



Universidade Federal de São Carlos - UFSCar  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)  
Departamento de Genética e Evolução (DGE)

**Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de  
*Xanthomonas citri* subsp. *citri*: proteínas relacionadas com  
a indução da patogenicidade *in vitro***

**Juliana Artier**

São Carlos  
2010



Universidade Federal de São Carlos - UFSCar  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)  
Departamento de Genética e Evolução (DGE)

**Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de  
*Xanthomonas citri* subsp. *citri*: proteínas relacionadas com  
a indução da patogenicidade *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Genética e  
Evolução para a obtenção do título de  
Mestre em Genética e Evolução.

Aluna: Juliana Artier  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

São Carlos  
2010

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

A791ap

Artier, Juliana.

Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: proteínas relacionadas com a indução da patogenicidade *in vitro* / Juliana Artier.. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
75 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética. 2. Proteínas. 3. Cancro cítrico. 4. Bactérias gram-negativas. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA FRAÇÃO  
PERIPLASMÁTICA DE XANTHOMONAS CITRI SUBSP.  
CITRI: PROTEÍNAS RELACIONADAS COM A INDUÇÃO DA  
PATOGENICIDADE IN VITRO.**

Dissertação de Mestrado de Juliana Artier

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

*Maria Teresa Marques Novo*

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

*Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo*

Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

*Jesus Aparecido Ferro*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por possibilitarem a oportunidade de eu percorrer o caminho que escolhi, sempre me apoiando e reconfortando quando os problemas aparecem, e por todo o amor e carinho que me deram. Vocês são meu sol.

À Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo, pela orientação, pelo incentivo, oportunidade, pelas longas horas de discussão inclusive em horários alternativos..., pela amizade durante todos esses anos juntas.

Ao CNPQ e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao Fundecitrus, pelo auxílio financeiro, e pelo apoio e colaboração do pesquisador Dr. José Belasque Júnior, tanto pelas inúmeras discussões com nosso grupo que ajudaram a nortear esta linha de pesquisa e este trabalho, como pelo fornecimento das linhagens de cancro cítrico; também aos alunos e estagiários do Fundecitrus.

À Profa. Dra. Heloisa S. S. de Araújo, DCF, UFSCar, pelo sequenciamento da região N-terminal das proteínas, pela ajuda com a produção e obtenção dos anticorpos utilizados neste estudo e pela disponibilização de seu laboratório.

A todos os professores e chefes de laboratório que disponibilizaram seus equipamentos e espaço, como o Prof. Dr. Gilberto Moraes e Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, e seus alunos. Também a Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, que disponibilizou seu laboratório para meu treinamento durante a Iniciação Científica, e para os primeiros experimentos de eletroforese bidimensional.

À Dra. Ana Paula Felício, UNESP - Araraquara, pela enorme paciência, por seus ensinamentos, disposição, amizade e apoio.

Ao LNLS e às pesquisadoras Adriana Paes Leme, Bianca Pauletti e Tais Dombroski, pelos ensinamentos, análise das nossas amostras por espectrometria de massas, pela paciência, disposição e amizade.

À minha família, meu irmão Alexandre, minha cunhada Ana Paula, meus avós e meus tios, que sempre me apoiaram e ajudaram em meus caminhos e escolhas, com amor e carinho, facilitando minha vida inclusive nas escolhas e agendamento com bastante antecedência das datas das festas familiares, para que eu pudesse continuar a participar nos acontecimentos dessa família que eu tanto amo.

Ao doutorando Adilson Silva pela disponibilidade, paciência, amizade e atenção dedicados a mim, sempre me ajudando. À doutoranda Sabrina de Oliveira pela disponibilidade, atenção e auxílio nos experimentos de eletroforese bidimensional, e pela amizade.

Aos colegas de laboratório, Flávia S. Zandonadi, Carolina M. Carnielli e Fábio Pelegrinelli, pela parceria, colaboração, amizade, pelos momentos alegres e divertidos.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio, carinho, amor e amizade constante independente da distância, e em todos os momentos, bons ou ruins: Andréa, Jamil, Daniel (Mag), Fernanda F., Guilherme, Vanessa B., aos amigos que fiz em Londrina e que ficarão pra sempre no meu coração; e em especial aos meus companheiros de casa Tiago e Imyra pela paciência, compreensão, companheirismo, carinho, amizade, pelos vários momentos de alegria e diversão, e por não deixarem me perder no caos..

Ao Bruno Sauce que esteve presente em minha vida em vários momentos, bons e ruins, e que me deu muito apoio e carinho nos momentos mais importantes e difíceis.

## **SATÉLITE**

Fim de tarde.

No céu plúmbeo

A Lua baça

Paira

Muito cosmograficamente

Satélite.

Desmetaforizada,

Desmitificada,

Despojada do velho segredo de melancolia,

Não é agora o golfão de cismas,

O astro dos loucos e enamorados,

Mas tão somente

Satélite.

Ah Lua deste fim de tarde,

Demissionária de atribuições românticas,

Sem show para as disponibilidades sentimentais!

Fatigado de mais-valia,

Gosto de ti assim:

Coisa em si,

— Satélite.

**Manuel Bandeira**

## RESUMO

O cancro cítrico é uma doença economicamente importante para a citricultura, não existindo atualmente medidas preventivas e curativas eficazes para combatê-la. Os agentes etiológicos são bactérias do gênero *Xanthomonas*, classificadas em duas espécies, *X. citri* e *X. fuscans*. A variedade mais agressiva aos citros é a bactéria *X. citri* subsp. *citri* (*Xac*). Pelo presente trabalho, realizamos a análise proteômica diferencial de uma fração celular de *Xac* enriquecida em proteínas periplasmáticas, após indução *in vitro* da sua patogenicidade, comparativamente à condição de não indução de patogenicidade (controle). As proteínas dessa fração foram separadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), sendo a análise estatística das intensidades dos *spots* realizada por meio do *software* Image Master Platinum (GE). Aproximadamente 80 *spots* apresentaram expressão diferencial significativa ( $p < 0,05$ ) entre as duas condições estudadas, os quais foram isolados do gel e sua(s) proteína(s) constituinte(s) digerida(s) com tripsina. Os peptídeos resultantes da digestão foram analisados por espectrometria de massas (LC-ESI-QToF) e os dados obtidos utilizados na identificação da proteína por pesquisa em bancos de *Xac* e/ou de outros organismos com o *software* Mascot. Dentre as proteínas de *Xac* identificadas como mais expressas após indução de patogenicidade *in vitro* duas estão classificadas como “proteínas relacionadas com Patogenicidade, Virulência e Adaptação” (segundo anotação do genoma de *Xac*), sendo elas: superoxidase dismutase (XAC2386) e fosfoglicomutase (XAC3579). Proteínas pertencentes a um *spot* com notável aumento de expressão em situação de indução de patogenicidade (*spot* 46) foram identificadas por espectrometria de massas, sendo elas: proteína *lytic murein transglycosilase* (XACb0007) e/ou *transglycosylase* (XAC3225), oxidoreductase (XAC1160) e subunidade beta da DNA polimerase III (XAC0002). O *spot* 46 foi isolado a partir de vários géis 2D e utilizado para produção de anticorpos em camundongos. A análise da expressão da(s) proteína(s) pertencente(s) ao *spot* 46 foi realizada por meio de *Western blot* nas linhagens-genoma B e C do cancro cítrico, as quais diferem de *Xac* na virulência e tipo de citros- hospedeiro. Por esta análise foi verificado que proteínas do *spot* 46 possuem expressão muito distinta entre as linhagens genoma do cancro cítrico, sendo sua expressão preponderante em *Xac*, especialmente em situação de indução de patogenicidade. Concluímos que o estudo das proteínas utilizando a fração periplasmática como objeto de estudo é de grande interesse para investigação de proteínas envolvidas com patogenicidade e virulência em *Xac*, e que tenham passagem pelo periplasma, inclusive de proteínas transportadas para o



meio extracelular. Além disso, algumas proteínas desta fração possuem potencial para serem utilizadas como biomarcadores ou como possível alvo de combate ao cancro cítrico.

Palavras-chave: análise proteômica; cancro cítrico; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; patogenicidade; fração periplasmática.

## ABSTRACT

Citrus canker is an economically important disease that affects many citrus growing areas around the world, and there is no effective control or cure. The causative agents are bacteria from the genus *Xanthomonas*, recently classified as two novel species, *X. citri* e *X. fuscans*. The most virulent strain is *X. citri* subsp. *citri* (*Xac*). In this study, we did a differential proteomic analysis of a periplasmatic proteins enriched fraction from *Xac*, by comparison of the protein profiles after cellular growth in pathogenicity inducing medium (XAM1) or non-inducing medium (Nutrient Broth). We performed Bidimensional Electrophoresis (2D-PAGE) in triplicate and statistical analyses were done with the software Image Master Platinum (GE). At least 80 spots showed significant differences on protein expression ( $p < 0.05$ ) between the two conditions tested (induction/ non-induction) and had their proteins digested by trypsin. The peptides were analyzed by mass spectrometry (LC-ESI- Q-Tof) and the results were compared with proteins from genome databases using the Mascot tool. Among *Xac* proteins identified with higher expression in *in vitro* pathogenicity inducing situation, two are classified as “proteins involved with Pathogenicity, Virulence, and Adaptation” (in according to the genome annotation): superoxidase dismutase (XAC2386) e phosphoglucomutase (XAC3579). A highly differential spot (46), increased in the inducing condition, had their proteins identified as lytic murein transglycosilase (XACb0007) and/or transglycosylase (XAC3225), oxidoreductase (XAC1160) and DNA polymerase III subunit beta (XAC0002). The spot 46 was isolated from several 2D gels and used to produce antibody in mouse. The expressions of these proteins were analyzed by Western blot in others citrus canker genome strains, which differ from *Xac* in the virulence and host types. This analysis showed that proteins from the spot 46 had different expression pattern among these strains, with higher expression in *Xac* growing in inducing condition. We conclude that the proteomic study of proteins from periplasmic fraction is an important strategy to detect *Xac* proteins involved with pathogenicity and virulence, even including proteins transported outside the cell. Proteins found in this fraction could be used as biomarkers, however more experiments are still necessary.

Key-words: proteomic analyses; canker citrus; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; pathogenicity; periplasmatic fraction.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões
AN	Agar Nutriente
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ou análise de variância
avr/ Avr	Gene de avirulência/ proteína efetora do gene avr
BSA	Soro albumina bovina
CN	Caldo Nutriente
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
HR	<i>Hypersensitive response</i> ou resposta de hipersensibilidade
hrp	<i>Hypersensitive Response and Pathogenicity</i> ou genes de Resposta de Hipersensibilidade e Patogenicidade
IAA	Iodoacetamida
LC-ESI-QTof	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador de massa tipo Quadrupolo-Tempo de Vôo
MM	Massa Molecular
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em série
pI	Ponto isoelétrico
rpf	Fator regulador de patogenicidade
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SSTI	Sistema de Secreção Tipo Um (I)
SSTII	Sistema de secreção Tipo dois (II)
SSTIII	Sistema de secreção Tipo três (III)
SSTIV	Sistema de secreção Tipo quatro (IV)
SSTV	Sistema de secreção tipo cinco (V)
TCA	Ácido Tricloroacético
Xac	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> , anteriormente denominada <i>Xanthomonas</i>

	<i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (patovar A)
XAM1	Meio de cultura indutor de patogenicidade
<i>XauB</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo B
<i>XauC</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Análise da sequência N-terminal de algumas proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio não indutor (CN) vs. indutor de patogenicidade (XAM1)..... 38
- Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). .....48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Lesões provocadas pelo cancro cítrico em folhas, ramos e frutos. O fruto está próximo de ter sua casca rompida devido à proliferação de *Xac*. Fonte: Fundecitrus, 2010..... 16
- Figura 2. Ciclo do Cancro Cítrico. Fonte: *Plant Management Network*, 2010 (com modificações por Ferreira, C., 2009). ..... 17
- Figura 3. Sintomas induzidos em folha de limão cravo após inoculação com *Xac*, *XauB* e *XauC*. Fonte: Carvalho, 2006. .... 19
- Figura 4. Sistemas de secreção em bactérias Gram -negativas. Fonte: Kegg pathway, 2010..21
- Figura 5. Membrana de bactéria Gram-negativa. Observar o espaço periplasmático entre membranas interna e externa. Fonte: Conacyt, 2010, com modificações.....24
- Figura 6. Esquema para cultivo das bactérias em meio indutor e não indutor de patogenicidade para os experimentos de extração de proteínas da fração periplasmática..... 28
- Figura 7. Perfil de proteínas da fração celular periplasmática (15 µg) obtidas por SDS-PAGE (14%) após cultivo de *Xac*, *XauB* e *XauC* em meio não indutor de patogenicidade CN (1) ou meio indutor XAM1 (2). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular. A seta externa indica uma banda de cerca de 13 kDa, provavelmente correspondente a lisozima, utilizada no procedimento de extração da fração de periplasma. As cabeças de setas apontam algumas proteínas que aparentemente são expressas diferencialmente. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.....35
- Figura 8. Perfil de proteínas da fração celular periplasmática (9 µg) de *Xac* obtidas por SDS-PAGE (14%) após cultivo em meio não indutor de patogenicidade CN (1) ou meio indutor XAM1 (2). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular. As setas numeradas de 1 a 5 indicam as bandas que foram isoladas da membrana de PVDF para o seqüenciamento do N-terminal. O gel foi corado com nitrato de prata. .... 36

- Figura 9. Curvas de crescimento das linhagens genomas de cancro cítrico (*Xac*, *XauB* e *XauC*) cultivadas em 80 mL de meio não indutor CN. .... 39
- Figura 10. Curvas de crescimento de *Xac* cultivadas em 400 mL dos meios CN e XAM1. .... 40
- Figura 11. Otimização da extração de proteínas da fração celular periplasmática (15 µg) pela análise por SDS-PAGE (14%) após cultivo de *Xac* em meio não indutor CN (1) ou meio indutor de patogenicidade XAM1 (2). A extração de proteínas foi realizada na ausência de inibidores de protease (sem inib); na presença de 10 µL/mL de coquetel inibidor de protease (GE)/ 5mM EDTA; ou com adição de 1mM PMSF/ 5 mM EDTA. Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P). As cabeças de setas apontam bandas que foram alteradas em relação à extração na presença de inibidores de proteases. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. .... 41
- Figura 12. Perfil de proteínas da fração celular periplasmática (260 µg) obtidas por 2D-PAGE após cultivo de *Xac* em meio não indutor (CN) (A) ou em meio indutor de patogenicidade (XAM1) (B). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P). Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250. Esses géis foram utilizados como referências na análise pelo *software* Image Master Platinum (GE). Em destaque os *spots* que foram analisados por espectrometria de massas. .... 43
- Figura 13. Réplicas do perfil de proteínas da fração celular periplasmática (260 µg) obtidas por 2D-PAGE após cultivo de *Xac* em meio não indutor (CN) (A) ou em meio indutor de patogenicidade (XAM1) (B). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P) Benchmarck (Invitrogen). Os géis (réplicas) foram corados com Coomassie Blue R-250. .... 44
- Figura 14. *Scatter plot* (% vol vs % vol) entre as réplicas dos géis 2D-PAGE de proteínas da fração celular periplasmática (260 µg) de *Xac* após cultivo em meio não indutor (A) e em meio indutor de patogenicidade (B) indicando reprodutibilidade entre as réplicas a correlação > 0,9. Os géis foram obtidos em triplicata para cada condição e comparados dois a dois, utilizando-se como referência os géis da Figura 12A e 12B. .... 45
- Figura 15. Zoom de alguns *spots* (denominados 9, 19, 20, 34, 36 e 46, conforme Fig. 12) que se mostraram diferencialmente expressos em *Xac*. Os *spots* aparecem como induzidos em XAM1. .... 46
- Figura 16. Histogramas representando a média da intensidade (expresso em % vol) e desvios-padrão das triplicatas de *spots*. As letras **a**, **b** e **c** indicam as réplicas em meio indutor e as letras **d**, **e** e **f** as réplicas em meio não indutor. A linha azul representa a média e as linhas vermelhas os valores mínimo e máximo do desvio padrão. .... 47
- Figura 17. *Western Blot*: perfil de proteínas periplasmáticas (70 µg) de *Xac*, *XauB* e *XauC* após cultivo em meio não indutor CN (1) ou meio indutor de patogenicidade XAM1 (2) após reação com anticorpos obtidos em camundongos contra proteína(s) do *spot* 46, de maior expressão em *Xac* quando em meio indutor de patogenicidade. Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P). .... 56

Figura 18. Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas identificadas a partir da fração enriquecida com proteínas periplasmáticas de *Xac*. As categorias funcionais utilizadas foram as mesmas descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. Descrição das categorias: I, proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário; II, proteínas relacionadas à biossíntese de pequenas moléculas; III, proteínas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas; IV, proteínas de estrutura celular; V, proteínas relacionadas a processos celulares; VII, proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação; VIII, proteínas hipotéticas; IX, orfs com categoria indefinida..58

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Aspectos econômicos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Cancro cítrico .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 O agente etiológico .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Mecanismos de interação planta-patógeno.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Estudos com <i>Xanthomonas</i> sp. causadoras do cancro cítrico – Era genômica e pós-genômica .....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de cultivo .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Análise preliminar da fração protéica periplasmática das linhagens-genoma do cancro cítrico .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Curvas de crescimento <i>in vitro</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Extração de proteínas da fração periplasmática para a análise proteômica em <i>Xac</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de <i>Xac</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5.1 Separação das proteínas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5.2 Análise de proteínas diferenciais por espectrometria de massas.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Avaliação da expressão de proteínas de <i>Xac</i> em outras linhagens .....</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Análise preliminar da fração protéica periplasmática das linhagens-genoma do cancro cítrico .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Curvas de crescimento <i>in vitro</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Padronização da extração de proteínas periplasmáticas .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 Análise dos perfis protéicos de periplasma de <i>Xac</i> por eletroforese bidimensional e identificação das proteínas diferenciais .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.1 Análise das proteínas da fração periplasmática de <i>Xac</i> por 2D-PAGE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 Análise da expressão de proteína(s) de <i>Xac</i> em outras linhagens de cancro cítrico.....</b>	<b>55</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>



<b>5.1 Proteínas de <i>Xac</i> diferencialmente expressas em condição de indução de patogenicidade em relação ao controle (não indução).....</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Análise da expressão de proteína(s) de <i>Xac</i> em outras linhagens de cancro cítrico</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos econômicos

A citricultura é uma das mais importantes atividades econômicas do Brasil. Ocupa o quarto lugar no *rank* da produção agrícola nacional (FAO, 2007) e é a segunda atividade rural em importância no Estado de São Paulo. O país mantém a posição de maior produtor mundial de laranja, com uma produção de 18.982.647 toneladas (IBGE, 2010), e é responsável por 56% do suco de laranja comercializado no mundo (Fundecitrus, 2010). O estado de São Paulo, com 80% de participação na produção, produziu 14.720.000 toneladas da fruta, sendo que as exportações do complexo da laranja somaram US\$ 1,6 bilhão em 2009, com 96% desse montante consistindo em suco de laranja (Investe SP, 2010). O setor ainda é responsável pela geração de milhares de empregos diretos e indiretos (Fundecitrus, 2010).

