

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

SOLANGE CRISTINA ANTÃO

**Análise funcional do gene que codifica xiluloquinase
em *Xanthomonas citri***

SÃO CARLOS

2022

SOLANGE CRISTINA ANTÃO

**Análise funcional do gene que codifica xiluloquinase
em *Xanthomonas citri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Ênfase: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Prof. Dra Maria Teresa Marques Novo Mansur
Co-Orientador: Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino

SÃO CARLOS
2022

Antão, Solange Cristina

Análise funcional do gene que codifica xiluloquinase em
Xanthomonas citri / Solange Cristina Antão -- 2022.
67f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Maria Teresa Marques Novo Mansur
Banca Examinadora: Dulce Helena Ferreira de Souza,
Maria Célia Bertolini

Bibliografia

1. Xanthomonas citri subsp. citri. 2. Xilulose quinase. 3.
Cinética enzimática. I. Antão, Solange Cristina. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



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

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Solange Cristina Antão, realizada em 23/06/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino (UNICEP)

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini (UNESP)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente em meus passos e me auxilia em momentos de dificuldade.

À minha mãe, Leoni, que não mede esforços em me ajudar e me incentivar. Muito obrigada por tudo e para sempre.

Ao restante da minha família, em especial aos meus irmãos Rosangela e Marcos, que sempre estão presentes e trazem alegria por onde passam.

À minha orientadora, Prof Dra Maria Teresa Marques Novo Mansur, pela oportunidade de aprender tudo o que aprendi nestes últimos anos e por sua orientação e amizade.

Ao meu coorientador, Prof Dr André Vessoni Alexandrino, pelos ensinamentos ao longo destes anos e por me socorrer em momentos de desespero.

Às minhas amigas de graduação, Camila, Fernanda e Mariana, que mesmo estando à distância, pude sentir o carinho e o apoio durante este período.

À minha amiga Valentine, por sempre estar presente e acreditando em mim, mesmo quando eu duvidava.

Aos meus amigos, em especial Mayara e Higor, por estarem presentes na minha vida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Beatriz, Carol, Evandro, Jéssica, Mariana, Naiane, Vinícius e Yuri, pela colaboração e amizade.

À Célia Regina Câmara, que carrega sua alegria onde quer que vá, obrigada pela amizade.

A todos os professores que disponibilizaram seus equipamentos e forneceram reagentes para a realização deste projeto, em especial aos professores Dr Adilson José da Silva, Dra Dulce Helena Ferreira de Souza, Dr Felipe Roberti Teixeira, Dr Flávio Henrique da Silva, Dr Moacir Rossi Forim e Dr Marco Antonio Del Lama.

À CAPES e ao PPGGEv pela bolsa de Mestrado e à FAPESP pela Bolsa TT3 de janeiro/2022 a julho/2022 (Proc. FAPESP 2021/14225-0, vinculado ao Proc. 2020/05529-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com o financiamento da FAPESP (Projeto vigente de Auxílio à Pesquisa, Proc. nº 2020/05529-3).

“We do not simply live in this universe. The universe lives within us.”
— Neil deGrasse Tyson, Astrofísica para apressados.

RESUMO

O cancro cítrico proporciona queda na produtividade e na qualidade das frutas cítricas pela falta de medidas de controle e erradicação que sejam eficientes e é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC). Em trabalhos de proteômica previamente realizados em nosso grupo de pesquisa constatou-se o envolvimento do metabolismo de xilose, carboidrato presente na parede vegetal, no processo infeccioso da bactéria, demonstrando que estudos com XAC podem ter importância biotecnológica para o aproveitamento de biomassa vegetal. O objetivo deste trabalho foi a caracterização do gene de xiluloquinase (XK) de XAC, uma das enzimas pertencente a essa via metabólica, responsável pela fosforilação de D-xilulose [produzida a partir de xilose pela xilose isomerase (XI)] a D-xilulose-5-fosfato, permitindo então que a xilose seja metabolizada por meio da via das pentoses fosfato. Existem duas ORFS presentes no genoma de XAC anotadas como codificantes de XK (XAC1775 ou *xylB1* e XAC4244 ou *xylB2*), e o alinhamento das duas sequências de aminoácidos revelou somente 26% de similaridade entre elas. Esses dois genes anotados como codificantes de XK foram utilizados na construção de sistema de expressão heteróloga induzível por IPTG para avaliar suas atividades preditas. A expressão do gene *xylB2* retornou uma proteína insolúvel, sendo continuados os estudos com *xylB1*. Os estudos de atividade enzimática demonstraram que *xylB1* codifica uma enzima quinase de xilulose funcional, e estudos cinéticos revelaram o valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) como sendo de $0.7947 \pm 0,4032$ mM e o valor de $V_{m\acute{a}x}$ $0,01217 \pm 0,001130$ $\mu\text{Mol de xilulose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{i}na}^{-1}$. Em ensaio de *Pull-Down* para investigação de possíveis proteínas de interação da XK, os resultados indicaram ausência ou concentrações não detectáveis de proteínas do extrato celular total que interagem com XK de XAC. Foi realizada também uma tentativa de obtenção de uma linhagem mutante deletada no gene *xylB1* baseada em metodologia de dupla recombinação homóloga, com a construção do vetor suicida (pNPTS138_ *xylB1*) a partir da clonagem *in tandem* de fragmentos 1 kb *upstream* e *downstream* ao gene *xylB1*. Até o momento, obteve-se uma colônia heterogênea contendo possivelmente a linhagem selvagem e a linhagem mutante (a ser denominada XAC Δ 1775), que está em processo de isolamento do mutante para posterior caracterização quanto à patogenicidade do mesmo frente à linhagem selvagem. Dada a importância do metabolismo da xilose dentro do atual contexto econômico-estratégico de utilização de biomassa vegetal, este trabalho visa agregar conhecimento quanto a essa via metabólica em XAC e é pioneiro na caracterização molecular do gene de xiluloquinase (XK) no gênero *Xanthomonas*.

Palavras-chave: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; xilulose quinase; xilose; cinética enzimática

ABSTRACT

Citrus canker causes a decrease in the productivity and quality of citrus fruits due to the lack of efficient control and eradication measures and is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp *citri* (XAC). In proteomics studies previously carried out by our research group, the involvement of xylose metabolism, a carbohydrate present in the plant wall, in the bacterial infection process was observed, demonstrating that studies with XAC may have biotechnological importance for the use of plant biomass. The objective of this work was to characterize the XAC xylulokinase (XK) gene, one of the enzymes belonging to this metabolic pathway, responsible for the phosphorylation of D-xylulose [produced from xylose by xylose isomerase enzyme (XI)] to D-xylulose-5-phosphate, then allowing xylose to be metabolized via the pentose phosphate pathway. There are two ORFS present in the XAC genome annotated as coding for XK (XAC1775 or *xyIB1* and XAC4244 or *xyIB2*), and the alignment of the two amino acid sequences revealed only 26% similarity between them. These two genes annotated as coding for XK were used in the construction of an IPTG-inducible heterologous expression system to evaluate their predicted activities. The expression of the *xyIB2* gene returned an insoluble protein, and studies with *xyIB1* continued. Enzyme activity studies demonstrated that *xyIB1* encodes a functional xylulose kinase enzyme, and kinetic studies revealed the value of the Michaelis-Menten constant (K_m) to be $0.7947 \pm 0,4032$ mM and the value of V_{max} to be $0,01217 \pm 0,001130$ $\mu\text{Mol of xylulose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$. In a Pull-Down assay to investigate possible XK interacting proteins, the results indicated absence or undetectable concentrations of proteins from the total cell extract that interact with XK of XAC. An attempt was also made to obtain a mutant strain deleted in the *xyIB1* gene, based on a double homologous recombination methodology, with the construction of the suicide vector (pNPTS138_ *xyIB1*) with the in tandem cloning of fragments 1 kb upstream and 1 kb downstream to the *xyIB1* gene. So far, a heterogeneous colony was obtained, possibly containing the wild and the mutant strains (mutant to be named XAC Δ 1775), which is in the process of isolation of the mutant for further characterization against the wild strain regarding its pathogenicity. Given the importance of xylose metabolism within the current economic-strategic context of using plant biomass, this work aims to add knowledge about this metabolic pathway in XAC and is a pioneer in the molecular characterization of the xylulokinase (XK) gene in the genus *Xanthomonas*.

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; xylulokinase; xylose; enzymatic kinetic

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Danos causados pelo cancro cítrico.	14
Figura 2: Microscopia confocal de XAC306.....	15
Figura 3: Estrutura da parede celular vegetal e seus principais componentes.....	16
Figura 4: Esquema representativo da estrutura geral do xilano e suas ramificações.	17
Figura 5: Esquema da hidrólise do xilano.	18
Figura 6: Esquema de degradação enzimática de xiloglicanos em XAC.....	19
Figura 7: <i>Operon</i> XyGUL, altamente conservado nas espécies de <i>Xanthomonas</i> , e a degradação de xiloglicanos.....	22
Figura 8: Representação do contexto genômico das duas ORFs anotadas como xiluloquinase <i>xylB</i> em XAC 306, conforme consta na anotação do sequenciamento genômico no NCBI. ...	23
Figura 9: Alinhamento das sequências peptídicas preditas codificadas pelos genes anotados como codificantes da enzima xiluloquinase.	24
Figura 10: Reação de acoplamento para detecção da atividade de xilulose quinase.....	32
Figura 11: Modelo simplificado do plasmídeo de deleção pNPTS138_ <i>xylB1</i>	35
Figura 12: Esquema do sistema de <i>screening</i> de possíveis mutantes.....	38
Figura 13: Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação [A] e clonagem em vetor de propagação [B] das ORFs XAC1775 e XAC4244.	40
Figura 14: Análise por eletroforese em gel de agarose da restrição dos vetores de expressão pET28a após transformação em linhagem <i>E. coli</i> DH5 α e digestão com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	40
Figura 15: Análise da expressão, solubilidade e purificação de XK-1 em SDS-PAGE.....	41
Figura 16: Análise da expressão, solubilidade e purificação de XK-2 por SDS-PAGE.	42
Figura 17: Teste da funcionalidade do acoplamento enzimático.	43
Figura 18: Teste enzimático utilizando diferentes concentrações de XK.	44
Figura 19: Equação de Michaelis-Menten.....	45
Figura 20: Cinética enzimática da xiluloquinase de XAC.	45
Figura 21: Esquema de catálise enzimática.....	46
Figura 22: SDS-PAGE de amostras obtidas a partir da metodologia de <i>Pull-Down</i> com a proteína XK recombinante e o lisado celular de XAC selvagem.	47
Figura 23: Eluatos de 300 mM dos testes de <i>Pull-Down</i> com XAC selvagem.....	48
Figura 24: Perfil de interações proteicas previstas pelo <i>software</i> STRING para a enzima XK de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306.....	49
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>xylB1</i> , obtidos por amplificação a partir do DNA genômico de XAC 306.	50
Figura 26: Análises por eletroforese em gel de agarose da restrição dos vetores de propagação pJET 1.2 contendo os fragmentos <i>upstream</i> e <i>downstream</i> após clonagem em <i>E. coli</i> DH5 α .51	
Figura 27: Análise de restrição do plasmídeo de deleção pNPTS138_ <i>xylB</i> por eletroforese em gel de agarose.	52
Figura 28: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR de colônia de um possível mutante.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das regiões de interesse.	28
Tabela 2: Programação das etapas de amplificação por PCR.	29
Tabela 3: Oligonucleotídeos desenhados para a confirmação da deleção do gene <i>xyfBI</i>	39
Tabela 4: Descrição das etapas do ciclo de PCR realizados na confirmação da deleção gênica	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D.O._{595nm}: densidade óptica em 595 nm.

dNTP: trifosfato de desoxiribonucleotídeo

Fundecitrus: Fundo de Defesa da Citricultura

GenBank: banco de dados de sequências de DNA e proteínas do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA

IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

IMAC: “*Immobilized Metal Affinity Chromatography*” ou Cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados

kb: quilopares de bases

kDa: quilodalton

LB: meio de cultura Lúria-Bertani

LDH: Lactato desidrogenase

NCBI: “*National Center for Biotechnology Information*”, Centro Nacional de Informação Biotecnológica

MW: “*Molecular Weight*” ou Peso Molecular

ORF: “*Open Reading Frame*”, quadro aberto de leitura

pb: pares de bases

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*”, reação em cadeia da DNA polimerase

PDB: “*Protein Data Bank*”, banco de dados de estruturas resolvidas de proteínas

PK: Piruvato quinase

POD: peroxidase

rpm: rotações por minuto

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

TAE: tampão tris-acetato-EDTA

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

XAM-M: Meio indutor de patogenicidade modificado do meio XAM-1

XAC: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

XI: Xilose Isomerase

XK: Xiluloquinase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Cancro Cítrico	13
1.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	15
1.3 Xilano e o metabolismo de xilose	16
1.4 Xilulose quinase	20
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos Específicos	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1 Bactérias, plasmídeos, condições de cultivo e procedimentos em biologia molecular. .	27
3.2 Desenho dos oligonucleotídeos	27
3.3 Extração de DNA genômico.....	28
3.4 Amplificação das regiões de interesse por PCR e clonagem.....	28
3.5 Clonagem em vetor de propagação	29
3.6 Montagem dos plasmídeos de expressão de <i>xylB1</i> e <i>xylB2</i>	30
3.6.1 Clonagem em vetor de expressão	30
3.6.2 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade.....	30
3.7 Método de avaliação da atividade de XK.....	31
3.7.2 Teste de atividade de XK	33
3.7.3 Cinética enzimática	33
3.8 <i>Pull-Down</i> com XK recombinante	34
3.9 Deleção gênica.....	35
3.9.1 Montagem do plasmídeo de deleção	36
3.9.1.1 Preparação de células de XAC eletrocompetentes	37
3.9.1.2 Transformação de XAC com plasmídeo de deleção	37
3.9.1.3 Seleção de mutantes deletados	37
3.9.1.4 Confirmação da deleção do gene <i>xylB1</i>	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Expressão heteróloga e purificação de XK recombinante.....	40
4.1.1 Construção dos plasmídeos de expressão.....	40
4.1.2 Análise da expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade	41
4.2 Análise da atividade de XK-1.....	42
4.2.1 Confirmação da atividade de PK e LDH para avaliação da atividade de XK-1.....	42
4.2.2 Teste enzimático com XK recombinante.....	43
4.2.3 Cinética enzimática de XK.....	44

4.3 Predição de possíveis proteínas parceiras de XK <i>in vitro</i>	46
4.4 Deleção gênica.....	50
4.4.1 Construção do plasmídeo de deleção.....	50
4.4.2 Confirmação da montagem do plasmídeo de deleção	51
4.4.3 Confirmação da deleção gênica.....	52
5 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO I.....	60
ANEXO II	61
ANEXO III	62
ANEXO IV	63
ANEXO V	64
ANEXO VI.....	65
ANEXO VII.....	66

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de laranja é líder mundial, correspondendo a 37% da produção de laranja, 64% da produção de suco de laranja e 79% do comércio internacional de suco de laranja, de acordo com dados de 2019 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês “*United States Department of Agriculture*”). Os principais consumidores do mercado brasileiro são os países europeus, norte-americanos e asiáticos.

Em São Paulo, estado que concentra a maior parte da produção do país (aproximadamente 70%), a safra estimada em 2021 foi de 9,6 milhões de toneladas, havendo uma redução de quase 10% na produtividade quando comparado com a safra 2020 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE). Em 2020, a exportação total de suco de laranja concentrado rendeu aproximadamente US\$ 1 bilhão, colocando a produção de laranjas em 12º lugar entre as *commodities* brasileiras (FAO STAT, 2022).

Os valores obtidos nas safras de 2020, quando comparados com as safras anteriores, sofreram um declínio total de aproximadamente 13%, chegando essa queda a quase 19% na produção paulista. Essa queda na produção é atribuída a alterações climáticas que, devido às crises hídricas sofridas no estado de São Paulo, impuseram influência negativa nas safras (FUNDECITRUS, 2021).

Além das dificuldades enfrentadas com alterações climáticas, muitas pragas presentes no campo interferem na citricultura brasileira, influenciando negativamente no potencial econômico da citricultura. Em destaque estão o *greening*, a clorose variegada (conhecida como CVC), a pinta preta dos citros e o cancro cítrico (BEHLAU, 2019).

O cancro cítrico é causado principalmente pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC), que afeta todas as variedades de citros comerciais. Tal doença ocasiona perdas econômicas, uma vez que diminui a produtividade das colheitas por levar a um tamanho diminuto dos frutos ou a uma queda prematura dos mesmos (BEHLAU, 2019).

Até o ano de 2009, o manejo do cancro cítrico era realizado com uma estratégia de erradicação de plantas contaminadas e/ou sintomáticas localizadas próximas a uma planta identificada (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE, 2016). Essa estratégia, porém, foi finalizada em 2009 devido a pressões realizadas por produtores, resultando numa maior disseminação do cancro cítrico entre 2009 e 2012, aumentando o número de talhões contaminados em quase dez vezes quando comparados aos anos anteriores (SANCHES et al., 2014).

Em 2018, uma nova Instrução Normativa (IN) federal (Normativa nº 21 de 25/04/2018), em substituição à IN anterior, determinou que as estratégias de controle do cancro cítrico a

serem adotadas seriam determinadas de acordo com o *status* fitossanitário da doença na área. Esse *status* possui quatro condições distintas: 1. Área sem ocorrência; 2. Área livre de praga (ALP); 3. Área sob erradicação e 4. Área sob sistema de mitigação de risco (SMR).

O estado de São Paulo, em conformidade com a Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº10 (2017), enquadra-se na área sob SMR. Tal estratégia se refere a locais nos quais a incidência de cancro cítrico varia de intermediária a alta, sendo que a erradicação de talhões contaminados não é uma opção. Nesse contexto, as ações realizadas têm como objetivo manejar e diminuir o impacto da doença na produção. As ações realizadas nesse caso permitem que o produtor mantenha plantas com sintomas, e que estejam discriminadas em seu cadastro a presença da doença. O comércio de fruta *in natura* é proibido, e todas as frutas recebidas a partir das áreas sob SMR são higienizadas e individualmente embaladas para comercialização. Frutos apresentando sintomas de cancro cítrico devem ser destruídos ou encaminhados à produção de suco (BEHLAU, 2019)

1.1 Cancro Cítrico

O primeiro relato de cancro cítrico no Brasil foi no ano de 1957 (BITANCOURT, 1957), e desde então, a doença tem sido um problema para a produção de citros por causar prejuízos aos produtores. Sua origem ainda é incerta, mas suspeita-se que o Sul da China, a Indonésia e a Índia sejam os locais mais prováveis para o surgimento, a partir dos quais ocorreu a disseminação (DAS, 2003).

Além do Brasil, os EUA, outro principal produtor mundial de citros, também possuem relatos de cancro cítrico, e mesmo já tendo sido considerada erradicada a doença por volta dos anos de 1980 e 1994, esse país ainda sofre danos à sua produtividade devido à incidência da doença, principalmente no estado da Flórida (STALL; CIVEROLO, 2003)

O cancro cítrico é causado pela entrada de XAC na planta por orifícios naturais ou lesões pré-existentes (BRUNINGS; GABRIEL, 2003), afetando principalmente as partes aéreas da planta, como a superfície de frutos, folhas e caules (Figura 1). O principal sinal é a formação de erupções circulares, decorrentes da hiperplasia das células do mesófilo da planta (AMARAL, 2003), que podem ter diâmetros variados e formar pústulas esponjosas esbranquiçadas, que ao longo do tempo escurecem e ganham tom marrom-escuro, que podem ou não ser circundadas por halos amarelos (BELASQUE JUNIOR et al., 2010; BRUNINGS; GABRIEL, 2003). A infecção normalmente se inicia na face abaxial das folhas, na qual há maior quantidade de estômatos ou em cicatrizes ao longo do caule e das frutas (AMARAL, 2003).



Figura 1: Danos causados pelo cancro cítrico. À esquerda, fruto imaturo apresentando lesões típicas do cancro cítrico e à direita, lesão causada pelo cancro cítrico detectada em caule de laranjeira. Fonte: Fundecitrus <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>

A principal forma de disseminação da doença acontece devido à ação humana, através da manipulação de equipamentos e roupas contaminados, transporte de mudas infectadas e restos agrícolas que contenham inóculos bacterianos (BEHLAU, 2019; EFROM; SOUZA, 2018). A presença de chuvas acompanhadas de ventos é um importante fator para a transmissão do patógeno para as plantas próximas, pois cria e carrega um filme que permite a sobrevivência da bactéria por um certo tempo e promove sua dispersão para plantas próximas ou para outros locais da mesma planta, além de garantir o sucesso da infecção (STALL; SEYMOUR, 1983).

