

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



TIAGO ANTONIO DE SOUZA

**“Caracterização Molecular da Interação entre Proteínas de Citros
Envolvidas no Controle da Expressão Gênica e a Proteína Efetora
Bacteriana PthA, Indutora do Cancro Cítrico.”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
TIAGO ANTONIO DE SOUZA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Vegetal
e Melhoramento .

A handwritten signature in blue ink that reads "Celso Benedetti".

Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti.

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So89c	<p>Souza, Tiago Antonio de Caracterização molecular da interação entre proteínas de citros envolvidas no controle da expressão gênica e a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico / Tiago Antonio de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Celso Eduardo Benedetti. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Proteína PthA. 2. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>. 3. Fatores de ribolização do ADP. 4. Proteínas de grupo de alta mobilidade. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Molecular characterization of the interaction between citrus proteins involved in gene transcription control and the effector protein PthA, a citrus canker disease inductor.

Palavras-chave em inglês: PthA protein; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; ADP-Ribosylation factors; High mobility group proteins.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Celso Eduardo Benedetti, Helena Carrer, Marcelo Carnier Dornelas.

Data da defesa: 28/05/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 28 de Maio de 2010

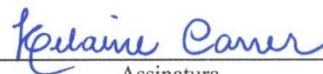
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra Helaine Carrer



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Assinatura

"Achei que vocês gostariam de ver o que os anjos calçam. Só por curiosidade mesmo. Não estou tentando provar nada, a propósito, sou um cientista e sei muito bem o que pode ser chamado de prova. Mas o motivo pelo qual desejo ser chamado pelo meu apelido de infância é exatamente esse: lembrar-me de que um cientista deve, acima de tudo, ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independentemente daquilo ser o que ele imaginava ver ou não. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão, você só vai ver o que você esperava ver. A maioria dos cientistas esquece-se disso. Mais tarde, vou mostrar uma coisa a vocês pra demonstrar o que estou falando. Então, o outro motivo pelo qual gosto de ser chamado de Wonko, o São, é para que as pessoas pensem que eu sou bobo. Isso me permite dizer o que eu vejo quando eu vejo. Não dá para ser um cientista se você for ficar se preocupando se as pessoas vão ou não te achar bobo. Enfim, imaginei que vocês fossem gostar de ver isso também."

Douglas Adams (1984)

**Dedico esse trabalho à minha mãe, Maria Aparecida da Trindade Souza,
Ao meu pai, Mauri Antonio de Souza
E à minha irmã, Máira Eunice de Souza**

Agradecimentos

À minha mãe, Maria, que escolheu dar a oportunidade para que eu pudesse sempre ser o que sonhava ser. E principalmente por tentar me ensinar que sensibilidade é essencial ao ser humano. Sem você eu não seria absolutamente nada nem ninguém. Obrigado por escolher abdicar dos seus sonhos para que eu pudesse tentar realizar os meus!

À minha irmã (e broa) Maíra, por ser simplesmente o maior exemplo de força, perseverança e alegria que eu tenho. Obrigado pelo apoio e pela paciência broa!

Ao meu pai, Mauri, e toda minha família (Vó, tios, tias, padrinhos e madrinhas, primos...) por sempre me receberem e me trazerem de volta às minhas raízes, muitas vezes sem perceber. Isso foi, é e ainda vai ser muito importante durante minha vida.

Ao meu orientador Dr. Celso Benedetti pela oportunidade, pela confiança depositada em mim e pela liberdade científica durante todos esses anos de convivência.

Ao Dr. Raul Andrés Cernadas por me ensinar meus primeiros passos em biologia molecular ainda na iniciação científica. Sua competência e garra científica são motivos de inspiração.

Ao Dr. Alexandre Quaresma, grande amigo, grande pesquisador e essencial no início dos estudos da proteína HMG de citros.

Ao Dr. Maurício Sforça pela sempre constante paciência, sabedoria e tranquilidade e a todos os membros do grupo de RMN pela excelente colaboração.

Ao Dr. Michel Vincentz por ceder suas instalações para o início dos experimentos com *Arabidopsis thaliana*.

Aos membros titulares da Banca de Defesa: Dra. Helena Carrer e Dr. Marcelo Dornelas, pelas sugestões valiosas e pela disponibilidade e aos demais membros, Dr. Michel Vincentz e Dr. Ivan de Godoy Maia.

Aos membros da banca de Qualificação e Pré-Banca: Dr. Jörg Kobarg, Dr. Cláudio Werneck e Dr. Michel Vincentz pelas valiosas críticas, sugestões e troca de experiências.

A todo o pessoal do grupo GEM e principalmente aqueles que estiveram mais próximos das dificuldades e participaram mais ativamente das alegrias: Adriana Soprano, André Pereira, Maria Luiza (Malu) e Mariane Domingues. E também aos demais membros do grupo Bruna Campos, Lilían Pino e Fabiana. Aos que já se foram mais ainda foram igualmente importantes: Rosicler Barbosa (Rosi), Andrés Cernadas, Marina Vanini, Luciana (Luli) e Aline Oliveira.