Apesar do seu grande potencial econômico, os citros são susceptíveis a muitas doenças, algumas de alto potencial destrutivo, como a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xyllela fastidiosa* (Laranjeira; Palazzo, 1999) e o cancro cítrico, que tem como seu agente etiológico principal a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Koller, 1994, Namekata *et al*, 1996).

O cancro cítrico causa grandes prejuízos ao setor citricultor devido à queda na produtividade e qualidades dos frutos, e à ausência de medidas eficazes de controle e cura. Nos Estados Unidos, o cancro cítrico vem se alastrando de maneira preocupante e progressiva desde 1995, após anos de esforços em programas de erradicação da doença, os quais já consumiram mais de US\$200 milhões (Brown, 2001). Devido a furacões que atingiram a Flórida em 2004 e 2005, a doença se espalhou muito e com isso as organizações responsáveis pelo seu controle concluíram que ela não pode ser erradicada e estão à procura de uma nova estratégia de combate à doença (Fletcher *et al.*, 2006). Além disso, a doença foi constatada também na Argentina, Uruguai, China, Japão, Índia, Austrália (Leite, 1990), Irã (Mohammadi *et al*, 2001), entre outros países.

No Brasil, foi estabelecida uma Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (Canec/SP), com o apoio da portaria nº 291 do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, de 23 de julho de 1997. Por essa campanha a forma de combate é a erradicação das plantas contaminadas, como também das árvores adjacentes suspeitas de estarem infectadas, ainda que não apresentem sintomas visíveis do cancro cítrico (lesões). Isso levou a grandes prejuízos ao produtor, sendo que, em 2009 o número de plantas

erradicadas no estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro foi de 348.986 plantas (Fundecitrus, 2010). Futuramente pode haver um aumento na incidência da doença devido à diminuição no rigor da legislação, visto que a Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo revogou a obrigatoriedade da erradicação dos talhões quando a infestação superar o percentual de 0,5%.

## 1.2 Cancro cítrico

O cancro cítrico ataca todas as variedades e espécies de citros, causando lesões salientes nas folhas, ramos e frutos (Figura 1). Estas erupções locais atingem de dois até doze milímetros de diâmetro ou mais, possuem cor palha e aspecto corticoso devido ao rompimento da epiderme (Rossetti, 2001). As erupções são circundadas ou não por um halo amarelo, associado ao decréscimo de clorofilas a e b, caroteno e xantofila (Padmanabham *et al.*, 1973). Em folhas, as lesões ocorrem dos dois lados e em frutos, quando em estágio avançado, ocorre a ruptura da casca, resultando na dispersão do patógeno.

Esses sintomas em si não são o principal problema porque raramente são letais para a planta. Porém, um dos efeitos da doença é o aumento do hormônio etileno em resposta ao estresse biótico provocando a queda prematura das folhas e frutos, tornando estes inapropriados para consumo (Crozier *et al.*, 2001), o que leva à diminuição na produtividade e prejuízos financeiros para o citricultor.



Figura 1. Lesões provocadas pelo cancro cítrico em folhas, ramos e frutos. O fruto está próximo de ter sua casca rompida devido à proliferação de *Xac*. Fonte: Fundecitrus, 2010.

A dispersão da doença ocorre rapidamente, contaminando plantas vizinhas, chegando até pomares de outras propriedades (Figura 2). A transmissão a curta distância é

feita principalmente pelo vento e água de chuvas, enquanto a longas distâncias a transmissão pode ocorrer pelo trânsito indiscriminado de pessoas pelos pomares, mudas, material de colheita e veículos contaminados (Fundecitrus, 2010).

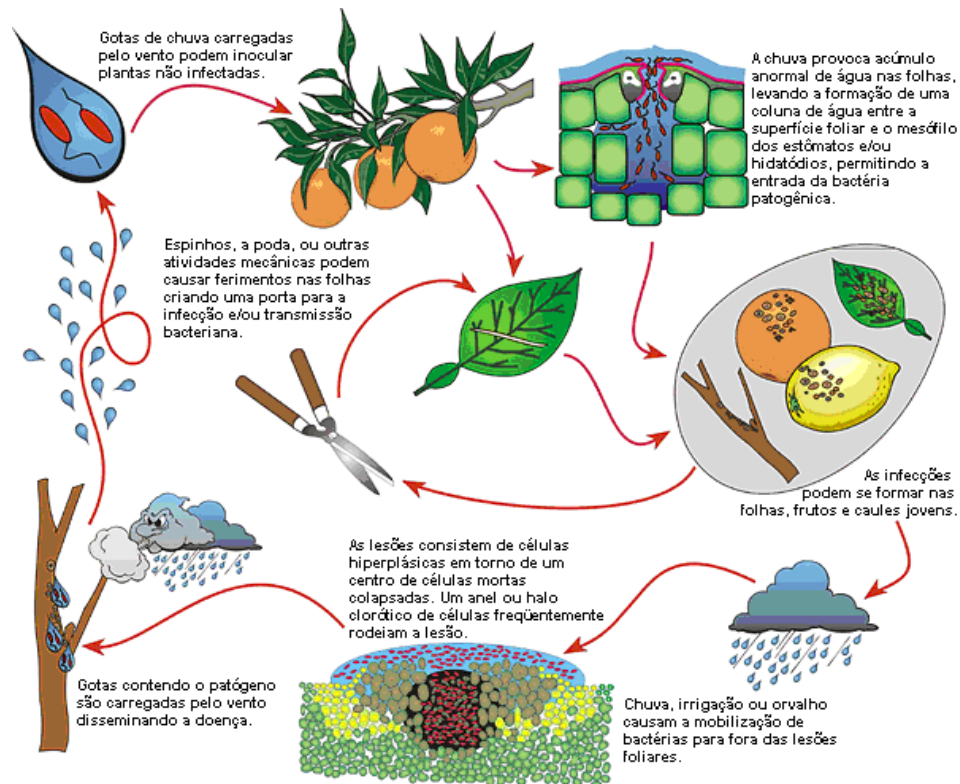


Figura 2. Ciclo do Cancro Cítrico. Fonte: *Plant Management Network*, 2010 (com modificações por Ferreira, C., 2009).

### 1.3 O agente etiológico

O agente etiológico do cancro cítrico é uma bactéria aeróbica obrigatória, com metabolismo oxidativo, não fixadora de nitrogênio, uniflagelada polar, não formadora de esporos, Gram-negativa, pertencente ao gênero *Xanthomonas* (do grego, “xanthos” = amarelo; “monas” = unidade) (Hayward, 1993). Este é um grupo diverso e economicamente importante, sendo considerado um dos grupos de fitopatógenos mais dispersos na natureza, podendo infectar em torno de 120 tipos de monocotiledôneas e 270 de dicotiledôneas (Leyns, 1984).

A forma mais propagada e agressiva do cancro cítrico é a cancrase A (cancro cítrico asiático). Seu agente etiológico foi identificado e isolado primeiramente por Hasse (1915) que, após provar a sua patogenicidade, classificou-o como *Pseudomonas citri*. Cerca

de 80 anos depois a bactéria foi reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Vauterin *et al*, 1991). Em 2006, seu nome foi modificado para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad *et al*, 2006). Esta bactéria ataca quase todas as espécies de citros e pode ser encontrada na Ásia, Oceania e Américas.

Outras bactérias foram descritas como causadoras de tipos diferentes de cancro cítrico (Rossetti, 2001): *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (Schaad *et al*, 2005), patogênica somente a limões verdadeiros e limas ácidas, a qual induz o “cancro cítrico B” ou “cancrose B” e restringe-se a Argentina, Paraguai e Uruguai (Civerolo, 1984); *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, (Schaad *et al*, 2005; 2006), a qual tem como único hospedeiro específico a lima ácida galego, causa a “cancrose do limoeiro galego” ou “cancrose C”, encontrada apenas em São Paulo, Brasil (Malavolta Jr *et al*, 1984).

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* ataca quase todas as espécies de citros possuindo, portanto, uma gama ampla de hospedeiros, enquanto *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C ataca praticamente um hospedeiro único (Civerolo, 1984). Por outro lado, a estirpe *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B infecta a planta de maneira menos agressiva e mais lenta que *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Figura 3). No entanto, nenhuma espécie de citros é resistente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* quando esta é inoculada artificialmente, sugerindo que não há verdadeira resistência genética contra esta bactéria, e que a tolerância de algumas espécies de citros no campo se deve à variação do *habitat* em que a planta está sendo cultivada (Brunings; Gabriel, 2003). Tipagem de sequências *multilocus* e outras análises moleculares (Cubero; Graham, 2002; Leite *et al*, 1994) mostraram que o tipo B e o tipo C são mais proximamente relacionados entre si do que com a *citri*.

Os organismos estudados neste trabalho não possuem nomes universalmente aceitos, dessa forma seguiremos procedimento adotado por Moreira *et al* (2010), ou seja, utilizaremos abreviações de acordo com os prefixos de lócus anotados nos genomas. Para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* será *Xac* (da Silva *et al*, 2002), para *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B, *XauB*, e para *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, *XauC* (Moreira *et al*, 2010). Para se referir aos três organismos coletivamente usaremos o termo “linhagens do cancro cítrico”.

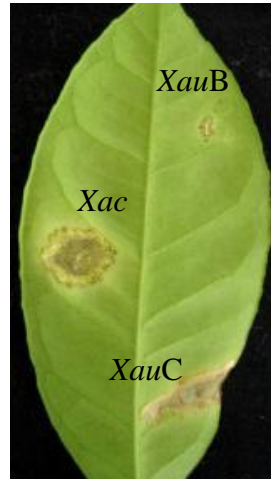


Figura 3. Sintomas induzidos em folha de limão cravo após inoculação com *Xac*, *XauB* e *XauC*. Fonte: Carvalho, 2006.

#### 1.4 Mecanismos de interação planta-patógeno

A bactéria é capaz de sobreviver fora do hospedeiro, mas ao entrar em contato com a planta coloniza o seu mesófilo, causando a doença (Graham *et al*, 2000). Durante o processo de infecção, a bactéria passa por uma fase epífita até que consiga entrar no hospedeiro por aberturas naturais da planta como estômatos, hidatódios e lenticelas ou por regiões submetidas a ferimentos mecânicos, como os provocados por ventos muito fortes. O minerador dos citros (*Phyllocnistis citrella* Staiton), uma larva que se alimenta principalmente de folhas, causando ferimentos nestas, aumenta a probabilidade das infecções, pois facilita o acesso da bactéria aos tecidos do hospedeiro (Bergamin Filho *et al*, 2000; Gravena, 1998).

Uma vez que a bactéria tenha penetrado na planta, diversas reações ocorrem em ambas as partes, numa relação co-evoluída entre eles (Baker *et al*, 1997). A bactéria precisa sobreviver, obter nutrientes e se multiplicar num ambiente hostil, e para isso usa um complexo mecanismo envolvendo muitos genes, inclusive alguns ligados à patogenicidade e virulência e seus produtos. A planta, por sua vez, precisa reconhecer a bactéria e ativar a resposta específica a esta. Deste modo, ocorre uma interação entre patógeno e hospedeiro de forma que para cada proteína de ataque produzida o outro responde com uma proteína de defesa, sendo esta interação conhecida como “Teoria gene-a-gene” (Flor, 1971). Esta interação pode ser classificada como compatível e incompatível.

A interação compatível ocorre com plantas mais susceptíveis, onde a bactéria, por diversos mecanismos, acaba mascarando os mecanismos de defesa do hospedeiro. Ocorre posteriormente a manifestação dos sintomas da doença através de mecanismos de

patogenicidade e virulência da bactéria, que podem envolver a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta hospedeira. Com isso, a resposta da planta pode ser modulada, interferida ou suprimida (White *et al*, 2000) e a planta não consegue responder em intensidade e tempo suficiente de conter a bactéria.

Na interação incompatível, o patógeno é restringido ao sítio de infecção, onde ocorre a identificação da bactéria pela planta. O mecanismo pelo qual isso se dá envolve o gene de avirulência (*avr*) do patógeno que codifica uma proteína efetora (*Avr*). Esta proteína pode reagir especificamente com um receptor na membrana celular da planta hospedeira, codificado pelo gene de resistência, a proteína *R* correspondente (Flor, 1971; Keen, 1990). Assim, a presença do gene *avr* torna o patógeno não-virulento se a planta tiver o gene *R* específico. Se um dos genes *avr* ou *R* não existir ou não for funcional na planta ou no agente patogênico, não há reconhecimento, nem resistência e a doença se instala. A interação entre proteínas *Avr* e *R* leva à resposta de defesa da planta, caracterizada pela reação de hipersensibilidade (*HR*, “Hipersensitivity Response”). Isto pode acarretar na morte localizada das células infectadas (atacadas e adjacentes), o que leva ao bloqueio da bactéria (Goodman; Novacky, 1994; Staskawicz *et al*, 1995).

O agrupamento de genes *rpf* (fatores reguladores de patogenicidade) presente na bactéria também está diretamente relacionado à interação planta-patógeno. Este é responsável por controlar a produção de fatores de patogenicidade importantes como as proteases, endoglucanases, poligalacturonato liases e polissacarídeos extracelulares (como a goma xantana), que influenciam na severidade dos sintomas, agindo sinergisticamente para causar doença (Barber *et al*, 1997; Dow *et al*, 2000). Esse agrupamento é composto de 9 genes, *rpfABFCHGDIE*, e os gêneros *Xanthomonas* e *Xylella* são os únicos organismos conhecidos que possuem este agrupamento.

Estudos têm mostrado ainda o papel de um grupo de genes bacterianos chamados genes *hrp* (*Hypersensitive Response and Pathogenicity*; ou Resposta de Hipersensibilidade e Patogenicidade) tanto na patogenicidade em plantas susceptíveis, quanto na indução de Resposta de Hipersensibilidade (*HR*) em plantas resistentes ou não hospedeiras (Bonas; Van Den Ackerveken, 1997). Os genes *hrp* são essenciais para a patogenicidade e indução de *HR*, indicando que a funcionalidade dos genes *avr* depende dos genes *hrp* (Dangl, 1994). Esses genes são controlados por sinais ambientais, tais como osmolaridade, pH e disponibilidade de nutrientes (Rahme *et al*, 1992).

Assim como muitas bactérias Gram-negativas fitopatogênicas, *Xac* possui sistemas especializados que injetam macromoléculas em seus hospedeiros durante o processo infeccioso, geralmente proteínas, que atuam com funções específicas durante a infecção e são requeridas para o desenvolvimento da doença (Büttner; Bonas, 2002). Dentre os sistemas de secreção existentes, *Xac* possui em seu genoma regiões para os sistemas de secreção tipo I, II, III e IV (da Silva, 2002) (Figura 4).

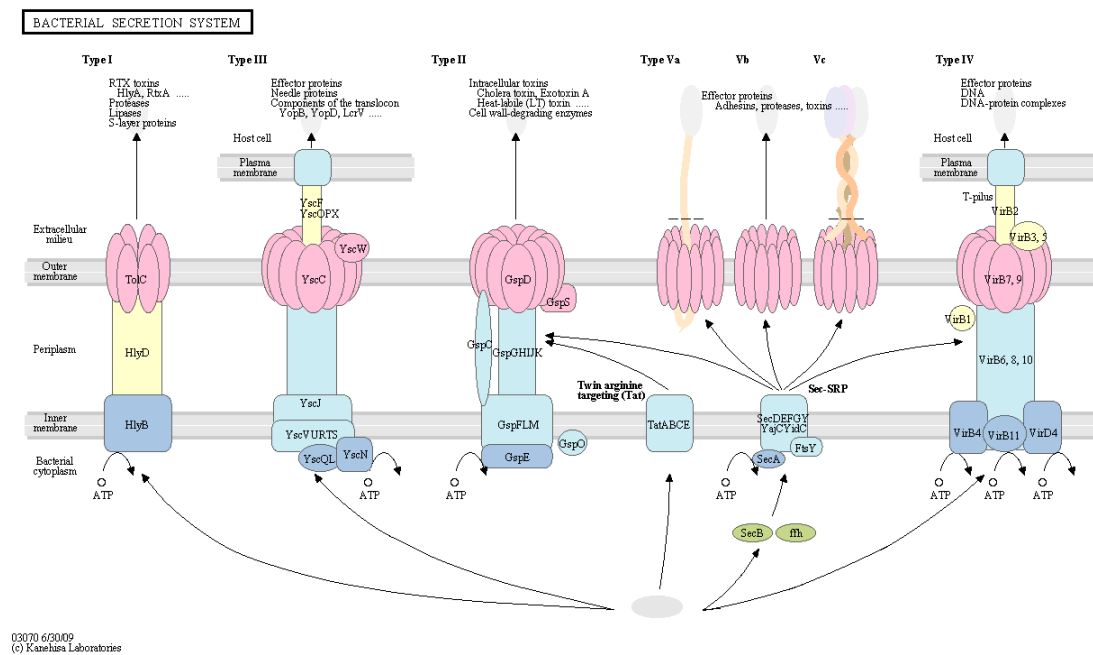


Figura 4. Sistemas de secreção em bactérias Gram - negativas. Fonte: Kegg pathway, 2010

O sistema de secreção tipo I (SSTI) é amplamente disperso em bactérias Gram-negativas, sendo que este permite a secreção de proteínas de diversos tamanhos e funções. Ele é formado por um translocador, composto de três proteínas, que atravessa o envelope celular. Uma dessas proteínas é uma proteína de membrana externa e as outras duas são proteínas da membrana citoplasmática: *ATP-binding cassette* (ABC), *membrane fusion, or adaptor protein* (MFP), representadas na Figura 4 pelas proteínas TolC, HlyB e HlyD de *Escherichia coli*. O sistema de secreção tipo I é independente de Sec (sistema secretório geral conservado) e sua via se desvia do periplasma. As proteínas com um sinal de secreção não clivado no C-terminal reconhecem a proteína ABC, disparando o processo (Delepelaire, 2004).

O sistema de secreção tipo II (SSTD) está presente em muitas bactérias Gram-negativas fitopatogênicas. Ele é responsável por mediar a secreção de proteínas como celulases, pectato liases, proteases, toxinas e alcalino fosfatases no ambiente (Brunings;



Gabriel, 2003). O sistema tipo II é composto por pelo menos 12 proteínas envolvidas no transporte de proteínas através da membrana externa. Num primeiro passo as proteínas a serem exportadas para o meio externo são sintetizadas como precursores contendo um peptídeo sinal. Após a “quebra” do peptídeo sinal, as proteínas ‘maduras’ passam pela membrana citoplasmática através do sistema Sec e são depositadas no periplasma. A partir daí o sistema de secreção tipo II é o responsável pela passagem destas pela membrana externa (Filloux, 2004).

No sistema de secreção tipo três (SSTT), a bactéria “percebe” a planta, ou as condições do ambiente como favoráveis, o que ativa a sua maquinaria protéica e o SSTT. Os genes ativados (*hrp*) produzem uma estrutura de adesão com a célula, o *pilus* (Figura 4). Através deste, e da formação de um poro condutor, proteínas são transferidas diretamente para o citosol da célula hospedeira, atravessando as duas membranas da bactéria e a membrana do vegetal. Uma destas proteínas são as Avr, que em plantas resistentes causam uma reação de hipersensibilidade (RH). Acredita-se que algumas das proteínas transportadas possam causar os sintomas de infecção na planta hospedeira. Evidências mostram que algumas proteínas que são enviadas para a célula hospedeira podem estar relacionadas com a ativação, direta ou indireta, da maquinaria protéica do núcleo celular a favor da bactéria patogênica (Büttner; Bonas, 2002).