A presença de lesões pré-existentes no tecido vegetal garante o sucesso da infecção de XAC. Tais lesões podem ser causadas pelo maquinário durante a colheita de frutos e/ou manipulação de mudas, mas também podem ser causadas por outras pragas existentes na região, como por exemplo, o inseto minador dos citros (*Phyllocnistis citrella*) (BEHLAU, 2019). Tal inseto não dissemina a bactéria, porém durante a sua alimentação ocorre a ingestão da epiderme do tecido vegetal, a lagarta cria galerias que são os locais nos quais a bactéria se alojará (MANEIRA; DANELLA NETO, 2019).

Apesar de todos os sintomas característicos da doença, o principal problema relacionado ao cancro cítrico é a queda prematura dos frutos, que ocorre devido ao aumento na produção do fitohormônio etileno em resposta à infecção (CROZIER, 2001). Estudos relacionam o tamanho das lesões características da doença com a queda dos frutos, demonstrando que apenas lesões grandes são capazes de provocar a queda de um fruto (BEHLAU, 2019).

Dentro das áreas sob SMR, o controle do cancro cítrico deve ser realizado para manejar a doença, tendo como objetivo principal reduzir a incidência de frutos com sintomas e a queda prematura dos frutos. Esse manejo é realizado pela construção de estruturas quebra-vento, controle do minador dos citros, plantio de variedades menos suscetíveis ao cancro e aplicação

de solução contendo cobre metálico em um raio de 30 metros da planta infectada (BEHLAU, 2019). Essa última aumenta os custos da produção e causa muitas preocupações em relação à poluição do ambiente (FU et al., 2012) ou mesmo aos efeitos toxicológicos sobre o consumidor. Ainda vale ressaltar que essa prática pode não ser eficiente, pois já são relatadas linhagens de *Xanthomonas* resistentes ao cobre (BEHLAU et al., 2011).

1.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O gênero *Xanthomonas* pertence ao grupo das Gamma-proteobacterias, um grupo de bactérias aeróbias, flageladas, não esporulantes, não fastidiosas e com formato de bastonete (Figura 2) (MANDIGAN, M.M., J. BENDER, 2014). As bactérias desse gênero são importantes economicamente por serem fitopatógenos capazes de infectar uma gama de hospedeiros que se distribui em 68 famílias e 240 gêneros de plantas (HAYWARD, 1993). Apesar destes valores, cada cepa bacteriana possui um número limitado de hospedeiros, o que diferencia esse grupo em estudos de interação planta-patógeno (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

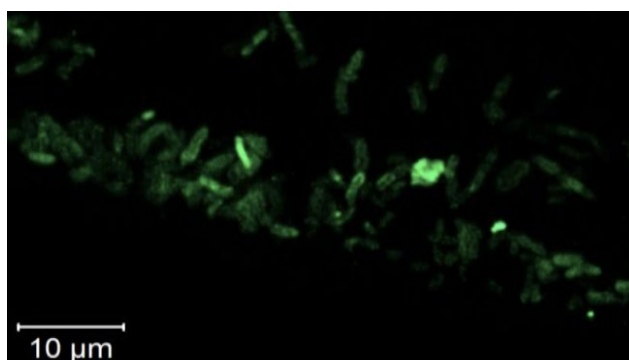


Figura 2: Microscopia confocal de XAC306. As células estão marcadas com fluorescência por meio de anticorpos anti- DnaK conjugados com Isotiocianato de fluoresceína - FITC (do inglês, “*Fluorescein isothiocyanate*”) Fonte: Ferreira, Comunicação pessoal. Fotos obtidas junto ao grupo do Prof. Dr. Francisco Gontijo, USP/São Carlos)

As colônias possuem uma morfologia característica, sendo circulares, lisas, convexas e com coloração amarelada devido à produção do pigmento xanthomonadina (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). As colônias também possuem um aspecto viscoso (STALL; CIVEROLO, 2003), decorrente da produção de goma xantana, um exopolissacarídeo que, apesar de não ser essencial para a patogenicidade de XAC (DUNGER et al., 2007) fornece proteção à bactéria contra fatores ambientais (MEYER; BOGDANOVE, 2009). Esse polissacarídeo possui variada aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, química e

petroquímica, e com grande interesse em uso biotecnológico (LÓPEZ; MORENO; RAMOS-CORMENZANA, 2001).

Xanthomonas citri subsp. *citri* (XAC) é capaz de infectar diversas espécies de citros, sendo responsável pela forma mais agressiva da doença, denominada cancrose A e está amplamente presente em território brasileiro. Outra espécie que é encontrada no Uruguai, no Paraguai e na Argentina, a *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (ou XauB), causa a cancrose tipo B, principalmente em *Citrus lemon* (STALL; SEYMOUR, 1983). Uma terceira forma da doença, a cancrose C, é causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, a qual possui um único hospedeiro, *Citrus aurantifolia* (CIVEROLO, 1984).

1.3 Xilano e o metabolismo de xilose

As hemiceluloses juntamente com a celulose e a lignina são componentes da parede celular vegetal, sendo as hemiceluloses heteropolímeros ramificados ou lineares (Figura 3). Elas atuam como conectores entre os demais componentes e também como reserva energética e são classificadas de acordo com o monossacarídeo predominante nas ramificações e na cadeia principal (AHMAD; ZAKARIA, 2019).

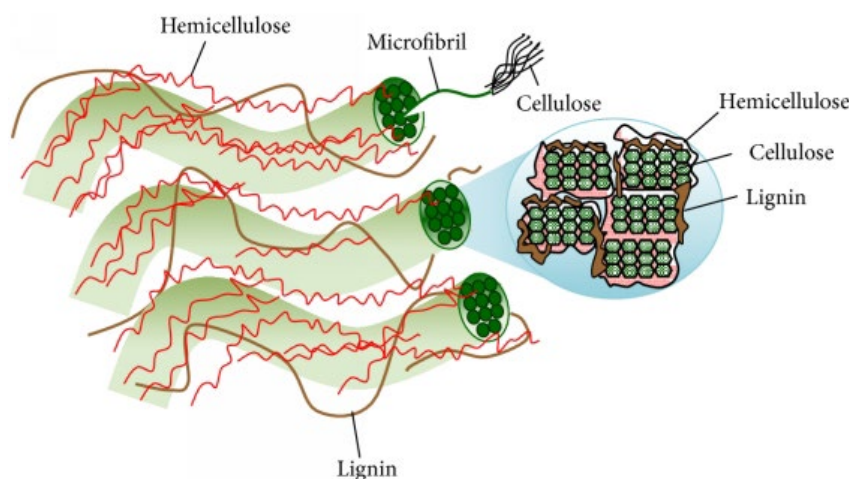


Figura 3: Estrutura da parede celular vegetal e seus principais componentes. As fitas de moléculas de celulose envoltas em hemicelulose e agrupadas com auxílio da lignina são mostrados e estão presentes logo abaixo da lamela média das células vegetais. Fonte : (AHMAD; ZAKARIA, 2019).

Um dos principais componentes das hemiceluloses é o heteropolissacarídeo xilano (Figura 4), formado por uma cadeia principal composta por unidades de D-xilose com ligações β -1,4 entre essas unidades (AHMAD; ZAKARIA, 2019; CHOW et al., 2015). A cadeia principal possui ramificações laterais que definem a classe do polissacarídeo (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013): com ramificações compostas por L- α -arabinofuranose são

classificados como arabinoxilanos (AX) e com ramificações compostas de ácidos α -glicurônico ou 4-O-metil-glicurônico são classificados como glicuroxilanos (GX). Porém, o xilano pode conter os dois tipos de ramificações, sendo então classificados como arabinoglicuronoxilanos (AGX) (BUSSE-WICHER et al., 2016).

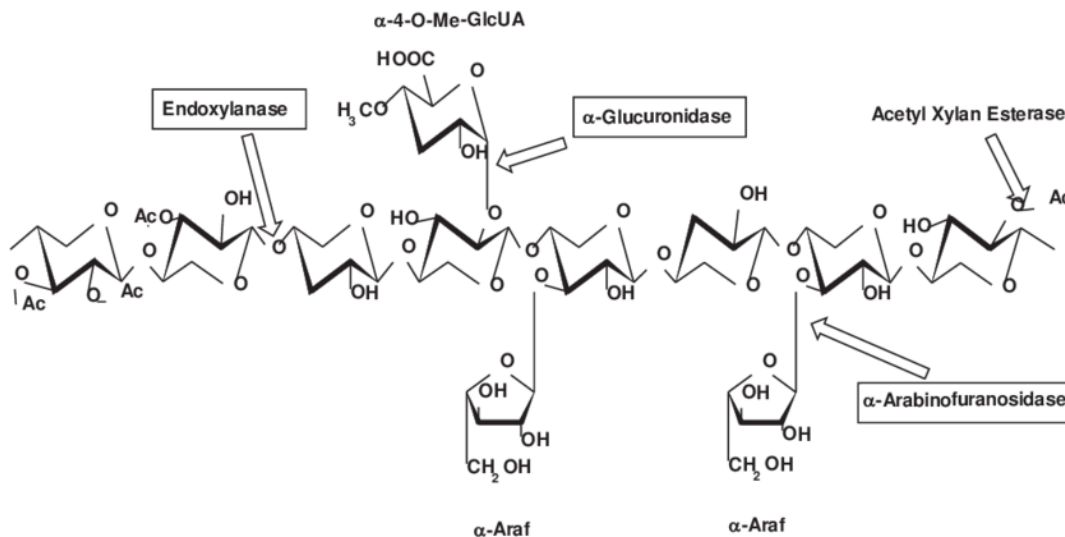


Figura 4: Esquema representativo da estrutura geral do xilano e suas ramificações. Estrutura do heteropolissacarídeo xilano demonstrando o esqueleto principal e as ramificações. São também apresentadas as enzimas xilanolíticas. Fonte: Sunna e Antranikan, 1997.

O sistema de hidrólise do xilano envolve diversas enzimas em etapas distintas, que precisam atuar de forma sinérgica para que a D-xilose seja liberada ao final para utilização pela célula. A liberação de cadeias laterais é realizada por enzimas acetil-esterase, mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, glicuronidases e arabinosidases (DHIMAN; MUKHERJEE, 2018; MALGAS et al., 2019). Enzimas α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) hidrolisam as extremidades não redutoras de L- α -arabinofuranosil presentes em AXs e AGXs (LAGAERT et al., 2014). Processo semelhante ocorre com as enzimas α -D-glicuronidases (EC 3.2.1.139), que hidrolisam as ligações entre os ácidos D-glicurônico e o esqueleto principal em GXs (SHALLOM; SHOHAM, 2003). Alguns resíduos de glicuronoxilanos podem estar ligados a uma molécula de ácido acético, necessitando assim de enzimas carboidrato esterase para desacetilação (BIELY, 2012).

A despolimerização do esqueleto central do xilano tem como principais agentes as enzimas β -xilosidases e endo-1,4- β -xilanases, que são responsáveis por hidrolisar as ligações β -1,4 de extremidades não redutoras liberando xilose, xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e até xilo-oligossacarídeos (XOs) de cadeia longa ou ramificados (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016). Os resíduos X2 e X3 são novamente quebrados para a liberação da xilose (Figura 5).

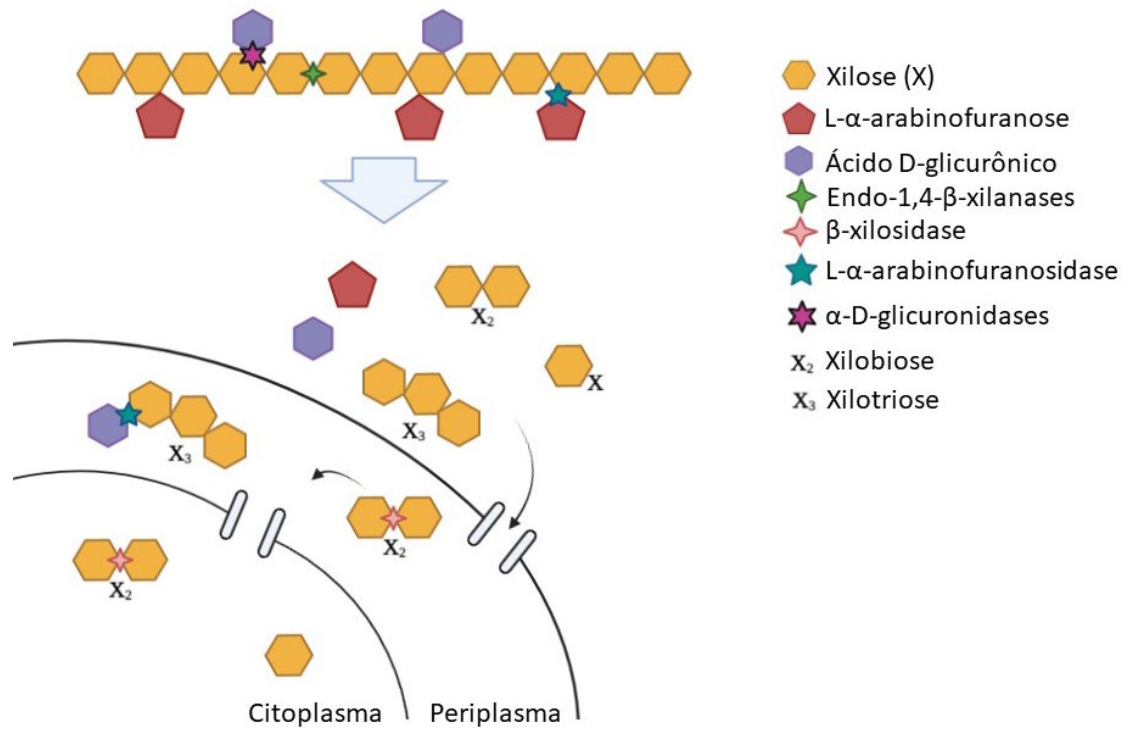


Figura 5: Esquema da hidrólise do xilano. As cadeias laterais são degradadas por L-α-arabinofuranosidases e α-D-glicuronidases que hidrolisam ligações glicosídicas e liberam L-α-arabinofuranose e ácido D-glicurônico, respectivamente. O esqueleto principal do xilano é hidrolisado pelas β-xilosidases e endo-1,4-β-xilanases nas ligações β -1,4 entre os resíduos de xilose, liberando xilose, xilobiose (X₂), xilotriose (X₃) ou outros agrupamentos mais longos (XOs). Esses resíduos são internalizados pela célula e assimilados. A legenda contendo cada um dos componentes representados está à direita. A localização das reações pode não ser exata. Fonte: Próprio autor, baseado em Chen, et al., 2015 e Vieira et al., 2021.

Além do xilano, a hemicelulose pode ser composta por xiloglicanos (XyG), que são polissacarídeos heterogêneos compostos por resíduos de xilose e glicose na cadeia principal com ligações entre as unidades iguais a do xilano (WALDRON; FAULDS, 2007). Vieira e colaboradores descreveram um *operon* presente em XAC contendo enzimas específicas de degradação desses polímeros (Figura 6).

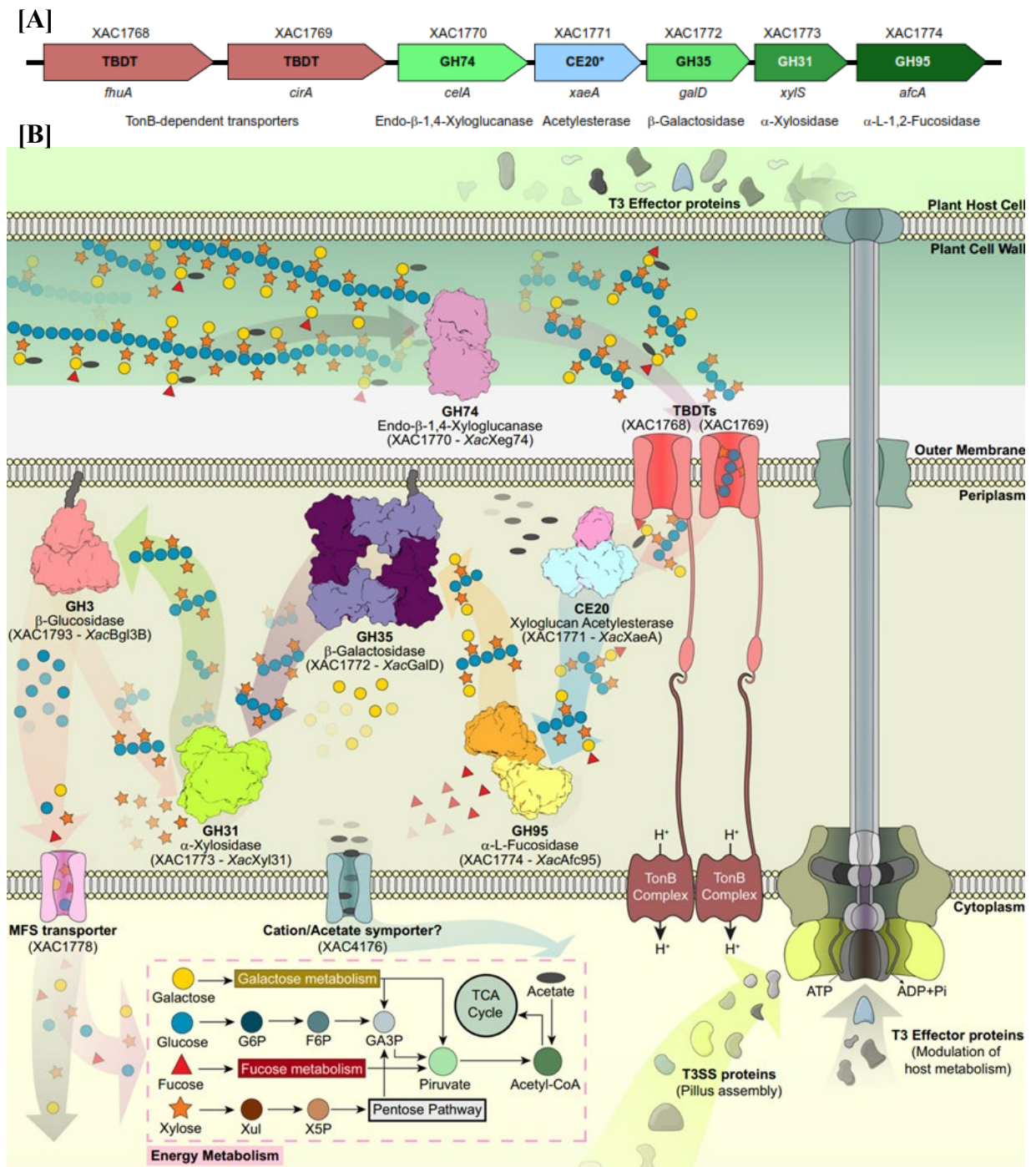


Figura 6: Esquema de degradação enzimática de xiloglicanos em XAC. Em [A] estão apresentados os genes constituintes do *operon* XyGUL (*Xyloglucans Utilization Loci*) em XAC306; e em [B] a cascata de degradação e suas enzimas efetoras. Fonte: Vieira et al, 2021.

Diversos fitopatógenos possuem estratégias metabólicas para a assimilação e utilização como fonte de energia dos resíduos de D-xilose liberados no metabolismo do xilano (como demonstrado na Figura 6 em espécies de *Xanthomonas*). O metabolismo da D-xilose se inicia com a sua internalização na membrana plasmática, seguida da isomerização de D-xilose em D-xilulose pela enzima xilose isomerase (XI) e posterior fosforilação da D-xilulose pela enzima

xilulose quinase ou xiluloquinase (XK) (EC 2.7.1.17) em D-xilulose-5-fosfato, a qual pode ser metabolizada pela via das pentoses fosfato (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996; CHOW et al., 2015). Um trabalho de proteômica diferencial realizado em nosso grupo de pesquisa comparando as frações periplasmáticas de XAC e XauB em condições infecciosa e não infecciosa *in vitro* (em meio indutor de patogenicidade XAM-M e meio não indutor de patogenicidade NB, respectivamente), identificaram a expressão de xilose isomerase em condição de indução de patogenicidade *in vitro* apenas na linhagem mais virulenta XAC (ZANDONADI et al., 2020), podendo indicar uma importância no envolvimento da degradação da xilose com o processo bacteriano de infecção.

A partir disso, em nosso grupo de pesquisa, as duas ORFs codificantes da enzima xilose isomerase vem sendo estudadas para compreender o papel da via do metabolismo de xilose na virulência de XAC (ALEXANDRINO, 2020 e Prieto, tese de doutoramento). Os estudos, até então, demonstram que a deleção de um ou dos dois genes codificantes de XI (*xyIA2*) aumentou a virulência de XAC que, segundo os autores, ocorre devido ao acúmulo de xilose nas células com o consequente aumento da expressão de genes reguladores Hrp. Com isso, surgiu a necessidade de compreender a importância do metabolismo de xilose no processo infeccioso de XAC e assim caracterizar também a atuação da xilulose quinase, alvo deste estudo.

