



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

**Análise proteômica diferencial de proteínas superficiais da membrana de  
*Xanthomonas* spp. em interação com hospedeiro cítrico**

**Carolina Moretto Carnielli**

**São Carlos**

**2013**



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

**Análise proteômica diferencial de proteínas superficiais da membrana de  
*Xanthomonas* spp. em interação com hospedeiro cítrico**

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

Aluna: Carolina Moretto Carnielli  
Orientadora: Maria Teresa Marques Novo Mansur

**São Carlos**

**2013**

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

C289ap Carnielli, Carolina Moretto.  
Análise proteômica diferencial de proteínas superficiais da membrana de *Xanthomonas* spp. em interação com hospedeiro cítrico / Carolina Moretto Carnielli. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Bioquímica. 2. Proteômica. 3. Cancro cítrico. 4. *Xanthomonas*. 5. Patogenicidade. 6. Eletroforese bidimensional. I. Título.

CDD: 574.192 (20<sup>a</sup>)

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

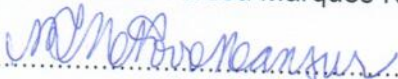
"Análise proteômica diferencial de proteínas totais e superficiais da  
membrana de *Xanthomonas* spp. em interação com hospedeiro  
cítrico"

Dissertação de Mestrado de

**CAROLINA MORETTO CARNIELLI**

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur



Prof. Dr. Ricardo de Marco



Profa. Dra. Maria Célia Bertolini



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me dando forças e direção para vencer os mais diversos obstáculos e seguir adiante.

À minha mãe Sonia e à minha irmã Helena, minhas queridas companheiras, que me alegram e fazem sorrir todos os dias e sem as quais eu não seria eu mesma.

A todos os meus familiares que acreditaram em mim e me ajudaram a chegar até aqui, e por estarem sempre ao meu lado.

À Profa. Dr. Maria Teresa Marques Novo Mansur, pela confiança a mim depositada, me recebendo em seu laboratório, pela disposição e orientação, e pela amizade e bons momentos de descontração.

Ao CNPq pela bolsa e à FAPESP pelo auxílio financeiro ao Projeto Jovem Pesquisador.

Ao FUNDECITRUS pelo fornecimento das linhagens bacterianas e ao pesquisador Dr. José Belasque Júnior, pela sua colaboração ao Projeto Jovem Pesquisador do qual este trabalho é parte integrante.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Maria Célia Bertolini e Prof. Dr. Ricardo de Marco, por aceitarem o convite e pelas contribuições fornecidas ao presente trabalho.

Ao Fabrício J. Jaciani do FUNDECITRUS, ao Prof. Henrique Ferreira, atualmente docente da UNESP de Rio Claro, e à sua orientada Julia A. P. Sumares pelas instruções de cultivo de *Xanthomonas* sp. *in vivo*.

Ao Departamento de Botânica, por permitir o uso da casa de vegetação para armazenamento das plantas utilizadas neste estudo.

À Profa. Dra. Regina V. Oliveira, da UFSCar, e a seu aluno Pedro Henrique pelo auxílio com os procedimentos de ultracentrifugação.

À Profa. Dra. Heloísa S. S. de Araújo por disponibilizar seus equipamentos e espaço laboratorial para realização de algumas partes deste trabalho.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM-ABTLuS, Campinas-SP, pelo suporte nas análises de espectrometria de massas. Em especial à Dra. Adriana Franco Paes Leme e às técnicas Romênia e Bianca do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas-SP, pela ajuda e ensinamentos sobre as técnicas e conceitos de espectrometria de massas.

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

À Sheila Guterres, pela amizade e ajuda com os mais diversos problemas de análises de géis.

À Verônica A. Zorgetto, minha amiga de longa data. À Flávia S. Zandonadi, minha companheira de trabalho, obrigada pela amizade e apoio. Às minhas amigas e companheiras de academia Mariana e Araceli.

Aos meus amigos: Juliana Artier, Danyella, Carla, Leandro, André, Ayra e Fábio, pela ajuda com os experimentos e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

## RESUMO

O cancro cítrico é uma doença economicamente importante para a citricultura. Devido à inexistência de medidas eficazes de prevenção e combate, o cancro cítrico ainda é uma doença de ampla distribuição. Os agentes etiológicos são bactérias do gênero *Xanthomonas*, sendo classificadas em duas espécies, *X. citri* e *X. fuscans*, as quais diferem em virulência e espectro de hospedeiros cítricos. Este trabalho teve como objetivo a análise diferencial do subproteoma da superfície celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC), espécie mais virulenta e causadora da cancriose A, entre duas condições de crescimento, infectante (*in vivo*) e não infectante (*in vitro*). Adicionalmente, a análise proteômica total por *shotgun* (LC-MS/MS) foi realizada para comparação de XAC com *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB), espécie menos virulenta, ambas após crescimento *in vivo*. Inicialmente, foram realizadas curvas de crescimento de ambas as bactérias em folhas de um hospedeiro cítrico comum (*Citrus aurantifolia*) a fim de se conhecer a dinâmica de crescimento populacional *in vivo* e a eficiência da recuperação bacteriana por dois diferentes métodos. Para as análises proteômicas, células bacterianas intactas tiveram suas proteínas de superfície marcadas com fluorescência (*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*) e em seguida foram lisadas, sendo o extrato proteico total analisado por eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE), técnica padronizada neste trabalho. Os perfis proteicos de XAC foram analisados pelo *software DeCyder 7.0* (GE Healthcare) e *spots* com expressão diferencial (ANOVA  $p < 0,05$ ) foram isolados dos géis e identificados por espectrometria de massas seguida de busca pela ferramenta *Mascot* em bancos de proteínas anotadas a partir da sequência genômica. Dos 79 *spots* de XAC analisados foram identificadas 30 diferentes proteínas, sendo que 10 correspondem a proteínas reconhecidas de membrana e/ou superfície celular: receptores dependentes de Ton-B e proteínas relacionadas a OmpA foram encontradas com menor expressão na condição *in vivo*, enquanto que receptor de enterobactina, chaperonina 60 kDa (GroEL) e DnaK apresentaram maior expressão após interação com hospedeiro cítrico. Em relação à comparação do extrato total de XAC e XauB por *shotgun* foi possível identificar apenas duas proteínas de XAC. Proteínas da superfície celular com maior expressão na linhagem virulenta (XAC) na condição *in vivo* poderão ser futuros alvos de interesse biotecnológico para combate ao cancro cítrico por estarem possivelmente relacionadas com a fitopatogenicidade e/ou maior espectro de hospedeiros cítricos.

**Palavras-chave:** Cancro Cítrico. *Xanthomonas citri*. *Xanthomonas fuscans*. Patogenicidade. Análise Proteômica Diferencial. Proteínas de Superfície; 2D-DIGE.



## ABSTRACT

The citrus canker is an economically important disease for citrus crop. At the moment, there is no effective means of prevention or cure for this disease, which has contributed to citrus canker wide distribution around the world. The etiologic agents are bacteria of the genus *Xanthomonas* classified into two species, *X. citri* and *X. fuscans*. This study aimed to perform the differential proteomic analysis of cell surface proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC), the more virulent specie, between infectious (*in vivo*) and non-infectious (*in vitro*) conditions of growth. Additionally, the same analysis was performed by *shotgun* for XAC against the *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* type B (XauB), less virulent specie, both after growth *in vivo*. Initially, we performed growth curves of both bacteria on leaves of a common citrus host (*Citrus aurantifolia*) in order to investigate the dynamics of population growth *in vivo* and the efficiency of cell recovery by two different methods. For proteomic analysis, intact bacterial cells had their surface proteins labeled with fluorescence (DIGE CyDye Fluor minimal dyes), were then lysed and the total protein extract analyzed by differential gel electrophoresis (2D-DIGE), as standardized in this study. Protein profiles were analyzed by DeCyder 7.0 software and spots differentially expressed (ANOVA  $p < 0.05$ ) were isolated from gels, identified by mass spectrometry and search in protein databases of the annotated genome sequence of the bacteria. Seventy-nine spots from XAC were analyzed and thirty different proteins were identified, of which 10 correspond to known membrane or cell surface proteins: Ton-B dependent receptors and OmpA-related proteins exhibited lower expression in infectious condition, differently of Ferric enterobactin receptors, 60 kDa chaperonin (GroEL) and DnaK which showed higher expression after host interaction. XAC and XauB total extraction analysis by *shotgun* identified just two XAC proteins. Cell surface proteins with increased *in vivo* expression in virulent strain (XAC) could provide future targets of biotechnological interest for fighting citrus canker for being possibly related to phytopathogenicity and/or host spectrum.

**Keywords:** Citrus Canker. *Xanthomonas citri*. *Xanthomonas fuscans*. Pathogenicity. Differential Proteomics Analysis. Surface Proteins. 2D-DIGE.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-DIGE	<i>Two-Dimensional Differential In Gel Electrophoresis</i> ou eletroforese bidimensional diferencial em gel
2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões
ABC	<i>ATP-Binding Cassete</i>
AN	Agar Nutriente
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ou análise de variância
avr/Avr	Gene de avirulência/ proteína efetora do gene avr
BVA	<i>Biological Variation Analysis</i>
CN	Caldo Nutriente
DO	Densidade Óptica
DIA	<i>Differential In-gel Analysis</i>
DTT	Ditiotreitol
HR	<i>Hypersensitive Response</i> ou resposta de hipersensibilidade
hrp	<i>hypersensitive Response and Pathogenicity genes</i> ou genes de Resposta de Hipersensibilidade e Patogenicidade
IAA	Iodoacetamida
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i> ou Focalização Isoelétrica
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> ou Solução de Tampão Fosfato
PME	Proteína de Membrana Externa
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ou Dodecil Sulfato de Sódio
SSTI	Sistema de Secreção Tipo Um (I)
SSTII	Sistema de Secreção Tipo Dois (II)
SSTIII	Sistema de Secreção Tipo Três (III)
SSTIV	Sistema de Secreção Tipo Quatro (IV)
SSTV	Sistema de Secreção Tipo Cinco (V)
SSTVI	Sistema de Secreção Tipo Seis (VI)
Tat	<i>Twin-Arginine Translocation pathway</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XAC	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
XauB	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Tipo B
XauC	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Tipo C

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Características do *CyDyes Fluor minimal dyes*.
- Tabela 2. Desenho experimental da marcação fluorescente de amostras proteicas para experimentos de 2D-DIGE. Cada gel contém uma alíquota do padrão interno, uma amostra proveniente de células cultivadas *in vivo* (Exsudato) e uma amostra proteica obtida de células crescidas no meio CN.
- Tabela 3. Programação utilizada para a isoeletrofocalização das amostras.
- Tabela 4. Protocolo utilizado para a coloração dos géis 2D-DIGE (compatível com experimentos de espectrometria de massas). Extraído de Mortz et.al. (2001).
- Tabela 5. Proteínas de XAC diferencialmente expressas entre as condições de crescimento infectante (*in vivo*) ou não infectante (*in vitro*).
- Tabela 6. Proteínas de XAC e de XauB expressas após cultivo *in vivo* (condição infectante), por espectrometria de massas tipo *shotgun*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Galerias criadas pela lagarta minadora dos citros na superfície foliar. Fonte: USDA; <http://www.flickrriver.com/photos/tags/mesophyll/interesting/>.
- Figura 2. Lesões provocadas pelo cancro cítrico em (A) folhas, (B) ramos e (C) frutos. É possível observar tanto na folha como no fruto a presença de um halo amarelo ao redor das lesões salientes de cor marrom, enquanto que no ramo as lesões são de cor parda, sem o halo amarelo. Fontes: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/agosto2005/ju297pag03.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2005/ju297pag03.html); <http://www.freshfromflorida.com/pi/canker/photos.html>; Fundecitrus, 2010.
- Figura 3. Sintomas da cancrose cítrica causada por XAC, XauB e XauC em folha de *Citrus aurantifolia*, 21 dias após a inoculação (Moreira et al., 2010).
- Figura 4. Estrutura do envelope celular de bactérias Gram-negativas (Prescott, 2002).
- Figura 5. Representação dos sistemas de secreção em bactérias Gram-negativa. Fonte: Kegg pathway, 2013.
- Figura 6. Representação esquemática dos sistemas de secreção de *Xanthomonas* spp. Seis tipos de sistemas de secreção são codificados. Os SSTII e SSTV dependem dos sistemas Sec e TAT para o transporte através da membrana interna. Os sistemas SSTIII e SSTIV estão associados a estruturas extracelulares do *pilus* e presumivelmente translocam proteínas para o interior da célula hospedeira. OMV, vesículas da membrana externa; IM, membrana interna; OM, membrana externa; TAT, twin-arginine translocação. Extraído de Büttner a Bonas, 2009.
- Figura 7. Espectro de excitação e emissão para *CyDye DIGE Fluor dyes* Cy2, Cy3, e Cy5.
- Figura 8. Esquema da reação de marcação com *CyDyes*. (A) Reação de marcação mínima com *CyDye DIGE Fluor minimal dye*. (B) Reação de marcação por saturação com *CyDye DIGE Fluor saturation dyes*. Extraído do manual do usuário do sistema *Ettan DIGE (GE Healthcare)*.
- Figura 9. Esquema que ilustra a importância do uso do padrão interno nos experimentos de 2D-DIGE. Cada gel é constituído por duas amostras biológicas e pelo padrão interno, o qual contém alíquotas de todas as quatro amostras apresentadas na figura. O *spot* destacado mostra-se em diferentes tamanhos entre o padrão interno dos géis, o que evidencia uma variação experimental. A interpretação da expressão deste *spot* é apresentada nos gráficos. Como pode ser visto, a

comparação feita a partir de dados de volume do *spot* fornece uma interpretação errônea da abundância do *spot*, enquanto que a comparação por uma razão relativa ao padrão interno gera uma interpretação mais precisa da sua abundância. Extraído e modificado de *Ettan DIGE System User Manual*.

Figura 10. Esquema de cultivo *in vivo* (em folhas destacadas) de XAC e XauB para a realização das curvas de crescimento e para a obtenção de células para experimentos de análise proteômica.

Figura 11. Folhas de limão galego infiltradas com *Xanthomonas* spp. após sete dias de cultivo. (I) Sintomas visíveis da doença puderam ser observados após sete dias da infecção por XAC (seta em vermelho). (II) Na infecção por XauB não foi possível observar sintomas característicos da doença (seta em vermelho), mesmo após trinta dias de cultivo.

Figura 12. Curvas de crescimento de XAC em meio CN. Uma alça de massa celular bacteriana cultivada em meio sólido AN foi inoculada em 20 mL de meio CN e os valores de D.O. foram obtidos pela leitura de absorbância a 595 nm em leitora de placas *iMark* (Biorad).

Figura 13. Curvas de crescimento de XAC e XauB em folhas de limão galego pela contagem de UFC/mL. (A) Células de XAC foram obtidas por maceração ou (B) por exsudação. Em (C) as duas curvas são apresentadas na mesma escala. (D) Células de XauB foram recuperadas por maceração ou exsudação. (E) Comparação da quantidade de células recuperadas de cada espécie bacteriana em um disco foliar pelo método de exsudação. Experimentos obtidos em triplicatas. Setas em vermelho indicam o pico de crescimento apresentado por cada bactéria.

Figura 14. Curva de crescimento de XauB em folhas de limão galego pela contagem de UFC/mL. Para a infiltração, foram utilizados inóculos de XauB com DO 1,2 (curva em preto) ou DO 0,3 (curva em vermelho) (Abs 595 nm). Experimentos obtidos em triplicatas.

Figura 15. Validação da metodologia de marcação de proteínas da membrana de *Xanthomonas citri* sp. *citri* por meio de reação de células intactas com Cy3 (*GE Healthcare*). Células foram lisadas após a marcação e o conteúdo submetido à ultracentrifugação. Proteínas do *pellet* (25 µg) após solubilização e do sobrenadante (25 µg) foram separados por SDS-PAGE 12%, sendo o gel digitalizado para detecção de fluorescência e em seguida corado com prata.

- Figura 16. Imagens de um gel 2D-DIGE de proteínas da superfície celular de XAC após cultivo *in vivo* ou *in vitro* (meio CN). Amostras marcadas com diferentes *CyDyes* foram misturadas e submetidas à mesma separação por eletroforese-2D. Para a digitalização do gel, foi utilizado o *scanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)* e as amostras lidas com diferentes comprimentos de onda (Cy5 680 nm; Cy3 595 nm; Cy2 530 nm), de acordo com o *CyDye* utilizado. Devido à presença de Tris no tampão de lavagem das células durante a etapa de marcação fluorescente, os géis apresentaram forte *background*.
- Figura 17. Imagens de um gel bidimensional (2D-DIGE) de proteínas da superfície celular de XauB e XAC após cultivo *in vivo* obtidas pela digitalização com *scanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)* e respectivo padrão interno. Não foi possível visualizar *spots* proteicos de XauB marcados fluorescentemente, problema possivelmente causado pela presença de interferentes nas amostras.
- Figura 18. SDS-PAGE de amostras proteicas de XAC e XauB marcadas fluorescentemente com Cy3, ambas após cultivo *in vivo*. Vinte microgramas de cada amostra foram aplicados no gel. (I) Imagem obtida pela leitura de fluorescência no *scanner Ettan DIGE Imager*. (II) O mesmo gel foi corado com prata e digitalizado com *ImageScanner*. PM, peso molecular.
- Figura 19. Imagens de um gel bidimensional (2D-DIGE) de proteínas da superfície celular de XAC após cultivo *in vitro* e *in vivo* obtidas pela digitalização com *scanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)* e respectivo padrão interno. É possível observar rastros das amostras proteicas no gel, indicando que a focalização na primeira dimensão não foi bem sucedida.
- Figura 20. Géis de 2D-DIGE de proteínas da superfície celular de XAC após cultivo *in vivo* ou *in vitro*. As imagens de um gel foram geradas a partir da leitura com comprimentos de onda (Cy5 680 nm; Cy3 595 nm; Cy2 530 nm). Os quatro géis, cada um composto por duas amostras biológicas e um padrão interno, foram submetidos à mesma corrida de isoeletrofocalização quanto de segunda dimensão (SDS-PAGE). Células após crescimento *in vitro* (CN) e *in vivo* foram alternativamente marcadas com Cy3 e Cy5. O padrão interno, marcado com Cy2, é constituído por quantidades iguais de células provenientes de cada uma das oito amostras (totalizando  $10^7$  células).
- Figura 21. Detalhe da imagem de um *spot* detectado nos géis bidimensionais de XAC obtido com o programa *DeCyder*. (A) Imagem do *spot* 991 (em um mesmo gel) com suas respectivas imagens 3D na condição infectante e na condição não-

infectante. É possível visualizar a diferença de intensidade do *spot* circulado em cor magenta. (B) O Gráfico mostra dados de abundância para o *spot* selecionado (em cada gel presente na análise). Pontos em rosa representam os mapas de *spots* na condição *in vivo* e os pontos em laranja representam os mapas de *spots* da condição *in vitro*. As linhas pontilhadas apresentam os valores médios de cada grupo.

Figura 22. Análise de padrões para os *spots* das amostras proteicas de XAC dos géis da Figura 20. (A) *Score plot* da análise de componentes principais com mapas de *spots* dos grupos experimentais de XAC: em amarelo, *in vivo* (quadrantes da direita); em rosa, *in vitro* (quadrantes da esquerda). Nenhum mapa de *spots* foi detectado fora da tendência geral da maioria das amostras. (B) *Score plot* da análise de componentes principais dos *spots* com expressão diferencial significativa detectada pelo teste *Student-t* no módulo EDA. Apenas três *spots* estão fora do nível de significância. (C) *Heat map* resultante da análise de agrupamento. Para obtenção desse mapa o *software* utiliza o teste-t ( $p < 0,05$ ) para combinar ou separar dados emparelhados, gerando assim o dendrograma. Os mapas de *spots* estão localizados na parte inferior do dendrograma e os *match IDs* dos *spots* no lado direito da figura. A expressão dos *spots* pode ser observada de acordo com a cor apresentada (verde: menor expressão; vermelho: maior expressão), sendo possível classificar as amostras em dois grupos distintos: proteínas relacionadas à condição infectante e proteínas relacionadas à condição não infectante.

Figura 23. *Spots* com expressão diferencial significativa (ANOVA  $p < 0,05$ ) entre as condições de cultivo de XAC (infectante ou não infectante) isolados para identificação por espectrometria de massas. A excisão dos 79 *spots* foi feita manualmente a partir do gel corado com prata. Os *spots* foram enumerados de acordo com o *match ID* gerados pelo *software* de análise dos géis. Os números à esquerda do gel indicam os valores (em kDa) das bandas do padrão de peso molecular.

Figura 24. Representação de proteínas presentes na membrana celular. Essas proteínas podem atravessar a camada lipídica da membrana (*a* e *b*), enquanto outras, chamadas de periféricas podem se ligar à superfície de proteínas integrais (*d*) ou então interagir com o grupo polar dos lipídeos (*c*). Extraído de Berg (2012).

Figura 25. Categorização funcional das proteínas de XAC identificadas por ESI-QUAD-Tof/Mascot, a partir de seus perfis diferenciais entre as duas condições de cultivo

(infectante ou não infectante). As categorias funcionais utilizadas foram as descritas no sequenciamento do genoma de XAC.



## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A citricultura brasileira e o cancro cítrico.....	1
1.2 A bactéria.....	3
1.3 Interação planta-patógeno.....	5
1.4 Era pós-genômica e a análise proteômica.....	12
1.5 Estudos do genoma e do proteoma de <i>Xanthomonas</i> spp. causadoras do cancro cítrico...	17
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral.....	23
2.2 Específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Linhagens bacterianas e meios de cultura.....	24
3.2 Inoculação de células bacterianas em folhas de limão-galego.....	24
3.3 Curvas de crescimento de XAC e XauB em <i>Citrus aurantifolia</i> .....	25
3.4 Marcação de proteínas de superfície de XAC e de XauB.....	26
3.5 Validação da marcação de proteínas de membrana.....	27
3.6 Análise proteômica.....	27
3.6.1 Quantificação de proteínas.....	28
3.6.2 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE).....	28
3.6.3 Análise dos géis 2D-DIGE pelo software <i>DeCyder 2D</i> .....	30
3.6.4 Análise das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas.....	31
3.6.5 Análise das amostras proteicas de XAC e de XauB por <i>shotgun</i> .....	32
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Infiltração de folhas de limão galego com <i>Xanthomonas</i> spp.....	34
4.2 Curvas de crescimento.....	36
4.2.1 <i>In vitro</i> .....	36
4.2.2 <i>In vivo</i> – Células recuperadas por maceração ou exsudação.....	36
4.3 Teste para validação da marcação fluorescente das proteínas de superfície celular de <i>Xanthomonas</i> spp.....	39
4.4 Padronização da técnica de 2D-DIGE para proteínas de superfície celular de <i>Xanthomonas</i> spp.....	40
4.5 Análise estatística dos perfis proteicos de XAC ( <i>in vivo</i> vs. <i>in vitro</i> ) obtidos por 2D-DIGE e identificação das proteínas diferenciais.....	44
4.5.1 Análise dos perfis de proteínas de superfície celular por 2D-DIGE.....	44

4.5.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas e categorização funcional.....	51
4.6 Análise de amostras proteicas de XAC e XauB por <i>shotgun</i> .....	56
5 DISCUSSÃO.....	57
5.1 Validação da marcação fluorescente das proteínas de superfície celular de <i>Xanthomonas</i> spp.....	57
5.2 Proteínas identificadas entre as condições de cultivo de XAC.....	58
5.3 Comparação dos presentes resultados com trabalhos anteriores envolvendo a análise proteômica de XAC .....	63
6 CONCLUSÕES.....	65
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
8 REFERÊNCIAS.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A citricultura brasileira e o cancro cítrico

A citricultura é uma atividade com grande importância para a economia brasileira, sendo responsável pela movimentação de US\$ 3,8 bilhões no ano de 2011 e com uma produção superior a 19 bilhões de toneladas de laranja (FAO, 2011). Com uma representação de aproximadamente 40%, o Brasil é o maior produtor mundial de laranja, posição que detém desde a década de 80, sendo também responsável por 60% da produção mundial de suco concentrado (NEVES et al, 2007). O segundo maior produtor são os Estados Unidos da América, com uma produção aproximada de 8 bilhões de toneladas da fruta (FAO, 2011).

Frequentemente a citricultura é alvo de inúmeras pragas e doenças que podem causar sérios danos às plantações. Dentre as principais doenças de grande impacto econômico destaca-se o cancro cítrico, considerado atualmente como um dos principais fatores responsáveis pela diminuição da produtividade de citros no país e da qualidade dos frutos, apresentando grande potencial destrutivo (KOLLER, 1994). Outras enfermidades também são causa de preocupação para a produção citrícola brasileira por reduzirem significativamente a produção, a longevidade e a qualidade dos frutos, como a clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), o *Citrus greening* (doença causada pela bactéria *Citrus greening bacterium*), a mancha preta (fungo *Guignardia citricarpa*) e as viroses tristeza e leprose (AYRES, 2001).

Os prejuízos ocasionados pelo cancro cítrico levaram à elaboração de programas de erradicação da doença, com a criação da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC/ SP) no ano de 1975, com o apoio da portaria nº 291 do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Dois anos mais tarde, foi criado o Fundo Paulista de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) com a contribuição de citricultores e indústrias processadoras de citros, a fim auxiliar o trabalho realizado pela CANECC (AYRES, 2001).

De acordo com um levantamento realizado no ano de 2010 pelo FUNDECITRUS, a incidência do cancro cítrico passou de 0,14% para 0,44% nos talhões do parque citrícola paulista, e no ano de 2011 este valor saltou para 0,99%, sendo o maior índice detectado nos últimos treze anos (FUNDECITRUS, 2012). Esse aumento tem sido atribuído à mudança na legislação ocorrida em junho de 2009, quando deixou de ser obrigatória a erradicação de todas as plantas de um talhão que apresentasse índice de contaminação

superior a 0,5%. Logo após essa mudança, em seis meses, o número de novos casos de cancro cítrico cresceu quase 80% se comparado ao primeiro semestre de 2009 (FUNDECITRUS, 2011).