Muitas bactérias utilizam a maquinaria de conjugação para exportar moléculas durante a infecção. Esses sistemas são membros da família de secreção tipo IV ou “conjugação adaptada” (Christie; Vogel, 2000). O sistema de secreção tipo IV (SSTQ) requer contato célula a célula, e assim como o SSTT envolve a formação de um *pilus* (Christie, 1997). O sistema de secreção tipo IV é responsável pela transferência de complexos de proteínas- ácidos nucléicos durante a conjugação bacteriana (Christie; Vogel, 2000). Em *Agrobacterium tumefaciens* este sistema atua na translocação do T-DNA oncogênico para o interior de células de plantas hospedeiras (Christie, 1997). Sabe-se também que proteínas chaperonas são necessárias (Khater *et al*, 2005) e que há interações proteína-proteína específicas em *Xac* nesse sistema (Alegria *et al*, 2005).

### **1.5 Estudos com *Xanthomonas* sp. causadoras do cancro cítrico – Era genômica e pós-genômica**

Devido à fácil disseminação, ao alto potencial destrutivo, à falta de controles curativos eficientes para o cancro cítrico e à grande importância econômica da citricultura

para o país, a bactéria *Xac* (linhagem 306) teve seu genoma completamente sequenciado (da Silva, 2002). Mais recentemente, o genoma de *XauB* e *XauC* foi também sequenciado e comparado *in silico* com o de *Xac* e de outras espécies de *Xanthomonas* (Moreira *et al*, 2010). Genes reconhecidos previamente como contribuintes para a virulência em *Xac* (Laia *et al*, 2009) foram identificados como diferenciais na comparação com os outros genomas de *XauB* e *XauC*, podendo, por este motivo, estar relacionados tanto com a virulência como aos tipos de citros hospedeiros, devido ao fato de as três linhagens de cancro cítrico diferir nesses aspectos (Moreira *et al*, 2010).

O genoma de *Xac* apontou algumas características particulares, que devem estar relacionadas com a capacidade de adaptação ao hospedeiro. Em seu genoma foram encontrados genes codificadores de enzimas degradativas de parede celular e de transporte de açúcares, genes codificadores de proteínas com possível função de efetoras de virulência associadas ao SSTT, genes de biossíntese da goma xantana e de um completo sistema flagelar e de quimiotaxia (Moreira *et al*, 2004).

Anteriormente à fase genômica, Mehta e Rosato (2001) utilizaram ferramentas de análise proteômica (2D-PAGE e sequenciamento N-terminal de proteínas) para estudo da interação de *Xac* com extrato de folha da planta-hospedeira, sendo identificadas cinco proteínas diferencialmente expressas entre as condições estudadas. A disponibilização da sequência genômica de *Xac* (da Silva *et al*, 2002) possibilitou alavancar estudos funcionais da bactéria, bem como da interação planta-patógeno, os quais atualmente têm sido realizados no Brasil por vários grupos, utilizando diferentes estratégias. Dentre essas estratégias destacam-se: análise de mutantes (Baptista, 2006; Ferreira, C., 2009), da expressão gênica (Carvalho, 2006), do transcriptoma (Cernadas *et al*, 2008; Laia, 2007; 2009), e da proteômica (Facincani, 2007), incluindo a análise proteômica da fração extracelular, o denominado “secretoma” (Ferreira, R., 2009).

A proteômica, considerada uma análise em larga escala da expressão protéica, é uma das áreas centrais da genômica funcional. Os atuais avanços técnicos permitem resolver e identificar centenas ou milhares de proteínas a partir de extratos protéicos complexos. As técnicas comumente usadas envolvem separação por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) (Gorg, 2004) ou cromatografia, aliada à espectrometria de massas. Estas técnicas possibilitam a obtenção de informações de proteínas envolvidas diretamente em diferentes situações metabólicas e fisiológicas de um dado organismo, e ainda a detecção de modificações pós-traducionais (Anderson; Seilhamer, 1997).

A estratégia de análise proteômica de frações celulares utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é uma estratégia interessante, pois permite que um maior número de proteínas pouco abundantes seja detectado, comparativamente à análise do extrato total. Além disso, é conhecida a estreita relação entre certas proteínas que passam pelo periplasma de células Gram-negativas (Figura 5) (como por exemplo celulases) e o processo de interação/infecção de *Xac* com o hospedeiro por meio do sistema de secreção tipo II (Baptista, 2006). Assim, é possível que a fração periplasmática concentre um dos maiores diferenciais em termos de expressão protéica para diferentes agentes do cancro cítrico.

Proteínas diferenciais, uma vez identificadas, poderiam se constituir, por exemplo, em marcadores a serem explorados para fins de aplicação biotecnológica. Marcadores específicos poderiam auxiliar no diagnóstico do tipo de linhagem presente em plantas infectadas no campo e na decisão de se eliminar ou não outros tipos de citros nas proximidades de um determinado foco da doença, evitando grandes devastações. Além disso, proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens do cancro cítrico, cujo envolvimento com a virulência ou tipo de hospedeiro fosse comprovados, poderiam consistir em alvos efetivos para o *design* de drogas de combate à doença.

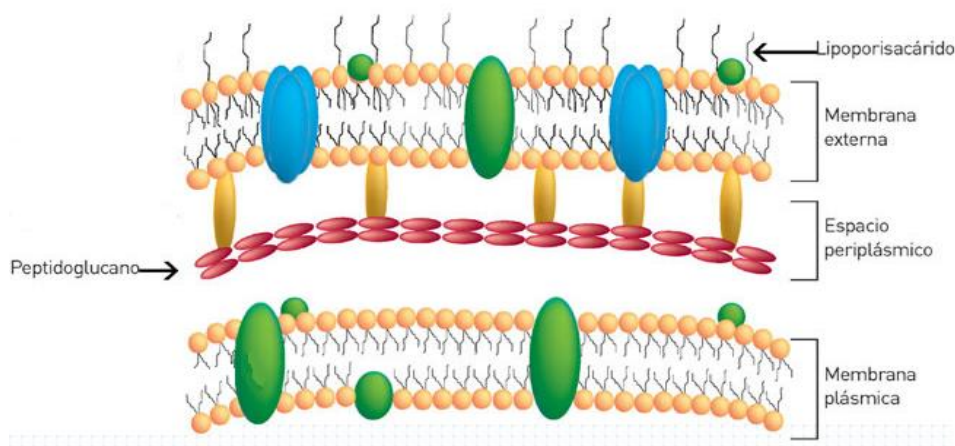


Figura 5. Membrana de bactéria Gram-negativa. Observar o espaço periplasmático entre membranas interna e externa. Fonte: Conacyt, 2010, com modificações.

A estratégia de 2D-PAGE para análise proteômica diferencial da linhagem 306 de *Xac* em condição infectante e não-infectante já foi realizada por Facincani (2007), tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, a autora analisou o extrato protéico total, sendo que a fração periplasmática não foi estudada até o momento nesta ou em outras linhagens do cancro cítrico. Trabalhos previamente realizados em nosso laboratório evidenciaram por SDS-PAGE

que a fração periplasmática de *Xac* apresenta alterações acentuadas em seu perfil em situação de indução da patogenicidade *in vitro* (relativamente à condição de não-indução), quando comparadas com as alterações observadas em outras frações investigadas (citosol e membrana), ainda que de forma exploratória, nessas mesmas condições (Artier, 2008).

A análise proteômica diferencial do periplasma de *Xac* em situação não infectante e infectante pode auxiliar na elucidação de questões ainda em aberto dos mecanismos de interação entre *Xac* e seu hospedeiro cítrico ou levar à seleção de proteínas envolvidas com a indução da fitopatogenicidade e/ou que apresentem um potencial como biomarcador entre as linhagens do cancro cítrico. Assim, o presente trabalho vem complementar os estudos pós-genômicos de *Xac* e se constitui em um importante passo para a análise proteômica comparativa entre as linhagens-genoma de *Xanthomonas* sp. causadoras do cancro cítrico, objetivo de um projeto Jovem Pesquisador financiado pela FAPESP, atualmente em andamento em nosso laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (DGE/UFSCar).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi a identificação, por análise proteômica diferencial, de proteínas periplasmáticas de *Xac* que estejam potencialmente envolvidas com a sua fitopatogenicidade *in vitro*, além de avaliar a potencialidade de proteínas diferencialmente expressas para utilização como biomarcador.

### 2.2 Específicos

- análise preliminar por SDS-PAGE dos perfis de proteínas periplasmáticas das linhagens-genoma *Xac*, *XauB* e *XauC*, nas condições de cultivo *in vitro*, em meio não indutor vs. meio indutor de patogenicidade, seguida da caracterização parcial das principais proteínas diferenciais de *Xac* por seqüenciamento N-terminal;

- curvas de crescimento das linhagens-genoma do cancro cítrico;

- análise por 2D-PAGE (triplicatas) da fração de proteínas periplasmáticas de *Xac* (linhagem virulenta de maior gama de hospedeiros), nas duas condições de cultivo (não indutor vs. indutor) e análise estatística da expressão das proteínas diferencialmente expressas nessas condições;

- identificação das principais proteínas diferenciais por espectrometria de massas/ pesquisa em bancos de dados (ferramenta Mascot);

- avaliação da expressão, em outras linhagens do cancro cítrico, de proteína(s) pertencente(s) a um *spot* com evidente aumento da expressão em situação de indução de patogenicidade em *Xac*, por meio de *Western blot* com anticorpos produzidos contra proteína(s) deste *spot* (isolado a partir de géis 2D).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

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

As linhagens-genoma do cancro cítrico utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Fundecitrus: *Xac* (306= FDC12); *XauB* (11122= FDC1631); *XauC* (10535= IBSBF338= FDC1632). As bactérias foram estocadas em meio Caldo Nutriente Difco (CN) com glicerol 16% a - 80°C. O meio sólido utilizado foi o Agar Nutriente Difco (AN), e o crescimento foi realizado a 28°C.

Para a realização dos experimentos as linhagens foram cultivadas em meio não indutor de patogenicidade (CN) e em meio indutor de patogenicidade (XAM1). O meio XAM1 foi utilizado para simular *in vitro* a indução conferida pelo hospedeiro cítrico. Esse meio de cultura é uma variação do XVM2, conhecido por ser indutor de patogenicidade em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, mimetizando o espaço apoplástico da planta hospedeira. XAM1 mostrou-se indutor da expressão de genes do sistema hrp, cujas proteínas constituem marcadores de indução de patogenicidade e virulência (Carvalho, 2006; Laia, 2007).

O cultivo da bactéria para a extração de proteínas foi realizado conforme esquematizado na Figura 6. Uma alça de Koole de 10 µL “cheia” de células (obtida a partir do meio sólido) foi inoculada em 80 mL de CN (pré-inóculo). Após o crescimento até o final da fase exponencial (densidade óptica -DO- de aproximadamente 1,2, conforme resultados da curva de crescimento, item 4.2.), células provenientes de um volume de 20 mL do pré-inóculo, obtidas após centrifugação, foram inoculadas em 400 mL de meio de cultura não indutor, sendo tal procedimento realizado em duplicata. O mesmo procedimento foi adotado para o meio indutor (Figura 6). O cultivo da bactéria foi realizado a 28°C e 200 rpm.

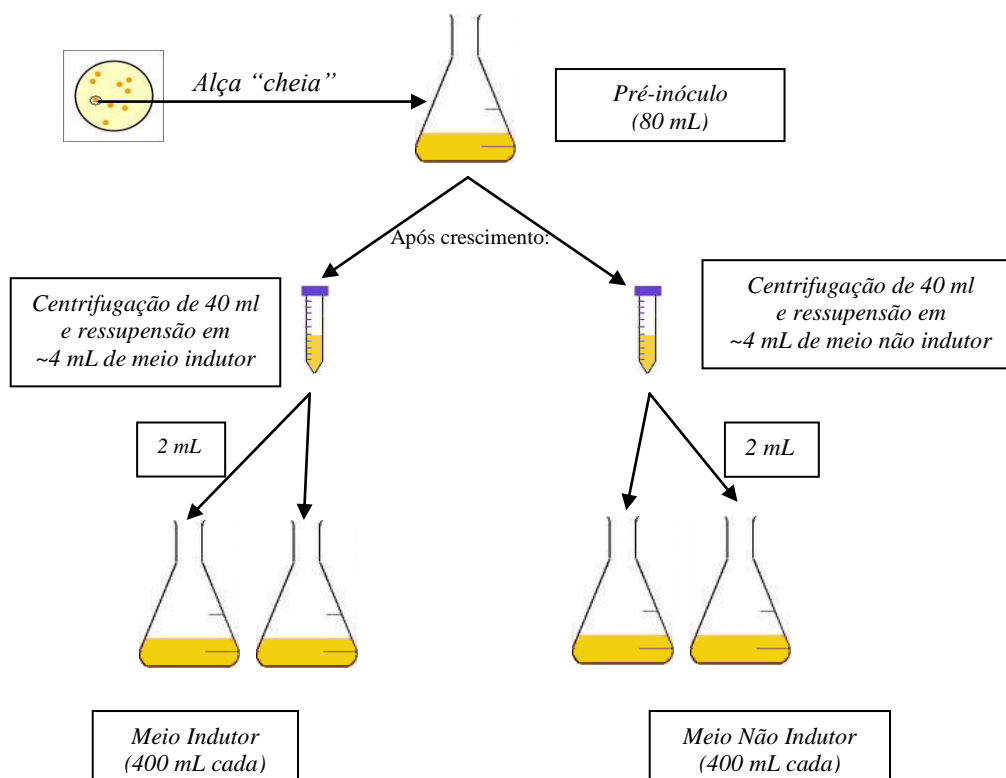


Figura 6. Esquema para cultivo das bactérias em meio indutor e não indutor de patogenicidade para os experimentos de extração de proteínas da fração periplasmática.

### 3.2 Análise preliminar da fração protéica periplasmática das linhagens-genoma do cancro cítrico

A extração de proteínas das três linhagens-genoma A, B e C foi realizada segundo procedimento padronizado por Artier (2008) a partir de metodologias descritas por Hu (1995) e Coligan (2000). As proteínas periplasmáticas dessas linhagens foram separadas por SDS-PAGE 14% (Laemmli, 1970), sendo a corrida realizada em sistema "Mini-Protean II" (Bio-Rad) em tampão contendo 0,3% Tris, 1,5% glicina e 0,1% SDS, com voltagem constante de 110V, por 2 horas. A partir da análise dos perfis de proteínas periplasmáticas algumas bandas, com aparente expressão diferencial, foram caracterizadas pelo sequenciamento da sua região amino-terminal (N-terminal), como descrito a seguir.

As proteínas do gel foram transferidas para membranas de PVDF ("polyvinylidene difluoride" – Hybond, Amersham Biosciences) de acordo com Matsudaira (1987). Os géis foram mantidos em tampão de transferência contendo 10 mM de CAPS (3-[ciclohexilamino]- 1-ácido propanosulfônico), 10% de metanol, pH 11 (ajustado com NaOH), durante 15 minutos (min). As membranas foram tratadas com metanol (100%) por 10

segundos, lavadas em água deionizada por 5 min e mantidas em tampão de transferência por 10 min. O processo foi realizado em sistema de transferência para mini-géis (Bio-Rad), sob agitação lenta, durante 2 horas, com corrente constante de 250 mA. A membrana foi corada com solução de 0,1% Coomassie Blue R-250, 50 % metanol durante 2 min e descorada em solução 5% de metanol, 10% de ácido acético (Matsudaira, 1993). Bandas diferenciais foram isoladas e tiveram sua região N-terminal sequenciada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob coordenação da Profa. Dra. Heloisa S. S. de Araújo. Analisamos as seqüências através do *software* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para proteínas (BLASTp), em banco de dados de *Xac* (NCBI).

### **3.3 Curvas de crescimento *in vitro***

As curvas de crescimento *in vitro* foram realizadas em 80 mL de CN para as três linhagens-genoma do cancro cítrico (A, B e C) de forma exploratória, e em 400 mL dos meios CN e XAM1 para a linhagem A (*Xac*) com no mínimo três réplicas. Os valores de densidade óptica (DO) foram medidos em espectrofotômetro ( $\lambda = 595$  nm), em função do tempo, a partir do momento inicial da adição do inóculo ao meio.

### **3.4 Extração de proteínas da fração periplasmática para a análise proteômica em *Xac***

A extração de proteínas periplasmáticas foi realizada, com modificações, segundo procedimento padronizado por Artier (2008) a partir de metodologias descritas por Hu (1995) e Coligan (2000).

Testamos a adição dos seguintes inibidores de proteases durante a extração: 1mM PMSF/ 5 mM EDTA ou 10  $\mu$ L/ mL coquetel inibidor de protease (GE) /5 mM EDTA, sendo que a comparação exploratória dos perfis protéicos foi realizada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Posteriormente optamos por alterar a concentração de EDTA de 5 para 1 mM (Simpson, 2003). Com base nos resultados obtidos, a metodologia adotada foi a descrita a seguir.

A cultura (800 mL) em final da fase exponencial de crescimento foi centrifugada a 10.000 x g (Sorvall RC5C Plus) por 20 min a 4°C para a obtenção das células. O sobrenadante (meio) foi descartado. As células foram lavadas em tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,9% NaCl, 1 mM EDTA (pH8), 10  $\mu$ L/mL de Coquetel Inibidor de



Protease (GE). A seguir as células foram suspensas em tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8), 20 % sacarose, 1 mM EDTA (pH8), 10 µL/mL de Coquetel Inibidor de Protease (GE) e lisozima (3 mg/mL), sendo que esta última foi adicionada somente após a suspensão das células no tampão. Após 1 hora em gelo a solução foi centrifugada a 11.000 x g por 30 min a 4°C (Sorvall RC5C Plus) para sedimentação dos esferoplastos, resultantes da ação da lisozima.

Ao sobrenadante (fração enriquecida em proteínas periplasmáticas) foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 10% (concentração final) e, após agitação em vortex, a solução foi mantida em gelo durante 30 min para precipitação das proteínas. A solução foi centrifugada a 16.000 x g por 10 min a 4°C (Eppendorf 5415R), e o precipitado lavado com etanol (70%) gelado de 3 a 4 vezes. Após completa secagem à temperatura ambiente, as proteínas foram suspensas em 300 µL de tampão contendo 7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 40 mM DTT, 1 mM EDTA (pH8), 10 µL/mL de Coquetel Inibidor de Protease (GE).

A quantificação das proteínas nos extratos foi determinada segundo metodologia descrita por Bradford (1976).

### **3.5 Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de *Xac***

#### **3.5.1 Separação das proteínas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)**

Amostras contendo 260 µg de proteínas foram purificadas utilizando-se o kit 2-D Clean Up (GE). O precipitado foi suspenso em tampão contendo 8M uréia, 4% CHAPS, 50 µL DeStreak Rehydration Solution (GE) e 1,25 µL IPG Buffer pH 3-10, para um volume total de 250 µL. Estas soluções foram então aplicadas em tiras de 13 cm com gradiente linear de pH de 3 a 10 (Immobiline DryStrip, GE). As tiras foram hidratadas *overnight*, e após este período introduzidas em sistema de focalização isoeletrica Ettan IPGphor III. O protocolo seguido para a isoeletrofocalização foi: 100V por 1h; 500V até atingir 500Vh; 1000V até 800Vh; 8000V até 11.300 Vh; 8000V até 2900 Vh; 100 V até retirar a tira; totalizando 16600 Vh.