Aos grandes amigos do LNBio, cujas discussões foram e ainda são tão profícuas que tangem todo e qualquer ramo do conhecimento!: Aline Oliveira, André Pereira, Carla Polo, Daniel Lanza, Fábio Moraes, Luis Gustavo Morello (Guga), Gustavo Bressan, Joice Paiva, Marcos Alborghetti, Marcos (Toty), Tatiana Souza, Yuri Mendonça, Gabriela Meirelles (Gabi) e Gustavo Bezerra. Vocês foram essenciais na minha formação e são minha esperança na futura ciência brasileira. Obrigado pelas inúmeras sugestões e pela amizade!

À Mariane N. Domingues pelas correções atenciosas na dissertação e pela colaboração nos nossos infindáveis experimentos!

À Dra. Maria Luiza (Malu) pelo apoio nos experimentos de transformação de citros. E por sempre nos contagiar com a sua alegria e empolgação. Ao André Pereira pelo auxílio no isolamento dos promotores e nos ensaios de EMSA. E por ser um grande amigo dentro e fora do laboratório!

A todos os pesquisadores, colaboradores e alunos do Laboratório Nacional de Biociências, pelo apoio e por sempre manterem o local de trabalho um lugar cada vez melhor para se praticar ciência de alto nível.

Ao Dr. Shaker Chuck Farah e Dra. Cássia Docena pela colaboração no *screening* inicial de duplo-híbrido.

Ao Dr. Nilson Ivo T. Zanchin pelo fornecimento do plasmídeo PT7Sup23.

À Givanil, Veruska, Tereza, Adriana, M. Eugênia, Renata, Celisa, Andréia, ao grupo de Espectrometria de Massas e a todo o pessoal técnico do LNBio.

Aos meus amigos Víctor Maturana e Renê Rocha, que compartilharam os mesmos anseios ao longo do mesmo caminho (MATURANA, 2010).

Ao grande Fábio Moraes, pela amizade e por nossos *grandes English Talks!*

À Sarah Azoubel Lima, por ter sido tão importante durante tanto tempo.

Aos meus grandes amigos que tive a oportunidade de conhecer, conviver e que me surpreendem até hoje e com os quais posso falar sem medir palavras: Rodrigo Sasaki, Mathias Pires, Maurício Durigan, Guilherme Godoy, Camila Carlos, Renato Milani, Gustavo Mori, Hugo Cândido, Victor Lourenço, Carlos Assis, Henrique Scatolin, Guilherme Rocha, André Oliveira, Lucas Frungillo, Bruno Cardoso, Francisco Neto e a todo Xorume/APF. A todo pessoal da República (atuais e ex-moradores) pela excelente convivência e amizade: Novo, Sammy, Zoinho, Plínio, Tchê, Reco, Minitups, Nicholas, Marreco, Felipe, Piriquito, Magnão e Igor.

A todos meus grandes amigos do Coluni-UFV, que um dia vão com certeza dominar esse mundo, cada um do seu jeito peculiar: Felipe Ramos (Mingau), Evérton (Araponga), José Guilherme, Fabrício Luís, Luís Carlos, Frederico (Fredão), Thales, Wander, Lander e a todo o pessoal de Minas!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLus – MCT) pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

Índice

Índice	viii
Lista de Figuras e Tabelas	x
Lista de Abreviações	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
Introdução	
1.1 Interação Patógeno Hospedeiro	1
1.2 Cancro Cítrico	3
1.3 Proteínas Efetoras Tipo III	5
1.4 Proteína <i>Auxin Response Factor</i> (ARF)	9
1.5 Proteína <i>High-mobility group</i> (HMG)	13
2.1 Objetivos e Justificativa	16
Materiais e Métodos	
3.1 Clonagem	17
3.2 Duplo-híbrido de Leveduras	19
3.3 Expressão e Purificação	20
3.4 GST-pulldown	24
3.5 Clonagem da Região 5'UTR dos Genes CsEXP e CsCP450	25
3.6 Ensaios Estruturais e Funcionais de CsHMG	27
3.7 Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-O e <i>hmg-1</i>	31
3.8 Anticorpo Anti-HMG e Tentativas de Co-imunoprecipitação	31
3.9 Ferramentas de Bioinformática	32
Resultados e Discussão	
Parte 1 - Caracterização da proteína CsARF e sua interação com a proteína efetora PthA.	
4.1 Identificação das proteínas CsARF e CsHMG como parceiras de interação da proteína efetora PthA de Xac.....	33
4.2 CsARF tem elevada similaridade com ARF2 de <i>A. thaliana</i> , um repressor transcricional da sinalização por auxinas	33
4.3 CsARF Interage <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com todas as Variantes de PthA exceto a variante 1, de 16,5 repetições	34
4.4 As Repetições no Domínio Interno de PthA são Suficientes para a Interação com CsARF	36
4.5 Os Domínios C-terminal Aux/IAA e N-terminal B3 estão Envolvidos na Interação com PthA.....	37
4.6 A Região de DNA 5'UTR do gene CsEXP apresenta uma seqüência muito similar à Encontrada em Promotores Regulados por AvrBs3 e um box putativo AuxRE	38
4.7 Outros Promotores Podem ser Alvos da Ligação Conjunta de PthA e CsARF	42
4.8 Expressão e Purificação de 6xHis-CsARF Δ N ₍₁₋₂₅₇₎	42
Parte 2 - Caracterização da proteína CsHMG e sua interação com a proteína efetora PthA.	
4.9 CsHMG Pertence à Família HMGB1 de <i>A. thaliana</i>	44
4.10 CsHMG Interage <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com Todas as Variantes de PthA.....	45
4.11 A Interação pode depender de dímeros de PthA e Envolve a Região Rica em Leucinas (PthALRR).....	46
<i>Caracterização funcional e estrutural de CsHMG</i>	
4.12 Expressão e Purificação de 6xHis-CsHMG	48
4.13 CsHMG Interage com DNA de Forma Inespecífica <i>in vitro</i>	49