A bactéria causadora do cancro cítrico é capaz de infectar folhas, ramos e frutos, mesmo não possuindo um mecanismo ativo de penetração através da parede celular. A sua propagação não requer um vetor específico, podendo ser transmitida de uma planta à outra a partir de lesões pré-existentes, por meio de chuvas ou material contaminado, se espalhando com facilidade pelos pomares. A entrada do patógeno pode ocorrer através de aberturas naturais da planta, como os estômatos, ou por ferimentos mecânicos presentes no tecido vegetal, tal como os ocasionados pela lagarta minadora dos citros, cuja presença está relacionada ao aumento da ocorrência de cancro cítrico (Figura 1), ou mesmo aqueles deixados pelo homem. Dessa forma, são necessários cuidados especiais durante o período de colheita, como a desinfecção do material a ser utilizado, a pulverização de caminhões e veículos antes de entrar na propriedade e a queima de restos de colheitas, como folhas, galhos e frutos, a fim de manter a propriedade livre da doença.

**Figura 1.** Galerias criadas pela lagarta minadora dos citros na superfície foliar.

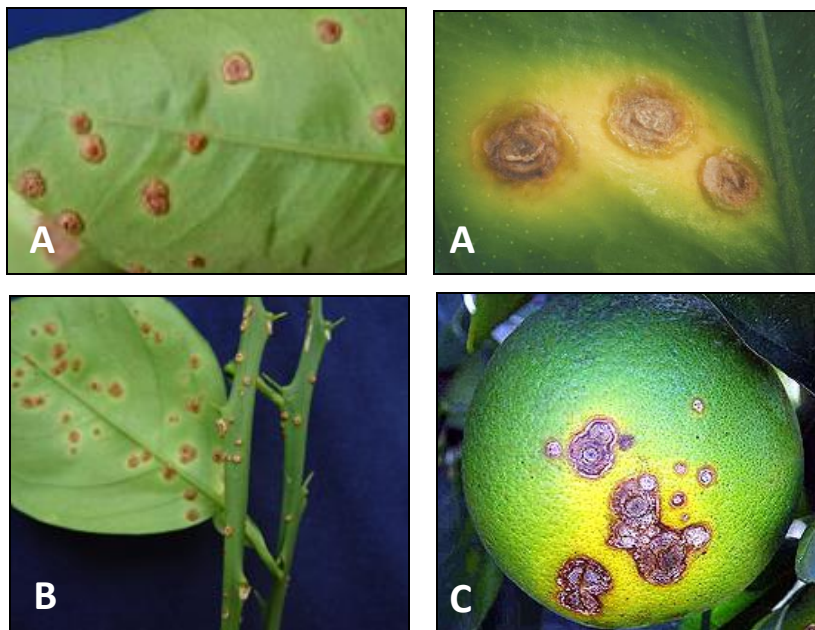


Fonte: USDA; <http://www.flickriver.com/photos/tags/mesophyll/interesting/>.

Sintomas da doença podem ser vistos em toda a parte aérea da planta (Figura 2). Nas folhas, as lesões são inicialmente pequenas manchas amarelas e circulares, que em estágios posteriores se tornam marrons, podendo atingir alguns centímetros de diâmetro. Geralmente, o cancro cítrico induz lesões salientes nos dois lados da folha e é comum o aparecimento de um anel amarelo ao redor das lesões de cor marrom. Nos frutos, a doença se manifesta pelo surgimento de pequenas manchas amarelas e circulares, que, após crescerem, assumem a cor marrom. Em estágios mais avançados, essas lesões causam o rompimento da

casca e a conseqüente perda do fruto. Nos ramos as lesões são também salientes, em forma de crosta de cor parda (NERO et al., 2006).

**Figura 2.** Lesões provocadas pelo cancro cítrico em (A) folhas, (B) ramos e (C) frutos. É possível observar tanto na folha como no fruto a presença de um halo amarelo ao redor das lesões salientes de cor marrom, enquanto que no ramo as lesões são de cor parda, sem o halo amarelo.



Fontes: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/agosto2005/ju297pag03.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2005/ju297pag03.html);  
<http://www.freshfromflorida.com/pi/canker/photos.html>; Fundecitrus, 2010.

## 1.2 A bactéria

O agente etiológico do cancro cítrico é uma bactéria fitopatogênica, aeróbica obrigatória, com metabolismo oxidativo, não fixadora de nitrogênio, Gram-negativa, pertencente ao gênero *Xanthomonas* (HAASE, 1915).

Há três tipos mais comuns de cancro cítrico descritos na literatura e seus agentes etiológicos variam quanto à patogenicidade e sintomas apresentados pelo hospedeiro (ROSSETTI, 2001) (Figura 3). A cancrose A constitui a forma mais severa e difundida da doença, atacando quase todas as espécies de citros. Sua origem ocorreu na Ásia e apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada também nas Américas e na Oceania. O

agente causador da cancrose A é a bactéria classificada atualmente por Schaad et al. (2006) como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC), nomenclatura adotada neste projeto.

O cancro cítrico B (ou falso cancro) se restringe à Argentina, Paraguai e Uruguai e é causado pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB) (SCHAAD et al., 2006). Esse tipo de cancrose afeta um número menor de hospedeiros que XAC e é patogênica somente a limões verdadeiros (*Citrus limon*) e limas ácidas (*Citrus aurantifolia*). Os sintomas da cancrose B surgem em um período de tempo de quatro a cinco vezes maior que o apresentado pela cancrose A, recebendo assim a denominação de “falso cancro” (MOREIRA, 2006). Outro aspecto importante na comparação entre ambas as bactérias diz respeito à virulência, sendo XauB significativamente menos virulenta que XAC (GOTO, 1980).

A cancrose C é restrita ao Brasil (Estado de São Paulo), sendo causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC) (SCHAAD et al., 2006) e apresenta um hospedeiro único, a lima ácida galego.

**Figura 3.** Sintomas da cancrose cítrica causada por XAC, XauB e XauC em folha de *Citrus aurantifolia*, 21 dias após a inoculação.



Fonte: (MOREIRA, et al., 2010).

Há ainda outro tipo de cancrose identificado em viveiros da Flórida, a “mancha bacteriana dos citros”, ocasionada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* e que afeta principalmente o citrumelo *Swingle*. Foi reclassificada como *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* por Schaad et al. (2005; 2006).

Considerando que cada estirpe apresenta características particulares como as anteriormente descritas, marcadores específicos para cada uma delas poderiam auxiliar no

diagnóstico de plantas infectadas no campo, especialmente no período em que os sintomas no hospedeiro ainda não são aparentes, bem como na decisão de se eliminar ou não outros citros nas proximidades de um determinado foco da doença. Esta técnica poderia ser empregada no controle do cancro cítrico no campo, evitando uma grande devastação e perdas pela retirada de plantas sadias.

### **1.3 Interação planta-patógeno**

As plantas estão sempre expostas ao ataque de organismos patogênicos. Entretanto, estratégias de defesa têm sido desenvolvidas pelas plantas, incluindo respostas de longo e curto prazo. Tais respostas provêm da percepção de sinais extracelulares e na sua transdução dentro das células vegetais e entre elas mesmas.

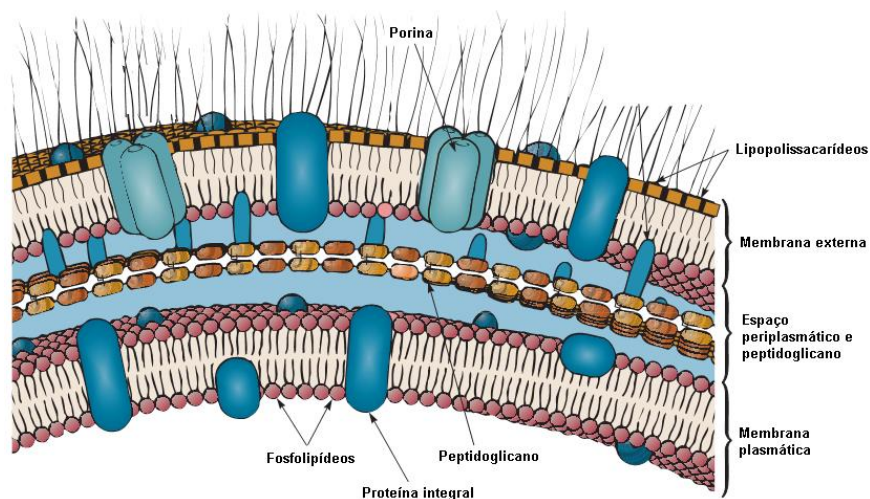
A interação entre planta e bactéria fitopatogênica pode ser classificada de acordo com dois tipos de reações. Na interação compatível, o patógeno é capaz de mascarar ou reprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro, podendo seguir seu desenvolvimento nos tecidos vegetais e colonizar a planta hospedeira. A manifestação dos sintomas ocorre através de mecanismos de patogenicidade e virulência que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta, os quais são capazes de modular, interferir ou suprimir as respostas de defesa da planta (WHITE et al., 2000).

Na interação incompatível, também conhecida como interação gene-a-gene, a bactéria penetra o tecido vegetal e é reconhecida pela planta através de sinais moleculares específicos provenientes do patógeno, o qual é então restringido ao sítio de infecção. A incompatibilidade ocorre quando genes de resistência da planta codificam proteínas receptoras (R) que interagem especificamente com proteínas efetoras (Avr) codificadas por genes de avirulência (avr) presentes no patógeno. Esses genes de avirulência fazem com que fitopatógenos induzam uma resposta de resistência no hospedeiro. Dessa forma, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas de defesa, resultando na morte celular e tecidual no sítio de infecção, o que caracteriza a reação de hipersensibilidade (HR, "Hipersensitivity Response"). Portanto, de acordo com essas interações, quando a planta é resistente, o patógeno é dito avirulento e a interação é incompatível. Por outro lado, quando a planta é susceptível, o patógeno é denominado virulento e a interação é compatível (STASKAWICZ et al., 2002; GACHOMO et al., 2003).

Para que consigam se estabelecer no hospedeiro, bactérias fitopatogênicas devem ser capazes de aderir à superfície da planta, invadir o espaço intercelular do tecido vegetal, captar nutrientes e responder às respostas de defesa do hospedeiro. O sucesso da infecção bacteriana depende em grande parte dos sistemas de secreção de proteínas, pelos quais proteínas são secretadas no espaço extracelular ou são então injetadas diretamente no citosol da célula hospedeira (BUTTNER; BONAS, 2009).

Bactérias Gram-negativas secretam vários tipos de proteínas extracelulares através da membrana externa, cuja função inclui biogênese de organelas (como o *pilus* e o flagelo), aquisição de nutrientes, virulência, secreção de drogas e outras toxinas. Para tanto, proteínas marcadas para secreção devem atravessar a membrana citoplasmática e a membrana externa, as quais se constituem em barreiras lipídicas separadas por um espaço periplasmático (Figura 4).

**Figura 4.** Estrutura do envelope celular de bactérias Gram-negativas



Fonte: (PRESCOTT, 2002).

As vias de secreção de bactérias Gram-negativas são distinguidas em seis grupos principais, sendo a classificação baseada na natureza molecular da maquinaria desses transportadores e nas reações catalisadas por elas (LEE; SCHNEEWIND, 2001) (Figura 5).

Os grupos de transportadores também podem ser classificados de acordo com o mecanismo de transporte através da membrana plasmática. As vias Sec-dependentes utilizam um sistema de secreção denominado Sec, o qual transporta proteínas pela membrana citoplasmática para o periplasma e facilita a integração da mesma na membrana lipídica. Proteínas destinadas à secreção apresentam uma sequência sinal peptídica clivável na



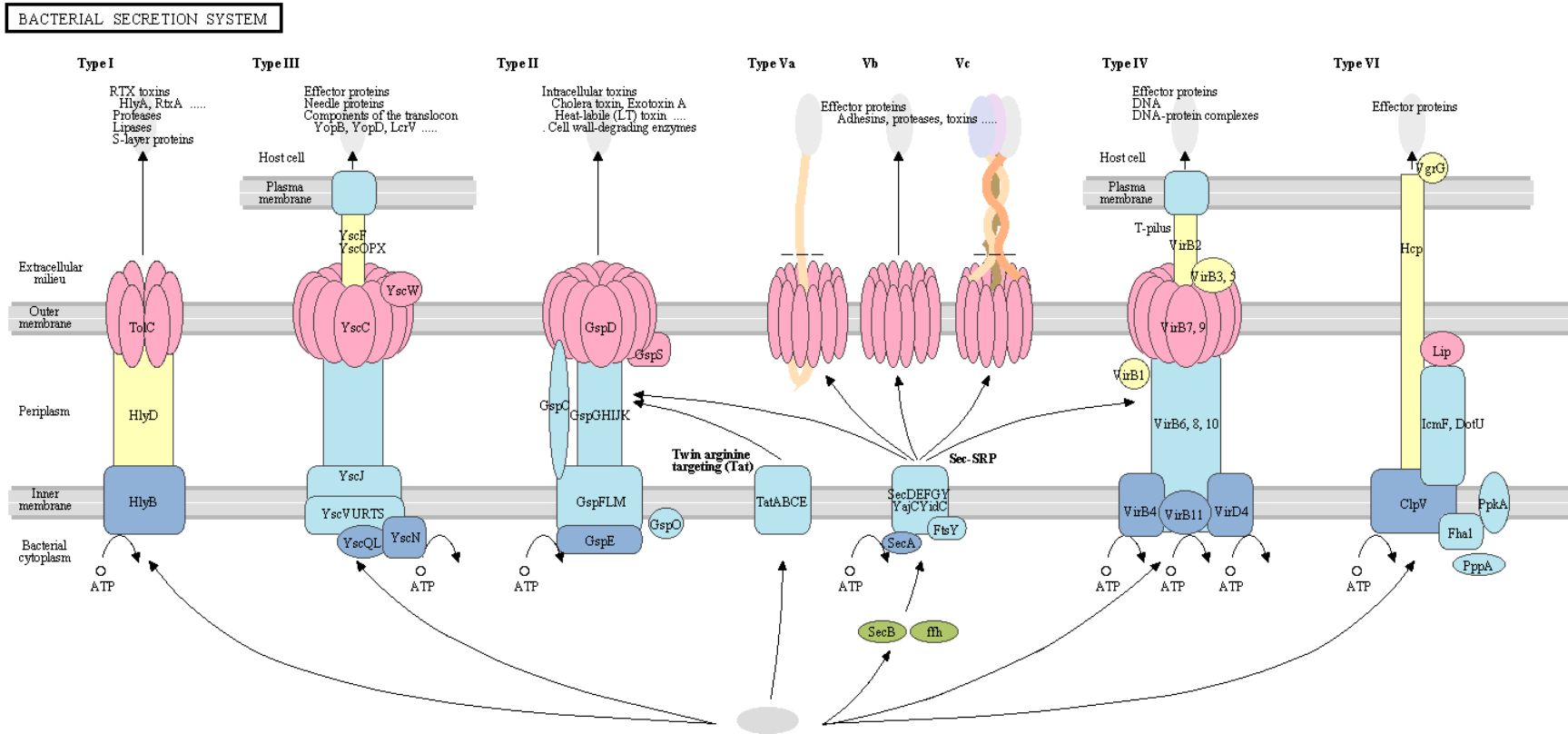
extremidade amino-terminal, o qual é posteriormente clivado no periplasma por peptidases sinais tipo I e tipo II na maioria das proteínas exportadas por essa via (PRESTON, 2005). Por outro lado, nas vias Sec-independentes não há um intermediário periplasmático e os substratos podem se deslocar diretamente do citoplasma até o meio externo (LEE; SCHNEEWIND, 2001).

Outra via de secreção recentemente descoberta é o sistema Tat (*twin-arginine translocation pathway*), pela qual, diferentemente do sistema Sec, proteínas já enoveladas são transportadas através da membrana citoplasmática por meio de um gradiente transmembrânico de prótons que atua como a principal força de translocação (BERKS, et al., 2003) (Figura 6).

Alguns polipeptídios são inseridos na membrana através de um peptídio sinal que não é clivado, denominado de sequência âncora, como ocorre com proteínas de membrana do sistema de secreção tipo I. Outros polipeptídios são inseridos na membrana plasmática por meio de um sinal peptídico clivável e por uma sequência hidrofóbica localizada abaixo deste, tal como ocorre em proteínas de membrana constituintes do sistema de secreção tipo II (LEE; SCHNEEWIND, 2001).

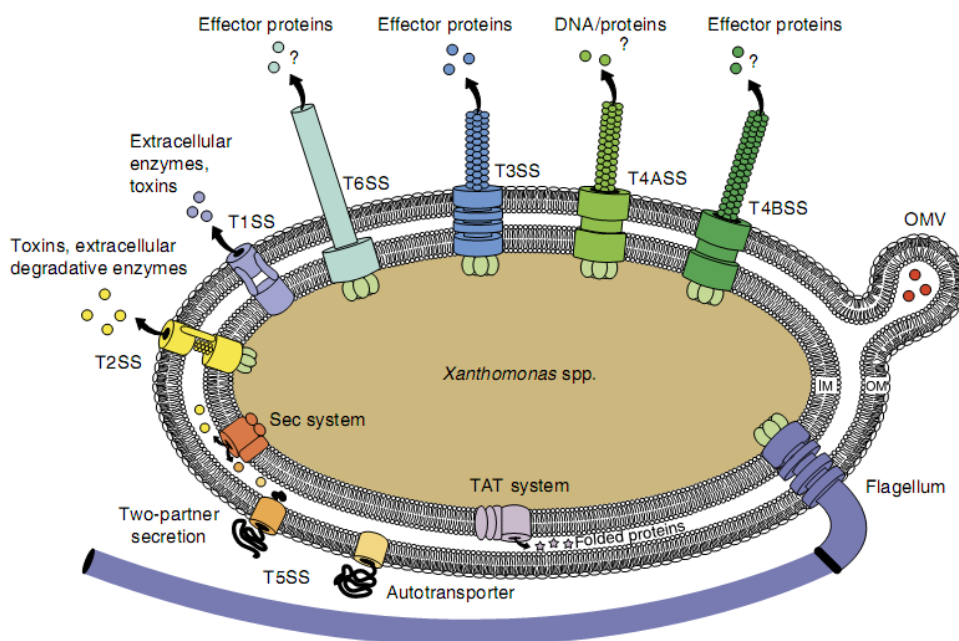
Transportadores *ATP-Binding Cassete* (ABC) compreendem uma grande superfamília de proteínas transportadoras de membrana envolvidas em diversas funções, incluindo secreção de toxinas, proteases e lipases por bactérias fitopatogênicas. O sistema de secreção tipo I (SSTI), ou *ATP-binding cassette* (ABC), é amplamente utilizado por bactérias Gram-negativas para a secreção de toxinas, lipases e proteases (Figura 5; Figura 6). É uma via Sec-independente, pois não requer o processamento de um peptídio líder para atravessar a membrana citoplasmática, sendo o transporte feito diretamente do citoplasma para o meio externo. O SSTI é composto por três componentes: um canal na membrana externa, denominado PME (proteína de membrana externa), um transportador ABC na membrana interna e uma proteína periplasmática ancorada na membrana interna, chamada de proteína de fusão (THANASSI; HULTGREN, 2000; PRESTON, 2005).

Figura 5. Representação dos sistemas de secreção em bactérias Gram-negativa.



Fonte: Kegg pathway, 2013.

**Figura 6.** Representação esquemática dos sistemas de secreção de *Xanthomonas* spp. Seis tipos de sistemas de secreção são codificados. Os SSTII e SSTV dependem dos sistemas Sec e TAT para o transporte através da membrana interna. Os sistemas SSTIII e SSTIV estão associados a estruturas extracelulares do *pilus* e presumivelmente translocam proteínas para o interior da célula hospedeira. OMV, vesículas da membrana externa; IM, membrana interna; OM, membrana externa; TAT, twin-arginine translocação.



Fonte: (BÜTTNER A BONAS, 2009).

O sistema de secreção tipo II (SSTII) de bactérias Gram-negativas é um complexo multiproteico responsável pela secreção de enzimas hidrolíticas e toxinas (Figura 5; Figura 6). A secreção por esse tipo de sistema é mediado por um aparato composto por diversas partes que se estendem tanto pela membrana interna quanto pela membrana externa. O processo de secreção ocorre por meio de duas etapas. Primeiro, a maquinaria Sec ou Tat transloca a proteína com seu peptídeo líder através da membrana plasmática. Esse peptídeo é então cortado e a proteína adquire sua conformação nativa no espaço periplasmático, para posteriormente ser secretada através da membrana externa pelo SSTII (GONZALEZ-PEDRAJO; DREYFUS, 2003).

O sistema de secreção tipo III (SSTIII), também conhecido como sistema de secreção dependente de contato, desempenha um papel central na interação de fitobactérias Gram-negativas e seu hospedeiro. Isso se deve ao fato de que esse tipo de sistema de

secreção é utilizado para a exportação de proteínas diretamente para o citoplasma da célula hospedeira. Uma estrutura de adesão à célula vegetal é produzida a partir de genes *hrp* (genes de patogenicidade e resposta de hipersensibilidade) presentes no patógeno, denominado de *pilus*, que, juntamente com um poro condutor, possibilita a secreção de proteínas através da membrana externa, passando diretamente do citosol bacteriano para a célula hospedeira (THANASSI; HULTGREN, 2000; PRESTON, 2005) (Figura 5; Figura 6).

O sistema de secreção tipo IV (SSTIV) é utilizado para a exportação tanto de proteínas como de complexos nucleoproteicos, que comumente ocorre de uma célula para outra. Foi recentemente identificado como uma via homóloga aos sistemas de conjugação bacteriana e ao sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, o qual facilita o transporte de DNA oncogênico (T-DNA) para o interior de uma célula eucariótica. O transporte de DNA por VirB e sistemas de conjugação ocorrem em uma única etapa desde o citoplasma até o meio externo. Entretanto, a secreção de proteínas parece ocorrer em duas etapas, primeiramente, atravessando a membrana plasmática via Sec-dependente e, então, ocorrendo o transporte para fora da célula (Figura 5; Figura 6). Assim como o SSTIII, é necessário o contato direto da célula bacteriana com a célula hospedeira, envolvendo a formação de um *pilus* (THANASSI; HULTGREN, 2000; PRESTON, 2005).

O primeiro exemplo descrito de secreção pelo sistema de tipo V (SSTV) foi para a peptidase IgA de *Neisseria gonorrhoeae*. Essa proteína apresenta um peptídeo sinal na porção N-terminal que a sinaliza para ser secretada para o periplasma via sistema Sec. A porção C-terminal da proteína então forma um poro na membrana externa, pelo qual o peptídeo maduro é exportado (Figura 5; Figura 6). Dessa forma, esse tipo de sistema de secreção tem sido chamado de autotransportador (PRESTON, 2005).

Entre os sistemas de secreção existentes, XAC apresenta em seu genoma regiões que codificam os sistemas de secreção tipo I, II, III, IV e V (SILVA et al., 2002; PRESTON, 2005), sendo os tipos III e IV também encontrados em XauB (MOREIRA et al., 2010). Sabe-se que o sistema de secreção tipo III permite que o patógeno seja capaz de injetar proteínas de virulência, denominadas de efetoras, no interior das células hospedeiras, enquanto que o sistema de secreção tipo IV também exerce um papel importante na patogenicidade incluindo adesão celular, motilidade, formação de microcolônias e secreção de proteases (CRAIG; LI, 2008).

Muitas espécies de microrganismos são capazes de formar uma estrutura de agregação denominada de biofilme, que se constitui em um aglomerado de células inseridas em uma matriz de origem orgânica (composta principalmente por polissacarídeos

extracelulares) que pode estar aderida a uma superfície (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1995; CROSSMAN et al., 2004). A habilidade de bactérias fitopatogênicas em formar e de se destacar de biofilmes pode ter implicações consideráveis em sua sobrevivência na superfície foliar e no seu ciclo de vida (CROSSMAN et al., 2004), pois sua formação oferece proteção contra antibióticos e repostas de defesa do hospedeiro, podendo também contribuir para a sobrevivência do patógeno no ambiente externo antes da colonização do espaço intercelular (STOODLEY, 2002).

Estudos mostram que bactérias do gênero *Xanthomonas* são capazes de sintetizar um polissacarídeo extracelular denominado xanthana, o qual protege a bactéria contra estresses ambientais. Sua produção é direcionada por muitos *loci* gênicos, entre eles, o *cluster* gênico *gum*, o qual é composto por 12 genes responsáveis pela síntese e liberação de xanthana (KATZEN, 1998). Tais genes estão presentes em muitas espécies de *Xanthomonas*, inclusive em XAC, XauB e XauC e contribuem para a sobrevivência bacteriana tanto no ambiente externo (crescimento epífita) quanto no interior do hospedeiro, bem como no surgimento dos sintomas. Sabe-se também que a produção de xanthana é importante para a integridade dos agregados bacterianos em cultura, o que foi demonstrado por Dow et al. (2003) em seu trabalho com mutantes para genes de *regulação de fatores de patogenicidade (rpf)*, os quais estão envolvidos na regulação da síntese desse extrapolissacarídeo.

Em seu trabalho, Gottig et al. (2009) estudou a expressão de um gene de XAC (*XacFhaB*), cujo produto é uma proteína tipo-hemaglutinina, que pode ser secretada ou associada à membrana bacteriana. Em seus resultados, a equipe verificou por RT-PCR um aumento da expressão desse gene durante a interação planta-patógeno e que a proteína codificada parece mediar a adesão da bactéria à superfície celular, já que mutantes *XacFhaB* mostraram uma diminuição nesse processo de adesão e na formação de biofilme, relacionando tal gene à virulência, tanto no crescimento epífita quanto no interior do hospedeiro.

