

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ANDRÉ VESSONI ALEXANDRINO

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização parcial da trealase  
periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e do seu  
envolvimento com a fitopatogenicidade

SÃO CARLOS  
2015

ANDRÉ VESSONI ALEXANDRINO

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização parcial da trealase periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e do seu envolvimento com a fitopatogenicidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Área de Concentração:  
Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur  
Co-orientador: Dr. Leandro Seiji Goto

SÃO CARLOS  
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A382c Alexandrino, André Vessoni  
Clonagem, expressão heteróloga e caracterização  
parcial da trealase periplasmática de *Xanthomonas*  
*citri* subsp. *citri* e do seu envolvimento com a  
fitopatogenicidade / André Vessoni Alexandrino. --  
São Carlos : UFSCar, 2016.  
69 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. Cancro cítrico. 2. *Xanthomonas citri* subsp.  
*citri*. 3. Expressão heteróloga. 4. Trealase  
periplasmática. 5. Trealose. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato André Vessoni Alexandrino, realizada em 03/03/2015:

---

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur  
UFSCar

---

Prof. Dr. Leandro Seiji Goto  
UFSCar

---

Prof. Dr. Humberto D'Muniz Pereira  
USP

---

Prof. Dr. José Belasque Junior  
ESALQ

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e avós, pelo carinho, amor, incentivos, conselhos e apoio em todas as fases e decisões da minha vida.

Ao meu irmão, Daniel, pela cumplicidade, amizade, amor e confiança.

À minha namorada, Taís, pelo companheirismo, cumplicidade, amizade, carinho, amor e paciência.

À Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, pela orientação, oportunidade, confiança e apoio, que foram essenciais para realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Leandro Seiji Goto, pela orientação, apoio e ensinamentos.

Ao Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas"- IFSC/USP - São Carlos, especialmente à Andressa Patrícia Alves Pinto, pelos sequenciamentos de DNA.

Ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira (IFSC/USP), pela imensa colaboração nos estudos de estrutura de proteínas.

A todos os professores que disponibilizaram seus equipamentos e espaço, especialmente aos professores Dr. Flávio Henrique da Silva, Dr. Iran Malavazi, Dra. Silvia Nassif Del Lama, Dr. Gilberto Moraes e Dr. Marco Antonio Del Lama.

Ao FUNDECITRUS, pela disponibilização de espaço para realização dos ensaios *in vivo* de patogenicidade, especialmente ao Dr. Franklin Behlau e à Tamiris Garcia.

Aos colegas de laboratório, Silvia, Danyella, Carla, Camila, Vinícius, Dante, Jansen, Jéssica e Mariana, pela colaboração, amizade, parceria e momentos de descontração.

À FAPESP e CAPES, pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de pesquisa.

## RESUMO

O cancro cítrico impõe prejuízos ao setor citricultor por ocasionar queda na produtividade e qualidade dos frutos e pela ausência de medidas eficazes de controle e cura. Assim, o potencial econômico dos citros é limitado, em parte, por essa doença causada principalmente pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC), que apresenta maior virulência e largo espectro de hospedeiros cítricos, comparativamente às bactérias *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B (XauB) e C (XauC). Em um trabalho de análise proteômica anteriormente realizado por nosso grupo de pesquisa, a trealase periplasmática foi identificada como uma proteína cuja expressão foi diferencial entre XAC e XauC, em condição de indução da patogenicidade *in vitro*. A trealase é uma enzima que catalisa a reação de hidrólise da trealose, um dissacarídeo formado por duas unidades de glicose, cujo papel na interação planta-patógeno é ainda pouco compreendido. Um dos objetivos do trabalho foi obter esta enzima purificada, utilizando um sistema de expressão heteróloga induzível por IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo) em *E. coli*, para fins de caracterização parcial da sua estrutura e atividade. A trealase periplasmática de XAC de origem heteróloga apresentou-se como um monômero relativamente estável em relação ao pH, e de cinética Michaeliana. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) da enzima para a trealose foi de  $0,124 \pm 0,015$  mM e a  $V_{m\acute{a}x}$   $17,319 \pm 0,035$   $\mu\text{Mol de glicose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{i}na}^{-1}$ . Análise de dicroísmo circular resultou na seguinte composição de estruturas secundárias: 42,7 % de  $\alpha$ -hélices e 13 % de folhas- $\beta$ . Uma metodologia de nocaute gênico baseada na dupla recombinação homóloga entre o DNA genômico e o vetor suicida pNPTS138 viabilizou a obtenção de uma linhagem mutante deletada no gene que codifica a trealase periplasmática (XAC $\Delta$ 0604), o que possibilitou avaliar a relação entre tal gene e a patogenicidade de XAC em *Citrus aurantifolia*. Folhas infiltradas com a suspensão de XAC $\Delta$ 0604 apresentaram maior encharcamento e necrose do tecido vegetal, além de intensas pústulas acastanhadas quando comparadas com as folhas infiltradas com XAC selvagem, sugerindo maior virulência da linhagem mutante. A atividade da trealase periplasmática foi comparada em extratos celulares brutos provenientes de cultivos de XAC e XauC em dois meios de cultura, não-indutor de patogenicidade (CN) e indutor de patogenicidade (XAM-M). A bactéria XauC apresentou maior atividade enzimática de trealase em relação à XAC em XAM-M. Sendo assim, a acentuada patogenicidade de XAC $\Delta$ 0604 em relação à linhagem selvagem XAC e a maior atividade da trealase periplasmática de XauC em relação à XAC reforçam os recentes trabalhos que indicam a trealose como promotora da patogenicidade em fitopatógenos.

**Palavras-chave:** cancro cítrico; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; expressão heteróloga; trealase periplasmática; trealose; patogenicidade; nocaute gênico.

## ABSTRACT

Citrus canker imposes damages to citriculture by causing drop in productivity and fruit quality and the absence of effective control and cure. Thus, the economic potential of citrus is limited in part by this disease mainly caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) that presents the greatest virulence and broad spectrum of citrus hosts, compared to bacteria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* types B (XauB) and C (XauC). In a proteomic analysis previously performed by our research group, periplasmic trehalase was identified as a protein which expression differed between XAC e XauC in an *in vitro* induction of pathogenicity. Trehalase is an enzyme that catalyzes hydrolysis reaction of trehalose, a disaccharide composed of two glucose units, which role in the plant-pathogen interaction is poorly understood. One of the objectives of the study was to obtain this enzyme in purified form using an IPTG-inducible heterologous expression system in *E. coli*, for purposes of partial characterization of its structure and activity. The recombinant XAC periplasmic trehalase is a monomer bearing wide pH stability and showed Michaelian kinetics. The Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for trehalose was  $0,124 \pm 0,015$  mM and  $V_{max}$   $17,319 \pm 0,035$   $\mu\text{Mol glucose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ . Circular dichroism spectroscopy indicated the following composition of secondary structures: 42.7%  $\alpha$ -helices and 13%  $\beta$ -sheets. A gene knockout method based on double homologous recombination between the genomic DNA and suicide vector pNPTS138 has made possible to obtain a strain deleted in the gene encoding the periplasmic trehalase (XAC $\Delta$ 0604), which enabled to evaluate the relationship between this gene and the XAC pathogenicity in *Citrus aurantifolia*. Infiltrated leaves with XAC $\Delta$ 0604 showed drenching and necrosis of plant tissue and intense brownish pustules compared with wild XAC, suggesting greater virulence of the mutant strain. The periplasmic trehalase activity was compared in XAC and XauC cell extracts from two culture mediums, non-pathogenicity-inducing (CN) and pathogenicity-inducing (XAM-M). Interestingly, XauC has showed higher enzyme activity compared to XAC in XAM-M. Thus, the noticeable higher XAC $\Delta$ 0604 pathogenicity and the greater activity of XauC periplasmic trehalase compared to XAC are indicatives that trehalose may promote pathogenicity.

**Keywords:** citrus canker; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; heterologous expression; periplasmic trehalase; trehalose; pathogenicity; gene knockout.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Lesões características do cancro cítrico .....	13
Figura 2 – Esquema da hidrólise da trealose, catalisada pelas trealases .....	16
Figura 3 – Esquema simplificado do plasmídeo de deleção do gene-alvo, pNPTS138_treA.....	26
Figura 4 – Metodologia para seleção dos possíveis mutantes deletados .....	30
Figura 5 – Esquema simplificado do método de detecção de glicose .....	34
Figura 6 – Análise dos produtos de PCR.....	39
Figura 7 – Análise de restrição dos vetores de propagação .....	40
Figura 8 – Análise de restrição do vetor de expressão .....	41
Figura 9 – Análise da expressão, solubilidade e purificação da trealase recombinante sob SDS-PAGE ....	42
Figura 10 – Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138_treA .....	43
Figura 11 – Confirmação da deleção gênica .....	45
Figura 12 – Ensaio <i>in vivo</i> em <i>Citrus aurantifolia</i> .....	46
Figura 13 – Avaliação da atividade enzimática em XAC, XauC e XAC $\Delta$ 0604 .....	50
Figura 14 – Alinhamento das trealases periplasmáticas de XAC e <i>E. coli</i> .....	52
Figura 15 – Curva padrão de glicose .....	53
Figura 16 – Avaliação da atividade enzimática em função da concentração de trealose .....	54
Figura 17 – Equação de Michaelis-Menten.....	55
Figura 18 – Cinética enzimática da trealase periplasmática de XAC.....	55
Figura 19 – Curva de atividade enzimática relativa em função do pH.....	57
Figura 20 – Ensaio de desnaturação térmica da trealase periplasmática.....	58
Figura 21 – Espectro de dicroísmo circular (CD).....	59
Figura 22 – Estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão por tamanho. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho dos oligonucleotídeos .....	21
Tabela 2 – Pares de oligonucleotídeos e seus respectivos produtos de PCR (pPCR) e funções .....	22
Tabela 3 – Descrição dos ciclos de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos gênicos .....	23
Tabela 4 – Oligonucleotídeos para a confirmação da deleção do gene-alvo .....	31
Tabela 5 – Descrição dos ciclos de PCR utilizados na confirmação da deleção gênica .....	32
Tabela 6 – Proteínas utilizadas na construção da curva de calibração da SEC .....	38
Tabela 7 – Desconvolução do espectro de CD da trealase periplasmática. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2D-PAGE:** "*Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*", eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.
- FAO:** "*Food and Agriculture Organization*", Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.
- BSA:** "*Bovine Serum Albumin*", albumina de soro bovino.
- CD:** "*circular dichroism*", dicroísmo circular.
- CDPro:** pacote contendo os programas CONTINLL, CDSSTR e SELCON3 para análises de espectros de dicroísmo circular.
- D.O.600<sub>nm</sub>:** densidade óptica em 600 nm.
- DMSO:** dimetilsulfóxido.
- dNTP:** trifosfato de desoxinucleotídeo.
- EDTA:** "*Ethylenediamine tetraacetic acid*", ácido etilenodiamino tetra-acético.
- Fundecitrus:** Fundo de Defesa da Citricultura.
- GenBank:** banco de dados de sequências de DNA e proteínas no NCBI.
- GOD:** glicose oxidase.
- IMAC:** "*Immobilized metal affinity chromatography*", cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.
- IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo.
- K<sub>av</sub>:** coeficiente de partição, utilizado na cromatografia de exclusão por tamanho.
- kb:** quilo pares de bases.
- kDa:** quilodalton.
- K<sub>m</sub>:** Constante de Michaelis-Menten.
- LB:** meio de cultura Lúria-Bertani.
- NCBI:** "*National Center for Biotechnology Information*", Centro Nacional de Informação Biotecnológica.
- ORF:** "*Open Reading Frame*", quadro aberto de leitura.
- pb:** pares de bases.
- PBS:** "*Phosphate Buffer Saline*", tampão fosfato de sódio.
- PCR:** "*Polymerase Chain Reaction*", Reação em cadeia da DNA polimerase.
- PDB:** "*Protein Data Bank*", banco de dados de estruturas resolvidas de proteínas.
- POD:** peroxidase.

**pPCR:** produtos de PCR.

**rpm:** rotações por minuto.

**SDS-PAGE:** "*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*", eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio.

**SEC:** "*Size Exclusion Chromatography*", Cromatografia de Exclusão por Tamanho.

**TAE:** Tampão Tris-Ácido acético-EDTA.

**TM:** temperatura de melting ou temperatura de transição de fase.

**V<sub>máx</sub>:** velocidade máxima.

**V<sub>o</sub>:** velocidade inicial.

**XAC:** *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

**XACΔ0604:** linhagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com deleção do gene que codifica a trealase periplasmática.

**XAM-M:** modificação do meio de cultura XAM-1, conhecido por ser indutor de patogenicidade.

**XauB:** *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B.

**XauC:** *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C.

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	11
1.1 Cancro cítrico .....	12
1.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	14
1.3 Estudos genômicos e pós-genômicos .....	15
1.4 O gene-alvo e seu produto.....	16
2 Objetivos .....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3 Materiais e Métodos .....	19
3.1 Linhagens bacterianas, meios e condições de cultivo .....	19
3.2 Enzimas, kits e procedimentos em biologia molecular .....	19
3.3. Desenho e síntese de oligonucleotídeos .....	20
3.4 Extração de DNA genômico.....	22
3.5 Isolamento e clonagem dos fragmentos gênicos de interesse .....	22
3.6 Construção do sistema de expressão .....	24
3.7 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade.....	25
3.8 O sistema de deleção gênica.....	26
3.8.1 Construção do vetor de deleção pNPTS138 .....	27
3.8.2 Preparação de células de XAC eletrocompetentes.....	28
3.8.3 Transformação de XAC por eletroporação.....	28
3.8.4 Seleção de mutantes deletados.....	29
3.8.5 Confirmação da deleção do gene-alvo .....	31
3.9 Teste de patogenicidade em <i>Citrus aurantifolia</i> .....	32
3.10 Atividade enzimática da trealase periplasmática .....	33
3.10.1 Método de avaliação da atividade enzimática .....	33
3.10.2 Atividade da trealase periplasmática em extrato celular de XAC, XAC $\Delta$ 0604 e XauC.....	34
3.10.3 Cinética enzimática .....	35
3.10.4 Teste de estabilidade de pH .....	35
3.10.5 Teste de estabilidade térmica .....	36
3.11 Estudos estruturais.....	37

3.11.1 Dicroísmo Circular .....	37
3.11.2 Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....	37
4 Resultados e Discussão .....	39
4.1 Amplificação por PCR e clonagem .....	39
4.2 Expressão heteróloga e purificação da trealase periplasmática recombinante.....	40
4.2.1 Construção do vetor de expressão.....	40
4.2.2 Análise da expressão heteróloga e da purificação por cromatografia de afinidade .....	41
4.3 Deleção gênica.....	42
4.3.1 Construção do vetor de deleção.....	42
4.3.2 Confirmação da deleção gênica .....	43
4.4 Ensaio in vivo em Citrus aurantifolia .....	46
4.5 Avaliação da atividade enzimática em extratos celulares de XAC, XauC e XAC $\Delta$ 0604 .....	49
4.6 Estudos estruturais e funcionais.....	51
4.6.1 Cinética enzimática .....	52
4.6.2 Estabilidade em relação ao pH.....	56
4.6.3 Estabilidade térmica.....	57
4.6.4 Análise da estrutura secundária por dicroísmo circular .....	58
4.6.5 Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....	60
5 Conclusões.....	62
Referências Bibliográficas .....	63

## 1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com uma produção estimada em mais de 18 milhões de toneladas, tendo sido sendo responsável por 33% do suco de laranja concentrado comercializado no mundo em 2012. Nesse mesmo ano, a produção de laranjas ocupou o sétimo lugar no *ranking* (em valores) entre as *commodities* brasileiras, o que consolida a citricultura como destaque na economia brasileira e contribui para o superávit na balança comercial do país (< <http://faostat3.fao.org/> >, Food and Agriculture Organization – FAO).

Em 2009, as exportações do complexo dos citros somaram US\$ 1,84 bilhão, valor que correspondeu a 3 % das exportações do agronegócio. A produção de citros influencia também o mercado interno brasileiro. Ainda em 2009, foram arrecadados US\$ 189 milhões em impostos e contribuições e, além disso, a citricultura gerou 230 mil empregos diretos e indiretos (NEVES, 2009).

O cancro cítrico causa redução da produtividade e qualidade dos frutos cítricos, agravada pela ausência de medidas efetivas de controle e cura para a doença. A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) é a principal espécie causadora desta doença que acomete culturas em vários continentes (KOLLER, 1994; NAMETAKA et al., 1996).

Desde 1995, o cancro cítrico vem se alastrando de maneira alarmante, principalmente no Brasil e nos EUA, evidenciando a suscetibilidade dos citros frente a esse fitopatógeno (BROWN, 2001). Prática necessária, mas que causa prejuízos ao setor, a erradicação das plantas contaminadas com XAC ainda é adotada pelo Estado de São Paulo, no sentido de erradicar e/ou suprimir o cancro cítrico dos pomares paulistas. Além disso, tornou-se obrigatória a pulverização, que deve ser repetida a cada brotação, de uma solução 0,1 % de cobre metálico nas plantas de citros localizadas em um raio de até 30 metros, a partir de uma

planta contaminada (SÃO PAULO, 2013). Geralmente, metais em elevadas concentrações são tóxicos aos microrganismos, e a utilização de cobre como bactericida na citricultura tem sido extensamente empregada. Porém, tal procedimento não deve ser permanentemente eficaz, uma vez que há registros de linhagens de XAC resistentes ao cobre (BEHLAU et al., 2011).

### **1.1 Cancro cítrico**

Uma das doenças mais importantes da citricultura, o cancro cítrico tem sua origem ainda controversa. Entretanto, acredita-se que áreas tropicais da Ásia, como o Sul da China, a Indonésia e a Índia tenham sido o seu berço, de onde se disseminou para os outros continentes (DAS, 2003).

No Brasil, o primeiro relato de cancro cítrico ocorreu em 1957, no município de Presidente Prudente, localizado na região oeste do Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). A partir de então, a doença se espalhou para outros estados, como Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (NAMETAKA et al., 1996).

Apesar de fracassar na eliminação do cancro cítrico, São Paulo, estado responsável por 76% da produção nacional de laranja, manteve controlada a doença pela adoção de medidas de contenção e erradicação de plantas contaminadas (BELASQUE JR, 2009; IBGE, 2012). No entanto, o último relatório anual do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) acionou um estado de alerta na comunidade citricultora, já que o nível de talhões contaminados atingiu 0,99 %, o mais alto desde 1999 (FUNDECITRUS, 2011). Tal aumento pode ser intensificado nos próximos levantamentos devido à mudança nas regras de controle do cancro cítrico no Estado de São Paulo. A partir de novembro de 2013, a erradicação das plantas que estão em um raio de 30 metros de uma planta contaminada não é mais obrigatória (SÃO PAULO, 2013).

A bactéria causadora do cancro cítrico penetra nos tecidos vegetais por meio de orifícios naturais como os estômatos ou causados por danos mecânicos como ferimentos por espinhos, grãos de areia e atividade de insetos (AMARAL, 2003). O cancro cítrico ataca todas as variedades de citros lesionando as partes aéreas das plantas, sobretudo as folhas e a superfície dos frutos (Figura 1), causando erupções de aspecto corticoso, devido ao rompimento da epiderme vegetal (ROSSETTI, 2001). As erupções podem ser circundadas ou não por um halo amarelo, associado ao decréscimo de clorofilas a e b, caroteno e xantofila (PADMANABHAN et al., 1973). Em folhas, as lesões ocorrem tanto sobre a face abaxial quanto adaxial. Por possuírem elevada concentração de estômatos, as folhas constituem a região mais importante no processo de infecção. Frutos em estágio avançado de infecção apresentam ruptura na casca, o que facilita a dispersão do patógeno (AMARAL, 2003).

Entretanto, os sintomas supracitados não representam o principal problema da doença, pois raramente tais manifestações são letais para a planta. Todavia, um dos efeitos adicionais do cancro cítrico é o aumento na produção do fito-hormônio etileno em resposta à infecção, o que provoca queda prematura de folhas e frutos, tornando estes inapropriados para o consumo (CROZIER et al., 2001).