1.4 Xilulose quinase

A xilulose quinase (XK) catalisa a fosforilação de resíduos de xilulose em xilulose-5-fosfato, de modo que este produto possa ser metabolizado pela via das pentoses fosfato, como citado anteriormente. A XK possui, como todas as enzimas quinases, dois substratos: o ATP e o substrato a ser fosforilado, neste caso xilulose, e está presente em uma grande variedade de microrganismos (LAWLIS et al., 1984; SIZEMORE et al., 1991; WILHELM; HOLLENBERG, 1984)

Utilizando o *software* BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>), um banco de dados específico para enzimas, estão registrados 27 parâmetros de K_m para a enzima XK (dez para D-xilose como substrato, nove para o ATP como substrato e o restante para outros compostos não específicos) (CHANG et al., 2021). Estudos estruturais de XK avaliados no *Protein Data Bank* (PDB), demonstram 12 estruturas registradas sendo somente quatro de microrganismos (*Chromobacteriu spp*, *Bifidobacterium spp*, *Brucella ovis* e *E. coli*) e nenhum registro do gênero *Xanthomonas* (BERMAN et al., 2000).

Vieira e coautores (2021) reportaram que os genes que codificam a XI e a XK estão presentes em praticamente todas as espécies de *Xanthomonas* (Figura 7), e que a localização desses genes também é conservada, estando *downstream* ao *operon* de utilização de xiloglicanos XyGUL (*Xyloglucans Utilization Loci*), constituído em XAC pelas ORFs XAC1768 a XAC1774 (Figura 6A), sendo que este *operon* está também presente na maior parte das espécies (Figura 7).

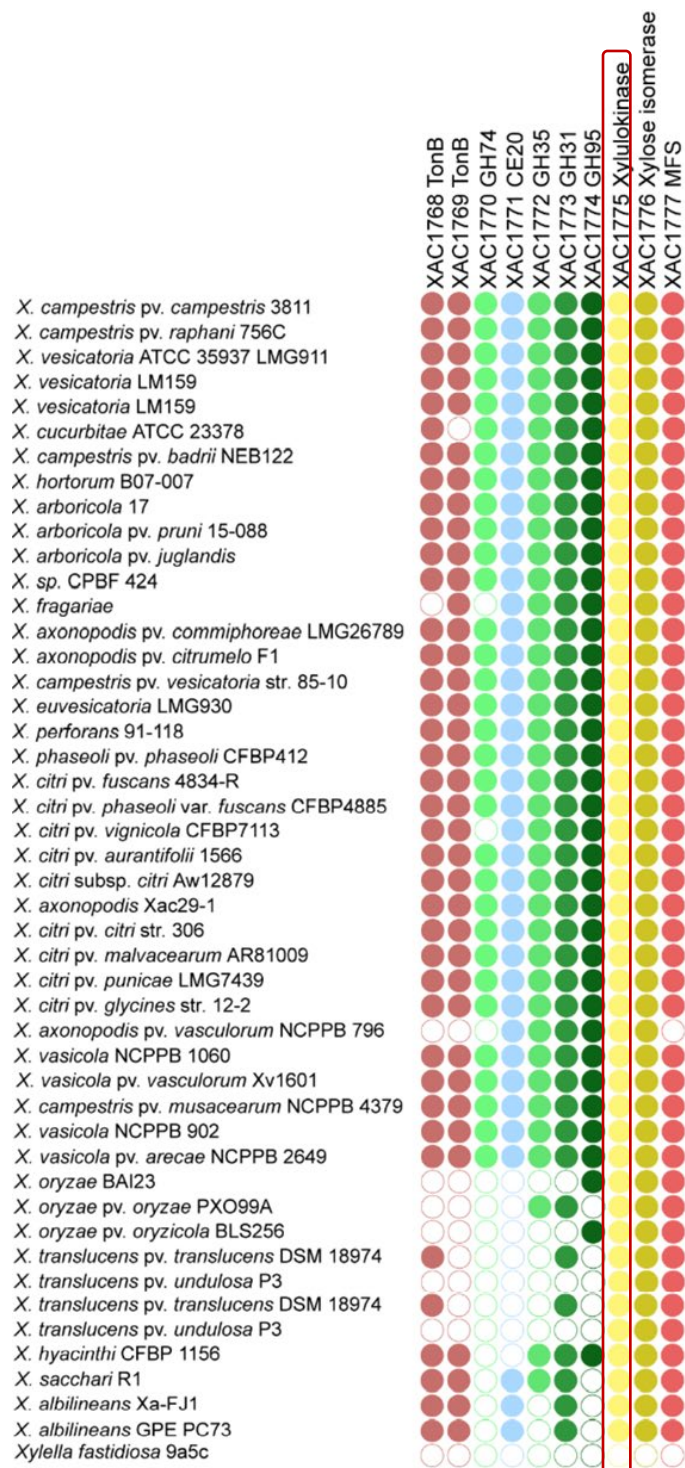


Figura 7: *Operon XyGUL*, altamente conservado nas espécies de *Xanthomonas*, e a degradação de xiloglicanos reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança, onde é representada a presença (círculos cheios) ou ausência (círculos vazios) de genes pertencentes ao *operon XyGUL* presente em XAC306, e também dos genes que codificam XI e XK, localizados *downstream* ao operon e envolvidos no metabolismo de xilose (XAC1775 e XAC1776), além do transportador MSF (XAC1777). Um dos genes estudados nesse trabalho está destacado e é possível observar a conservação desse gene nas diferentes espécies de *Xanthomonas*. Fonte: Vieira et al., 2021.

Há duas ORFs no genoma de XAC, linhagem 306 (*Accession number*: AE008923.1) anotadas como codificantes de XK (XAC1775 e XAC4244), que possuem tamanhos de 1494

pb e de 1647 pb e estão presentes em contextos genômicos distintos (Figura 8), estando XAC1775 presente *downstream* ao operon XyGUL (VIEIRA et al., 2021) e XAC4244 presente em um dos três *operons* considerados pertencentes ao *regulon* de hidrólise de xilano (CHOW et al., 2015).

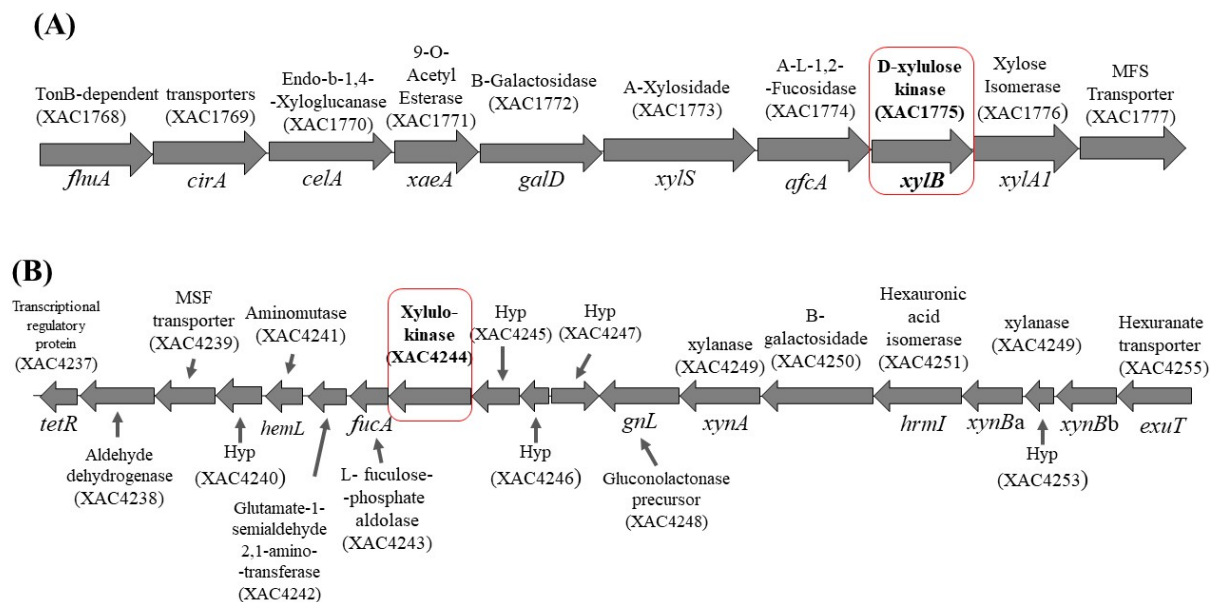


Figura 8: Representação do contexto genômico das duas ORFs anotadas como xiluloquinase *xylB* em XAC 306, conforme consta na anotação do sequenciamento genômico no NCBI. As duas ORFs estudadas nesse trabalho estão destacadas com um retângulo vermelho. O gene *xylB* está *downstream* ao operon XyGUL que compreende as ORFs XAC1768-1774 (Figura 6A; VIEIRA et al., 2021); um segundo gene, *xylB*, está localizado em outro operon, associado a um *regulon* do metabolismo de xilano, em outra região do genoma (CHOW et al., 2015). Fonte: Próprio autor.

O alinhamento das sequências dos resíduos de aminoácidos resultantes da transcrição e tradução *in silico* das duas ORFs de XK em XAC 306 acusou somente 26% de identidade enquanto a sequência de nucleotídeos dos respectivos genes apresenta similaridade menor que 40%. É possível, portanto, que uma delas não codifique uma proteína ativa ou mesmo que a anotação do genoma esteja equivocada.

Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) existe uma única ORF codificante da enzima XK, e as sequências dos resíduos de aminoácidos preditas a partir das duas ORFs de XAC, XAC1775 e XAC4244, foram alinhadas àquela da ORF de Xcc. Entre XAC1775 e a ORF codificante da XK de Xcc, a identidade foi de 98,4%, enquanto para XAC4244, 25% (Figura 9).

indiquem proteínas homólogas com outra atividade conhecida. Por outro lado, análises com a sequência de nucleotídeos retornaram sequências com 100% de identidade com mais de 100 genes anotados como XK em espécies de *Xanthomonas* (dados não mostrados), porém nenhum deles com função confirmada experimentalmente.

Levando em consideração o contexto genômico e sua relação com o metabolismo da D-xilose, os estudos de deleção foram aqui desenvolvidos com a ORF XAC1775, a qual apresenta *downstream* o gene da enzima xilose isomerase (ORF XAC1776), o mesmo não ocorrendo com a ORF XAC4244. Até o momento não há na literatura estudos funcionais da xiluloquinase em *Xanthomonas citri* ou mesmo em outras espécies do gênero.

Como relatado anteriormente, constatou-se o possível envolvimento do metabolismo de xilose no processo infeccioso da bactéria. Tal fato pode evidenciar XAC como um microrganismo estratégico do ponto de vista biotecnológico, no sentido de ser uma possível ferramenta ou eventualmente um modelo para estudos de desconstrução de biomassa vegetal, que visem sua utilização na produção de bioetanol ou outros produtos de valor agregado.

Dada a importância do metabolismo da xilose por bactérias fitopatogênicas nesse contexto econômico-estratégico, este trabalho visa agregar conhecimento adicional para o entendimento dessa via metabólica em XAC e é pioneiro na caracterização do gene de xiluloquinase (XK) de do gênero *Xanthomonas*.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral foi caracterizar funcionalmente a ORF XAC1775 e, parcialmente, a ORF XAC4244 de XAC306, as quais estão anotadas no genoma como xilulose quinase (XK), enzima que catalisa a fosforilação da xilulose como parte do metabolismo de xilose.

2.1 Objetivos Específicos

- Amplificar por PCR a partir do DNA genômico de XAC306 as ORFs 1775 e 4244, anotadas como codificantes de XK, para subsequente clonagem e produção heteróloga de ambos os produtos gênicos na forma recombinante em *E. coli*;
- Analisar a atividade enzimática das duas proteínas recombinantes produzidas para avaliar sua função predita de XK;
- Caracterizar os parâmetros cinéticos da XK recombinante;
- Analisar possíveis proteínas parceiras de XK pela técnica de *Pull-Down*;
- Construir uma linhagem mutante deletada na ORF XAC1775 para posterior análise funcional do envolvimento da mesma em característica(s) envolvida(s) no processo infeccioso.

3. Materiais e Métodos

3.1 Bactérias, plasmídeos, condições de cultivo e procedimentos em biologia molecular.

Neste trabalho foi utilizada a linhagem XAC 306 (causadora da cancrese tipo A), fornecida pelo Fundecitrus (Araraquara–SP). Para propagação dos plasmídeos de expressão foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH5 α e para expressão heteróloga a linhagem *E. coli* BL21(DE3).

As enzimas de restrição e o vetor de clonagem pJET (Anexo I) foram adquiridos da *Thermo Scientific*. O vetor de expressão utilizado foi o pET28a (Novagen, Anexo II). O vetor de deleção utilizado (pNPTS138 – Anexo III) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira (UNESP/Rio Claro) e os antibióticos utilizados foram da Sigma.

As células foram cultivadas em meio Lúria-Bertani (LB, KASVI) sólido e líquido, e para os testes de *Pull-Down* o cultivo foi realizado em meio XAM-M indutor de patogenicidade (ARTIER, 2018, modificado a partir do meio XAM-1), composto por (NH₄)₂SO₄ 7,57 mM; KH₂PO₄ 33,06 mM; K₂HPO₄ 60,28 mM; citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) 1,7 mM; MgSO₄ 1M; casaminoácidos 0,03%; Frutose 10 mM, Sacarose 10 mM; BSA 1 mg.ml⁻¹ ; pH 5,4. Todas as bactérias foram armazenadas a -80°C em meio LB contendo glicerol 20%.

Técnicas de biologia molecular adicionais foram utilizadas de acordo com métodos padronizados (AUSUBEL, 2002) ou conforme detalhadas.

3.2 Desenho dos oligonucleotídeos

Tendo como base a sequência genômica de XAC306 depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sob o código de acesso NC_003919.1 e utilizando o software UGene – Unipro v.33 (<http://ugene.net/>), foram identificadas as duas ORFs anotadas como codificantes da enzima xilulose quinase: XAC1775 (*D-xylulokinase*) e XAC4244 (*xylulose kinase*), as quais serão nomeadas neste trabalho como *xylB1* e *xylB2*, respectivamente. Uma análise *in silico* realizada utilizando o software SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) não identificou possíveis peptídeos-sinal em nenhuma das duas ORFs.

Para a construção do plasmídeo destinado à deleção gênica foram identificadas também as regiões de 1 kb *upstream* e 1 kb *downstream* flangeadoras ao gene *xylB1* na sequência genômica no NCBI. Os oligonucleotídeos para amplificação destas regiões e dos genes *xylB1* e *xylB2* estão apresentados na Tabela 1.

Bases adicionais na extremidade 5' foram inseridas para ajuste dos fatores termodinâmicos dos oligonucleotídeos de forma a evitar formação de *hairpins*, homo e heterodímeros de hibridização oligo-oligo e para ajuste da temperatura de *melting* (TM) dos pares de oligonucleotídeos. Tais otimizações foram realizadas por meio do algoritmo OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) e os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Exxtend (Campinas -SP).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das regiões de interesse. As colunas mostram a notação, sequência, temperatura de *melting* (TM) e finalidade de cada primer. Os sítios de restrição adicionados aos oligonucleotídeos estão destacados por cor de acordo com cada enzima de restrição a ser utilizada: em vermelho para *Nde*I, em verde para *Xho*I, em azul para *Hind*III, em roxo para *Bam*HI e em amarelo para *Eco*RI.

Nome	Sequência	TM (°C)	Aplicação
pET28_XYLB1775_FW	TGACGCGCATATGAGCTTGTATGTAGGAC	58,8	Expressão de <i>xylB1</i>
pET28_XYLB1775_RV	CTTCCTCGAGTCAACCGGCGTAGAG	58,8	
pET28_XYLB4244_FW	AGCCATATGCGCACGCAAAC	57,6	Expressão de <i>xylB2</i>
pET28_XYLB4244_RV	TATATACTCGAGTCATGGGCAAACATGC	57,6	
UP_XYLB1775_FW	TATTAAAGCTTCGATCGACGGCGC	58,8	Deleção de <i>xylB1</i>
UP_XYLB1775_RV	CCGATATAGGATCCTGCGTCACCAATCGG	58,8	
DOWN_XYLB1775_FW	CACGCGTGGATCCTCGATAGTTTTTCTA	57,2	
DOWN_XYLB1775_RV	GTGGAATTCGGTTCGGTGTCCCAG	57,2	

3.3 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de XAC (linhagem 306) com o *kit PureLink™ Microbiome DNA Purification* (Invitrogen) a partir de 5 mL de cultivo das células bacterianas em meio LB líquido a 30°C e 250 rpm *overnight*. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água Mili-Q e quantificado por método de absorção de UV em comprimento de onda 280 nm em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific).

3.4 Amplificação das regiões de interesse por PCR e clonagem

As amplificações dos fragmentos de interesse foram realizadas por PCR com as seguintes condições: 50 ng de DNA genômico de XAC como molde, 12,5 pmol de oligonucleotídeo FW, 12,5 pmol de oligonucleotídeo RV, 10 µL *Taq Polimerase Master Mix 2x* (Cellco) e H₂O q.s.p. 20 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) nas condições mostradas na Tabela 2: **Programação das etapas de**

amplificação por PCR.respeitando-se a temperatura de hibridização de cada um dos pares de oligonucleotídeos, como mencionado na Tabela 1.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris 40 mM, Acetato 20 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo brometo de etídeo 1%.

Tabela 2: Programação das etapas de amplificação por PCR.

Etapa da PCR	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94 °C	4 min
Desnaturação	94 °C	30 s
Hibridização	59 – 62 °C	40 s
Extensão	72 °C	2min20s
Extensão final	72 °C	10 min

} 35 x

As bandas de amplificação foram excisadas do gel com auxílio de bisturi e os fragmentos foram purificados com *kit GeneJET Gel Extraction* (ThermoScientific), sendo suspensos em 30 µL de água Mili-Q. O DNA foi quantificado em Nanodrop 1000 (ThermoScientific).

3.5 Clonagem em vetor de propagação

A enzima *Taq* DNA Polimerase utilizada na amplificação dos insertos adiciona uma adenina terminal nas extremidades do fragmento amplificado, de modo que foi necessária realização de uma reação com *DNA blunting enzyme*, uma enzima DNA polimerase com atividade de revisão que remove as adeninas terminais em regiões 3' e preenche as regiões 5' para permitir a ligação do inserto ao vetor que possui extremidade *blunt*, o que foi realizado a 70°C durante 15 minutos. Os fragmentos purificados então foram utilizados individualmente para ligação, com T4 DNA ligase, no vetor de propagação pJET 1.2/*blunt* (ThermoScientific) em razão molar 3:1 (inserto:vetor), em reação *overnight* a 22°.

Na transformação, a um volume de 50 µL de células de *E. coli* linhagem DH5α quimiocompetentes obtidas por tratamento com cloreto de cálcio (AUSUBEL, 2002), foram adicionados 10 µL da reação de ligação, permanecendo a solução incubada por 40 minutos e seguido de um choque térmico (90 segundos a 42°C e resfriamento novamente em gelo). As

células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 mg.mL^{-1} de ampicilina para seleção de clones transformados.

Clones transformados tiveram seus plasmídeos extraídos utilizando *kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (Cellco), os quais foram duplamente digeridos com suas endonucleases específicas de acordo com os sítios de restrição incluídos por meio de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), sendo os produtos da digestão analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos utilizados na digestão foram enviados para sequenciamento por método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, USP (São Paulo, SP) que confirmou a sequência dos fragmentos clonados.

3.6 Montagem dos plasmídeos de expressão de *xytB1* e *xytB2*

3.6.1 Clonagem em vetor de expressão

Após a propagação utilizando o vetor pJET 1.2 (item 3.5), as bandas contendo as regiões codificantes dos genes *xytB1* e *xytB2* destinadas à expressão heteróloga (propriamente digeridos de acordo com a Tabela 1) foram recortadas do gel, purificadas utilizando *kit GeneJet Gel Extraction* (ThermoScientific). O DNA foi suspenso em $30 \mu\text{l}$ de H_2O Mili-Q, quantificado e clonado no vetor de expressão pET28a (ThermoScientific), por ligação em razão molar 3:1 (inserto:vetor) em reação *overnight* a 22°C . Células de *E. coli* DH5a foram transformadas também por choque térmico como descrito anteriormente e plaqueadas em meio LB sólido contendo 30 mg.ml^{-1} de canamicina para seleção de clones transformantes.

Os clones positivos, contendo plasmídeos cuja digestão com endonucleases apropriadas resultou em fragmentos de tamanho esperado, foram cultivados em meio LB líquido contendo 30 mg.mL^{-1} de canamicina, e os plasmídeos foram purificados com *kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (Cellco) e quantificados para transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3).