Portanto, conforme abordado neste tópico, a formação de biofilme e a secreção de proteínas pelos sistemas de secreção são etapas centrais para o sucesso da infecção bacteriana, pois promovem a adesão celular, proteção contra respostas de defesa do hospedeiro, podendo também contribuir para a sobrevivência epífita antes da colonização do espaço intercelular vegetal.

#### 1.4 Era pós-genômica e a análise proteômica

Os dados gerados pelo sequenciamento do genoma, embora importantes, são limitados e necessitam serem complementados com outras técnicas que estudem tanto os processos de transcrição das informações contidas nos genes como os seus produtos, as proteínas. Essa integração deu início à chamada “Era Pós-Genômica” e vem promovendo o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de técnicas utilizadas no estudo dos transcritos (transcriptoma), proteínas (proteoma) e metabólitos (metabolômica).

A proteômica consiste no estudo do conjunto de proteínas de um organismo e tem como objetivo prover uma visão compreensiva de sua estrutura, função e regulação nos sistemas biológicos. Esta mesma ferramenta permite conhecer o produto final de um gene, as suas propriedades químicas e locais de atuação nas células, o que não é possível prever a partir das sequências de DNA devido às etapas posteriores de processamento pós-transcricional e pós-traducional de proteínas. Juntamente com a genômica, a proteômica tem provido um crescente e completo panorama da bioquímica ao nível celular e até mesmo ao nível de organismo.

Os recentes avanços na proteômica, como a introdução da espectrometria de massas para a análise de macromoléculas, juntamente com técnicas analíticas como a eletroforese bidimensional (eletroforese-2D), eletroforese capilar e a cromatografia líquida e a gasosa, tem permitido a expansão do estudo das proteínas e também de processos fisiológicos complexos e dinâmicos. Embora tecnologias alternativas à eletroforese-2D tenham surgido, esse método ainda é o único disponível para a resolução de milhares de proteínas simultaneamente, permitindo a visualização de grandes porções do proteoma.

A eletroforese 2-D é uma técnica que acopla a focalização isoeletrica (IEF), na primeira dimensão, ao SDS-PAGE, na segunda dimensão, permitindo assim a separação de uma mistura complexa de proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), massa molecular (MM), solubilidade e abundância relativa. Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, a eletroforese 2D pode resolver mais de cinco mil proteínas simultaneamente e pode detectar quantidades menores do que 1 ng de proteínas por *spot* (GORG et al., 2004).

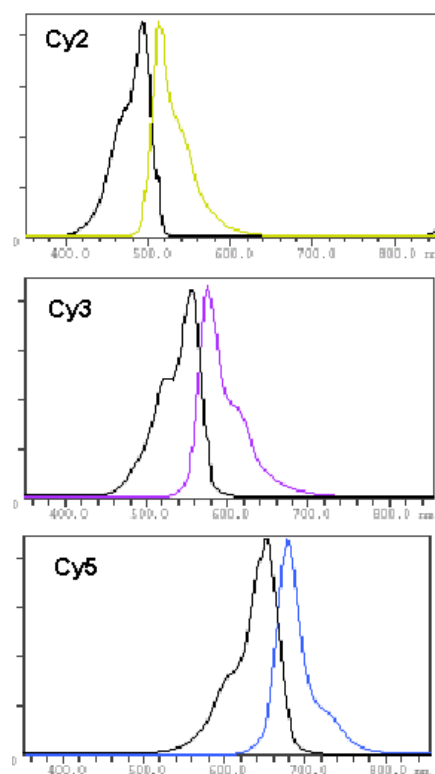
Embora ainda existam algumas dificuldades relacionadas a essa técnica, como a baixa resolução dos *spots* em algumas faixas de MM e pI, pouca sensibilidade para a detecção de proteínas pouco abundantes e de proteínas hidrofóbicas, avanços importantes têm sido introduzidos ao longo dos anos na eletroforese 2D para a superação desses problemas. O aumento de resolução tem sido possível pela utilização de faixas mais estreitas de gradiente de

pH durante a isoeletrofocalização, enquanto um aumento do nível de detecção de proteínas menos abundantes tem sido proposto pelo pré-fracionamento subcelular da amostra (GORG et al., 2004).

Entretanto, a eletroforese 2D é uma técnica que exige a confecção de um grande número de géis para serem analisados e comparados, além de apresentar problemas quanto à reprodutibilidade dos mesmos, dificultando a distinção entre a variação decorrente do sistema daquela induzida biologicamente.

Atualmente é possível diminuir o problema da reprodutibilidade dos géis e fazer uma quantificação mais precisa das proteínas que compõem o perfil do gel 2D pela técnica 2D-DIGE (*Two-Dimensional Difference In Gel Electrophoresis*), primeiramente descrita por Unlu et al. (1997). Esta técnica envolve a marcação de extratos proteicos, usando marcadores fluorescentes conhecidos como Cy2, Cy3 e Cy5 (*CyDye DIGE fluors dye*, GE). As amostras marcadas são misturadas e separadas simultaneamente no mesmo gel 2D. Os extratos proteicos marcados com os diferentes marcadores podem ser visualizados separadamente pela excitação específica de cada um com diferentes comprimentos de onda (Figura 7; Tabela 1), gerando imagens digitais de cada amostra individualmente.

**Figura 7.** Espectro de excitação e emissão para *CyDye DIGE Fluor dyes* Cy2, Cy3, e Cy5.



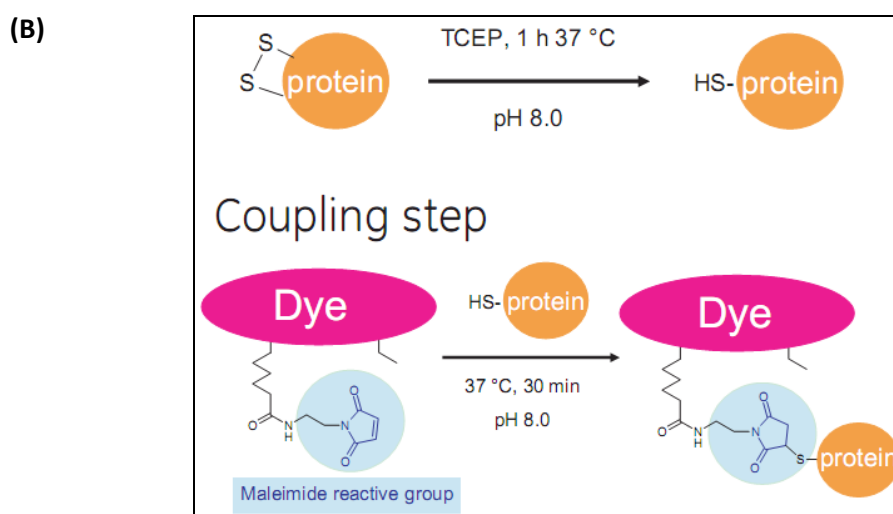
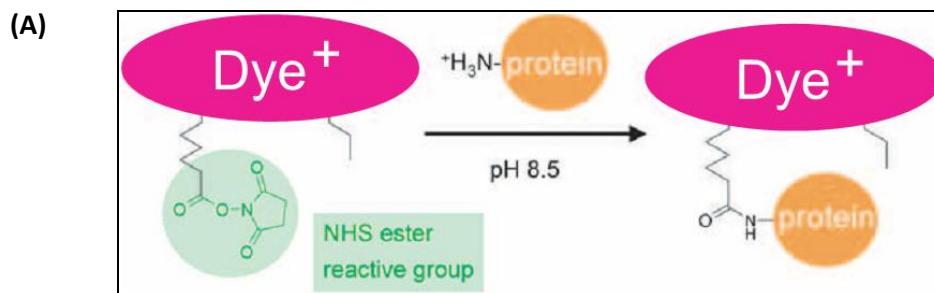
**Tabela 1.** Características do *CyDyes Fluor minimal dyes*.

<b>Flúor</b>	<b>Cor da fluorescência</b>	<b>Máx. absorção (nm)</b>	<b>Máx. emissão (nm)</b>
Cy2	verde	491	509
Cy3	laranja	553	569
Cy5	vermelho	645	664

Há duas estratégias possíveis para a marcação de proteínas utilizando-se esses marcadores fluorescentes. Na marcação mínima, a razão de marcador por proteína é baixa, de forma que há teoricamente apenas uma molécula do composto fluorescente por proteína. Assim, nesta técnica são utilizadas pequenas quantidades de marcador (*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*), os quais apresentam um grupo reativo NHS-éster que se liga covalentemente aos resíduos de lisina (Figura 8A). Consequentemente, cerca de apenas 5% do total de proteínas presentes na amostra são marcadas (MAROUGA, 2005). Devido à alta quantidade de resíduos de lisina presente na maioria das proteínas, o uso da marcação por saturação poderia acarretar em problemas quanto à solubilidade protéica. Assim, a estratégia de marcação por saturação envolve a ligação covalente de grupos reativos maleimidas dos marcadores (*CyDye DIGE Fluor saturation dyes*) ao grupo tiol dos resíduos de cisteína (Figura 8B), de forma que se torna necessária uma razão alta de marcador/proteína. A baixa ocorrência de resíduos de cisteína em proteínas, juntamente com sua resistência a modificações químicas, torna esse aminoácido susceptível para esta estratégia, na qual são utilizadas grandes quantidades de marcador (MAROUGA, 2005).



**Figura 8.** Esquema da reação de marcação com CyDyes (GE Healthcare). (A) Reação de marcação mínima com *CyDye DIGE Fluor minimal dye*. (B) Reação de marcação por saturação com *CyDye DIGE Fluor saturation dyes*.



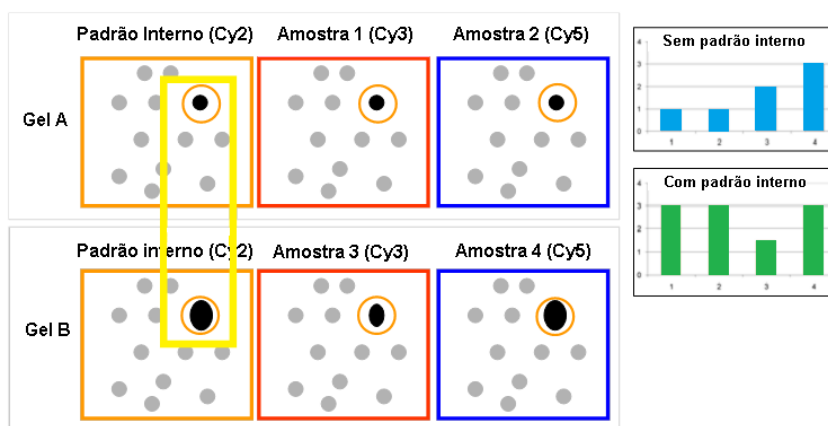
Fonte: *Ettan DIGE System User Manual (GE Healthcare)*.

Comparativamente à eletroforese bidimensional convencional, a técnica 2D-DIGE oferece maior sensibilidade na detecção de proteínas. No método por marcação mínima, é possível detectar quantidades inferiores a 1 ng (0,025 ng para Cy3 e Cy5, e 0,075 ng para o Cy2), quantidade mínima detectada pela coloração por prata, por exemplo, enquanto que a marcação por saturação é ainda mais sensível, com valores inferiores a 15 pg (MAROUGA, 2005). Assim, é possível utilizar apenas poucos microgramas de amostra (por exemplo, 5 µg), enquanto que para a técnica de 2D-PAGE convencional são necessários centenas de microgramas (por exemplo, 300 µg), o que apresenta grande importância em trabalhos que envolvem pequenas quantidades de amostras proteicas.

Ainda na técnica de 2D-DIGE, várias amostras são submetidas a uma mesma corrida em um mesmo gel, o que proporciona uma redução na variação do padrão do *spot*, reduzindo o número de géis necessários para validar estatisticamente o experimento. É

recomendado que em experimentos com quantidades superiores a três amostras seja utilizado um padrão interno, o qual deve estar presente em todos os géis de um experimento. Este padrão interno é constituído por quantidades iguais de proteínas de cada amostra biológica do experimento, as quais são marcadas com um mesmo corante, geralmente o Cy2. Assim, as proteínas de cada amostra estarão representadas no padrão interno, o que permite que as mesmas sejam normalizadas com o padrão interno presente no mesmo gel, sendo a abundância de cada *spot* proteico medido como uma razão (e não como um volume) relativa ao seu *spot* correspondente no padrão interno (MAROUGA, 2005) (Figura 9). Dessa forma, é possível realizar uma quantificação mais acurada devido ao aumento da confiança do *matching* entre os géis durante a análise estatística, além de separar variações induzidas biologicamente daquelas produzidas pela variação experimental.

**Figura 9.** Esquema que ilustra a importância do uso do padrão interno nos experimentos de 2D-DIGE. Cada gel é constituído por duas amostras biológicas e pelo padrão interno, o qual contém alíquotas de todas as quatro amostras apresentadas na figura. O *spot* destacado mostra-se em diferentes tamanhos entre o padrão interno dos géis, o que evidencia uma variação experimental. A interpretação da expressão deste *spot* é apresentada nos gráficos. Como pode ser visto, a comparação feita a partir de dados de volume do *spot* fornece uma interpretação errônea da abundância do *spot*, enquanto que a comparação por uma razão relativa ao padrão interno gera uma interpretação mais precisa da sua abundância.



Fonte: *Ettan DIGE System User Manual (GE Healthcare)*.

Com os recentes avanços da técnica de espectrometria de massas aplicada para o estudo de macromoléculas como as proteínas, a eletroforese bidimensional tem sido frequentemente empregada em associação a esta ferramenta, por meio da qual é possível determinar sequências de aminoácidos, identificar proteínas, bem como suas modificações

químicas (ex., fosforilações e glicosilações), dentre outras aplicações. Proteínas previamente separadas em géis bidimensionais são coletadas do gel e digeridas em peptídeos através do uso de uma protease sequência-específica, como a tripsina. Os peptídeos gerados são submetidos a um processo que os converte em íons em fase gasosa (ionização) e são separados de acordo com seus valores de massa/carga. A magnitude da corrente produzida ao atingirem um detector é usada para determinar a intensidade (abundância) e o valor da razão massa/carga do íon (SIMPSON, 2002). Os dados de espectrometria de massa, relativos à sequência dos peptídeos, possibilitam identificar a proteína, por meio de *softwares* desenvolvidos para a comparação desses dados com proteínas “teóricas” presentes em bancos de dados do organismo em estudo, anotadas a partir de sua sequência genômica.

A análise proteômica também pode ser realizada por técnicas que não envolvem a separação em géis, chamadas de *gel-free*. Essa abordagem proteômica, denominada de *shotgun*, se refere à análise direta de misturas complexas, gerando um perfil global das proteínas presentes na mistura. Essa abordagem tem sido facilitada pelo uso da técnica *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT), na qual proteínas são separadas em duas dimensões por uma cromatografia de troca catiônica e uma de troca reversa, seguida por HPLC e espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS). Para isso, as amostras são digeridas por uma enzima (p.ex. tripsina) e submetidas à análise por espectrometria de massas busca em banco de dados, conforme descrito acima. Por não exigir um conhecimento prévio da composição da amostra, esse método tem sido muito utilizado em experimentos que buscam descobrir o perfil de proteínas expressas em um organismo, ou tecido, sob uma determinada condição (DOMON; AEBERSOLD, 2010).

### **1.5 Estudos do genoma e do proteoma de *Xanthomonas* spp. causadoras do cancro cítrico**

O sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC), por laboratórios da rede ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*) da FAPESP, revelaram que seu genoma é composto por 5.175.554 pares de bases que codificam 4.313 proteínas (SILVA et al., 2002). A comparação das sequências genômicas dos diferentes tipos de *Xanthomonas* spp. pode fornecer informações importantes sobre a especificidade de hospedeiros e a sua patogenicidade. Para isso, o projeto genoma de sequenciamento dos tipos XauB e XauC foi realizado por grupos de pesquisa da USP - SP e UNESP - Jaboticabal, com o suporte da FAPESP e do FUNDECITRUS. As sequências foram depositadas no *National*

Center for Biotechnology Information (NCBI). Estima-se que cerca de 94% do genoma de XauB e 96% do genoma de XauC tenha sido sequenciado (MOREIRA et al., 2010).

Em seu trabalho Moreira et.al. (2010) encontrou diversas semelhanças e diferenças entre os genomas de XAC, XauB e XauC, e também entre outras *Xanthomonas* sp. Seus resultados mostraram, por exemplo, que XAC compartilha 74% de seus genes codificantes de proteínas com XauB e XauC, sendo 87% compartilhados com XauB e 84% com XauC. Outras diferenças foram encontradas em genes relacionados à formação de biofilme, sendo que XauB apresenta algumas variações no gene *rpfN* que podem explicar seu crescimento fastidioso tanto *in vivo* quanto em cultura. Outros resultados dizem respeito aos genes efetores XopAI e XopE3, presentes nas três linhagens, e cuja deleção reduziu a capacidade de causar o cancro cítrico. Entretanto, o maior destaque pode ser dado ao gene *xacPNP* encontrado somente em XAC, o qual possivelmente é um dos genes responsáveis pela maior virulência apresentada por esta bactéria. Novos estudos de genética molecular podem agora ser utilizados para determinar o papel destes genes diferenciais nas interações planta-microrganismo, de forma que o conhecimento adquirido possa ser fundamental para melhorar o controle do cancro cítrico.

Embora a análise genômica e funcional em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* já seja objeto de estudo por parte de alguns grupos de pesquisa, do ponto de vista da análise comparativa da expressão dessa bactéria frente à *X. fuscans*, praticamente inexitem estudos em andamento que complementem a análise genômica comparativa *in silico* dos tipos A, B e C, especialmente no que se refere à análise proteômica, uma importante ferramenta em estudos pós-genômicos.

A fim de compreender a diferença de patogenicidade exibida por XAC e por XauC, Cernadas e sua equipe (CERNADAS et al.,2008) avaliaram os perfis transcricionais de *Citrus sinensis* (laranja doce) após infecção com essas duas espécies bacterianas. Através da expressão gênica de *C. sinensis* em resposta a esses patógenos, os autores encontraram 100 genes relacionados ao desenvolvimento do cancro e à resistência à doença. Foram observadas mudanças nos perfis transcricionais dos genes relacionados à defesa, parede celular, tráfego de vesículas e crescimento celular em folhas infectadas por XAC entre 6 a 48 horas após a infecção. Essas observações foram consistentes com a noção de que XAC suprime as defesas do hospedeiro logo no início da infecção e ao mesmo tempo muda o estado fisiológico das células do hospedeiro cítrico, reprogramando-as para divisão e crescimento. Por outro lado, XauC, através da ativação de proteínas quinases sinalizadoras e fatores transcricionais responsivos ao etileno, ativa genes de defesa da planta (CERNADAS et al.,2008).

Facincani (2007) realizou trabalhos relacionados à análise proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, no qual obteve resultados relacionados à primeira construção de um mapa proteômico da XAC em meios indutor de virulência e não indutor, além de uma triagem temporal de proteínas da XAC expressas diferencialmente em diferentes condições infectantes, sendo, portanto, XAC cultivada em meio indutor de virulência (XAM1) por 24 h, ou em confronto direto com a planta cítrica hospedeira (*Citrus sinensis*) por 3 ou 5 dias de infecção (condições infectantes) comparando-se com XAC cultivada em meio não indutor de virulência CN (condição não infectante), utilizado como referência. A autora encontrou 39% de todas as proteínas preditas pelo genoma de XAC, em condições não infectantes (meios CN e TSB, meios basais não indutores), estando as mesmas distribuídas em todas as categorias funcionais. Além disso, 25% das proteínas designadas como hipotéticas conservadas do genoma foram detectadas. O perfil de expressão protéico decorrente do contato XAC/citros revelou um total de 57 proteínas diferenciais associadas à patogenicidade e virulência, sendo 17 detectadas pela técnica de eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massas e 40 pela tecnologia *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT), as quais forneceram resultados complementares, porém com diferenças inerentes a cada uma destas estratégias. Dentre essas proteínas, destacam-se as proteínas dos Sistemas de Secreção Tipo II, III e IV, efetoras do SSTIII, proteínas relacionadas a estresse, goma xantana, carência nutricional, entre outras. Uma comparação dos resultados obtidos por Facincani e os encontrados no presente trabalho é apresentada no subitem 5.2 da discussão.

Outros estudos interessantes de análise proteômica envolvendo a interação de *Xanthomonas* sp. com seu hospedeiro tem sido realizados. Mehta e Rossato (2001) utilizaram eletroforese-2D e sequenciamento N-terminal para analisar o perfil de proteínas expressas após o crescimento de XAC em contato com extratos foliares de um hospedeiro susceptível, de um resistente e de uma planta não-hospedeira, em comparação com uma condição controle. Os resultados revelaram duas proteínas expressas constitutivamente (pseuduridina sintase 3; fator de alongação P), uma proteína com expressão reduzida (proteína de choque térmico G) na presença de extrato cítrico e duas proteínas com maior expressão na presença do mesmo (sem identificação por sequenciamento N-terminal). Em outro estudo, a mesma equipe desenvolveu um método simples para a realização de análises de expressão de proteínas e de RNA mensageiro: células bacterianas foram recuperadas por exsudação do tecido vegetal, as proteínas foram extraídas com fenol e extração de RNA foi realizada com Trizol. De acordo com seus resultados de RT-PCR utilizando *primers* específicos para genes conhecidos de XAC

(*pthA*; *clp*; *mobL*), foi possível obter todos os produtos de amplificação esperados. Além disso, o perfil proteico obtido foi muito semelhante ao apresentado por XAC na presença do extrato de *Citrus sinensis* (conforme trabalho anterior; Mehta e Rossato, 2001), entretanto, algumas novas proteínas diferencialmente expressas *in vivo* foram observadas, porém não foram identificadas (MEHTA; ROSSATO, 2003).

Aproximadamente um quarto ou até mesmo um terço de todos os genes bacterianos são responsáveis pela codificação de proteínas da membrana interna ou da membrana externa. Tais proteínas desempenham funções fisiológicas essenciais, como a importação ou exportação de metabólitos, íons metais envolvidos com a homeostase, excreção de substâncias tóxicas ou antibióticos e também na geração ou conversão de energia (POETSCH; WOLTERS, 2008). Além disso, muitas proteínas que atuam durante o processo de infecção por bactérias Gram-negativas patogênicas estão localizadas ou associadas à membrana citoplasmática ou à membrana externa, enquanto outras proteínas necessitam passar por tais compartimentos para serem secretadas e desempenharem sua função. Há também proteínas importantes para o processo infeccioso que atuam na adesão da célula bacteriana à célula hospedeira e para tanto, estão expostas na superfície celular. Dessa forma, a superfície de membrana é um compartimento celular de interesse substancial e a compreensão do perfil de proteínas nele expressas pode fornecer um melhor entendimento da maneira com que seu proteoma é regulado e como responde a diversos tipos de sinais intra e extracelulares (SHIN, 2003).

Atualmente há uma escassez de trabalhos que envolvam a análise do proteoma de superfície celular em decorrência de problemas associados à baixa quantidade dessas proteínas e à dificuldade em resolver e de identificá-las. De fato, proteínas de membrana geralmente são pouco representadas em estudos de proteômica bidimensional, devido à sua baixa solubilidade e à presença de regiões transmembranas hidrofóbicas (GORG, 2004). Uma estratégia comumente utilizada é o fracionamento celular, entretanto, há uma limitação a essa abordagem por possível contaminação por proteínas citoplasmáticas, além de não resolver o problema da insolubilidade de proteínas de membrana (SHIN, 2003). Outra estratégia envolve métodos de marcação de proteínas com corantes fluorescentes (*CyDye*) em células intactas, o que, além de aumentar a sensibilidade de detecção de proteínas pouco abundantes, também possibilita a detecção de proteínas de membrana sem a necessidade de fracionamento celular prévio. Esta técnica de marcação para proteínas superficiais foi descrita recentemente para células humanas, se mostrando bastante eficiente (MAYRHOFER, 2006).

Em seu trabalho, McWither et al. (2008) testou duas estratégias de marcação de proteínas de membrana utilizando células ovarianas de Hamster e os corantes Cy3, Cy5 e Cy2. Com um dos corantes marcou células intactas, de forma que somente proteínas de membrana foram marcadas, enquanto que outro corante foi usado para marcar proteínas de superfície após realizar o fracionamento de um lisado celular. Seus resultados mostraram que muitas proteínas de superfície somente puderam ser detectadas quando as células foram marcadas antes de serem lisadas, em comparação ao método de marcação após lise celular seguida de fracionamento, concluindo que as proteínas de membrana foram melhores representadas no método de marcação de células intactas. A equipe de McWhiter também detectou que poucas proteínas intracelulares foram marcadas, concluindo que apenas uma pequena quantidade de corante foi capaz de atravessar a membrana plasmática.

É possível que na membrana se concentrem diferenças em termos de expressão proteica para os diferentes agentes do cancro cítrico, constituindo-se um importante foco de interesse para a análise do perfil proteico de *Xanthomonas*. A interação direta do patógeno com seu hospedeiro por meio do cultivo *in vivo* dispensa o uso de um meio mimético de tal condição e pode fornecer informações relevantes sobre mudanças no proteoma decorrentes deste contato. Assim, o presente trabalho apresenta a membrana externa como objeto da análise proteômica, visando comparar o perfil de XAC após cultivo *in vivo* no hospedeiro (condição infectante) em relação ao obtido por cultivo *in vitro* (condição não infectante). Adicionalmente, o perfil de XAC será comparado com o de XauB, ambas após crescimento *in vivo*, uma vez que a primeira apresenta maior virulência e infecta maior espectro de hospedeiros do que a última. Esta investigação pode levar à identificação de proteínas-chave envolvidas com a fitopatogenicidade, as quais poderiam se constituir em candidatas a marcadores e/ou alvos para o combate da infecção em plantas.

