM-1). Entretanto, de acordo com os resultados das análises de massas mais de uma proteína foi identificada para *Xac* (Anexo II, tabela 1/ *spot* 4), ao contrário do verificado para *Xau-C* (Anexo II, tabela 2/ *spot* 8) no qual a proteína era única. Com as análises realizadas no *software Scaffold*, verificamos que *Xau-C* apresentava maior nível de expressão da superóxido dismutase [Fig.24(2)] em relação à *Xac*, embora o *spot* apresentasse menor intensidade.

A *chaperonin GroEL*, como discutido nos itens anteriores, é uma proteína relacionada com enovelamentos de proteínas na região citoplasmática. Em sistemas Sec-dependentes, existem chaperoninas que são subunidades destes sistemas e apresentam a função de controlar o enovelamento de proteínas no sentido de aumentar a eficiência de suas exportações (LEWIN, 2009). A expressão de GroEL foi diferencial principalmente nas comparações entre *Xac* e *Xau-B*, tanto para a condição de indução como não indução de patogenicidade [Fig. 24 (1) e (2)]. Embora presente em um *spot* que foi diferencial entre *Xac* e *Xau-C* (em MI, anexo II), na análise de quantificação pelo *Software Scaffold* essa variação não ficou evidente [Fig.24(2)]. Isto pode significar que tal proteína pode estar mais relacionada com o aspecto de virulência do que de especificidade de hospedeiro.

Conclusão análoga sobre a relação com virulência pode ser inferida para a *Phosphoglucomutase/ Phosphomannomutase*, identificada apenas para *Xac* (em relação à *Xau-B*), e principalmente em MI, e corroborando as diferenças de intensidade dos *spots* dos géis bidimensionais. Níveis elevados foram observados, segundo os cálculos realizados no *software Scaffold*, para *Xac* em MI [Fig. 24 (4)].

Embora o papel da esterase não seja compreendido, sua expressão diferencial é evidente para *Xau-C* em relação à *Xac*, tanto em MNI como em MI, o que não acontece entre *Xac* e *Xau-B* (Fig. 24). Isto pode ser sugestivo do seu possível envolvimento numa restrição de hospedeiros cítricos, o que também pode ser concluído para a superóxido dismutase.

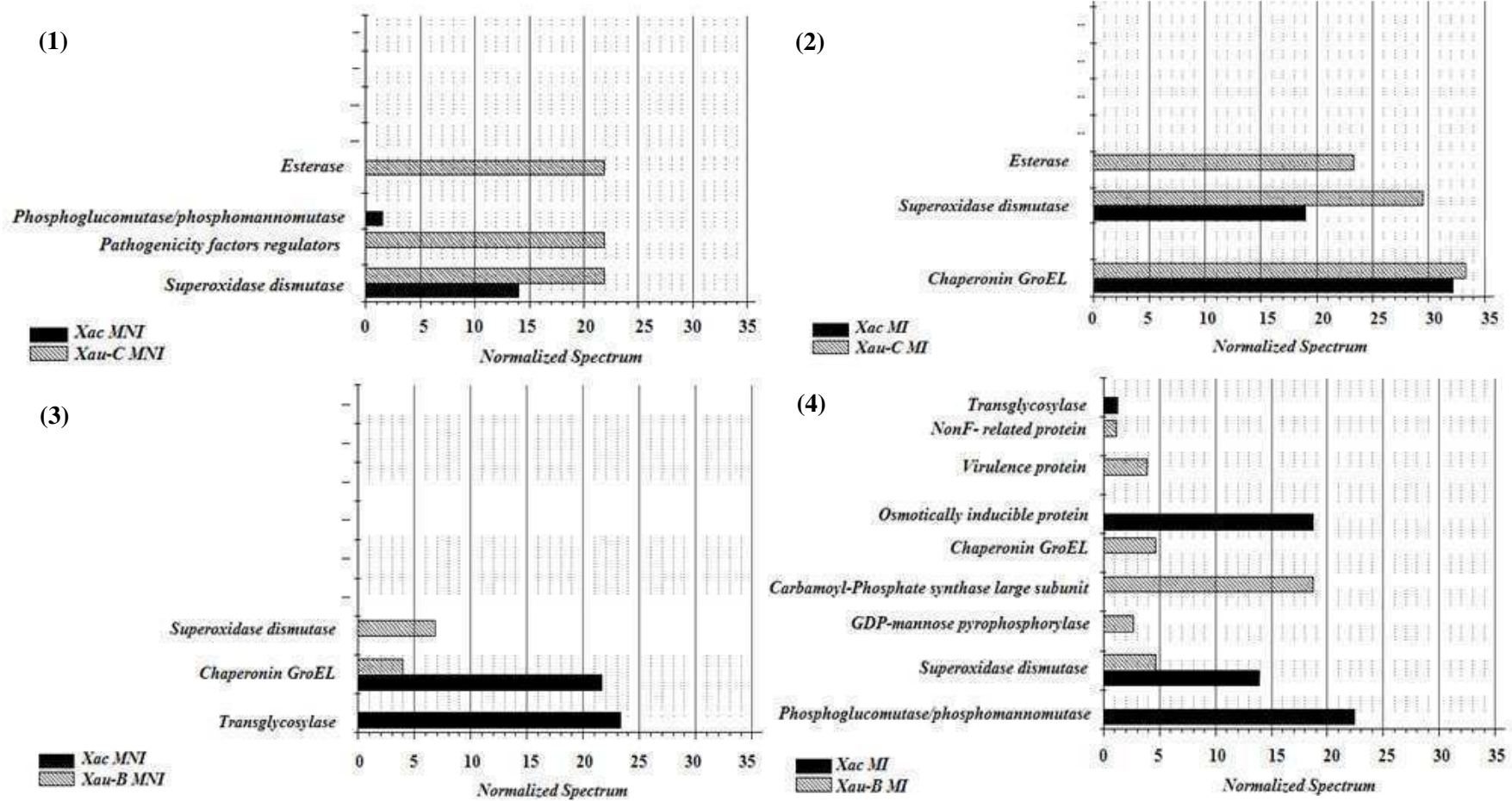


Figura 24: Níveis de expressão relativa (%) das proteínas-alvo identificadas e quantificadas pelo *software Scaffold Q+*. **(1 e 3)** Xac/Xau-C e Xac/Xau-B, respectivamente, cultivadas em meio não indutor de patogenicidade (MNI/ CN). **(2e 4)** Xac/Xau-C e Xac/Xau-B, respectivamente, cultivadas em meio indutor de patogenicidade (MI/ XAM-1).

4.2.5. Validação da expressão de proteínas diferenciais entre as linhagens genômicas pela técnica de *Western blot*

Para a validação da expressão diferencial das proteínas consideradas possíveis alvos relacionados ao grau de virulência e especificidade de hospedeiros, foi realizada análise por meio da técnica de *Western blot* com anticorpos comerciais [anti-superóxido/anti-SOD2 (código ab13533, abcam) e anti-fosfoglicomutase/ anti-PGM1 (código ab55616, abcam)].

Para a superoxidase foi possível confirmar sua expressão diferencial para *Xac* em meio de indução de patogenicidade em relação ao meio não indutor de patogenicidade (Fig. 26). Este resultado confirma a análise proteômica realizada por Artier (2011), cuja validação por *Western blot* para esta proteína não foi realizada naquela ocasião. Entretanto, neste trabalho, a análise proteômica evidenciou níveis de expressão diferenciais da *superoxidase dismutase* para *Xac* e *Xau-C* tanto em MNI como MI (Fig. 26). Para *Xau-C* nas condições de não indução (CN) e indução (XAM-1) com níveis equivalentes na expressão da proteína.

Ao comparamos com os dados de quantificação [fig. 24 (1) e (2)] entre *Xau-C* e *Xac* para ambas as condições os dados do western blot corroboram tais dados, pois os níveis de expressão de *Xau-C* apresentam-se mais elevados nestas condições. Podemos observar também que para *Xau-B* em XAM-1 pôde-se detectar uma quantidade significativa da mesma proteína, desta forma, ao menos isto pode indicar que é possível que níveis muito baixos da proteína sejam expressos nessas condições. Como mostra a Fig. 24, níveis mais elevados da proteína seriam esperados para *Xac* em relação à *Xau-B* para o MI, o que foi confirmado pelo *Western*. Inconsistência pode ser observada entre os dois resultados na comparação entre essas duas linhagens apenas para o MNI (Fig. 24 e Fig 26).

A β -lactamase foi inicialmente escolhida como uma possível proteína de controle para o experimento de *Western*, pois foi relatada como sendo constitutiva para essa fração em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (IMPERI, 2009). Entretanto, observamos reação apenas para *Xau-B* em MI (Fig. 27) e concluímos que tal proteína não é adequada para o objetivo proposto. β -lactamases são enzimas produzidas por algumas bactérias e são responsáveis por sua resistência a antibióticos beta-lactâmicos. De fato, a condição de expressão constitutiva foi observada para *P. aeruginosa* quando

cultivada em carbenicilina e essa condição não foi adotada em nossos experimentos para a *Xanthomonas* spp.

Para a validação da expressão de *phosphoglucomutase/phosphomannomutase* não observamos reação do anticorpo comercial (resultados não mostrados) possivelmente pela baixa qualidade do próprio anticorpo e/ ou pela baixa quantidade da proteína no extrato a ser validado. Novos experimentos de *Western blot* serão necessários para a validação deste e de outros biomarcadores.