3.6.2 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade

Com o vetor de expressão confirmado, células *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) foram transformadas e plaqueadas em ágar-LB contendo canamicina $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Transformantes foram inoculados em 100 mL de caldo LB contendo a mesma concentração de canamicina, e ao alcançarem a fase *mid-log* de crescimento bacteriano (D.O._{595nm} de 0,5), a indução da

expressão foi realizada pela adição de IPTG 0,1 mM. Após incubação do cultivo *overnight* a 18°C, 250 rpm, as células foram recuperadas por centrifugação 10000 x g por 20 minutos a 4°C, ressuspendidas em 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM e lisadas por 6 pulsos de ultrassom em equipamento Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific), sob banho de gelo. Após a lise, uma nova centrifugação a 4°C, 10.000 x g por 30 minutos separou as frações insolúvel e solúvel do lisado celular.

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). A fração solúvel do lisado foi aplicada em uma coluna de níquel imobilizado Ni-NTA (Novagen) na qual a proteína recombinante permaneceu adsorvida pela cauda de histidinas N-terminal que a expressão gênica utilizando o plasmídeo pET28a possibilita. A eluição da proteína foi analisada aplicando-se um gradiente de concentrações crescente de imidazol (de 5 mM a 500 mM). A coluna então foi lavada com imidazol 2 M. Para as análises de expressão, solubilidade e purificação, alíquotas de todas as etapas do processo (incluindo as frações solúvel e insolúvel) foram submetidas a análises de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970)

Para a obtenção da enzima recombinante a ser utilizada nos demais experimentos, a expressão foi realizada novamente em volume de 250 mL de caldo LB com canamicina 40 µg.mL⁻¹, seguida da etapa de purificação. A concentração final de enzima recombinante obtida foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). As proteínas recombinantes codificadas por *xylB1* e *xylB2* serão chamadas nesse trabalho como XK-1 e XK-2, respectivamente.

3.7 Método de avaliação da atividade de XK

A enzima xilulose quinase catalisa a fosforilação da xilulose para xilulose-5-fosfato, o que permite que tal açúcar seja degradado pela via das pentoses-fosfato. Devido à sua natureza, um método amplamente utilizado para avaliação da atividade enzimática é de uma reação de acoplamento com outras duas enzimas, a piruvato quinase (PK) e a lactado desidrogenase (LDH) (SHAMANNAT; SANDERSON, 1979).

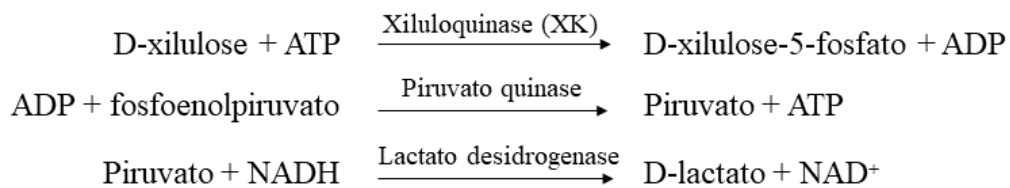


Figura 10: Reação de acoplamento para detecção da atividade de xilulose quinase. Pelo acoplamento das reações catalisadas pelas enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase é possível determinar a atividade de XK acompanhando a oxidação do NADH por espectrofotometria. Fonte: Shamannat & Sanderson (1979), adaptada.

Esse acoplamento utiliza o ADP resultante da fosforilação da xilulose para transformar o fosfoenolpiruvato em piruvato pela PK. A enzima LDH então converte o piruvato à lactato utilizando NADH como coenzima. A atividade de XK é medida acompanhando a oxidação do NADH à NAD^+ , observando o decaimento na absorvância em comprimento de onda de 340 nm.

Para todos os testes enzimáticos foi utilizado o protocolo utilizado por Groisillier e colaboradores (2015) adaptado para a XK, com modificações descritas a seguir. A reação foi composta de 10 mM de xilulose, 100 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM de ATP, 100 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl_2 , 1 mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 0,5 mM NADH recém preparado, 0,2 μL de PK, 0,2 μL de LDH, e 1 μL da enzima XK recombinante purificada em concentrações de 1 a 7,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, em um volume final de 100 μL (com H_2O MiliQ estéril), em placa de 96 poços. As reações foram monitoradas por 20 minutos a partir da adição de ATP, a 25 °C, e as absorvâncias inicial e final em comprimento de onda 340 nm foram obtidas em equipamento MultiSkán GO (ThermoScientific), configurado com auxílio do *software* SkánIt RE v. 4.1. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.7.1 Confirmação da eficiência do acoplamento

As enzimas PK e LDH do acoplamento foram testadas quanto ao seu funcionamento, de forma independente da XK. Para isso, a primeira reação de fosforilação da xilulose pela XK mostrada na Figura 10 foi eliminada e ADP, produto da referida reação, foi adicionado (1 μL na concentração de 1 mM) ao *mix* de reação descrito anteriormente. Para o controle negativo (branco) foi substituído o volume de ADP por água MiliQ estéril, e os testes foram realizados em triplicata. A reação foi realizada por 10 minutos a 25°C, com leitura e anotação da absorvância a 340 nm a cada 60 segundos. As curvas então foram plotadas com auxílio do *software* GraphPad Prism v. 8.

3.7.2 Teste de atividade de XK

Após a confirmação do funcionamento da reação de acoplamento, foram realizados os testes enzimáticos de acordo com o protocolo citado acima, com quatro concentrações de XK: 1 mg.mL⁻¹, 3 mg.mL⁻¹, 5 mg.mL⁻¹ e 7,5 mg.mL⁻¹. Dois controles negativos também foram adicionados, um sem a enzima recombinante e um sem a xilulose. Todos os testes foram realizados por 20 minutos a 25°C, com leitura e anotação das absorbâncias em 340 nm a cada 40 segundos. As curvas então foram plotadas com auxílio do *software* GraphPad Prism v.8.

3.7.3 Cinética enzimática

Para caracterizar a atividade da enzima XK, a cinética enzimática foi analisada pela medida das velocidades iniciais das reações (V_0) com a variação na concentração de xilulose. De acordo com os testes realizados na etapa anterior, a primeira concentração de enzima utilizada foi de 5 mg/mL, porém não houve reprodutibilidade entre as triplicatas (resultados não mostrados), sendo então os mesmos testes realizados com menor concentração de enzima (3 mg/mL).

Devido à taxa de decaimento do NADH ser diretamente proporcional à formação de piruvato, ela é igualmente proporcional à atividade de XK (Figura 10). Para o cálculo da taxa de consumo de NADH, utilizou-se a seguinte fórmula (GROISILLIER; TONON, 2015) :

$$\text{Taxa de consumo de NADH} = \frac{(\Delta A_{340\text{nm}} \text{ teste} - \Delta A_{340\text{nm}} \text{ branco})}{t \times 6220 \times 0,3 \times 0,0001}$$

Onde:

$\Delta A_{340\text{nm}}$ = variação da absorbância;

t = tempo de duração da reação (min)

6220 = coeficiente de extinção para o NADH (L.mol⁻¹.cm⁻¹)

0,3 = caminho óptico (cm)

0,0001 = volume da reação (L)

Para esse ensaio foram definidas várias concentrações de xilulose, variando de 0,1 a 30 mM, e para cada uma dessas concentrações foram calculados os valores de V_0 utilizando intervalo de tempo inicial mínimo (nas faixas lineares de absorbância para cada concentração de xilulose), sendo o tempo de 2 minutos para 0,1 e 0,5 mM de xilulose e 4 minutos para 2, 10, 20 e 30 mM de xilulose. Os cálculos são mostrados no anexo VII. Com auxílio do *software* GraphPad Prism v. 8, os dados foram modelados de acordo com a equação de Michaelis-Menten, permitindo o cálculo dos valores de K_m e $V_{máx}$ para a XK (MICHAELIS; MENTEN, 1913)

3.8 Pull-Down com XK recombinante

Com a finalidade de encontrar possíveis proteínas parceiras à XK, realizou-se um ensaio de *Pull-Down* pela adsorção da proteína recombinante em coluna de níquel imobilizado e passagem de lisado celular de XAC360 para fins de avaliação de interações proteína-proteína.

Para obtenção do lisado celular a linhagem de XAC selvagem foi cultivada em 100 mL de meio indutor de patogenicidade XAM-M (ARTIER et al., 2018) até atingir D.O._{590nm} de 0,6. O cultivo foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de tampão Tris-NaCl 50 mM pH 8,0 e as células foram lisadas com 5 pulsos de ultrassom (30 s pulse *on* e 60 s pulse *off*) em equipamento Sonic Desmembrator 500 (Fisher Scientific). A suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos, a fração solúvel foi recolhida em um novo tubo e o *pellet* restante foi descartado. Paralelamente à preparação da amostra, a coluna de níquel Ni-NTA (Novagen) foi equilibrada com o mesmo tampão utilizado na suspensão das células.

Foram adicionados à coluna 330 µg da XK recombinante de XAC, contida em 3 mL de tampão Tris-NaCl 50mM pH 8,0, permanecendo incubada por uma hora à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 10 mL do mesmo tampão já citado, e depois novamente lavada com 5 mL de tampão contendo imidazol 10 mM por duas vezes. A fração solúvel do lisado foi então adicionada à coluna, permanecendo em contato por mais 1 hora a temperatura ambiente. Após a passagem do lisado pela coluna, a mesma foi lavada três vezes com 5 mL de tampão contendo imidazol 10 mM e eluída com 5 mL de tampão contendo imidazol 300 mM, lavada novamente com tampão contendo imidazol 10 mM e posteriormente eluída com 2 mL de imidazol 2 M.

Para controle, os mesmos procedimentos citados acima foram realizados sem a adição da proteína recombinante à coluna de níquel. Ao final, alíquotas de cada uma das etapas após percolação pela coluna foram analisadas por SDS-PAGE 12%. Os géis obtidos foram corados com *Silver Blue* e documentados em equipamento *ChemiDoc MP Imaging System* (BioRad).

3.9 Deleção gênica

Para a deleção gênica, resumidamente, utilizou-se o vetor pNPTS138, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira (UNESP/Rio Claro), sendo que os dois fragmentos de 1 kb correspondentes às regiões *upstream* e *downstream* ao gene *xylB1* a ser deletado foram clonados *in tandem* no vetor (Figura 11).

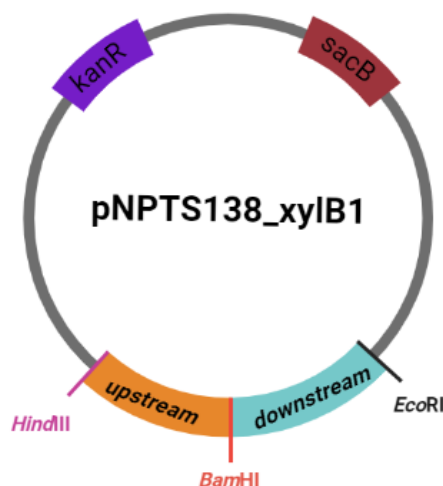


Figura 11: Modelo simplificado do plasmídeo de deleção pNPTS138_xylB1. O esquema indica os fragmentos de 1 kb flanqueadores ao gene *xylB1* no genoma da XAC 306 (*upstream* e *downstream*) clonados *in tandem*, com os sítios de restrição para as endonucleases *HindIII*, *BamHI* e *EcoRI*. São indicados também o gene que confere resistência à canamicina (*kanR*) e o gene *sacB* que codifica a levansucrase, uma enzima que converte sacarose em um composto tóxico para as células. Fonte: Próprio autor.

O processo de deleção gênica ocorre em duas etapas distintas. A primeira etapa é o primeiro evento de recombinação entre uma das regiões flanqueadoras clonadas no plasmídeo e a respectiva região no DNA genômico bacteriano. Esse evento permite que o plasmídeo seja incorporado ao genoma bacteriano e a bactéria assim obtida seja selecionada em meio contendo canamicina.

A etapa seguinte consiste no segundo evento de recombinação entre o outro fragmento flanqueador ao gene-alvo e a região correspondente no genoma, o que resulta na remoção do vetor do DNA cromossômico, juntamente com o gene alvo. Como o vetor em

questão é suicida, ele é perdido durante sucessivas replicações da célula e com ele também a característica de resistência à canamicina.

Em ambas as etapas, os genes de seleção garantem que os processos estão ocorrendo de acordo com o modo esperado. Além do gene de resistência à canamicina, o plasmídeo pNPTS138 possui uma cópia do gene que codifica para a enzima levansucrase (*SacB* de *Bacillus subtilis*), que converte a sacarose em um composto tóxico para a célula bacteriana (BRAMUCCI; NAGARAJAN, 1996). Assim, células que passaram pelas duas etapas da deleção serão capazes de crescer em meio contendo sacarose, ao contrário da célula que possui o vetor incorporado no genoma.

A seguir são detalhadas cada uma das etapas de deleção gênica.

3.9.1 Montagem do plasmídeo de deleção

3.9.1.1 Clonagem das regiões flanqueadoras de *xylBI* em vetor de deleção pNPTS138

As linhagens de *E. coli* DH5 α transformadas com os plasmídeos pJET 1.2 contendo os fragmentos flanqueadores ao gene *xylBI* foram cultivadas em caldo LB para purificação dos plasmídeos. Tais plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI (fragmento *upstream*) e *Bam*HI e *Eco*RI (fragmento *downstream*), e os fragmentos foram purificados em gel de agarose 1%. Paralelamente, o plasmídeo pNPTS138 íntegro foi digerido com *Hind*III e *Bam*HI, e também purificado em gel de agarose 1%.

Em seguida, o fragmento *upstream* foi utilizado em reação contendo T4 DNA ligase e o plasmídeo pNPTS138 previamente digerido, com razão molar 3:1 (inserto:vetor). A ligação foi utilizada na transformação da linhagem *E.coli* DH5 α do mesmo modo que foi descrito previamente, seguido de plaqueamento em LB-ágar contendo canamicina 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Clones resistentes à canamicina tiveram seu DNA plasmidial extraído e submetido à digestão com as endonucleases *Hind*III e *Bam*HI e analisados em gel de TAE agarose 1% para confirmação da presença do fragmento.

Após a confirmação e para a inserção do fragmento flanqueador *downstream*, os mesmos procedimentos supracitados foram novamente realizados utilizando o vetor contendo o fragmento *upstream*, substituindo a enzima *Hind*III por *Eco*RI.

Ao final, o plasmídeo pNPTS138_*xylBI*, obtido de *E. coli* resistente à canamicina, foi submetido a digestões com as endonucleases *Hind*III, *Bam*HI e *Eco*RI para a confirmação da clonagem dos dois fragmentos no vetor.

3.9.1.1 Preparação de células de XAC eletrocompetentes

Células de XAC306 foram cultivadas em 100 mL de caldo LB, a 250 rpm e 30°C até atingirem D.O._{595nm} de 0,6. Após isso, as células foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 x g e 4°C e lavadas três vezes com água estéril gelada. As células foram então concentradas 50 vezes, aliquotadas e armazenadas a -80°C.

3.6.1.2 Transformação de XAC com plasmídeo de deleção

Células eletrocompetentes de XAC foram transformadas com o plasmídeo de deleção pNPTS138_xylB1 por eletroporação. Cubetas de 0,2 cm contendo 50 µL de um *mix* de XAC e o plasmídeo de deleção foram colocadas em um eletroporador *Gene Pulser II Electroporator* (BioRad) (Laboratório de Biologia Molecular, Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva- UFSCar), e a eletroporação foi realizada sob as seguintes condições: 2,5 kV, 50 Ω e 50 uF.

Após o pulso elétrico, 1 mL de caldo LB isento de antibióticos foi adicionado à mistura e o cultivo foi incubado por 1 hora sob agitação de 250 rpm. Em seguida, o cultivo foi plaqueado em LB-ágar contendo canamicina 40 µg.mL⁻¹.

3.9.1.3 Seleção de mutantes deletados

Para as etapas de seleção dos possíveis mutantes, foram utilizados seis meios distintos, os quais estão descritos abaixo. As etapas realizadas estão simplificadas na Figura 9.

Meio A: Ágar-LB contendo canamicina.

Meio B: Caldo LB contendo canamicina e sacarose 10%.

Meio C: Caldo LB contendo sacarose 10%.

Meio D: Caldo LB

Meio E: Ágar-LB

Meio F: Caldo LB contendo canamicina.

As colônias de XAC transformantes resistentes à canamicina foram repicadas em Meio B e Meio C para a confirmação da presença do plasmídeo no DNA bacteriano, o qual impede crescimento na presença de sacarose, o que se confirmou pela ausência de crescimento nesses meios. Colônias que não apresentaram crescimento em nenhum desses dois meios foram então repicadas em meio D (Caldo-LB), onde permaneceram em crescimento por 24 horas sob agitação de 250 rpm, a 30°C para possibilitar o segundo evento de recombinação e excisão do plasmídeo com o gene-alvo. Após o crescimento as células foram plaqueadas no Meio E. Para auxiliar no *screening* de possíveis mutantes deletados, as células isoladas em meio E foram

repicadas em meio C e permaneceram em crescimento por 24 horas sob agitação de 250 rpm, a 30°C. As células então foram estriadas em meio E novamente para isolamento.

Após o crescimento, as colônias foram repicadas em meio C, onde permaneceram em crescimento por 18 horas, à 30°C e sob agitação de 250 rpm. As células foram plaqueadas em meio E. As colônias resultantes foram então testadas para o fenótipo pós segundo evento de recombinação, onde foram repicadas independentemente nos meios B, C e F. Todo o procedimento descrito está representado na Figura 12.

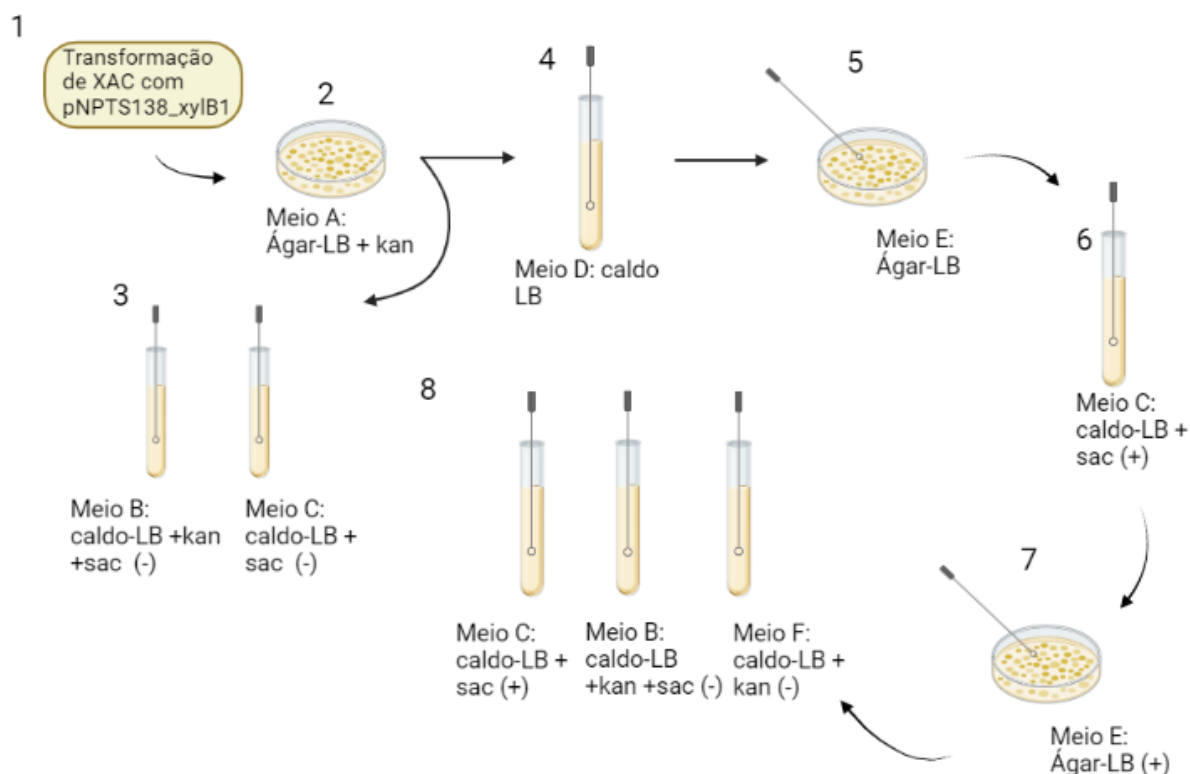


Figura 12: Esquema do sistema de *screening* de possíveis mutantes. Foram utilizados seis meios diferentes para facilitar o *screening* de linhagens mutantes deletadas. **1-2** | Células de XAC eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com plasmídeo de deleção e plaqueadas em meio contendo canamicina (Meio A). **3** | Colônias transformantes foram repicadas em meio contendo canamicina e sacarose (Meio B) e meio contendo somente sacarose (Meio C). **4-5** | Colônias que não tiveram crescimento na etapa 3 foram repicadas em caldo LB (Meio D) e estriadas em ágar-LB (Meio E) para isolamento. **6-7** | Colônias isoladas foram repicadas em Meio C para facilitar a identificação de possíveis mutantes deletados, seguido de plaqueamento em Meio E. **8** | Colônias isoladas foram cultivadas em meios C, B e F, para a seleção de possíveis mutantes deletados. As etapas 3, 6 e 8 mostram entre parênteses meios onde o crescimento é esperado (+) ou não (-). Fonte: (ALEXANDRINO et al., 2016), com modificações.