Para isso, com o presente trabalho foi introduzido pela primeira vez em nosso laboratório o cultivo bacteriano *in vivo* em folhas de um hospedeiro cítrico, técnica que exigiu padronização. Poucos trabalhos de proteômica envolvendo o cultivo *in vivo* de *Xanthomonas* sp. são descritos na literatura e nenhum está voltado especificamente para a análise de proteínas superficiais de membrana. Para o desenvolvimento deste projeto, foi também necessária a adequação da técnica de 2D-DIGE para analisar o proteoma de superfície celular dos tipos A e B de *Xanthomonas* sp. por meio da marcação fluorescente destas proteínas com os corantes Cy3, Cy5 e Cy2, seguida de lise celular. Nenhum trabalho relacionado a esta abordagem de 2D-DIGE envolvendo a marcação fluorescente de células bacterianas intactas foi descrito até o momento na literatura para espécies bacterianas.

Sabendo-se que proteínas de membrana são normalmente utilizadas como alvos para o desenvolvimento de drogas, tal como proteínas-acopladas à proteína G (*G protein-coupled receptors* – GPCRs) e proteínas constituintes de canal iônico (DREWS, 2000), neste trabalho buscamos por proteínas de superfície que possam estar relacionadas ao processo infeccioso e que futuramente possam contribuir para o desenvolvimento de drogas e para o combate à doença. Tais proteínas-alvo reveladas pela presente análise proteômica serão também utilizadas em estudos de biologia molecular em andamento em nosso laboratório, os quais envolvem a clonagem, expressão heteróloga e deleção dos genes correspondentes em *Xanthomonas* sp, com subsequente caracterização do mutante quanto à patogenicidade e perfil proteômico frente à linhagem selvagem.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar, por meio de análise proteômica diferencial de proteínas superficiais da membrana e total da célula, a identificação de proteínas potencialmente relacionadas com a fitopatogenicidade/ espectro de hospedeiros cítricos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) por meio de duas abordagens comparativas: XAC infectante (crescimento *in vivo*) vs não infectante (*in vitro*), e XAC vs *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB), espécie menos virulenta, ambas após crescimento *in vivo*.

### 2.2 Específicos

- Obtenção das curvas de crescimento (contagem de Unidades Formadora de Colônia, UFC) de XAC e XauB após crescimento *in vivo*, a fim de inferir o final da fase exponencial de crescimento bacteriano;
- Padronização do cultivo de XAC e XauB em folhas do hospedeiro e da marcação de proteínas de superfície de membrana de células intactas com corantes fluorescentes para análise proteômica por 2D-DIGE;
- Padronização da técnica de 2D-DIGE;
- Análise estatística da expressão das proteínas detectadas por 2D-DIGE para determinar quais apresentam expressão diferencial significativa (ANOVA  $p < 0,05$ ) entre as condições estudadas (XAC *in vivo* vs XAC *in vitro*), seguida por isolamento e digestão triptica dos *spots* selecionados;
- Identificação das proteínas diferenciais a partir de resultados gerados por espectrometria de massas (LNBio, Campinas-SP) e por pesquisa em banco de proteínas anotadas a partir da sequência genômica de cada bactéria (*Mascot software*).
- Análise por espectrometria de massas do tipo *shotgun* na tentativa de identificação de proteínas totais de XAC e de XauB, como alternativa à metodologia de eletroforese bidimensional.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens bacterianas e meios de cultura

As linhagens genômicas de XAC (linhagem 306) e XauB (linhagem IBSBF 1631) foram fornecidas pelo FUNDECITRUS – Araraquara, SP. As bactérias foram cultivadas em meio líquido caldo nutriente (CN, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona e 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne) e estocadas no mesmo meio acrescido de glicerol 16% para o preparo das culturas permanentes. Em seguida, foram armazenadas a -80°C.

A reativação das bactérias a partir da cultura permanente foi realizada através do estriamento em placas de meio sólido ágar nutriente (AN), cuja composição é a mesma do CN, acrescido de 2% de ágar. Após inoculadas, as placas foram mantidas em estufa aquecida a 28°C.

Para a obtenção dos inóculos, XAC e XauB foram cultivadas em meio AN e mantidas em estufa a 28°C. Após o período de crescimento (3 e 4 dias, respectivamente), as células foram então inoculadas em folhas de *Citrus aurantifolia* (limão-galego), adquiridas comercialmente de viveiros (Gilmar Citros e Chácara Zambuzzi), situados na cidade de Limeira-SP.

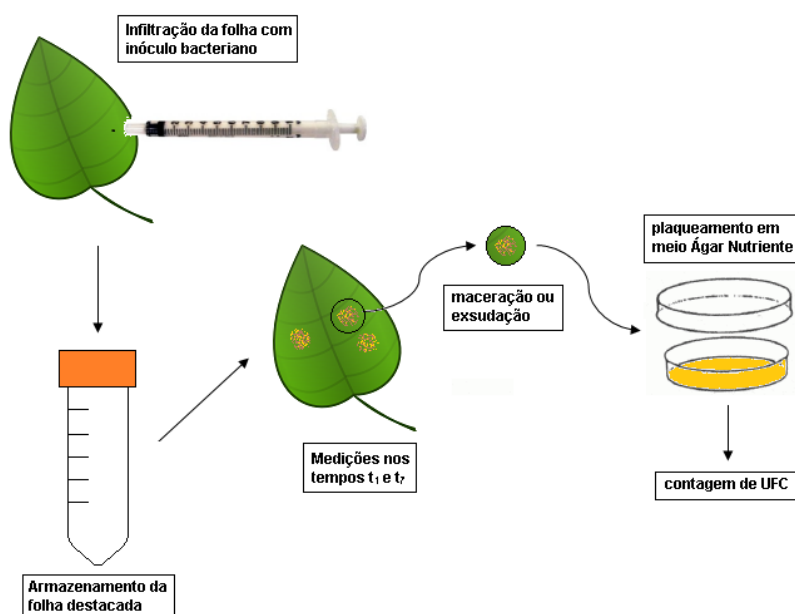
#### 3.2 Inoculação de células bacterianas em folhas de limão-galego

Após cultivo em meio sólido AN, as células de XAC e XauB foram ressuspensas em água destilada de forma a obter uma suspensão celular com densidade óptica (DO) de 0,3 (Abs 595 nm). Essa suspensão foi então infiltrada na superfície inferior de folhas destacadas de *Citrus aurantifolia* com o auxílio de uma seringa, em local previamente perfurado com agulha, até encharcar a folha (Figura 10). Cada folha foi inoculada de 3 a 4 vezes, conforme seu tamanho, sendo recuperados vários discos conforme esse número. Após infiltração, as folhas foram introduzidas em tubos Falcon de 45 mL contendo 5 mL de água “corrente”, os quais foram mantidos semi-abertos em bancada (sem controle da temperatura ambiente). Este procedimento foi utilizado tanto para a realização das curvas de crescimento *in vivo* (item 3.3) como também para a obtenção de células para a análise de proteínas de superfície da membrana e total da célula (item 3.4).

### 3.3 Curvas de crescimento de XAC e XauB em *Citrus aurantifolia*

O crescimento populacional de cada espécie bacteriana foi avaliado segundo duas metodologias. Células bacterianas provenientes de um disco de 6 mm de diâmetro no local da infiltração foram recuperadas por maceração das folhas com almofariz (Andrade et al., 2008), ou por exsudação (Mehta e Rosato, 2003) em 1mL de água destilada autoclavada durante duas horas. A suspensão foi diluída a concentrações apropriadas ( $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ) e uma alíquota de 100  $\mu$ L foi inoculada em placas de AN, as quais foram mantidas em estufa a 28°C para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (Figura 10). Os dias de amostragem foram determinados de acordo com os resultados obtidos durante o decorrer do experimento e cada curva de crescimento foi realizada em triplicata.

**Figura 10.** Esquema de cultivo *in vivo* (em folhas destacadas) de XAC e XauB para a realização das curvas de crescimento e para a obtenção de células para experimentos de análise proteômica.



Os resultados das duas metodologias foram comparados de forma a se determinar se o método de exsudação, a ser utilizado nos experimentos de análise proteômica, possibilitava uma boa recuperação das células bacterianas. Este método foi o de escolha para tal análise, uma vez que a contaminação com proteínas do hospedeiro pode ser minimizada comparativamente à técnica de maceração das folhas.

A fim de se conhecer quantas células eram recuperadas por cada disco foliar, foi realizada a contagem de UFC presentes em 1 mL do exsudato de um único disco. Assim, um disco recuperado de uma folha infiltrada com XAC foi retalhado e, após duas horas de exsudação, uma alíquota foi diluída ( $10^{-4}$ ) e 100  $\mu$ L foram inoculados em placas AN. Resultados mostraram a recuperação de em média  $1 \times 10^7$  células em 1 mL de exsudato. Adicionalmente foi realizada a medida da absorbância (Abs 595 nm) desse exsudato de um disco foliar inoculado com XAC, sendo obtido um valor de 0,195, de forma que este valor corresponde a  $1 \times 10^7$  células. Essas medidas foram utilizadas para inferir o número de células necessárias para a marcação fluorescente de proteínas (item 3.4).

### **3.4 Marcação de proteínas de superfície de XAC e de XauB**

As células bacterianas a serem utilizadas no processo de marcação de proteínas de superfície da membrana foram recuperadas de folhas infectadas de limão galego por meio de exsudação no sétimo dia de crescimento, dia este equivalente ao final da fase exponencial de crescimento de XAC (ver resultados, item 4.2). Foram inoculadas 72 folhas com XAC para cada uma das duas comparações realizadas (XAC *in vivo* vs. XAC *in vitro*; XAC vs XauB) e 120 folhas com XauB (para a comparação de XAC vs XauB). Os discos recortados a partir das folhas (inoculadas 3 ou 4 vezes, item 3.2) foram retalhados para maior eficiência da recuperação celular, sendo que para a exsudação foi utilizado 1 mL água destilada para cada disco. As células presentes no exsudato foram lavadas e ressuspensas em tampão PBS (0.136 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0017 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH8.5), a partir do qual as mesmas foram colocadas em contato com 400 pmol de *CyDyes DIGE Fluor Minimal dyes* para marcação das proteínas de superfície segundo protocolo descrito pela *GE Healthcare*, por Mayrhofer et al. (2006) e McWhirter et al. (2008). Após o processo de marcação fluorescente, as células foram lavadas com tampão de lavagem (0.136 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0017 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4), centrifugadas e ressuspensas em tampão de lise celular (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 10 mM DTT), sendo ocasionalmente submetidas à agitação por vortex. Após lise celular, o conteúdo foi centrifugado a  $10000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante recuperado. Por fim, as proteínas foram quantificadas (item 3.6.1) e submetidas à análise proteômica por 2D-DIGE (item 3.6.3). O mesmo procedimento de marcação fluorescente de proteínas de superfície foi utilizado para células de XAC cultivadas *in vitro*, a fim de se comparar com a condição *in vivo*.

A marcação fluorescente das amostras foi realizada conforme desenho experimental recomendado pelo manual *GE Healthcare*. A tabela 2 mostra um exemplo do esquema para a marcação fluorescente das amostras de XAC obtidas a partir de proteínas extraídas de células crescidas *in vivo* e de células crescidas *in vitro* no meio CN.

**Tabela 2.** Desenho experimental da marcação fluorescente de amostras proteicas para experimentos de 2D-DIGE. Cada gel contém uma alíquota do padrão interno, uma amostra proveniente de células cultivadas *in vivo* (Exsudato) e uma amostra proteica obtida de células crescidas no meio CN.

	Cy2	Cy3	Cy5
<b>Gel 1</b>	Padrão interno	Exsudato 1	Meio CN 1
<b>Gel 2</b>	Padrão interno	Meio CN 2	Exsudato 2
<b>Gel 3</b>	Padrão interno	Exsudato 3	Meio CN 3
<b>Gel 4</b>	Padrão interno	Meio CN 4	Exsudato 4

### 3.5 Validação da marcação de proteínas de membrana

Paralelamente, foi realizado um teste para validação da marcação de proteínas superficiais da membrana com células crescidas *in vitro* (meio CN). Considerando que 1 mL de cultura com DO 1,6 corresponde a  $1 \times 10^8$  células de XAC, cerca de  $1 \times 10^7$  células (~ 1mL) foram marcadas com o corante fluorescente Cy3 (CyDyes DIGE Fluor minimal dyes), lavadas, lisadas e submetidas à ultracentrifugação a 40.000 rpm, 2 horas, 4°C (Ultracentrífuga Himac CP 90 WX - Hitachi). Os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (7M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS).

Alíquotas de cada uma das frações de membrana (*pellet*) e de citosol (sobrenadante) foram separadas por SDS-PAGE como descrito a seguir. Quantidades apropriadas (25 µg) de amostras protéicas foram adicionadas de tampão de Laemmli 6x (375 mM Tris-HCl; 6% SDS; 15% β-mercaptoetanol; 60% glicerol; 0,06% azul de bromofenol), diluídas em água milli-Q e fervidas a 100°C por 5-10 min. Em seguida, foram submetidas à eletroforese unidimensional em sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell, em tampão de corrida (0,3% de Tris, 1,5% de glicina e 0,1% SDS) a uma voltagem constante de 110V até o final da corrida. O gel foi corado com prata para comparação do seu perfil protéico com o perfil obtido desse mesmo gel pela detecção da fluorescência com digitalizador de géis apropriado (*scanner Ettan DIGE, GE Healthcare*).

### 3.6 Análise proteômica

### 3.6.1 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas obtidas nos extratos proteicos foi realizada com o kit 2D-Quant (GE Healthcare), que se baseia na quantificação por cobre residual, e a absorbância verificada em leitora de placas *iMark* (Biorad) em 480 nm. O volume necessário de cada amostra foi calculado a fim de se obter a quantidade necessária de proteínas para a aplicação em cada gel 2D-DIGE e para os experimentos por espectrometria de massas tipo *shotgun*.

### 3.6.2 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)

Volumes apropriados de cada amostra foram separados de forma a conter 50 µg de proteína e em seguida foram adicionados de 1,25 µL de *IPG buffer* pH 3 a 10 (0,5%) e *DeStreak™ rehydration solution* (GE Healthcare) suficiente para totalizar um volume final de 250 µL. Essa solução foi adicionada a tiras de IPG (*Immobilized pH Gel*) (*Immobiline™ DryStrip*, GE Healthcare) de pH 3 a 10 para a hidratação e entrada da amostra no gel. A separação de proteínas na primeira dimensão, que consiste na focalização isoeétrica, foi realizada no sistema *Ettan™ IPGphor 3* (GE Healthcare) segundo programação apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Programação utilizada para a isoeletrofocalização das amostras.

Modo	Voltagem	Voltagem/hora ou tempo
<i>Step</i>	100 V	11:00 h
<i>Step</i>	500 V	500 Vh
<i>Grad</i>	1000 V	750 Vh
<i>Grad</i>	8000 V	11300 Vh
<i>Step</i>	8000 V	5000 Vh

Após a separação na primeira dimensão, as tiras foram armazenadas em tubos de ensaio envoltos por papel alumínio para proteger da exposição à luz e estocadas em -80°C por no máximo uma semana, até serem submetidas à segunda dimensão.

A preparação das tiras para a separação na segunda dimensão (SDS-PAGE) envolveu a incubação das mesmas em 3 mL de solução de equilíbrio (5,8 M uréia; 0,06 M SDS; 0,12 M Tris pH 8,8 e 30% glicerol, com traços de *Bromophenol Blue*) contendo 10 mg.mL<sup>-1</sup> de DTT durante 15 minutos, sob agitação. Em seguida, a solução foi descartada e substituída por

3 mL de solução de equilíbrio contendo  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de iodoacetamida, sendo submetida a agitação por 15 minutos. Após este tempo, a solução foi retirada e as tiras mergulhadas rapidamente para lavagem em tampão de corrida (0,3% de Tris, 1,5% de glicina e 0,1% SDS).

As tiras foram então colocadas na parte superior do gel de poliacrilamida (concentração de 12,5%), com o cuidado de não danificar o gel. Para o padrão de peso molecular (*Benchmark* – Invitrogen) foi utilizado papel de filtro de dimensões 1 cm x 1 cm com 10  $\mu\text{L}$  da solução, o qual, após secagem em estufa, foi colocado no gel próximo ao lado positivo da tira de IPG. O gel de poliacrilamida foi selado com solução de agarose 1% contendo traços de *Bromophenol Blue*.

A eletroforese da segunda dimensão foi realizada em sistema Hoefer™ SE600 (*GE Healthcare*) em tampão de corrida contendo 0,3% de Tris, 1,5% de glicina e 0,1% SDS, a  $15^\circ\text{C}$  (sistema *MultiTemp III*, *GE Healthcare*). A corrida foi realizada mantendo-se a corrente elétrica a 10 mA/gel nos primeiros 30 minutos e a 45 mA/gel até o término da corrida.

Os géis 2D resultantes foram digitalizados com o *scanner* e programa *Ettan DIGE Imager* (*GE Healthcare*), o qual utiliza filtros de excitação e de emissão específicos para cada marcador fluorescente. O tempo de exposição também foi ajustado para cada marcador fluorescente analisado, de forma a obter uma melhor aquisição da imagem.

Após a digitalização dos géis, os mesmos foram submetidos a coloração com prata, segundo protocolo abaixo (Tabela 4). A escolha do protocolo foi feita de acordo com a compatibilidade com análises por espectrometria de massas.

**Tabela 4.** Protocolo utilizado para a coloração dos géis 2D-DIGE (compatível com experimentos de espectrometria de massas).

Etapa	Solução	Tempo (min)
Fixação	50% Metanol (etanol) e 5% ácido acético em água	60
Lavagem	50% Metanol (etanol) em água	20
Lavagem	Água destilada	10
Lavagem	Água destilada	120
Sensibilização	0,025% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3
(2x) Lavagem	Água destilada	1
Coloração	0,15% $\text{AgNO}_3$	45
(2x) Lavagem	Água destilada	1
Revelação	3% $\text{Na}_2\text{CO}_3$ e 0,05% de formaldeído	3 - 10 min
(3x) Interrupção	5% de ácido acético	5 min

Fonte: (MORTZ et al, 2001).

Os géis corados com prata foram então digitalizados com o *Image Scanner III* (GE *Healthcare*), utilizando-se o *software LabScan 6.0*, com resolução de 300 dpi, *Green filter* e modo transparente. O ponto isoelétrico e a massa molecular aproximada de cada *spot* foi determinada pelo *Software ImageMaster™ 2D Platinum 7.0* (GE *Healthcare*), já que o *Software DeCyder* não atribui esses valores sem uma informação prévia fornecida pelo usuário a um dos *spots*, o que só pode ser feito a partir da identificação de uma proteína por espectrometria por massas. Tais informações foram posteriormente utilizadas para a comparação dos valores obtidos experimentalmente com os valores teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas identificadas por espectrometria de massas.

### **3.6.3 Análise dos géis 2D-DIGE pelo software DeCyder 2D**

O programa *DeCyder 2D* (GE *Healthcare*) foi utilizado para a análise das imagens dos géis de 2D-DIGE. Primeiramente, foi realizada uma análise diferencial intra-gel, com o uso do módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) para se obter uma quantificação dos *spots* de cada imagem gerada pelas diferentes fluorescências, comparando o volume dos mesmos com o volume dos *spots* presentes no padrão interno. Para isso, o módulo DIA detecta os *spots* das três imagens de um mesmo gel e quantifica a abundância proteica para cada um deles. Os valores de abundância são então expressos como razões que indicam mudanças dos níveis de expressão a partir da comparação direta dos *spots* correspondentes entre as imagens. Essa razão pode ser usada em experimentos de menor escala, avaliando diretamente mudanças entre as duas amostras estudadas.

Os dados gerados pelo módulo DIA foram utilizados para a análise inter-gel pelo módulo BVA (*Biological Variation Analysis*), o qual permite uma comparação da abundância proteica entre as amostras nos diferentes géis. Um gel mestre é selecionado por conter o maior número de *spots* e, por meio do padrão interno, é feita uma comparação estatística dos níveis de proteína (abundância). As proteínas que apresentaram uma expressão diferencial significativa entre as duas condições estudadas pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ) foram isoladas do gel para análise/ identificação por espectrometria de massas.



### 3.6.4 Análise das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas

Os *spots* que apresentaram expressão diferencial significativa ( $p < 0,05$ ) entre as condições estudadas (XAC *in vivo* e XAC em meio CN) foram isolados do gel e inseridos individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5mL (*Axygen*) para posterior tratamento.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas - LNBio, em Campinas, SP, com o auxílio das técnicas Bianca Pauletti e Romênia Ramos Domingues e sob coordenação da Dra. Adriana Franco Paes Leme. Os procedimentos prévios de descoloração dos *spots*, redução e alquilação das proteínas contidas nestes *spots* foram realizados para a posterior hidrólise das mesmas com tripsina, como descrito a seguir (protocolo disponível em <http://lnbio.cnpem.br/massspectrometry/>).

Os *spots* foram descorados com 50% metanol e 2,5% ácido acético por 2h a temperatura ambiente, sendo este processo repetido por 1h. Após a desidratação em acetonitrila 100% por 5 min, por duas vezes, o restante foi evaporado em equipamento *Speedy Vac* (Vacufuge Plus Model 5305). Posteriormente, foi realizada a redução das proteínas com 10 mM DTT em 100 mM bicarbonato de amônio e posterior alquilação com 50 mM IAA em 100 mM bicarbonato de amônio (no escuro), por 30 min em cada etapa. Os *spots* foram lavados com bicarbonato de amônio por 10 min e novamente desidratados em acetonitrila (100%), por 5 min a temperatura ambiente. Após a reidratação com 100 mM bicarbonato de amônio por 10 min e novamente desidratação em acetonitrila (100%), este passo foi repetido. O restante da solução foi evaporada em *Speed Vac* (Vacufuge Plus Model 5305).

Uma solução contendo 20ng/ $\mu$ L de tripsina em 50 mM bicarbonato de amônio gelado foi adicionada aos *spots* por 30 min, no gelo, para reidratação do gel. O excesso de solução foi removida e uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada até cobrir o gel, sendo posteriormente 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 5% acetonitrila, reagindo por 10 min a temperatura ambiente, por duas vezes. A amostra foi evaporada deixando cerca de 1  $\mu$ L, sendo ressuspensa em 0,1% ácido fórmico.

As amostras inicialmente foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa em colunas de C18 (*Waters*) para separação dos peptídeos trípticos. Os peptídeos foram então analisados por um espectrômetro de massas Q-TOF *Ultima* (*MicroMass/Waters*), com fonte de ionização *electrospray* (ESI) (voltagem do capilar de 3,5 kV) e analisador quadrupolo/tempo de

vão 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 e analisados por meio do *software Mascot*. Para isso, foram utilizados valores de massas monoisotópicas dos espectros MS/MS (MS/MS *Ion Search*), carbamilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação da metionina como modificação variável. Outro critério considerado foi a modificação variável dos resíduos de lisina, os quais podem ou não apresentar a marcação com os *CyDyes* (massas médias: 663.5966 Da para Cy2, 684.8442 Da para Cy5, e 672.8335 Da para Cy3; massas monoisotópicas: 663.182850 Da para Cy2, 684.298156 Da para Cy5, e 672.298156 Da para Cy3). Na hidrólise por tripsina foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos MS e MS/MS foi de 0,1 Da. As buscas foram realizadas utilizando-se banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *SwissProt High* e de contaminantes (*Common contaminants compiled by Max Planck 44 Institute of Biochemistry, Martinsried*). Consideramos os peptídeos identificados quando o valor da pontuação (*score*) da comparação, calculado pelo Mascot, foi superior ao nível de significância de homologia extensiva ou identidade da proteína analisada com as proteínas de banco de dados.

### **3.6.5 Análise das amostras proteicas de XAC e de XauB por *shotgun***

Amostras de proteínas totais de XAC e de XauB (ambas após cultivo *in vivo*) preparadas para utilização nos experimentos de 2D-DIGE (item 3.4) foram também submetidas à análise proteômica por *shotgun*. Para isso, 50 µg de cada amostra (três réplicas biológicas de XAC e três de XauB) foram tratados em solução com DTT 5 mM final durante 25 minutos a 56°C para redução das proteínas, seguido por alquilação com IAA 14 mM final durante 30 minutos a temperatura ambiente. Foi novamente adicionado DTT 5mM final durante 15 minutos. A amostra foi então diluída em 1:5 em 50 mM de bicarbonato de amônio a fim de reduzir a concentração da uréia para 1.6M. Após a adição de cloreto de cálcio 1 mM final, as amostras foram incubadas por 16h a 37°C com uma solução de tripsina 20 ng/µL (1:50 de enzima:substrato) para a digestão das proteínas. Ácido trifluoacético (TFA) foi adicionado na concentração final de 0.4% para interromper a reação da enzima até obter um pH abaixo de 2.0. As amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo.

Foi necessária a realização de uma cromatografia de troca iônica para a remoção de detergentes presentes na amostra, o qual pode interferir nas análises por espectrometria de massas. Para isso, colunas Oasis MCX 1 cc Vac Cartridge (10 mg Sorbent per Cartridge, 30  $\mu$ m Particle Size, 100/pk) foram condicionadas sequencialmente com 2 mL de metanol e 1 mL de TFA 0.1% e as amostras diluídas em 1 mL de TFA 0.1% foram então carregadas. As colunas foram lavadas sequencialmente com cada uma das soluções: 2 mL de TFA 0.1%, 2 mL de acetonitrila/água (8:2, v/v) e 0.1% TFA, e 2 mL de água. Os peptídeos foram eluídos com 1.5 mL de metanol/hidróxido de amônio 28% (9:1, v/v) e, após evaporação em *Speedy Vac* (Vacufuge Plus Model 5305), as amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o dia da análise.