**Figura 1 – Lesões características do cancro cítrico.** Lesões típicas do cancro cítrico em folha, fruto e ramo infectados por XAC, da esquerda para a direita.

Fonte: Fundecitrus (<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=66>)

A disseminação do cancro cítrico ocorre de diversas formas. Um importante disseminador é o próprio homem, por meio do transporte de mudas, restos de cultura e equipamentos contaminados. A chuva também atua como um dispersor da doença, uma vez

que as gotas d'água se chocam com a massa bacteriana exsudada pelas lesões do cancro cítrico, transportando o fitopatógeno para outros ramos ou até mesmo outras plantas (GOTO, 1992).

## 1.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O gênero *Xanthomonas* compõe um grupo economicamente importante de bactérias aeróbicas, gram-negativas, flageladas, não fastidiosas, com morfologia de bastonete (GRAHAM et al., 2004; MADIGAN et al., 2010). São produtoras da goma xantana, um polissacarídeo de notável aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, química e petroquímica, suscitando interesse na indústria biotecnológica (LOPEZ et al., 2001).

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) ataca a maioria das espécies conhecidas de citros e ocasiona a cancrose A, forma mais severa da doença. *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC), causadora da cancrose C, ataca um único hospedeiro, *Citrus aurantifolia* (CIVEROLO, 1984). Encontrada no Uruguai, Paraguai e Argentina, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB) é menos patogênica e provoca a cancrose B principalmente em *Citrus limon* (STALL; SEYMOUR, 1983).

Não há registros de espécies de citros resistentes à infecção artificial por XAC, sugerindo a inexistência de resistência genética dos citros contra esta bactéria e que a variação ambiental deve ser o componente responsável pela tolerância de algumas espécies de citros no campo (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

No início do processo de infecção, a planta precisa identificar a presença da bactéria e ativar alguma resposta de defesa específica a esta. Sendo assim, há uma interação entre patógeno e hospedeiro de modo que para cada gene ativado, ou para cada proteína de ataque produzida por uma das partes, uma resposta é induzida pela produção de uma proteína de

defesa pela contraparte (FLOR, 1971). Em casos nos quais a bactéria sobrepuja os mecanismos de defesa do hospedeiro, ocorre a manifestação dos sintomas da doença por meio dos mecanismos de patogenicidade e virulência da bactéria. Esses mecanismos envolvem a secreção de enzimas líticas extracelulares, produção de toxinas e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta hospedeira.

Dessa forma, em consequência da ativação dos mecanismos de infecção do patógeno, a resposta da planta pode ser modificada. Entretanto, geralmente essa resposta de defesa não é suficiente para evitar a infecção bacteriana, devido ao fato de o hospedeiro não conseguir responder em intensidade e tempo suficientes para conter a bactéria (WHITE et al., 2000).

### **1.3 Estudos genômicos e pós-genômicos**

A importância econômica da citricultura para o país aliada ao poder destrutivo do cancro cítrico e à falta de medidas de controle dessa doença dos citros foram tópicos conspícuos que estimularam o projeto de sequenciamento completo do genoma da bactéria XAC, linhagem 306 (DA SILVA et al., 2002). A conclusão do projeto tem possibilitado o estudo de características particulares de XAC, as quais podem estar relacionadas com a capacidade de adaptação da bactéria ao hospedeiro.

A proteômica, considerada uma análise em larga escala da expressão proteica, é uma das áreas centrais da genômica funcional. Os atuais avanços técnicos permitem resolver e identificar centenas ou milhares de proteínas a partir de extratos proteicos complexos. Trabalhos utilizando a proteômica diferencial de frações periplasmáticas de XAC após indução da sua patogenicidade *in vitro*, comparada à condição de não indução da patogenicidade (ARTIER, 2010), ou entre XAC, XauB e XauC (ZANDONADI, 2012) foram previamente realizados em nosso laboratório (LBBMA) no Departamento de Genética e

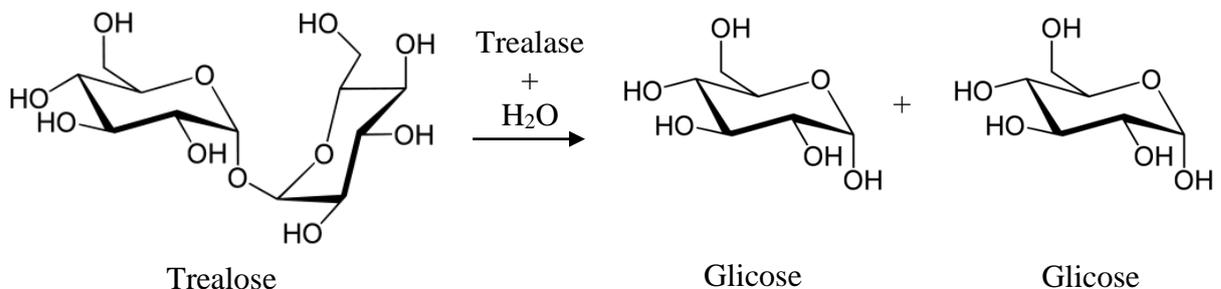
Evolução – UFSCar. Ainda nesse contexto, foi realizada a análise de proteínas superficiais da membrana de XAC em interação com o hospedeiro (CARNIELLI, 2013).

No trabalho de Zandonadi (2012), frações ricas em proteínas periplasmáticas foram extraídas de XAC e XauC cultivadas em meio XAM-M, uma modificação do meio XAM-1, conhecido por ser indutor de patogenicidade (CARVALHO, 2006). Tais proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e analisadas quanto à sua expressão diferencial.

Os dados obtidos foram utilizados na identificação das proteínas por pesquisa em bancos de sequências anotadas a partir do genoma de XAC, disponível no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). Uma das proteínas identificadas como diferentemente expressas entre as bactérias XAC e XauC cultivadas em meio XAM-M foi a trealase periplasmática (código de acesso no GenBank XAC0604/AAM35493.1).

#### 1.4 O gene-alvo e seu produto

Trealases (EC 3.2.1.28) são enzimas que catalisam a hidrólise da trealose, um dissacarídeo não redutor ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo), resultando em dois monômeros de glicose (Figura 2) (PAUL et al., 2008).



**Figura 2 – Esquema da hidrólise da trealose, catalisada pelas trealases.** A enzima catalisa a hidrólise da ligação  $\alpha$ -O-glicosídica do dissacarídeo trealose liberando duas moléculas de D-glicose (modificado a partir de PAUL et al., 2008).

A trealose é um açúcar amplamente distribuído entre os seres vivos, sendo encontrada em bactérias, fungos, animais (exceto mamíferos) e vegetais. Este dissacarídeo exerce variadas funções biológicas, desde reserva energética, proteção de proteínas e membranas contra diversos estresses ambientais (dessecação, congelamento, estresse osmótico e escassez de nutrientes) até a sinalização de vias metabólicas e de crescimento (CROWE et al., 1984; ELBEIN, 2003; PAUL et al., 2008). Curiosamente, estudos contemporâneos indicam a trealose como um promotor de fitopatogenicidade (DJONOVIC et al., 2013; FACINCANI et al., 2014).

Trealases periplasmáticas bacterianas parecem estar relacionadas com mecanismos de resposta a perturbações ambientais (STROM, 1993), o que é cabível sob o ponto de vista de XAC respondendo ao estresse imposto pelo hospedeiro no decorrer da colonização. Compreender o papel da trealase periplasmática neste contexto pode contribuir para o entendimento do processo de infecção.

Não há registro de estudos envolvendo trealases em fitopatógenos, tampouco em XAC. Há apenas quatro estruturas resolvidas de trealases periplasmáticas depositadas no *Protein Data Bank* <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>, todas de *E. coli* (GIBSON, 2007). A análise utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) indica que o gene que codifica a trealase periplasmática de XAC possui 98 % de identidade em relação aos genes de XauB e XauC, os quais possuem 99 % de identidade entre si (alinhamentos não mostrados). Os três tipos bacterianos possuem apenas um gene que codifica para trealase periplasmática em todo seu genoma.

## 2 Objetivos

O objetivo do projeto foi agregar informações biológicas que possam contribuir para o entendimento do papel da trealase periplasmática no processo infeccioso da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por meio da análise funcional do gene codificante e da proteína recombinante.

### 2.1 Objetivos específicos

- Isolamento (amplificação por PCR) e clonagem da região codificante referente ao gene-alvo.
- Subclonagem, produção heteróloga e purificação do produto de expressão recombinante do gene em *E. coli*;
- Estudos sobre o produto de expressão heteróloga do gene com a finalidade de caracterizar parcialmente sua estrutura e atividade biológica;
- Obtenção de uma linhagem de XAC mutante deletada no gene que codifica a trealase periplasmática;
- Avaliação *in vivo* do efeito da deleção do gene da trealase periplasmática em XAC em relação à patogenicidade em *Citrus aurantifolia*.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Linhagens bacterianas, meios e condições de cultivo

As linhagens de XAC (linhagem 306) e XauC (linhagem IBSBF 338) foram fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). As bactérias foram estocadas a -80 °C em meio caldo nutriente (Difco) adicionado de glicerol 10 %.

Cultivos de XAC em meio sólido foram realizados em ágar nutriente (Difco) ou ágar-LB (Sigma) em incubadora a 28 °C. Caldos Lúria-Bertani (LB) e Nutriente (Difco) foram utilizados para cultivos em meio líquido.

Para a análise da atividade enzimática em XAC e XauC, os cultivos foram feitos em caldo nutriente e no meio indutor de patogenicidade, XAM-1 (CARVALHO, 2006), com modificações. A composição do meio XAM-1 modificado, denominado XAM-M (ARTIER, submetido) é a seguinte: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,57 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 33,06 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60,28 mM; citrato de sódio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) 1,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1M; casaminoácidos 0,03%; Frutose 10 mM, Sacarose 10 mM; BSA 1 mg/mL; pH 5,4.

As linhagens DH5 $\alpha$  e BL21(DE3) de *E. coli* foram cultivadas em caldo LB e ágar-LB.

#### 3.2 Enzimas, kits e procedimentos em biologia molecular

Para a extração de DNA genômico de XAC foi utilizado o *kit Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). DNA polimerase (*Phusion High Fidelity DNA Polimerase*), enzimas de restrição, vetor de clonagem e demais *kits* de extração de DNA foram adquiridos da Fermentas-Thermo Scientific. Ampicilina e canamicina foram obtidas da Sigma.

Técnicas de biologia molecular seguiram métodos padronizados (AUSUBEL, 2002) ou então como detalhadas.

### 3.3. Desenho e síntese de oligonucleotídeos

O par de oligonucleotídeos destinados à amplificação por PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase) da região codificante da trealase periplasmática de XAC foi desenhado com base na sequência depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), código de acesso XAC0604/AAM35493.1 (*periplasmic trehalase*), de tal forma a coincidirem 15-30 bases da região 5' da fita codificante e da sua respectiva fita reversa complementar (3' do fragmento gênico). A análise *in silico* da ORF XAC0604 no *software* SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) indicou um provável peptídeo sinal, codificado por uma região de 117 pb, o qual foi excluído quando do desenho do oligonucleotídeo pET2829TREA\_FW (Tabela 1).

Para a construção do plasmídeo de deleção do gene-alvo, foram projetados oligonucleotídeos designados à amplificação por PCR das regiões de 1 kb *upstream* e *downstream* à ORF XAC0604, com base na sequência do genoma completo de XAC, depositada no GenBank, código de acesso NC\_003919.1.

Todos os oligonucleotídeos possuem sítios de restrição para endonucleases adequadas para a posterior subclonagem nos vetores de propagação, expressão e/ou deleção. O *software* Lasergene 7.1 ([www.dnastar.com](http://www.dnastar.com)) foi utilizado para o estudo das sequências e escolha das endonucleases, de modo que fossem adotadas endonucleases cujos sítios não estivessem presentes nas sequências nucleotídicas originais dos fragmentos gênicos e estivessem presentes e adequadamente posicionados nos vetores.

Bases adicionais foram inseridas às extremidades 5' de alguns oligonucleotídeos de forma a possibilitarem, caso necessário, clonagem direta (sem propagação no vetor de clonagem), e também para otimização dos parâmetros termodinâmicos como temperatura de transição de fase (*melting temperature*) a mais próxima a 65 °C e temperatura de formação de

superestruturas indesejáveis como *hairpins*, homo e hetero dímeros de hibridização oligo-oligo, a mais baixa possível. Otimização dos oligonucleotídeos foram feitas por meio do *software* OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com>). A Tabela 1 apresenta o desenho de todos os oligonucleotídeos utilizados.

<b><u>pET2829 treA</u></b>		
	NdeI	
pET2829treA_FW	5' TAA <b>CA/TATC</b> gcgccgctggacgctccggtc 3'	TM 67.5°C
	M A P L D A P V	
	XhoI	
pET2829treA_RV	5' TAT <b>C/TCGAG</b> tcagcgcgcgccgcctc 3'	TM 67.5°C
	XhoI	
pET2829treA_RV_C	5' <b>C/TCGAG</b> gcgcgcgccgcctcg 3'	TM 67.5°C
<b><u>1kb Up treA</u></b>		
	BamHI	
Up_treA_FW	5' TAT <b>G/GATCC</b> ggtaaacgaccggtgtggcgg 3'	TM 65.9°C
	EcoRI	
Up_treA_RV	5' AGC <b>G/AATTC</b> gtccatccggtgccattgcac 3'	TM 65.9°C
<b><u>1kb Down treA</u></b>		
	HindIII	
Down_treA_FW	5' CGACT <b>A/AGCTT</b> gtcggtgaccagttccggtgt 3'	TM 65.9°C
	BamHI	
Down_treA_RV	5' TAT <b>A/G/GATCC</b> ggacggtgccgctgctgc 3'	TM 65.9°C

**Tabela 1 – Desenho dos oligonucleotídeos.** Ao final de todo o processo de otimização, os oligonucleotídeos resultantes estão apresentados. Em letras minúsculas, as regiões de sobreposição de bases com o fragmento gênico de interesse. Em letras maiúsculas, bases adaptadas nas regiões 5'. Sítios de restrição estão grifados em amarelo, com a respectiva enzima de restrição identificada acima e ponto de clivagem representado por /. Códon de fim de tradução está grifado em azul. Um códon de iniciação não-nativo (ATG) foi incluído no oligonucleotídeo pET2829TREA\_FW. A tradução conceitual prevista da região *N*-terminal da proteína de interesse está mostrada em verde. As temperaturas de *melting* estão indicadas (TM).

Para a expressão heteróloga foram projetadas duas versões do oligonucleotídeo reverso (3' do fragmento gênico que codifica a trealase periplasmática), o que torna possível a expressão fusionada a uma cauda *N*-terminal de histidinas no vetor pET28a (Novagen, Anexo I), expressão em fusão com cauda de histidina *C*-terminal no vetor pET29a (Anexo II) ou livre de fusão (pPCR1 no vetor pET29a, Tabela 2). Sendo assim, as duas versões de produtos

de PCR voltadas à expressão gênica podem facilmente ser utilizadas para a obtenção de até quatro construções diferentes quanto à presença e posicionamento da cauda de histidina (sem nenhuma, *N*-terminal, *C*-terminal e até com duas caudas).

A Tabela 2 mostra a relação entre os pares de oligonucleotídeos e os correspondentes produtos de PCR, especificando suas respectivas funções no presente trabalho.

<b>Par de oligonucleotídeos</b>	<b>Produto</b>	<b>Função</b>
pET2829treA_FW e pET2829treA_RV	Trealase periplasmática ( <b>pPCR1</b> )	Expressão heteróloga
pET2829treA_FW e pET2829treA_RV_C	Trealase periplasmática sem o <i>stop</i> códon nativo do gene ( <b>pPCR2</b> )	Expressão heteróloga
Up_treA_FW e Up_treA_RV	Região de 1 kb <i>upstream</i> ao gene que codifica a trealase periplasmática de XAC ( <b>pPCR3</b> )	Deleção gênica
Down_treA_FW e Down_treA_RV	Região de 1 kb <i>downstream</i> ao gene que codifica a trealase periplasmática de XAC ( <b>pPCR4</b> )	Deleção gênica

**Tabela 2 – Pares de oligonucleotídeos e seus respectivos produtos de PCR (pPCR) e funções**

### 3.4 Extração de DNA genômico

Células de XAC foram cultivadas em 500 mL de caldo nutriente, coletadas por centrifugação e lavadas três vezes com PBS (Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; 150 mM NaCl). Cerca de 0,1 g da massa de células resultante (peso úmido) foi utilizado para extração de DNA genômico por meio do *kit Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega).

### 3.5 Isolamento e clonagem dos fragmentos gênicos de interesse

O isolamento dos fragmentos gênicos de interesse (Tabela 2) foi feito por PCR utilizando DNA genômico de XAC como molde.

As ampliações foram realizadas em um termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) segundo o descrito abaixo:

---

500 ng de DNA genômico  
 100 pMol de oligonucleotídeo FW  
 100 pMol de oligonucleotídeo RV (ou RV\_C)  
 2,5 U de *taq* DNA polimerase  
 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>  
 0,8 mM de dNTP (0,2mM de cada)  
 H<sub>2</sub>O MilliQ q.s.p 50 µL

---

A Tabela 3 mostra a programação dos ciclos de PCR destinados ao isolamento dos fragmentos gênicos de interesse.

pPCR Etapa da PCR	1 e 2		3 e 4	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	97°C	10 minutos	98°C	10 minutos
Desnaturação	94°C	30 segundos	98°C	30 segundos
Hibridização	61,5°C	30 segundos	60,9°C	30 segundos
Extensão	72°C	2 minutos	72°C	1 minuto
Extensão final	72°C	10 minutos	72°C	10 minutos

} 35x

**Tabela 3 – Descrição dos ciclos de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos gênicos**

Os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %) contendo brometo de etídeo e utilizados em reação de ligação (com T4 DNA ligase) para clonagem no vetor pJET 1.2 (Fermentas, Anexo III), seguindo a razão molar de 3:1 (inserto:vetor). Os produtos da ligação foram utilizados na transformação de células de *E. coli* DH5α competentes por tratamento com cloreto de cálcio (AUSUBEL, 2002). As células transformadas foram plaqueadas em meio ágar-LB contendo ampicilina 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

Algumas colônias ampicilina-resistentes foram submetidas à extração de DNA plasmidial para averiguação de clones positivos (para cada um dos insertos pPCR1, pPCR2,

pPCR3, pPCR4; Tabela 2) por dupla digestão do DNA plasmidial com as endonucleases específicas, seguida de análise por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %) contendo brometo de etídio.

Os clones positivos foram submetidos a sequenciamento de DNA pelo método do didesoxinucleotídeo marcado de Sanger (SANGER, 1977) em um aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas", no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

### **3.6 Construção do sistema de expressão**

O DNA plasmidial de um clone para o qual a presença de inserto foi confirmada (construção utilizando como inserto o pPCR1) foi digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI* e o produto da digestão submetido à eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %) para purificação do fragmento clonado. O fragmento purificado foi utilizado em reação de ligação com T4 DNA ligase (razão molar inserto:vetor de 3:1) juntamente com o vetor pET28a (Novagen, Anexo I), previamente digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. A reação de ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  para fins de propagação e extração de DNA plasmidial.

As células foram plaqueadas em meio ágar-LB contendo canamicina (40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Clones resistentes à canamicina foram confirmados para a presença de inserto por dupla digestão do DNA plasmidial com as endonucleases *XhoI* e *NdeI* em eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %).

### 3.7 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade

O vetor de expressão obtido foi utilizado na transformação de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), sendo as células plaqueadas em ágar-LB contendo canamicina 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Colônias isoladas dos transformantes foram inoculadas em caldo LB adicionado de canamicina 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para ensaios de expressão pela indução com IPTG 0,1 mM, adicionado na fase *mid-log* de crescimento populacional bacteriano ( $\text{D.O.}_{600\text{ nm}} \cong 0,5$ ). Os ensaios de expressão foram incubados por 16 horas a 18 °C em agitador orbital a 250 rpm. Ao final da indução, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em 50 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM e lisadas por 5 pulsos de ultrassom (Sonic Dismembrator 500, Fisher Scientific, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva), com intervalos de 1 minuto entre os pulsos, sob banho de gelo. A fração solúvel do lisado foi separada do particulado insolúvel por centrifugação a 4 °C, 12.000 x g por 10 minutos.