Células que apresentaram crescimento em meio C e não apresentaram crescimento em B e F foram consideradas possíveis mutantes e sua confirmação foi realizada utilizando-se técnica de PCR de colônia.

3.9.1.4 Confirmação da deleção do gene *xylBI*

Para a confirmação da deleção do gene-alvo, oligonucleotídeos que hibridizam no genoma aproximadamente 100 pb adjacentes às regiões flanqueadoras de 1 kb do gene *xylBI* foram desenhados para a confirmação da deleção por PCR (Tabela 3). Os produtos de amplificação utilizando tais oligonucleotídeos são capazes de diferenciar linhagens selvagens de mutantes de deleção de *xylBI*, a partir do tamanho do *amplicon* obtido.

Tabela 3: Oligonucleotídeos desenhados para a confirmação da deleção do gene *xylBI*. A tabela mostra as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR para o *screening* de possíveis linhagens mutantes. São mostradas também as temperaturas de *melting* (TM).

Nome	Seqüência	TM
KO_XYLB1775_FW	GGGTGGTGCACAACAATA	54°C
KO_XYLB1775_RV	CAGCACCACCAGCATG	54°C

Possíveis colônias mutantes foram isoladas e ressuspensas em 50 µL em tampão de lise (Tris 10 mM, EDTA 2 mM e 0,1% Triton X-100, pH 8.0) e fervidas durante 15 minutos. Após isso, as suspensões foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado como molde em reação de PCR, realizada em termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) com a seguinte programação:

Tabela 4: Descrição das etapas do ciclo de PCR realizados na confirmação da deleção gênica

Etapa da PCR	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94 °C	10 min
Desnaturação	94 °C	30 s
Hibridização	54 °C	40 s
Extensão	72 °C	5 min
Extensão final	72 °C	10 min

} 45 x

Para o isolamento dos possíveis mutantes, as células foram estriadas e as colônias individuais foram testadas novamente para a confirmação da deleção conforme descrito neste item.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão heteróloga e purificação de XK recombinante

4.1.1 Construção dos plasmídeos de expressão

Os oligonucleotídeos desenhados para a amplificação por PCR das regiões codificantes dos genes *xylB1* e *xylB2* funcionaram de modo satisfatório (Figura 13A). Após a purificação, os fragmentos foram clonados em plasmídeo de propagação pJET 1.2/blunt, transformados em *E. coli* DH5 α , e após purificação os plasmídeos foram submetidos à análise de restrição e confirmados por sequenciamento (Figura 13B).

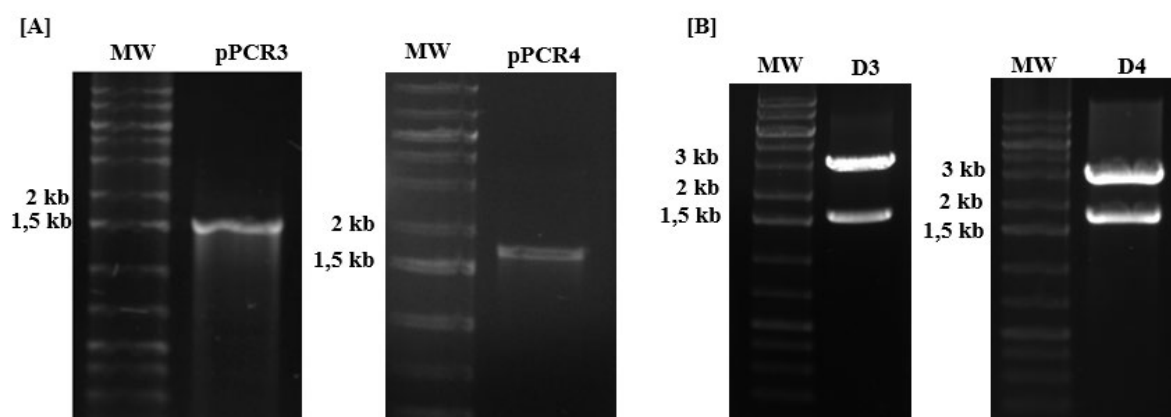


Figura 13: Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação [A] e clonagem em vetor de propagação [B] das ORFs XAC1775 e XAC4244. MW | Padrão molecular *1kb Plus DNA Ladder* (Cellco); pPCR3 | Amplificação do gene XAC1775; pPCR4 | Amplificação do gene XAC4244; D3 e D4 | Digestão do vetor de propagação pJET 1.2 contendo fragmento XAC1775 e XAC4244, respectivamente, com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Bandas importantes do marcador molecular estão mostradas.

Os insertos foram então excisados e clonados em vetor de expressão pET28a. A reação de ligação foi transformada em *E. coli* DH5 α e os clones positivos foram submetidos à confirmação da montagem dos vetores por análise de restrição com os plasmídeos extraídos (Figura 14). Os vetores de expressão foram denominados como pET28a_xylB1 e pET28a_xylB2.

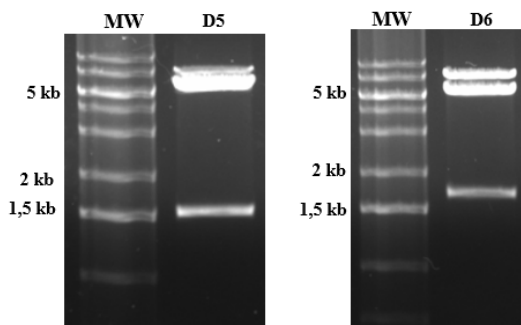


Figura 14: Análise por eletroforese em gel de agarose da restrição dos vetores de expressão pET28a após transformação em linhagem *E. coli* DH5 α e digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. MW | Padrão de tamanho molecular *1kb Plus DNA Ladder* (Cellco); D5 | vetor no qual foi clonado o fragmento XAC1775; D6 | vetor no qual foi clonado o fragmento XAC4244.

4.1.2 Análise da expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade

Os vetores de expressão após a sua confirmação foram transformados em linhagem *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) e o plaqueamento foi realizado em LB-ágar contendo canamicina. Colônias positivas foram coletadas e testadas em ensaios de expressão heteróloga com indução por IPTG, sendo recolhidas alíquotas durante todas as etapas da purificação, incluindo as frações solúveis e insolúveis, seguida de análise por SDS-PAGE (Figura 15 e Figura 16).

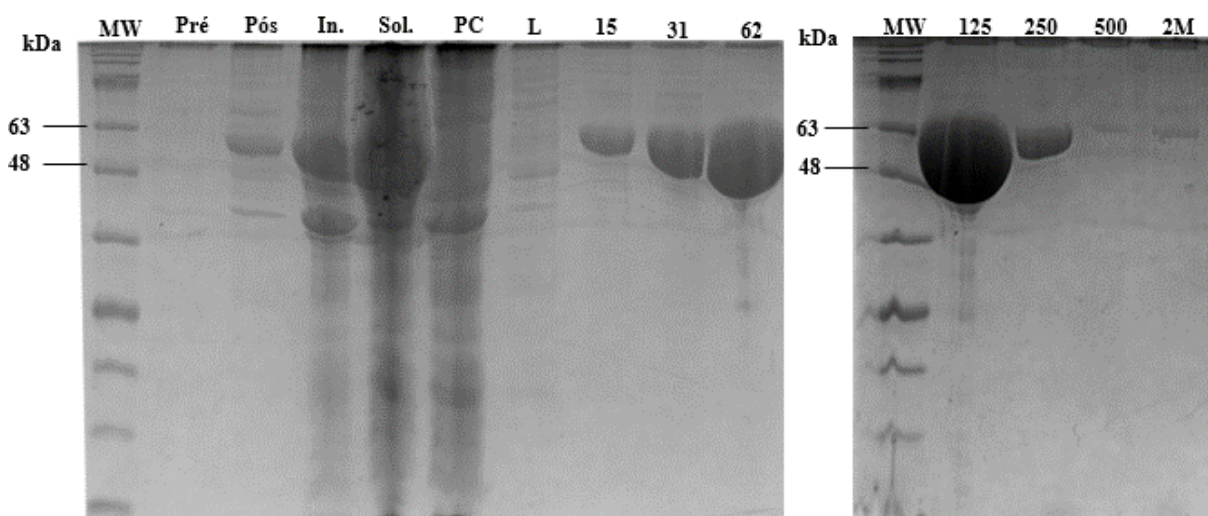


Figura 15: Análise da expressão, solubilidade e purificação de XK-1 em SDS-PAGE. Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a_ *xylBI* foram induzidas e testadas quanto à expressão, solubilidade e purificação da enzima recombinante em coluna de níquel. MW | Padrão de massa molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco). Pré | Células de *E. coli* pré-indução por IPTG. Pós | Células de *E. coli* pós-indução por IPTG. I | Fração insolúvel do lisado celular. S | Fração solúvel do lisado celular. PC | Pós-coluna da fração solúvel do lisado. L | Lavagem da coluna de níquel com tampão. Um gradiente de imidazol de 15 a 500 mM foi aplicado à coluna de níquel para avaliar a eluição em relação à concentração de imidazol. A coluna então foi lavada com uma concentração de imidazol de 2 M. É possível visualizar uma banda de superexpressão com massa molecular entre 48 e 63 kDa, compatível com o esperado de 55 kDa.

O gene *xylBI* prevê uma proteína com 497 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 53 kDa. Somando-se aos 2 kDa referentes à cauda de histidina inserida na porção *N*-terminal da proteína pelo plasmídeo de expressão, a massa molecular final é de aproximadamente 55 kDa. Assim, o tamanho predito é compatível com o observado, além de um rendimento da proteína recombinante na forma solúvel na ordem de 0,15 mg por mL de meio de cultura.

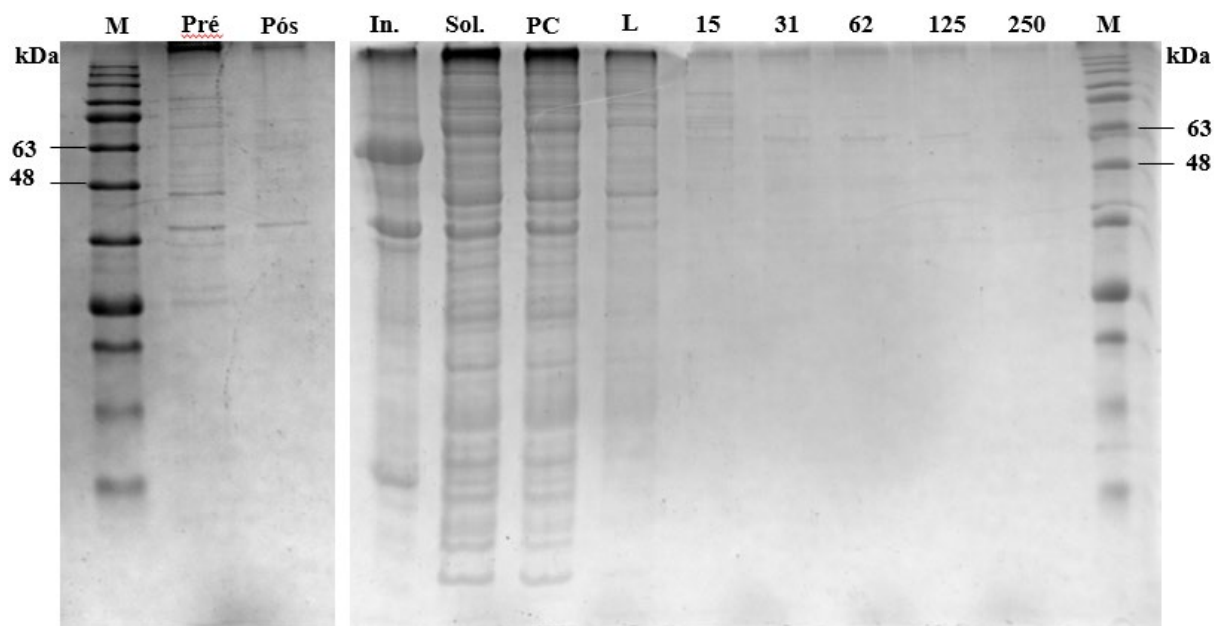


Figura 16: Análise da expressão, solubilidade e purificação de XK-2 por SDS-PAGE. Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a_xylB2 foram induzidas e testadas para a expressão, solubilidade de purificação da enzima recombinante em coluna de níquel. **MW** | Padrão molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco). **Pré** | Células de *E. coli* pré indução por IPTG. **Pós** | Células de *E. coli* pós indução por IPTG. **I** | Fração insolúvel do lisado celular. **S** | Fração solúvel do lisado celular. **PC** | Pós coluna da fração solúvel do lisado. **L** | Lavagem da coluna de níquel com tampão. Um gradiente de imidazol de 15 a 250 mM foi aplicado à coluna de níquel para avaliar a eluição em relação à concentração de imidazol. A coluna então foi lavada com uma concentração de imidazol de 2 M.

O gene *xylB2* codifica uma proteína de 532 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 60 kDa de massa molecular. Somando-se os 2 kDa da cauda de histidina *N*-terminal o tamanho final esperado é de aproximadamente 62 kDa. Esta banda pode ser observada na fração insolúvel do lisado celular (Figura 16), indicando que a proteína obtida é, na sua maior parte, insolúvel. Devido a isso, os estudos de atividade enzimática e análise funcional seguiram somente com XK-1.

4.2 Análise da atividade de XK-1

4.2.1 Confirmação da atividade de PK e LDH para avaliação da atividade de XK-1

Para garantir que as demais enzimas do acoplamento estavam funcionais, foi realizado um teste prévio sem a enzima XK, com as enzimas PK e LDH, fornecendo ADP como substrato, o qual é um dos produtos da XK. O resultado do teste durante 10 minutos de reação é mostrado na Figura 17.

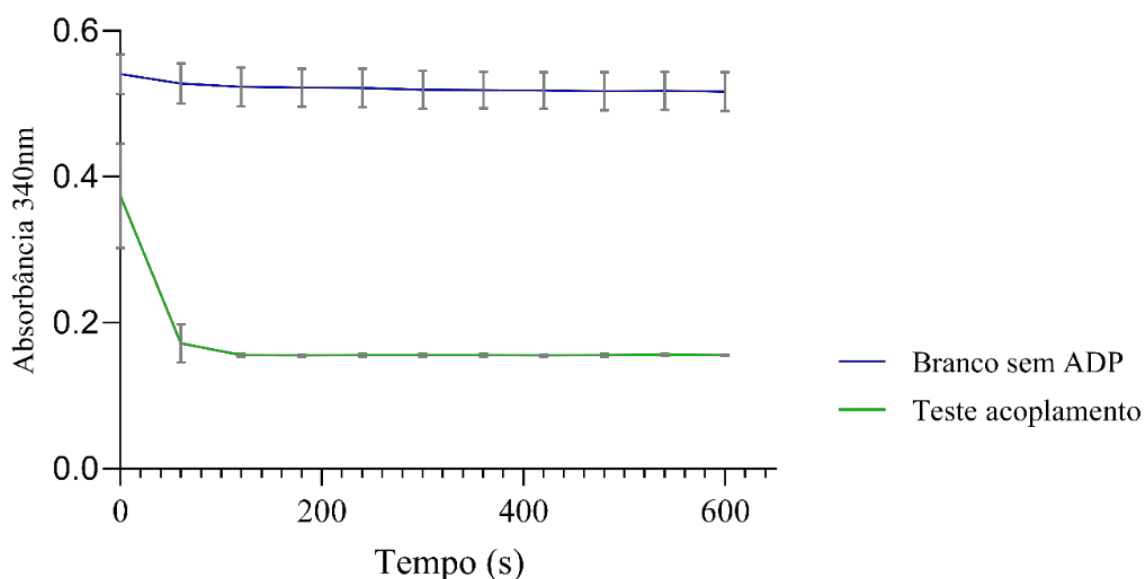


Figura 17: Teste da funcionalidade do acoplamento enzimático. As enzimas PK e LDH tiveram sua funcionalidade no acoplamento avaliada para garantir o teste da atividade de XK. Utilizando o ADP, a PK converte o fosfoenolpiruvato em piruvato e a LDH então converte o piruvato à lactato utilizando o NADH como coenzima. A curva foi obtida fazendo a medida da oxidação do NADH à NAD^+ pela leitura da absorbância a 340 nm por 10 minutos. Ao branco não foi fornecido o substrato inicial ADP. Os testes foram realizados em triplicata e as barras de erro estão representadas.

Foi possível observar que o acoplamento enzimático foi bem sucedido, com a reação atingindo o equilíbrio rapidamente. Com esse resultado foi possível garantir que quaisquer problemas obtidos durante o teste com XK não estariam relacionados com as enzimas que realizam as reações de acoplamento.

4.2.2 Teste enzimático com XK recombinante

A enzima recombinante XK teve sua atividade testada utilizando o acoplamento com as enzimas PK e LDH (Figura 10). Após a confirmação do funcionamento da reação de acoplamento demonstrado no item anterior, cinco concentrações de XK foram utilizadas nas reações enzimáticas: 1 mg.mL^{-1} , 3 mg.mL^{-1} , 5 mg.mL^{-1} e $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Dois brancos foram adicionados ao teste, um sem o substrato xilulose e outro sem a enzima recombinante XK. A atividade foi acompanhada pela oxidação do NADH à NAD^+ , cuja absorbância foi lida a 340 nm. Os resultados dos 20 minutos de atividade estão apresentados na Figura 18.

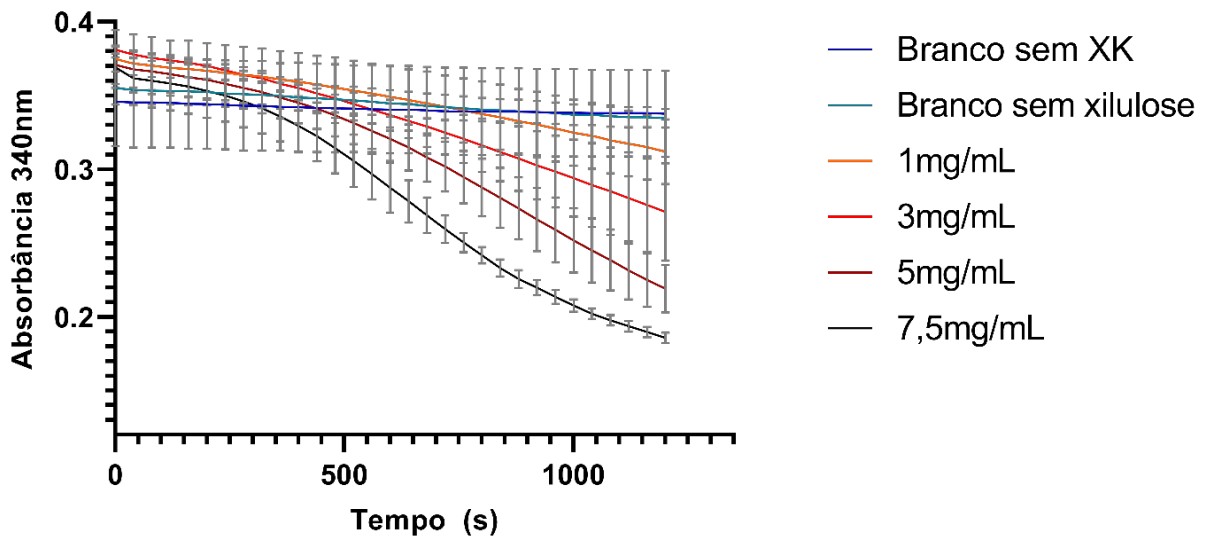


Figura 18: Teste enzimático utilizando diferentes concentrações de XK. Os ensaios foram realizados com a concentração de 10 mM de xilulose. Cinco concentrações distintas de enzima recombinante foram testadas e as linhas são representadas em cores distintas para cada concentração de acordo com a legenda no canto direito do gráfico: 1 mg.mL⁻¹ (laranja), 3 mg.mL⁻¹ (vermelho), 5 mg.mL⁻¹ (vinho) e 7,5 mg.mL⁻¹ (preto). Dois brancos foram utilizados, sem enzima recombinante (azul escuro) e sem o carboidrato (azul claro). Todos os testes foram realizados em triplicata. As figuras completas isoladas podem ser encontradas no Anexo IV.