As análises por *shotgun* foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas - LNBio, em Campinas, SP, com o auxílio das técnicas Bianca Pauletti e Romênia Ramos Domingues e sob a coordenação da Dra. Adriana Franco Paes Leme. As amostras inicialmente foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa em colunas de C18 (*Waters*) para separação dos peptídeos tripticos. Os peptídeos foram então analisados por um espectrômetro de massas *Q-TOF Ultima (MicroMass/Waters)*, com fonte de ionização *electrospray* (ESI) (voltagem do capilar de 3,5 kV) e analisador quadrupolo/tempo de vôle 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 e analisados por meio do *software* Mascot. Para isso, foram utilizados valores de massas monoisotópicas dos espectros MS/MS (*MS/MS Ion Search*), carbamilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação da metionina como modificação variável. Outro critério considerado foi a modificação variável dos resíduos de lisina, os quais podem ou não apresentar a marcação com os *CyDyes* (massas médias: 663.5966 Da para Cy2, 684.8442 Da para Cy5, e 672.8335 Da para Cy3; massas monoisotópicas: 663.182850 Da para Cy2, 684.298156 Da para Cy5, e 672.298156 Da para Cy3). Na hidrólise por tripsina foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos MS e MS/MS foi de 0,1 Da. As buscas foram realizadas utilizando-se banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *SwissProt High* e de contaminantes (*Common contaminants compiled by Max Planck 44 Institute of Biochemistry, Martinsried*). Somente são considerados peptídeos identificados quando o valor da pontuação (*score*) da comparação, calculado pelo Mascot, for superior ao nível de

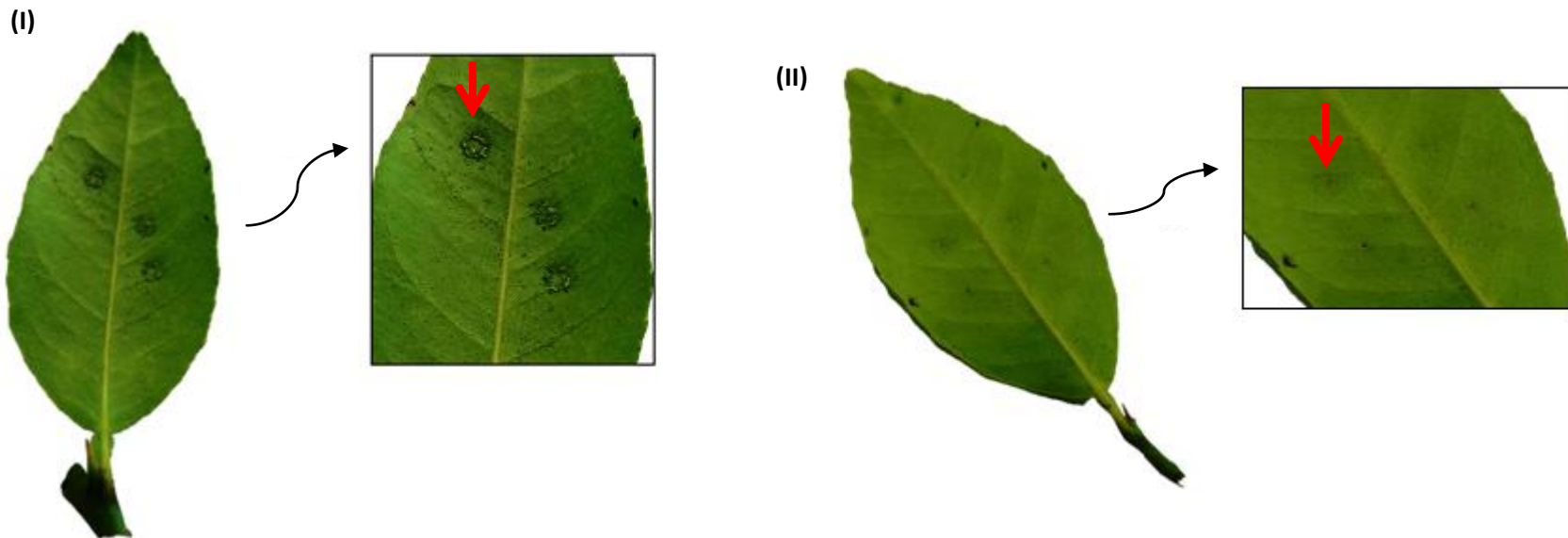
significância de homologia extensiva ou identidade da proteína analisada com as proteínas de banco de dados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Infiltração de folhas de limão galego com *Xanthomonas* spp.

Para a realização das curvas de crescimento e experimentos de marcação fluorescente de proteínas superficiais de células bacterianas intactas (item 3.4) e *shotgun* (item 3.6.5) após interação com hospedeiro (*in vivo*), XAC e XauB foram cultivadas em folhas de *Citrus aurantifolia* por meio da infiltração de uma solução bacteriana. As folhas foram observadas diariamente quanto ao surgimento de sintomas de cancro cítrico e outras mudanças morfológicas. Os resultados mostraram que após sete dias da inoculação com XAC sintomas visíveis da doença puderam ser observados, enquanto que para XauB não foram observados sintomas típicos do cancro cítrico (Figura 11), mesmo após trinta dias de cultivo. Outra característica interessante foi a ocorrência da excisão do pecíolo foliar após certo período de infecção com XAC, sendo geralmente por volta do 8º dia. Tal característica não foi observada para o período de incubação de folhas de limão galego com XauB (período máximo observado: 30 dias).

**Figura 11.** Folhas de limão galego infiltradas com *Xanthomonas* spp. após sete dias de cultivo. (I) Sintomas visíveis da doença puderam ser observados após sete dias da infecção por XAC (seta em vermelho). (II) Na infecção por XauB não foi possível observar sintomas característicos da doença (seta em vermelho), mesmo após 30 dias de cultivo.

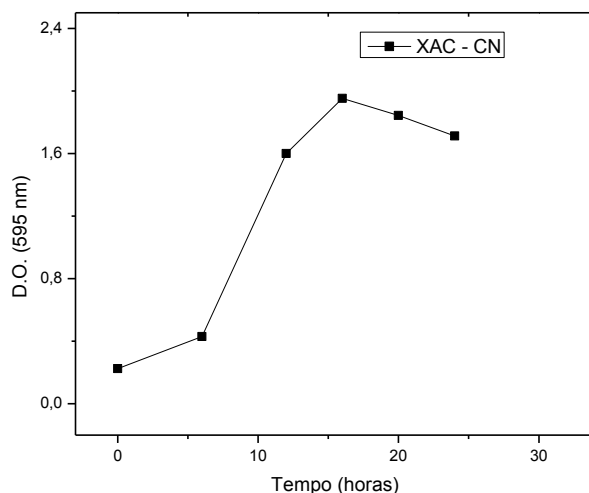


## 4.2 Curvas de crescimento de XAC

### 4.2.1 *In vitro*

Para a coleta de células de XAC em meio CN, foram realizadas medidas de absorvância do meio de cultivo bacteriano para a avaliação do crescimento. De acordo com os resultados apresentados na figura 12, o pico de crescimento de XAC ocorre com 18 horas de crescimento, momento escolhido para a coleta celular. Assim, é importante ressaltar que o tempo de cultivo de XAC difere nas duas condições apresentadas (*in vivo* ou *in vitro*), de forma que ficou estabelecido que a coleta das células seria realizada no momento do pico de crescimento bacteriano.

**Figura 12.** Curvas de crescimento de XAC em meio CN. Uma alça de massa celular bacteriana cultivada em meio sólido AN foi inoculada em 20 mL de meio CN e os valores de D.O. foram obtidos pela leitura de absorvância a 595 nm em leitora de placas *iMark* (Biorad).



### 4.2.2 *In vivo* – Células recuperadas por maceração ou exsudação

As curvas de crescimento baseadas na contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foram realizadas visando verificar a quantidade das células viáveis (coletadas para a análise proteômica) e a eficiência da recuperação celular por dois diferentes métodos. Os resultados são apresentados na Figura 13.

Para cada espécie bacteriana, os perfis de crescimento obtidos por ambos os métodos de recuperação celular foram semelhantes, mostrando um pico de crescimento por

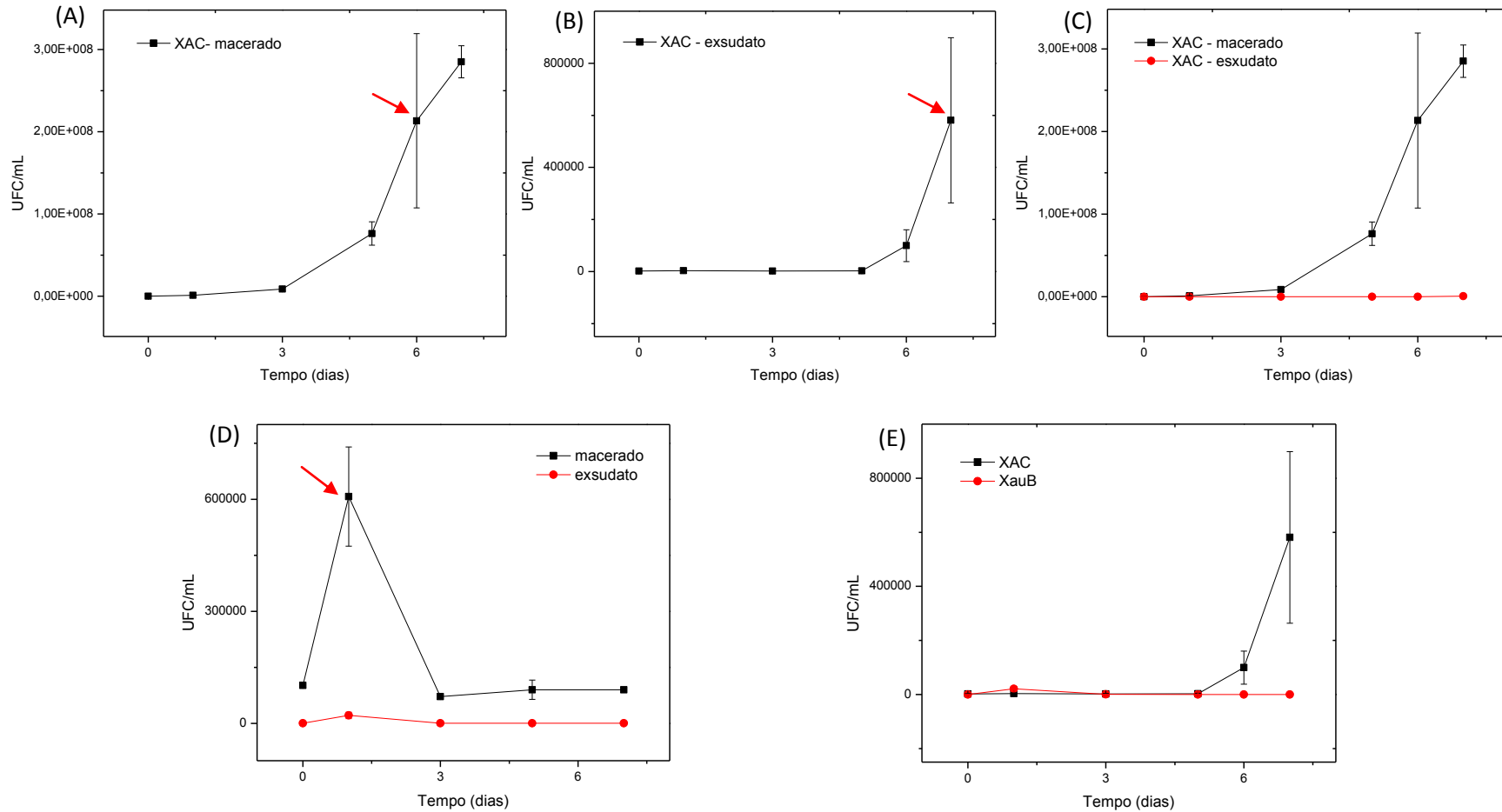
volta do sétimo dia para XAC, enquanto que em XauB um pequeno aumento ocorre no dia seguinte ao da infiltração das folhas e permanece com baixos valores de UFC/mL nos demais dias. É importante destacar também a diferença de crescimento apresentada entre as duas espécies em termos de quantidade de células recuperadas. Os resultados indicam um crescimento muito maior para XAC (aproximadamente  $1,0 \cdot 10^8$  UFC/mL no pico de crescimento) em comparação ao observado para XauB (aproximadamente  $1,0 \cdot 10^5$  UFC/mL no mesmo período) (Figura 13-E). Essa diferença pode estar relacionada à maior virulência apresentada por XAC, a qual também é capaz de infectar um número maior de hospedeiros cítricos comparada a XauB, conhecida como uma espécie de crescimento fastidioso em meio sólido (MOREIRA, 2010).

Ambos os métodos permitiram a avaliação do crescimento bacteriano, entretanto, a recuperação celular por meio de maceração do tecido vegetal mostrou-se mais eficiente, com a qual foi possível obter um número muito maior de UFC/mL (cerca de  $1,0 \cdot 10^8$  para XAC) comparado ao obtido pelo método de exsudação (cerca de  $1,0 \cdot 10^5$  para XAC). Por outro lado, este último é um método menos agressivo e foi o escolhido para os procedimentos de análise proteômica.

Diante da pequena quantidade de células de XauB recuperadas pelo método de exsudação foi realizado um teste para infiltração das folhas de limão galego utilizando-se uma suspensão bacteriana com DO de 1,2 (Abs 595 nm), ou seja, um valor três vezes maior que o utilizado anteriormente, a fim de se verificar se seria possível obter maior número de células no momento da coleta celular por exsudação. Conforme resultados apresentados na figura 14, os valores obtidos com o inóculo bacteriano mais concentrado forneceu valores ainda mais baixos de UFC/mL, contrariamente ao que era esperado. Assim, foi mantido a de densidade óptica da suspensão bacteriana em 0,3, valor utilizado também para XAC.

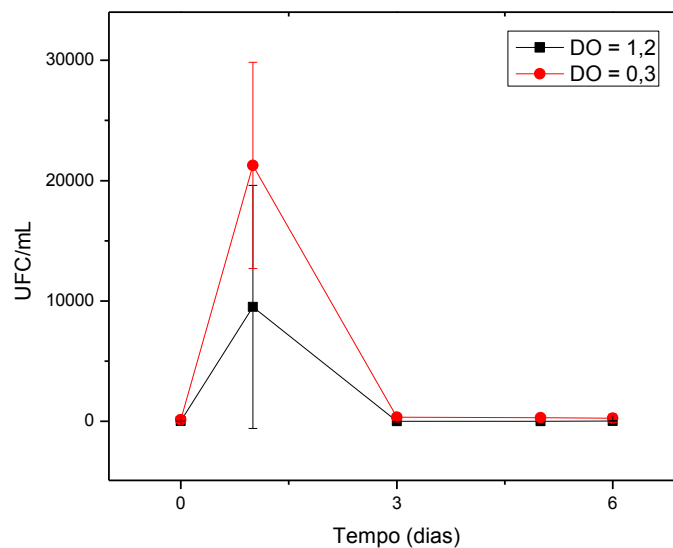
De acordo com os resultados das curvas de crescimento, ficou estabelecido que a coleta das células de XAC fosse realizada no sétimo dia de cultivo *in vivo*, momento em que a bactéria se encontra no seu pico de crescimento. Apesar de este não ser o tempo de maior crescimento de XauB, ficou igualmente estabelecido que a coleta seria realizada no mesmo período, a fim de manter os mesmos parâmetros de tempo de cultivo.

**Figura 13.** Curvas de crescimento de XAC e XauB em folhas de limão galego pela contagem de UFC/mL. (A) Células de XAC foram obtidas por maceração ou (B) por exsudação. Em (C) as duas curvas são apresentadas na mesma escala. (D) Células de XauB foram recuperadas por maceração ou exsudação. (E) Comparação da quantidade de células recuperadas de cada espécie bacteriana em um disco foliar pelo método de exsudação. Experimentos obtidos em triplicatas. Setas em vermelho indicam o pico de crescimento apresentado por cada bactéria.





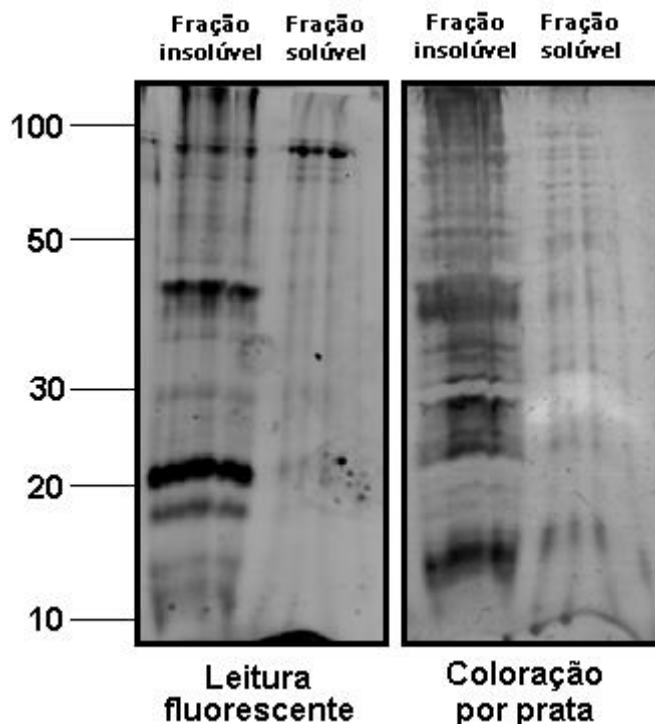
**Figura 14.** Curva de crescimento de XauB em folhas de limão galego pela contagem de UFC/mL. Para a infiltração, foram utilizados inóculos de XauB com DO 1,2 (curva em preto) ou DO 0,3 (curva em vermelho) (Abs 595 nm). Experimentos obtidos em triplicatas.



#### 4.3 Teste para validação da marcação fluorescente das proteínas de superfície celular de *Xanthomonas* spp.

Para verificar quais frações proteicas são marcadas fluorescentemente pela técnica aqui descrita, células intactas de XAC crescidas *in vitro* (meio CN) foram marcadas com Cy3 e submetidas à lise e ultracentrifugação. A fração insolúvel, constituída em sua maioria por proteínas de membrana, e a fração solúvel, constituída por proteínas de citoplasma em sua maioria, foram analisadas por eletroforese unidimensional (item 3.5). Na leitura de fluorescência da fração citosólica foi possível notar marcação apenas em uma banda de alto peso molecular quando comparado ao perfil total citoplasmático apresentado após coloração por prata (Figura 15).

**Figura 15.** Validação da metodologia de marcação de proteínas da membrana de *Xanthomonas citri* sp. *citri* por meio de reação de células intactas com Cy3 (*GE Healthcare*). Células foram lisadas após a marcação e o conteúdo submetido à ultracentrifugação. Proteínas do *pellet* (25 µg) após solubilização e do sobrenadante (25 µg) foram separados por SDS-PAGE 12%, sendo o gel digitalizado para detecção de fluorescência e em seguida corado com prata.

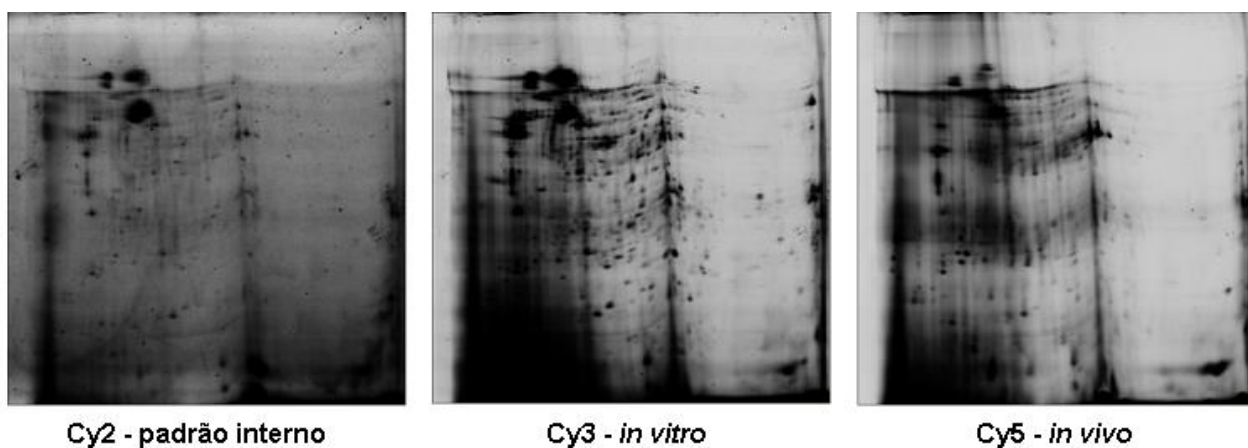


#### 4.4 Padronização da técnica de 2D-DIGE para proteínas de superfície celular de *Xanthomonas* spp.

Inicialmente, foi utilizado um tampão composto por Tris 10 mM e Acetato de magnésio 5 mM para a lavagem das células de *Xanthomonas* spp. adquiridas a partir do exsudato (*in vivo*) ou do meio CN (*in vitro*). Este tampão foi utilizado nos experimentos apresentados pelo manual da *GE Healthcare* para a lavagem celular de *Escherichia coli* e posterior extração de proteínas e marcação fluorescente. Dessa forma, esse mesmo tampão foi aplicado para lavagem celular de *Xanthomonas* spp. e na ressuspensão das células para a marcação fluorescente. Entretanto, a presença do Tris pareceu interferir na reação de marcação fluorescente. Considerando que essa reação ocorre pela ligação covalente do grupo NHS éster do marcador fluorescente ao grupo amina de um resíduo de lisina é possível que grupo amina do Tris tenha reagido com os *CyDyes*, provocando o surgimento de um forte

*background* nos géis 2D-DIGE durante a leitura de fluorescência (Figura 16). Este artefato impossibilitou a utilização desses géis nas análises estatísticas.

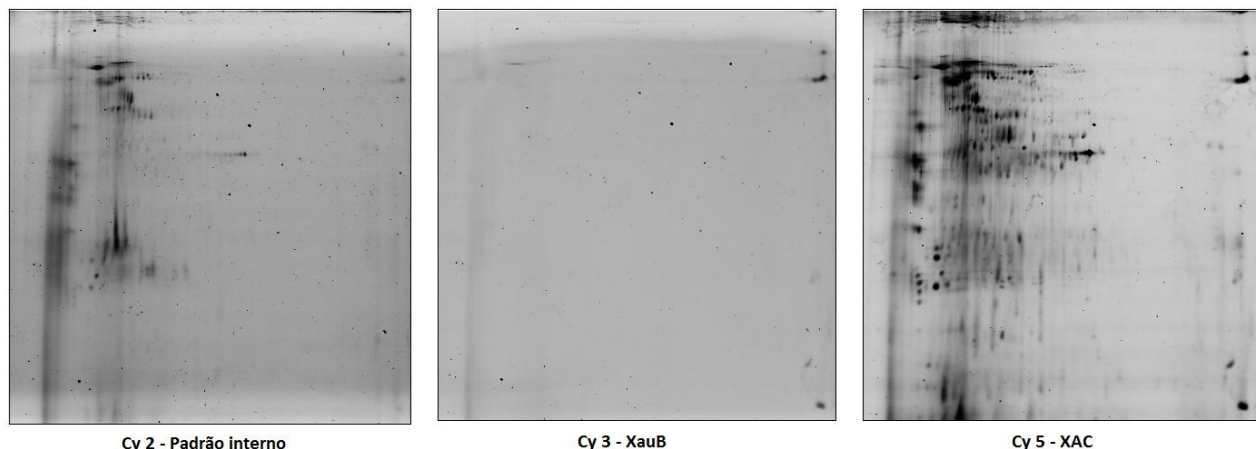
**Figura 16.** Imagens de um gel 2D-DIGE de proteínas da superfície celular de XAC: padrão interno, após cultivo *in vitro* (meio CN) e *in vivo*. Amostras marcadas com diferentes *CyDyes* foram misturadas e submetidas à mesma separação por eletroforese-2D. Para a digitalização do gel, foi utilizado o scanner *Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)* e as amostras lidas com diferentes comprimentos de onda (Cy5 680 nm; Cy3 595 nm; Cy2 530 nm), de acordo com o *CyDye* utilizado. Devido à presença de Tris no tampão de lavagem das células durante a etapa de marcação fluorescente, os géis apresentaram forte *background*.



Para eliminar o problema apresentado, o tampão de lavagem foi substituído por um tampão fosfato (conforme descrito no item 3.4) para a lavagem das células e também para a sua ressuspensão no processo de marcação fluorescente.