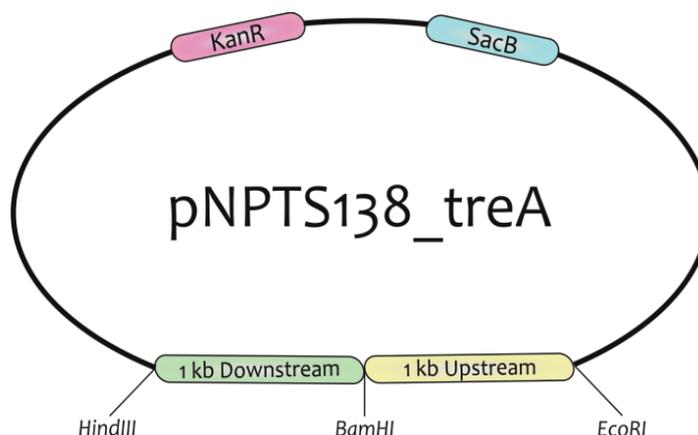
Para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), a fração solúvel do lisado celular foi aplicada sobre uma coluna de níquel imobilizado Ni-NTA (Novagen) e a proteína foi eluída da coluna aplicando-se um gradiente de concentrações de imidazol (de 5 mM a 250 mM). Alíquotas das frações solúvel e insolúvel, bem como alíquotas do pós-coluna (após a passagem da fração solúvel do lisado pela coluna cromatográfica de afinidade) e dos eluatos em imidazol foram submetidas à análise em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para averiguar a funcionalidade dos sistemas de expressão e purificação.

Para os experimentos de atividade e cinética enzimática (item 3.10) e estruturais (item 3.11), repetiu-se o ensaio de expressão otimizando a purificação ao utilizar apenas as soluções de imidazol 5 mM (lavagem da coluna de níquel imobilizado para eliminação de

contaminantes) e 50 mM (eluição da proteína purificada). Esta última fração foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 100 mM, e quantificada pelo método de absorção no UV em comprimento de onda de 280 nm.

### 3.8 O sistema de deleção gênica

A deleção do gene-alvo foi feita utilizando o vetor pNPTS138 (Anexo IV), gentilmente cedido pelo Prof. Henrique Ferreira (UNESP/Rio Claro). Resumidamente, dois fragmentos de aproximadamente 1 kb correspondentes às regiões *upstream* e *downstream* ao gene-alvo a ser deletado foram clonadas *in tandem* no vetor pNPTS138 (Figura 3).



**Figura 3 – Esquema simplificado do plasmídeo de deleção do gene-alvo, pNPTS138\_treA.** O gene que confere resistência à canamicina está representado por KanR. SacB denota o gene de *Bacillus subtilis*, que codifica a enzima levansucrase, a qual converte sacarose em um composto tóxico para as células. As regiões de 1000 pb que flanqueiam o gene-alvo estão representadas por 1 kb Downstream e 1 kb Upstream, com os respectivos sítios de restrição para *HindIII*, *BamHI* e *EcoRI*, estrategicamente posicionados para clonagem dos fragmentos *in tandem*.

Tal construção foi utilizada na transformação de XAC por eletroporação. Colônias transformantes potencialmente contendo um primeiro evento de recombinação por *crossing-over* entre o DNA cromossomal e o plasmídeo introduzido (o qual resulta na incorporação do plasmídeo ao cromossomo bacteriano) foram selecionadas em meio contendo canamicina. Para selecionar mutantes carregando um segundo evento de *crossing-over* (o qual resulta na

remoção do vetor e também do gene-alvo do DNA cromossômico) os mutantes selecionados na primeira fase foram cultivados em sacarose 10 %.

O vetor pNPTS138 carrega uma cópia do gene que codifica para a enzima levansucrase (*SacB* de *Bacillus subtilis*), a qual converte a sacarose em um composto tóxico para as células (Figura 3) (BRAMUCCI, 1996). Desse modo, somente as bactérias que transferiram o gene para o plasmídeo por dupla recombinação e o eliminaram (ou seja, houve excisão do plasmídeo do cromossomo seguido de cura plasmidial) serão capazes de crescer no meio contendo sacarose 10 %. Células resultantes de recombinação única também são eliminadas por possuírem o plasmídeo integrado no genoma. Para aumentar as chances de cura plasmidial nos mutantes que sofreram o duplo *crossing-over*, os mesmos foram cultivados repetidamente em meio de cultivo na ausência de canamicina. Colônias mutantes de XAC obtidas foram analisadas por PCR e alíquotas do cultivo bacteriano dos mutantes confirmados foram armazenadas a -80 °C.

### 3.8.1 Construção do vetor de deleção pNPTS138

Como mencionado na seção 3.5, os produtos de PCR pPCR3 e pPCR4 foram separadamente clonados no vetor pJET 1.2 (Fermentas) e os clones confirmados por dupla digestão do DNA plasmidial com as endonucleases *Bam*HI e *Eco*RI (pPCR3, região *upstream*) e *Bam*HI e *Hind*III (pPCR4, região *downstream*), seguida de análise por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %). Clones positivos foram cultivados em caldo LB para fins de extração do DNA plasmidial. Após a dupla digestão do DNA plasmidial dos dois diferentes clones em pJET 1.2 (Fermentas) com os respectivos pares de endonucleases, as regiões 1 kb *upstream* e *downstream* foram purificadas em gel de TAE agarose (0,8 %).

Para iniciar a construção do vetor de deleção do gene que codifica a trealase periplasmática (pNPTS138\_treA, Figura 3), o plasmídeo pNPTS138 foi digerido com as endonucleases *Hind*III e *Bam*HI e purificado em gel de TAE agarose (0,8 %). Em seguida, o fragmento de 1 kb *downstream* purificado foi utilizado em reação de ligação com T4 DNA ligase (razão molar inserto:vetor de 3:1) juntamente com o vetor pNPTS138 previamente digerido e purificado. Tal construção foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  seguida de plaqueamento em ágar-LB contendo canamicina (40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Colônias resistentes à canamicina tiveram seu DNA plasmidial extraído e digerido com as endonucleases *Hind*III e *Bam*HI. A confirmação da clonagem foi feita em eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %).

Para a clonagem do segundo fragmento flanqueador (1 kb *upstream*) ao gene-alvo, seguiu-se o mesmo procedimento, utilizando o vetor com a primeira região clonada e substituindo-se a endonuclease *Hind*III por *Eco*RI.

### **3.8.2 Preparação de células de XAC eletrocompetentes**

Células de XAC foram cultivadas em 100 mL de caldo LB, sob agitação de 200 rpm, a 28 °C até que atingissem D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5. Em seguida, as células foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 x g a 4 °C e lavadas três vezes com água estéril gelada. As células foram concentradas 10x, aliquotadas e armazenadas a -80 °C.

### **3.8.3 Transformação de XAC por eletroporação**

O vetor de deleção pNPTS138\_treA foi utilizado na transformação de células de XAC eletrocompetentes. A eletroporação foi realizada com cubetas de 0,2 cm em um eletroporador

*Gene Pulser Xcell Electroporation Systems* (BIO-RAD), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Iran Malavazi, sob as seguintes condições: 2,5 kV, 50 $\Omega$  e 50  $\mu$ F. Após o pulso elétrico, foram adicionados 2 mL de caldo LB isento de antibióticos e o cultivo foi incubado por 2 horas sob agitação de 200 rpm. Em seguida, o cultivo foi plaqueado em ágar-LB contendo canamicina (40  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>).

### 3.8.4 Seleção de mutantes deletados

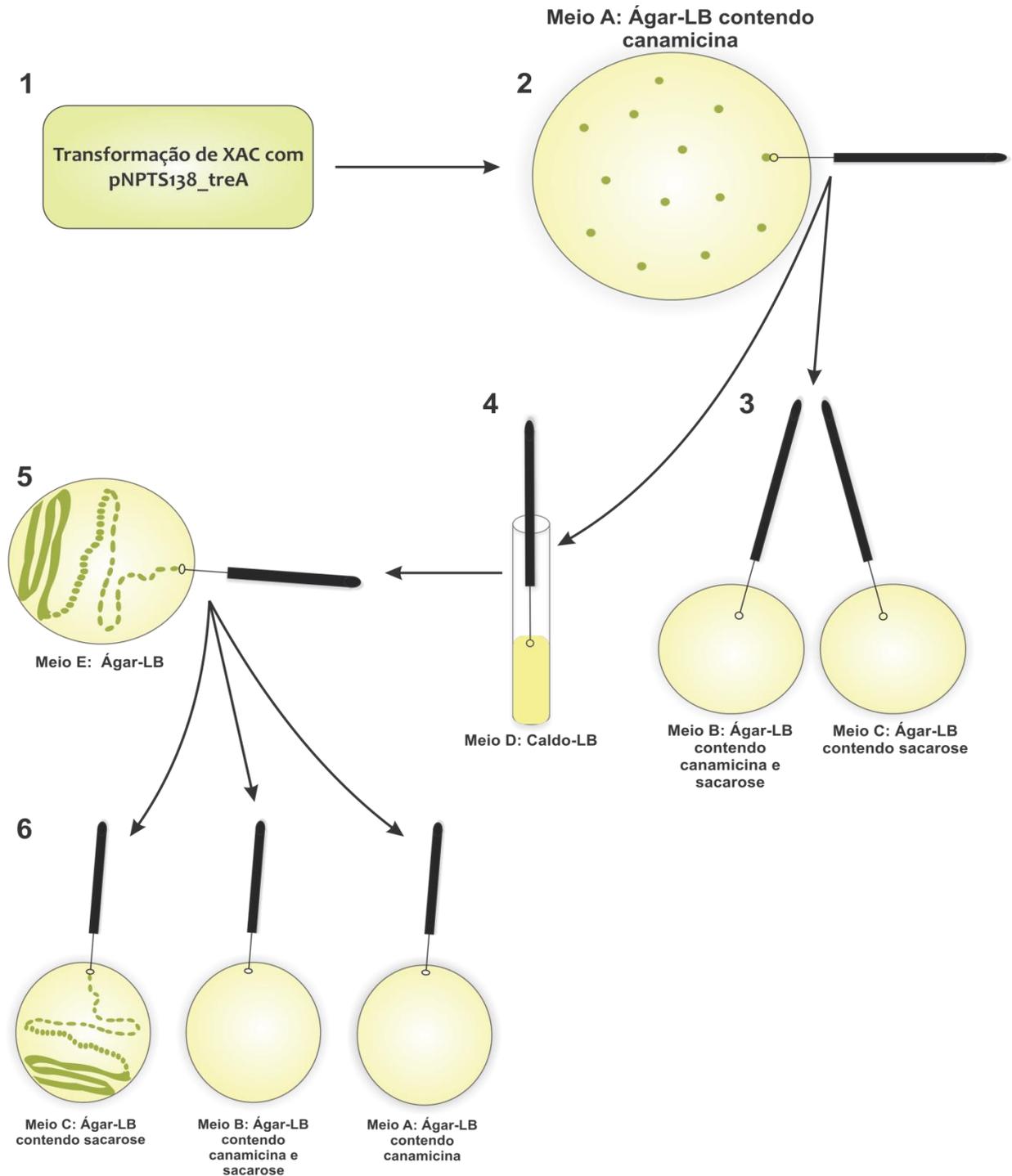
Colônias transformantes resistentes à canamicina foram repicadas em duas condições diferentes: ágar-LB contendo canamicina e sacarose 10 % (Meio B) e ágar-LB contendo sacarose 10 % (Meio C). Em seguida, colônias que não tiveram crescimento nos meios B e C foram cultivadas em caldo LB isento de antibióticos (Meio D) por 12 horas, sob agitação de 200 rpm, a 28 °C, para possibilitar o primeiro evento de recombinação, o que resultaria em integração do vetor ao DNA cromossomal de XAC. Tal cultivo foi estriado em ágar-LB para obtenção de colônias isoladas. Após isso, algumas colônias isoladas foram repicadas em três diferentes condições:

Meio A: Ágar-LB contendo canamicina;

Meio B: Ágar-LB contendo canamicina e sacarose 10 %;

Meio C: Ágar-LB contendo sacarose 10 %;

O cultivo de cada uma das colônias (repicadas) nestas três diferentes condições facilita o *screening* das possíveis colônias mutantes deletadas, isto porque colônias resistentes à sacarose e sensíveis à canamicina podem ser resultantes da dupla recombinação seguida da eliminação do plasmídeo de deleção. A Figura 4 ilustra o procedimento adotado na seleção das possíveis colônias mutantes deletadas.



**Figura 4 – Metodologia para seleção dos possíveis mutantes deletados.** Diferentes cultivos foram realizados para facilitar o *screening* de linhagens mutantes deletadas. **1-2** | Células de XAC eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo de deleção do gene de interesse e, em seguida, plaqueadas em ágar-LB adicionado de canamicina (Meio A). **3** | Colônias transformantes foram replicadas em ágar-LB contendo canamicina e sacarose (Meio B) e ágar-LB contendo somente sacarose (Meio C). **4-5** | Colônias que não apresentaram crescimento nos meios B e C foram cultivadas em caldo-LB (Meio D) e então estriadas em ágar-LB (Meio E) para seu isolamento. **6** | Colônias isoladas foram replicadas nos meios A, B e C, para seleção dos possíveis mutantes deletados (aqueles que apresentaram crescimento apenas no meio C).

### 3.8.5 Confirmação da deleção do gene-alvo

Oligonucleotídeos (treA\_KO\_FW e treA\_KO\_RV, Tabela 4) que hibridizam nas regiões do DNA cromossomal adjacentes às regiões flanqueadoras de 1 kb do gene-alvo (distantes cerca de 50 pb) e não hibridizam no plasmídeo de deleção pNPTS138\_treA, foram projetados para a confirmação da deleção por PCR. Desse modo, é possível diferenciar uma colônia mutante deletada de uma selvagem de acordo com os tamanhos dos produtos de PCR obtidos.

treA_KO_FW 5' TATatctgcaggcttttcgccccgagccgc 3'	TM 65.0°C
treA_KO_RV 5' ATCaccocgccatgccagctcgtccatc 3'	TM 65.1°C

**Tabela 4 – Oligonucleotídeos para a confirmação da deleção do gene-alvo.** Em letras minúsculas, as regiões de sobreposição de bases com DNA genômico. Em letras maiúsculas, bases adaptadas nas regiões 5'. As temperaturas de *melting* estão indicadas (TM).

Colônias selecionadas como possíveis mutantes deletados foram isoladamente ressuspensas em 49 µL de água destilada estéril e fervidas por 5 minutos. Cinco µL deste material foram utilizados como molde juntamente com 5 µL de um *Mix* de PCR preparado suficiente para 10 reações (descrito abaixo) de volume final de 10 µL.

---

150 pMol de oligonucleotídeo treA\_KO\_FW  
 150 pMol de oligonucleotídeo treA\_KO\_RV  
 0,8 mM de dNTP (0,2 mM de cada)  
 5x *Phusion Green High-Fidelity Buffer*  
 2 U de *Phusion High-Fidelity* DNA polimerase  
 DMSO 5%  
 H<sub>2</sub>O MiliQ q.s.p 19 µL

---

As amplificações foram realizadas em um termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) programado para realizar o seguinte ciclo:

<b>Etapa da PCR</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Desnaturação inicial	98°C	10 minutos
Desnaturação	98°C	30 segundos
Hibridização	60°C	30 segundos
Extensão	72°C	4 minutos
Extensão final	72°C	10 minutos

} × 45

**Tabela 5 – Descrição dos ciclos de PCR utilizados na confirmação da deleção gênica**

### **3.9 Teste de patogenicidade em *Citrus aurantifolia***

As linhagens de XAC e XAC $\Delta$ 0604 (mutante deletada para o gene da trealase periplasmática) foram testadas quanto à patogenicidade em *Citrus aurantifolia*, em uma estufa com temperatura e umidade controladas, gentilmente disponibilizada pelo Fundecitrus, em Araraquara-SP.

Colônias isoladas de XAC e XAC $\Delta$ 0604 foram cultivadas em 25 mL de caldo LB até que atingissem D.O.<sub>600nm</sub> de 0,4. As células foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 28 °C e os “*pellets*” foram ressuspensos em 25 mL de água destilada estéril. Tais suspensões foram utilizadas na infiltração das folhas (na face abaxial) com auxílio de uma seringa, em pontos levemente perfurados com agulha. Em cada folha, foram feitas de 8 a 12 infiltrações, totalizando até 1 mL de suspensão bacteriana ou água destilada estéril (controle negativo) por folha.

Um ramo da planta foi utilizado para cada uma das três condições testadas (XAC, XAC $\Delta$ 0604 e controle com água destilada estéril), sendo infiltradas quatro folhas de cada ramo. No quinto dia após as infiltrações, as folhas foram destacadas e fotografadas para constatação e comparação do processo infeccioso de XAC e XAC $\Delta$ 0604.

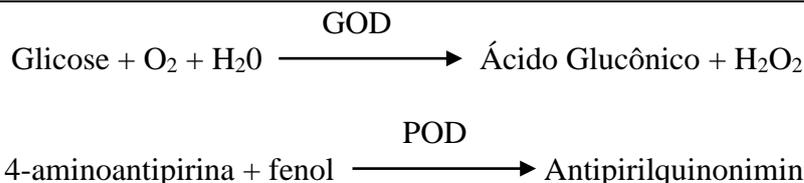
### 3.10 Atividade enzimática da trealase periplasmática

#### 3.10.1 Método de avaliação da atividade enzimática

A trealase periplasmática catalisa a hidrólise de uma molécula de trealose, resultando na formação de duas moléculas de glicose. Assim, a avaliação da atividade enzimática da enzima foi realizada com um teste de detecção de glicose baseado no método de acoplamento da glicose oxidase e peroxidase (TRINDER, 1969), utilizando trealose como substrato e o *kit* Glicose Liquiform (Labtest), composto de uma solução contendo tampão fosfato 30 mM (pH 7,5), fenol 1 mM, glicose oxidase 12500 U/L, peroxidase 800 U/L; 4-aminoantipirina 290  $\mu$ M, azida sódica 7,5 mM e surfactantes. Uma solução contendo glicose 100 mg/dL foi utilizada como padrão calibrador de acordo com instruções do fabricante.

A glicose resultante da hidrólise da trealose é oxidada pela glicose oxidase (GOD) do *kit*, formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado participa de uma reação de oxidação envolvendo a 4-aminoantipirina e o fenol, catalisada pela peroxidase (POD), resultando em água e um composto avermelhado, a antipirilquinonimina, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de glicose liberada (Figura 5).

Todos os ensaios referentes à atividade enzimática da trealase periplasmática foram realizados em replicatas a 25 °C sob comprimento de onda de 490 nm no leitor de microplacas *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad). Os dados são representados pelas médias entre replicatas e barras de erro representam variação dentro de cada ponto. A relação entre a absorbância e a quantidade de glicose foi obtida por uma curva padrão de quantidade de glicose utilizando 270  $\mu$ L do *kit* Glicose Liquiform e 30  $\mu$ L de cada uma de 12 concentrações de glicose utilizadas (de 0,268 a 550  $\mu$ M).



**Figura 5 – Esquema simplificado do método de detecção de glicose.** A glicose resultante da hidrólise da trealose é oxidada pela glicose oxidase (GOD), formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Adaptado do Manual de Instruções de Uso do produto Glicose Liquiform (Labtest).

### 3.10.2 Atividade da trealase periplasmática em extrato celular de XAC, XAC $\Delta$ 0604 e XauC

A atividade da trealase periplasmática foi comparada em extratos proteicos celulares de XAC e XauC após crescimento em dois meios de cultura, Caldo Nutriente (CN) e XAM-M, um meio indutor de patogenicidade. Para XAC $\Delta$ 0604, foi feito o cultivo apenas em CN.

Colônias isoladas de XAC, XAC $\Delta$ 0604 e XauC foram cultivadas em 30 mL dos meios de cultura até que atingissem a D.O.<sub>600nm</sub> de 0,4. Os cultivos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos e os “*pellets*” ressuspensos em 4 mL de Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 50 mM e lisados por 6 pulsos de ultrassom (Sonic Dismembrator 500, Fisher Scientific, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva), com intervalos de 1 minuto entre os pulsos, sob banho de gelo. Em seguida, os lisados celulares foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes coletados para os testes.