Realizando-se o teste enzimático com valores distintos de concentração de enzima recombinante foi possível, além de detectar atividade, analisar a relação do aumento da concentração da enzima com a melhor eficiência enzimática medida pelo aumento na velocidade de consumo de NADH. A partir destes resultados, a concentração de 5 mg.mL⁻¹ foi inicialmente escolhida como a concentração a ser utilizada nos testes para a determinação dos padrões cinéticos de XK. De acordo com os resultados obtidos, o mesmo ensaio foi repetido com concentração menor de 3 mg.mL⁻¹.

4.2.3 Cinética enzimática de XK

Estudos de cinética permitem avaliar o comportamento de uma reação enzimática de acordo com o substrato que é fornecido a uma enzima, bem como o impacto da concentração de substrato na velocidade de uma reação. Como as reações catalisadas por enzimas tendem a alcançar um equilíbrio, a melhor forma de analisar a cinética é analisar a velocidade da reação na sua velocidade inicial (V_0) (STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2014).

Ao se representar graficamente V_0 com diferentes concentrações de substrato, pode-se observar um aumento linear da velocidade nas menores concentrações que tende a se equilibrar com o aumento na concentração do substrato. Essa velocidade no equilíbrio é um parâmetro

virtual, que demonstra a maior velocidade alcançada pela enzima ($V_{\text{máx}}$) e representa a velocidade na qual todas as enzimas presentes na reação estão complexadas ao substrato. A constante de Michaelis (K_m) de uma enzima se refere à concentração de substrato onde a V_0 é a metade de $V_{\text{máx}}$. O cálculo destes parâmetros enzimáticos, principalmente o de K_m , permite a caracterização em função da eficiência catalítica em relação a um determinado substrato (NELSON; COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]}$$

Figura 19: Equação de Michaelis-Menten. A equação define a relação quantitativa entre a velocidade inicial (V_0), a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), a concentração de substrato $[S]$ e a constante de Michaelis (K_m).

De acordo com a metodologia descrita e baseando-se na equação de Michaelis-Menten, as velocidades iniciais (V_0) das reações catalisadas pela XK recombinante com oito diferentes concentrações de substratos foram calculadas. Em seguida, os valores foram inseridos em um gráfico com os valores de V_0 e as respectivas concentrações de substrato (xilulose). A curva resultante é demonstrada na Figura 20.

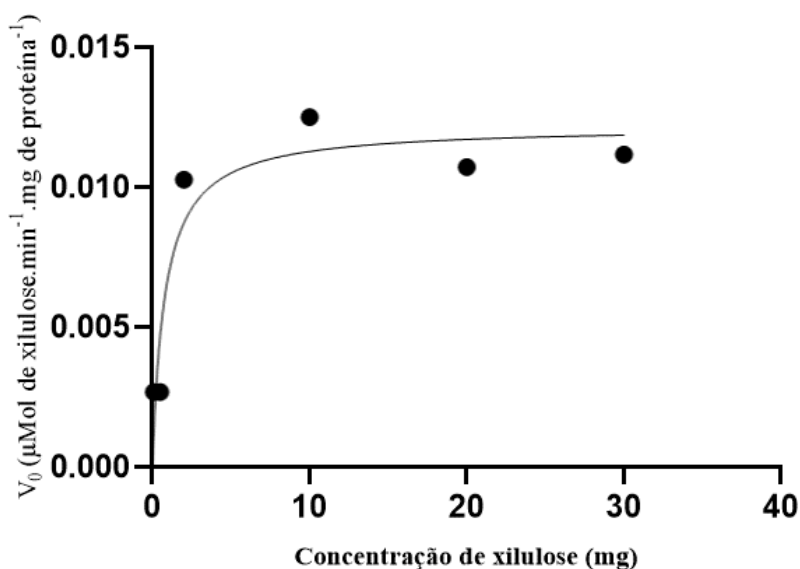


Figura 20: Cinética enzimática da xiluloquinase de XAC. Foram realizadas reações enzimáticas com seis concentrações de xilulose conforme metodologia descrita no item 3.8.3, onde cada uma das concentrações teve o valor da velocidade inicial calculada e registrados no gráfico em função da concentração de substrato (0,1, 0,5, 2, 10, 20 e 30 mM). Baseado na equação de Michaelis-Menten, foram calculados os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$.

O valor da constante de Michaelis (K_m) calculado foi de $0,7947 \pm 0,4032$ mM e a $V_{\text{máx}}$ $0,01217 \pm 0,001130$ $\mu\text{Mol de xilulose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. A ausência de estudos cinéticos sobre a XK em espécies de *Xanthomonas* não permite uma comparação direta dos parâmetros

desta enzima, porém o valor de K_m obtido está dentro da faixa de valores da literatura variam entre 0,024 mM para XK humana (BUNKER et al., 2013), passando por 0,29 mM em linhagem de *E. coli* K12 (DI LUCCIO et al., 2007) e alcançando o valor máximo de 1,24 mM em *Termatoga maritima* (MARTÍN DEL CAMPO et al., 2013), não sendo nenhum desses valores correspondentes à fitopatógenos.

O valor de K_m pode ser utilizado para indicar a afinidade de uma enzima por um determinado substrato. Porém, para que isso seja possível, o K_m deve representar a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, onde a velocidade de formação do produto e liberação da enzima (k_2) deve ser muito menor que a velocidade de dissociação do complexo ES liberando o substrato e a enzima (k_{-1}) (Figura 21).

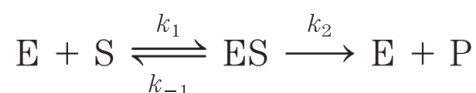


Figura 21: Esquema de catálise enzimática. As etapas da catálise de um substrato S em produto P, catalisado por uma enzima E.

Quando essa condição é satisfeita, o K_m se torna uma medida de força do complexo ES, de modo que um valor maior de K_m indica uma pequena afinidade ao substrato enquanto um valor menor de K_m uma pequena afinidade (NELSON; COX, 2014).

4.3 Predição de possíveis proteínas parceiras de XK *in vitro*

A técnica de *Pull Down* foi realizada imobilizando-se a XK-1 recombinante como isca, e percolando a fração solúvel do lisado celular de XAC. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 22.

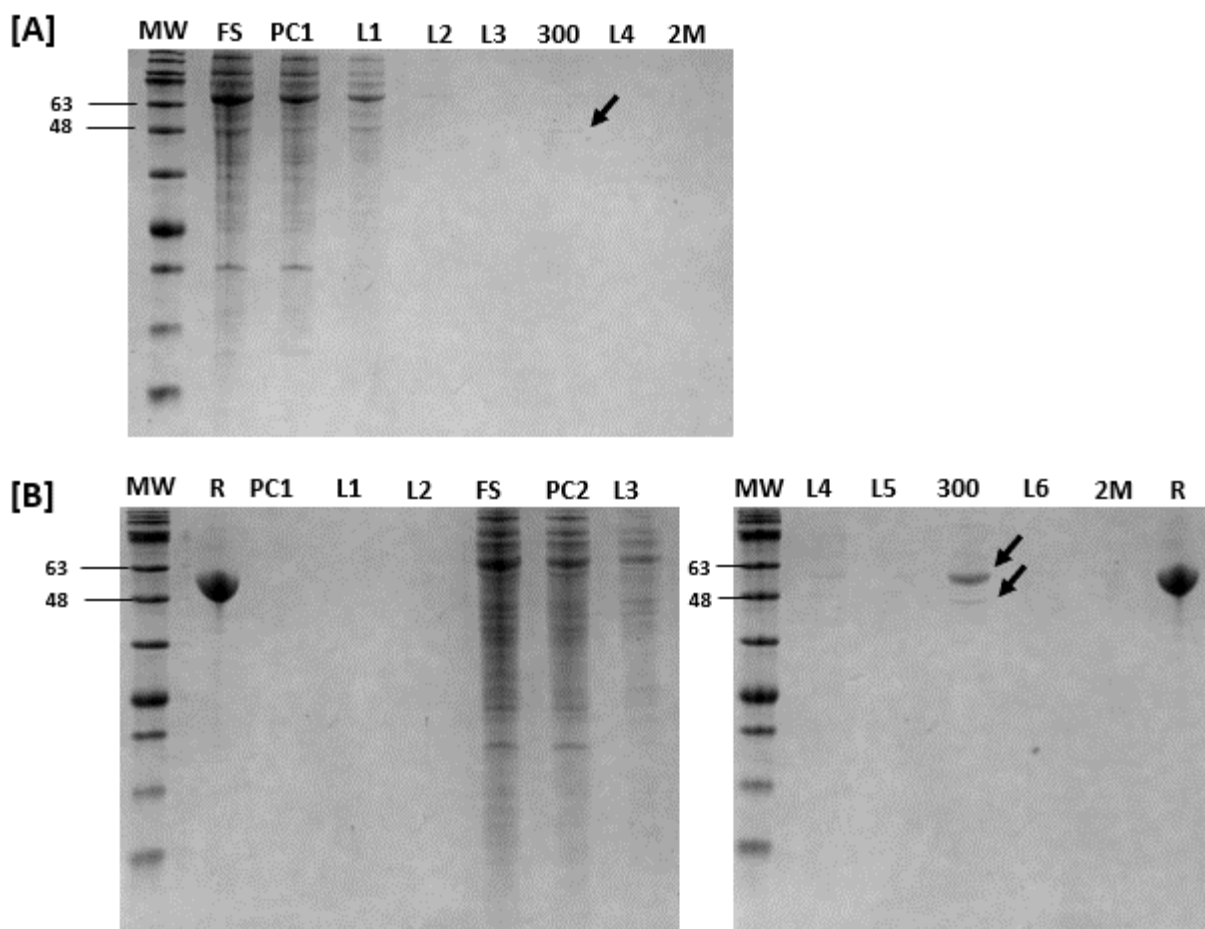


Figura 22: SDS-PAGE de amostras obtidas a partir da metodologia de *Pull-Down* com a proteína XK recombinante e o lisado celular de XAC selvagem. São apresentadas duas réplicas independentes da metodologia completa sem a presença da proteína recombinante [A] e na presença da proteína recombinante [B]. **MW** | Padrão molecular *BluEye Prestained Protein Marker* (Cellco); **R** | XK recombinante (controle); **PC1** | Pós coluna da enzima recombinante; **L1 e L2** | Lavagens com tampão contendo imidazol 10 mM; **FS** | Fração solúvel de XAC selvagem; **PC2** | Pós coluna da fração solúvel do lisado celular; **L3-L5** | Lavagens consecutivas com tampão contendo imidazol 10 mM; **300** | Eluição com tampão contendo imidazol 300 mM; **L6** | Lavagem com tampão contendo imidazol 10 mM; **2M** | Lavagem da coluna com tampão contendo imidazol 2M. Bandas de relevância do padrão molecular são indicadas. Uma banda na altura de 48 kDa é indicada por seta em [A] e [B], bem como a XK recombinante em [B].

É possível observar na Figura 22 B, além da banda da proteína recombinante, uma banda de aproximadamente 48 kDa. A ausência dessa banda nas lavagens realizadas com tampão contendo imidazol 10 mM poderia indicar a possibilidade de uma proteína interagindo fisicamente com a XK recombinante. Porém, a presença dessa mesma banda no teste realizado na ausência de proteína recombinante (Figura 22A) indica que ela está aderida à coluna a partir somente da fração solúvel do lisado, o que pode ser decorrente da presença de proteínas nativas de Xcc com afinidade a colunas de níquel imobilizado. Para melhores visualização e comparação, os eluatos foram aplicados em um único gel e são mostrados na Figura 23.

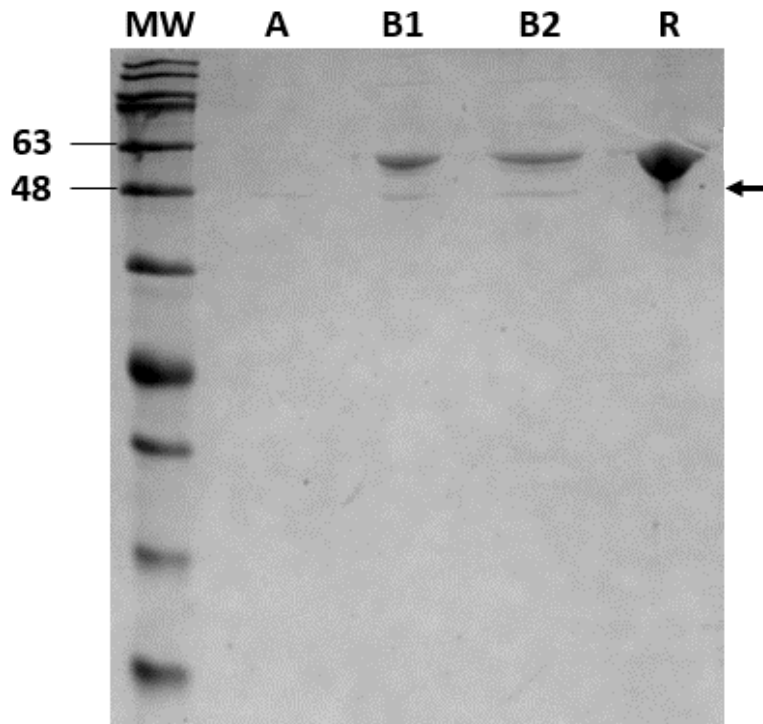


Figura 23: Eluatos de 300 mM dos testes de *Pull-Down* com XAC selvagem. MW | Marcador de massa molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco); A | Eluato 300 mM do teste sem a adsorção prévia da proteína recombinante à coluna; B1 | Eluato após 300 mM de imidazol na primeira réplica; B2 | Eluato após 300 mM de imidazol na segunda réplica; R | XK recombinante. É possível observar a reprodutibilidade da técnica, porém, nota-se também a banda de aproximadamente 48 kDa (indicada pela seta à direita inferior) no teste realizado sem a presença de XK recombinante. Estão indicados os pesos moleculares relevantes.

O ensaio está sendo otimizado para eliminar essa interferência e/ou comprovar a identidade das proteínas, e o teste será repetido utilizando-se fração de periplasma ao invés de fração total celular, o que poderá levar ao enriquecimento em proteínas parceiras da XK, visto que uma delas poderá ser a XI, a qual foi previamente detectada nessa fração celular (ZANDONADI et al., 2020).

A utilização de análises *in silico* pode auxiliar nos estudos de interação proteína-proteína, fornecendo um hipotético mapa de interações entre a proteína alvo e alvos putativos a serem descobertos posteriormente em análises *in vitro*. Um dos *softwares* de análises *in silico* de interações proteicas é o STRING (<https://string-db.org/>) que fornece as 10 primeiras conexões proteicas baseadas em contexto genômico, que abrange vizinhança, fusão e coocorrência de genes; interações conhecidas por curadoria em banco de dados ou determinadas experimentalmente; ou por outros tipos de contextos incluindo coexpressão, *text-mining* e homologia de proteína (SZKLARCZYK et al., 2021). Assim, ao analisar a sequência de

aminoácidos da proteína (D-xilulokinase) codificada pelo gene *xylB1* de XAC, um mapa de interação foi obtido e é apresentado na Figura 28.

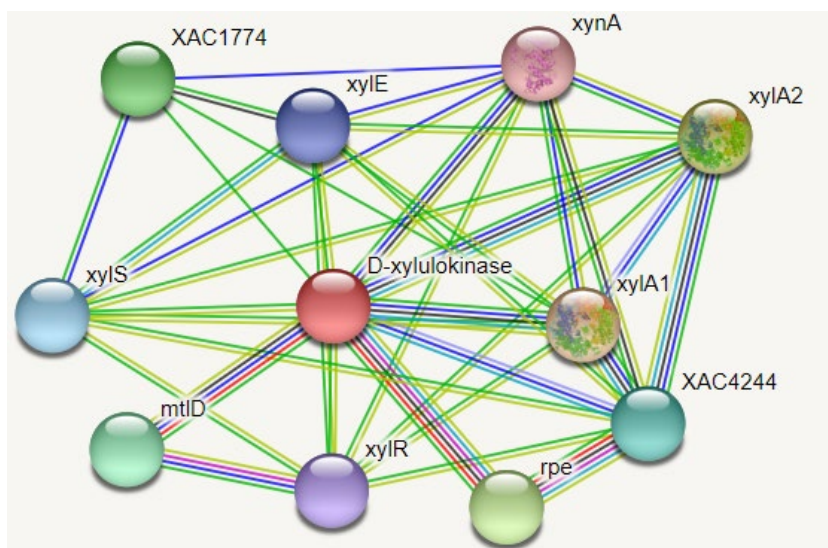


Figura 24: Perfil de interações proteicas previstas pelo *software* STRING para a enzima XK de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306. As linhas conectoras são baseadas em evidências de interação e se diferenciam por cor, com as interações derivadas de vizinhança genômica mostradas em verde, fusão de genes em vermelho, coocorrência em azul escuro, curadoria em banco de dados em azul esverdeado, determinadas experimentalmente em rosa, coexpressão em preto, *text-mining* em amarelo e homologia em azul claro.

Analisando os resultados, os genes e as proteínas codificadas por eles estão descritos a seguir: *xylA1* e *xylA2* (xilose isomerase), *xylE* (proteína transportadora de xilose), *xylS* (alfa-xilodase), *rpe* (D-ribulose-5-fosfato epimerase), XAC1774 (glicosidase), *mtID* (manitol desidrogenase), *xynA* (beta-xilanasase), *xylR* (proteína repressora tipo LacI do operador *xyl-box* do *operon* de degradação de xilano e metabolismo de xilose) (LOKMAN et al., 1997, IKAWA 2018) e XAC4244, também alvo desse estudo. Observa-se que boa parte das proteínas identificadas como parceiras tem envolvimento no metabolismo de xilano e xilose (*xylB2*, *xylE*, *xylS*, XAC1774, *xynA* e *xylR*). Como as interações preditas nesse *software* são agrupadas a partir de diversos organismos, tais interações necessitam de confirmação experimental, o que pode ser realizado com o teste de *Pull-Down*.

4.4 Deleção gênica

4.4.1 Construção do plasmídeo de deleção

Os oligonucleotídeos destinados à amplificação das regiões flanqueadoras ao gene *xytB1* (1 kb *upstream* e 1 kb *downstream*) funcionaram satisfatoriamente, e os produtos de PCR foram analisados por gel de TAE agarose 1% (Figura 25).

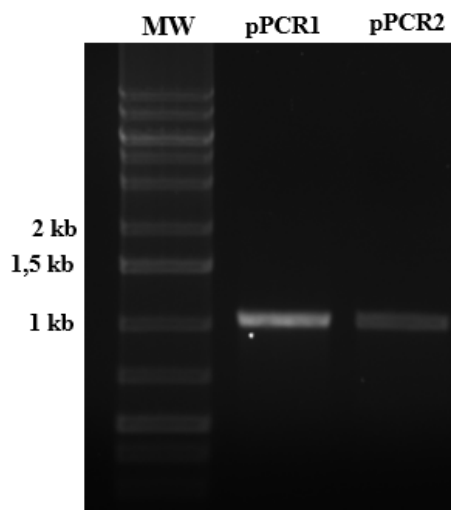


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos *upstream* e *downstream* ao gene *xytB1*, obtidos por amplificação a partir do DNA genômico de XAC 306. Aliquotas de 5 μ L das reações foram analisadas por eletroforese em gel TAE agarose 1%. MW | Padrão de tamanho molecular *1kb Plus DNA Ladder* (Cellco), pPCR1 | Região flanqueadora *upstream* ao gene *xytB1*. pPCR2 | Região flanqueadora *downstream* ao gene *xytB1*.

Os fragmentos então foram excisados, purificados e clonados individualmente em vetor de propagação pJET 1.2/blunt, com subsequente transformação de linhagens de *E. coli* DH5 α . Os plasmídeos foram extraídos dos transformantes e digeridos com as respectivas enzimas de restrição (Tabela 1). Os produtos das digestões dos plasmídeos foram analisados por eletroforese em gel de TAE agarose 1% (Figura 26).