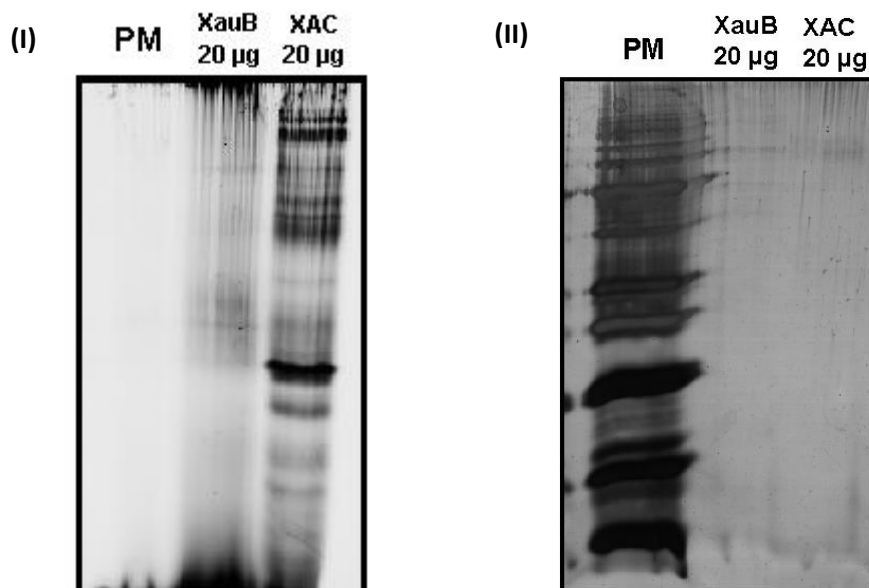
Outra dificuldade encontrada foi a obtenção de células de XauB em quantidade suficiente para a extração de proteínas para os experimentos de 2D-DIGE, considerando que esta linhagem é pouco patogênica e não se multiplica satisfatoriamente *in vivo*. Para tanto, foi utilizado um grande número de folhas para recuperar as células bacterianas, as quais foram colocadas em contato com os marcadores fluorescentes e submetidas à extração de proteínas conforme descrito anteriormente (item 3.4). O gel 2D-DIGE resultante não mostrou boa resolução dos *spots* na primeira dimensão (isoeletrofocalização), não sendo possível nem mesmo observá-los na imagem das amostras de XauB (Figura 17). Essa ausência pode ser devido a interferentes presentes nas amostras de XauB gerados pela alta quantidade de folhas utilizadas para a recuperação celular, os quais possivelmente prejudicaram a entrada de proteínas no gel, já que as amostras foram previamente quantificadas quanto a concentração de proteínas.

**Figura 17.** Imagens de um gel bidimensional (2D-DIGE) de proteínas da superfície celular de XauB e XAC após cultivo *in vivo* obtidas pela digitalização com *scanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)* e respectivo padrão interno. Não foi possível visualizar *spots* proteicos de XauB marcados com fluorescência, problema possivelmente causado pela presença de interferentes nas amostras.



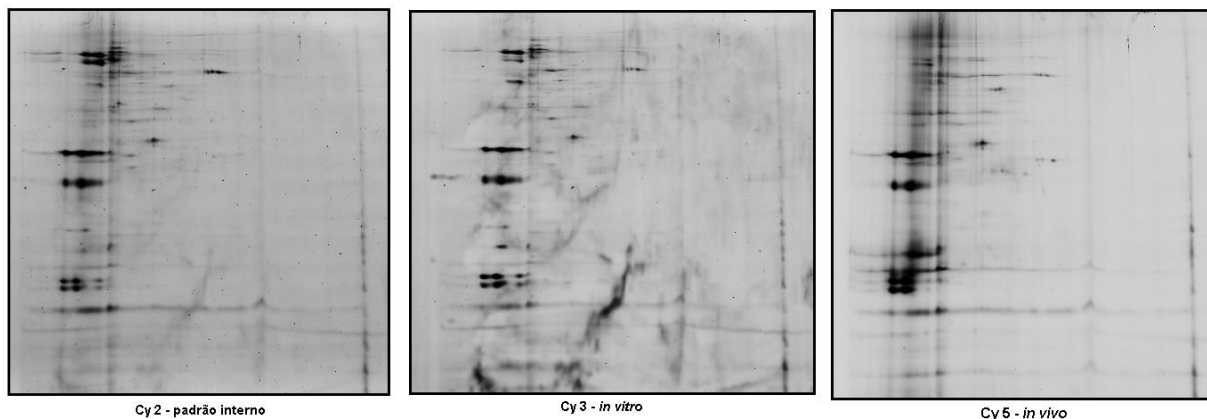
Devido ao problema aqui apresentado, as amostras de XauB e de XAC foram submetidas a eletroforese unidimensional, processo que é mais eficiente na desnaturação e solubilização de proteínas, comparativamente às condições mais brandas exigidas para a primeira dimensão, ou isoeletrofocalização (Figura 18). Foram utilizadas 20 µg de proteínas de cada amostra (XAC ou XauB, *in vivo*), de forma que tal quantidade também pudesse ser observada na coloração do gel por prata. Entretanto, só foi possível observar bandas durante a leitura de fluorescência das amostras, e especialmente para XAC (Figura 18, I), enquanto que a coloração do gel por prata revelou somente as bandas do padrão de peso molecular (Figura 18, II).

**Figura 18.** SDS-PAGE de amostras proteicas de XAC e XauB marcadas fluorescentemente com Cy3, ambas após cultivo *in vivo*. Vinte microgramas de cada amostra foram aplicados no gel. (I) Imagem obtida pela leitura de fluorescência no *scanner Ettan DIGE Imager*. (II) O mesmo gel foi corado com prata e digitalizado com *ImageScanner*. PM, peso molecular.



Adicionalmente, foi realizado um teste de fracionamento das amostras de XAC obtidas após cultivo *in vivo* (item 3.2) e *in vitro*, após marcação fluorescente seguida de lise celular conforme descrito no item 3.4. Tal fracionamento foi realizado para a separação das frações de membrana e de citosol, por meio de ultracentrifugação a 40.000 rpm, 2 horas, 4°C (Ultracentrífuga Himac CP 90 WX - Hitachi). Os *pellets*, correspondentes à fração de membrana, foram ressuspensos em tampão de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS). Nova quantificação proteica foi realizada com o kit 2-D Quant (*GE Healthcare*) (item 3.6.1) e 50 µg de cada amostra foram submetidas à 2D-DIGE (item 3.6.2). Resultados mostraram uma baixa resolução na primeira dimensão (ou isoeletrofocalização) (Figura 19), o que possivelmente é decorrente das características da amostra proteica, a qual foi fracionada para enriquecimento com proteínas de membrana, uma fração rica em fosfolípídeos. Assim, a corrida de isoeletrofocalização pode ter sido prejudicada por algum interferente que foi juntamente enriquecido na fração de membrana. Assim sendo, o fracionamento celular não foi utilizado para o presente trabalho.

**Figura 19.** Imagens de um gel bidimensional (2D-DIGE) de proteínas da superfície celular de XAC após cultivo *in vitro* e *in vivo* obtidas pela digitalização com *scanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare)* e respectivo padrão interno. É possível observar rastros das amostras proteicas no gel, indicando que a focalização na primeira dimensão não foi bem sucedida.



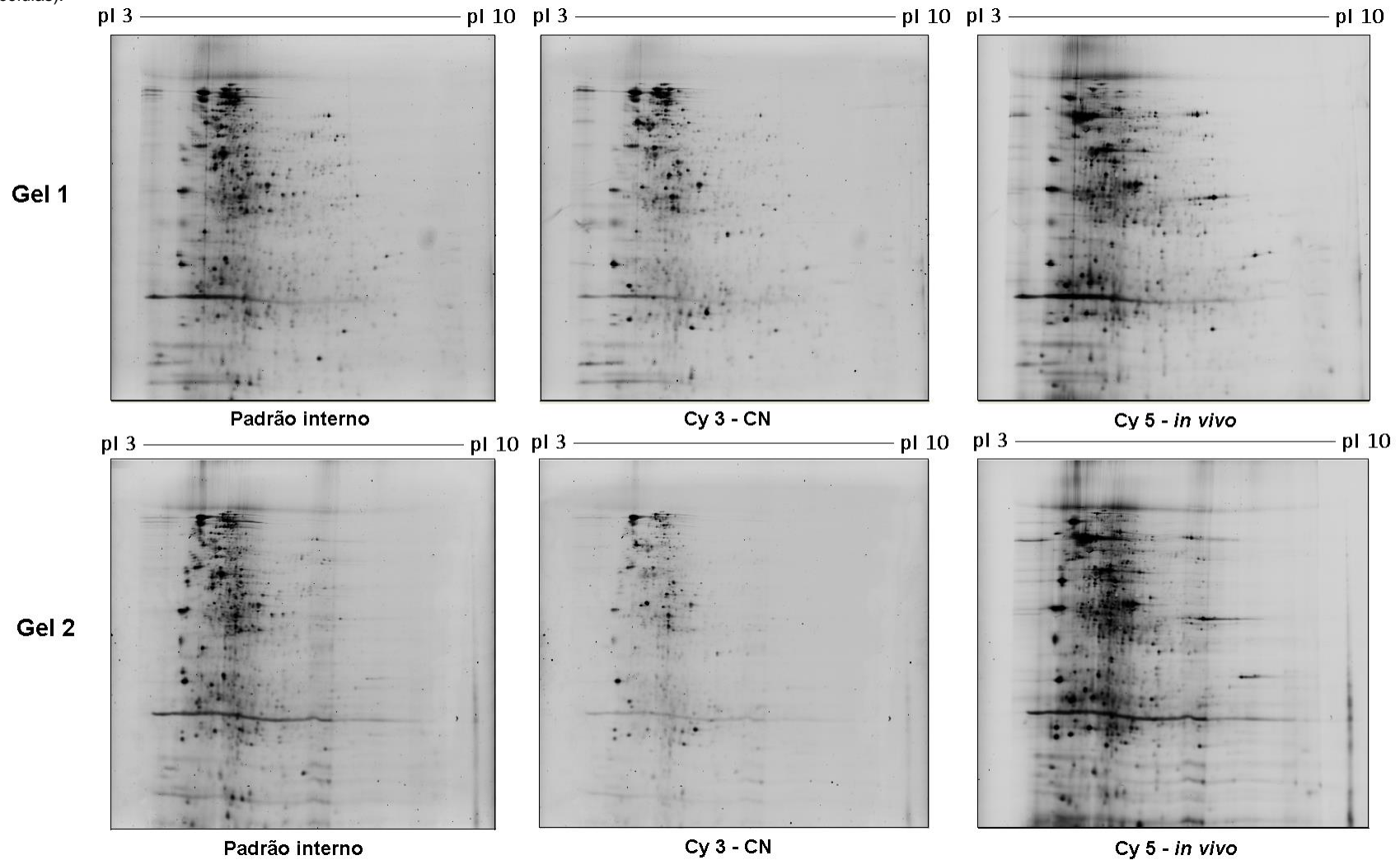
#### 4.5 Análise estatística dos perfis proteicos de XAC (*in vivo* vs. *in vitro*) obtidos por 2D-DIGE e identificação das proteínas diferenciais

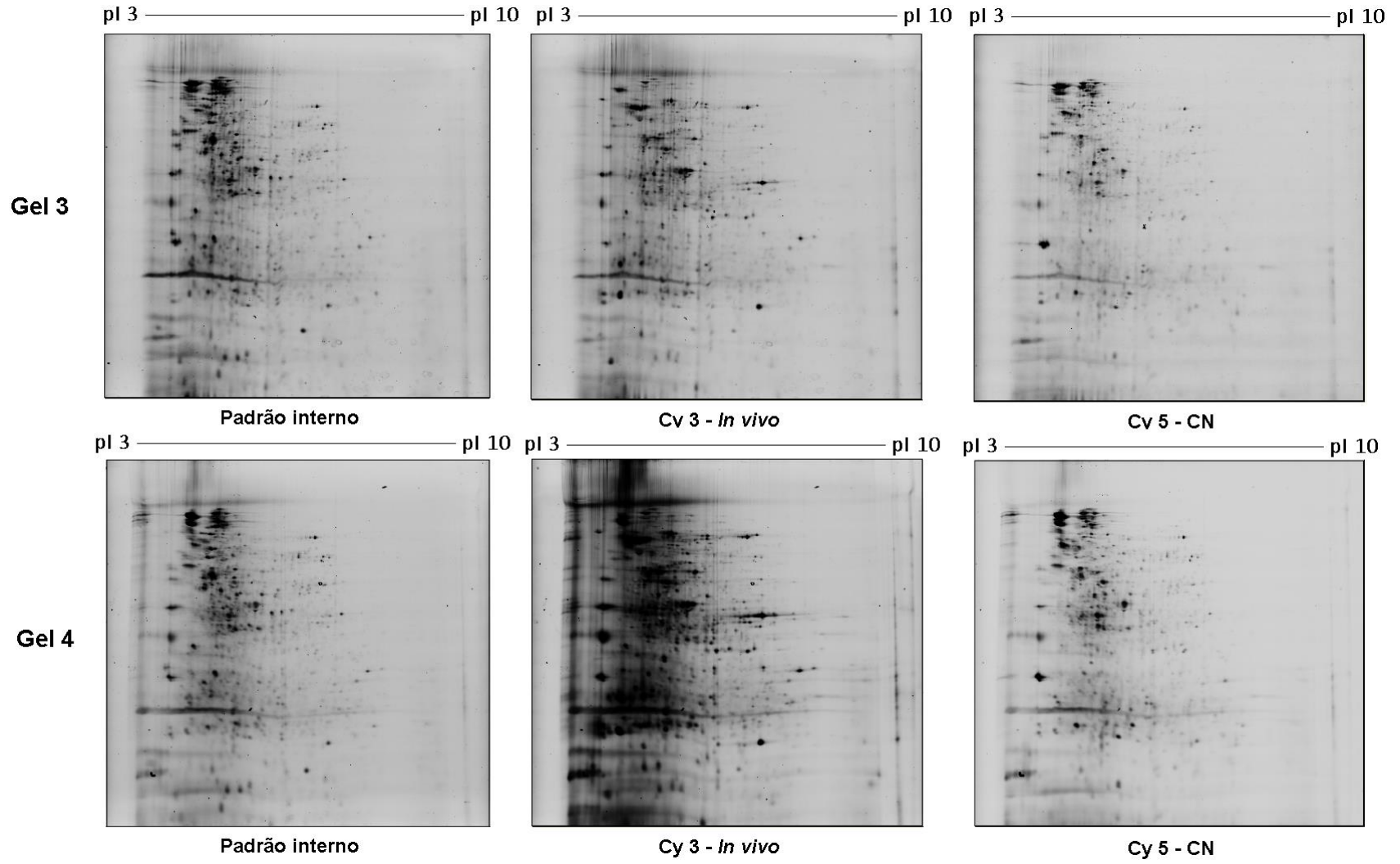
##### 4.5.1 Análise dos perfis de proteínas de superfície celular por 2D-DIGE

A partir da análise do perfil de proteínas superficiais de XAC por eletroforese diferencial em gel (2D-DIGE) foi possível notar a presença de inúmeros *spots* diferenciais entre as duas condições estudadas, ou seja, entre a condição infectante (*in vivo*) e a não infectante (meio CN) (Figura 20). Tais diferenças se aplicam à intensidade ou à presença/ausência de *spots* em uma das condições analisadas. Embora aparentemente alguns *spots* sejam comuns às duas condições, seus perfis apresentam um acentuado grau de diferenciação.

Por se tratar de uma amostra complexa, preferimos utilizar uma faixa de pH entre 3-10 com a finalidade de abranger uma faixa maior de proteínas, entretanto, observamos uma predominância de *spots* na região ácida, bem como uma maior resolução na região central, porém isto não prejudicou a análise dos mesmos. Os dados posteriormente obtidos por espectrometria de massas (item 4.5.2) mostraram que as proteínas identificadas possuem, em sua maioria, um pI teórico correspondente à faixa central (pH 4-7) da tira de pH 3-10 utilizada para a separação por isoeletrofocalização.

**Figura 20.** Géis de 2D-DIGE de proteínas da superfície celular de XAC após cultivo *in vivo* ou *in vitro*. As imagens de um gel foram geradas a partir da leitura com comprimentos de onda (Cy5 680 nm; Cy3 595 nm; Cy2 530 nm). Os quatro géis, cada um composto por duas amostras biológicas e um padrão interno, foram submetidos à mesma corrida de isoeletrofocalização quanto de segunda dimensão (SDS-PAGE). Células após crescimento *in vitro* (CN) e *in vivo* foram alternativamente marcadas com Cy3 e Cy5. O padrão interno, marcado com Cy2, é constituído por quantidades iguais de células provenientes de cada uma das oito amostras (totalizando  $10^7$  células).



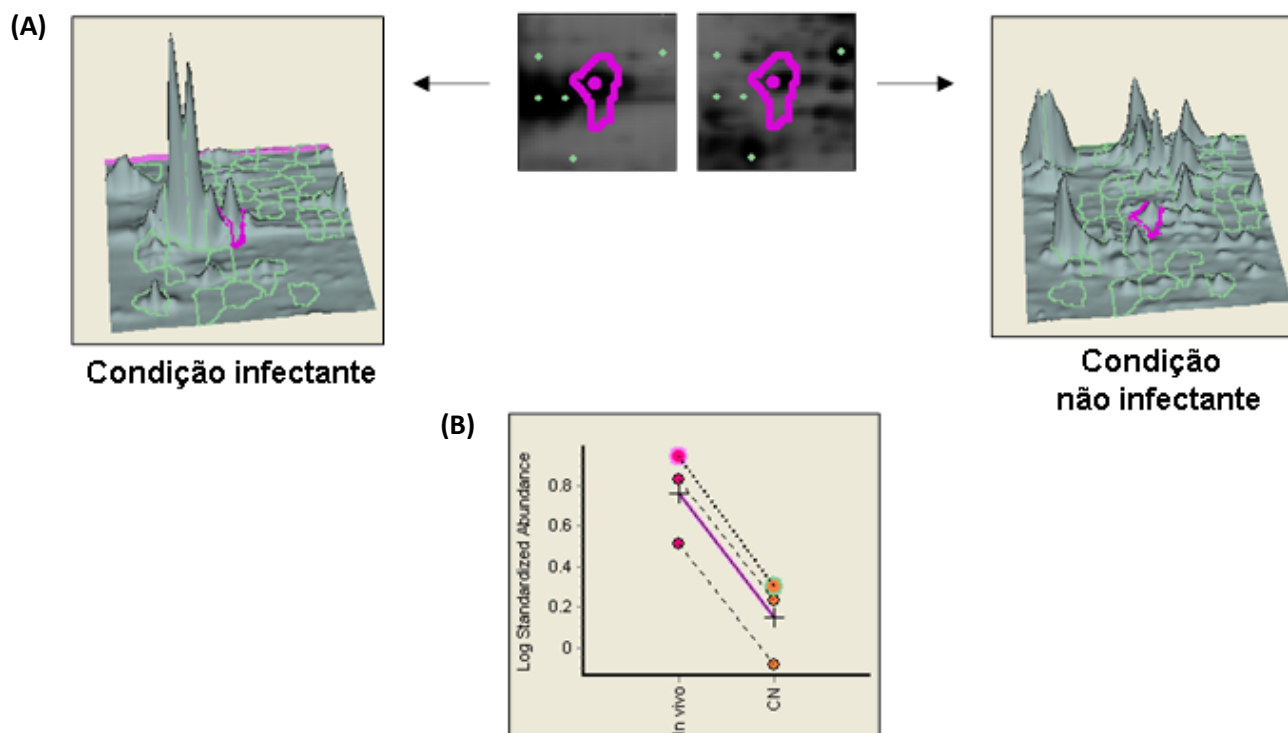




Utilizando o *software DeCyder 7.0*, cada imagem das amostras de um gel foi processada pelo módulo DIA, fixando um número de 10.000 *spots* para serem reconhecidos em cada gel. Por esta análise, foi possível contabilizar quantos *spots* estavam presentes em cada condição, bem como se houve um aumento ou diminuição de sua expressão relativamente ao padrão interno. É importante destacar que muitos *spots* detectados pelo programa não correspondem necessariamente a *spots* proteicos, mas a artefatos do gel ou até mesmo a partículas de poeira presentes na superfície das placas de vidro, já que as mesmas são levadas junto ao *scanner* para a leitura de fluorescência do gel. Esses artefatos não interferem no resultado final, pois são eliminados da análise estatística durante o tratamento dos dados. Dessa forma, é difícil discutir as mudanças de expressão dos *spots* baseadas somente nos dados apresentados pelo módulo DIA.

As imagens foram então agrupadas de acordo com sua origem (i.e., padrão interno, condição infectante ou não infectante) para as análises no módulo BVA. Em seguida, foi realizado o *matching* dos géis, isto é, a associação dos *spots* de cada gel com aqueles presentes em um gel mestre, assim eleito por apresentar o maior número de *spots*. Uma quantificação foi gerada a partir da razão das médias de um *spot* nas diferentes condições (infectante ou não infectante), normalizada por meio do padrão interno. Neste mesmo módulo, foi realizada a análise estatística por ANOVA para identificar *spots* com expressão diferencial significativa ( $p < 0.05$ ) entre as condições estudadas, sendo identificados 230 *spots* diferenciais, os quais foram selecionados e adicionados a uma lista de candidatos para análise por espectrometria de massas. Um exemplo desses *spots* pode ser observado na figura 21. Os *spots* selecionados foram recortados dos géis, digeridos por tripsina e analisados por espectrometria de massas ESI-Q-TOF (LNBio, Campinas-SP).

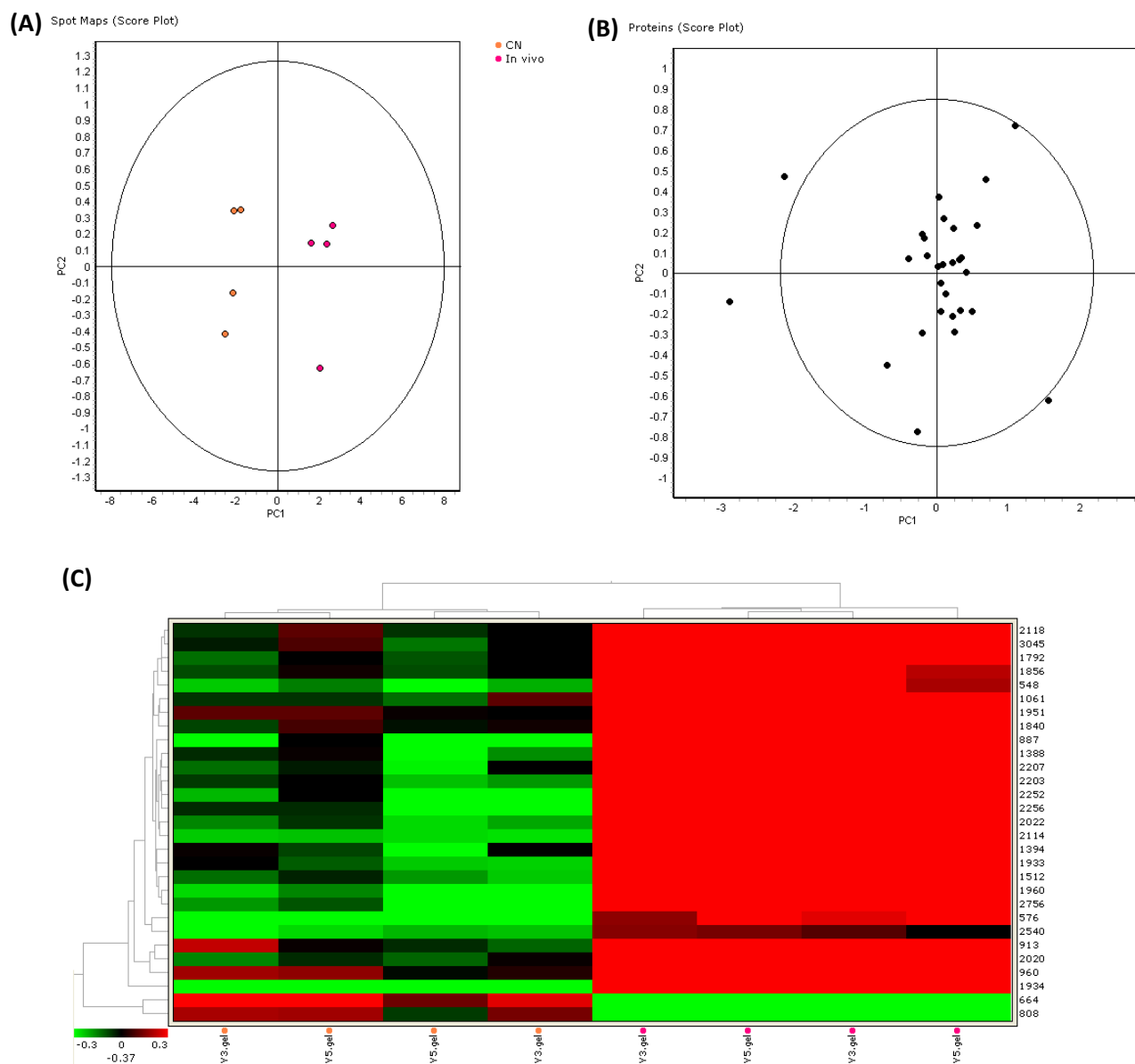
**Figura 21.** Detalhe da imagem de um *spot* detectado nos géis bidimensionais de XAC obtido com o programa *DeCyder*. (A) Imagem do *spot* 991 (em um mesmo gel) com suas respectivas imagens 3D na condição infectante e na condição não-infectante. É possível visualizar a diferença de intensidade do *spot* circulado em cor magenta. (B) O Gráfico mostra dados de abundância para o *spot* selecionado (em cada gel presente na análise). Pontos em rosa representam os mapas de *spots* na condição *in vivo* e os pontos em laranja representam os mapas de *spots* da condição *in vitro*. As linhas pontilhadas apresentam os valores médios de cada grupo.