Para análise da atividade da trealase periplasmática de XAC, XAC $\Delta$ 0604 e XauC, foram montadas cinco reações em triplicata, todas contendo 100  $\mu$ L de cada lisado celular, 15  $\mu$ L de trealose 0,8 M e 185  $\mu$ L do *kit* Glicose Liquiform. O controle negativo foi feito substituindo o volume do lisado celular por 100  $\mu$ L do tampão de ressuspensão.

A formação de glicose foi registrada em função do tempo e, a partir desses dados, foram calculadas as velocidades iniciais das reações ( $V_0$ ).

### 3.10.3 Cinética enzimática

A atividade enzimática da trealase periplasmática foi analisada quanto ao comportamento das velocidades iniciais das reações ( $V_0$ ) com a variação da concentração de trealose, utilizando uma concentração de enzima dentro da faixa de resposta de reação proporcional à quantidade de proteína, determinada previamente (não mostrado).

Para o ensaio cinético, foram realizadas cinco reações, com as seguintes concentrações de trealose: 0,1563 mM, 0,3125 mM, 0,625 mM, 2,5 mM e 5 mM. Todas as reações foram compostas de 270  $\mu$ L do *kit* Glicose Liquiform (Labtest), 15  $\mu$ L de trealase periplasmática (concentração final de 0,1  $\mu$ M) e 15  $\mu$ L de trealose (concentração final de 40 mM), totalizando 300  $\mu$ L de volume final.

Cada uma das reações registrou a quantidade de glicose para cada intervalo de tempo, sendo as velocidades iniciais representadas em função das concentrações de trealose. Os dados foram modelados segundo a equação de Michaelis-Menten, possibilitando a estimativa dos valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para a enzima (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

O controle (sem enzima) teve o volume de enzima substituído por tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8 e foi subtraído das medidas dos ensaios.

### 3.10.4 Teste de estabilidade de pH

Para o teste de estabilidade de pH, foram preparadas 11 soluções de acetato-borato-fosfato de sódio 0,02 M, variando o pH em uma unidade, de 2 a 12. Alíquotas da trealase periplasmática recombinante foram separadamente incubadas (diluição de 8 vezes) nestas 11 soluções por 30 minutos e centrifugadas a 14.000 x *g* por 2 minutos. A seguir, os sobrenadantes foram utilizados em 11 reações individuais em triplicata contendo 30  $\mu$ L da

enzima diluída (concentração final de 0,1  $\mu\text{M}$ ), 15  $\mu\text{L}$  de trealose 0,8 M (concentração final de 40 mM) e 255  $\mu\text{L}$  do *kit* Glicose Liquiform, totalizando 300  $\mu\text{L}$  de volume final.

Os dados foram utilizados para o cálculo das velocidades iniciais das reações ( $V_0$ ) e representados como porcentagem média de atividade enzimática em todos os pHs.

Todos os tampões foram testados e não houve interferências inespecíficas sobre os reagentes da reação.

### **3.10.5 Teste de estabilidade térmica**

O teste de estabilidade térmica foi feito incubando-se a enzima purificada em diferentes temperaturas, seguida da medida de sua atividade enzimática. Para isso, a enzima foi diluída em tampão acetato-borato-fosfato de sódio 0,02 M pH 3, de modo que sua concentração ficasse em 1  $\mu\text{M}$ . Tal solução foi incubada por 5 minutos em diferentes temperaturas (de 20  $^{\circ}\text{C}$  a 55  $^{\circ}\text{C}$ , com intervalos de 5  $^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 2 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  e os sobrenadantes utilizados nos testes. Para a análise da atividade enzimática remanescente, foram feitas reações contendo 30  $\mu\text{L}$  da enzima incubada em cada temperatura (concentração final de 0,1  $\mu\text{M}$ ), 15  $\mu\text{L}$  de trealose 0,8 M (concentração final de 40 mM) e 255  $\mu\text{L}$  do *kit* Glicose Liquiform (Labtest).

Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo das velocidades iniciais das reações ( $V_0$ ). Os dados foram representados como porcentagem média de atividade enzimática em cada temperatura.

### 3.11 Estudos estruturais

#### 3.11.1 Dicroísmo Circular

A constituição de estruturas secundárias da trealase periplasmática foi avaliada por dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*), uma técnica espectroscópica baseada na diferença entre as absorções das luzes circularmente polarizadas à esquerda e à direita. Tal disparidade é característica em moléculas que contêm um ou mais cromóforos quirais. O espectro de CD foi obtido no espectropolarímetro J-815 (Jasco), utilizando trealase periplasmática 1,625  $\mu\text{M}$  em Tris-HCl 6,25 mM pH 8, NaCl 12,5 mM. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo, de 0,1 cm de caminho óptico e registradas como a média de 8 leituras consecutivas entre os comprimentos de onda de 195 a 260 nm, com intervalos de 0,5 nm. O conteúdo das estruturas secundárias da proteína foi analisado com a última versão do pacote de programas CDPro (SREERAMA; WOODY, 2000), utilizando um banco de dados de 43 proteínas distribuído com o pacote.

O experimento foi realizado em colaboração com o Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas", no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

#### 3.11.2 Cromatografia de Exclusão por Tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) é uma técnica que permite a separação de moléculas de acordo com seu tamanho e forma, e não precisamente massa molecular. Entretanto, uma curva de calibração com proteínas de massas moleculares conhecidas e seus respectivos volumes de eluição de SEC permitem a estimativa da massa molecular da amostra, uma vez que o volume de eluição é inversamente

proporcional ao logaritmo da massa molecular aproximada. A Tabela 6 resume as proteínas usadas na curva de calibração.

<b>Proteína</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>Fonte</b>
Ferritina	440	Baço de cavalo
Aldolase	158	Músculo de coelho
Conalbumina	75	Ovo branco de galinha
Ovalbumina	44	Ovo de galinha
Anidrase carbônica	29	Eritrócito bovino
Ribonuclease A	13,7	Pâncreas bovino

**Tabela 6 – Proteínas utilizadas na construção da curva de calibração da SEC**

A fase estacionária da SEC é composta, geralmente, por polímeros quimicamente modificados como dextrano, agarose e poli(acrilamida). Neste ensaio, foi utilizado o Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences), um polímero formado pela ligação covalente entre cadeias de dextrano e uma matriz de agarose.

Por permitir a estimativa da massa molecular em condições próximas ao estado nativo, a SEC possibilita a inferência sobre a estrutura quaternária de proteínas, objetivo desta abordagem no presente trabalho.

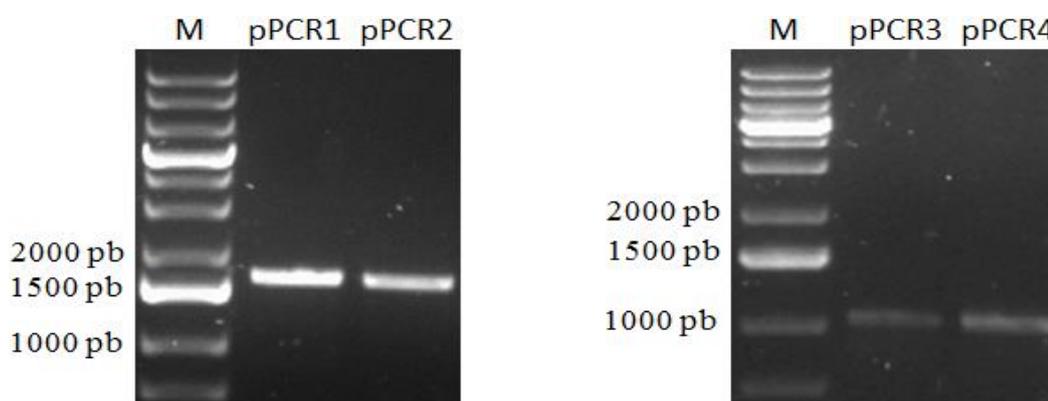
Para a SEC, trealase periplasmática recombinante em Tris-HCl 25 mM pH8, NaCl 50 mM foi aplicada em uma coluna pré-empacotada Superdex 200 10/300 GL equilibrada no mesmo tampão. O ensaio foi realizado em um cromatógrafo ÄKTA purifier (GE Healthcare Life Sciences) sob vazão de 0,5 mL/minuto do mesmo tampão, monitorando a absorbância em 280 nm.

O experimento foi realizado em colaboração com o Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas", no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Amplificação por PCR e clonagem

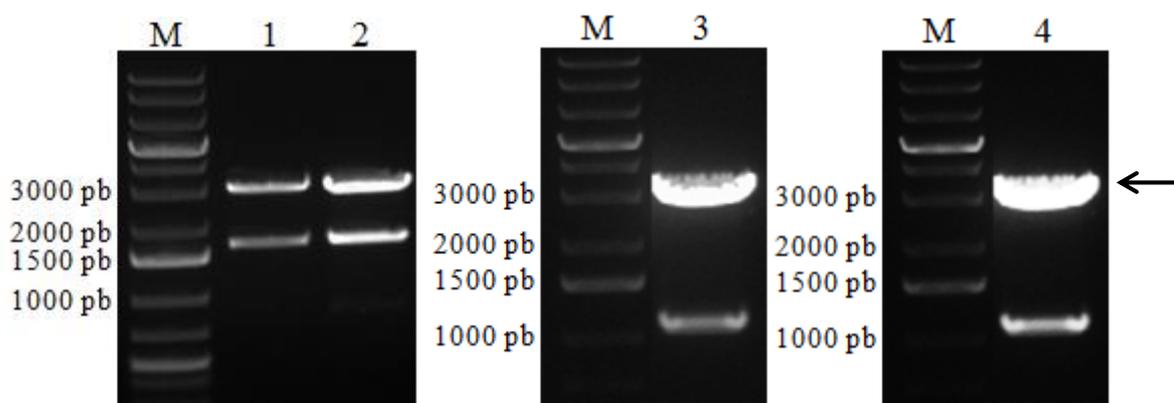
Oligonucleotídeos específicos foram desenhados de forma a amplificarem isoladamente: a região codificante do gene da trealase periplasmática e os fragmentos de 1kb *upstream* e *downstream* ao gene alvo. Os produtos de PCR 1 e 2, referentes à região codificante do gene-alvo incluem sítios de restrição com enzimas adequadas para clonagem nos vetores de propagação e expressão (pET28 e 29). Já os produtos de PCR 3 e 4, referentes às regiões adjacentes ao gene-alvo possuem sítios de restrição para clonagem nos vetores de propagação e deleção (pNPTS138). Todos os fragmentos gênicos de interesse foram amplificados (Figura 6).



**Figura 6 – Análise dos produtos de PCR.** Aliquotas de 3  $\mu$ L de cada reação de PCR foram analisadas em eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %). **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **pPCR1** | Produto de PCR referente à região codificante da trealase periplasmática madura (1593 pb). **pPCR2** | Produto de PCR referente à região codificante da trealase periplasmática sem *stop* códon. **pPCR3 e pPCR4** | Produtos de PCR referentes aos fragmentos de 1kb *upstream* e *downstream* ao gene-alvo, respectivamente. Bandas do padrão mais próximas ao tamanho dos produtos estão indicadas à esquerda.

Cada fragmento gênico amplificado foi individualmente clonado no vetor de propagação pJET 1.2 (Fermentas). As ligações foram transformadas em *E. coli* DH5 $\alpha$  e plaqueadas em ágar-LB adicionado de ampicilina. DNA plasmidial dos transformantes foi submetido à análise de restrição (Figura 7) com as respectivas endonucleases para

subclonagem dos insertos no vetor de expressão (pET28a, Novagen) e do vetor de deleção (pNPTS138). Os insertos foram completamente sequenciados e correspondem aos fragmentos gênicos de interesse.

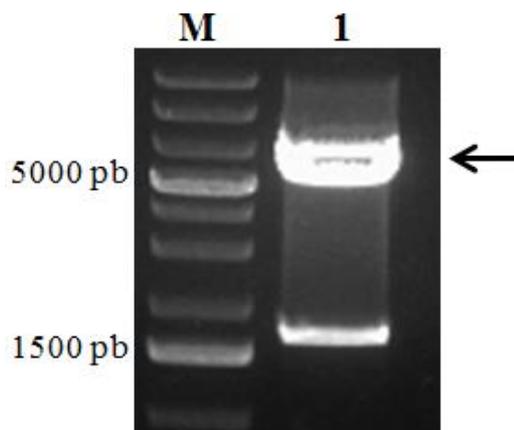


**Figura 7 – Análise de restrição dos vetores de propagação.** Cerca de 500 ng de DNA plasmidial dos vetores de propagação foram submetidos à dupla digestão com endonucleases específicas e analisados em eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %). M | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). 1 | Vetor de propagação da região codificante da trealase periplasmática (pPCR1). 2 | Vetor de propagação da região codificante da trealase periplasmática sem *stop* códon (pPCR2). 3 | Vetor de propagação da região *upstream* ao gene alvo (pPCR3). 4 | Vetor de propagação da região *downstream* ao gene alvo (pPCR4). Tamanhos de bandas do padrão mais próximos aos insertos e vetor estão indicados. Uma seta indica a altura da banda do vetor de propagação pJET 1.2 (aproximadamente 3 kb).

## 4.2 Expressão heteróloga e purificação da trealase periplasmática recombinante

### 4.2.1 Construção do vetor de expressão

O inserto referente ao pPCR1 foi excisado (*NdeI* e *XhoI*), purificado e clonado no vetor de expressão pET28a. A reação de ligação foi transformada em *E. coli* DH5 $\alpha$  e os clones foram confirmados por digestão do DNA plasmidial sob eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %) (Figura 8). Um dos clones positivos foi nomeado pET28a\_treA, o vetor de expressão da trealase periplasmática recombinante de XAC.



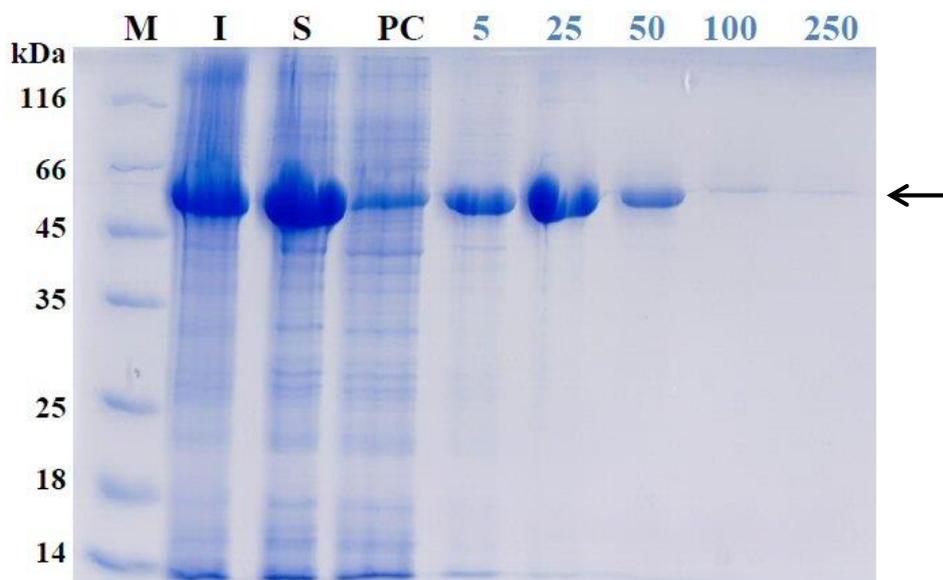
**Figura 8 – Análise de restrição do vetor de expressão.** Cerca de 500 ng de DNA plasmidial do vetor de expressão da trealase periplasmática, pET28a\_treA foram submetidos à dupla digestão com as endonucleases *NdeI* e *XhoI* e analisados em eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%). **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). **1** | DNA plasmidial do vetor de expressão pET28a\_treA digerido. Tamanhos de bandas do padrão mais próximos ao inserto e vetor estão indicados. Uma seta indica a altura da banda do plasmídeo pET28a (cerca de 5,3 kb).

#### 4.2.2 Análise da expressão heteróloga e da purificação por cromatografia de afinidade

O vetor pET28a\_treA foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) e o plaqueamento feito em ágar-LB adicionado de canamicina. Uma colônia isolada dos transformantes foi utilizada para o ensaio de expressão heteróloga sob indução por IPTG. Ao final da indução, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão e lisadas por pulsos de ultrassom, sob banho de gelo.

Para purificação do produto de expressão heteróloga, a fração solúvel do lisado foi aplicada em coluna de níquel imobilizado. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de ressuspensão e um gradiente crescente de concentrações de imidazol foi aplicado para eluição da proteína.

Alíquotas das frações solúveis e insolúveis, bem como alíquotas do pós-coluna e dos eluatos em imidazol foram submetidas à análise em SDS-PAGE (Figura 9).



**Figura 9 – Análise da expressão, solubilidade e purificação da trealase periplasmática recombinante sob SDS-PAGE.** Células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o vetor de expressão pET28a\_treA e submetidas a teste de expressão, solubilidade e purificação em coluna de níquel. **M** | Padrão de massa molecular *Pierce Unstained Protein MW Marker* (Thermo). **I** | Fração insolúvel do lisado. **S** | Fração solúvel do lisado. **PC** | Fração solúvel após passagem pela coluna de purificação. A proteína foi eluída pela aplicação de um gradiente crescente de concentrações de imidazol (concentrações em mM, mostradas em azul). As eluições foram realizadas com volumes de imidazol referentes a cinco volumes de coluna. Seta indica a altura da banda de superexpressão da proteína recombinante. Massas do padrão estão indicadas à esquerda.

O fragmento clonado prediz uma proteína de 530 resíduos com massa molecular de 59,53308 kDa e coeficiente de extinção molar  $\lambda_{280\text{nm}}=113345/\text{cm}\cdot\text{M}^{-1}$  em 280 nm ( $\text{Abs}_{280\text{nm}} 0.1\% \text{ (g/l)} = 1,904$ ). Adicionando-se 2 kDa referentes à cauda de histidinas *N*-terminal, o produto possui massa molecular de aproximadamente 61,4 kDa, compatível com o observado.

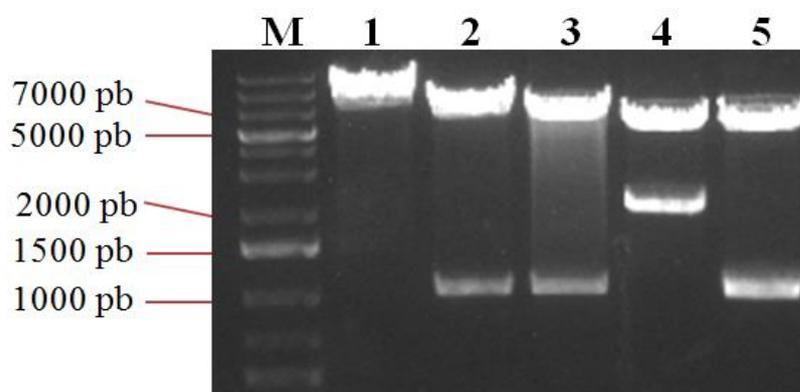
### 4.3 Deleção gênica

#### 4.3.1 Construção do vetor de deleção

Os fragmentos referentes aos pPCR 3 e 4 (regiões de 1kb *upstream* e *downstream*, respectivamente) foram sequencialmente subclonados *in tandem* no vetor de deleção pNPTS138 (transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$  a cada fragmento adicionado) entre os sítios de restrição *Hind*III e *Eco*RI. A construção substituiu o local da região codificante do gene-alvo

por um sítio de *Bam*HI (6 pb), o que não altera o quadro de leitura de outras ORFs do genoma do mutante.

Resumidamente, o sistema de deleção prevê a troca da porção codificante pelo sítio de *Bam*HI por dupla recombinação homóloga entre as regiões flangeadoras de 1 kb do gene-alvo no genoma e as clonadas no vetor. A análise de restrição do vetor pNPTS138\_treA indica sucesso na sua construção (Figura 10).