Em vista dos resultados obtidos, pela falta de uma proteína-controle constitutiva, os géis foram produzidos em duplicatas, a fim de que um deles pudesse ser corado (Fig. 25) e o outro submetido à análise por *Western blot* (Fig 26).

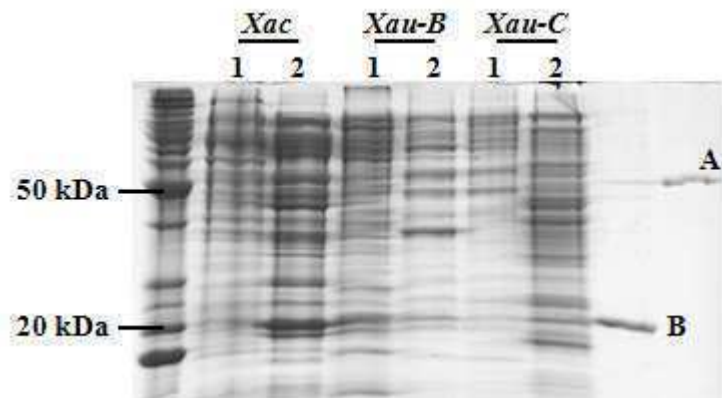


Figura 25: SDS-PAGE de extratos da fração de proteínas periplasmáticas das linhagens- genoma *XacC*, *Xau-B* e *Xau-C* (60 µg cada), após cultivo nas seguintes condições:. (1) MNI (CN) e (2) MI (XAM-1); Controles de proteínas recombinantes obtidas por Goto, L.S.: (A) Fosfoglicomutase (3µg) e (B) Superóxido Dismutase (3µg)). Réplica do gel SDS usado para *Western blot*, corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, Fig. 27 .

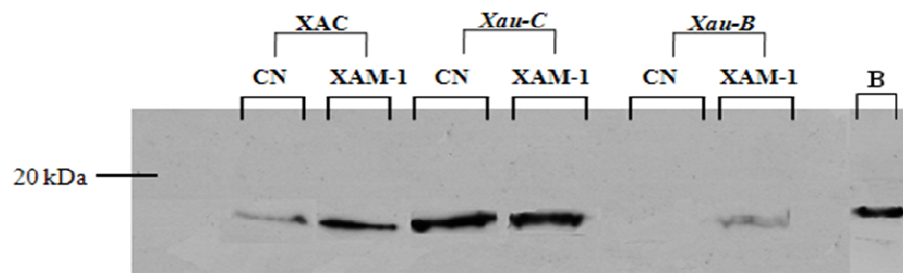


Figura 26: *Western blot* entre as linhagens-genoma *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* para validação dos níveis de expressão da proteína superóxido dismutase (duplicata do gel da Fig 24, que foi transferido para membrana de nitrocelulose), após cultivo nas seguintes condições:(1) MNI (CN) e (2) MI (XAM-1) / (B) superóxido dismutase (Controles de proteínas recombinantes obtidas por Goto, L.S.)

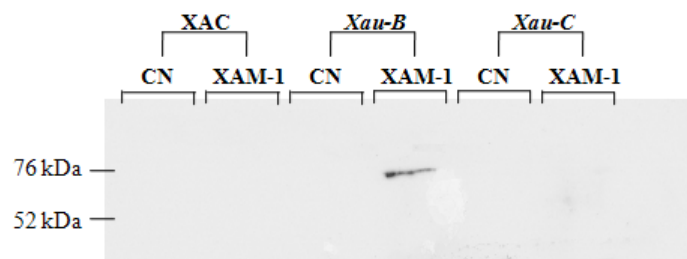


Figura 27: *Western blot* entre as linhagens-genoma *Xac*, *Xau-B* e *Xau-C* para investigar sobre a possibilidade de utilizar a β -Lactamase como marcador constitutivo para todas as linhages cultivadas em todas as condições de estudo. A presença desta proteína só foi verificada em *Xau-B* em MI (XAM) (duplicata do gel da Fig 24, que foi transferido para membrana de nitrocelulose).

5. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos mostraram que o estudo da fração celular enriquecida com proteínas periplasmáticas é uma estratégia eficiente para identificação de proteínas diferenciais entre os tipos de *Xanthomonas* spp. As diferenças observadas tanto nos perfis dos géis 2D, bem como as proteínas identificadas entre as bactérias cultivadas sob a mesma condição mostraram que a composição periplasmática é bastante diferente e que provavelmente as bactérias utilizam rotas metabólicas distintas no ataque ao hospedeiro. As razões para *Xac* ser mais virulenta e capaz de infectar todos os tipos de citros podem, em parte, ser explicadas por estas diferenças.

Apesar da grande quantidade de dados para a análise proteômica das linhagens (*Xac*, *Xau-B* e *Xau-C*) e da dificuldade relacionada às anotações para as proteínas de *Xau-C* e *Xau-B*, as metodologias empregadas foram suficientes para encontrar proteínas periplasmáticas promissoras no envolvimento destas moléculas com a virulência, ou mesmo que se relacionem à interação com o tipo de hospedeiro, e até mesmo que possam responder aos diferentes graus de virulência entre elas.

Apesar deste trabalho não ter sido direcionado às técnicas de proteômica quantitativa, dados relativos à espectrometria de massas possibilitaram avaliar as proteínas alvos quantitativamente e que foram corroborados por meio da validação dos níveis de expressão pela técnica de *Western blot* para a superóxido dismutase. Desta forma, os dados qualitativos avaliados neste trabalho, relativos à patogenicidade (*Xac* vs *Xau-B*) e ao hospedeiro cítrico (*Xac* vs *Xau-C*) puderam ser validados de maneira quantitativa.

Após validação dos resultados por futuros experimentos de *Western* e nocaute de *Xanthomonas* spp. em genes de proteínas alvo aqui encontradas com análise do fenótipo resultante, é que se poderá definitivamente atribuir a essas proteínas ter função relacionada à virulência e/ou espectro de hospedeiros cítricos.

Sob o ponto de vista biotecnológico, nossa expectativa é que a identificação de proteínas potencialmente envolvidas com os aspectos de patogenicidade e especificidade a hospedeiros cítricos, bem como o conhecimento de como estas moléculas atuam na interação patógeno-hospedeiro, possibilitará resolver problemas

relacionados à citricultura, bem como criar produtos de controle e até mesmo contribuir com a erradicação da doença.

6. REFERÊNCIAS

ALEGRIA, M. C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; DA SILVA, A. C. R.; and FARAH, C. S. New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates for the Type III Secretion System of *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*. **Journal of Bacteriology**. v.186, p. 6186 – 6197, 2004.

ALEGRIA, M. C.; SOUZA, P. D.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; da Silva, A. C. R. and FARAH, C. S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type iv secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**. v.187, n 7,p. 2315 – 2325,2005.

ANDERSSON, K., N. CARBALLEIRA, K.E. MAGNUSSON, C. PERSSON, O. STENDAHL, H. WOLF-WATZ, and M. FÄLLMANN. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. **Mol. Microbiol.** v. 20, p. 1057–1069, 1996.

ARTIER, J. **Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: proteínas relacionadas com a indução da patogenicidade in vitro.** 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ARTIER, J. **Deteção de proteínas potencialmente envolvidas na patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*: estudos preliminares em diferentes frações celulares.** Monografia apresentada para conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos. 41p. 2008.

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; ROCOLLETA, J.; CARVALHO, S. A.; and MACHADO, M.A. Expression Profile of Virulence and Pathogenicity Genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Microbiology**. v. 187, p. 1201 – 1205, 2005.

BARON, C.; O'CALLAGHAN, D. and LANKA, E. Bacterial secrets of secretion: Euro Conference on the biology of type IV secretion processes. **Molecular Microbiology**. v.43,p.1359 – 1365, 2002.

BENDER, C. L., RANGASWAMY and LOPER V. J., **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 7, p. 175–196, 1999.

BONAS, U. Hrp genes of phytopatogenic bacteria. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.192, p.79 – 98,1994.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BÜTTNER, D. BONAS, U. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal*. v. **21**, p. 5313 – 5322, 2002.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol.* v. 34, p. 107–133, 2009.

CARNIELLI, C.M. **Análise proteômica diferencial da fração protéica periplasmática das estirpes A e B de *Xanthomonas* sp.** Monografia apresentada para conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos. 2011.

CARVALHO, F.M.S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira.** Tese de Doutorado, pp.177, 2006.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, R. L. and BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. **Molecular Plant Pathology**. v.9, n.5, p. 609–631, 2008.

CORNELIS, G. R. AND VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 54, p. 735–774, 2000.

DEWDNEY, M.M. and GRAHAM, J.H. 2012 **Florida Citrus Pest Management Guide: Citrus Canker**. UNIVERSITY OF FLORIDA IFAS EXTENSION. Disponível em : <http://edis.ifas.ufl.edu/cg040>> acesso: 06 de maio 2012 às 10:04.

FANCINCANI, A.P. **Análise Proteômica do Fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciência Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/d/1025.pdf>> Acessado em 09 de março de 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT statistical databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> . Acesso em: 22 mar. 2012.

FERNANDES, R.S. **Proteínas periplasmáticas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C diferencialmente expressas em condição de indução da patogenicidade *in vitro*: análise proteômica preliminar.** Monografia apresentada para conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos, 2010.

FERREIRA, B.C. **Secretma da Bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*** 52p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

FILLOUX, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. v. 1694, 11, p. 163 – 179. 2004.

FUNDECITRUS, **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 2 mai. 2012.