Após a isoeletrofocalização, as tiras foram equilibradas com tampão contendo 6M uréia, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol e 10mg/mL DTT (para redução das proteínas). Em seguida foi utilizado esse mesmo tampão,

substituindo-se o DTT por 25mg/mL iodoacetamida (IAA) (para alquilação), sendo que cada incubação foi realizada por 15 min, com baixa agitação.

A eletroforese da segunda dimensão foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se gel de 12,5% de poliacrilamida em sistema Hoefer SE600 (GE) em tampão de corrida contendo 0,3% de Tris, 1,5% de glicina e 0,1% SDS, a 15°C (sistema de refrigeração *Multitemp III*, da GE). A corrida foi realizada mantendo-se a corrente elétrica fixa de 45 mA/gel por aproximadamente 2 h. Foi utilizado o marcador de massa molecular BenchMark (Invitrogen). Os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,27% corante, 54% metanol, 13,5% ácido acético) por 20 min (sob agitação) e descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético.

Os géis foram documentados utilizando-se sistema Image Scanner (GE) - *software* LabScan 2.0, sendo analisados com o *software* Image Master 2D Platinum 7.0 (GE). Na análise dos géis, os mesmos foram alinhados por *bookmarks*, os *spots* detectados automaticamente e a comparação (*matching*) foi inicialmente realizada entre as triplicatas (para averiguar reprodutibilidade, duas a duas, por meio de gráficos de dispersão ou *Scatter Plots*) e depois entre as condições de indução/não indução de patogenicidade. Os valores experimentais de massa molecular (MM) foram obtidos em relação ao padrão e os de ponto isoelétrico (pI) a partir dos pontos inicial e final da tira *Immobiline DryStrip* (pH de 3 a 10). A quantificação dos *spots* foi calculada em termos de volume do pico (intensidade vs área) e a normalização realizada em termos de porcentagem do volume (% volume), onde 100% representa o volume de todos os *spots* no gel. A análise estatística da expressão diferencial foi realizada pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ), por meio do *software* Image Master 2D Platinum 7.0 (GE). Procedimentos estatísticos análogos têm sido descritos na literatura para a análise proteômica (Farinati, 2009; Fathi, 2009). Para isto, os experimentos foram realizados em triplicata (desde o processo inicial de cultura das células), tanto para as amostras controle como para as provenientes de condição de indução de patogenicidade.

### 3.5.2 Análise de proteínas diferenciais por espectrometria de massas

Os *spots* que apresentaram expressão diferencial significativa ( $p < 0,05$ ) entre as duas condições estudadas (cultivo em meio não indutor e em meio indutor de patogenicidade) foram isolados do gel e inseridos individualmente em tubos tipo eppendorf, previamente lavados com metanol, água ultrapura e novamente com metanol.

Realizamos a análise de espectrometria de massas no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), em Campinas, SP, com auxílio das técnicas Bianca Pauletti e Tais Dombroski. Com esse intuito, os *spots* foram tratados previamente (descoloração, redução e alquilação das proteínas) para posterior hidrólise das proteínas com tripsina, como descritos a seguir.

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

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

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

Os espectros MS/MS foram obtidos a partir da fragmentação dos íons precursores, sendo analisados por meio do *software* Mascot Distiller (versão 2.3.0). Para identificação das proteínas foi utilizada versão gratuita do *software* Mascot (Matrix Science). Os parâmetros usados foram: valores de massas monoisotópicos dos espectros MS/MS (MS/MS Ion Search), carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação

da metionina como modificação variável. Na hidrólise por tripsina foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos para MS e MS/MS foi de 0,1 Da. As buscas foram realizadas utilizando-se os bancos de dados não-redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBIInr), SwissProt High e de contaminantes (*Common contaminants compiled by Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried*). Consideramos os peptídeos identificados quando o valor da pontuação (*score*) da comparação, calculado pelo Mascot, foi superior ao nível de significância de homologia extensiva ou de identidade da proteína analisada com as proteínas de banco de dados.

### 3.6 Avaliação da expressão de proteínas de *Xac* em outras linhagens

Um *spot* que apresentou grande aumento de sua intensidade nos géis de *Xac* em situação de indução da patogenicidade (de acordo com a análise proteômica) teve a expressão de sua(s) proteína(s) analisada(s) em outras linhagens de cancro cítrico. Após produção em série de novos géis, 6 réplicas do *spot* escolhido foram coletadas, maceradas e solubilizadas em 200 µL de água ultra pura. Esta solução foi injetada em 2 camundongos fêmeas jovens (Biotério - UFSCar) para a produção de anticorpos. Após nova produção de igual número de géis, seguida da coleta dos *spots* e preparação de uma nova solução com o mesmo *spot*, como descrito anteriormente, houve a aplicação de uma segunda dose, após 49 dias. Devido à presença de acrilamida, as injeções foram realizadas via intradérmica. Após 10 dias da segunda inoculação os camundongos foram sacrificados. Essas etapas foram realizadas com o auxílio da Profa. Dra. Heloísa S. Selistre-de-Araujo (DCF, UFSCar). Após coagulação do sangue, este foi centrifugado por 14.500 rpm por 20 min a temperatura ambiente para a obtenção do soro.

A técnica de *Western blot* foi empregada para analisar a expressão da(s) proteína(s) provenientes do *spot* selecionado nas linhagens- genoma do cancro cítrico (A, B e C). As proteínas periplasmáticas dessas linhagens foram separadas por SDS-PAGE 14% (Laemmli, 1970), sendo a corrida realizada em sistema “Mini-Protean II” (Bio-Rad) em tampão contendo 0,3% Tris, 1,5% glicina e 0,1% SDS, com voltagem constante de 110V, por 2 horas. O padrão de massa molecular usado neste caso foi o *Prestained protein marker, broad range* (7-175 kDa), da BioLabs.

A transferência para membrana de nitrocelulose (Invitrogen) foi realizada no sistema já citado, em tampão de transferência (200 mM Tris, 50 mM glicina e 20% metanol) a

150 mA durante 2 horas. A membrana foi corada em solução de Ponceau (0,5% *Ponceau*, 0,1% ácido acético) possibilitando checar a eficiência da transferência e realizar a marcação na membrana, com o auxílio de uma agulha, do padrão de massa molecular. Feita a marcação, a membrana foi lavada em água e incubada overnight em solução de bloqueio (5% leite em pó desnatado em tampão TBS – 100 mM Tris, 70 mM NaCl, pH 8,0). Em seguida a membrana foi lavada três vezes durante 5 minutos em tampão TBS pH 8, 20% Tween 20 (Sigma) e então incubada com o anticorpo primário (1:100 em TBS) por 2,5 h. Após nova lavagem com TBS e Tween 20, como descrito anteriormente, a membrana foi incubada com anti-mouse IgG (Sigma) (1:1000 em TBS) por 90 min. A membrana foi novamente lavada com TBS e Tween 20 e a revelação foi realizada por adição do substrato - *AP Conjugate Substrate kit*, BioRad - para a enzima conjugada ao anticorpo secundário (anti- IgG de camundongo), a fosfatase alcalina.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise preliminar da fração protéica periplasmática das linhagens-genoma do cancro cítrico

Observando o perfil de proteínas periplasmáticas de *Xac*, *XauB* e *XauC*, observamos diferenças na intensidade de algumas bandas, entre as linhagens e entre as condições de estudo (não indução/ indução de patogenicidade) (Figura 7, notar setas). Isto indica uma aparente diferença na expressão das proteínas contidas nestas bandas do gel.

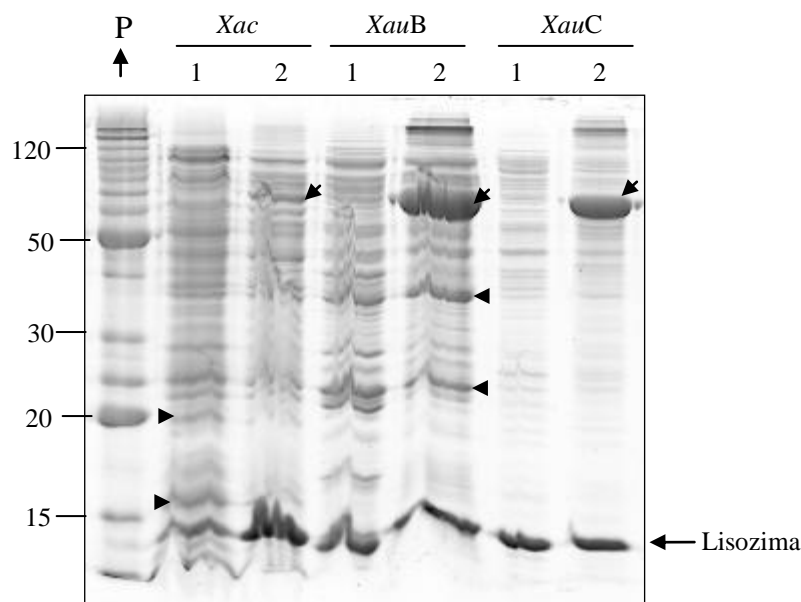


Figura 7. Perfil de proteínas da fração celular periplasmática (15  $\mu$ g) obtidas por SDS-PAGE (14%) após cultivo de *Xac*, *XauB* e *XauC* em meio não indutor de patogenicidade CN (1) ou meio indutor XAM1 (2). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular. A seta externa indica uma banda de cerca de 13 kDa, provavelmente correspondente a lisozima, utilizada no procedimento de extração da fração de periplasma. As cabeças de setas apontam algumas proteínas que aparentemente são expressas diferencialmente. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

Podemos notar que em *Xac* algumas proteínas periplasmáticas aparentemente tiveram sua expressão reprimida quando em situação de indução de patogenicidade, em relação a não indução de patogenicidade (Figura 7). Tanto *XauB* como *XauC* apresentaram uma banda com intensidade bastante aumentada entre 60-70 kDa, quando em situação de indução de patogenicidade. Algumas outras bandas do perfil de *XauB* aparentemente diminuiram quando em condição de indução patogenicidade. Com relação à *XauC*, a mesma

apresentou um perfil diferenciado quando em indução de patogenicidade, em relação ao controle (Figura 7).

A respeito dos perfis de proteínas periplasmáticas das linhagens, podemos observar que todas as linhagens evidenciam diferenças entre si. Porém, *Xac* e *XauB* aparentam ter um perfil mais semelhante do que o apresentado por *XauC*. Essas linhagens diferem na sua gama de hospedeiro, sendo a estirpe C de hospedeiro único, podendo tais diferenças estar relacionadas com proteínas periplasmáticas específicas, o que só poderá ser confirmado posteriormente, por análise proteômica comparativa.

Devido às diferenças citadas, e por *Xac* ser o objeto principal do nosso estudo, algumas bandas aparentemente diferenciais foram selecionadas do perfil de proteínas periplasmáticas desta linhagem. Para isso um novo gel foi produzido, e algumas bandas diferenciais (indicadas na Figura 8 por setas) foram selecionadas para seqüenciamento do seu amino-terminal, sendo o resultado observado na Tabela 1.

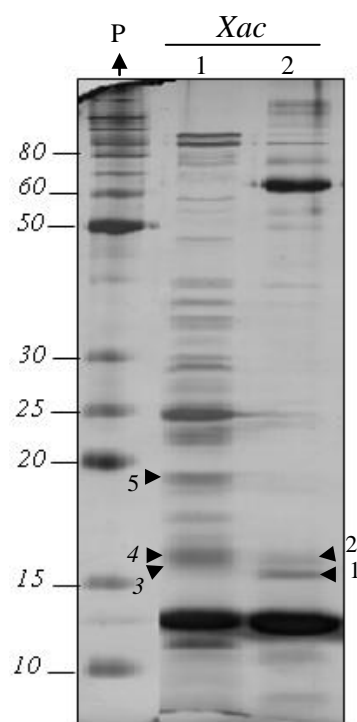


Figura 8. Perfil de proteínas da fração celular periplasmática (9 µg) de *Xac* obtidas por SDS-PAGE (14%) após cultivo em meio não indutor de patogenicidade CN (1) ou meio indutor XAM1 (2). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular. As setas numeradas de 1 a 5 indicam as bandas que foram isoladas da membrana de PVDF para o seqüenciamento do N-terminal. O gel foi corado com nitrato de prata.

Podemos observar que a comparação das seqüências obtidas com bancos de proteínas por BLASTp indica possibilidade de proteólise de proteínas do extrato, como

ocorreu no estudo da fração extracelular (Artier, 2008), sugerindo a necessidade do uso de inibidores de proteases durante a extração.

Adicionalmente, resultados obtidos anteriormente evidenciaram diferenças entre os perfis de proteínas periplasmáticas quando as amostras diferiram apenas quanto ao ponto da curva de crescimento em que as células foram coletadas para a extração (resultados não mostrados). Este resultado evidenciou a necessidade de se padronizar o momento da coleta das células para a extração de proteínas, indicando a importância do conhecimento da curva de crescimento da bactéria. Por este motivo, curvas de crescimento de *Xac* foram elaboradas para os meios utilizados neste trabalho (CN e XAM1), a fim de se determinar o final da fase exponencial de crescimento para cada um deles, momento em que se realizou a coleta das células para a análise proteômica.



Tabela 1. Análise da sequência N-terminal de algumas proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio não indutor (CN) vs. indutor de patogenicidade (XAM1).

1	~15	+MI	** 3 LIELMIVI 10 *** 9 LIELMIVI 16	Fimbrillin (100%)	15,1	XAC3241	<a href="#">NP_643549.1</a>
2	~16	+MI	2 VFGRH 6 12 VFGRH 16	ABC transporter ATP-binding protein (100%)	59,0	XAC2334	<a href="#">NP_642651.1</a>
3	~16	+MNI	1 KVFGHWM 7 257 KLFVWWM 263	Signal transducer (71%)	43,5	XAC3901	<a href="#">NP_644202.1</a>
4	~16	+MNI	3 QTGEP 7 518 QTGEP 522	oligopeptidase A (100%)	74,8	XAC3627	<a href="#">NP_643934.1</a>
5	~19	+MNI	1 AENC <b>SYNKPE</b> 10 337 AENC <b>DYN-PQ</b> 347	TonB-dependent receptor (80%)	101	XAC2535	<a href="#">NP_644361.1</a>

\* +MI indica maior expressão no meio indutor; +MNI indica maior expressão no meio não indutor;

\*\* O número indica a posição na sequência da proteína em análise;

\*\*\* O número indica a posição na sequência da proteína do banco de dados

Em azul os aminoácidos que não foram correspondentes.

## 4.2 Curvas de crescimento *in vitro*

As três linhagens-genoma de cancro cítrico apresentaram diferentes perfis de crescimento no meio CN (Figura 9). No geral, *Xac* apresentou velocidade de crescimento maior do que as outras duas estirpes, atingindo  $DO_{595nm}$  máxima maior (Figura 9 e 10). *XauC* apresentou um perfil de crescimento mais próximo ao de *Xac*, atingindo, porém, em 24 horas, uma menor densidade óptica máxima ( $DO_{595nm} \sim 1,1$ ), em comparação com a atingida por *Xac* ( $DO_{595nm} \sim 1,3$ ). A estirpe *XauB* apresentou um perfil de crescimento bastante diferenciado em relação às outras duas linhagens, atingindo  $DO_{595nm}$  máxima de apenas  $\sim 0,55$  em intervalo de tempo maior (de 25 a 42 horas).

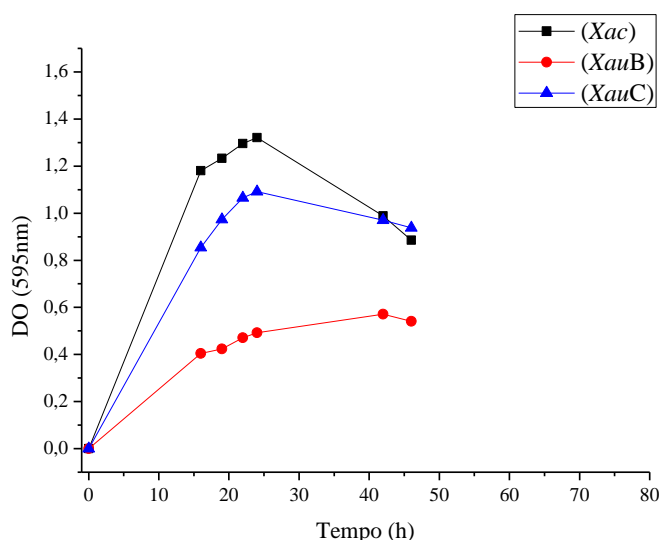


Figura 9. Curvas de crescimento das linhagens genomas de cancro cítrico (*Xac*, *XauB* e *XauC*) cultivadas em 80 mL de meio não indutor CN.

Sabe-se que *XauB* possui crescimento fastidioso em meio de cultura enquanto *Xac* e *XauC* crescem bem em NA e TSA (meio triptofano-sacarose-agar) (Rodrigues Neto *et al.*, 1986). Neste trabalho obtivemos resultado de crescimento das linhagens em CN semelhante ao observado na literatura para os meios acima citados.

O crescimento de *Xac* no meio indutor de patogenicidade (XAM1) mostrou-se muito mais lento do que em meio não indutor (CN) (Figura 10), o que se justifica pelo fato de o meio CN ser um meio mais nutritivo que XAM1. O crescimento no meio indutor possivelmente deve exigir mais da bactéria em termos metabólicos e requer um tempo maior para que a mesma possa se adaptar e atingir seu crescimento máximo ( $DO_{595nm} \sim 1,2$ ). A

diferença na DO entre os picos máximos de crescimento nos dois meios aparentemente não foi significativa (Figura 10). Entretanto, como o meio XAM1 simula o hospedeiro, e assim estimula a patogenicidade e virulência, a bactéria tem que ativar todo o seu mecanismo de sobrevivência nessas condições, o que leva provavelmente a um crescimento mais lento.

A análise da viabilidade celular (UFC/mL) realizadas para *Xac* seguiu o mesmo padrão das curvas realizadas com medidas da DO (resultados não mostrados).

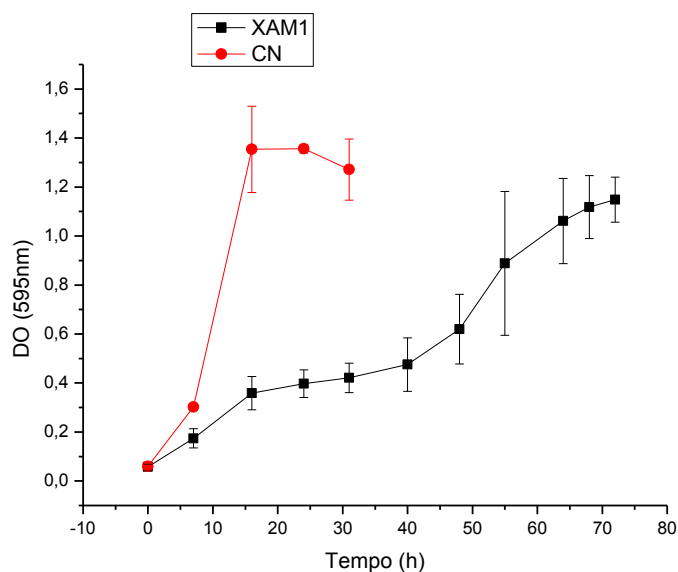


Figura 10. Curvas de crescimento de *Xac* cultivadas em 400 mL dos meios CN e XAM1.