**Figura 10 – Análise de restrição do vetor de deleção pNPTS138\_treA.** DNA plasmidial de uma colônia transformante foi submetido à digestão com combinações das enzimas de restrição *Hind*III, *Bam*HI e *Eco*RI e analisado por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %). **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **1-5** | DNA plasmidial pNPTS138\_treA digerido respectivamente com: *Eco*RI somente; *Hind*III e *Bam*HI; *Bam*HI e *Eco*RI; *Hind*III e *Eco*RI; *Hind*III, *Bam*HI e *Eco*RI. As bandas relevantes do padrão de tamanho molecular estão indicadas. O plasmídeo pNPTS138 possui cerca de 5,36 kb.

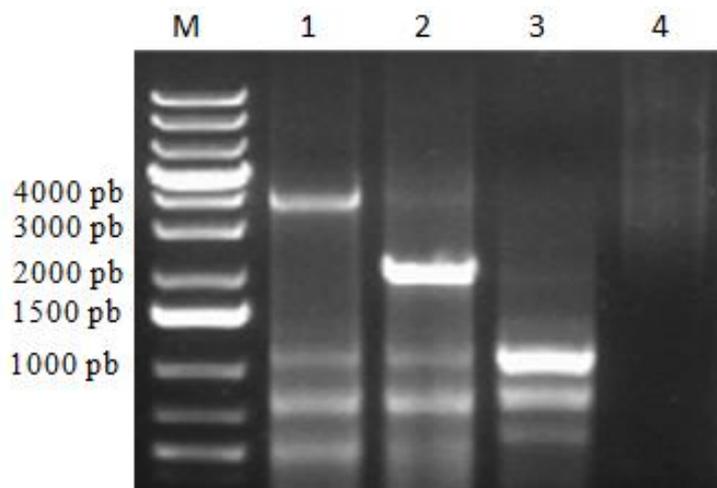
#### 4.3.2 Confirmação da deleção gênica

O vetor de deleção da trealase periplasmática, pNPTS138\_treA, foi utilizado na transformação de XAC seguida de plaqueamento em ágar-LB contendo canamicina. Em seguida, colônias transformantes foram cultivadas em caldo LB isento de antibióticos para possibilitar o primeiro evento de recombinação, ou seja, a integração do plasmídeo de deleção no DNA cromossomal de XAC. A cultura em caldo LB foi estriada em ágar-LB para obtenção de colônias isoladas, as quais foram repicadas em três cultivos em ágar-LB – um contendo canamicina, outro canamicina e sacarose e o último, somente sacarose.

Neste último repique em três cultivos em ágar-LB, as possíveis colônias mutantes deletadas no gene da trealase periplasmática (XAC $\Delta$ 0604) e que tenham eliminado o plasmídeo seriam aquelas que apresentassem crescimento apenas no meio ágar-LB contendo sacarose, pois a presença do plasmídeo, episossomal ou integrado ao DNA cromossomal, permitiria o crescimento em meios contendo canamicina além de impossibilitar o crescimento em meio contendo sacarose, pela presença do gene *SacB*.

Colônias que apresentaram tal configuração (crescimento somente em ágar-LB contendo sacarose) tiveram seu DNA extraído e utilizado como molde na PCR de confirmação da deleção gênica, juntamente com os oligonucleotídeos específicos *treA\_KO\_FW* e *treA\_KO\_RV* (Tabela 4), os quais hibridizam em regiões adjacentes às regiões flanqueadoras ao gene-alvo. Tais oligonucleotídeos não hibridizam nas próprias regiões flanqueadoras ou no pNPTS138\_*treA*.

A Figura 11 mostra os produtos da PCR de confirmação da deleção gênica submetidos à eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %). Foram feitas quatro reações utilizando como moldes XAC selvagem, XAC $\Delta$ 0604 e DNA plasmidial pNPTS138\_*treA*. Além disso o produto de PCR resultante da amplificação utilizando o XAC $\Delta$ 0604 foi digerido com a endonuclease *Bam*HI, cujo sítio de restrição está posicionado entre os fragmentos flanqueadores.



**Figura 11 – Confirmação da deleção gênica.** Produtos de PCR resultantes da utilização de diferentes moldes foram analisados por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %) para confirmação da deleção gênica. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas); **1** | XAC selvagem como molde. **2** | XAC $\Delta$ 0604 como molde. **3** | Produto de XAC $\Delta$ 0604 como molde, digerido com a endonuclease *Bam*HI. **4** | DNA plasmidial do vetor pNPTS138\_treA como molde. As bandas relevantes do padrão de tamanho molecular estão indicadas.

Os tamanhos dos produtos de PCR foram compatíveis com o esperado. O produto da reação utilizando XAC selvagem como molde apresentou tamanho compatível com 3,6 kb, o somatório entre 1 kb da região *upstream* ao gene-alvo, aproximadamente 1,6 kb da região codificante da trealase periplasmática e 1 kb da região *downstream* ao gene-alvo.

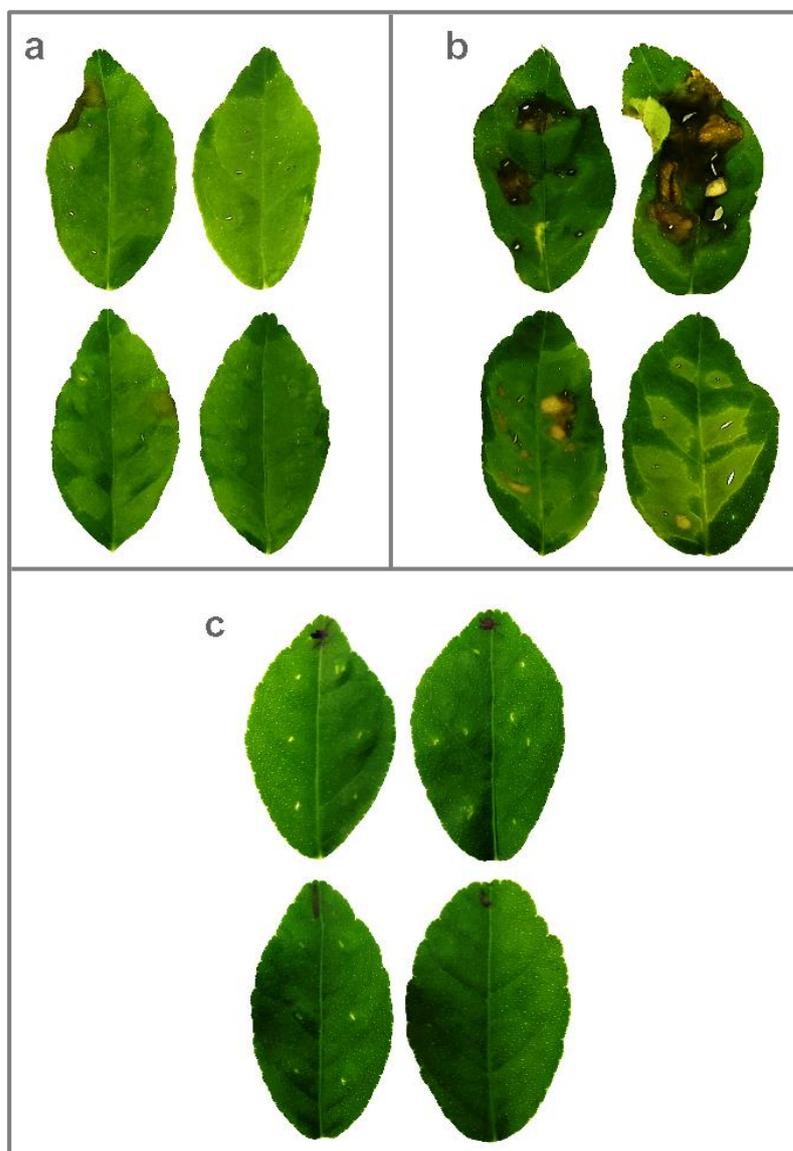
Já quando o molde foi o mutante deletado (XAC $\Delta$ 0604), o produto da PCR se mostrou com 2 kb, correspondente aos 1 kb das regiões *upstream* e *downstream* ao gene-alvo, confirmando a ausência da região codificante da trealase periplasmática. Para certificação adicional de que tal produto de PCR correspondia à região de interesse, foi feita a digestão deste com a endonuclease *Bam*HI, cujo sítio de restrição foi projetado para estar entre as regiões flanqueadoras ao gene-alvo. O resultado dessa digestão foi exatamente o esperado, uma única banda de 1 kb, referente aos dois fragmentos flanqueadores separados.

A ausência de produtos de PCR nas reações utilizando o vetor de deleção como molde confirma que os oligonucleotídeos não hibridizam no pNPTS138\_treA.

#### 4.4 Ensaio in vivo em *Citrus aurantifolia*

A linhagem XAC $\Delta$ 0604 foi testada quanto à patogenicidade em uma planta de *Citrus aurantifolia*. Foram feitas infiltrações na face abaxial de folhas utilizando suspensões de XAC $\Delta$ 0604, XAC selvagem e água destilada estéril como controle negativo.

No quinto dia após as infiltrações, as folhas foram destacadas da planta para registro fotográfico (Figura 12).



**Figura 12 – Ensaio in vivo em *Citrus aurantifolia*.** Uma planta de *Citrus aurantifolia* foi utilizada para avaliação comparativa da patogenicidade de XAC e XAC $\Delta$ 0604. Para cada uma das condições foram infiltradas quatro folhas de um ramo independente. **a** | XAC selvagem. **b** | XAC $\Delta$ 0604. **c** | Água destilada estéril. As fotografias foram obtidas no quinto dia após as infiltrações.

As folhas infiltradas com a suspensão de XAC $\Delta$ 0604 apresentaram maior encharcamento e necrose do tecido vegetal, além de intensas pústulas acastanhadas quando comparadas com as folhas infiltradas com XAC selvagem. Analisando a extensão dos sintomas produzidos por XAC $\Delta$ 0604, é possível sugerir que XAC $\Delta$ 0604 pode ser mais virulenta que a linhagem selvagem.

A relação entre a maior virulência de XAC $\Delta$ 0604 em relação à XAC pode ser entendida no contexto da trealose, substrato da enzima não produzida pelo mutante. A ausência de trealase periplasmática em XAC $\Delta$ 0604 implica em maior quantidade de trealose, já que esta não é hidrolisada em glicose. A trealose tem ação protetora em situações de estresse, como dessecação, congelamento, estresse osmótico e escassez de nutrientes (ITURRIAGA, 2009), o que pode explicar, em parte, a maior patogenicidade de XAC $\Delta$ 0604, dado o estresse cominado pelo hospedeiro durante a infecção.

Embora o mecanismo de atuação da trealose não esteja completamente elucidado, é frequente a diminuição da patogenicidade de microrganismos que não a sintetizam. Em *Pseudomonas aeruginosa*, a deleção de dois operons (treYZ e treS) relacionados à síntese de trealose ocasiona expressiva diminuição do seu crescimento em folhas de *Arabidopsis*, em comparação com a linhagem selvagem. Além disso, quando o mutante foi coinoculado com trealose, o fenótipo selvagem foi restaurado. Curiosamente, a diminuição da patogenicidade de tal linhagem que não produz trealose foi observada em *Arabidopsis*, mas não em *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, também hospedeiros de *P. aeruginosa*. Como o nitrato de amônio também fez com que o fenótipo selvagem fosse resgatado sugeriu-se que somente em plantas a trealose estivesse envolvida no mecanismo de obtenção de compostos nitrogenados, os quais seriam fatores limitantes do êxito na colonização do tecido hospedeiro (DJONOVIC et al., 2013).

A deleção do gene *ostA* de XAC, que codifica a trealose-6-fosfato sintase (da via de biossíntese da trealose em XAC), resultou na incapacidade do mutante em produzir lesões em folhas de *Citrus sinensis* e *Citrus limonia* (FACINCANI et al., 2014).

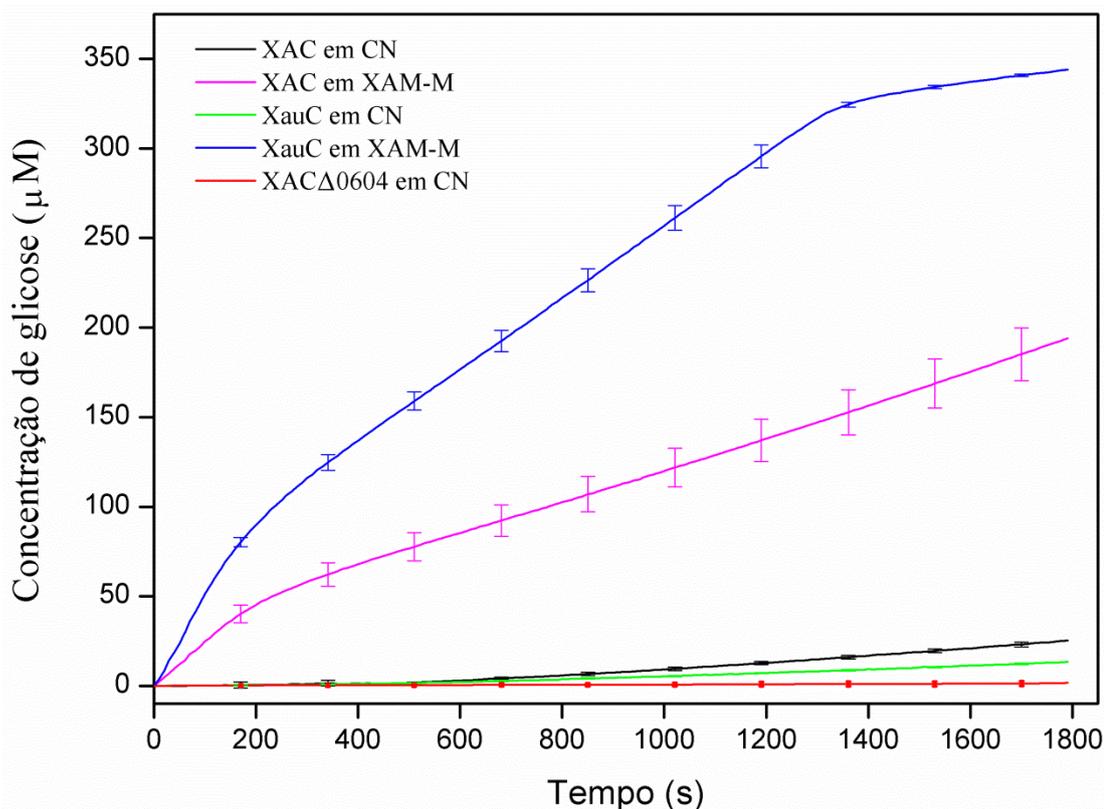
Portanto, a acentuada patogenicidade de XAC $\Delta$ 0604 é factível quando se considera a trealose um promotor da patogenicidade em fitopatógenos.

#### 4.5 Avaliação da atividade enzimática em extratos celulares de XAC, XauC e XAC $\Delta$ 0604

Lisados celulares de XAC e XauC provenientes de dois meios de cultura, caldo nutriente (CN) e XAM-M, foram analisados quanto à atividade da trealase periplasmática. Do mesmo modo, porém apenas em CN, tal atividade foi avaliada no mutante XAC $\Delta$ 0604.

Colônias isoladas de XAC, XAC $\Delta$ 0604 e XauC foram cultivadas nos meios de cultura até que atingissem D.O.<sub>600nm</sub> de 0,4. Após a centrifugação, os cultivos foram ressuspensos em tampão e lisados por pulsos de ultrassom. Para as análises, 100  $\mu$ L da fração solúvel desses lisados celulares compuseram as reações enzimáticas juntamente com trealose e o *kit* de detecção de glicose Glicose Liquiform (Labtest). Para o controle negativo, substituiu-se o volume do lisado por tampão.

A formação de glicose em função do tempo (Figura 13) foi utilizada para o cálculo das velocidades iniciais ( $V_0$ ) de cada uma das reações feitas em triplicata. Aqui, o cálculo das velocidades iniciais não tem função de caracterizar ou comparar o comportamento cinético das trealases periplasmáticas nas diferentes linhagens e cultivos, mas sim, avaliar a expressão do gene-alvo, utilizando-se da atividade enzimática como ferramenta. Desse modo, uma comparação entre as velocidades iniciais das diferentes reações pode sugerir diferenças nas quantidades da enzima, ou seja, maior ou menor expressão do referido gene.



**Figura 13 – Avaliação da atividade enzimática em XAC, XauC e XACΔ0604.** As frações solúveis dos lisados celulares de XAC e XauC em CN e XAM-M, e XACΔ0604 em CN foram utilizadas em reações contendo trealose e o *kit* de detecção de glicose Glicose Liquiform (Labtest) para avaliação da atividade da trealase periplasmática. A média da formação de glicose em função do tempo foi registrada no gráfico para cada lisado celular. As velocidades iniciais das reações em  $\mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$  utilizando os lisados celulares de XAC em CN, XauC em CN, XAC em XAM-M e XauC em XAM-M foram: 0,0164; 0,007; 0,0952; 0,1998, respectivamente. Já a reação utilizando o lisado celular de XACΔ0604 em CN não registrou formação de glicose, corroborando a deleção gênica. Barras de erro indicam o desvio-padrão absoluto de cada uma das triplicatas.

Nas reações utilizando o lisado celular de XACΔ0604 não houve atividade enzimática, o que também ratifica a deleção do gene que codifica a trealase periplasmática. Interessantemente, no meio indutor de patogenicidade XAM-M, XauC apresentou velocidade inicial de  $0,1998 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$  de glicose, o dobro do valor obtido para XAC no mesmo meio. Tal constatação sustenta as indicações de que a trealose desempenha um importante papel no processo infeccioso, uma vez que XauC causa a cancrrose C, mais branda que a cancrrose A, causada por XAC. Sendo assim, considerando a possível promoção da patogenicidade em plantas e a atuação como molécula protetora da bactéria por parte da trealose, é possível que a maior expressão de trealase periplasmática em XauC e, conseqüentemente, a maior hidrólise da trealose em glicose, esteja relacionada com a redução de sua patogenicidade.

#### 4.6 Estudos estruturais e funcionais

O mecanismo de ação de uma enzima pode ser investigado por meio do conhecimento de sua estrutura tridimensional e/ou da sua cinética enzimática. Apesar das inúmeras ORFs anotadas como sendo trealases, há apenas uma estrutura resolvida no banco de dados PDB (Protein Data Bank), cujo código de acesso é 2JG0. O estudo envolvendo a resolução da estrutura da trealase periplasmática de *E. coli* em complexo com 4 ligantes determinou a constituição e disposição das estruturas secundárias e, também, indica quais aminoácidos participam do sítio-ativo da enzima. Os dados mostram uma proteína composta por 47 % de  $\alpha$ -hélices e 8 % de folhas- $\beta$  (GIBSON et al., 2007).