GABRIEL, D.W.; KINGSLEY, M.T.; HUNTER, J.E.; GOTTWALD, T. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.39, p.14-22, 1989.

GÁLÁN, J. E.; and COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**. v.284, p. 1322 – 1328, 1999.

GARDUNO, R. A., GARDUNO, E, and HOFFMAN, P. S. Surface-Associated Hsp60Chaperonin of Legionella pneumophila Mediates Invasion in a HeLa Cell Model. **American Society for Microbiology**. Infection and Immunity, CA. 1998.

GHOSH, P. Process of protein transport by the type III secretion system. **Microbiol Mol Biol R**. v.68, p. 771–795, 2004.

GONZÁLES-PEDRAJO, B.; DREYFUS, G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. **Mensaje Bioquímico**. v. 27. 2003.

GOTTWALD, T.R., HUGHES, G., GRAHAM, J.H., SUN, X. and RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**. v. 91, p.30-34, 2001.

HAASE, C.H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**. v. 4, p. 97-100, 1915.

HENDERSON, I.R., NAVARRO-GARCIA, F., DESVAUX, M., FERNANDEZ, R. C., and ALA'ALDEEN, D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. **Microbiology And Molecular Biology**. v.68, p.692-744, 2004.

HEINECKEL, N.L., PRATT, B.S., VAISAR, T. and BECKER,L. PepC: proteomics software for identifying differentially expressed proteins based on spectral counting. **Bioinformatics Applications Note**. v.26, n.12. p. 1574-1575, 2010.

HORLACHER, R., UHLAND, K., KLEIN, W., EHRMANN, M and BOOS, WINFRIED. Characterization of a Cytoplasmic Trehalase of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 178, n. 21, p. 6250–6257, 1996.

HUECK, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, n.2, p. 379–433, June 1998.

JIANG, H., OUYANG, H., ZHOU, H and JIN, C. GDP-mannose pyrophosphorylase is essential for cell wall integrity, morphogenesis and viability of *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**. v.154, p. 2730–2739, 2008.

KOLLER, O.C. Citricultura: laranja, limão e tangerina. **Porto Alegre: Editora Rígel**. p. 446, 1994.

KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HOTTE, B., SIMON, R., WANG, G. and PUHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB Genes Are Involved in UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. **Journal of bacteriology**. p. 191-199, Jan. 1992.

KORONAKIS, V., ESWARAN, J., and HUGHES, C. Structure and function of TolC: The Bacterial Exit Duct for Proteins and Drugs **Annu. Rev. Biochem.** v.73, p. 467–489, 2004.

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

LEE, H.M., TYAN, S.W., LEU, W.M., CHEN, L.Y., CHEN, D.C., HU, N.T. Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-XpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p.528-535, 2001.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes and Development**. v. 15, p.1725-1752. 2001.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**, 4º ed. Ed. Savier. São Paulo. pp 91-108, 2006.

MALAVOLTA JÚNIOR; V.A., CARVALHO; M.LV., RODRIGUES NETO; J., ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E.M.C. and PALAZZO, D.A. Reaction of different Citrus and relative to bacterial canker C [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hesse) Dye]. **Proceedings Congress of the International Society of Citriculture** v.1, p.363-364, 1987.

MELOTTO, M. **Barreira natural contra infecções** Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/6274>> Acessado em 07 de maio de 2012.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA Jr., N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; da SILVA, A. C.; de MORAES, F. E.; OLIVEIRA, J. C.; de SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE Jr., R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; NETO, J. R.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA Jr., H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics** 2010, 11:238. 2010.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica 5º ed.** Ed. Elsevier. Rio de Janeiro. pp. 17-18, 2006.

NEVES, F. N., TROMBIN, V. G., MILAN, P., LOPES, F. F., CRESSONI, F., KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. Ribeirão Preto. 2010. Disponível em: www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf Acessado em 20 de junho de 2012.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J. B.; and BELASQUE JUNIOR, J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C em Lima Ácida “Galego”. **Fitopatologia brasileira**. v.31, p. 140-146, 2006.

PROTEOME SOFTWARE. Disponível em: http://www.proteomesoftware.com/Proteome_software_prod_Scaffold.html Acessado em 30 de novembro de 2010.

RANFORD, J. C.; COATES A. R. M. and HENDERSON, B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge University Press, UK. 2000.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K. and VIDAVER, A. K. 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. rev.; *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.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K. and VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 29, p.690–695, 2006.

SCHUBERT, T.S.; RIZVI, S.A.; SUN, X.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. and DIXON, W.N. **Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-Again**. *Plant Dis.* v.85.p. 340–356, 2001.

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.

SIMPSON, R.J. **Proteins and proteomics: a laboratory manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

SMOLKA, M.B, *et al.* Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics**. v.3., p.224-237, 2003.

SOUSA, M.V., FONTES, W., RICART, C.A.O. Análise de Proteomas. **Revista Biotecnologia Ciência and Desenvolvimento**, 2007.

STALL, R. E. and SEYMOUR ,C. P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Dis**. v. 67,p. 581-585, 1983.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; and JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**. v. 268,p. 661-667, 1995.

STRØM, A.R. and KAASEM, I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: Stress protection and stress regulation of gene expression. **Molecular Microbiology**. v.8,n.2,p. 205-210, 1993.

SUN, X. A.,; STALL, R. E.; JONES, J. B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N.; SCHUBERT, T. S.; CHALOUX, P. H.; STROMBERG, V. K.; LACY, G. H. and SUTTON, B. D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key Mexican lime and Alemow in South Florida. **Plant Dis**. v.88, p.1179-1188, 2004.

TEIXEIRA, E.C.; de OLIVEIRA, J.C.F.; NOVO, M.T.M.; BERTOLINI, M.C. The copper resistance operon copAB from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. **Microbiology**, v. 154, p.402-412, 2008.

THANASSI, D. G., HUTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current Opinion in Cell Biology*, v.2, p. 420- 430, 2000.

TSENG, T.; BRETT, M. T.; SETUBAL, J.C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology** 2009, v.9 (Suppl 1), 2009.

VANTARIN L., *et al.* Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv, *citri* strains by sodium dodecyl sulfete-polyacrylamide gel-eletrophoresis of proteins, fatty-acids, and DNA-DNA Hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n.4, p. 535-542. 1991.

WENGELNICK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; and BONAS, U. Expression and Localization of HrpA1, a Protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Essential for Pathogenicity and Induction of the Hypersensitive Reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 4, p. 1061 – 1069, 1996.

WHITE, F.F., YANG, B. and JOHNSON, L.B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Pathology**, 3, 291-298, 2000.

YACOUBI, B. E. **Bacterial citrus canker: molecular aspects of a compatible plant-microbe interaction.** Tese de Doutorado, p. 203, 2005.

ANEXO I

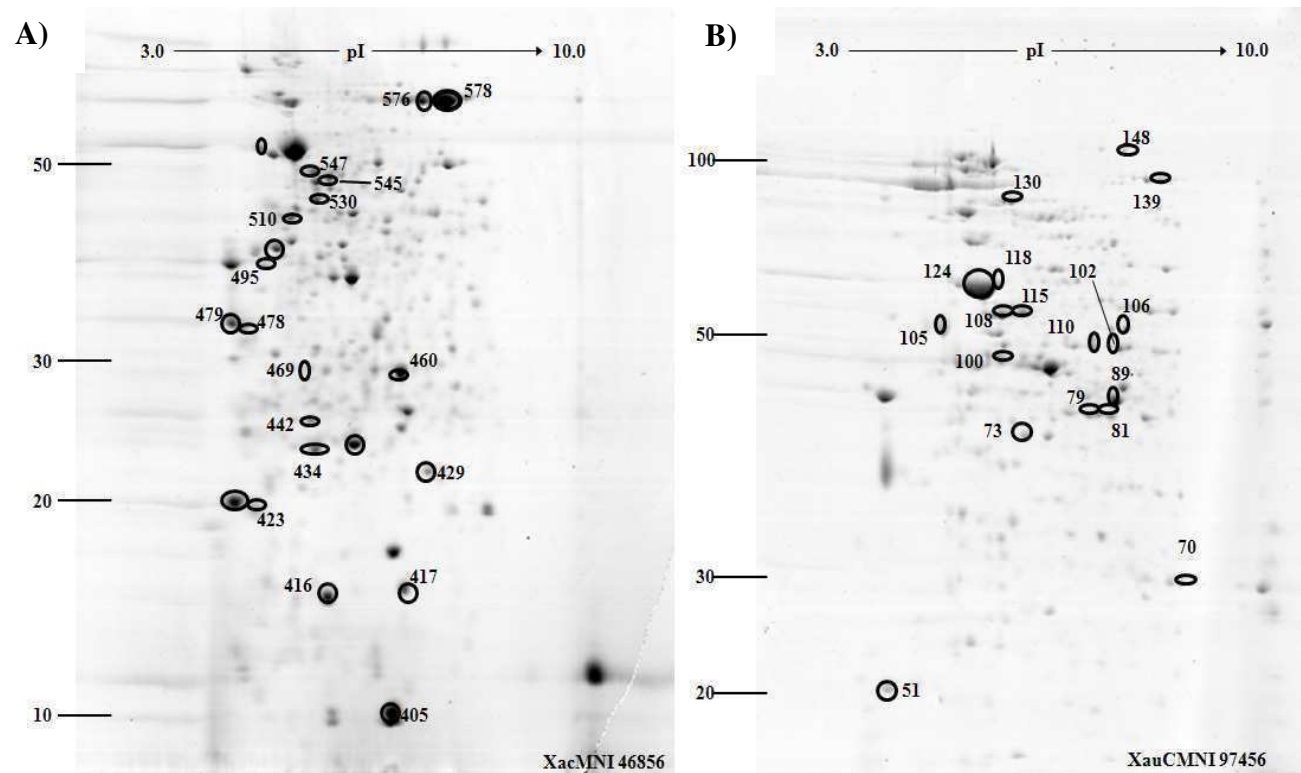


Figura Suplementar 1: Seleção de *spots* com expressão diferencial significativa ($P < 0,05$) entre as bactérias *Xac* (A) e *Xau-C* (B) cultivadas em meio não indutor de patogenicidade (CN) para identificação por espectrometria de massas. A análise dos *spots* enumerados tiveram seus dados de massa pesquisados em bancos de proteínas de *Xace* de *Xau-C*.