Adicionalmente à análise de expressão diferencial, uma melhor compreensão dos dados pode ser obtido por meio da Análise de Componentes Principais (também conhecido como PCA – *Principal Component Analysis*) e da Análise de Agrupamento (*clustering analysis*) realizada pelo módulo EDA. Dessa forma é possível revelar padrões de subgrupos entre as proteínas e entre os mapas de *spots*. Inicialmente, foi utilizada a análise de componentes principais para localizar a presença de amostras que estejam fora da tendência geral da maioria das amostras, por meio da avaliação dos mapas de *spots*. Por esse método matemático, as variáveis podem ser agrupadas em componentes principais com base na sua correlação a um conjunto de variáveis. Assim, o gráfico gerado apresenta os componentes principais 1 e 2 nos eixos, sendo as variáveis distribuídas de acordo com a variabilidade (variabilidade aumenta do quadrante inferior esquerdo para o quadrante superior direito, ou do

quadrante inferior direito para o quadrante superior esquerdo) dentro ou fora da elipse, a qual representa um nível de 95% de confiança. Nenhuma amostra foi detectada fora da elipse, ou seja, fora da tendência geral, sendo também possível verificar uma separação entre os grupos *in vivo* e *in vitro*, sendo a condição infectante agrupada nos quadrantes do lado direito e a condição não infectante com os mapas de *spots* agrupados nos quadrante do lado esquerdo (Figura 22A). Entretanto, podemos observar uma separação de subgrupos em ambas condições analisadas (*in vitro* ou *in vivo*), sendo a condição infectante constituída por um subgrupo de três amostras (no quadrante superior direito) e um subgrupo de uma amostra (quadrante inferior direito), enquanto que a condição não infectante parece ser constituída por dois subgrupos, cada um com duas amostras (quadrantes esquerdos). Apenas três dentre as 29 proteínas detectadas como de interesse se apresentam fora do nível de significância (Figura 22B), sendo que as proteínas apresentadas no quadrante superior esquerdo estão com expressão aumentada na condição não infectante, enquanto que aquelas presentes no quadrante superior direito estão com maior expressão na condição infectante.

Ainda no módulo EDA foi aplicada uma análise de agrupamento (*clustering analysis*) para investigar os padrões de expressão entre as proteínas e a expressão geral entre os mapas de *spots*. Baseado no teste-t ( $p < 0,05$ ), essa análise de agrupamento é um método que combina ou separa dados emparelhados e assim gera uma estrutura em forma de árvore denominada de dendrograma. No módulo EDA, os resultados do dendrograma e do *heat map* são juntamente apresentados, de forma que é possível observar se os mapas de *spot* estão agrupados e também observar os padrões gerais de proteínas no conjunto de dados. Resultados mostram os mapas de *spots* agrupados de acordo com sua origem (*in vitro* ou *in vivo*) e as amostras classificadas distintamente em dois grupos principais: proteínas com maior expressão na condição infectante ou na condição não infectante (Figura 22C). Além disso, dentre as 29 proteínas detectadas como de interesse pela análise e componentes principais, 27 apresentam expressão significativamente ligada à condição infectante (em vermelho no lado esquerdo do dendrograma).

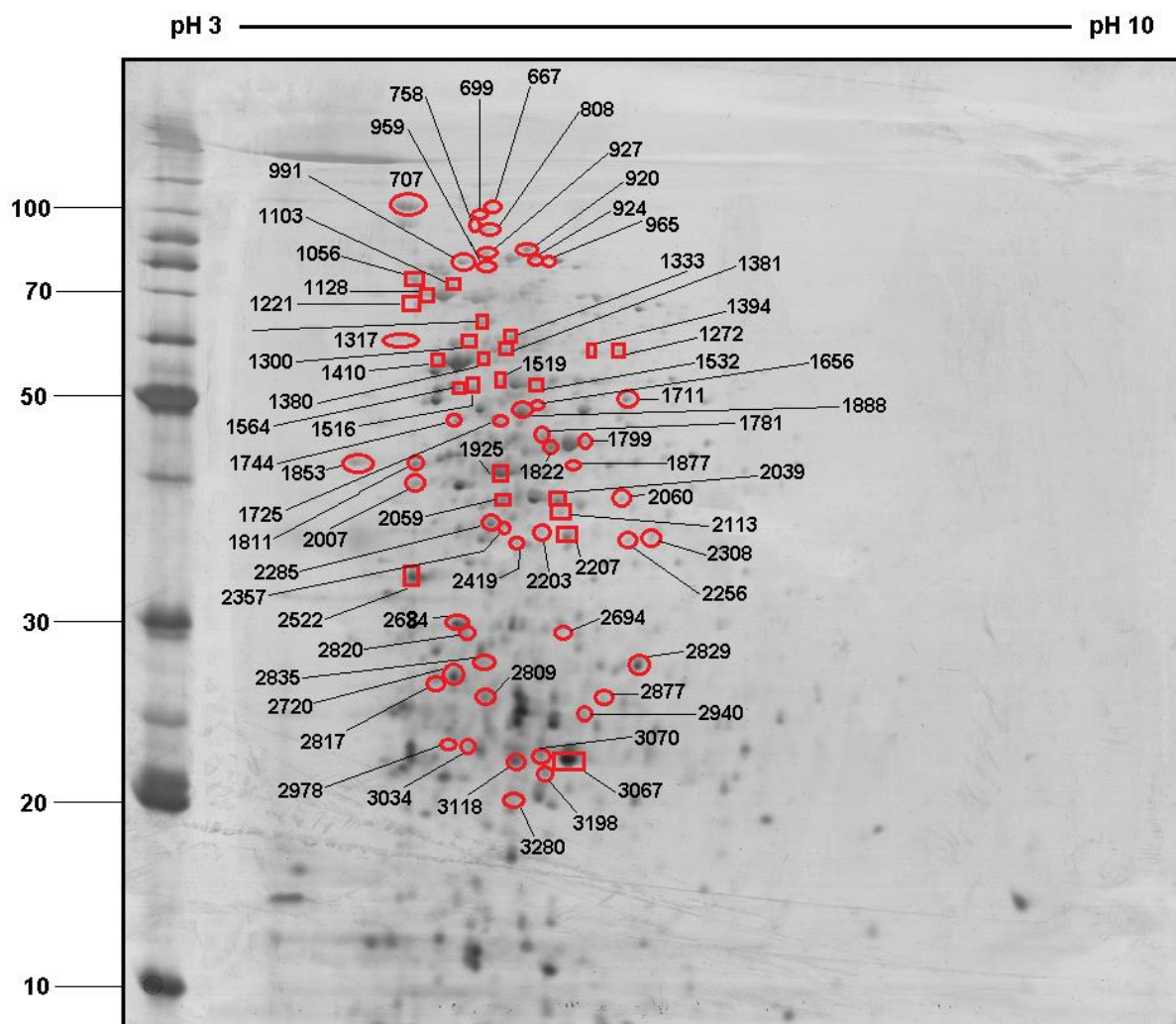


**Figura 22.** Análise de padrões para os *spots* das amostras proteicas de XAC dos géis da Figura 20. (A) *Score plot* da análise de componentes principais com mapas de *spots* dos grupos experimentais de XAC: em amarelo, *in vivo* (quadrantes da direita); em rosa, *in vitro* (quadrantes da esquerda). Nenhum mapa de *spots* foi detectado fora da tendência geral da maioria das amostras. (B) *Score plot* da análise de componentes principais dos *spots* com expressão diferencial significativa detectada pelo teste *Student-t* no módulo EDA. Apenas três *spots* estão fora do nível de significância. (C) *Heat map* resultante da análise de agrupamento. Para obtenção desse mapa o *software* utiliza o teste-t ( $p < 0,05$ ) para combinar ou separar dados emparelhados, gerando assim o dendrograma. Os mapas de *spots* estão localizados na parte inferior do dendrograma e os *match* IDs dos *spots* no lado direito da figura. A expressão dos *spots* pode ser observada de acordo com a cor apresentada (verde: menor expressão; vermelho: maior expressão), sendo possível classificar as amostras em dois grupos distintos: proteínas relacionadas à condição infectante e proteínas relacionadas à condição não infectante.

#### 4.5.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas e categorização funcional

Embora mais de duzentos *spots* diferenciais tenham sido listados a partir da análise estatística pelo módulo BVA (teste ANOVA), apenas 79 foram recortados dos géis em razão da dificuldade de comparação do perfil gerado pela leitura de fluorescência e o perfil obtido após a coloração do gel por prata (procedimento que revelou todas as proteínas presentes na amostra, ou seja, o extrato de proteína total), o que dificultou a identificação precisa dos *spots* (Figura 23). Outra dificuldade para localizá-los foi devido à fraca intensidade de alguns *spots* na coloração por prata relativamente aos apresentados pela marcação fluorescente, o que impossibilitou a identificação de certos *spots* para a excisão.

**Figura 23.** Spots com expressão diferencial significativa (ANOVA  $p < 0,05$ ) entre as condições de cultivo de XAC (infectante ou não infectante) isolados para identificação por espectrometria de massas. A excisão dos 79 spots foi feita manualmente a partir do gel corado com prata. Os spots foram enumerados de acordo com o *match ID* gerados pelo *software* de análise dos géis. Os números à esquerda do gel indicam os valores (em kDa) das bandas do padrão de peso molecular.



As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio, no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (ABTLuS/MCT) (Campinas-SP), sendo os resultados obtidos confrontados pelo *software Mascot* com banco de proteínas anotadas a partir da sequência genômica da bactéria XAC (NCBI). As proteínas identificadas estão listadas na Tabela 5. Nesta tabela são apresentadas apenas proteínas que apresentaram a maioria das seguintes características: concordância dos valores de pI e massa molecular da proteína do banco de dados (“teórica”) com os obtidos

experimentalmente (posição da proteína no gel 2D), valores de *score* acima do limite calculado pelo *software* e o número de peptídeos detectados para a proteína ser preferencialmente maior que 1.

A partir da identificação dos *spots* de XAC pelo *software* Mascot, foi necessária a categorização funcional das proteínas pelo *Xanthomonas axonopodis pv. citri* *Main Chromosome Gene* (não mais disponível online). Entre as categorias listadas, há proteínas envolvidas com processos celulares, estrutura celular, metabolismo de macromoléculas, patogenicidade e virulência, dentre outras.

Dentre as 30 diferentes proteínas identificadas para os 79 *spots* diferenciais, 17 estão contidas em *spots* com expressão aumentada na condição infectante (apresentadas com um sinal “-” na tabela 5), sendo duas delas (XAC2672, XAC3370) identificadas em mais de um único *spot* e com maior expressão na condição não infectante. Outras duas proteínas, XAC1012 e XAC0970, também foram encontradas em mais do que um *spot* e com expressões diferentes em relação ao cultivo *in vivo* (maior ou menor expressão). Essa contradição pode ser explicada pelo fato de que nesses *spots* foi identificado mais do que uma proteína pelo *software* Mascot, de forma que a variação da expressão não se refere a somente uma das proteínas, mas a todas aquelas presentes nesse mesmo *spot*. Outra possível explicação pode ser que as proteínas estejam em diferentes *spots* por conter alguma modificação pós-traducional adicional, alterando sua massa molecular ou ponto isoelétrico, conseqüentemente alterando sua posição no gel. Como exemplo, os *spots* 1853 e 1925 (Figura 23; Tabela 5) foram identificados como a mesma proteína *outer membrane protein* (XAC1012), mas não se encontram na mesma posição no gel, apresentando uma diferença de aproximadamente 1000 Da e com pontos isoelétricos diferindo em 0,12.

A localização celular de cada proteína foi predita de acordo com o programa PSORTb v.3.0.2 (disponível online, <http://www.psort.org/psortb/index.html>), o que nos permitiu verificar que 10 dentre as 30 proteínas identificadas foram descritas como sendo da membrana externa, enquanto que 16 foram descritas como citoplasmáticas, uma pertencente à membrana citoplasmática, uma ao periplasma e duas com localização desconhecida.

**Tabela 5.** Proteínas de XAC identificadas em *spots* diferencialmente expressos entre as condições de crescimento infectante (*in vivo*) e não infectante (*in vitro*).

Match ID	Quantificação relativa ao <i>in vitro</i>	ORF	NCBI accession no.	Identificação da proteína	Teórico MM / pI	Score	Cobertura da sequência %	Categorização das proteínas	Localização celular predita
707	12,21	XAC3444	<a href="#">gii21109802</a>	TonB-dependent receptor	103243/4.79	141	4	I	membrana externa
965	-5,16	XAC3169	<a href="#">gii21109499</a>	ferric enterobactin receptor	80756/5.28	42	4	I	membrana externa
991	-4,16	XAC3168	<a href="#">gii21109498</a>	ferric enterobactin receptor	87324/5.20	30	3	I	membrana externa
1103	3,82	XAC1509	<a href="#">gii21107687</a>	conserved hypotheticalprotein	71910/6.07	25	2	VII	citoplasma
667 (M)	3,72	XAC2672	<a href="#">gii21108951</a>	Oar protein	117402/5.10	57	4	II	membrana externa
667	3,72	XAC3370	<a href="#">gii21109721</a>	outer membrane receptor for ferric iron uptake	80506/4.89	90	4	I	membrana externa
		XAC2672	<a href="#">gii21108951</a>	Oar protein	117402/5.10	54	0	II	membrana externa
1056	2,83	XAC3370	<a href="#">gii21109721</a>	outer membrane receptor for ferric iron uptake	80506/4.89	41	1	I	membrana externa
924	-3,37	XAC0969	<a href="#">gii21107104</a>	elongation factor G	77757/5.19	24	4	IV	citoplasma
1744	-2,05	XAC0542	<a href="#">gii21106636</a>	60 kDa chaperonin (GroEL)	57131/5.05	77	4	IV	citoplasma
1128	2,94	XAC1522	<a href="#">gii21107700</a>	DnaK protein	68810/4.97	67	5	IV	citoplasma
2207	-5,17	XAC1006	<a href="#">gii21107144</a>	malate dehydrogenase	348866/5.37	59	10	V	desconhecida
1919	-2,30	XAC3802	<a href="#">gii21110198</a>	conserved hypotheticalprotein	41202/7.08	48	2	VII	desconhecida
708	5,46	XAC4273	<a href="#">gii21110713</a>	OmpA-related protein	109344/5.21	179	4	III	membrana externa
		XAC4274	<a href="#">gii21110714</a>	OmpA-related protein	110082/5.29	34	1	III	membrana externa
		XAC2773	<a href="#">gii21109061</a>	Oar protein	111900/5.47	28	1	II	membrana externa
1781	-4,81	XAC3580	<a href="#">gii21109956</a>	phosphomannose isomerase	51043/5.57	66	6	III	citoplasma
1381	-7,71	XAC0204	<a href="#">gii21106264</a>	glutamine synthetase	52041/5.15	58	8	VI	citoplasma
1811	2,30	XAC1719	<a href="#">gii21107915</a>	enolase	45992/4.96	33	4	V	citoplasma
1155	-3,71	XAC2298	<a href="#">gii21108543</a>	30S ribosomal protein S1	61701/5.05	147	4	IV	citoplasma
1014 (M)	-15,85	XAC1522	<a href="#">gii21107700</a>	DnaK protein	68810/4.97	516	13	IV	citoplasma
1056 (M)	-2,83	XAC1522	<a href="#">gii21107700</a>	DnaK protein	68810/4.97	256	10	IV	citoplasma
1011 (M)	-3,30	XAC3659	<a href="#">gii21110043</a>	dihydroliipoamide dehydrogenase	63403/5.79	24	2	V	citoplasma
		XAC1522	<a href="#">gii21107700</a>	DnaK protein	68810/4.97	69	2	IV	citoplasma
2940	1,98	XAC4009	<a href="#">gii21110419</a>	arginase	33388/5.12	43	3	V	citoplasma



**Tabela 5.** Proteínas de XAC identificadas em *spots* diferencialmente expressos entre as condições de crescimento infectante (*in vivo*) e não infectante (*in vitro*). (cont.)

Match ID	Quantificação relativa ao <i>in vitro</i>	ORF	NCBI accession no.	Identificação da proteína	Teórico MM / pI	Score	Cobertura da sequência %	Categorização das proteínas	Localização celular predita
2829	-2,12	XAC3344	<a href="#">gi 21109692</a>	fructose-bisphosphate aldolase	36538/4.98	84	11	V	citoplasma
2007	3,78	XAC3236	<a href="#">gi 21109574</a>	succinyl-CoA synthetase beta subunit	41542/4.85	41	2	V	citoplasma
2039	-1,80	XAC3651	<a href="#">gi 21110034</a>	ATP synthase alpha chain	55365/5.32	107	6	V	citoplasma
3118	-2,22	XAC1078	<a href="#">gi 21107218</a>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	22839/5.39	54	12	IV	citoplasma
1333	-5,52	XAC1413	<a href="#">gi 21107582</a>	outer membrane antigen	87651/5.53	42	3	II	membrana externa
1853	-3,46	XAC1012	<a href="#">gi 21107151</a>	outer membrane protein	39651/4.59	227	6	II	membrana externa
1925	3,01	XAC1012	<a href="#">gi 21107151</a>	outer membrane protein	39651/4.59	210	13	II	membrana externa
		XAC0970	<a href="#">gi 21107092</a>	elongation factor Tu	43344/5.45	78	7	IV	citoplasma
2059	2,65	XAC0970	<a href="#">gi 21107092</a>	elongation factor Tu	43344/5.45	62	4	IV	citoplasma
1822	-4,17	XAC0970	<a href="#">gi 21107092</a>	elongation factor Tu	43344/5.45	48	9	IV	citoplasma
		XAC0002	<a href="#">gi 21106040</a>	DNA polymerase III beta chain	40842/5.35	46	11	IV	citoplasma
		XAC3225	<a href="#">gi 21109562</a>	transglycosylase	46173/5.89	46	4	II	membrana citoplasmática
1688	3,62	XAC0970	<a href="#">gi 21107092</a>	elongation factor Tu	43344/5.45	125	6	IV	citoplasma
3067	3,79	XAC2386	<a href="#">gi 21108638</a>	superoxidase dismutase	22703/5.47	50	6	III	periplasma

\* Os *match* IDs estão numerados de acordo com a figura 20. *Match* IDs indicados com (M) são provenientes do gel *Master*.

\*\* Descrição das categorias segundo anotação do genoma de XAC: (I) Processos celulares; (II) Estrutura celular; (III) Patogenicidade, virulência e adaptação; (IV) Metabolismo de macromoléculas; (V) Metabolismo intermediário; (VI) Biossíntese de pequenas moléculas; (VII) Hipotéticas. Predição da localização celular conforme software PSORTb v.3.0.2.

\*\*\* Dados de quantificação relativa à condição não infectante (*in vitro*) obtidos pela análise dos *spots* no *software DeCyder*, gerados a partir de uma razão entre os grupos selecionados (infectante e não infectante) e o padrão interno.

#### 4.6 Análise de amostras proteicas de XAC e XauB por *shotgun*

Proteínas totais de células de XAC e de XauB (obtidas após cultivo *in vivo*) previamente submetidas à marcação fluorescente das proteínas de superfície com *CyDyes* (item 3.4) foram também submetidas à análise por espectrometria de massas do tipo *shotgun*, uma vez que não foi possível realizar a comparação por 2D-DIGE, de modo análogo ao realizado para as duas condições de crescimento de XAC (item 4.5). Assim, após marcação fluorescente e recuperação de proteínas solúveis provenientes de lise celular (proteínas totais), as amostras foram submetidas à cromatografia de troca iônica (item 3.6.5) para remoção de detergentes. Durante a análise por espectrometria de massas foi detectada a presença de um interferente, possivelmente um detergente, mesmo após a realização de cromatografia de troca iônica nas amostras. Resultados obtidos foram confrontados pelo *software Mascot* com banco de proteínas anotadas a partir da sequência genômica de cada bactéria (NCBI). Assim, possivelmente devido à presença de interferentes, foram identificadas apenas duas proteínas em uma única amostra de XAC, e apenas uma proteína (com *score* abaixo ao nível de significância) em somente uma amostra de XauB (Tabela 6).

**Tabela 6.** Proteínas identificadas nas amostras de XAC e de XauB, após cultivo *in vivo* (condição infectante), por espectrometria de massas tipo *shotgun*.

Amostra	ORF	NCBI accession no.	Identificação da proteína	Teórico MM / pI	Score	Categorização das proteínas	Localização celular predita
XAC	XAC0970	gij21107092	elongation factor Tu	43344/5.45	72	IV	citoplasma
	XAC1012	gij21107151	outer membrane protein	39651/4.59	38	II	membrana externa
XauB	--	gij292601205	conserved hypothetical protein	22883/9.59	16	--	--

\* Descrição das categorias segundo anotação do genoma de XAC: (II) Estrutura celular; (IV) Metabolismo de macromoléculas. Predição da localização celular conforme software PSORTb v.3.0.2.

\*\* Em vermelho está apresentado o valor de *score* abaixo do nível de significância.

Por não haver sucesso na identificação das proteínas pelo método apresentado neste tópico, não foi possível realizar uma comparação entre essas duas espécies de *Xanthomonas* spp., tanto quanto à presença ou ausência de proteínas, bem como se havia uma expressão diferencial quanto ao aumento ou diminuição de diferentes proteínas. Essa abordagem por espectrometria de massas tipo *shotgun* está sendo introduzida em nosso laboratório pela primeira vez por meio do presente trabalho, de forma que ainda há

necessidade de se adequar o preparo das amostras, possibilitando a análise e identificação das proteínas por esse método.

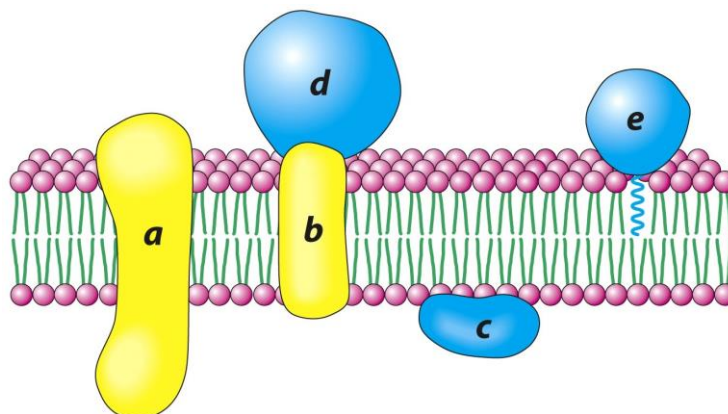
## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Validação da marcação fluorescente das proteínas de superfície celular de *Xanthomonas* spp.

A fim de se verificar quais frações proteicas são marcadas fluorescentemente pela técnica aqui descrita (item 3.4), células intactas de XAC crescidas *in vitro* (meio CN) foram marcadas com Cy3 e as frações de membrana e de citoplasma obtidas após lise celular e ultracentrifugação foram analisadas por eletroforese unidimensional (item 3.5). A leitura de fluorescência da fração citosólica revelou a marcação de apenas uma banda de alto peso molecular quando comparado ao perfil total citoplasmático apresentado após coloração por prata (Figura 15). É possível que essa banda se constitua de proteína(s) periférica(s) da membrana, as quais geralmente são mais solúveis e não tão fortemente ligadas à membrana como as proteínas integrais de membrana com domínios expostos na superfície celular. Dessa forma, podemos afirmar que a marcação é bastante seletiva para proteínas de membrana ou que mínima fração de marcador fluorescente é internalizada, caso a banda marcada da fração citosólica não se constitua em contaminação com proteínas de membrana.

Este mesmo teste revelou também que muitas proteínas localizadas na fração membrana não são marcadas com este procedimento, o que pode ser uma evidência de que somente proteínas periféricas externas e/ou proteínas com domínios na superfície celular são assim marcadas (Figura 24).

**Figura 24.** Representação de proteínas presentes na membrana celular. Essas proteínas podem atravessar a camada lipídica da membrana (*a* e *b*), enquanto outras, chamadas de periféricas podem se ligar à superfície de proteínas integrais (*d*) ou então interagir com o grupo polar dos lipídeos (*c*).

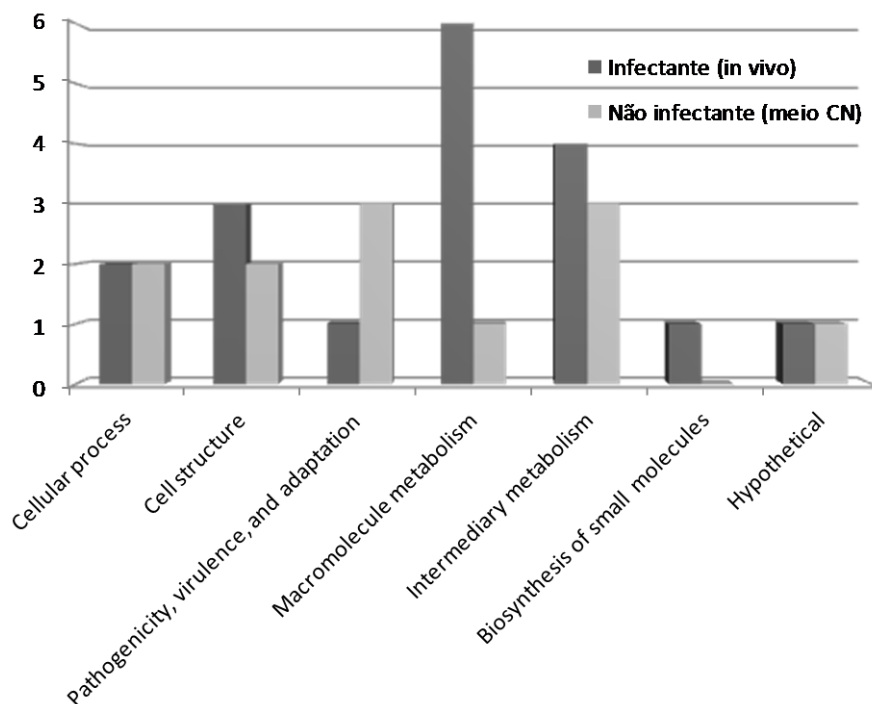


Fonte: (BERG, 2012).

## 5.2 Proteínas identificadas entre as condições de cultivo de XAC

De acordo com a categorização funcional das proteínas de XAC analisadas por 2D-DIGE e identificadas por espectrometria de massas, foi construído um histograma que demonstra o número de proteínas para cada categoria encontrada nas respectivas condições, infectante ou não infectante (Figura 25). Pôde-se observar que entre as duas condições de cultivo, houve um aumento das proteínas relacionadas à estrutura celular, metabolismo de macromoléculas, metabolismo intermediário e síntese de pequenas moléculas durante o cultivo em condição infectante. Já as proteínas associadas a processos celulares e hipotéticas não apresentaram alterações nesse percentual. Por outro lado, proteínas associadas à patogenicidade se apresentam mais expressas na condição não infectante.