Curvas de crescimento *in vitro* realizadas para *Xac* em meio de cultura TSA (triptona, sacarose, glutamato de sódio), mostraram resultados semelhantes ao obtido aqui em CN para *Xac* (Laia, 2007).

### 4.3 Padronização da extração de proteínas periplasmáticas

Em estudos anteriores dos perfis protéicos de frações celulares de *Xac* em SDS-PAGE (Artier, 2008) e da fração periplasmática (citado anteriormente), os resultados da análise das sequências N-terminal de algumas proteínas indicaram uma possível ação de proteases durante a extração. Para evitar este problema, a metodologia de extração de proteínas foi adaptada, adicionando-se inibidores de protease: 1mM PMSF/ 5 mM EDTA ou 10  $\mu$ L/ mL coquetel inibidor de protease (GE) / 5 mM EDTA (Figura 11).

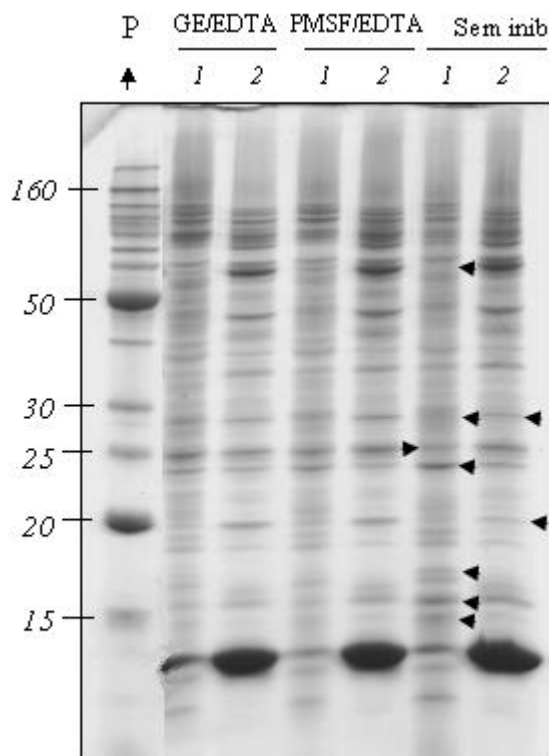


Figura 11. Padronização da extração de proteínas da fração celular periplasmática (15  $\mu$ g) pela análise por SDS-PAGE (14%) após cultivo de *Xac* em meio não indutor CN (1) ou meio indutor de patogenicidade XAM1 (2). A extração de proteínas foi realizada na ausência de inibidores de protease (sem inib); na presença de 10  $\mu$ L/mL de coquetel inibidor de protease (GE) / 5mM EDTA; ou com adição de 1mM PMSF/ 5 mM EDTA. Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P). As cabeças de setas apontam bandas que foram alteradas em relação à extração na presença de inibidores de proteases. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Entre os perfis obtidos sem adição de inibidores de protease (“sem inib”) e os obtidos com a adição de inibidores de protease (GE/EDTA ou PMSF/EDTA) são observadas diferenças, evidenciadas pelas setas indicativas na figura 11, resultado este que sugere a necessidade do uso de inibidores de protease durante a extração das proteínas dessa fração. A alteração observada não se deve à detecção de inibidores de natureza protéica contidos no coquetel utilizado, pois não foi possível detectá-los em gel conforme teste realizado em paralelo (resultados não mostrados).

Para este trabalho decidimos usar o coquetel inibidor de protease (GE) devido ao mesmo ser mais completo, atuando em diferentes tipos de proteases. Posteriormente, modificamos a concentração de EDTA de 5 para 1 mM como descrito na literatura (Simpson, 2003).

#### **4.4 Análise dos perfis protéicos de periplasma de *Xac* por eletroforese bidimensional e identificação das proteínas diferenciais**

##### **4.4.1 Análise das proteínas da fração periplasmática de *Xac* por 2D-PAGE**

Ao analisarmos o perfil de proteínas periplasmáticas de *Xac*, cultivada em condição de não indução e de indução patogenicidade, encontramos diferenças significativas na intensidade de vários *spots* no gel 2D (Figura 12). Utilizamos uma faixa de pH entre 3-10 com a finalidade de abranger uma faixa maior de proteínas, porém pode-se observar uma baixa resolução na faixa de pH básica, sendo este problema relatado na literatura como sendo comum em géis bidimensionais (Kane *et al*, 2006; ONG; Padley, 2001). Os géis apresentaram melhor resolução na região central (Figura 12 e 13), porém isto não prejudicou os resultados obtidos. Como pode ser observado na próxima seção, as proteínas identificadas por espectrometria de massas, com poucas exceções, possuem pI teórico correspondente à faixa central (pH 4-7) da tira de pH 3-10 utilizada na separação das proteínas na primeira dimensão. Os dados obtidos mostraram-se consistentes, não apresentando proteínas que não deveriam estar na faixa central, com pouquíssimas exceções que possivelmente se devem a artefatos da técnica.

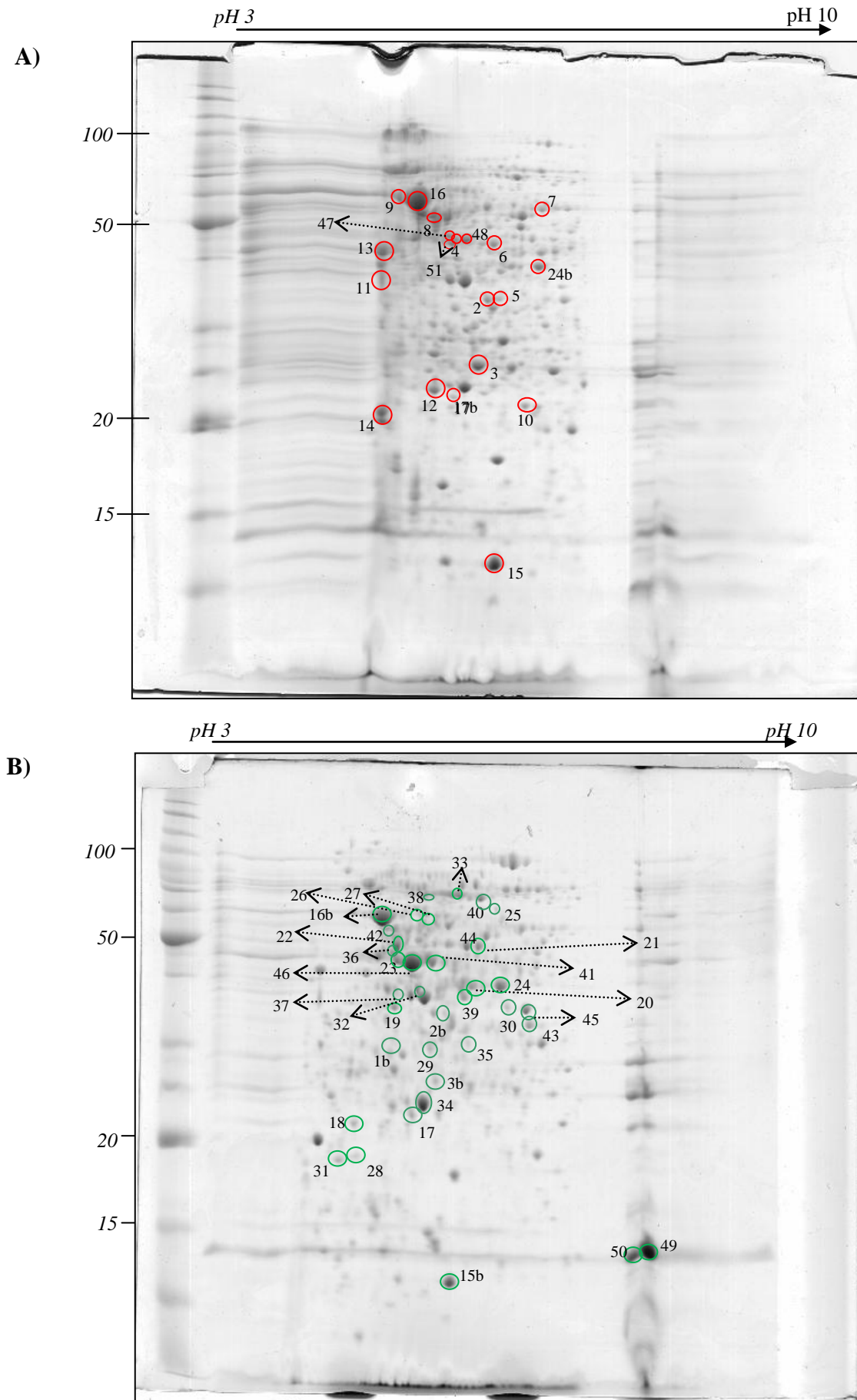


Figura 12. Perfil de proteínas da fração celular periplasmática (260  $\mu$ g) obtidas por 2D-PAGE após cultivo de *Xac* em meio não indutor (CN) (A) ou em meio indutor de patogenicidade (XAM1) (B). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P). Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250. Esses géis foram utilizados como referências na análise pelo *software* Image Master Platinum (GE). Em destaque os *spots* que foram analisados por espectrometria de massas.

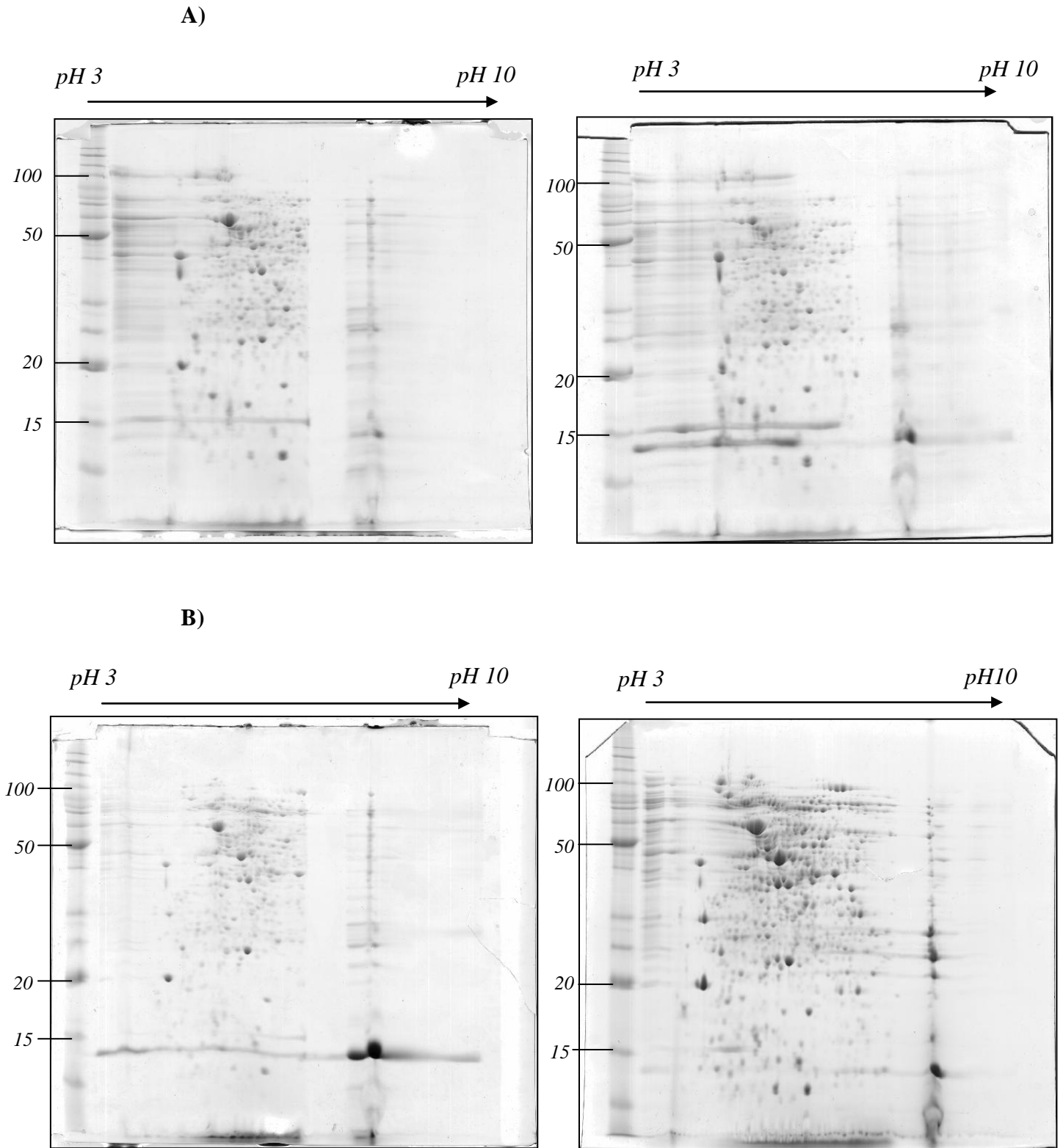


Figura 13. Réplicas do perfil de proteínas da fração celular periplasmática (260  $\mu$ g) obtidas por 2D-PAGE após cultivo de *Xac* em meio não indutor (CN) (A) ou em meio indutor de patogenicidade (XAM1) (B). Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P) BenchMark (Invitrogen). Os géis (réplicas) foram corados com Coomassie Blue R-250.

A reprodutibilidade da triplicata dos géis 2D-PAGE, em cada situação (CN e XAM1), foi verificada pela construção dos gráficos de dispersão ou *Scatter Plots*, por comparação dois a dois, como pode ser observado na Figura 14. Correlações acima de 0,9 foram consideradas significativas para a análise (Felício, 2010).

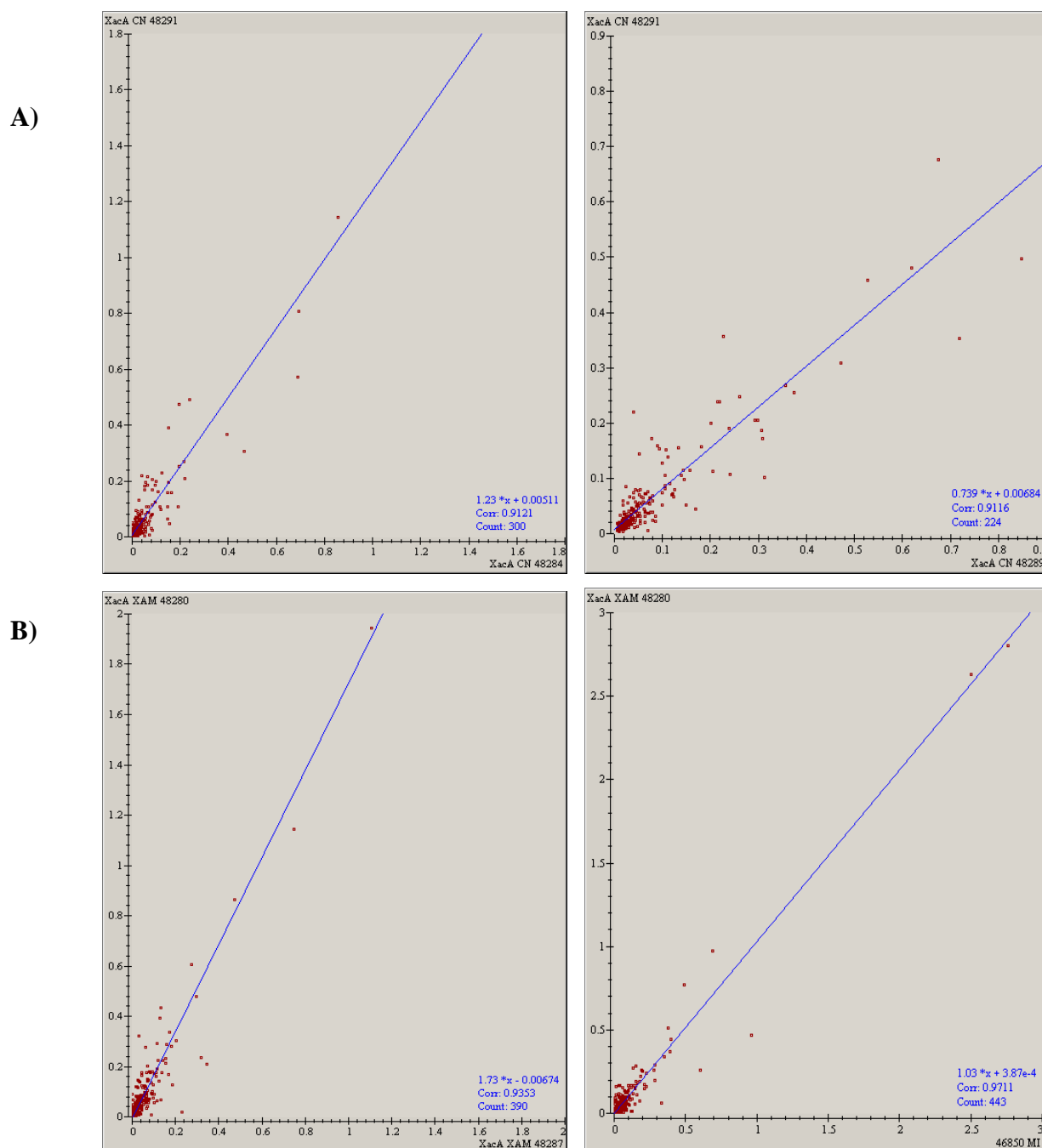


Figura 14. *Scatter plot* (% vol vs % vol) entre as réplicas dos géis 2D-PAGE de proteínas da fração celular periplasmática (260 µg) de *Xac* após cultivo em meio não indutor (A) e em meio indutor de patogenicidade (B) indicando reprodutibilidade entre as réplicas a correlação > 0,9. Os géis foram obtidos em triplicata para cada condição e comparados dois a dois, utilizando-se como referência os géis da Figura 12A e 12B.



Cerca de 800 *spots* foram comparados. Os *spots* com maior expressão diferencial são mostrados em destaque na Figura 12, dentre os 80 *spots* que apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ) após aplicação do teste ANOVA. O aumento no *zoom* de alguns *spots* entre as triplicatas pode ser observado na Figura 15. Os valores de média e desvio padrão da intensidade (%volume) destes *spots* (considerando a triplicata) podem ser vistos por histogramas na Figura 16.