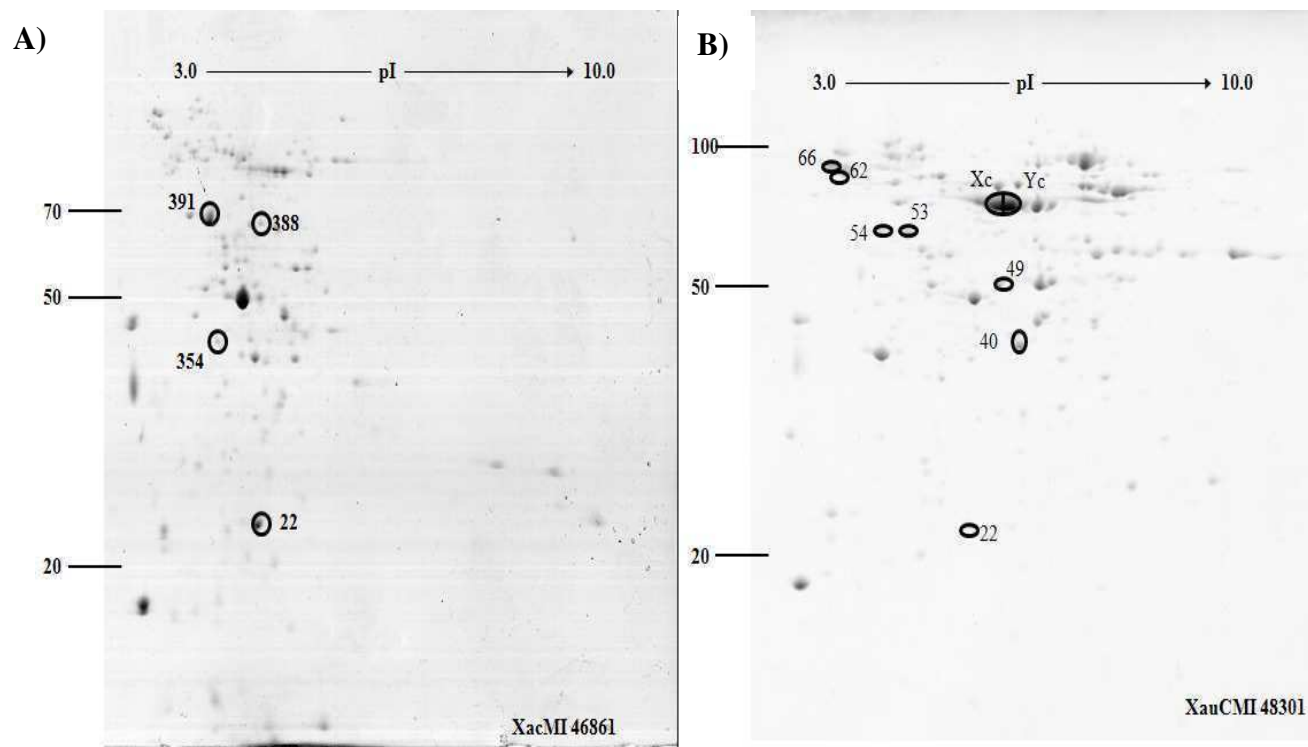


Figura Suplementare 2: Seleção de *spots* com expressão diferencial significativa ($P < 0,05$) entre as bactérias *Xac* (A) e *Xau-C* (B) cultivadas em meio indutor de patogenicidade (XAM-1) para identificação por espectrometria de massas. Os *spots* enumerados foram pesquisados em bancos de proteínas de *Xac* e de *Xau-C*.

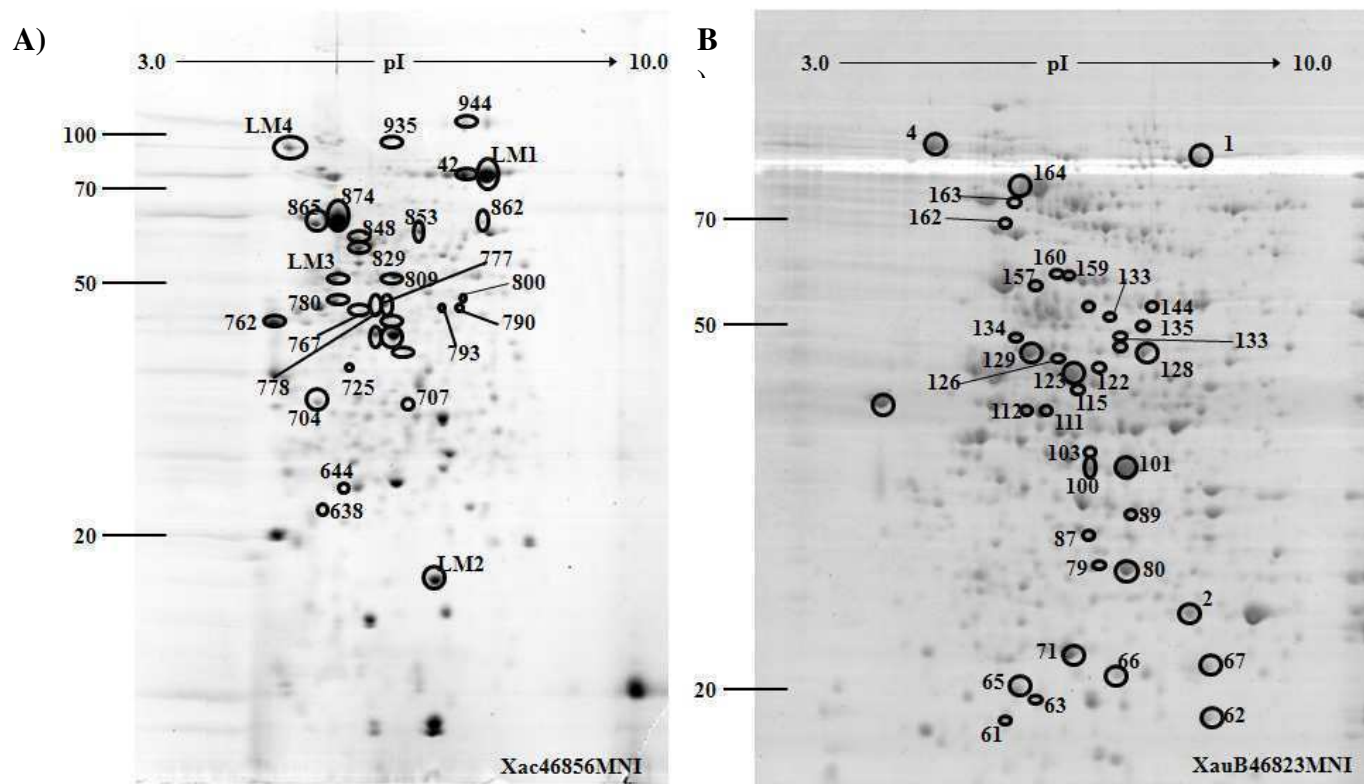


Figura Suplementare 3: Seleção de *spots* com expressão diferencial significativa ($P < 0,05$) entre as bactérias *Xac* (A) e *Xau-B* (B) cultivadas em meio não indutor de patogenicidade (CN) para identificação por espectrometria de massas. A análise dos *spots* enumerados tiveram seus dados de massa pesquisados em bancos de proteínas de *Xace* de *Xau-B*.