**Figura 25.** Categorização funcional das proteínas de XAC identificadas por ESI-QUAD-Tof/ Mascot, a partir de seus perfis diferenciais entre as duas condições de cultivo (infectante ou não infectante). As categorias funcionais utilizadas foram as descritas no sequenciamento do genoma de XAC.



Conforme pôde ser observado, durante o cultivo de XAC na condição infectante houve um aumento do número de proteínas envolvidas com estrutura celular, categoria que apareceu predominantemente para proteínas de membrana externa (apenas uma localizada na membrana citoplasmática). Curiosamente, proteínas relacionadas à patogenicidade se apresentaram mais expressas na condição não infectante. Entretanto, esta análise cabe somente a proteínas do subproteoma da superfície celular, não sendo possível inferir que não houve indução de patogenicidade durante o período de cultivo da bactéria em folhas de seu hospedeiro cítrico, mas somente que não foi possível detectar um aumento de sua expressão na condição infectante, conforme seria esperado por se tratar de um cultivo de interação direta do patógeno com seu hospedeiro (cultivo *in vivo*). Outra possibilidade seria o envolvimento dessas proteínas em outras funções ainda não bem descritas, conforme pode ser visto na discussão de algumas proteínas aqui encontradas (ver adiante neste mesmo item) em que mostramos a descrição clássica da função apresentada para aquela proteína e também o seu envolvimento com outros processos relatados em novos estudos.

A análise do subproteoma de superfície celular revelou 30 diferentes proteínas e algumas delas foram classificadas como proteínas de membrana externa. Como já mencionado

anteriormente, aproximadamente um quarto ou até mesmo um terço de todos os genes bacterianos codificam proteínas da membrana interna ou da membrana externa bacteriana. Tais proteínas desempenham funções fisiológicas essenciais, como a importação e exportação de metabólitos, homeostase de íons metálicos, excreção de substâncias tóxicas ou antibióticos, e participam na geração e conversão de energia. Proteínas de membrana também são importantes para diferenciar e caracterizar linhagens, para identificar fatores de virulência e para estudar interações parasita-hospedeiro e resistência a antibióticos (POESTCH; WOLTERS, 2008). De acordo com essas características, proteínas de superfície de XAC foram analisadas sob duas diferentes condições: após crescimento bacteriano em interação com hospedeiro (condição infectante) ou após crescimento no meio caldo nutriente (condição não infectante).

Muitas bactérias patogênicas devem ser capazes de obter ferro a partir do hospedeiro para estabelecer a infecção. Como este é um elemento limitante no ambiente ou mesmo no hospedeiro, muitas bactérias utilizam a secreção de moléculas de alta afinidade a ferro, chamadas de sideróforos, para a sua captura (NEILANDS, 1981; NEILANDS, 1982). Neste trabalho, foram identificados receptores de membrana externa envolvidos no transporte de ferro ou de sideróforos. Bactérias respondem à diminuição da disponibilidade de ferro no ambiente aumentando a expressão de sistemas de aquisição de ferro assim como de determinantes de virulência (LITWIN; CALDERWOOD, 1993). De acordo com essas informações, a proteína denominada receptor de enterobactina férrica (*Ferric enterobactin receptor*, XAC3169 e XAC3168) foi identificada com um aumento na expressão após a interação com o hospedeiro (Tabela 6; Figura 23). Por outro lado, as proteínas denominadas *Outer membrane receptor for ferric uptake* (XAC 3370) e *Ton-B dependent receptor* (XAC3444) foram identificadas com diminuição na expressão na condição infectante. A diminuição da expressão de *Ton-B dependent receptor* não se contrapõe aos resultados obtidos por Soares e sua equipe (SOARES et al., 2010), trabalho no qual foi detectado um aumento de sua expressão após o cultivo de XAC sob condições não infectantes.

*Ton-B dependent receptor* está ligado a uma proteína chamada TonB, a qual atravessa o espaço periplasmático e interage com receptores na membrana externa, e cuja função é fornecer energia para a internalização de substratos para o periplasma (KREWULAK; VOGEL, 2011). Consistentemente à função de aquisição de ferro, uma proteína receptora dependente de Ton-B (*Ton-B dependent receptor*) de *Pseudomonas fluorescens* tem sido encontrada em associação com o desenvolvimento da infecção em seu hospedeiro e por tal motivo tem sido investigada como potencial alvo de vacinas (HU et.al., 2012).

Além de sua clássica função na aquisição de ferro, proteínas *Ton-B dependent receptor* também são receptores de carboidratos, característica presente tanto em fitopatógenos como em bactérias aquáticas (BLANVILLIAIN et al., 2007). Blanvillain et.al. (2007) identificaram no fitopatógeno *Xanthomonas campestris* uma proteína *Ton-B dependent receptor* capaz de se ligar à sacarose e transportá-la para o interior da célula. Polissacarídeos são amplamente utilizados para a formação de biofilmes por muitas bactérias, inclusive algumas espécies de *Xanthomonas* sp. (SUTHERLAND, 2001). Um estudo recente revelou uma forte indução desse tipo de receptores em *Pseudoalteromonas* sp. D41 durante a formação de biofilme, o que possivelmente está associado à adesão, assimilação de açúcar, e/ou remodelamento da matriz extracelular (RITTER et al., 2012). No entanto, não temos uma explicação plausível no momento para a inibição desse receptor *in vivo*. Uma análise temporal das proteínas de XAC expressas durante o cultivo *in vivo* talvez possa revelar resultados diferentes dos aqui apresentados, o que seria interessante para estudar a resposta bacteriana em diferentes estágios de infecção.

Em nossa análise proteômica identificamos outras quatro proteínas provenientes de *spots* com diminuição na expressão na condição infectante, denominadas de *OmpA-related proteins* (XAC4273 e XAC4274) ou *Oar proteins* (XAC2672 e XAC2773), as quais também participam da formação de biofilmes em superfície abióticas (Lower et.al., 2005). Entretanto, em tais *spots* foram identificadas mais do que uma proteína, de forma que essa diferença de expressão entre elas possa ser diferente. Outra função para Omp-A foi descrita em *Acinetobacter baumannii*, uma bactéria patogênica e oportunística capaz de invadir células epiteliais humanas (Smani, 2012). A adesão do microrganismo à célula hospedeira é mediada por uma proteína tipo Omp-A e também por *TonB-dependent copper receptor*, as quais se ligam à uma proteína presente na matriz extracelular, a fibronectina.

A proteína XAC0542, referida como chaperonina 60 kDa ou *GroEL*, pertence à classe de proteínas responsáveis pelo *folding* e *refolding* de outras proteínas sob condições de estresse, estando associada à renaturação de proteínas intracelulares. Embora não esteja classificada como pertencente à membrana externa segundo PSORTb v3.0, nem à categoria relacionada à patogenicidade, chaperoninas 10 kDa e 60 kDa podem ser encontradas na superfície de inúmeras células procarióticas e eucarióticas, podendo até mesmo ser secretadas (RANFORD et al., 2000). A presença da chaperonina de 60 kDa na superfície de células bacterianas pode estar relacionada com aspectos de virulência, como demonstrado por Gardunõ (1998), cujos resultados com anticorpos específicos contra *Hsp60*, um membro da

família GroEL de *Legionella pneumophila*, mostraram que esta proteína está envolvida em interações proteína-proteína e também na aderência e invasão de células HeLa.

Sabe-se que em *Escherichia coli* proteínas a serem secretadas tem que ser mantidas em um estado conformacional antes da translocação pela membrana citoplasmática, função desempenhada pelas chaperonas. Muitas proteínas relacionadas à resposta de choque térmico em *E. coli* também atuam como chaperonas, tal como GroEL, juntamente com GroES, e DnaK, a qual geralmente atua com DnaJ e GrpE. Em seu trabalho, Kusukawa (1989) demonstrou que mutantes GroEL e GroES não conseguem processar  $\beta$ -lactamase *in vivo*, sugerindo sua função como chaperoninas. Outra evidência foi demonstrada Wild et.al. (1992) em que mutantes proteínas DnaK e DnaJ eram incapazes de translocar fosfatase alcalina, de forma que tais proteínas de resposta ao choque térmico estão também envolvidas na secreção de muitas proteínas, atuando como chaperonas.

Em seu trabalho com *Staphylococcus aureus*, Singh e sua equipe (2012) observaram que mutantes para DnaK causaram uma redução na habilidade desse patógeno em formar biofilmes e também em aderir à células eucarióticas, etapas fundamentais para o sucesso da infecção bacteriana. Tal função também poderia ser investigada em *Xanthomonas* sp. e verificar se há relação com a patogenicidade apresentada por este fitopatógeno. Assim, a função das proteínas GroEL e DnaK em *Xanthomonas* sp. ainda não é conhecida, mas pode-se inferir que estejam relacionadas à patogenicidade desse fitopatógeno, pois apresentaram um aumento na expressão na condição infectante, bem como uma maior expressão de GroEL no meio indutor de patogenicidade (XAM-1) identificada por Artier (2010).

Outra proteína identificada no presente trabalho com expressão possivelmente aumentada na condição infectante é uma protease Clp dependente de ATP (*ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit*, XAC1078). Sabe-se que em células procarióticas, as proteases Clp e Lon dependentes de ATP estão envolvidas com o *turnover* e degradação de proteínas, e dependendo do organismo, essas proteases contribuem com a tolerância ao estresse. Mutantes para os genes codificantes dessas proteínas em *Campylobacter jejuni* demonstraram que ClpP e Lon são necessárias para o crescimento em altas temperaturas, uma condição conhecida por aumentar os níveis de proteínas desoveladas (COHN et al., 2007). Semelhantemente, Tomoyasu e colaboradores (2001) demonstraram que células de *E. coli* mutantes para Clp e Lon apresentaram um acúmulo de proteínas agregadas, mesmo resultado obtido para mutantes DnaK no mesmo trabalho. Assim, alguns estudos sugerem que, em adição ao seu papel no enovelamento de proteínas, as chaperonas estejam envolvidas com



a degradação proteica. Entretanto, a relação entre chaperonas e proteases ainda não é bem compreendida (KANDROR, 1995).

Apesar de ser uma proteína tipicamente de citosol, uma protease Clp dependente de ATP foi encontrada associada à membrana de uma cianobactéria (*Synechococcus elongatus*), entretanto sua função ainda não foi bem caracterizada (STANNE et al., 2007).

### **5.3 Comparação dos presentes resultados com trabalhos anteriores envolvendo a análise proteômica de XAC**

A análise do subproteoma de superfície celular por meio da marcação fluorescente de células bacterianas intactas e análise por 2D-DIGE permitiu identificar 30 proteínas, sendo 10 descritas como pertencentes à membrana externa e uma localizada na membrana citoplasmática. Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, envolvendo frações enriquecidas com proteínas periplasmáticas e análise por 2D-PAGE (géis com 260 µg de proteínas) e espectrometria de massas (ARTIER, 2010; ZANDONADI, 2012) identificaram, além de muitas proteínas periplasmáticas, proteínas pertencentes à membrana externa ou à membrana interna. Em seu trabalho, Artier (2007) investigou diferenças de expressão proteica de XAC após cultivo em um meio indutor de patogenicidade (XAM-1) e em um meio não indutor de patogenicidade (CN). Seus resultados apresentaram três proteínas de membrana externa: esterase (XAC3300), *outer membrane protein* (XAC1012), *outer membrane protein P6 precursor* (XAC3141), e uma localizada na membrana citoplasmática *transglycosylase* (XAC3225). A proteína *outer membrane protein* (XAC1012) foi encontrada com menor expressão no meio XAM-1 e, no presente estudo, a mesma proteína foi identificada em dois *spots* diferentes, um com maior e outro com menor expressão na condição infectante (1853 e 1925, respectivamente). Já a proteína *transglycosylase* (XAC3225) foi encontrada em ambos os trabalhos em *spots* com expressão aumentada na condição de indução de patogenicidade (meio XAM-1) / infectante (cultivo *in vivo*). Apenas as proteínas esterase e *outer membrane protein P6 precursor*, encontradas com menor e com maior expressão no meio XAM1 respectivamente, não foram encontradas pela abordagem empregada no presente trabalho.

É interessante destacar que os *spots* 1853 e 1925 estão localizados em posições próximas no gel (Figura 22) e foram identificados com uma proteína em comum, a *outer membrane protein* (XAC1012), demonstrando a possibilidade de modificações pós-

tradicionais nesta proteína. Entretanto, modificações como fosforilação desta proteína não foram encontradas na literatura.

A comparação entre XAC e XauB e entre XAC e XauC após cultivo em meio indutor ou em meio não indutor de patogenicidade foi realizada por Zandonadi (2012). As frações enriquecidas com proteínas periplasmáticas foram obtidas de forma semelhante ao processo utilizado por Artier, entretanto, seus resultados revelaram maior número de proteínas assinaladas como de membrana. Em meio indutor de patogenicidade, a comparação de XAC e de XauB mostraram 10 proteínas de membrana externa, sendo algumas delas dos tipos *outer membrane protein* e *TonB-dependent receptor* (ambas com maior expressão em XauB) também encontrados neste estudo, e três de membrana citoplasmática que não correspondem às encontradas pela abordagem descrita neste trabalho. Já a comparação entre XAC e XauC revelou apenas duas proteínas de membrana externa (ambas com maior expressão em XauC), uma esterase (XAC3300) e uma *TonB-dependent receptor* (XAC3050), sendo esta última um tipo de proteína também aqui encontrada.

Diante desses resultados encontrados por Zandonadi, podemos observar que proteínas do tipo *TonB-dependent receptor* parecem ser menos expressas por XAC em condições de patogenicidade ou mesmo em comparação com espécies menos virulentas de *Xanthomonas* spp., como XauB e XauC, nas quais a sua expressão parece ser maior. Semelhantemente, o presente estudo apresenta uma diminuição de *TonB-dependent receptor* na condição infectante utilizada para XAC, o que pode ser uma evidência das diferenças de mecanismos utilizados por cada uma dessas espécies bacterianas diante de um estímulo de indução de patogenicidade.

Os dois diferentes métodos utilizados para extração de proteínas e para a análise dos perfis proteicos (por 2D-DIGE ou por 2D-PAGE) entre os trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório revelaram a identificação de diferentes proteínas de membrana. É importante ressaltar que no trabalho de Artier e Zandonadi a extração era própria para proteínas periplasmáticas e não de membrana e que no presente estudo foi utilizado o cultivo bacteriano *in vivo*, o que forneceu baixa quantidade de células para a extração proteica comparada à grande quantidade celular obtida por cultivo *in vitro*. Apesar de terem sido utilizados 50 µg de proteínas por amostra, esse valor se refere à quantificação de um extrato de proteínas totais de forma que proteínas de membrana estão presentes em menor quantidade. Por outro lado, o emprego da técnica de 2D-DIGE com marcação fluorescente de células intactas facilitou a comparação do perfil de expressão de proteínas superficiais após a

interação patógeno-hospedeiro, dispensando a realização de um fracionamento celular para isolar a fração de membrana e posterior análise proteica.

Em seu trabalho envolvendo a análise proteômica total de XAC, Facincani (2007) identificou a partir da análise por eletroforese bidimensional 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). Ainda no mesmo trabalho, a análise por MudPIT revelou a presença de 1.162 proteínas de XAC quando cultivada em meio CN, 1.167 proteínas de XAC cultivada no meio indutor XAM1 por 24 h, 1.157 proteínas do extrato de bactérias recuperadas por exsudação a partir de folhas de laranjeira 3 dias após a inoculação, enquanto 1.072 proteínas foram identificadas a partir do extrato de bactérias 5 dias após a inoculação. Um total de 1.679 proteínas de XAC foram identificadas por MudPIT e dessas, 518 são proteínas diferencialmente expressas na condição infectante, encontradas nos três extratos de XAC infectivos (1, 3 e 5 dias de infecção).

Dentre as proteínas encontradas no presente estudo, nenhuma corresponde às encontradas por Facincani durante as análises das condições de infecção. Por outro lado, na condição de não indução de virulência apenas uma proteína (XAC3169, *ferric enterobactin receptor*) identificada no presente trabalho não foi encontrada por Facincani. Tais diferenças apresentadas podem ser atribuídas às diferentes abordagens empregadas para a análise proteômica (2D-PAGE e MudPIT; 2D-DIGE), tanto como a espécie de hospedeiro cítrico utilizada em cada trabalho (*Citrus sinensis*; *Citrus aurantifolia*).

## 6 CONCLUSÕES

Até o presente momento, este é o primeiro estudo envolvendo a marcação fluorescente de proteínas superficiais em células intactas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A análise das proteínas por 2D-DIGE possibilitou detectar diferenças de expressão significativas entre os perfis proteicos obtidos em cada condição analisada. Essa abordagem experimental permitiu identificar proteínas de diferentes compartimentos de membrana, incluindo as de membrana externa, as quais são normalmente pouco representadas em um perfil 2D convencional.

Algumas das proteínas apresentadas neste trabalho correspondem àquelas identificadas em trabalhos anteriores envolvendo o estudo de frações enriquecidas com

proteínas periplasmáticas de XAC. Entretanto, novas proteínas foram identificadas, reforçando a importância da análise proteômica diferencial para a investigação de diferentes condições e também para fornecer informações de relevância para o controle da doença e para seu diagnóstico.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho possibilitou padronização de técnicas fundamentais para estudo *in vivo* por 2D-DIGE de proteínas da membrana. Embora o refinamento da técnica ainda possa ser realizado, as condições fundamentais para isto foram estabelecidas a partir deste trabalho

Experimentos adicionais envolvendo o fracionamento das amostras de XAC e de XauB, conforme descritos no item 4.4, podem ser realizados na tentativa de visualizar a fração de membrana em géis unidimensionais (SDS-PAGE), os quais fornecem melhores condições e preparo das amostras para uma maior solubilização das amostras (item 3.5). Dessa forma, uma análise diferencial poderia ser realizada a partir da comparação das bandas apresentadas em cada condição estudada, seguida pela identificação de proteínas por LC-MS/MS e busca em banco de dados.

Novas abordagens proteômicas podem ser aplicadas visando a realização da comparação de proteínas superficiais de XAC e de XauB após crescimento *in vivo*, conforme proposto no presente estudo. Uma possibilidade seria o uso de uma técnica descrita como *shaving*, na qual enzimas como a tripsina são utilizadas para a hidrólise de proteínas expostas na superfície de células vivas (Tjalsma et.al., 2007). Assim, a quantificação das amostras pode ser feita a partir da marcação dos peptídeos com *tags* isóbaros pela técnica iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*) seguida pela análise por LC-MS/MS (CASTRO-BORGES et al, 2011).

De forma a complementar o presente trabalho, novos estudos envolvendo a validação dos resultados por *Western blotting* e experimentos de nocaute de genes de proteínas de *Xanthomonas* sp. aqui apresentadas poderão analisar se tais proteínas estão relacionadas à virulência do patógeno e se serão importantes alvos para futuro desenvolvimento de drogas, o que poderá auxiliar na resolução de problemas associados à citricultura e até mesmo auxiliar na erradicação da doença.

## 8 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. E.; et al. In vivo proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 281, p. 167–174. 2008.

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

AYRES, A. J. Control De Las Enfermedades De Los Cítricos En Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE CÍTRICOS CHINA/FAO. 2001. 107-116.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

BERKS, B.C.; PALMER, T.; SARGENT, F. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. **Advances in Microbial Physiology**. v. 47, p. 187-254, 2003.

BLANVILLAIN, S.; et al. Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. **PLoS ONE**. v. 2, n. 2, p. 224, 2007.

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

CASTRO-BORGES, W.; et al. Enzymatic Shaving of the Tegument Surface of Live Schistosomes for Proteomic Analysis: A Rational Approach to Select Vaccine Candidates. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.5, n.3, e993, 2011.

CERNADAS, R.A.; CAMILLO, R.L.; 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.

COHN, M.T.; et al. Contribution of Conserved ATP-Dependent Proteases of *Campylobacter jejuni* to Stress Tolerance and Virulence. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 7803–7813, 2007.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial Biofilms. **Annu.Rev. Microbiology**. v. 49, p. 711-45, 1995.

CRAIG, L.; Li, J. Type IV pili: paradoxes in form and function. **Current Opinion in Structural Biology**, v.18, n.2, p. 267-277, 2008.

CROSSMAN, L.; DOW, J.M.. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 623–629, 2004.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. **Nature Biotechnology**, v.28, p.710-721, 2010.

DOW, J.M.; et al. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. **PNAS**. v. 100, n.19, 10995–11000, 2003.

DREWS, J. Drug Discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, p. 1960-1964, 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT statistical databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> . Acesso em: 22 mar. 2013.

FANCINCANI, A.P. **Análise Proteômica do Fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciência Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FUNDECITRUS. **Fundo de defesa da citricultura**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

GACHOMO, E. W.; SHONUKAN, O. O.; KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 26-32, 2003.

GARDUNO, R.A.; GARDUNO, E; HOFFMAN, P.S. Surface-Associated Hsp60Chaperonin of *Legionella pneumophila* Mediates Invasion in a HeLa Cell Model. **Infection and Immunity**. v. 66, n.10, p. 4602–4610, 1998.

GE HEALTHCARE. **Ettan DIGE System User Manual**. 18-1173-17 Edition AB.

GONZÁLES-PEDRAJO, B.; DREYFUS, G. Sistemas de Secreción de Proteínas en las Bacterias Gram Negativas: Biogénesis Flagelar y Translocación de Factores de Virulencia. **Mensaje Bioquímico**, v. 27. 45-63, 2003.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, nov. 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 cancrrosis B in Argentina. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 46, p. 329-338, 1980.

GOTTIG, N.; et al. A Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. **PLoS ONE**, v.4, n.2, e4358, 2009.

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

HU, Y.; DANG, W.; SUN, L. A TonB-dependent outer membrane receptor of *Pseudomonas fluorescens*: virulence and vaccine potential. **Arch Microbiol**, v.194, p. 795–802, 2012.

KANDROR, O.; et al. Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in *Escherichia coli* and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. **The EMBO Journal**, v.14, p. 6021-6027, 1995.

KATZEN, F.; et al. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. **Journal of Bacteriology**. v.180, n.7, p. 1607-1617. 1998.

KEEG. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway**. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/pathway/ko/ko03070.html>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

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

KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. TonB or not TonB: is that the question? **Biochem. Cell Biol.**, v.89, p. 87–97, 2011.

KUSUKAWA, N.; et al. Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**, v.8, n 11, p. 3517-3521, 1989.

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

LITWIN, C.M.; CALDERWOOD, S.B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p.137-149, 1993.

LOWER, B. H.; et al. Simultaneous force and fluorescence measurements of a protein that forms a bond between a living bacterium and a solid surface. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2127–2137, 2005.

MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Anal Bioanal Chem.**, v. 382, p. 669–678, 2005.

MAYRHOFER, C.; et al. DIGE compatible labeling of cell surface proteins on vital cells *in vitro* and *in vivo*. **Proteomics**, v.6, p. 579-585, 2006.

McWHITER, A.H.; et al. Selective Labelling of Cell-surface Proteins using CyDye DIGE Fluor Minimal Dyes. **JoVE**, 21. 2008.

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.

MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. A simple method for *in vivo* expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 400-403, 2003.

MOREIRA, L. M. **Análise estrutural e funcional do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2006. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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.

MORTZ, E.; et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **Proteomics**, v. 1, p. 1359-1363, 2001.

NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 715-731, 1981

NEILANDS, J. B. Microbial envelope proteins related to iron. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 36, p. 285-309, 1982.



NETO, E. F.; et al. Revisão Literária sobre cancro citríco (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, n. 10, p.1-7, dez. 2006.

NEVES, M.F.; et al. **Caminhos para a citricultura**. São Paulo: Editora, 2007.

POETSCH, A.; WOLTERS, D. Bacterial membrane proteomics. **Proteomics**, v. 8, p. 4100-4122, 2008.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. 5 ed. The McGraw–Hill Companies, 2002.

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

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

RITTER, A.; et al. Proteomic studies highlight outer-membrane proteins related to biofilm development in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. D41. **Proteomics**, v. 12, p. 3180–3192, 2012.

ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/FUNDECITRUS, Piracicaba, 2001.

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.

SHIN, B.K.; et al. Global Profiling of the Cell Surface Proteome of Cancer Cells Uncovers an Abundance of Proteins with Chaperone Function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7607–7616, 2003.

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

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

SINGH, V.K.; et al. An insight into the significance of the DnaK heat shock system in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, p. 242-252, 2012.

SMANI, Y.; McCONNEL, M.J.; PACHÓN, J. Role of Fibronectin in the Adhesion of *Acinetobacter baumannii* to Host Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e33073, 2012.

SOARES, M.R.; et al. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **Proteome Science**, v. 8, p.55, 2010.

STANNE, T.M.; et al. Distinctive Types of ATP-dependent Clp Proteases in Cyanobacteria. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.282, n.19, p.14394-14402, 2007.

STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. **Science**, v. 268, 661-667, 1995.

STOODLEY, P.; et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p.187–209, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3–9, 2001.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow proteins secretion across the bacterial outer membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 420-430, 2000.

TJALSMA, H.; et al. Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. **Proteomics**, v. 8, p. 1415–1428, 2008.

TOMOYASU, T.; et al. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. **Molecular Microbiology**, v.40, n.2, p.397-413, 2001.

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

WILD, J.; et al. DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in Escherichia coli. **Genes and Development**, v. 6, p. 1165- 1172, 1992.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <  
<http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2013.

UNLU, M.; MORGAN, M.E.; MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2071-2077, 1997.

ZANDONADI, F. da Silva. **Análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de Xanthomonas spp. que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros**. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.