O alinhamento entre as sequências primárias das trealases periplasmáticas maduras (sem os respectivos peptídeos sinal) de XAC e *E. coli*, realizado com o *software* ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) apontou 81 % de semelhança e 53,4 % de identidade (Figura 14). Além disso, dos 22 resíduos que compõem o sítio-ativo da trealase periplasmática de *E. coli*, apenas um difere da sequência predita de XAC, o que reflete uma forte homologia estrutural entre as proteínas.

```

XAC      APLDAPVVNAPAPTPTPTDLAYPELFAQVQRGELFDDQKHFVDFLPLRDPALINADYLAQ 60
E. coli  -----EETPVTQPPDILLGPLFNDVQNAKLFDPQKTFADAVPNSDPLMILADYRMO 52
          : .. ** .**:      **: **..:** ** ** *.* :* ** :* ** *
          :

XAC      HDHPGFDLRKFVDANFEESPPVQTDAIRQDTALREHIDLLWPKLVRSQNHVPPHSSLLAL 120
E. coli  QNQSGFDLRHFVNVNFTLPKEGEKEYVPEGQSLREHIDGLWPVLTRSTENTEKWDSLLPL 112
          :::.*****:**:.** . . . . :. :***** ** *.* ** :. . *****
          :

XAC      PHPYVVPGGRFREVVYWD SYFTMLGLVKSGETTLRQMLDNFAYLIDTYGHIPNGNRTYY 180
E. coli  PEPYVVPGGRFREVVYWD SYFTMLGLAESGHWKVDADMVANFAHEIDTYGHIPNGNRSYY 172
          *.*****:*****:*. . . . :*: ***: *****:***
          :

XAC      LSRSQPPFFSYMVELQAGVEGEAVYQRYLPQLQKEYAYWMQGSDDLQPGQAARHVRLAD 240
E. coli  LSRSQPPFFALMVELLAQHEGDAALKQYLPQMKEYAYWMDGVENLQAGQQEKRVVVKLQD 232
          *****: **** * **:* . :*****:*****:* :***.*** :***:*
          :

XAC      GSVLNRYWDERDTPRPEAWLHDTRTAAEVTDRPAAEVYRDLRAGAESGWDYTSRWLADGQ 300
E. coli  GTLLNRYWDDRDTPRPEASWVEDIATAKSNPNRPATEIYRDLRSAASGWDFFSSRWMDNPQ 292
          *:*****:*****:*. * ** . . :***:*.*****:.* *****:***: : *
          :

XAC      NLRTIRTTAILPIDLNSLLYHLERTLALACAQPGAECTR-DYAALAQQRKQAIDAHLWN- 358
E. coli  QLNTLRTTSIVPVDLNSLMFKMEKILARASKAAGDNAMANQYETLANARQKGIKYLWND 352
          :*.*:***:*.*:*****:***: ** * . * . . :* :***: *:.*: :***
          :

XAC      TAGYADYDWQTRTLNSQVTAALYPLFAGLASDDHAKRTASTVRKTLRPGGLATTAVK 418
E. coli  QQGWYADYDLKSHKVRNQLTAAALFPLYVNAAKDRANKMATATKTHLLQPGGLNNTSVK 412
          *:***** :.:.: **:******:***.. *.*:*: *:.:. . **:* **:*
          :

XAC      TGQQWDEPNGWAPLQWVAVDGLRRYGEDALARTIGERFLAQVQALFAREHKLVEKYGLET 478
E. coli  SGQQWDAPNGWAPLQWVATEGLQNYGQKEVAMDISWHFLTINVQHTYDREKKLVEKYDVST 472
          :***** *****:***:***. :* * . :***:** : **:******:.*
          :

XAC      DAAGGGGGEYALQDGFGW TNGVTLMLLNLYPGK--TKAAPAKRVRKPEAAAR----- 529
E. coli  TGTGGGGGEYPLQDGFGW TNGVTLKMLDLICPKEQPCDNVPATRPVKSATTQPSTKEAQ 532
          .:*****.*****:*. * * . . **.* .*:::
          :

XAC      ---
E. coli  PTP 535

```

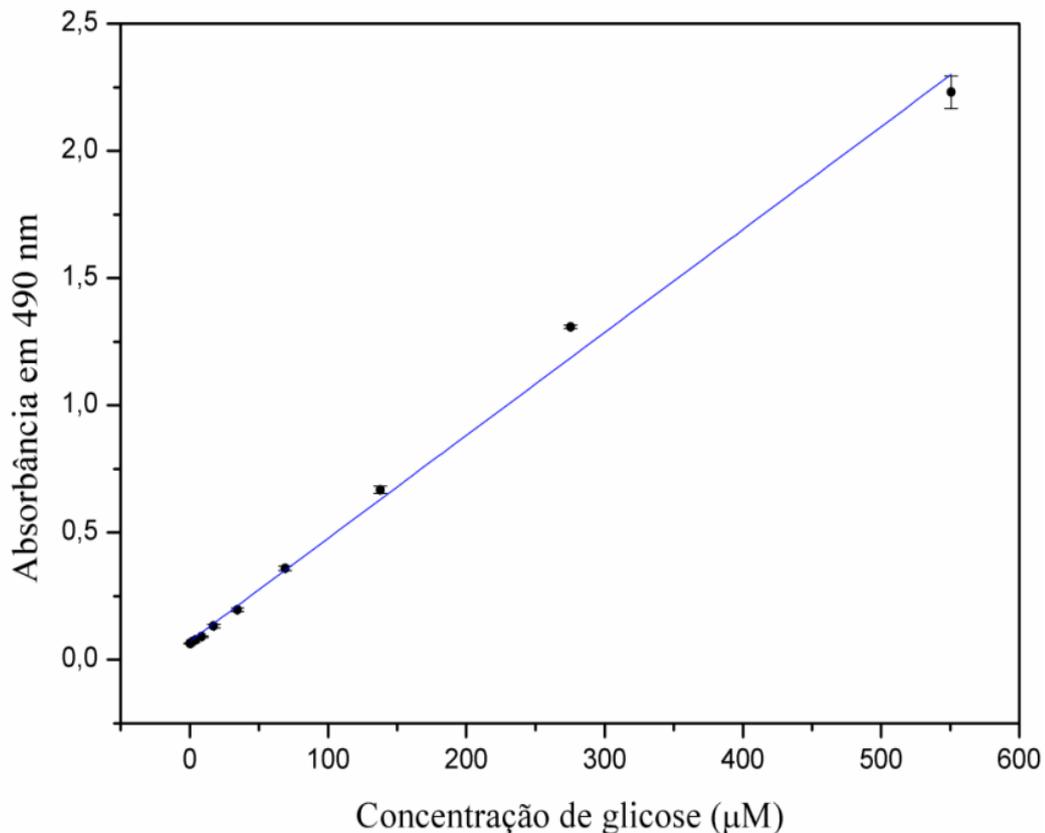
**Figura 14 – Alinhamento das trealases periplasmáticas de XAC e *E. coli*.** Sequências primárias das trealases periplasmáticas maduras (sem peptídeos sinal) de XAC e *E. coli* foram alinhadas utilizando o software ClustalW2. XAC indica a sequência da trealase periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *E. coli*, a de *Escherichia coli*. Resíduos idênticos são mostrados por (\*). Resíduos conservados são mostrados por (:). Resíduos que apresentam características secundárias conservadas são mostrados por (.). Estão grifados em amarelo os resíduos que compõem o sítio-ativo da enzima. Grifado em vermelho o único resíduo dentre os constituintes do sítio-ativo que difere mas é conservado entre XAC e *E. coli*. O alinhamento mostra que as sequências compartilham aproximadamente 53,4 % de identidade e 81 % de semelhança

#### 4.6.1 Cinética enzimática

Cinética enzimática é uma área que avalia o comportamento da velocidade da reação em função da alteração de parâmetros experimentais, como por exemplo, a concentração do substrato da enzima.

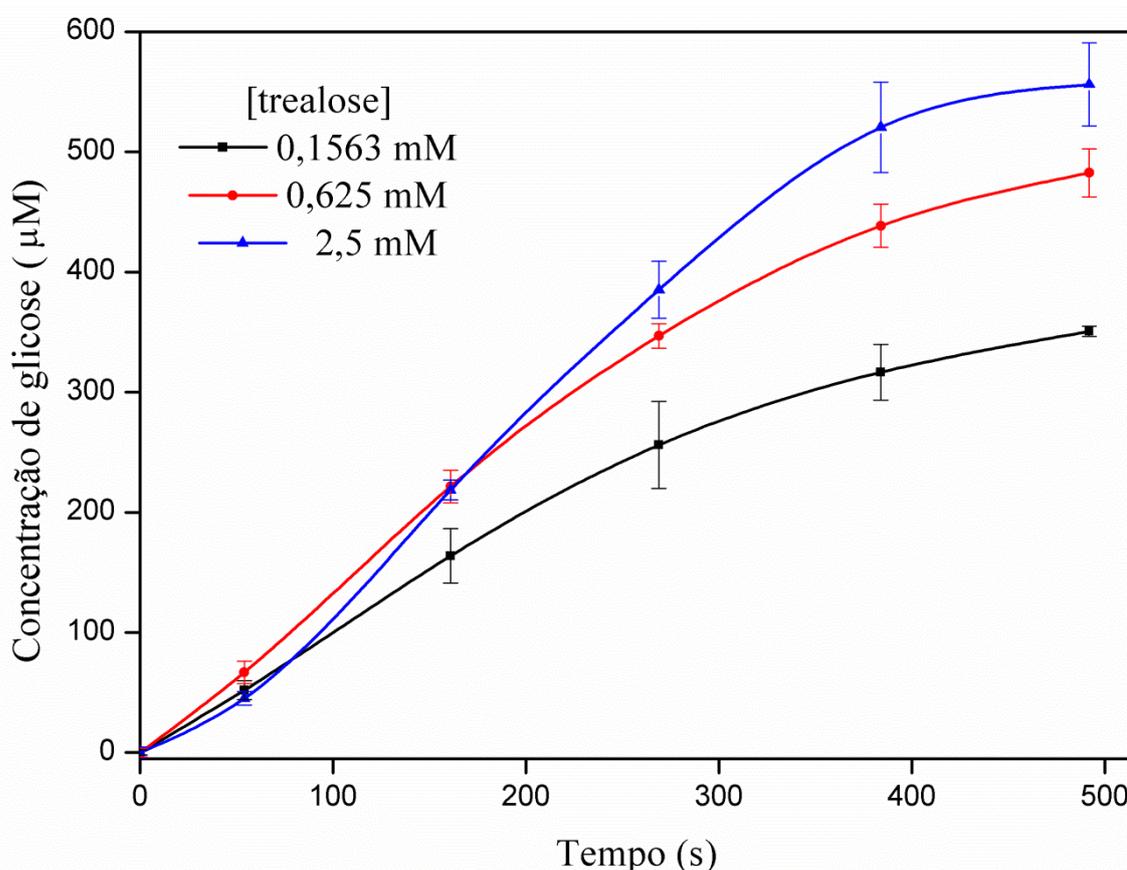
A alteração da concentração de substrato em uma reação enzimática pode ser problemática, uma vez que a concentração do substrato varia durante sua conversão em produto. Entretanto, uma alternativa para contornar esta situação é medir a velocidade da reação no seu início (velocidade inicial,  $V_0$ ), quando a concentração de substrato é consideravelmente maior que a concentração de enzima. Dessa forma, se o intervalo de tempo utilizado para os cálculos for curto, é possível negligenciar as alterações na concentração do substrato.

A relação entre a absorbância e a quantidade de glicose foi alcançada pela construção de uma curva padrão de quantidade de glicose utilizando o *kit* Glicose Liquiform e 12 concentrações de glicose (Figura 15).



**Figura 15 – Curva padrão de glicose.** Doze reações em triplicata foram realizadas, contendo 270 µL do kit Glicose Liquiform (Labtest) e 30 µL de cada uma das diferentes concentrações de glicose testadas. As reações foram incubadas a 25 °C por 15 minutos e as absorbâncias em 490 nm foram monitoradas para correlação entre valores de absorbância e quantidade de glicose. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) foi de 0,995. Barras de erro indicam o desvio-padrão absoluto de cada uma das triplicatas.

Cinco reações independentes em replicatas com diferentes concentrações de trealose foram realizadas a fim de se calcular suas velocidades iniciais ( $V_0$ ) (Figura 16). A média dessas velocidades iniciais pode ser representada, segundo a equação de Michaelis-Menten (Figura 17), em função das concentrações de trealose. O modelo Michaelis-Menten foi modelado (Figura 18) para obtenção dos parâmetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{m\acute{a}x}$  (velocidade máxima).



**Figura 16 – Avaliação da atividade enzimática em função da concentração de trealose.** A atividade enzimática da proteína purificada a concentração final de  $0,1 \mu\text{M}$  foi avaliada em cinco reações com diferentes concentrações de trealose, juntamente com o kit de detecção de glicose. As concentrações de trealose (em mM) usadas nas reações foram:  $0,1563$ ;  $0,3125$ ;  $0,625$ ;  $2,5$  e  $5$ . Para maior clareza visual, as curvas referentes às concentrações de  $0,3125$  e  $5$  mM não são mostradas no gráfico. As medidas foram feitas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  coletando a absorbância em  $490 \text{ nm}$  em intervalos de  $8$  segundos e representadas como a média das concentrações de glicose em função do tempo. Barras de erro representam o desvio-padrão absoluto das replicatas.

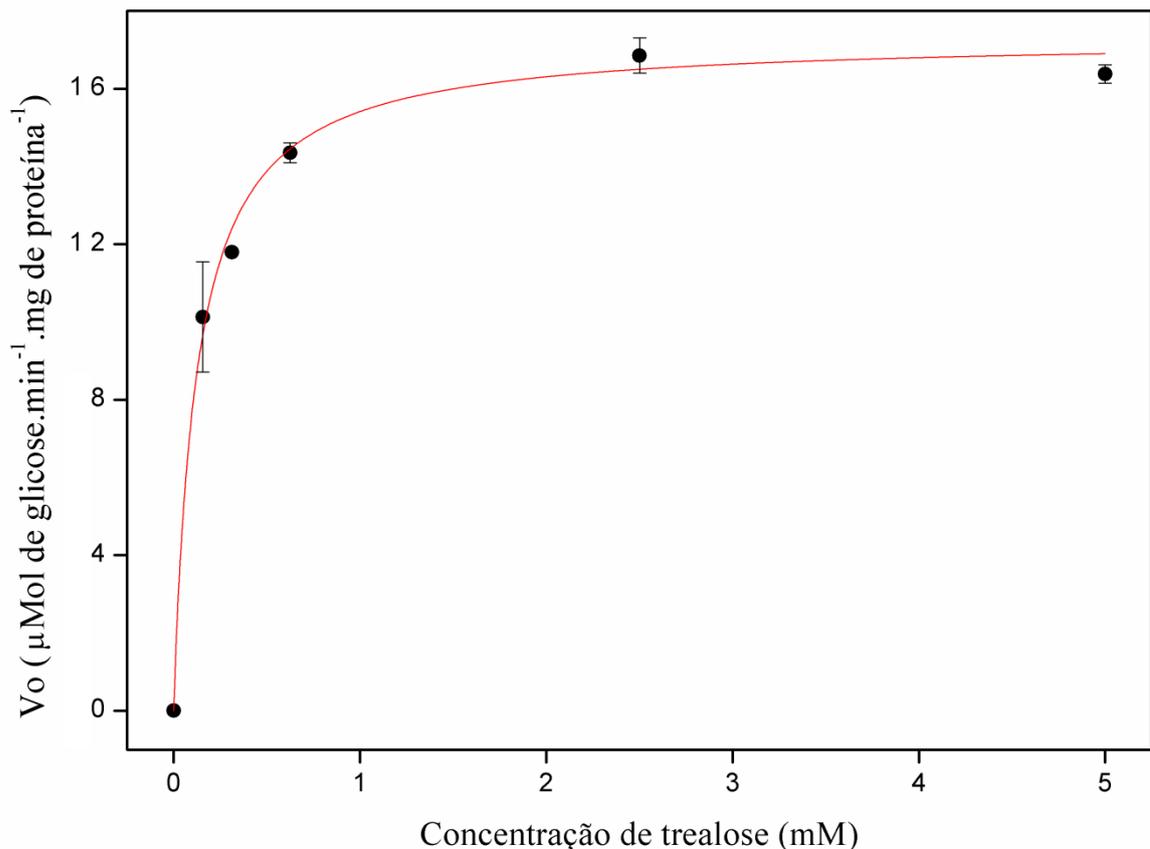
A velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) é um parâmetro virtual e, portanto, tem de ser extrapolado, uma vez que indica a velocidade da reação quando todas as moléculas da enzima

estão complexadas com o substrato. Já a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) é um parâmetro que indica a concentração de substrato na qual a  $V_0$  é igual à metade de  $V_{m\acute{a}x}$ .

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

**Figura 17 – Equação de Michaelis-Menten.** Equação da cinética enzimática de estado estacionário, cujo pressuposto é de que a concentração do complexo enzima-substrato [ES] permanece constante ao longo da reação.

Embora os parâmetros  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  não sejam completamente elucidativos em relação ao número, velocidade e natureza química das etapas da reação, eles podem ser utilizados para caracterizar e comparar as eficiências catalíticas das enzimas.



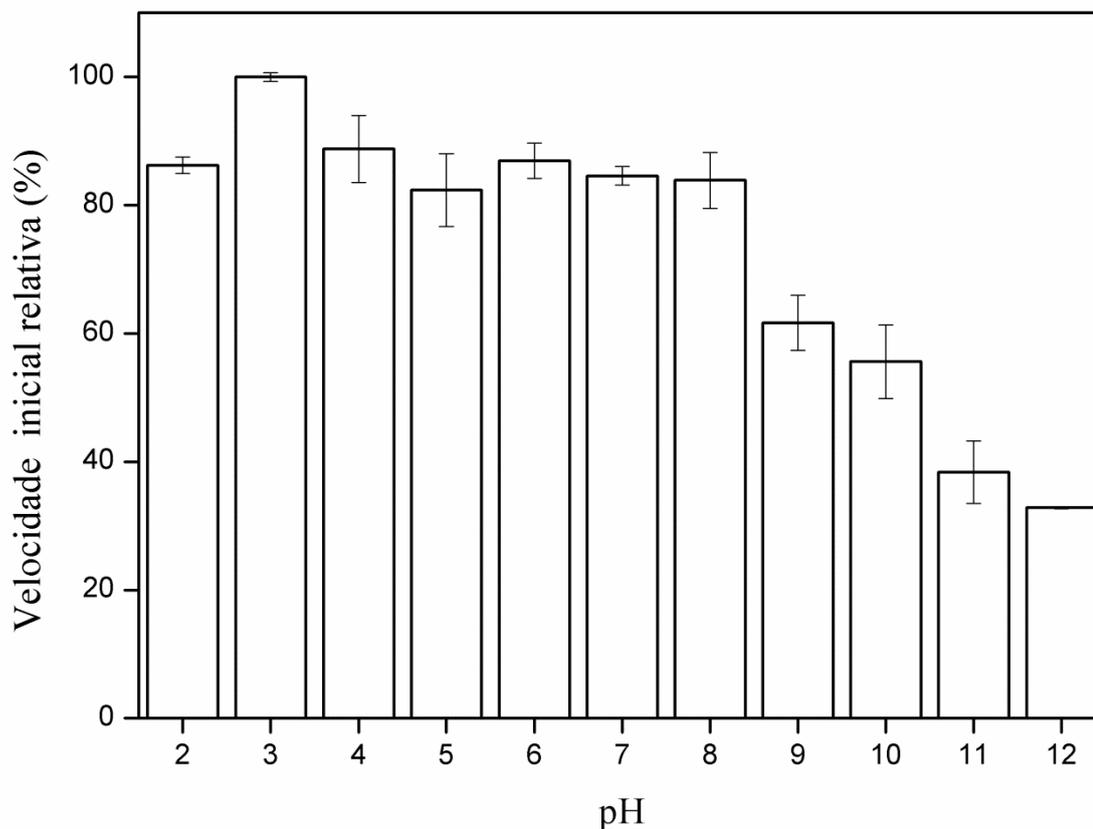
**Figura 18 – Cinética enzimática da trealase periplasmática de XAC.** Proteína purificada a concentração final de 0,1  $\mu\text{M}$  foi utilizada em cinco reações com diferentes concentrações de trealose, juntamente com o kit de detecção de glicose, Glicose Liquiform (Labtest). Para cada uma das reações, foi calculada a velocidade inicial, cujos valores foram registrados no gráfico em função das concentrações de trealose. Os dados foram modelados segundo a equação de Michaelis-Menten para estimativa dos parâmetros cinéticos  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ . Barras de erro representam o desvio-padrão absoluto de cada uma das triplicatas.

Para a trealase periplasmática de XAC, o  $K_m$  para a trealose foi de  $0,124 \pm 0,015$  mM e a  $V_{m\acute{a}x}$   $17,319 \pm 0,035$   $\mu\text{Mol de glicose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{i}na}^{-1}$ . Trealase periplasmática de *E. coli* parcialmente purificada registra  $K_m$  de 0,8 mM,  $V_{m\acute{a}x} = 132$   $\mu\text{Mol de glicose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{i}na}^{-1}$  (TOURINHO-DOS-SANTOS et al., 1994). Tais dados mostram uma similaridade em termos de efici\ecancia catal\ecitica, condizente com o elevado grau de homologia entre as enzimas (53,4 % de identidade e 81 % de semelhan\ca, Figura 14).