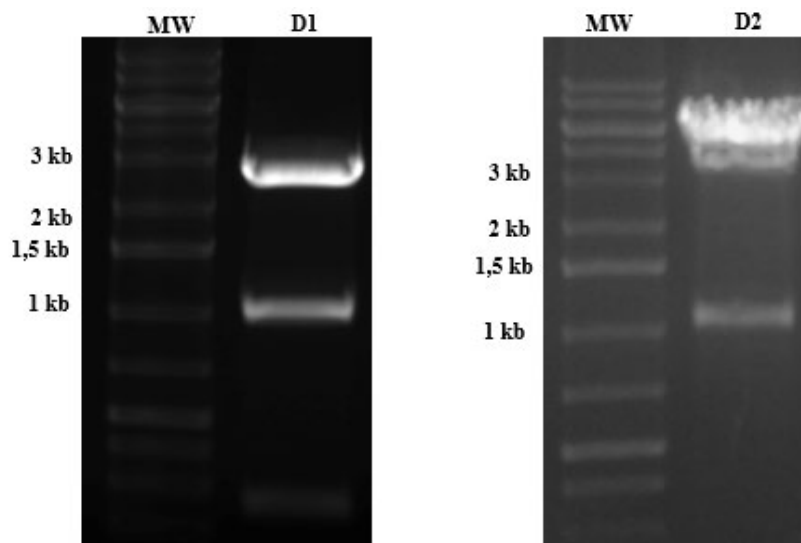


Figura 26: Análises por eletroforese em gel de agarose da restrição dos vetores de propagação pJET 1.2 contendo os fragmentos *upstream* e *downstream* após clonagem em *E. coli* DH5 α . O DNA plasmidial foi submetido à dupla digestão com endonucleases de restrição e alíquotas de 5 μ L foram analisados em gel de agarose 1% em TAE contendo brometo de etídeo 1%. **MW** | Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Cellco); **D1** | pJET 1.2 contendo região flanqueadora *upstream* digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III; **D2** | pJET 1.2 contendo região flanqueadora *downstream* digerido com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. Bandas do padrão de tamanho molecular próximas aos insertos e ao vetor são mostradas.

Após a confirmação, o volume restante da reação foi aplicado novamente em gel TAE agarose 1% para excisão dos fragmentos de interesse digeridos.

4.4.2 Confirmação da montagem do plasmídeo de deleção

Após a obtenção dos fragmentos flanqueadores ao gene *xylB1* devidamente digeridos, eles foram clonados *in tandem* no vetor de deleção pNPTS138. Cada fragmento foi inserido individualmente com subsequente confirmação por digestão. A construção final foi testada com todas as enzimas envolvidas no sistema e as digestões são mostradas na Figura 27. Os tamanhos das bandas resultantes foram confirmados, indicando o sucesso na construção do plasmídeo de deleção, que foi denominado pNPTS138_ *xylB1*.

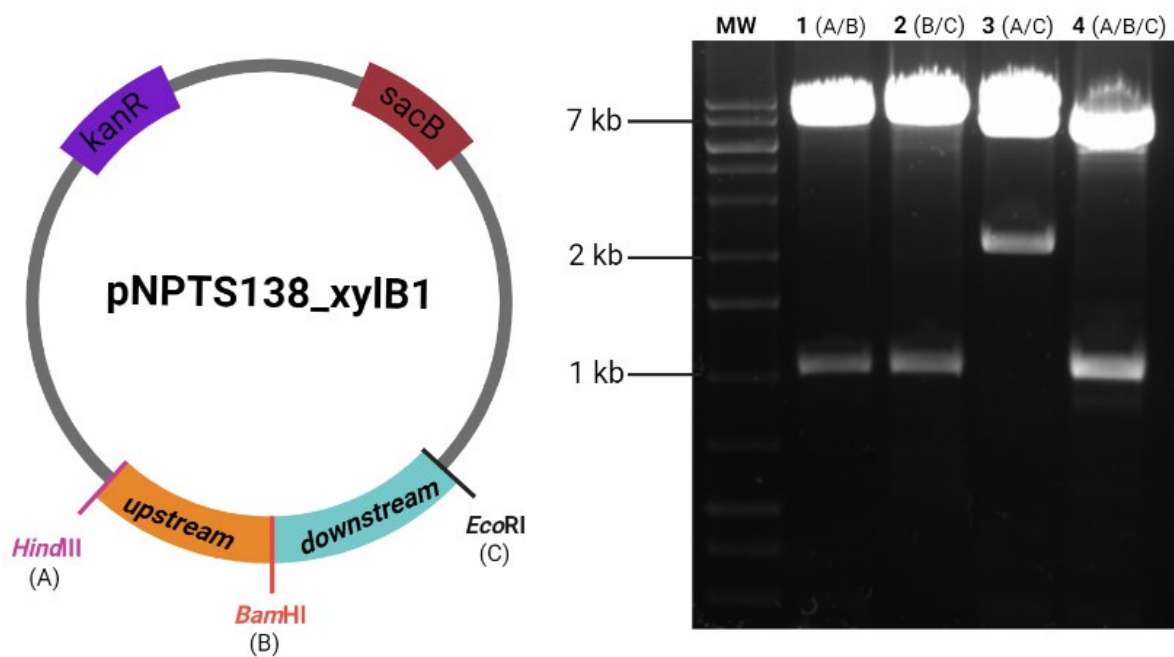


Figura 27: Análise de restrição do plasmídeo de deleção pNPTS138_xylB por eletroforese em gel de agarose. O DNA plasmidial de uma colônia de *E. coli* DH5 α transformante foi submetido à digestão com quatro combinações das enzimas de restrição *Hind*III, (A) *Bam*HI (B) e *Eco*RI (C) e analisados em gel TAE agarose 1%. **MW** | Padrão de tamanho molecular 1kB Plus DNA Ladder (Cellco); 1-4 | Digestões do DNA plasmidial pNPTS138_xylB1. O plasmídeo pNPTS138 possui um tamanho de aproximadamente 5,4 kb. Estão indicados ao lado do numeral a letra respectiva a cada uma das enzimas de restrição utilizadas. As bandas relevantes no padrão molecular estão destacadas.

4.4.3 Confirmação da deleção gênica

Após a transformação de XAC com o plasmídeo de deleção e os procedimentos para seleção de possíveis linhagens mutantes deletadas no gene *xylB1* de XAC (Figura 12), colônias que cresceram em meio contendo canamicina (e não cresceram em meio contendo sacarose) foram repicadas em meio LB e plaqueadas em meio ágar LB. Após o crescimento, dez colônias foram selecionadas e tiveram seu crescimento em meios contendo sacarose e canamicina testados. Destas, seis foram isoladas e tiveram o DNA genômico submetido a uma amplificação com os oligonucleotídeos KO_XYLB1775_FW e KO_XYLB1775_RV, conforme a programação mostrada na Tabela 4. A eletroforese em gel de agarose resultante do produto de PCR utilizando uma das colônias como DNA molde é apresentada na Figura 28.

Devido à localização do par de oligonucleotídeos utilizados na amplificação, linhagens selvagens de XAC retornariam uma banda de aproximadamente 3,5 kb (fragmento *upstream* + *xylB1* + fragmento *downstream*). Já bandas de linhagens mutantes, retornariam uma banda de 2 kb (fragmento *upstream* + fragmento *downstream*). Podemos observar na Figura 28 a

presença das duas bandas, o que pode indicar a presença de uma colônia heterogênea de linhagens mutante e selvagem.

Com essa descoberta, para obter isoladamente a linhagem mutante, a colônia foi cultivada em 5 mL de meio LB e o cultivo permaneceu em crescimento por 6 horas. Após esse crescimento, uma alíquota de 5 μ L foi plaqueada em meio ágar-LB. Colônias individuais foram então selecionadas e a amplificação realizada anteriormente foi repetida, não resultando em colônias mutantes isoladas.

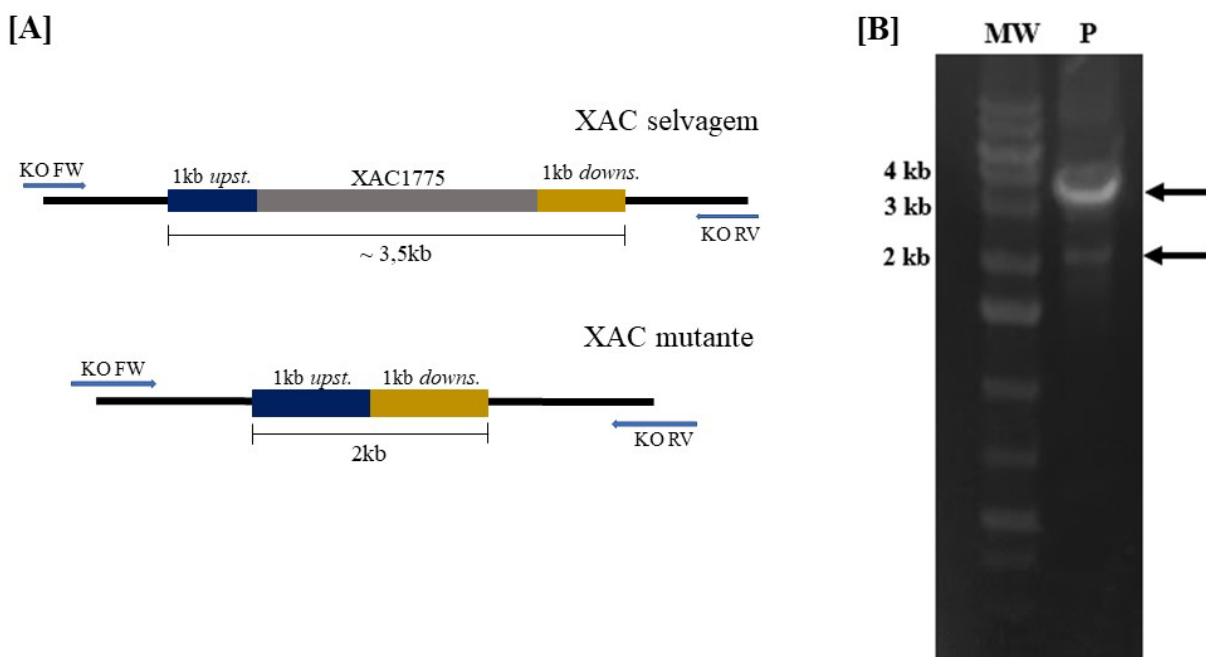


Figura 28: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR de colônia de um possível mutante. Em [A] um esquema apresentando os locais de anelamento dos *primers* de confirmação da deleção (KO FW e KO RV), bem como o tamanho das bandas esperadas nas amplificações. Em [B] a eletroforese de uma possível colônia heterogênea: MW | Padrão molecular *1kb DNA Plus* (Cellco); P | Amplificação de DNA genômico de possível colônia mutante. A banda esperada para mutantes está indicada pela seta inferior à direita, e a seta superior à direita indica o tamanho da banda esperada para a linhagem selvagem. As bandas do marcador molecular mais importantes são mostradas.

5 CONCLUSÕES

- ✓ As ORFs 1775 e 4244 de XAC, embora anotadas como sendo genes codificantes de xiluloquinase, codificam para cadeias polipeptídicas que diferem no tocante à solubilidade em água, possivelmente em decorrência da também distinta e baixa similaridade entre as respectivas sequências preditas de aminoácidos (26% similaridade);
- ✓ A ORF XAC1775 de XAC codifica para uma quinase de xilulose e apresenta comportamento cinético compatível com o modelo de Michaelis e Menten;
- ✓ A priori, a metodologia de *Pull-Down* com o lisado celular de XAC mostrou não ter sensibilidade suficiente para detecção de proteínas preditas *in silico* como possíveis parceiras de XK, o que pode sugerir uma baixa abundância destas neste extrato total e necessidade de utilização de frações sub-celulares enriquecidas, como por exemplo o extrato subcelular periplasmático;
- ✓ A obtenção de linhagem mutante de deleção para o gene da XK, embora ainda não purificada da linhagem selvagem, aponta para a possibilidade de a enzima não ser essencial para XAC e o mutante ser uma ferramenta passível de obtenção para utilização em estudos da relação da ORF1775 com a patogenicidade bacteriana.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; ZAKARIA, M. R. Oligosaccharide From Hemicellulose. **Lignocellulose for Future Bioeconomy**, p. 135–152, 1 jan. 2019.

ALEXANDRINO, A. V. **Análise funcional dos genes xanb e xyla2, potencialmente envolvidos na patogênese do cancro cítrico**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2020.

ALEXANDRINO, A. V.; GOTO, L. S.; NOVO-MANSUR, M. T. M. treA Codifies for a Trehalase with Involvement in Xanthomonas citri subsp. citri Pathogenicity. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162886, 1 set. 2016.

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

ARTIER, J. et al. Comparative proteomic analysis of Xanthomonas citri ssp. citri periplasmic proteins reveals changes in cellular envelope metabolism during in vitro pathogenicity induction. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 1, p. 143–157, 1 jan. 2018.

AUSUBEL, F. **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 5th ed. ed. New York: Wiley, 2002. v. 2

BEHLAU, F. et al. Molecular characterization of copper resistance genes from Xanthomonas citri subsp. citri and Xanthomonas alfalfae subsp. citrumelonis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4089–4096, jun. 2011.

BEHLAU, F. **MANUAL DE CANCRO CÍTRICO: Medidas essenciais de controle**. SN - 978-85-68170-13-7: [s.n.].

BEHLAU, F.; FONSECA, A. E.; BELASQUE, J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, v. 65, n. 8, p. 1390–1399, 1 out. 2016.

BELASQUE JUNIOR, J. et al. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, p. 314–317, 2010.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 280–300, jun. 1996.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1575–1588, 1 nov. 2012.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, v. 23, n. 10, p. 101–111, 1957.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

- BRAMUCCI, M. G.; NAGARAJAN, V. Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 3948–3953, 1996.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141–157, maio 2003a.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141–157, 1 maio 2003b.
- BUNKER, R. D. et al. Structure and function of human xylulokinase, an enzyme with important roles in carbohydrate metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 3, p. 1643–1652, 18 jan. 2013.
- BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. MICROBIAL XYLANASE: A REVIEW. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335–342, 2016.
- BUSSE-WICHER, M. et al. Evolution of Xylan Substitution Patterns in Gymnosperms and Angiosperms: Implications for Xylan Interaction with Cellulose. **Plant Physiology**, v. 171, n. 4, p. 2418–2431, 2 ago. 2016.
- CHANG, A. et al. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: New developments and updates. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D498–D508, 8 jan. 2021.
- CHOW, V. et al. Xylan utilization regulon in *Xanthomonas citri* pv. *citri* Strain 306: Gene expression and utilization of oligoxylosides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 2163–2172, 2015.
- CIVEROLO, E. Bacterial canker disease of citrus [*Xanthomonas campestris*]. . **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 1984.
- CROZIER, A. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules in Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, p. 829–850, 2001.
- DAS, A. K. Citrus canker-A review. **J. Appl. Hort**, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.
- DHIMAN, S.; MUKHERJEE, G. Recent Advances and Industrial Applications of Microbial Xylanases: A Review. **Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective**, p. 329–348, 1 jan. 2018.
- DI LUCCIO, E. et al. Structural and kinetic studies of induced fit in xylulose kinase from *Escherichia coli*. **Journal of molecular biology**, v. 365, n. 3, p. 783–798, 19 jan. 2007.
- DUNGER, G. et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 2, p. 127–135, 14 ago. 2007.
- EFROM, C.; SOUZA, P. **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. . Porto Alegre: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201805/15144652-citricultura-do-rio-grande-do-sul-indicacoes-tecnicas-efrom-souza.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2022.
- FAO STAT. **Commodities by country**.

FU, X. Z. et al. Different Transcriptional Response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kumquat and Sweet Orange with Contrasting Canker Tolerance. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41790, 26 jul. 2012.

FUNDECITRUS. INVENTÁRIO DE ÁRVORES E ESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2020/21 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO SEÇÃO I. Araraquara - SP: [s.n.]. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2021_07_30_Inventario_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2021-2022.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2022.

GROISILLIER, A.; TONON, T. Determination of Fructokinase Activity from *Zobellia galactanivorans*. **BIO-PROTOCOL**, v. 5, n. 21, 2015.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*, p. 1–119, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature.com**, 1970.

LAGAERT, S. et al. β -Xylosidases and α -l-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 316–332, 1 mar. 2014.

LAWLIS, V. B. et al. Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 15–21, 1984.

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1828–1830, 1 maio 2001.

MALGAS, S. et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1–13, 1 dez. 2019.

MANDIGAN, M.M., J. BENDER, K. B. **Brock Biology of Microorganisms**. 14th. ed. [s.l.] Pearson, 2014.

MANEIRA, R.; DANELLA NETO, P. **Cancro cítrico: estratégias na prevenção e controle**. [s.l.: s.n.]. . Acesso em: 4 maio. 2022.

MARTÍN DEL CAMPO, J. S. et al. Discovery and characterization of a novel ATP/polyphosphate xylulokinase from a hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 661–669, jul. 2013.

MEYER, D.; BOGDANOVE, A. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular Biology**, v. 147, p. 161, 2009.

MICHAELIS, V. L.; MENTEN, M. L. Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemistry**, v. 49, p. 333–369, 1913.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization** . [s.l.: s.n.]. v. 1p. 251–276.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição ed. [s.l.] Editora Artmed, 2014.
- SANCHES, A. L. R. et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 3, p. 549–566, 2014.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **National Acad Sciences**, 1977.
- SCHAAD, N.; JONES, J.; CHUN, W. **Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria**. [s.l: s.n.].
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 1 jun. 2003.
- SHAMANNAT, D. K.; SANDERSON, K. E. Uptake and Catabolism of D-Xylose in Salmonella typhimurium LT2. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 139, n. 1, p. 64–70, 1979.
- SIZEMORE, C. et al. Organization, structure, promoter analysis and transcriptional regulation of the xylose utilization operon from Staphylococcus xylosus. **Mol. Gen. Genet**, v. 84, p. 377–384, 1991.
- STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research Relating to the Recent Outbreak of Citrus Canker in Florida*. **Annual review of phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 399–420, 28 nov. 2003.
- STALL, R.; SEYMOUR, C. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. **Plant Disease**, v. 67, n. 5, p. 581–585, 1983.
- STRYER, L.; BERG, J.; TYMOCZKO, J. **Bioquímica**. 7ª EDIÇÃO ed. [s.l.] Guanabara Saúde Didático, 2014.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D605–D612, 8 jan. 2021.
- VIEIRA, P. S. et al. Xyloglucan processing machinery in Xanthomonas pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 30 jun. 2021.
- WALDRON, K.; FAULDS, C. Cell wall polysaccharides: composition and structure. **in Comprehensive Glycoscience Ch. 5**, v. 1, p. 181–201, 2007.
- WILHELM, M.; HOLLENBERG, C. P. Selective cloning of Bacillus subtilis xylose isomerase and xylulokinase in Escherichia coli genes by IS5-mediated expression. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 11, p. 2555–2560, 1 nov. 1984.
- ZANDONADI, F. S. et al. Periplasm-enriched fractions from Xanthomonas citri subsp. citri type A and X. fuscans subsp. aurantifolii type B present distinct proteomic profiles under in vitro pathogenicity induction. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0243867, 1 dez. 2020a.
- ZANDONADI, F. S. et al. Periplasm-enriched fractions from Xanthomonas citri subsp. citri type A and X. fuscans subsp. aurantifolii type B present distinct proteomic profiles under in vitro pathogenicity induction. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, 1 dez. 2020b.

ANEXO I

Alinhamento das sequências peptídicas de XAC1775 e xylB de *Xanthomonas campestris*.