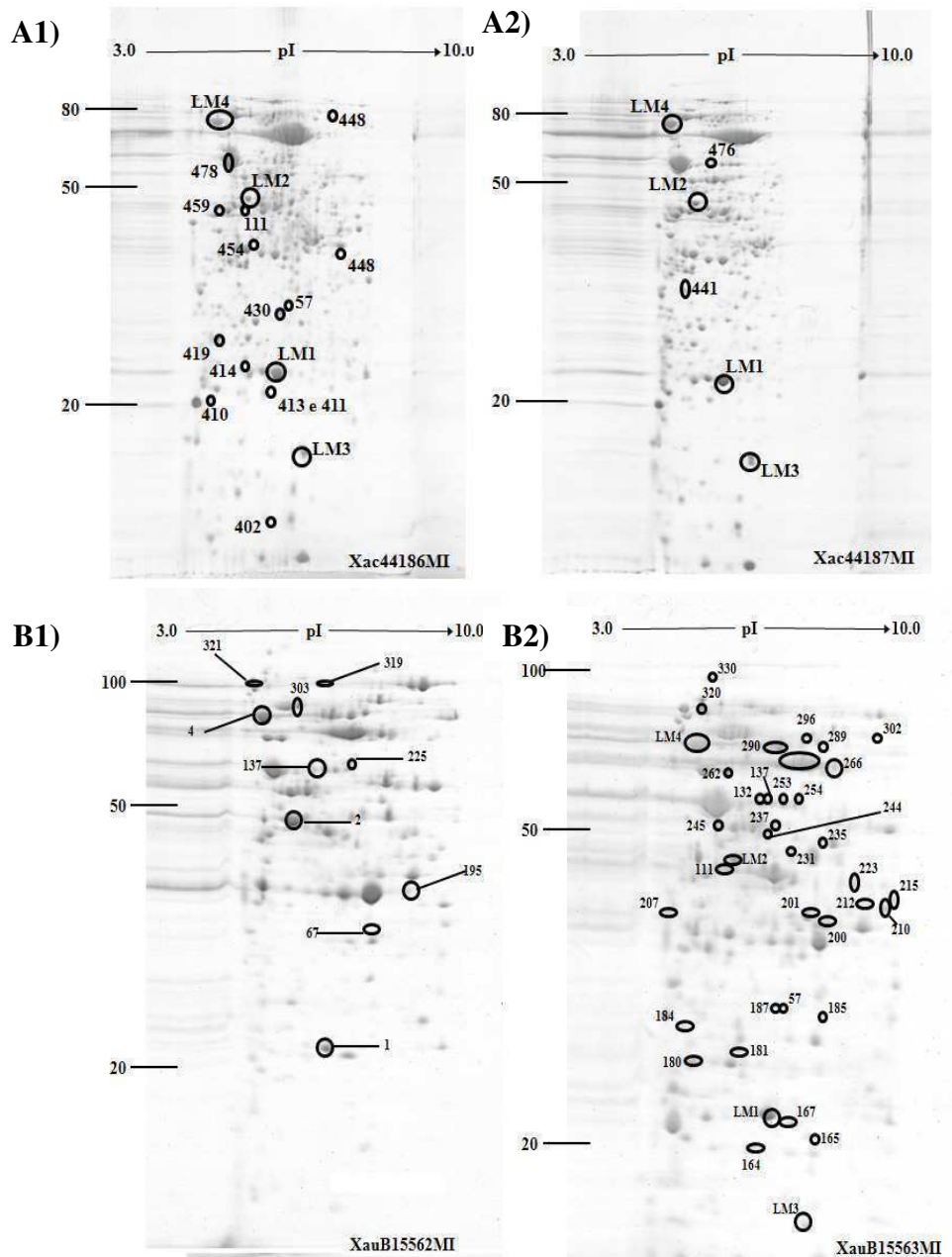


Figura Suplementare 4: Seleção de *spots* com expressão diferencial significativa ($P < 0,05$) entre as bactérias *Xac* (A1 e A2) e *XauB* (B1 e B2) cultivadas em meio indutor de patogenicidade (XAM-1) para identificação por espectrometria de massas. Os *spots* enumerados foram pesquisados em bancos de proteínas de *Xac* e de *Xau-B*. Para esta análise foram usados dois géis para cada condição devido a melhor resolução dos spots em uma das réplicas.

ANEXO II

Tabela 1: Proteínas diferencialmente expressas de *Xac* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xau-C* cultivada sob a mesma condição.

n° Spot	Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína	Descrição da proteína	% Volume	Teorico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal *	Localização celular predita**
1	354	NP_644518.1	XAC4219	conserved hypothetical protein	0,1963	31536/ 5.82	256	15	35%	VIII	-	D
		NP_641254.1	XAC0902	transaldolase B		34836/5.12	187	15	52%	I	-	C
3	391	NP_640895.1	XAC0542	60kDa chaperonin	1,7479	57131/ 5.05	1127	42	68%	III	-	C
		NP_642702.1	XAC2386	superoxidase dismutase		22703/5.47	207	10	57%	VII	-	P
4	22	NP_643341.1	XAC3032	conserved hypothetical protein	1,92384	23293/ 5.57	39	3	15%	VIII	-	C
		NP_640828.1	XAC0472	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase		23790/5.68	37	1	8%	I	-	C

Legenda: * (+/ -) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 2 (A). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-C* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína	Descrição da proteína	% Volume	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença do peptídeo sinal	Localização celular predita
1	49	gil292605792	XAC0120	TldD protein	0,22722	48729/6.00	487	45	59%	III	-	C
2	54	gil292603177	XAC3300	esterase	0,15948	61027/ 4.94	396	20	26%	IX	-	ME
4	66	gil292602773	XAC3050	TonB-dependent receptor	1,25391	105234/ 4.75	1149	62	37%	V	+	ME
6	53	gil292604166	XAC0542	chaperonin GroEL	0,93749	57144/5.05	1395	51	40%	II	-	C
		gil292602597	XAC0204	glutamine synthetase		51827/5.15	117	8	14%	II	-	C
7	46	gil292601868	XAC0957	elongation factor Tu	1,48807	43344/5.45	1273	44	50%	III	-	C
		gil292604481	XAC1158	adenylosuccinate synthetase		46171/5.37	61	3	5%	II	-	C
8	22	gil292605305	XAC2386	superoxidase dismutase	1,31301	22731/5.47	227	15	33%	VII	-	P

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 2(B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 3: Proteínas diferencialmente expressas de *Xac* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xau-B* crescida sob a mesma

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teóricos	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
1	410	NP_641253.1	conserved hypothetical protein	0,0771667	20226 / 4.78	200	8	38%	VIII	-	D
		NP_640579.1	conserved hypothetical protein		21893/ 4.60	20	1	5%	VIII	-	ME
2	67	NP_640578.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,0883519	35860/ 5.77	181	16	41%	III	+	C
		NP_643886.1	phosphoglucomutase/ phosphomannomutase		49337/ 5.19	2018	61	65%	VII	-	P
3	111	NP_642050.1	enolase	0,611122	45992/ 4.96	161	4	8%	I	-	C
		NP_644735.1	lytic murein transglycosylase		46215/ 5.89	128	5	14%	IV	+	MC
		NP_641305.1	elongation factor Tu		43344/ 5.45	88	4	10%	III	-	C
		NP_642104.2	xylose isomerase		48508/ 5.31	71	3	7%	I	-	C
		NP_641494.1	adenylosuccinate synthetase		46513/ 5.37	64	2	7%	II	-	C
		NP_643544.1	succinyl-CoA synthetase, beta subunit		41542/ 4.85	48	5	14%	I	-	C
		NP_643770.1	TolC protein		49575/ 5.59	37	1	3%	VII	+	ME
4	57	NP_641033.1	6-phosphogluconate dehydrogenase	0,144067	32928/ 5.55	698	20	43%	I	-	C

condição. **Legenda:** * (+/ -) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(A1 e A2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4: Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
1	210	gil292600998	conserved hypothetical protein	0,39126	38269/6.13	259	15	20%	II	-	C
		gil292600325	polyphosphate-selective porin O		43253/6.27	50	4	6%	IV	+	ME
		gil292598583	adenylate kinase		19943/5.33	620	24	70%	II	-	C
2	164	gil292599386	poly hydroxyalcanoate granule associated protein	0,05763	19816/5.31	50	2	3%	I	-	C
		gil292598855	DNA-binding related protein		20391/5.71	24	2	12%	III	-	C
3	330	gil292601125	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	0,15784	118126/4.93	148	27	15%	II	+	P/M

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
4	180	gil292597757	50S ribosomal protein L3	0,67451	22857/ 10.21	306	15	38%	III	-	C
		gil292600953	NonF-related protein		24272/4.90	206	10	21%	VII	-	D
		gil292601278	elongation factor P		20937/4.79	144	6	15%	III	-	C
		gil292598956	two-component system regulatory protein		25428/5.19	58	2	4%	I	-	C
5	253	gil292598471	anthranilate synthase component I	0,40732	54208/5.51	417	20	28%	II	-	C
		gil292601261	GDP-mannose pyrophosphorylase		50969/5.64	260	16	32%	VII	-	C
		gil292598101	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase		53165/5.51	100	8	14%	I	-	C
6		gil292601056	dihydrolipoamide dehydrogenase		103098/4.79	24	2	16%	I	-	C
7	303	gil292597753	translation elongation factor G	0,64422	75951/5.12	708	37	39%	III	-	C

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
8	207	gil292597822	isocitrate dehydrogenase	0,42096	35738/5.40	401	15	25%	I	-	C
		gil292597791	outer membrane protein		39651 / 4.59	131	14	30%	IV	+	ME
		gil292599783	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		36220/ 6.03	40	3	6%	I	-	C
9	320	gil292600612	TonB-dependent outer membrane receptor precursor	0,21509	111027/5.13	284	20	18%	III	+	ME
		gil292600024	TonB-dependent receptor		106566/ 5.01	224	21	25%	V	-	ME
		gil292600270	TonB-dependent outer membrane receptor		109041/ 5.24	55	4	3%	VIII	+	ME
10	195	gil292599109	secreted protein	0,2472	40882/ 6.24	460	27	66%	VIII	+	M
11	165	gil292600241	conserved hypothetical protein	0,1588	24258/ 6.31	197	11	19%	VIII	-	D