#### 4.6.2 Estabilidade em rela\cao ao pH

A prote\eca foi incubada em tamp\oes Acetato, Borato, Fosfato de S\odio 20 mM, com pHs de 2 a 12. Al\quotas da enzima incubada nos diferentes tamp\oes foram utilizadas na avalia\cao da atividade enzim\atica, juntamente com trealose e o *kit* Glicose Liquiform (Labtest). Posteriormente, as velocidades iniciais ( $V_0$ ) relativas de cada rea\cao foram determinadas e representadas em fun\cao do pH (Figura 19).

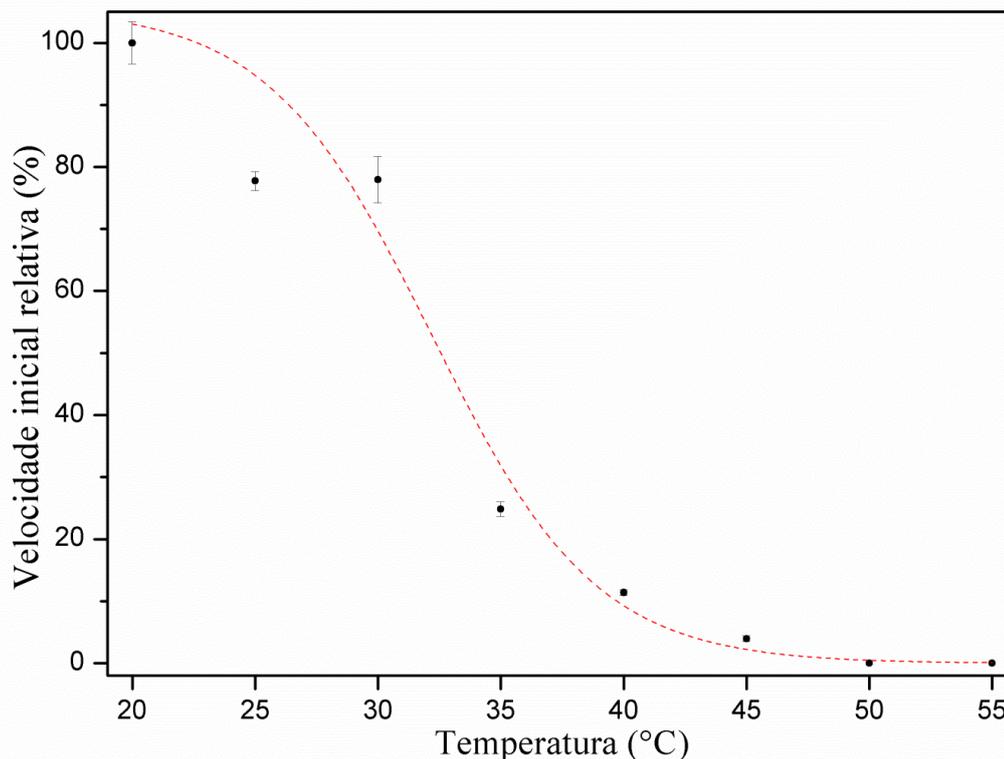
A trealase periplasm\atica demonstra estabilidade na faixa de pH de 2 a 8 e a atividade da enzima persistiu em toda a faixa de pH analisada. A enzima apresentou estabilidade ligeiramente maior no pH 3, um dado consistente uma vez que o pH \otimo de trealases tende \a acidez (TOURINO-DOS-SANTOS et al., 1994; PRASAD; MAHESHWARI, 1978; VALAITIS; BOWERS, 1993). Entretanto, as rea\coes ocorrem no pH 7,5 do *kit* Glicose Liquiform (Labtest) e obviamente n\ao se pode afirmar que o pH \otimo para a atividade da enzima tenha sido registrado.



**Figura 19 – Curva de atividade enzimática relativa em função do pH.** Trealase periplasmática purificada e em concentração final de 0,1  $\mu$ M foi incubada em 11 soluções de tampão Acetato, Borato, Fosfato de Sódio 20 mM, variando o pH de 2 a 12. Após isso, foi medida sua atividade enzimática, em uma reação contendo trealose e o kit de detecção de glicose, Glicose Liquiform (Labtest). As velocidades iniciais relativas das reações foram representadas no gráfico em função do pH. Barras de erro representam o desvio-padrão relativo.

#### 4.6.3 Estabilidade térmica

Trealase periplasmática diluída em tampão Acetato, Borato, Fosfato de Sódio 20 mM pH 3 foi incubada em diferentes temperaturas e, em seguida, teve sua atividade enzimática medida em reações contendo trealose e o *kit* Glicose Liquiform (Labtest). As velocidades iniciais das reações ( $V_0$ ) foram calculadas e representadas como porcentagem média de estabilidade em cada temperatura (Figura 20).

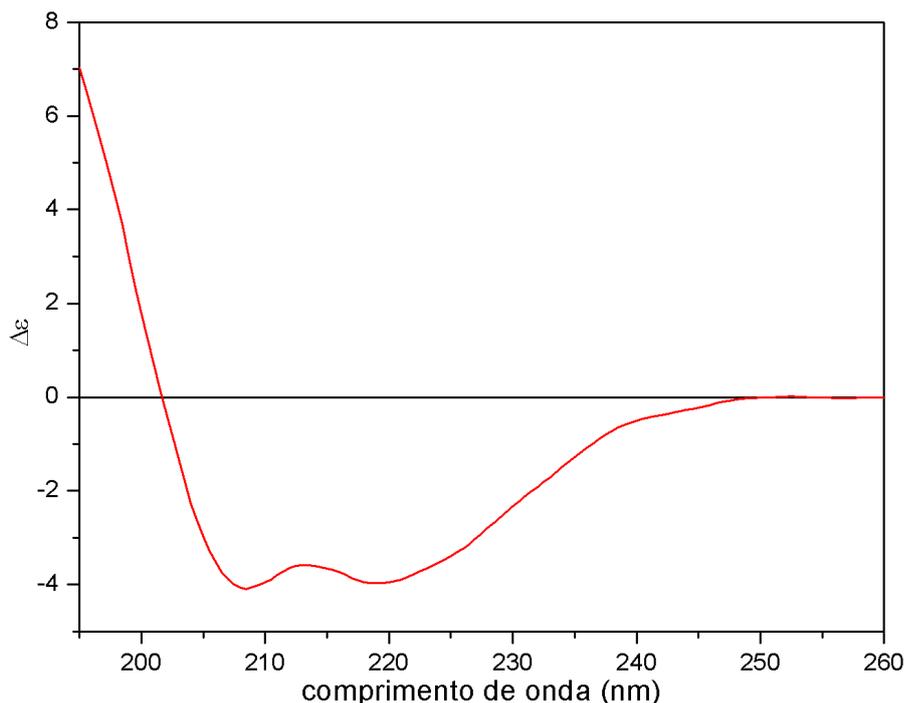


**Figura 20 – Ensaio de desnaturação térmica da trealase periplasmática.** Proteína purificada a concentração final de 0,1  $\mu\text{M}$  em tampão Acetato, Borato, Fosfato de Sódio 20 mM pH 3 foi incubada em diferentes temperaturas e sua atividade enzimática remanescente estimada. As velocidades iniciais relativas médias de triplicatas das reações foram registradas. Uma curva de desnaturação foi modelada e confirma uma temperatura de transição de fase em torno dos 33 °C. Barras de erro representam o desvio padrão de cada triplicata.

Metade da atividade relativa (temperatura de *melting*) foi perdida em torno de 33° C e a enzima mostrou estabilidade térmica até os 30° C, condizente com a natureza de XAC, cuja temperatura ótima de crescimento gira em torno dos 30 °C (DALLA-PRIA, 2006).

#### 4.6.4 Análise da estrutura secundária por dicroísmo circular

Trealase periplasmática recombinante em uma concentração de 1,6  $\mu\text{M}$  em Tris-HCl 6,25 mM pH8, NaCl 12,5 mM foi submetida à análise por CD e o espectro registrado na faixa UV-*far* de 195 a 260 nm (Figura 21) utilizado para estimativas de estrutura secundária.



**Figura 21 – Espectro de dicroísmo circular (CD).** Trealase periplasmática foi submetida à análise por CD e o espectro registrado na faixa de 195 a 260 nm. Os valores obtidos estão apresentados em elipticidade molar média do resíduo médio ( $\Delta\epsilon$ ). As medidas foram realizadas num espectropolarímetro J-815 (JASCO) a temperatura ambiente em cubetas de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. O espectro foi registrado como a média de 8 leituras consecutivas sobre a amostra.

O espectro de CD da trealase periplasmática mostra duas bandas mínimas a 219 nm e 228 nm e um *crossover* negativo-positivo a 201 nm, típico de estruturas majoritariamente em  $\alpha$ -hélices. Análises do espectro de CD realizadas com os programas *CDSSTR*, *CONTIN* e *SELCON 3* indicam a predominância de estruturas do tipo  $\alpha$ -hélices (Tabela 7).

<b>Estrutura</b> <b>Programa</b>	<b><math>\alpha</math>(r)</b>	<b><math>\alpha</math>(d)</b>	<b><math>\beta</math>(r)</b>	<b><math>\beta</math>(d)</b>	<b><i>Turn</i></b>	<b><i>Unrd.</i></b>
CDSSTR	.261	.172	.079	.062	.169	.256
CONTINLL	.240	.181	.072	.062	.174	.272
SELCON3	.241	.187	.058	.061	.173	.295
Média	<b>.247</b>	<b>.180</b>	<b>.069</b>	<b>.061</b>	<b>.172</b>	<b>.274</b>
%	<b>42,7</b>		<b>13</b>		<b>17,2</b>	<b>27,4</b>

**Tabela 7 – Desconvolução do espectro de CD da trealase periplasmática.** Estimativas da composição de estruturas secundárias foram feitas pela análise do espectro de CD da trealase periplasmática com o pacote de programas CDPro (*CDSSTR*, *CONTINLL* e *SELCON3*).  $\alpha$  e  $\beta$  indicam a contribuição em estruturas tipo  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ , respectivamente. Estruturas secundárias regulares e distorcidas são designadas por (r) e (d), respectivamente. *Unrd* indica as contribuições de estruturas não ordenadas.

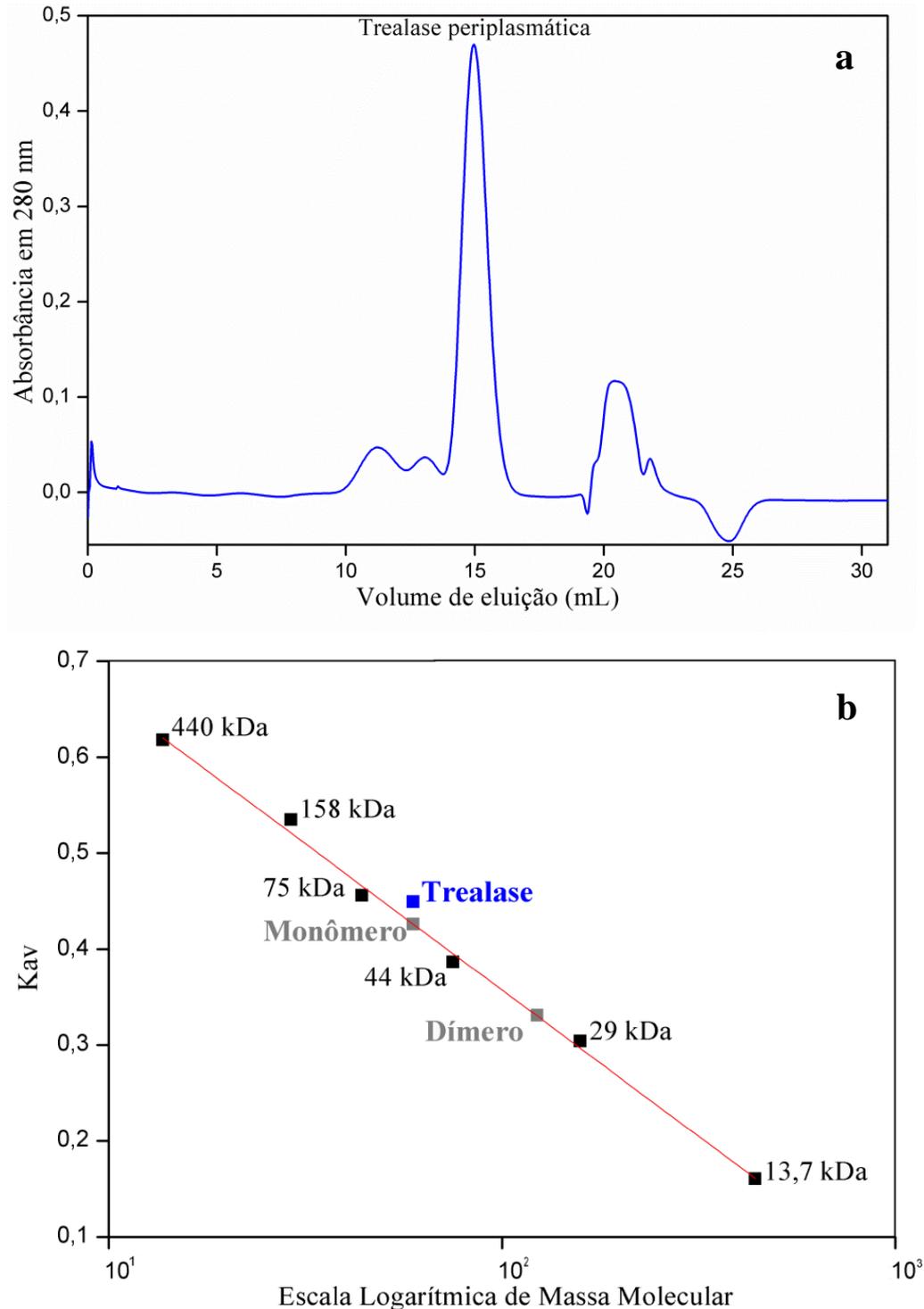
A desconvolução do espectro de CD da proteína recombinante indica 42,7 % de estruturas secundárias em  $\alpha$ -hélices e 13 % de folhas- $\beta$ , uma composição condizente com o esperado dada a extensa identidade com a trealase periplasmática de *E. coli* (Figura 14), que apresenta 47 % de  $\alpha$ -hélices e 8 % de folhas- $\beta$  (GIBSON et al., 2007).

#### 4.6.5 Cromatografia de Exclusão por Tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho pode ser utilizada para estimar a massa molecular de proteínas em um ambiente próximo ao nativo. Uma das metodologias para essa estimativa é o cálculo do coeficiente de partição ( $K_{av}$ ), que normaliza o comportamento de uma amostra.

A trealase periplasmática foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Superdex 200 sob vazão de 0,5 mL/minuto, monitorada por absorvâncias aos 280 nm. A eluição da trealase foi comparada com uma curva de calibração com as proteínas ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), albumina (44 kDa), anidrase carbônica (27 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa).

Uma equação de reta a partir dos dados da calibração foi utilizada na modelagem do valor do  $K_{av}$  para a trealase como sendo monômero ou dímero ideal (pontos indicados em cinza no gráfico). Utilizando os dados do cromatograma, o valor experimental do  $K_{av}$  para a trealase periplasmática (ponto mostrado em azul no gráfico) foi também modelado. Comparando-se os dados dos coeficientes de partição modelados é possível concluir que a trealase periplasmática de XAC deve ser um monômero em solução (Figura 22).



**Figura 22 – Estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão por tamanho.** A trealase periplasmática foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) sob vazão de 0,5 mL/minuto em Tris-HCl 25 mM pH8, NaCl 50 mM e monitorada por absorvâncias em 280 nm. **a** | Cromatograma indicando um pico majoritário de eluição em torno dos 15 mL. **b** | Coeficientes de partição ( $K_{av}$ ) da trealase periplasmática (mostrado em azul) e das proteínas utilizadas na curva de calibração da SEC representados em função do logaritmo na base 10 de suas massas moleculares. Para esta curva de calibração, o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) foi de 0,996. Os pontos em cinza foram modelados com base na curva de calibração para a trealase periplasmática como sendo monômero ou dímero. Os resultados indicam que a trealase periplasmática deve ser um monômero.

## 5 Conclusões

- ✓ O sistema de expressão heteróloga funcionou satisfatoriamente, provendo proteína solúvel ativa e homogênea;
- ✓ Testes confirmam que a ORF XAC0604 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* codifica para uma trealase;
- ✓ Espectroscopia de CD prediz uma estrutura secundária condizente com análogo estrutural;
- ✓ A trealase periplasmática é uma proteína monomérica com aparente estabilidade na faixa de pHs de ácidos a neutros;
- ✓ Parâmetros cinéticos da trealase periplasmática foram estudados com sucesso no modelo Michaeliano;
- ✓ O sistema de deleção gênica possibilitou a construção de uma linhagem de XAC deletada no gene que codifica a trealase periplasmática;
- ✓ A acentuada patogenicidade de XAC $\Delta$ 0604 condiz com a promoção da fitopatogenicidade pela trealose e, adicionalmente, a maior atividade da trealase de XauC corrobora esta hipótese.

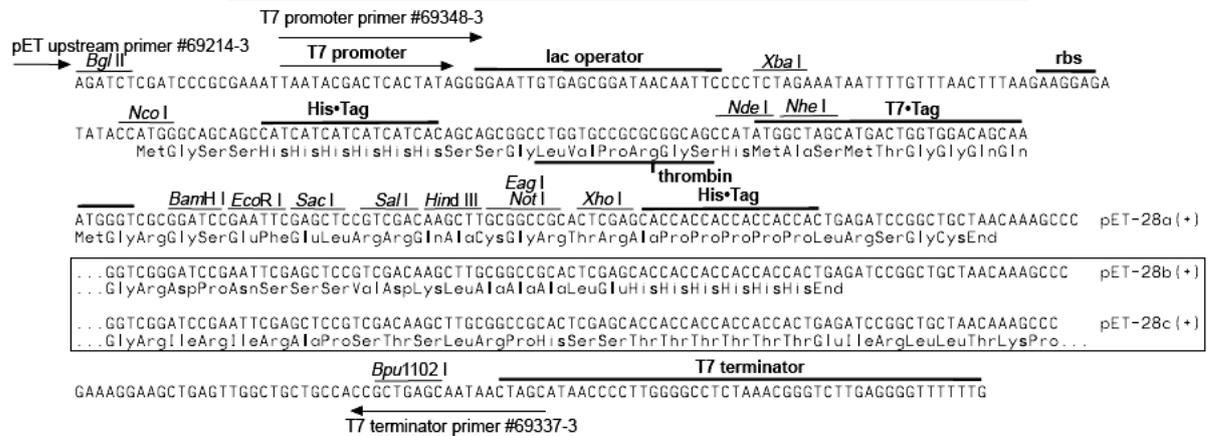
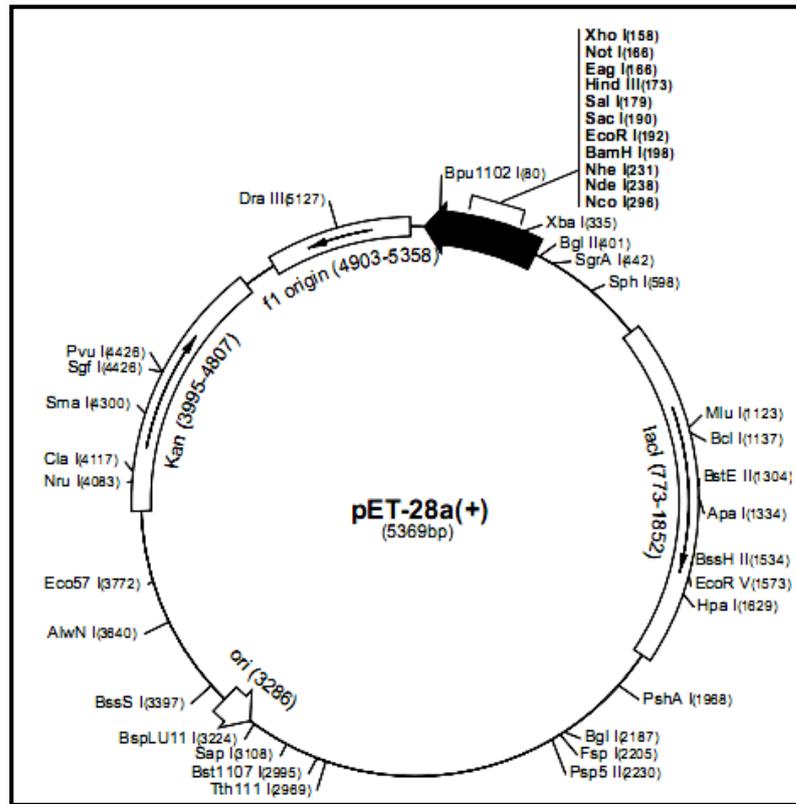
## Referências Bibliográficas

1. AMARAL, A.M. **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 86).
2. ALTSCHUL, S.F. et al. **Basic local alignment search tool**. *Journal of Molecular Biology*, 1990. 215:403-410.
3. ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. **A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver**. *Electrophoresis*, 1997. 18(3-4): p. 533-7.
4. ARTIER, J. **Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: proteínas relacionadas com a indução da patogenicidade in vitro**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
5. ARTIER et. al. 2015. **Subproteomic analysis of the periplasmic milieu reveals alterations in *Xanthomonas citri* subsp *citri* cellular envelope metabolism in response to in vitro pathogenicity induction**. Manuscrito não-publicado, Universidade Federal de São Carlos.
6. AUSUBEL, F.M., **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology**. 5th ed. 2002, New York: Wiley. 2v. (various pagins).
7. BEHLAU, F. et al. **Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis***. *Applied and Environmental Microbiology* 77.12 (2011): 4089–4096.
8. BELASQUE JR., J; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. **O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo, Brasil**. *Summa phytopathol.* [online]. 2009, vol.35, n.2, pp. 91-92 .
9. BITANCOURT, A. A. **O cancro cítrico**. *O Biológico*, 1957. 23:101-111.
10. BRAMUCCI, M.G.; NAGARAJAN, V. **Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality**. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. 62(11): p. 3948-53.
11. BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. ***Xanthomonas citri*: breaking the surface**. *Molecular Plant Pathology*, 2003. 4(3): p. 141-57.
12. CARNIELLI, C.M., **Análise proteômica diferencial de proteínas totais e superficiais da membrana de *Xanthomonas* spp. em interação com hospedeiro cítrico**. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
13. CARVALHO, F.M.S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. Tese de Doutorado, pp.177, 2006.
14. CIVEROLO, E.L., **Bacterial canker disease of citrus**. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society*, 1984. 37: p. 127-146.
15. CROWE, J.; CROWE, L.; CHAPMAN, D. **Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms**. The role of trehalose. *Science* (1984), 223, 209±217.
16. CROZIER, A. et al. **Biosynthesis of hormones and elicitor molecules, in Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2001, American Society of Plant Physiologists: Maryland, USA. p. 829-850.
17. DA SILVA, A.C. et al. **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities**. *Nature*, 2002. 417(6887): p. 459-63.