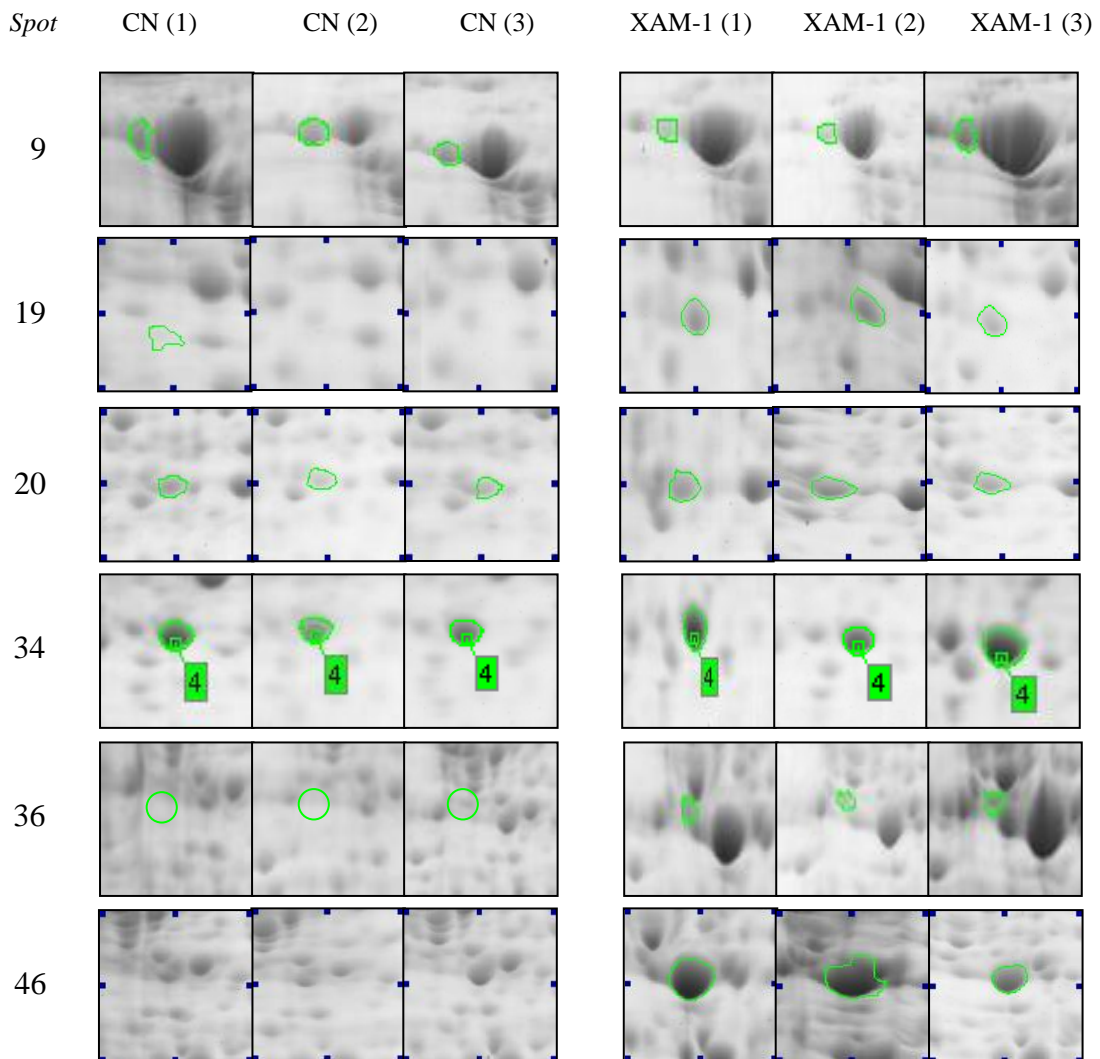


Figura 15. Zoom de alguns *spots* (denominados 9, 19, 20, 34, 36 e 46, conforme Fig. 12) que se mostraram diferencialmente expressos em *Xac*. Os *spots* aparecem como induzidos em XAM1.

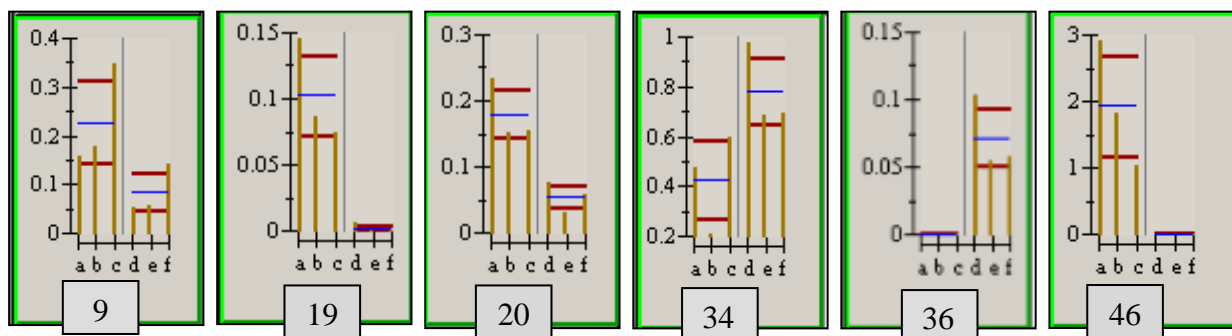


Figura 16. Histogramas representando a média da intensidade (expresso em % vol) e desvios- padrão das triplicatas de *spots*. As letras **a**, **b** e **c** indicam as réplicas em meio indutor e as letras **d**, **e** e **f** as réplicas em meio não indutor. A linha azul representa a média e as linhas vermelhas os valores mínimos e máximos do desvio padrão.

Dentre as proteínas diferencialmente expressas, observamos tanto aumento como também diminuição da expressão em relação à condição de indução de patogenicidade. Houve também as proteínas que aparentemente só foram detectadas em um dos meios, como por exemplo, o *spot* 46. Este *spot* mostrou-se muito aumentado em XAM1, não tendo sido detectado em CN. Por ser um *spot* com uma forte intensidade e relacionado com a situação de indução de patogenicidade, nós o selecionamos para ser analisado por *Western Blot* nas outras linhagens-genoma do cancro cítrico (item 5.2), mesmo considerando a possibilidade de não ser composto por um único polipeptídeo, dadas suas dimensões.

#### 4.4.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A partir dos resultados obtidos nas análises dos géis 2D coletamos os principais *spots* diferenciais, que apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ) para serem analisados por espectrometria de massa. Dos 80 *spots* diferenciais, a busca em banco de dados utilizando o *software* Mascot permitiu identificar proteínas de 50 destes *spots* (Tabela 2). Estas apresentaram identificação significativa (*score* maior que o limite de significância) com proteínas de *Xac* quando testados contra banco de proteínas de Eubactéria.

Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
1b	<a href="#">2::gi 21241891</a>	XAC1137	2-methylisocitrate lyase	-	32.009 / 5,16	74	2	4%	I
1b	<a href="#">2::gi 21242630</a>	<u>XAC1886</u>	Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase	-	30.703 / 5,11	67	1	4%	I
2	<a href="#">1::XYLA1_XANAC</a>	XAC1776	Xylose isomerase 1	-	48.508 / 5,31	79	1	4%	I
2b	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	-	57.131 / 5,05	318	6	14%	III
2b	<a href="#">2::gi 21241588</a>	XAC0818	Ribokinase	-	32.322 / 5,54	98	2	9%	I
2b	<a href="#">2::gi 21241313</a>	XAC0542	Chaperonin GroEL	-	57.131 / 5,05	318	6	14%	III
3	<a href="#">2::gi 21242101</a>	XAC1348	Acetoacetyl-CoA thiolase	-	40.057 / 6,31	277	7	16%	II
3	<a href="#">2::gi 21241638</a>	XAC0868	Hypothetical protein XAC0868	-	28.246 / 9,10	129	4	12%	VIII
3	<a href="#">1::EFTU_XANAC</a>	XAC0970	Elongation factor Tu	-	43.344 / 5,45	564	16	25%	III
3	<a href="#">2::gi 21241723</a>	XAC0957	Elongation factor Tu	-	43.344 / 5,45	564	16	25%	III
3b	<a href="#">2::gi 21241723</a>	XAC0957	Elongation factor Tu	-	43.116 / 5,45	146	4	4%	III
4	<a href="#">2::gi 21240776</a>	XAC0002	DNA polymerase III subunit beta	-	40.842 / 5,35	67	3	4%	III
5	<a href="#">2::gi 21241588</a>	XAC0818	Ribokinase	-	32.322 / 5,54	98	2	9%	I
6	<a href="#">2::gi 21241884</a>	XAC1129	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	-	43.024 / 5,57	105	3	11%	II
7	<a href="#">2::gi 21243279</a>	XAC2546	Ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase	-	54.837 / 6,05	78	4	6%	I
8	<a href="#">1::AMPA_XANAC</a>	XAC3556	Probable cytosol aminopeptidase	-	51.491 / 5,17	513	9	21%	III
8	<a href="#">2::gi 21107351</a>	XAC1204	Alanyl dipeptidyl peptidase	-	51.491 / 5,17	399	11	21%	III

Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). (cont).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
8	<a href="#">2::gi 21244281</a>	XAC3556	Leucyl aminopeptidase	-	51.491 / 5,17	513	9	21%	III
8	<a href="#">1::ATPA_XANAC</a>	XAC3651	ATP synthase subunit alpha	-	55.365 / 5,32	172	6	16%	I
8	<a href="#">2::gi 21243112</a>	XAC2378	N-ethylmethylamine chlorohydrolase	-	48.840 / 5,19	71	2	5%	VIII
9	<a href="#">2::gi 21244025</a>	XAC3300	Esterase	-	62.268 / 4,94	245	9	15%	I
9	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	-	57.131 / 5,05	145	5	6%	III
10	<a href="#">2::gi 77748536</a>	XAC0554	Hypothetical protein XAC0554	-	21.151 / 5,83	263	9	20%	IX
11	<a href="#">2::gi 21241777</a>	XAC1012	Outer membrane protein	-	39.651 / 4,59	318	10	26%	IV
11	<a href="#">1::AMPA_XANAC</a>	XAC3556	Probable cytosol aminopeptidase	-	51.491 / 5,17	123	2	5%	III
11	<a href="#">1::EFPL_XANAC</a>	XAC1849	Elongation factor P-like protein	-	20.654 / 4,52	78	1	7%	III
11	<a href="#">2::gi 21240878</a>	<a href="#">XAC0104</a>	Metalloprotease	-	37.846 / 4,83	64	2	3%	III
12	<a href="#">1::CLPP_XANAC</a>	XAC1078	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-	22.839 / 5,39	448	15	46%	III
12	<a href="#">2::gi 21242806</a>	XAC2067	Keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	-	22.932 / 5,24	56	2	15%	I
13	<a href="#">2::gi 21241777</a>	XAC1012	Outer membrane protein	-	39.651 / 4,59	650	18	44%	IV
14	<a href="#">2::gi 21240997</a>	XAC0223	Hypothetical protein XAC0223	-	21.893 / 4,60	313	9	34%	VIII
14	<a href="#">2::gi 21241518</a>	<a href="#">XAC0747</a>	Hypothetical protein XAC0747	-	22.394 / 4,80	196	3	12%	VIII
15	<a href="#">1::CH10_XANAC</a>	XAC0541	10 kDa chaperonin	-	9.973 / 5,78	326	13	94%	III

Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). (cont.).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
15b	<a href="#">1::CH10_XANAC</a>	XAC0541	10 kDa chaperonin	-	9.973 / 5,78	305	11	98%	III
16	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	-	57.131 / 5,05	2080	57	68%	III
16b	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	+	57.131 / 5,05	1444	31	54%	III
17	<a href="#">2::gi 21240799</a>	XAC0025	Hypothetical protein XAC0025	+	22.215 / 5,67	283	11	22%	VIII
17	<a href="#">2::gi 21244308</a>	XAC3583	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	+	20.541 / 5,36	247	6	25%	IV
17b	<a href="#">2::gi 21244308</a>	XAC3583	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	+	20.541 / 5,36	66	2	14%	IV
18	<a href="#">1::IPYR_XANAC</a>	XAC3442	Inorganic pyrophosphatase	+	19.872 / 4,94	256	7	28%	I
19	<a href="#">1::PUR7_XANAC</a>	XAC0470	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	+	34.625 / 5,21	81	3	8%	II
19	<a href="#">1::EFTS_XANAC</a>	XAC1421	Elongation factor Ts	+	31.085 / 5,23	66	2	6%	III
20	<a href="#">2::gi 21244077</a>	XAC3352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	+	36.220 / 6,03	585	21	42%	I
20	<a href="#">2::gi 21245079</a>	<a href="#">XAC4367</a>	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	+	39.811 / 6,01	112	3	11%	III
20	<a href="#">1::F16PA_XANAC</a>	XAC0124	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	+	36.802 / 5,70	104	4	17%	I
21	<a href="#">2::gi 21240894</a>	XAC0120	TldD protein	+	48.782 / 6,00	106	2	5%	III
22	<a href="#">1::SURA_XANAC</a>	XAC0865	Chaperone surA	+	50.084 / 5,43	1170	32	38%	III
22	<a href="#">2::gi 21241635</a>	XAC0865	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	+	50.084 / 5,43	1170	32	38%	III
22	<a href="#">2::gi 21244575</a>	XAC3851	Hypothetical protein XAC3851	+	49.960 / 5,31	138	3	5%	VIII

Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). (cont.).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
22	<a href="#">2::gi 21240894</a>	XAC0120	TldD protein	+	48.782 / 6,00	135	2	6%	III
22	<a href="#">3::00708398.1</a>		Bovine serum albumin precursor	+		80	2		
22	<a href="#">1::AMPA_XANAC</a>	XAC3556	Probable cytosol aminopeptidase	+	51.491 / 5,17	78	1	2%	III
22	<a href="#">2::gi 21244281</a>	XAC3556	Leucyl aminopeptidase	+	51.491 / 5,17	78	1	2%	III
23	<a href="#">2::gi 21243951</a>	XAC3225	Transglycosylase	+	46.173 / 5,89	451	8	13%	IV
23	<a href="#">2::gi 21264235</a>	XACb0007	Lytic murein transglycosylase	+	46.215 / 5,89	451	8	13%	IV
23	<a href="#">1::SURA_XANOM</a>	XAC0865	Chaperone surA	+	50.084 / 5,43	393	13	25%	III
23	<a href="#">2::gi 21241635</a>	XAC0865	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	+	50.084 / 5,43	393	13	25%	III
23	<a href="#">2::gi 21244575</a>	XAC3851	Hypothetical protein XAC3851	+	49.960 / 5,31	182	5	11%	VIII
23	<a href="#">1::MURA_XANAC</a>	XAC2965	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	+	44.641 / 5,34	110	3	5%	IV
23	<a href="#">1::XYLA1_XANAC</a>	XAC1776	Xylose isomerase 1	+	48.508 / 5,31	54	1	4%	I
24	<a href="#">2::gi 21244077</a>	XAC3352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	+	36.220 / 6,03	815	34	44%	I
24b	<a href="#">2::gi 21244077</a>	XAC3352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	+	36.220 / 6,03	111	7	15%	I
25	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	+	57.131 / 5,05	532	15	25%	III
26	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	+	57.131 / 5,05	129	3	10%	III
27	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	+	57.131 / 5,05	79	2	10%	III
28	<a href="#">2::gi 21243867</a>	XAC3141	Outer membrane protein P6 precursor	+	19.822 / 7,62	199	8	43%	IV

Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). (cont.).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
29	<a href="#">2::gi 21244309</a>	XAC3584	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	+	34.151 / 5,83	226	7	26%	IV
29	<a href="#">2::gi 21242074</a>	XAC1321	Periplasmic protease	+	53.877 / 7,79	221	8	17%	III
30	<a href="#">2::gi 78046603</a>	XAC1017	ABC transporter sulfate binding protein	+	37.842 / 6,73	93	2	5%	V
31	<a href="#">2::gi 21243867</a>	XAC3141	Outer membrane protein P6 precursor	+	19.822 / 7,62	170	7	38%	IV
32	<a href="#">2::gi 21240781</a>	XAC0007	Hypothetical protein XAC0007	+	43.415 / 6,79	274	9	22%	VIII
32	<a href="#">2::gi 21241811</a>	XAC1046	Isocitrate dehydrogenase	+	35.739 / 5,40	98	3	10%	I
32	<a href="#">1::MDH_XANAC</a>	XAC1006	Malate dehydrogenase	+	34.886 / 5,37	77	3	10%	I
33	<a href="#">2::gi 21244097</a>	XAC3372	Transketolase	+	72.702 / 5,64	186	5	7%	I
33	<a href="#">3::00708398.1</a>		Bovine serum albumin precursor						
34	<a href="#">gi 21243120</a>	XAC2386	Superoxidase dismutase	+	22.703 / 5,47	419	15	69%	VII
35	<a href="#">gi 21242074</a>	XAC1321	Periplasmic protease	+	53.877 / 7,79	74	2	4%	III
36	<a href="#">2::gi 21244304</a>	XAC3579	Phosphoglucomutase	+	49.337 / 5,19	252	7	26%	VII
36	<a href="#">2::gi 21243951</a>	XAC3225 / XACb0007	Transglycosylase	+	46.173 / 5,89	167	5	10%	IV
37	<a href="#">EFTS_XANAC</a>	XAC1421	Elongation factor Ts	+	31.085 / 5,23	128	3	7%	III
38	<a href="#">2::gi 21109311</a>	XAC2999	Peptidase	+	79.211 / 5,81	63	3	4%	III
39	<a href="#">2::gi 21242187</a>	XAC1434	Hypothetical protein XAC1434	+	38.703 / 5,89	292	9	29%	VIII
40	<a href="#">2::gi 21242015</a>	XAC1262	Hypothetical protein XAC1262	+	63.372 / 5,85	118	4	7%	VIII

Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). (cont.).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
41	<a href="#">2::gi 21264235</a>	XAC3225 / XACb0007	Lytic murein transglycosylase	+	46.173 / 5,89	150	5	10%	IV
42	<a href="#">1::ATPB_XANAC</a>	XAC3649	ATP synthase subunit beta	+	50.979 / 5,18	107	3	7%	I
42	<a href="#">1::CH60_XANAC</a>	XAC0542	60 kDa chaperonin	+	57.131 / 5,05	85	2	4%	III
42	<a href="#">2::gi 21241313</a>	XAC0542	Chaperonin GroEL	+	57.131 / 5,05	85	2	4%	III
43	<a href="#">2::gi 21243961</a>	XAC3235	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	+	29.824 / 6,38	442	12	37%	I
44	<a href="#">2::gi 21244034</a>	XAC3309	Aminopeptidase	+	48.930 / 5,91	686	20	41%	III
45	<a href="#">2::gi 21241782</a>	XAC1017	ABC transporter sulfate binding protein	+	37.842 / 6,73	735	21	46%	V
46	<a href="#">2::gi 21264235</a>	XACb0007	Lytic murein transglycosylase	+	46.215 / 5,89	569	15	24%	IV
46	<a href="#">2::gi 21243951</a>	XAC3225	Transglycosylase	+	46.173 / 5,89	569	15	24%	IV
46	<a href="#">2::gi 21241914</a>	XAC1160	Oxidoreductase	+	24.563 / 6,19	81	1	5%	I
46	<a href="#">2::gi 21240776</a>	XAC0002	DNA polymerase III subunit beta	+	40.842 / 5,35	64	2	4%	III
47	<a href="#">2::gi 77748610</a>	XAC1776	Xylose isomerase	-	48.909 / 5,31	213	6	11%	I
47	<a href="#">2::gi 21240776</a>	XAC0002	DNA polymerase III subunit beta	-	40.842 / 5,35	85	2	4%	III
48	<a href="#">2::gi 21240776</a>	XAC0002	DNA polymerase III subunit beta	-	40.842 / 5,35	335	13	22%	III
49	<a href="#">3::LYSOZYME</a>		IPI:CON_LYSOZYME		14.760 / 9,32	376		52%	
50	<a href="#">3::LYSOZYME</a>		IPI:CON_LYSOZYME		14.760 / 9,32	233		43%	



Tabela 2. Análise das proteínas periplasmáticas de *Xac* diferencialmente expressas em meio indutor de patogenicidade (XAM1), relativamente ao meio não indutor de patogenicidade (CN). (cont.).