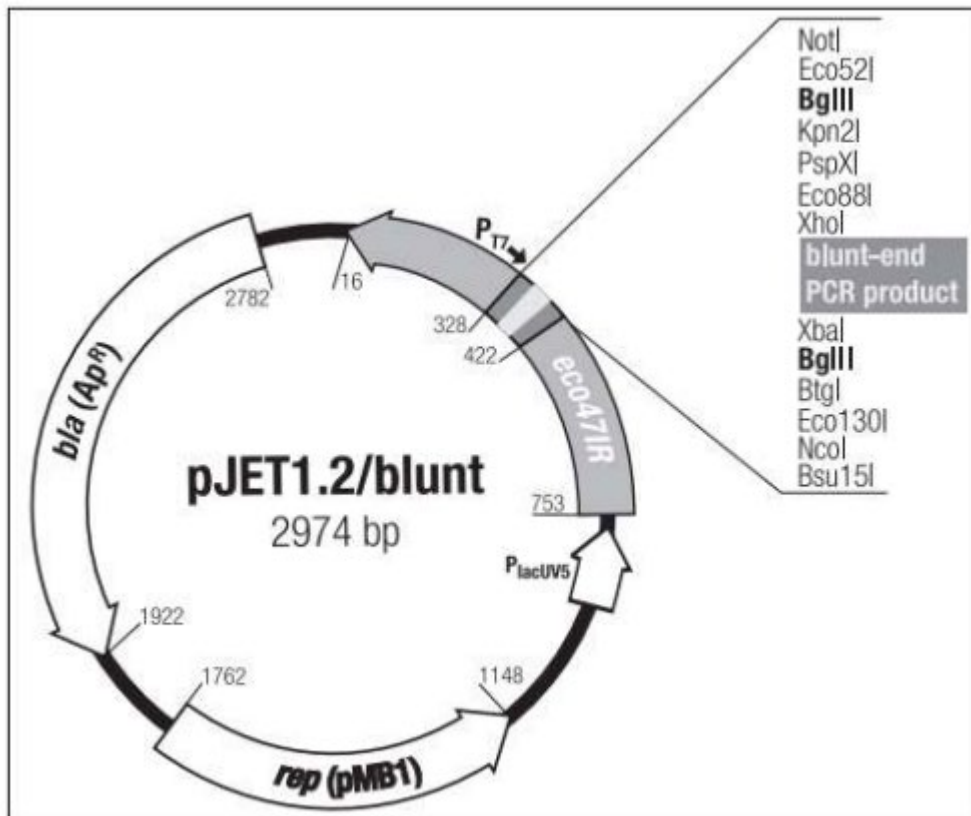
XAC1775	QLDGEQRARVRGISVSGQQHGFVPVAADGSVTAPVKLWCDTSTALECDEIMAAVGAAGS	120
XylB	QLDAELRARVRGISVSGQQHGFVPVAADGSVTAPVKLWCDTSTALECDEIMDAVGAAGS ***.* *****	120
XAC1775	VAAAGNPIMAGYTASKLPWTRKHRPDAYAAMTTVMLPHDYVNFWLTGERFAEVDASGTG	180
XylB	VATAGNPIMAGYTASKLPWTRKHRPEAYAAMTTVMLPHDYVNFWLTGERFTEVDASGTG **.* *****.* *****.* *****	180
XAC1775	WLDVRTRQWSEMLSAVDAQRDRLREALPPLVDTGAVYALSDAAAQALNLPAGVRVTTGGG	240
XylB	WLDVRTRQWSEMLGAMDAQRDRLDALPPLVETGAVFALSDAAAEALALPAGVRVTTGGG *****.*.* *****.* *****.* *****.* *****	240
XAC1775	DNMMAAIGTGNVVPGRLTMSLGTSGTLFAYADHPVVDDEARWAAFCSSSGGWLP LIC TMN	300
XylB	DNMMAAIGTGNVVPGRLTMSLGTSGTLFAYADHPVVDDEARWAAFCSSSGGWLP LIC TMN *****.* *****	300
XAC1775	CTVATEAVMRMFSITRDQTEAMIADTPGADGLVLLPFFNGERTPDLPAARGCLFGMDLH	360
XylB	CTVATEAVMRMFSITRAQTEAMIADTPGADGLVLLPFFNGERTPNLPDARGCLFGMDLH *****.* *****.* *****.* *****	360
XAC1775	NTTAAHFYRAAMEGATYSLRNGFDAFVAAGLQFDTI LLTGGGSKSAQWRQMVADIFNLQV	420
XylB	NTTPAHFYRAAMEGATYSLRNGFDAFVAAGLQFDTI LLTGGGSKSAQWRQMVADVFNLQV *** *****.* *****	420
XAC1775	VVPTQPEGAAFGAALQALWACERADGGDAALADVLEHLQVDDALAAQPNPQHVAQYQQH	480
XylB	VVPTQPEGAAFGAALQAVWACDRDDGGQAALSEVVLEHLQIDDALSARPDQORVAAYQQH *****.* *****.* *****.* *****.* *****.* *****	480
XAC1775	YQTFKHLHVVSPLYAG	497
XylB	YQNFLKHLHVVSPLYAG **.* *****	497

ANEXO II

Alinhamento das sequências peptídicas de XAC4244 e xylB de *Xanthomonas campestris*.

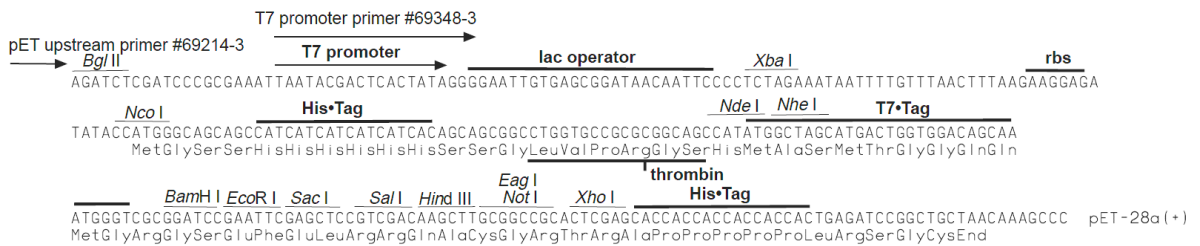
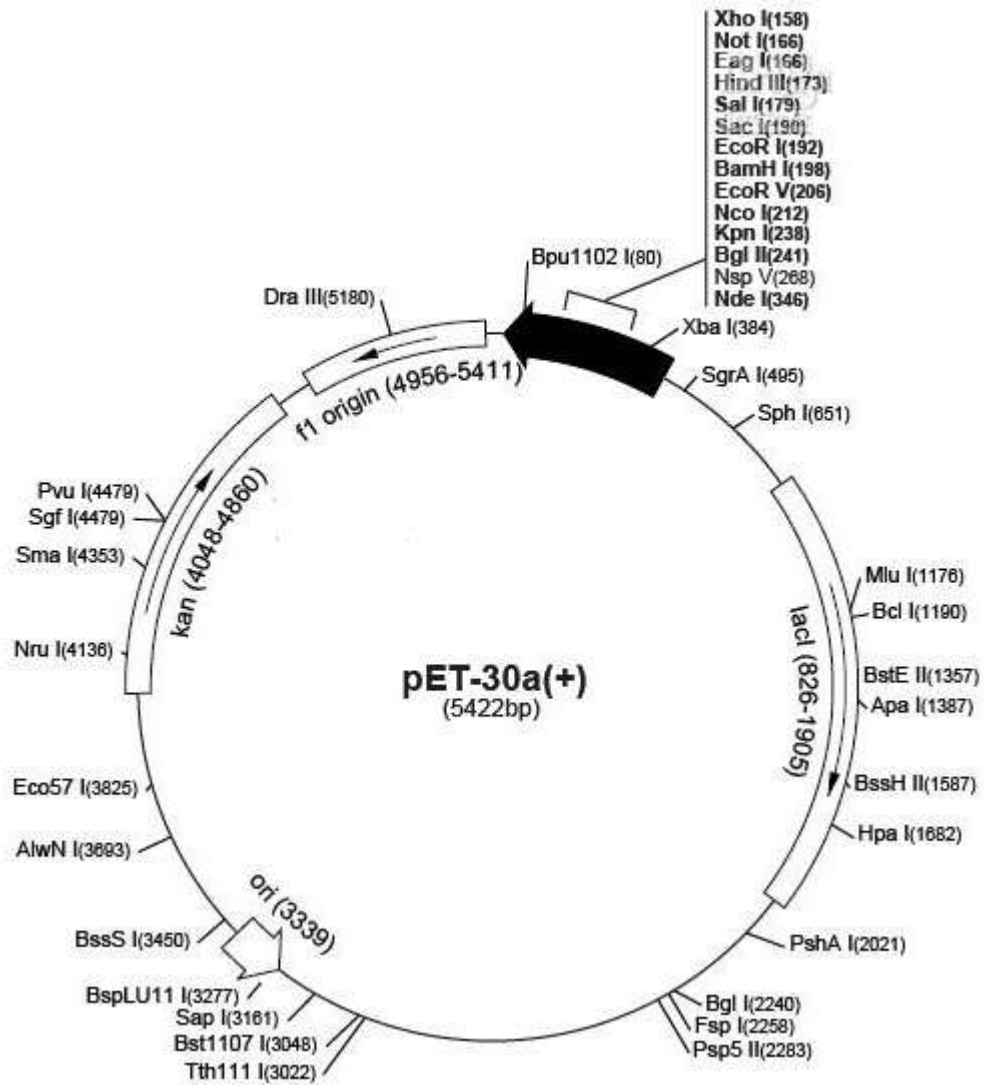
XAC4244	---MLAVDLGTSGCNCALVT-LDGKVLAWAFEPVQLHVQGVAAEQDPHAWWDAFCATAAA	56
XylB	MSVYVGLDVGTSVSVKLVAYDPQERAVVATIGAPMELISRDDGTREQQAQWWIDGIVH--C	58
	.:*:***. . . : *:* **:* .: .:.* . . .	
XAC4244	VVQGDAGLRRRVVAVCCSTQEGGTVCVDHNGQALGRAMLWLDMRGQAAIARRLQGRWLN	116
XylB	FAQLDAELRARVRGIVSQQHGFVPAADGSVTAPVKLWCDTSTALECDEIMDA---V	114
	..* ** ** ** .: . * * . * * * :*.. . . ** * . :.: *	
XAC4244	RGYDPLRLRWRRLRSGGAPARSGKDCAGHIAYLDRHQPVRYERTHKFLNVDYMNRLRTG	176
XylB	GGAA-----GSVATAGNPIMAG-YTASKLPWTRKHRPEAYAAMTTVMLEPHDYVNFWLTG	167
	* .: * * :* *.: : *.*:* * .: .: **:*: ***	
XAC4244	R-FCATPDSMLTTWVTDNRDPHHIRYDAGLLDMVGVERDKLPDLLPSTAVLGPLLPQVAQ	235
XylB	ERFTEVGDAAGTGWLDVTRQWSE-RMLGAMDAQRDALPPLVETGAVFAL-SDAAAE	225
	. * . *: * *: . * :* ** ** *: : **:. :*:	
XAC4244	ALGLSPQTVVVAGAIIDTSAVAVA-AAVEDHAAHLYLGTSSWLG--AHVPRMKT DVRSTIA	292
XylB	ALALPAGVRVTTGGGDNMMAAIGTGNVVPGLTMSLGTSGTLFAYADHPVVDDAR---W	282
	.* . *.:* * . *.:. . * : *. * * . * . *.*	
XAC4244	AVPFAVEGRYLAIALQTTAGANLSFLDRILFHADELLSDEQRPDVYEVNLRNRIARVPAG	352
XylB	AAFCSGGWLP LIC TMNCTVATEAV--MRMFSIT-----RAQTEAMIADTTTPG	329
	* . *: . * :* : : :* : : * . *	
XAC4244	SNGLIYMPWLFGERTPVEDPSLRAGLINLSLMH-SREDMIRAVMEGVAFNTRWMMPEPFAR	411
XylB	ADGLVLLPFFNGERTPNLP-DARGCLFGMDLHNTTPAHFYRAAMEGATYSLRNGFADFVA	388
	:***: :*.: ***** . * . *.:.* : : .: **.***.:. * :. * .	
XAC4244	LLGCDPGTIAAVGGGAQSDLWCQIIADVSGRPIRQLHNPIQANAVGAAFIAGVGLGRLG-	470
XylB	-AGLQFDTILLTGGGSKSAQWRQMVADVFNLQVVVPTQPEG-AAFGAALQAVWACDRDDG	446
	* : .** .***.:* * *.:*** . : : * * .***: * . . * .	
XAC4244	----FGD--LAALQR-PRRVYEPDAGTRALYDDRYAVFKDLQRTLAPIYRRLNPSTSVPA	523
XylB	GQAALSEVVLEHLQIDDALSARPDPQRVAAYQQHYQNFLKHLHVVSPLYAG-----	497
	.: : * ** .** * *.:* * . :.:*:*	
XAC4244	QEVAHVCP 532	
XylB	----- 497	

ANEXO III



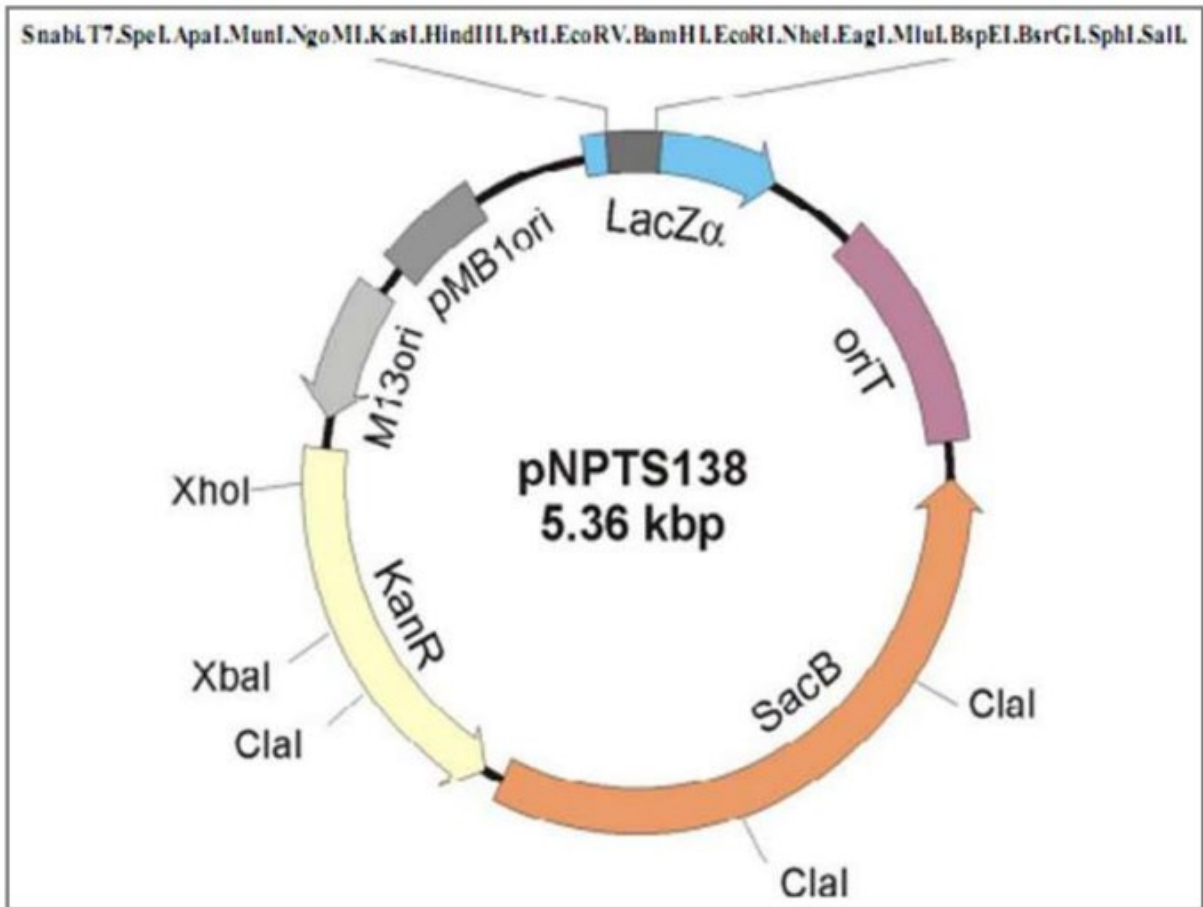
Mapa do vetor pJET 1.2/blunt (Fermentas)

ANEXO IV



Mapa do vetor pET28a

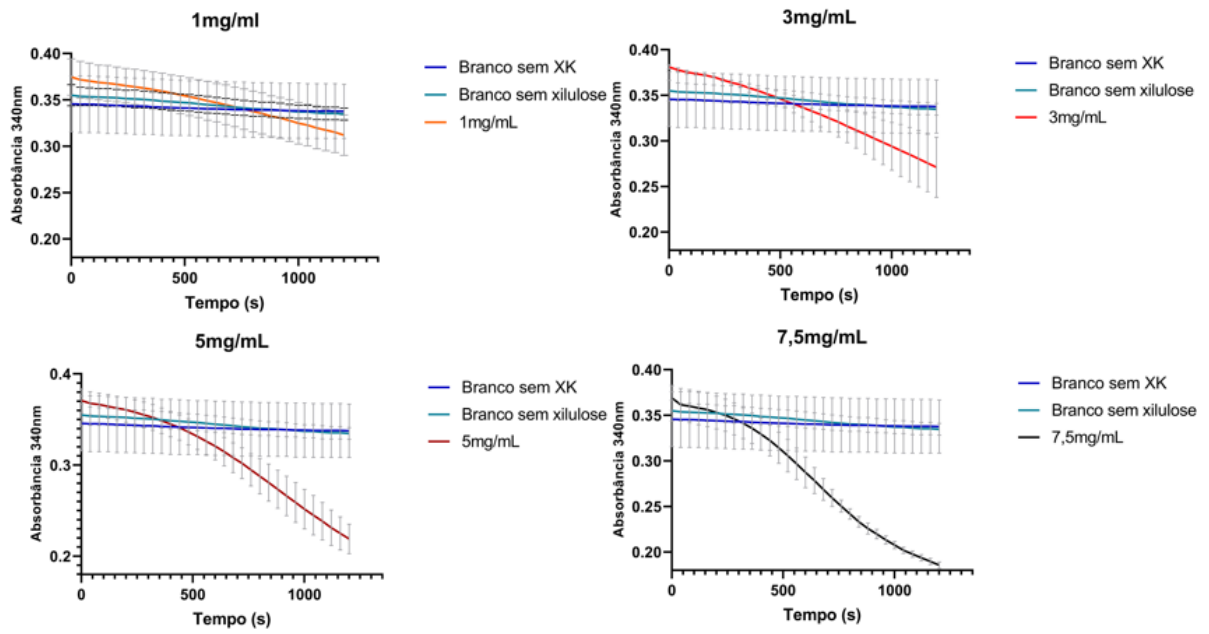
ANEXO V



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

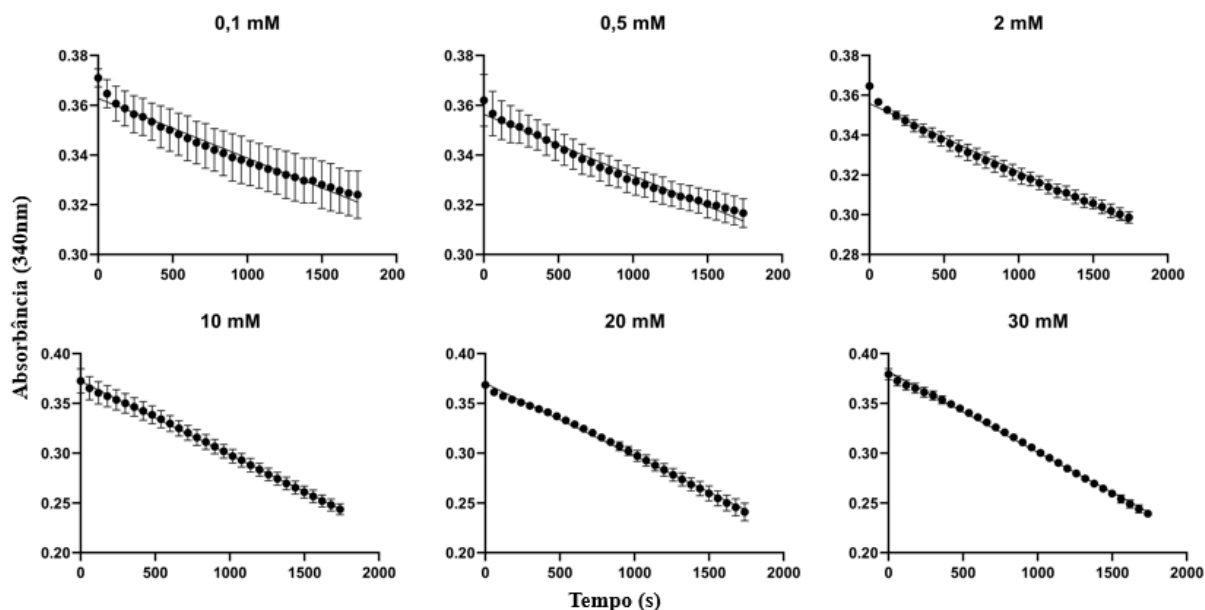
ANEXO VI

Curvas de atividade de XK com quatro valores diferentes de enzima recombinante



ANEXO VII

Curvas de absorbância x tempo e cálculos para obtenção o V_0



A partir das curvas obtidas, para o cálculo de V_0 foi escolhido o tempo de 119,99 s (2 minutos) para as concentrações 0,1 e 0,5 mM de xilulose e o tempo de 239,99 s (4 minutos) para as concentrações de 2, 10, 20 e 30 mM de xilulose

Calculando as variações para cada concentração e branco				
Concentração de xilose	Tempos (s)	Média t(inicial)	Média t(final)	Variação
Branco s/ xilose (2min)	0 a 119.99	0,3533	0,3463	0,0070
Branco s/ xilose (4min)	0 a 239.99	0,3533	0,3437	0,0097
0,1 mM	0 a 119.99	0,3687	0,3607	0,0080
0,5 mM	0 a 119.99	0,3620	0,3540	0,0080
2 mM	0 a 239.99	0,3647	0,3473	0,0173
10 mM	0 a 239.99	0,3727	0,3537	0,0190
20 mM	0 a 239.99	0,3687	0,3510	0,0177
30 mM	0 a 239.99	0,3793	0,3613	0,0180

Concentração	Δ teste - Δ branco	Denominador	Taxa de consumo de NADH (V_0)
0,1 mM	0,0010	0,3732	0,00267953
0,5 mM	0,0010	0,3732	0,00267953
2 mM	0,0077	0,7464	0,01027153
10 mM	0,0093	0,7464	0,01250447
20 mM	0,0080	0,7464	0,01071811
30 mM	0,0083	0,7464	0,0111647