Legenda: * (+/ -) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
12	185	gil292599005	conserved hypothetical protein	0,20019	29653/ 5.71	172	16	32%	VIII	-	D
13	187	gil292597871	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase	0,21997	32061/ 5.36	109	4	12%	I	-	C
		gil292600966	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase		32239/ 5.46	68	7	25%	I	-	C
14	57	gil292600966	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,14407	32239/ 5.54	232	13	31%	I	-	C
		gil292600928	secreted protein		25172/ 6.05	47	7	31%	VIII	+	M
		gil292597871	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase		32061/ 5.34	27	2	4%	I	-	C
15	181	gil292597738	50S ribosomal protein L25	0,3924	23335/ 5.20	500	12	41%	III	-	C
		gil292600055	conserved hypothetical protein		29125/ 5.21	25	2	5%	VIII	+	ME
16	189	gil292600055	conserved hypothetical protein	0,26726	29125/ 5.21	505	23	42%	VIII	+	ME

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
17	245	gil292601048	ATP synthase subunit B	0,14268	50998/ 5.19	388	18	38%	I	-	C
		gil292600067	ATP-dependent protease ATP-binding subunit		50753/5.36	61	10	18%	III	-	C
		gil292600242	dihydrolipoamide dehydrogenase		50718/ 5.76	51	1	3%	I	-	C
		gil292600158	cystathionine beta-synthase		49944/ 5.21	37	2	3%	II	-	C
		gil292600624	histidinol dehydrogenase		45088/ 5.04	32	3	6%	II	-	C
		gil292599639	aldehyde dehydrogenase		54382/ 5.37	30	1	1%	I	-	C
18	235	gil292600242	dihydrolipoamide dehydrogenase	0,14666	50718/ 5.76	543	34	47%	I	-	C
19	223	gil292600243	dihydrolipoamide acetyltransferase	0,1674	42354/ 5.87	57	1	3%	I	-	C
20	231	gil292600243	dihydrolipoamide acetyltransferase	0,35925	42354/ 5.88	406	27	44%	I	-	C

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
21	244	gil292598023	betaine aldehyde dehydrogenase	0,32491	52654/ 5.41	191	19	28%	V	-	C
		gil292598785	virulence protein		49009/ 5.55	149	10	14%	VIII	+	M
22	132	gil292599789	pyruvate kinase	0,08548	54804/ 5.57	250	13	16%	I	-	C
		gil292600337	chaperonin GroEL		56899/ 5.05	136	12	15%	III	-	C
		gil292601261	GDP-mannose pyrophosphorylase		50969/ 5.64	46	2	3%	VII	-	C
		gil292600730	outer membrane receptor for transport of vitamin B		67650/ 5.4	24	2	1%	IV	+	ME
23	67	gil292597861	acyl-carrier-protein S-malonyltransferase	0,06734	32998/ 5.71	43	4	14%	II	-	C
24	137	gil292599789	pyruvate kinase	0,11782	54804/ 5.57	618	31	26%	I	-	C
		gil292600961	bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein		57318/ 5.38	31	5	7%	II	-	C

Legenda: * (+/ -) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
25	248	gil292599657	glucose-6-phosphate isomerase	0,20055	54277/ 5.75	278	22	32%	I	-	C
26	236	gil292600893	adenylosuccinate lyase	0,16744	49856/ 5.57	739	39	43%	II	-	C
27	302	gil292601028	NADH dehydrogenase gamma subunit	0,19411	80094/ 6.19	403	34	38%	VIII	-	M
28	215	gil292598801	acetyl-CoA C-acetyltransferase	0,29567	40076/ 6.25	337	15	34%	II	+	D
29	266	gil292600323	phosphate acetyltransferase	0,78153	83985/ 5.64	413	24	26%	I	-	C
		gil292600431	ATP-dependent Clp protease subunit		83617/ 5.59	39	3	4%	III	-	C
		gil292601235	methyl-accepting chemotaxis protein		79308 / 5.16	30	4	0%	V	-	MC
30	289	gil292597974	tail-specific protease	0,28448	80119/ 5.95	516	42	34%	III	-	MC

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(B1 e B2). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

Tabela 4 (continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio indutor de patogenicidade (XAM-1), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Nº Spot	Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	% Volume	MM / pI Teórico	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Presença de peptídeo sinal	Localização celular predita
31	290	gil292601549	formate dehydrogenase accessory protein	0,58651	29809/5.98	28	2	2%	I	-	C

Legenda: * (+/-) Presença ou não, respectivamente de peptídeo sinal detectado pelo *software* pSortP v.3.0.

Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 4(**B1 e B2**). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas.

ANEXO III

Tabela 1: Proteínas diferencialmente expressas de *Xac* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xau-C* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	Identidade da proteína	NCBI accession no	Descrição da proteína	Teorico MM / pI	Score	Peptídio Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
39	<u>XAC1521</u>	<u>gi52782957 Q8PMB1.1</u>	heat shock protein GrpE	90003/4.43	81	4	26%	III	ME
478	<u>XAC1012</u>	<u>gi226734998 B0RPQ9.1</u>	outer membrane protein	39651/ 4.59	272	12	37%	II	ME
563	<u>XAC2796</u>	<u>gi226700160 B0RP90.1</u>	conserved hypothetical protein	72974/6.46	417	17	33%	VIII	M
429	<u>XAC0554</u>	<u>gi23822310 Q8PPX9.1</u>	nitroreductase	25832/5.12	664	15	82%	II	M
510	<u>XAC3347</u>	<u>gi24418588 Q8PHB2.1</u>	phosphoglycerate kinase	37675/5.60	1137	29	2%	I	C
417	<u>XAC0963</u>	<u>gi24212231 Q8PNT2.1</u>	50S ribosomal protein L10	18340/5.75	520	12	79%	III	C
530	<u>XAC0865</u>	<u>gi81804731 Q8PP23.1</u>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	50084/5.43	700	22	45%	III	P
	<u>XAC3556</u>	<u>gi25008106 Q8PGR0.1</u>	aminopeptidase A/I	51491/5.17	94	6	17%	III	C
547	<u>XAC3649</u>	<u>gi81860488 Q8PGG7.1</u>	ATP synthase, beta chain	50865/5.18	362	13	34%	I	C
545	<u>XAC3651</u>	<u>gi81799206 Q8PGG5.1</u>	ATP synthase, alpha chain	55365/ 5.32	773	28	52%	I	C
	<u>XAC3851</u>	<u>gi47606188 Q8P5R7.1</u>	conserved hypothetical protein	49960/ 5.31	162	6	14%	VIII	D
434	<u>XAC1078</u>	<u>gi25008307 Q8PNI5.1</u>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	22839/5.39	360	12	42%	III	C
	<u>XAC2067</u>	<u>gi123583902 Q3BN06.1</u>	KDPG and KHG aldolase	22932/5.24	317	9	69%	I	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 1(A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-C* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína	Descrição da proteína	Teorico MM / pI	Score	Peptídio Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
148	gil292605055	XAC2665	Tfp pilus adhesin	132225/6.45	678	27	26%	IX	D
70	gil292603267	XAC3235	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	29539/ 6.38	265	5	17%	I	C
48	gil292603628	XAC2015	nucleoside diphosphate kinase	15234/5.61	303	8	55%	II	E
119	gil292603177	XAC3300	lipase/esterase	61027/4.94	512	21	49%	I	M
105	gil292604669	XAC1975	flagellar protein	40576/5.10	1391	35	60%	V	E
	gil292603793	XAC0784	cell division protein FtsZ	42712/4.77	56	3	14%	V	C/M
100	gil292603707	XAC1077	trigger factor	48229/5.19	302	19	45%	III	C
	gil292605658	XAC3556	leucyl aminopeptidase	51076/5.10	218	7	22%	III	C
	gil292603469	XAC3851	conserved hypothetical protein	49932/ 5.30	38	2	4%	VIII	C
73	gil292605618	XAC1006	malate dehydrogenase	34914/5.37	515	23	65%	I	M
	gil292606070	XAC0996	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	36341/ 5.58	225	16	43%	III	C
79	gil292605352	XAC2083	GDP-mannose 4,6-dehydratase	39020/ 5.86	130	5	19%	I	C
	gil292603357	XAC1046	isocitrate dehydrogenase	35566/5.70	82	7	26%	I	M
	gil292604968	XAC0125	aspartate aminotransferase	46172/5.82	22	2	6%	II	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 1(A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 2 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-C* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína	Descrição da proteína	Teorico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
81	gil292604285	XAC3352	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35935/6.03	271	19	46%	I	C
	gil292605352	XAC2083	GDP-mannose 4,6-dehydratase	39020/5.86	236	8	38%	VIII	M
	gil292604967	XAC0124	fructose-1,6-bisphosphatase	38376/ 5.89	139	8	21%	I	C
110	gil292603728	XAC1534	dihydrolipoamide acetyltransferase	42399/5.87	567	20	44%	I	C
	gil292605349	XAC4299	O-antigen ABC transporter ATP-binding protein	46720/5.67	27	1	4%	VIII	M
106	gil292603729	XAC1533	dihydrolipoamide dehydrogenase	50388/5.81	563	14	38%	I	C
73	gil292605792	XAC0120	TldD protein	48558/6.00	648	25	51%	III	C
102	gil292605792	XAC0121	TldD protein	48558/ 6.00	448	21	55%	III	C
	gil292603232	XAC4178	secreted protein	49871/7.86	226	8	23%	VIII	C
130	gil292605992	XAC0969	translation elongation factor G	75780/5.12	310	16	29%	III	C
	gil292603836	XAC1413	outer membrane antigen	87624/5.53	298	11	16%	IV	M
118	gil292604166	XAC0542	chaperonin GroEL	57144/5.05	525	20	34%	III	C
	gil292602597	XAC0204	glutamine synthetase	51827/5.15	210	14	30%	II	C
114	gil292605344	XAC3603	cystathionine beta-synthase	49944/5.21	395	22	29%	II	C
	gil292603118	XAC0728	glutamate-cysteine ligase	53795/5.32	198	10	14%	II	M
	gil292602935	XAC3651	ATP synthase subunit A	55365/ 5.32	96	9	14%	II	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 1(A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 2 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-C* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína	Descrição da proteína	Teorico MM / pI	Score	Peptídio Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
63	gil292605902	XAC2292	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	32239/ 5.46	375	23	36%	I	C
94	gil292604316	XAC2351	argininosuccinate synthase	45167/5.55	188	24	31%	II	C
99	gil292605124	XAC0002	DNA polymerase III subunit beta	40828/5.28	364	25	40%	III	C
	gil292601868	XAC0957	elongation factor Tu	43344/5.45	339	22	35%	III	C
74	gil292603844	XAC1421	elongation factor Ts	31094/5.29	483	19	38%	III	C
95	gil292602816	XAC3388	citrate Si -synthase	50478/ 5.80	508	28	41%	I	C
	gil292605325	XAC2322	aminotransferase	42335/5.96	28	2	3%	II	C
75	gil292605030	XAC0902	transaldolase	34805/4.92	565	24	48%	I	C
	gil292602743	XAC4219	secreted protein	31612/ 5.37	327	21	39%	VIII	D
126	gil292603741	XAC1522	molecular chaperone DnaK	68738/4.99	1041	52	39%		C
	gil292602935	XAC3651	ATP synthase subunit A	55365/ 5.32	723	37	39%	I	C
115	gil292605361	XAC1312	methyalmalonate-semialdehyde dehydrogenase	54618/5.35	72	7	6%	I	C
	gil292605577	XAC1808	aldehyde dehydrogenase	54416/5.37	60	6	5%	I	C
	gil292605344	XAC3603	cystathionine beta-synthase	49944/5.21	42	4	4%	II	C
101	gil292605305	XAC2386	superoxidase dismutase	22731/5.47	501	19	34%	VII	P
113	gil292603707	XAC1077	trigger factor	48229/ 5.19	462	41	43%	III	C
108	gil292606184	XAC2504	pathogenicity factors regulator	41416/ 6.17	499	31	59%	VII	M