<i>Spot</i>	Acesso ao NCBI	ORF	Proteína	Expressão no meio indutor XAM1	Teórico MM / pI	<i>Score</i>	Peptídeos Pareados	Cobertura da sequência %	Categoria
50	<u>2::gi 21244077</u>	XAC3352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		36.220 / 6,03	91	4	12%	I
51	<u>2::gi 21243951</u>	XAC3225 / XACb0007	Transglycosylase	-	46.173 / 5,89	274	5	8%	IV
51	<u>1::MURA_XANAC</u>	XAC2965	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	-	44.641 / 5,34	169	6	8%	IV
51	<u>2::gi 21240776</u>	XAC0002	DNA polymerase III subunit beta	-	40.842 / 5,35	189	6	12%	III

Legenda:

+ intensidade aumentada em condição de indução de patogenicidade (meio indutor XAM1)

- intensidade diminuída em condição de indução de patogenicidade (meio indutor XAM1)

As ORFS sublinhadas não foram identificadas em estudos de proteoma de extrato total de proteínas (Facincani, 2007)

Os *spots* estão numerados conforme Figura 12; os marcados em vermelho não mostraram correlação entre a MM observada no gel 2D-PAGE e o esperado (MM teórica)

Descrição das categorias segundo anotação do genoma: I, proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário; II, proteínas relacionadas à biossíntese de pequenas moléculas; III, proteínas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas; IV, proteínas de estrutura celular; V, proteínas relacionadas a processos celulares; VI, elementos genéticos moveis; VII, proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação; VIII, proteínas hipotéticas; IX, orfs com categoria indefinida.

Os pareamentos de algumas das proteínas identificadas com os peptídeos obtidos por espectrometria de massas encontram-se em ANEXO. Vários *spots*, ainda que aparentemente isolados no gel 2D, apresentaram identidade com mais de uma proteína (Tabela 2).

Realizamos também buscas para possíveis “contaminantes”, como enzimas usadas durante o processo de extração de proteínas. Foram identificadas: lisozima (utilizada durante extração de proteínas), soroalbuminabovina (BSA, meio XAM1) e tripsina, utilizada para digestão das proteínas em etapa prévia à análise de espectrometria de massas. Os *spots* 49 e 50 (Figura 12) foram identificados por espectrometria de massas como sendo lisozima, que foi utilizada na extração de proteínas.

Para validar as análises de comparação realizada pelo *software* Image Master Platinum (GE), testamos alguns *spots* tanto na condição em que apresentaram maior intensidade, como na outra condição, isolando-os de ambos os géis para a análise por espectrometria de massas. Estes estão indicados com a letra minúscula b (Tabela 2). Observamos correlação entre as proteínas identificadas nas condições opostas, com algumas exceções. Portanto, analisar os *spots* em apenas uma das situações é possivelmente o suficiente para a obtenção de resultados verídicos. Os *spots* 47, 48 e 51 foram analisados por estarem na região próxima ao *spot* 46, porém na outra condição, ou seja, presentes em situação de não indução de patogenicidade. Os resultados mostraram proteínas semelhantes para os *spots* correlatos, sendo mais uma indicação do aumento na expressão das proteínas contidas no *spot* 46.

Em alguns casos, observamos diferenças entre a MM de alguns *spots* de acordo com o gel e as MM teóricas propostas para as suas respectivas proteínas identificadas em banco de dados (marcados em vermelho na Tabela 1). Isso pode ser devido a algum artefato da técnica. Porém, a maioria dos *spots* apresentou valores similares quanto a sua MM observada por 2D-PAGE e a esperada (teórica) (Figura 12 e Tabela 2).

#### **4.5 Análise da expressão de proteína(s) de *Xac* em outras linhagens de cancro cístico**

O *Western blot* com anticorpos obtidos a partir do *spot* 46 confirmou a sua maior expressão em condição de indução de patogenicidade de *Xac* do que na condição controle (Figura 17). A reação também foi observada, porém de forma menos intensa, com proteína na condição controle de *XauB*. Com as proteínas periplasmáticas de *XauC*, no

entanto, praticamente não houve reação. Algumas reações cruzadas foram observadas (Figura 17).

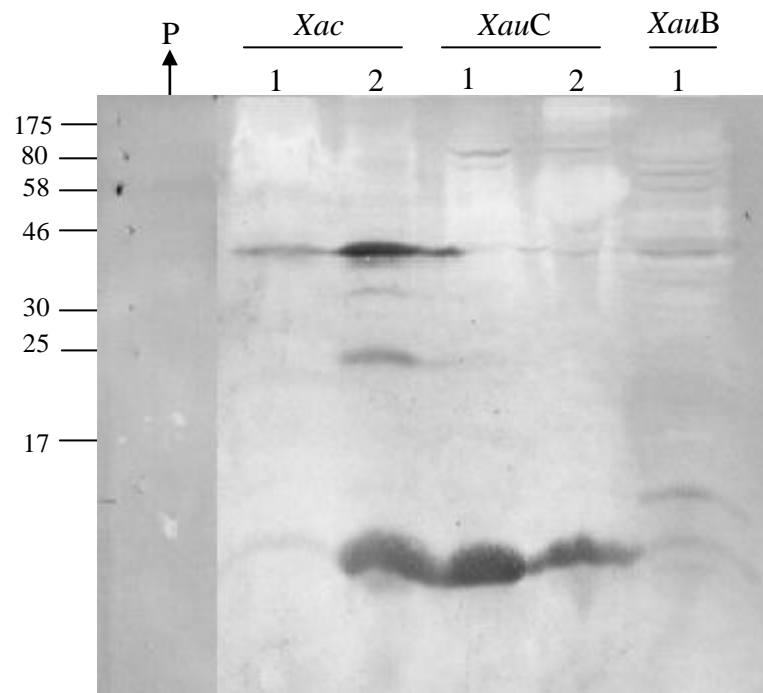


Figura 17. *Western Blot*: perfil de proteínas periplasmáticas (70  $\mu$ g) de *Xac*, *XauB* e *XauC* após cultivo em meio não indutor CN (1) ou meio indutor de patogenicidade XAM1 (2) após reação com anticorpos obtidos em camundongos contra proteína(s) do *spot* 46, de maior expressão em *Xac* quando em meio indutor de patogenicidade. Os números à esquerda representam bandas (kDa) do padrão de massa molecular (P).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Proteínas de *Xac* diferencialmente expressas em condição de indução de patogenicidade em relação ao controle (não indução).

Encontramos 80 *spots* diferenciais entre os perfis protéicos das condições de indução (XAM1) / não indução de patogenicidade (CN), sendo que 50 destes foram identificados após buscas em banco de dados. No estudo de proteoma total de *Xac*, Facincani (2007) encontrou na análise de 2D-PAGE 228 proteínas expressas diferencialmente durante a indução infectiva temporal da *Xac*, tanto em meio indutivo (XAM1) por 24 h, quanto em contato direto com o hospedeiro por 3 ou 5 dias após inoculação, utilizando como padrão a bactéria cultivada em meio nutritivo (CN). Dentre as proteínas identificadas pelo nosso estudo, quatro (8%) não foram encontradas no estudo de Facincani (2007): XAC4367: *glycerophosphoryl diester phosphodiesterase*; XAC0747: *hypothetical protein*; XAC0104: metaloprotease; XAC1886: *beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase*. Possivelmente essas proteínas são pouco abundantes na célula e apenas foram detectadas devido ao fracionamento celular.

Contudo, é difícil especificar quanto o estudo de proteínas diferenciais a partir do fracionamento da amostra incrementou a análise em relação ao extrato protéico total (Facincani, 2007), uma vez que a autora não especifica quais proteínas diferencialmente expressas foram detectadas pela técnica de 2D-PAGE. Considerando o total de proteínas detectadas por Facincani (2007), não apenas por 2D-PAGE, mas também por MudPIT (onde se detectou 228 e 518 proteínas diferenciais, respectivamente), o fracionamento permitiu detecção de 4 proteínas não apontadas no estudo do extrato total, mostrando uma sensibilidade interessante para o estudo de proteínas de *Xac*.

Sobretudo, este trabalho traz uma importante contribuição às análises proteômicas de *Xac* em termos de quantificação da expressão diferencial de um grande número de proteínas, bem como da natureza dessa expressão (indução/ repressão).

O estudo por fracionamento celular, em específico da fração periplasmática, vem possibilitar detecção das proteínas aí localizadas que possam estar relacionadas com a patogenicidade *in vitro*. Não apenas as pertencentes a fração periplasmática, mas também as que estão diretamente relacionadas a esta fração (como proteínas de membranas imersas no periplasma, proteínas pertencentes aos sistemas de secreção) ou que estejam de passagem para o meio extracelular.

As proteínas encontradas na análise inicial utilizando SDS-PAGE e sequenciamento da região N-terminal são proteínas interessantes. Porém, estas não foram vistas como diferencialmente expressas pela análise proteômica. Uma possibilidade seria os momentos de coletas das células terem sido diferentes (antes do final da fase exponencial e final da fase exponencial de crescimento, respectivamente), pois como já discutido as proteínas alteram seu perfil dependendo da fase de crescimento da bactéria.

Entre as proteínas encontradas está a proteína ABC transportadora ligante de ATP (XAC2334) (*ABC transporter ATP-binding protein*), que faz parte do sistema de transporte ABC (Kegg Pathway). A proteína Fimbrilina (XAC3241) constituinte do *pilus* está envolvida com mobilidade, tráfego intracelular de substâncias e secreção (SSTQ) (da Silva *et al.*, 2002; Kegg Pathway). Essas proteínas poderiam estar envolvidas com a adaptação da bactéria durante o seu estabelecimento no meio XAM1, sendo mais expressas na fase inicial de colonização e por isso não sendo encontrada como diferenciais no estudo proteômico. A proteína receptora dependente de Ton-B é característica de membrana externa, e foi encontrada com maior intensidade no controle do que na condição de indução de patogenicidade. Ela é citada na literatura como componente de vesículas de membrana externa, comuns em bactérias Gram-negativas. Essas vesículas são conhecidas por transportar compostos envolvidos na sinalização célula-célula, como também carregar proteínas associadas com virulência em *E. coli* e possivelmente *X. campestris* (Sidhu, 2008).

As proteínas de *Xac* que apresentaram expressão diferencial (meio indutor vs. não indutor) na análise proteômica foram classificadas de acordo com as categorias funcionais descritas na anotação do genoma de *Xac* (Figura 18).

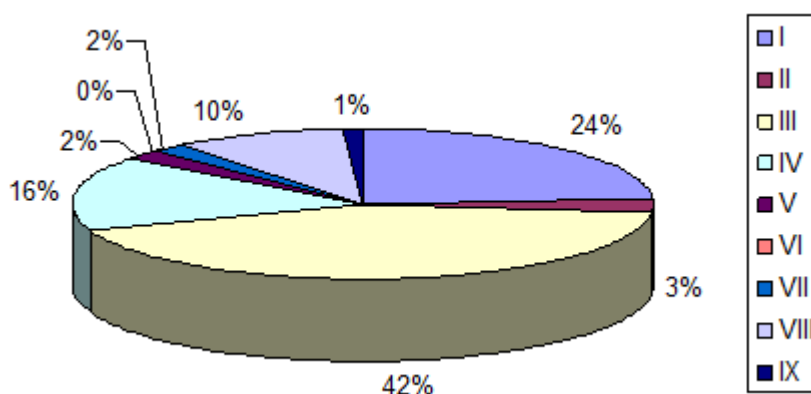


Figura 18. Categorização funcional (em porcentagem) das proteínas identificadas a partir da fração enriquecida com proteínas periplasmáticas de *Xac*. As categorias funcionais utilizadas foram as mesmas descritas no seqüenciamento do genoma da *Xac*. Descrição das categorias: I, proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário; II, proteínas relacionadas à biossíntese de pequenas moléculas; III, proteínas relacionadas ao metabolismo de macromoléculas; IV, proteínas de estrutura celular; V, proteínas relacionadas a processos celulares; VI, elementos genéticos moveis; VII, proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação; VIII, proteínas hipotéticas; IX, orfs com categoria indefinida.

De acordo com a categorização funcional das proteínas identificadas neste trabalho, a maioria está relacionada com o metabolismo de macromoléculas (42%) e com o metabolismo intermediário (24%). Em terceiro lugar aparecem as proteínas de estrutura celular (16%). Sugerimos que isso poderia estar relacionado com a situação de *stress* em que a bactéria se encontra, levando a bactéria a alterar seu metabolismo como defesa aos ataques do hospedeiro, inclusive modificando sua estrutura celular. Carvalho (2006) verificou que 6 genes relacionados ao metabolismo de membranas e da parede celular bacteriana tiveram sua expressão modificada, indicando uma readaptação destas estruturas macromoleculares na interação *Xac* - citros.

Entre as proteínas de estrutura celular encontradas com expressão aumentada em condição de indução de patogenicidade, estão as transglicosilases (*lytic murein transglycosilase* -XACb0007, *transglycosylase* -XAC3225) (*spots* 4, 23, 36, 41, 46, Figura 12). Transglicosilases líticas são amplamente distribuídas em bactérias Gram-negativas e clivam a ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e N-acetilglicosamina (GlcNAc). Pode-se notar mais de um *spot* tendo suas proteínas identificadas como a mesma proteína transglicosilase. Mas se observarmos, estes são *spots* bastante próximos, sendo possivelmente a mesma proteína. Também, pela análise usando Mascot não é possível identificar se a proteína transglicosilase é expressa a partir de gene do cromossomo (XAC3225) ou do plasmídeo (XACb0007), ou ambos. Possivelmente apenas uma análise mais detalhada da expressão desses genes elucidaria essa questão.

Observando-se a Figura 18 pode-se notar que 2% das proteínas identificadas aqui são proteínas pertencentes à categoria funcional VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) e são as seguintes: XAC2386 (superoxidase dismutase) (*spot* 34) e XAC3579 (fosfoglicomutase) (*spot* 36), e foram encontradas como mais expressas em situação de indução de patogenicidade. Esta porcentagem é relativamente pequena, mas as proteínas da categoria VII poderiam ter sido enviadas para o meio externo. No entanto, Ferreira, R. (2009) em sua análise de proteínas excretadas de *Xac* também não observou um grande número de proteínas dessa categoria funcional. Outro possível motivo por termos encontrado poucas proteínas pertencentes a categoria VII seria por nossa análise ser pontual (final da fase exponencial) e não temporal. Possivelmente de acordo com o progresso da doença, são necessárias diferentes proteínas da categoria VII.

A proteína superoxidase dismutase (XAC2386) (*spot* 34) possui função antioxidante, transformando superóxidos em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio. Observamos o aumento da expressão desta proteína em condição de indução de patogenicidade, porém Laia (2007) não identificou sua presença quando a bactéria foi crescida em meio indutor de

patogenicidade, apenas após cultivo na planta, sendo que nesse caso houve repressão.

A proteína fosfoglicomutase (XAC3579) (*spot* 36) está envolvida com a síntese e utilização do glicogênio, e é responsável pela conversão de D-glicose-1P para D-glicose-6P. Sabe-se que a fosfoglicomutase (XAC3579) está também relacionada com a produção de goma xantana e biossíntese de nucleotídeos UDP-glicose e GDP-manose em *X. campestris* pv. *campestris* (Kopling, 1991).

Facincani (2007) e Astua-Monge *et al.* (2004) observaram a diminuição na expressão da proteína fosfoglicomutase (XAC3579) e do gene, respectivamente, em situação de indução de patogenicidade *in vitro* (XAM1 e XVM2), e o primeiro observou um aumento somente quando a bactéria foi cultivada *in vivo*. Porém, verificamos aumento da expressão desta proteína após crescimento de *Xac* em XAM1, assim como Laia (2007). Astua-Monge *et al.* (2004) utilizou um meio de crescimento diferente do utilizado neste trabalho, o meio XVM2, que é tido como um indutor de gene *hrp* em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), podendo refletir diferença nos resultados.

A proteína esterase (XAC3300) encontrada neste trabalho pertence ao sistema de secreção tipo V. Este sistema é conhecido como sistema autotransportador, por não requerer energia e pelo fato das proteínas serem marcadas para passar por uma espécie de poro na membrana externa (Henderson *et al.*, 2004). Apesar deste sistema não ser descrito no artigo do genoma de *Xac* (da Silva *et al.*, 2002), ele é tido como comum em bactérias Gram-negativas e a proteína esterase (XAC3300) está identificada no banco de dados Kegg Pathway. Em *Pseudomonas aeruginosa* a proteína EstA (mesma da ORF XAC3300) é necessária para mobilidade celular e formação de biofilme (Wilhelm, 1999). Porém, esta proteína mostrou-se com expressão reduzida para *Xac* em condição indutora de patogenicidade, talvez por *Xac* priorizar os demais sistemas de secreção envolvidos com transporte de proteínas relacionadas a patogenicidade e virulência.

As inúmeras proteínas detectadas neste estudo, tanto como induzidas ou reprimidas incrementam o conhecimento sobre os processos que ocorrem na bactéria durante a indução de patogenicidade *in vitro*, porém a produção de mutantes relativos aos genes dessas proteínas é uma etapa importante, a ser realizada futuramente para alguns deles, a fim de se validar o seu envolvimento no processo de patogenicidade.

## 5.2 Análise da expressão de proteína(s) de *Xac* em outras linhagens de cancro cítrico

Na busca por uma proteína diferencial de *Xac*, o *spot* 46 se destacou por sua alta intensidade nos extratos de periplasma de *Xac*, na condição de indução de patogenicidade, em relação aos obtidos no controle. Optamos então por analisar a sua expressão em outras linhagens-genoma do cancro cítrico (B e C) em situação de indução/não indução de patogenicidade.

Pela análise de espectrometria de massas e busca em banco de dados, o *spot* 46 contém as proteínas transglicosilase lítica de mureína (XACb0007) e/ou transglicosilase (XAC3225), oxidoreductase (XAC1160), DNA polimerase III subunidade beta (XAC0002). A presença da enzima DNA polimerase pode ser justificada por ser uma proteína muito abundante, e que possivelmente seria contaminante na fração enriquecida de proteínas periplasmáticas. Por ser uma proteína abundante, a lise de poucas células no processo de extração de proteínas já explicaria sua presença no extrato periplasmático. A proteína oxidoreductase possui uma MM de 24.563 Da, e sua presença neste *spot* pode ser devido a algum artefato da técnica porque o *spot* tem tamanho distinto (aproximadamente 46 kDa).