18. DALLA-PRIA et al. **Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker.** Plant Pathology, v. 55, n. 5, p. 657-663, 2006.
19. DAS, A.K. **Citrus canker – A review.** Journal of Applied Horticulture, 2003. 5(1): p. 52-60.
20. DJONOVIC et al. **Trehalose biosynthesis promotes *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in plants.** PLoS Pathogens 9: e1003217. 2013
21. ELBEIN, A. D. et al. **New insights on trehalose: a multifunctional molecule.** Glycobiology. 2003; 13: 17–27.
22. FACINCANI et al. **Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Functional & Integrative Genomics, 2014. 14(1):205-17.
23. FLOR, H.H. **Current Status of the Gene-For-Gene Concept, in Annual Review of Phytopathology.** 1971, Annual Reviews Inc., 4139 El Camino Way, PO BOX 10139: Palo Alto, CA 94303-0139 p. 275-296.
24. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA – FUNDECITRUS. Disponível em: <[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)>. Acesso em: 2 jan. 2015.
25. GIBSON et al. **Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors.** Angewandte Chemie International Edition in English, 2007; 46:4115 – 9.
26. GÖRG, A. et al. **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.** Proteomics, 2004. 4(12): p. 3665-85.
27. GOTO, M. **Citrus canker.** In: Kumar, J.; Chaube, H.S.; Singh, U.S.; Mukhopadhyay, A.N. (Ed.). Plant diseases of international importance. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. chap. 3, p. 170-208.
28. GRAHAM, J.H., et al. ***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker.** Molecular Plant Pathology, 2004. 5(1): p. 1-15.
29. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 9 jan. 2015.
30. ITURRIAGA, G.; SUAREZ, R.; NOVA-FRANCO, B. **Trehalose metabolism: from osmoprotection to signalling.** International Journal of Molecular Sciences 10: 3793–3810. 2009.
31. KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina.** 1994, Porto Alegre: Editora Rígel. 446.
32. LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
33. LOPEZ, M.J. et al. ***Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters.** Water Research, 2001. 35(7): p. 1828-30.
34. MADIGAN, M.T. et al. **Brock Biology of Microorganisms.** 13 ed. 2010: Benjamin Cummings. 1152.
35. MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. **Kinetik der Invertinwirkung.** Biochemistry, 49: 333–369. 1913.
36. NAMEKATA, T. et al. **Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico.** Laranja, 1996. 17(1): p. 67-78.
37. NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira.** 1<sup>st</sup> ed. Ribeirão Preto: Markestrat - CitrusBR, 2009.

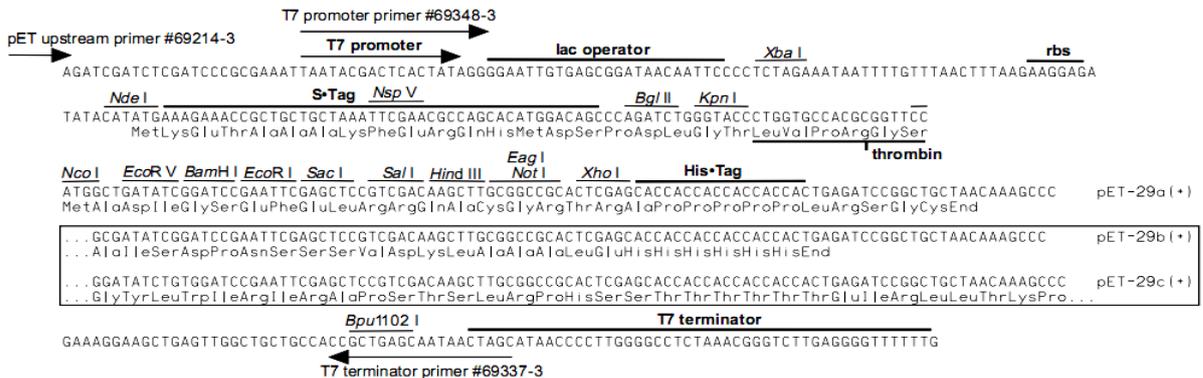
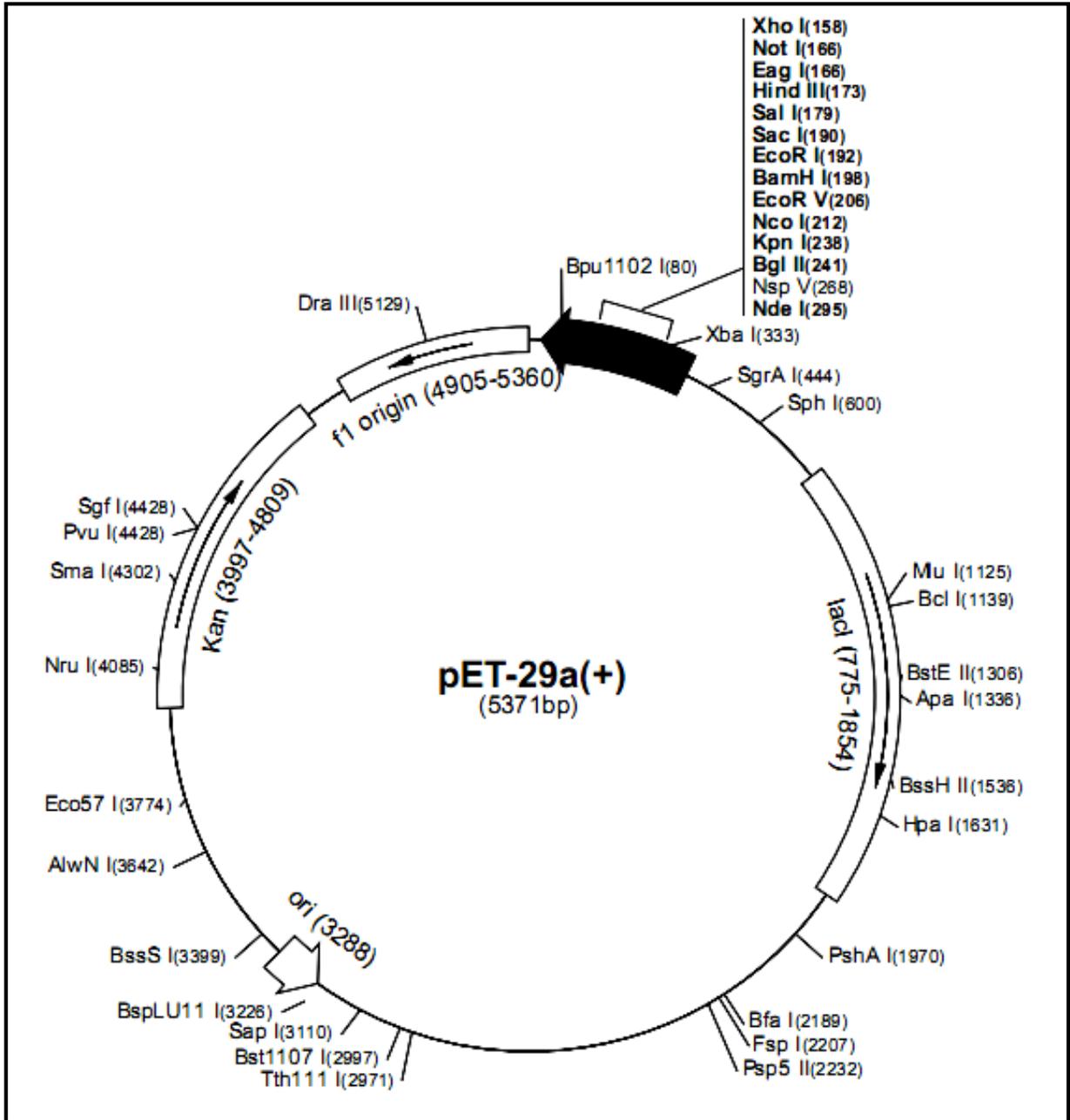
38. PETERSEN et al., **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions**. *Nature Methods*, 8:785-786, 2011.
39. PADMANABHAN, D. et al. **Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves**. *Indian Journal Phytopathology*, 1973. 26(1): p. 215-217.
40. PAUL, M. J.; PRIMAVESI, L. F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. H. **Trehalose metabolism and signaling**. *Annual Review of Plant Biology*, 2008. 59:417–441.
41. PRASAD, A.R.S., MAHESHWARI, R. **Growth of and trehalase activity in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus***. *Proceedings of the Indian Academy of Science*, 1978. B 87B, 231–241.
42. ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. 2001, Piracicaba: Fealq/Fundecitros. 270.
43. SÃO PAULO (Estado). **Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 147, de 31 de outubro de 2013**. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, 1º de novembro de 2013, Seção 1. p. 50.
44. SANGER, F. et al. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. *PNAS*, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A*, 1977. 74(12): p. 5463-7.
45. SREERAMA, N.; WOODY, R.W. **Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set**. *Analytical Biochemistry*. 282, 252-260, 2000.
46. STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. **Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states**. *Plant Disease Journal*. v. 67, p. 581-585, 1983.
47. STROM, A. R.; KAASEN, I. **Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression**. *Molecular Microbiology* 8: 205–210. 1993.
48. TOURINHO-DOS-SANTOS et al. **Periplasmic trehalase from *Escherichia coli*: characterization and immobilization on spherisorb**. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 1994. 27:627–636.
49. TRINDER, P. **Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor**. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1969;6:24–27.
50. VALAITIS, A.P.; BOWERS, D.F. **Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the gypsy moth, *Lymantria dispar***. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1993. 23, 599–606.
51. WHITE, F.F. et al. **Prospects for understanding avirulence gene function**. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000. 3(4): p. 291-8.
52. ZANDONADI, F.S., **Análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de *Xanthomonas spp.* que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros**. 2012. 119f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

ANEXO I



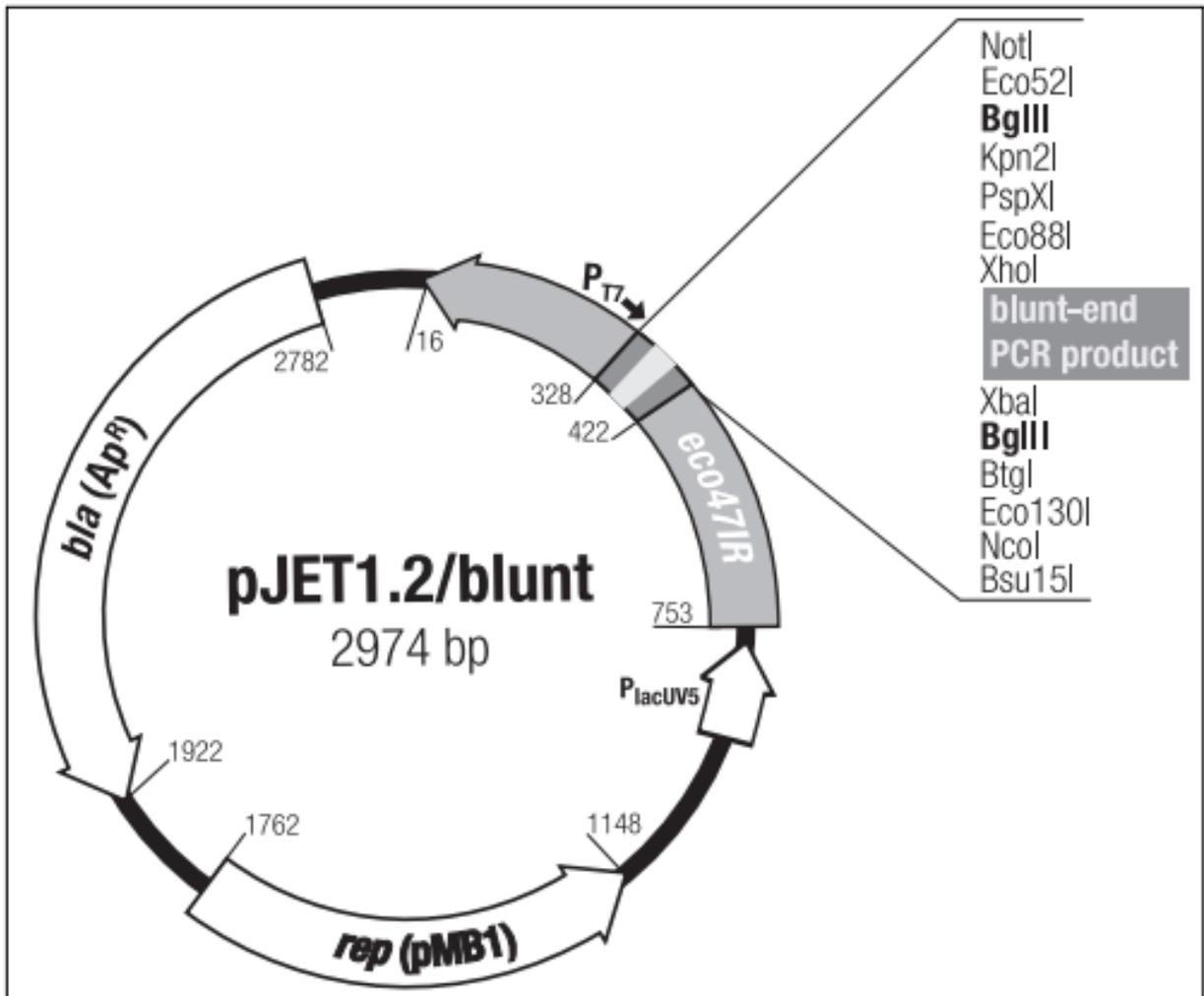
Mapa do vetor pET28a

ANEXO II



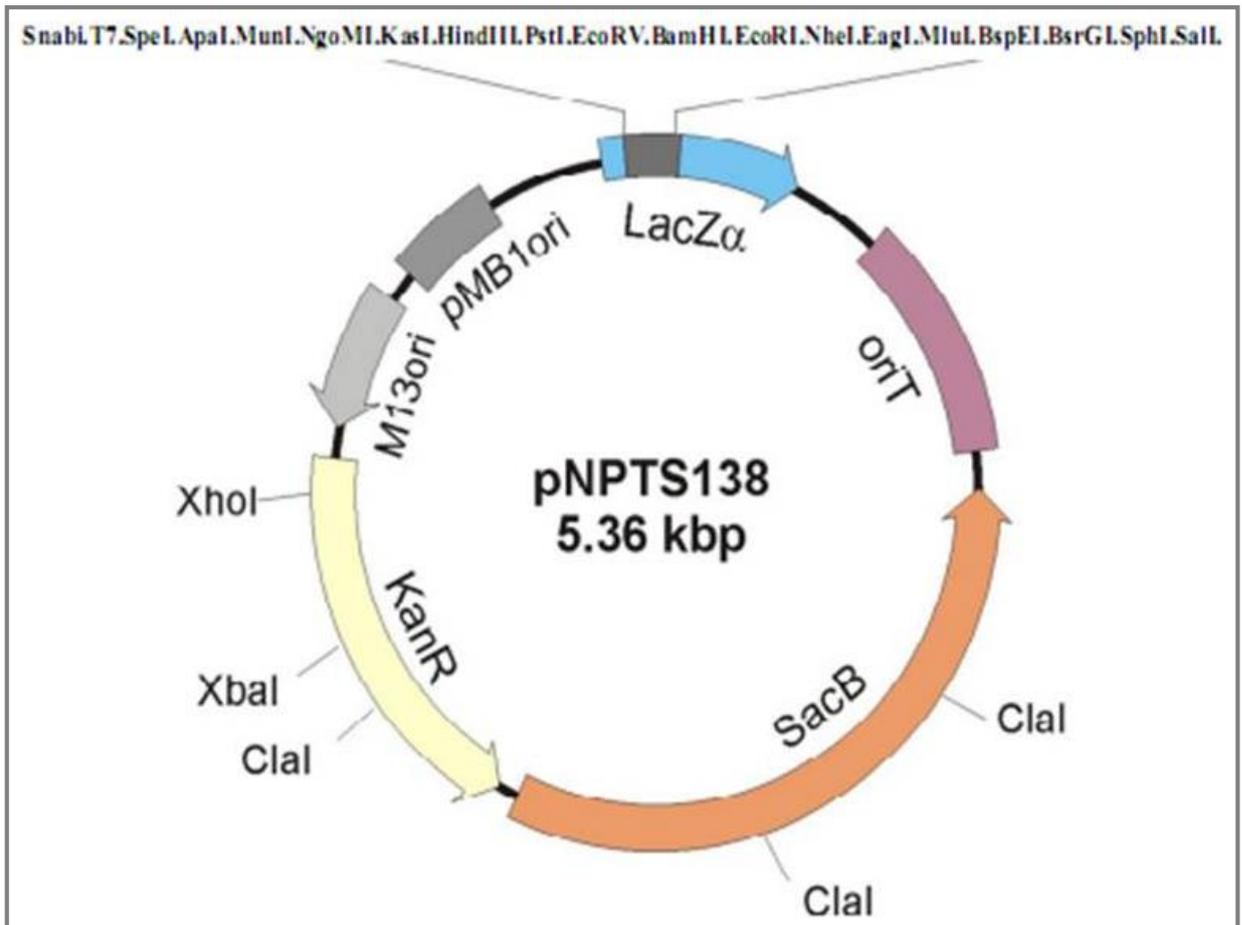
Mapa do vetor pET29a

## ANEXO III



Mapa do vetor pJET 1.2

## ANEXO IV



Mapa do vetor suicida pNPTS138 (Dickon Alley M. R. K., trabalho não publicado)