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 1(A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 3: Proteínas diferencialmente expressas de *Xac* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xau-B* crescida sob a mesma condição.

Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	%volume	Teorico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Categoria	Localização celular predita
778	XAC1362	GTN reductase	0,0992182	39383/ 5.37	630	30	I	C
800	XAC1129	3-oxoacyl-[ACP] synthase II	0,302146	43024/ 5.57	370	22	II	MC
790	XACb0007	lytic murein transglycosylase	0,239846	46215/ 5.89	2290	49	IV	MC
	XAC3602	cystathionine gamma-lyase-like protein		42683/ 5.68	51	10	II	C
	XAC1129	3-oxoacyl-[ACP] synthase II		43024/ 5.57	24	3	II	MC
	XAC3851	conserved hypothetical protein		49960/5.31	954	39	VIII	D
829	XAC3556	aminopeptidase A/I	0,185572	51491/5.17	58	3	III	C
	XACb0007	lytic murein transglycosylase		46215/5.89	51	2	IV	MC
	XAC1829	histidinol dehydrogenase		44753/5.26	48	3	II	C
	XAC2378	conserved hypothetical protein		48840/5.19	46	1	VIII	C
	XAC1808	aldehyde dehydrogenase		54398/5.37	37	1	I	C
	XAC0536	virulence regulating protein		37870/8.71	32	1	VII	C
	XAC3587	electron transfer flavoprotein alpha subunit		31760/4.90	76	24	I	M
704	XAC3924	spermidine synthase	0,295296	31875/4.94	40	1	II	C
	XAC2926	pyrroline-5-carboxylate reductase		28896/5.10	40	1	II	C
	XAC2012	3-ketoacyl-CoA thiolase		42104/6.02	457	20	I	C
727	XAC2352	ornithine carbamoyltransferase	0,385218	38494/6.13	153	6	II	C
	XACb0007	lytic murein transglycosylase		46215/5.89	30	2	IV	MC
751	XAC1006	malate dehydrogenase	0,565015	34886/ 5.37	1419	46	I	M

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3(A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 3 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xac* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xau-B* crescida sob a mesma condição.

Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	%volume	Teorico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Categoria	Localização celular predita
838	XAC1204	alanyl dipeptidyl peptidase	0,454128	79772/6.23	992	32	III	C
	XAC3556	aminopeptidase A/I		51491/5.17	393	12	III	C
	XAC3649	ATP synthase, beta chain		50979/5.18	77	3	I	M
	XAC1808	aldehyde dehydrogenase		54398/5.37	56	2	I	C
	XAC3651	ATP synthase, alpha chain		55365/5.32	49	1	I	C
853	XAC1788	glucose-6-phosphate isomerase	0,437012	54420/5.54	1487	37	I	C
809	XAC0002	DNA polymerase III, beta chain	0,514627	40842/ 5.35	1703	58	III	C
	XAC0957	elongation factor Tu		43344/5.45	154	6	III	C
	XAC1158	adenylosuccinate synthetase		46513/5.37	88	2	II	C
	XAC1788	glucose-6-phosphate isomerase		54420/5.54	63	2	I	C
718	XAC1587	thiosulfate sulfurtransferase	0,117253	30695/6.13	188	13	I	C
793	XAC0749	GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	0,103178	41321/ 5.46	657	26	II	C
	XACb0007	lytic murein transglycosylase		46215/5.89	89	5	IV	MC
	XAC3602	cystathionine gamma-lyase-like protein		42683/5.68	39	1	II	C
	XAC1858	valine-pyruvate aminotransferase		46126/6.16	22	1	II	P
725	XAC4009	arginase	0,136106	33388/ 5.12	91	4	I	C
	XAC3579	phosphoglucomutase/phosphomannomutase		49337/5.19	20	2	VII	P
749	XAC3341	cysteine synthase	0,146753	34065/5.47	208	19	II	MC
	XAC1434	conserved hypothetical protein		38703/5.89	155	15	VIII	M
862	XAC2516	L-lysine 6-aminotransferase	0,101013	53822/ 5.98	386	18	I	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 3 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xac* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xau-B* crescida sob a mesma condição.

Match ID	NCBI accession no.	Descrição da proteína	%volume	Teorico MM / pI	Score	Peptídio Matched	Categoria	Localização celular predita
765	<u>XAC1046</u>	isocitrate dehydrogenase	0,202916	35739/ 5.40	583	19	I	C
	<u>XAC1830</u>	histidinol-phosphate aminotransferase		39019/5.41	35	3	III	C
	<u>XAC0784</u>	cell division protein		41752/4.79	30	2	V	C
	<u>XAC0511</u>	phosphoribosylamine-glycine ligase		44976/ 5.42	26	2	II	C
767	<u>XAC3456</u>	3-isopropylmalate dehydrogenase	0,33752	38289/5.27	957	24	II	C
	<u>XAC1126</u>	malonyl CoA-ACP transacylase		32908/5.57	716	16	II	C
	<u>XAC1550</u>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		31658/6.43	129	6	III	ME
	<u>XAC1046</u>	isocitrate dehydrogenase		35739/5.40	80	4	I	C
780	<u>XAC1006</u>	malate dehydrogenase	0,474028	34886/ 5.37	119	6	I	M
	<u>XAC4040</u>	delta-aminolevulinic acid dehydratase		36552/5.38	88	4	II	C
	<u>XAC3443</u>	response regulator		40707/4.94	1104	27	I	M
	<u>XAC3347</u>	phosphoglycerate kinase		40877/4.91	151	7	I	C
	<u>XAC1362</u>	GTN reductase		39383/ 5.37	53	3	I	C
	<u>XAC1719</u>	enolase		45992/4.96	37	1	I	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 4: Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio não- indutor de patogenidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína em relação <i>Xac</i>	Descrição da proteína	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
148	gil292605055	XAC2665	Tfp pilus adhesin	132225/6.45	678	27	26%	IX	D
48	gil292603628	XAC2015	nucleoside diphosphate kinase	15234/5.61	303	8	55%	II	E
119	gil292603177	XAC3300	lipase/esterase	61027/4.94	512	21	49%	I	M
105	gil292604669	XAC1975	flagellar protein	40576/5.10	1391	35	60%	V	E
	gil292603793	XAC0784	cell division protein FtsZ	42712/4.77	56	3	14%	V	M
100	gil292603707	XAC1077	trigger factor	48229/5.19	302	19	45%	III	C
	gil292605658	XAC3556	leucyl aminopeptidase	51076/5.10	218	7	22%	III	C
	gil292603469	XAC3851	conserved hypothetical protein	49932/ 5.30	38	2	4%	VIII	C
73	gil292605618	XAC1006	malate dehydrogenase	34914/5.37	515	23	65%	I	M
79	gil292606070	XAC0996	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	36341/ 5.58	225	16	43%	III	C
	gil292605352	XAC2083	GDP-mannose 4,6-dehydratase	39020/ 5.86	130	5	19%	I	C
	gil292603357	XAC1046	isocitrate dehydrogenase	35566/5.70	82	7	26%	I	M
	gil292604968	XAC0125	aspartate aminotransferase	46172/5.82	22	2	6%	II	C
81	gil292604285	XAC3352	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35935/6.03	271	19	46%	I	C
	gil292605352	XAC2083	GDP-mannose 4,6-dehydratase	39020/5.86	236	8	38%	VIII	M
	gil292604967	XAC0124	fructose-1,6-bisphosphatase	38376/ 5.89	139	8	21%	I	C
110	gil292603728	XAC1534	dihydrolipoamide acetyltransferase	42399/5.87	567	20	44%	I	C
	gil292605349	XAC4299	O-antigen ABC transporter ATP-binding protein	46720/5.67	27	1	4%	VIII	ME