Laia (2009) não observou expressão da proteína transglicosilase (XAC3225) em meio XAM após 12 ou 24 h de crescimento, apenas em planta (laranja Pêra) após 3 dias da indução inicial. O resultado *in vivo* obtido pelo autor corrobora a presença da proteína transglicosilase (XAC3225) observada aqui como induzida em tempo similar (72 h), porém *in vitro*. A diferença entre o resultado *in vitro* deste autor e o resultado aqui observado, possivelmente está relacionada a estados fisiológicos distintos no momento da extração de proteínas. Neste estudo *Xac* ficou em contato com o meio indutor de patogenicidade XAM1 por aproximadamente 72 h, sendo um tempo maior do que o usado em outros trabalhos (24 h) (Carvalho, 2006; Facincani, 2007; Laia, 2007; 2009). Observando as curvas de crescimento de *Xac* em meio indutor de patogenicidade, nas condições em que este trabalho foi desenvolvido, no período de 24h as células ainda não se encontravam no final da fase exponencial, sendo esta alcançada apenas após aproximadamente 72h. Porém, os autores que utilizaram o mesmo meio não citam a fase de crescimento em que a bactéria estava no momento de sua coleta para os procedimentos experimentais, dificultando a comparação dos resultados. Este seria o possível motivo de alguns resultados encontrados neste trabalho não corroborarem os dos demais autores.

A literatura mostra que devido aos complexos protéicos dos sistemas de secreção SSTT e SSTQ de bactérias Gram-negativas, que expandem o envelope celular, é



necessário uma rearquitetura da membrana bacteriana assim como da parede celular. Porém, devido a limitações impostas pelo peptidoglicano das paredes de Gram-negativas, proteínas especializadas são responsáveis por uma degradação local controlada desses (Dijkstra; Keck, 1996, Koraimann, 2003). Esta poderia ser a razão de termos encontrado proteínas transglicosilases com expressão elevada quando em situação de indução de patogenicidade.

Essas enzimas líticas, assim como a transglicosilase lítica solúvel de 70kDa de *Escherichia coli*, clivam no mesmo sítio que a lisozima (de suíno), diferindo porém no produto (Holtje *et al.*, 1975). Apesar da baixa homologia significativa com a lisozima, os resíduos de aminoácidos envolvidos na arquitetura do sítio ativo são conservados entre essas duas enzimas (Dijkstra; Thunnissen, 1994). Sabendo que as transglicosilases de *Xac* também possuem domínio conservado com a lisozima, isso poderia ser uma explicação para a reação cruzada na membrana de *Western blot* na região de 15kDa, onde estaria a enzima lisozima, que inclusive foi identificada em *spots* dos géis 2D (*spot* 49 e 50).

A análise por *Western blot* com anticorpos obtidos a partir do *spot* 46 confirmou a sua expressão diferencial em condição de indução de patogenicidade de *Xac* de maneira mais intensa do que na condição controle. A reação também pode ser vista de forma menos intensa com as proteínas periplasmáticas na condição controle de *XauB*. Até o presente momento, não conseguimos crescer *XauB* em meio XAM1 de forma a obtermos quantidade de proteínas suficiente para a análise, e em condições semelhantes a *Xac* (final da fase exponencial de crescimento). O meio XAM1 é conhecido como indutor de patogenicidade em *Xac*, porém, variações no crescimento entre as linhagens são observadas, já que diferem na virulência e gama de hospedeiros. Em relação às proteínas de *XauC* a reação foi praticamente inexistente quando em condição de indução de patogenicidade.

Estudos mostraram que transglicosilases líticas específicas com função indispensável para o crescimento e divisão celular, são necessárias para aumentar a eficiência de sistemas de transporte macromolecular em bactérias, possivelmente específicos para sua espécie (Koraimann, 2003). Portanto, a possível ausência de reação no extrato protéico da linhagem-genoma C pode demonstrar que estas transglicosilases encontradas aqui estejam envolvidas com a infecção de um maior número de hospedeiros, uma vez que a tipo C infecta apenas um hospedeiro. Maiores experimentos serão necessários para verificar se essa proteína pode ser um biomarcador para *Xac* em relação a *XauC*. Mais estudos também serão necessários para averiguar se o potencial como biomarcador em estudos da fração periplasmática se mantém *in vivo*.

O *spot* 46 não possui uma única proteína, e uma das proteínas identificadas como constituindo o *spot*, a DNA polimerase é uma proteína bastante comum em todos os seres vivos, e poderia ser a razão da reação positiva. Porém a reação não foi observada nas proteínas da condição controle de *XauB*, sugerindo que a reação observada no *Western blot* seja contra a proteína transglicosilase. Maiores estudos terão que ser realizados para confirmar a expressão diferencial da proteína transglicosilase.

Uma reação positiva também pode ser observada na região de 24 kDa apenas para as proteínas de *Xac* em condição de indução de patogenicidade. A MM indica que poderia ser reação com uma terceira proteína constituinte do *spot* 46, a oxidorreductase. Como esta foi observada apenas para *Xac* quando em indução de patogenicidade, ela poderia também ter potencial para um biomarcador. Estudos complementares serão necessários para confirmar esta sugestão.

Em resumo, as proteínas constituintes do *spot* 46, ou apenas algumas delas, aumentam sua expressão na condição de indução de patogenicidade, o que poderia ser utilizado como potencial biomarcador para *Xac* nessa condição e/ou esta proteína se constituir em alvo importante para o combate ao cancro cítrico.

## 6. CONCLUSÕES

O estudo da fração celular de *Xac*, enriquecida com proteínas periplasmáticas, constitui-se em uma estratégia interessante para identificação de proteínas relacionadas com a indução de patogenicidade *in vitro*. A partir deste estudo foram identificadas proteínas que estão presentes no periplasma de *Xac* e/ou que de alguma forma estão relacionadas com esta fração, como proteínas que passam pelo periplasma antes de serem exportadas para o meio extracelular.

A bactéria *Xac* possui grande número de proteínas encontradas na fração periplasmática que estão relacionadas com a fitopatogenicidade *in vitro*, incluindo proteínas pertencentes a categoria funcional VII -Patogenicidade, Virulência e Adaptação.

A análise da expressão de proteína(s) de *Xac*, de maior expressão em situação de indução de patogenicidade, em outras linhagens do cancro cítrico, sugere que, em particular, transglicosilases possam se constituir em biomarcador(es) entre *Xac* e *XauC*. Maiores estudos, com maior número de linhagens A e C, serão necessários para confirmar essa expressão diferencial entre os dois tipos de linhagens.

## REFERÊNCIAS

- Alegria, M.C. *et al.* Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid- encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2315–2325. 2005.
- Anderson, L.; Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 533-537. 1997.
- Artier, J. Detecção de proteínas potencialmente envolvidas na patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv citri: estudos preliminares em diferentes frações celulares. 41p. **Monografia** (Conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas), Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.
- Astua-Monge, G.; *et al.* Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 1201-1205. 2005.
- Baker, B.; Zambryski, P.; Staskawics, B.; Dinesh-Kumar, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 726-733. 1997.
- Barber, C.E. *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 555-566. 1997.
- Baptista, J. C. Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. 93 p. **Dissertação de mestrado** (Mestrado em genética e biologia molecular na área de genética vegetal e melhoramento), Unicamp, Campinas. 2006.
- Bergamin Filho, T.; Amorim, L.; Laranjeira, F.; Gottwald, T.R. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the Asian citrus leafminer. **Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop**, p.20-22 Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. 2000. Disponível em: <<http://www.doacs.state.fl.us/canker>>
- Bonas, U.; Van Den Ackerveken, G. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? **The Plant Journal**, v.12, n.1, p.1-7. 1997.

- Bradford, 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. 1976.
- Brown, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 2275. 2001.
- Brunings, A.M.; Gabriel, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n.3, p. 141–157. 2003.
- Büttner, D.; Bonas, U. Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **The Embo Journal**, v. 21, n. 20, p. 5313-5322. 2002.
- Carvalho, F.M.S. Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências, área de concentração, Genética), 177 pp. Faculdade de Medicina, departamento de genética, USP, Ribeirão Preto. 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-19102006-152429/>>
- Cernadas, R.A.; Camillo, L.R.; Benedetti, C.E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 609–631. 2008.
- Christie P.J. *Agrobacterium tumefaciens* t-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria. **Journal of Bacteriology**, vol. 179, n.10, p. 3085-3094. 1997.
- Christie, P.J.; Vogel, J.P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 354–360. 2000.
- Civerolo, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, v. 37, p. 127-145. 1984.
- Coligan, J.E. *et al.* **Current Protocols in Protein Science (Volumes 1 e 2)**, John Wiley & Sons, Inc. 2000.
- Conacyt – Consejo nacional de ciência y tecnologia. Disponível em: <[www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)>. Data do acesso: 24 jun. 2010.

- Crozier, A.; Kamiya, Y.; Bishop, G. & Yokota, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Maryland USA, American Society of Plants Physiologists, 829-850. 2001.
- Cubero J., Graham J.H.: Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 8, n. 3, p.1257-1264. 2002.
- da Silva, A.C.R., *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463. 2002.
- Dangl, J. L. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 192, p.99-118.1994.
- Delepelaire, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, n. 1-3, 11, p. 149-161. 2004.
- Dijkstra, A.J.; Keck, W. Peptidoglycan as a Barrier to Transenvelope Transport, **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5555–5562. 1996.
- Dijkstra, B.W.; A.M. Thunnissen. ‘Holy’ proteins. II. The soluble lytic transglycosylase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, p. 810–813. 1994.
- Dow, J. M.; Newman, N.; Von Roepenack, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 241-261. 2000.
- Facincani, A.P. Análise proteômica do fitopatôgeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Tese de Doutorado**, 153 pp. (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 2007. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/d/1025.pdf>>.
- FAO – Food and Agriculture Organization. FAOSTAT statistical databases. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 20 jul. 2010.
- Farinati, S. *et al.* Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. **Proteomics**, v. 9, n. 21, p. 4837–4850. 2009.

- Fathi, A. *et al.* Comparative proteome and transcriptome analyses of embryonic stem cells during embryoid body-based differentiation. **Proteomics**, v. 9, n. 21, p. 4859–4870. 2009.
- Felício, A.P., *et al.* Differential proteomic analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells maintained in contact with bornite or chalcopyrite: proteins involved with the early bacterial response. **Manuscrito submetido**. 2010.
- Ferreira, R. M. Secretoma da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 52p. **Dissertação de mestrado** (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009.
- Ferreira, B.C. Caracterização fenotípica e funcional de mutantes da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 76p. **Dissertação de mestrado** (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009.
- Filloux, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1694, n. 1-3, 11, p.163-179. 2004.
- Fletcher, J., *et al.* Plant Pathogen Forensics: Capabilities, Needs, and Recommendations. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 2, p. 450–471. 2006.
- Flor, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, v. 9, p. 275-296. 1971.
- Fundecitrus, Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 21 jun. 2010.
- Graham, J.H., *et al.* Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (*Xcc*) on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). In: **Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop**, p.7. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. 2000. Disponível em: <<http://www.doacs.state.fl.us/canker>>
- Gravena, S. O cancro e a mineradora. **Informativo Coopercitrus**, v.12, n.141: p.18. 1998.
- Goodman, R.N.; Novacky, A.J. **The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon**. St Paul: APS Press. 1994.

- Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, **Proteomics**, v. 4, p. 3665–3685. 2004
- Goto, M.; Takahashi, T.; Messina, M.A. A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancris B in Argentina. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 46, p. 329-338 (1980).
- Hasse, C.H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 97-100. 1915.
- Hayward, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: Swings, J.G.; Civerolo, E.L. (Ed.) *Xanthomonas*. London, Ed Chapman & Hall, p. 1-17, 1993.
- Henderson, I.R., *et al.* Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology and Molecular Biology Review**, n. 68, p. 692-744. 2004.
- Holtje, J.V., *et al.* Novel Type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 3, p. 1067-1076. 1975.
- Hu, N. T., M. N. Hung, C. T. Liao, and M. H. Lin. Subcellular location of XpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Microbiology**, v. 141, p.1395–1406. 1995.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Agropecuária; Produção agrícola; **Levantamento sistemático da produção agrícola** (junho/2010). Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em 20 jul. 2010.
- Investe São Paulo. Disponível em: <<http://www.investimentos.sp.gov.br/setores/laranja>>. Acesso em: 21 jul. 2010.
- Kane, L.A., *et al.* Optimization of paper bridge loading for 2-DE analysis in the basic pH region: Application to the mitochondrial subproteome. **Proteomics**, v. 6, p. 5683–5687. 2006.
- Keen, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24, p. 447-463. 1990.
- Kegg - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway, Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>>. Acesso em: 20 jun. 2010.



- Khater, L., *et al.* In silico identification of potential chaperone genes that belong to type III and type IV secretion systems in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 321-327. 2005.
- Köplin, R., *et al.* Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 1, p. 191-199. 1992.
- Koller, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Editora Rígel, Porto Alegre, p. 446. 1994.
- Koraimann, G. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 2371–2388. 2003.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.
- Laia, M.L. Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese. p. 322. **Tese de doutorado** (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.
- Laia, M.L., *et al.* New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 1-17. 2009.
- Laranjeira, F.F.; Palazzo, D.A. Danos qualitativos a produção de laranja ‘natal’ causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 20, n. 1, p. 77-91. 1999.
- Leite Jr, R.P. **Cancro Cítrico: Prevenção e Controle no Paraná**. IAPAR, Londrina, PR, Brasil. 51p. (IAPAR. Circular,61). 1990.
- Leite Jr RP; Egel, D.S.; Stall, R.E. Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1078-1086. 1994.
- Leyns, F.; De Cleene, M.; Swings J.G. & De Ley, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review**, v. 50, p 308-356. 1984.

- Malavolta Júnior VA, Yamashiro T, Nogueira EMC, Feichtenberger E. Distribuição do tipo C de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 10, p. 11. 1984.
- Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 21, p. 10035-10038. 1987.
- Matsudaira, P. **A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing**, Academic Press, Inc. San Diego. p. 54-59, 1993.
- Mehta, A.; Rosato, Y.B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**, v. 1, p. 1111-1118. 2001.
- Mohammadi, M.; Mirzâee, M.R.; Rahimian, H. Physiological and biochemical characteristics of iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. **Journal Phytopathology**, v. 149, p. 65-75. 2001.
- Moreira L.M., *et al.* Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, vol 42, p. 163-184. 2004.
- Moreira, L.M., *et al.* Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v. 11, p.238. 2010. (doi:10.1186/1471-2164-11-238)
- Namekata, T.; Rossi, A.C.; Ceravolo, L.C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**, v. 17, n. 1, p. 67-78, 1996.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso: vários durante 2008-2010.
- Nociti, L.A.S., *et al.* Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C em lima ácida ‘Galego’. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.140-146. 2006.
- Ong, S.E.; Padley, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 195–205. 2001.

- Padmanabham, D.; Vidhyasekaran, P.; Rajagopalan, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Journal Phytopathology**, v. 26, p. 215-217. 1973.
- Rahme, L.G.; Mindrinos, M.N.; Panopoulos, N.J. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.11, p.3499-3507. 1992.
- Rodrigues Neto, J.; Malavolta Jr., V.A.; Victor, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n.1-2, p.16. 1986.
- Rossetti, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Fealq/Fundecitrus, Piracicaba. 2001.
- Salmond, G.P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 181-200. 1994.
- Schaad, N. W., *et al.* Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 494–518. 2005.
- Schaad, N. W., *et al.* Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 690–695. 2006.
- Sidhu, V. K.; Vorhölter, F.-J.; Niehaus, K. and Watt, S. A. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 87, p. 1471-2180. 2008.
- Simpson, R.J. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p. 926. 2003.
- Staskawicz, B.J., *et al.* Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661-667. 1995.

- Vauterin L., *et al.* Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis of proteins, fatty-acid analysis, and DNA-DNA Hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 4, p. 535-542. 1991.
- Wengelnik, K.; Marie, C.; Russel, M.; Bonas, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1061-1069. 1996.
- Wilhelm, S.; Tommassen, J.; Jaeger, K.E. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, n. 181, p. 6977-86. 1999.
- White, F. F.; Yang, B.; Johnson, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 291-298. 2000.



*Spot 36: Proteína fosfoglicomutase (XAC3579)*

1 MPMTLPAFKA YDIRGRVPDE LNEIDLARRIG VALAAQLDQG PVLGHHDVRL  
 51 **ASPALQEALS** **AGLR**ASGRDV IDIGLCGTEE VYFQTDYLKA AGGVMVTASH  
 101 NPMDYNGMKL VRE**QARP**ISS **DTGLFAIRD**T **VAADTAAPGE** **PTASEQSR**TD  
 151 KTAYLEHLLS YVDRSTLKPL KLVVNAGNGG AGLIVDLLAP HLPPEFVRFV**F**  
 201 **HEPDGNFPNG** **IPNPLLPENR** **DATAK**AVKDN GADFGIAWDG DFDRCFFFDH  
 251 TGRFIEGYL VGLLAQAAILA KQPGGKVVDH PRLTWNTVEQ VEEAGGIPVL  
 301 CK**SGHAFI**KE **KMR**SENAVY GEMSAHHYFR EFAYADSGMI PWLLIAELVS  
 351 QSGRSLADLV EARMQKFPCS GEINFKVADA KASVARVMEH YASLSPELDY  
 401 TDGISADFGQ WRFNLR**SSNT** **EPLLR**LN**VET** **RGDAALLETR** **TQEISNLLRG**  
 451

*Spot 46: Proteína lytic murein transglycosylase (XACb0007)*

1 MIMPSRLLRL TLGVSVCVAA TSVAQAIAIP ETTASSATDA GGQQDPAPT  
 51 SSFEQWLADF RQR**ALAAGIG** **ATTL**DNALAG **VTPDP**AVHEL **DQR**QPEFTQY  
 101 LWDYLDARVT PSAIQEGQQL LISQHALFEK LRQHYGVDPG ILTAIWSMES  
 151 GYGKQIGDFY VIR**SLATLAH** **EGR**RTTYGNT QLLAALQILQ TEKSIDRSQL  
 201 VGSWAGAMGQ TQFIPSTYRD **YAVDE**GDQK **RDV**WNSKADA LGSAANYLKQ  
 251 NNWTSAVPWG QEVQLSAGFD YAQADLTIK**K** **TVAEW**QRLGV APRRPIAPAL  
 301 AQQLASVLLP TGYRGPFLV FDNFRSILRY NNSTAYALAV GLLADGYAGR  
 351 AGVKQPWPKD DPPLNSTAQI TELQQR**LTDK** **GFDV**GGIDGV **LGAQ**TRQ**GIR**  
 401 **AFQRSQQLPQ** **DGYAST**SLLA RLRAP

*Spot 46: Proteína transglycosylase (XAC3225)*

1 MIMPSRLLRL TLGVSVCVAA TSVAQAIAIP ETTASSATDA GGQQDPAPT  
 51 ASFEQWLADF RQR**ALAAGIG** **ATTL**DNALAG **VTPDP**AVHEL **DQR**QPEFTQY  
 101 LWDYLDARVT PSAIQEGQQL LISQHALFEK LRQHYGVDPG ILTAIWSMES  
 151 GYGKQIGDFY VIR**SLATLAH** **EGR**RTTYGNT QLLAALQILQ TEKSIDRSQL  
 201 VGSWAGAMGQ TQFIPSTYRD **YAVDE**GDQK **RDV**WNSKADA LGSAANYLKQ  
 251 NNWTSAVPWG QEVQLSAGFD YAQADLTIK**K** **TVAEW**QRLGV APRRPIAPAL  
 301 AQQLASVLLP TGYRGPFLV FDNFRSILRY NNSTAYALAV GLLADGYAGR  
 351 AGVKQPWPKD DPPLNSTAQI TELQQR**LTDK** **GFDV**GGIDGV **LGAQ**TRQ**GIR**  
 401 **AFQRSQQLPQ** **DGYAST**SLLA RLRAA