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 4 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína em relação Xac	Descrição da proteína	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
158	gil292600337	XAC0542	chaperonin GroEL	56899/ 5.05	1094	43	44%	III	C
	gil292599401	XAC2952	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	53988/ 4.99	164	8	7%	II	C
71	gil292601272	XAC2386	superoxidase dismutase	22689/5.46	364	18	34%	VII	P
101	gil292599109	XAC1434	secreted protein	40882/6.24	1114	35	55%	VIII	M
	gil292599109	XAC1434	secreted protein	40882/6.24	3262	59	78%		D
	gil292600701	XAC2462	PhoH-like ATP-binding protein	35988/5.77	71	1	4%	VIII	C
	gil292599261		two-component system sensor protein	126768/ 9.19	33	2	0%	IX	ME
71	gil292597786	XAC1006	malate dehydrogenase	34971/5.37	20	2	5%	I	M
	gil292601272	XAC2386	superoxidase dismutase	22689/5.46	612	17	62%	VII	P
	gil292600607	XAC2736	carboxymethylenebutenolidase	23903/ 5.43	194	9	31%	I	D
	gil292600928	XAC0555	secreted protein	25172/ 6.05	44	3	10%	VIII	M
	gil292600841	XAC2067	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	22990/ 5.24	29	4	15%	I	C
111	gil292598771	XAC1384	ferredoxin II	15587/ 5.61	17	2	9%	I	C
	gil292598535	XAC3388	citrate Si -synthase	50478/ 5.80	574	32	52%	I	C
	gil292598989	XAC3987	leucine aminopeptidase	49132/6.00	178	10	16%	III	C
	gil292599789	XAC3345	pyruvate kinase	54804/ 5.57	100	9	11%	I	C
	gil292597741	XAC0957	elongation factor Tu	43344/ 5.45	28	4	15%	III	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 4 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína em relação Xac	Descrição da proteína	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
159	gil292599789	XAC3345	pyruvate kinase	54804/ 5.57	1828	52	57%	I	C
	gil292598101	XAC0804	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	53165/ 5.51	332	12	18%	I	C
	gil292598714	XAC1237	5-phosphoribosylglycinamide transformylase	43025/5.55	37	1	2%	II	MC
119	gil292597863	XAC1129	3-oxoacyl- acyl carrier protein synthase	43069/5.48	642	34	55%	II	MC
	gil292598714	XAC1237	5-phosphoribosylglycinamide transformylase	43025/5.55	254	11	20%	II	MC
	gil292600368	XAC3225	type III secretion system hopAJ-like protein	46359/ 6.14	64	2	2%	IV	M
	gil292598535	XAC3388	citrate Si -synthase	50478/ 5.80	30	2	8%	I	C
148	gil292599132	XAC1460	fumarate hydratase	54911/5.55	376	20	32%	I	C
	gil292599490		trehalase, periplasmic	62291/5.86	47	2	5%		
	gil292598073	XAC0776	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanyl ligase	51564/ 5.46	43	3	7%	IV	C
89	gil292600428	XAC2005	thioredoxin reductase	34560/ 5.71	243	10	39%	II	P/MC
	gil292599893	XAC3235	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	29824/6.38	45	2	10%	I	C
	gil292600777	XAC2346	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	34289/5.90	33	3	9%	II	C
	gil292601133	XAC2713	2OG-Fe II oxygenase superfamily protein	34924/5.83	16	3	6%	I	C
87	gil292597985	XAC0680	6-phosphogluconate dehydrogenase	32942/ 5.55	373	13	27%	I	C
	gil292599070	XAC1717	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	29993/5.64	97	6	11%	IV	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 4 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína em relação Xac	Descrição da proteína	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
65	gil292598583	XAC3437	adenylate kinase	19943/ 5.33	66	4	25%	II	C
66	gil292600241	XAC1532	conserved hypothetical protein	24258/ 6.31	76	3	9%	VIII	D
	gil292598813	XAC1335	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	20278/5.14	25	1	7%	II	C
163	gil292599185	XAC3869	beta-glucosidase	77725/ 5.15	154	16	27%	I	P
	gil292600230	XAC1522	molecular chaperone DnaK	68810/4.97	45	1	1%	III	C
	gil292599211	XAC3835	isocitrate dehydrogenase	80443/5.54	40	7	11%	I	C
140	gil292598077	XAC0780	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	50745/ 5.64	694	26	39%	IV	C
	gil292601110	XAC1845	oxidoreductase	51109/5.55	15	2	5%	I	C
122	gil292598971	XAC4006	tryptophanyl-tRNA synthetase	46878/ 5.62	432	17	26%	III	C
	gil292597741	XAC0957	elongation factor Tu	43344/5.45	135	6	19%	III	C
	gil292597740	XAC0953	GTP-binding protein	39071/ 4.96	18	4	10%	V	C
127	gil292600243	XAC1534	dihydrolipoamide acetyltransferase	42354/5.87	478	28	50%	I	C
	gil292600944	XAC4225	xylose isomerase	48976/5.39	443	19	43%	I	C
126	gil292597741	XAC0957	elongation factor Tu	43344/5.45	442	15	32%	III	C
	gil292601348	XAC1158	adenylosuccinate synthetase	46513/5.37	73	3	9%	II	C
	gil292597805	XAC1029	dihydrofolate synthase	45231/ 5.34	49	4	10%	II	C

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 4 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína em relação Xac	Descrição da proteína	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
129	gil292600204	XAC0141	conserved hypothetical protein	44018/ 5.19	549	28	50%	VIII	C
	gil292599925	XAC0865	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	50058/5.43	428	25	36%	III	P
	gil292600422	XAC2965	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	44595/5.27	32	3	6%	IV	C
134	gil292600486	XAC3556	leucyl aminopeptidase	51418/5.10	1817	61	76%	III	C
135	gil292600242	XAC1533	dihydroliipoamide dehydrogenase	50718/ 5.76	940	33	46%	I	C
	gil292600486	XAC3556	leucyl aminopeptidase	51418/ 5.10	137	5	12%	III	C
63	gil292598583	XAC3437	adenylate kinase	19943/5.33	546	17	52%	II	C
	gil292600425	XAC2008	outer-membrane lipoprotein carrier protein precursor	24737/9.27	109	5	17%	III	P
61	gil292598813	XAC1335	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	20278/ 5.14	639	22	61%	II	C
67	gil292599588	XAC0907	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	20564/ 6.15	351	23	69%	VII	C
	gil292601159	XAC1418	ribosome releasing factor	20310/ 6.77	58	3	14%	III	P
112	gil292598791	XAC1362	oxidoreductase	46810/ 6.19	1335	41	39%	I	C
	gil292599789	XAC3345	pyruvate kinase	54804/5.57	437	10	21%	I	C
	gil292600920		peptidase	55328/ 5.23	791	25	25%		
157	gil292600217	XAC0129	aldehyde dehydrogenase	55824/5.27	48	5	10%	VII	C
	gil292599589	XAC0906	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	57202/ 5.29	39	3	6%	VII	MC

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.

Tabela 4 (Continuação): Proteínas diferencialmente expressas de *Xau-B* em meio não- indutor de patogenicidade (CN), relativamente à *Xac* crescida sob a mesma condição.

Match Spot	NCBI accession no.	Identidade da proteína em relação <i>Xac</i>	Descrição da proteína	Teórico MM / pI	Score	Peptídeo Matched	Cobertura da sequência %	Categoria	Localização celular predita
79	gil292599509	XAC2547	dihydrodipicolinate synthetase	31972/ 5.70	1346	33	56%	II	C
74	gil292603844	XAC1421	elongation factor Ts	31094/5.29	483	19	38%	III	C
95	gil292602816	XAC3388	citrate Si -synthase	50478/ 5.80	508	28	41%	I	C
130	gil292600530	XAC1653	seryl-tRNA synthetase	47505/5.39	615	23	33%	III	C
	gil292601240	XAC0120	TldD protein	48729/ 6.00	89	4	11%	III	C
	gil292599202	XAC3851	conserved hypothetical protein	50003/5.36	50	6	13%	VIII	D
	gil292600944	XAC4225	xylose isomerase	48976/ 5.39	35	2	2%	I	C
103	gil292598899	XAC4103	pteridine-dependent deoxygenase like protein	36650/5.47	133	6	24%	VII	C
	gil292599109	XAC1434	secreted protein	40882/6.24	29	8	25%	VIII	M

Legenda: Os *Match spots* estão numerados de acordo com a figura Suplementar 3 (A e B). Descrição das categorias segundo anotação do genoma *Xac*: (I) Metabolismo Intermediário; (II) Biossíntese de pequenas moléculas; (III) Metabolismo Macromolecular; (IV) Estrutura celular; (V) Processos Celulares; (VI) Elementos genéticos de Mobilidade, (VII) Patogenicidade, Virulência e Adaptação; (VIII) hipotéticas e (IX) ORFs com categorias indefinidas. Siglas Localização celular: (ME) Membrana externa, (MC) Membrana citoplasmática/ interna, (M) Múltipla, (C) Citoplasma, (P) Periplasma e (D) Desconhecida.