4.14 CsHMG é capaz de ligar RNA <i>in vitro</i> de forma específica para regiões ricas em uridina sem sofrer influência da presença de DNA linear dupla-fita..	50
4.15 Estudos Biofísicos Revelam Estrutura Secundária Composta por Alfa-Hélices e Regiões Desestruturadas.	54
4.16 O Alto Índice de Regiões Desestruturadas de CsHMG Impede a Realização de Estudos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Proteína Inteira.	55
4.17 Estudos de RMN do Domínio HMG-box da Proteína CsHMG.	56
4.18 Detecção de HMGs de citros e <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Western Blot</i> ..	59
4.19 Tentativas de Cristalização de 6xHis-CsHMG.	61
Considerações Gerais e Perspectivas	62
Conclusões	64
Referências Bibliográficas	65
Anexo	
8.1 Artigo em Colaboração Aceito para Publicação	73
8.2 Prêmios Recebidos	74

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 – Tipos de imunidade em plantas	3
Figura 2 – Estrutura das proteínas da família PthA/AvrBs3.	7
Figura 3 – Variantes de PthA de Xac	8
Figura 4 – Estrutura de domínios de proteínas do grupo das ARFs	9
Figura 5 – Esquema da sinalização molecular por auxina.	10
Figura 6 – Esquema representando os oligonucleotídeos utilizados no isolamento da região 5'UTR de CsExp.	24
Figura 7 – CsARF tem elevada identidade de seqüência de aminoácidos com AtARF2, um repressor transcricional	32
Figura 8 – Interações entre CsARF e as variantes de PthA.	33
Figura 9 – Mapeamento do domínio de PthA envolvido na interação com CsARF Δ N ₍₁₋₂₅₇₎	34
Figura 10 – Ensaio de mapeamento do domínio de interação de CsARF com PthA	35
Figura 11 – Análise da seqüência 5'UTR do gene de uma expansina (CsEXP).	36
Figura 12 – EMSA com a região inteira 5' UTR de CsEXP e extrato de reticulócitos expressos com a construção PT7Sup23	37
Figura 13 – EMSA com a potencial região promotora de CsEXP e extrato de reticulócitos expressando CsARF	37
Figura 14 – Purificação da forma truncada 6xHis- CsARF Δ N ₍₁₋₂₅₇₎	40
Figura 15 – CsHMG tem elevada identidade de seqüência de aminoácidos com o grupo B de HMGB.	41
Figura 16 – Interações entre CsHMG e as variantes de PthA.	42
Figura 17 – Mapeamento do domínio de PthA envolvido na interação com CsHMG.	44
Figura 18 – Expressão e purificação de 6xHis-CsHMG.	45
Figura 19 – EMSA com 6xHis-CsHMG e sondas de DNA	46
Figura 20 – EMSA com 6xHis-CsHMG com sondas de RNA.	48
Figura 21 – UV-crosslinking das sondas poli A, C, G e U com 6xHis-CsHMG.	49
Figura 22 – Especificidade e ensaios competitivos da ligação CsHMG-RNA poly-U e CsHMG-BOX (Δ N Δ C).	50
Figura 23 – Ensaio de competição <i>in vitro</i> utilizando DNA dupla-fita.	51
Figura 24 – Espectros de CD de 6xHis-CsHMG	52
Figura 25 – Análises espectroscópicas e de RMN sobre a estruturação secundária de CsHMG	53
Figura 26 – Espectro bidimensional N ¹ H ¹⁵ QC da proteína 6xHis-CsHMG Δ N Δ C.	54
Figura 27 – <i>Chemical Shift Index</i> (CSI) preliminar dos resíduos presentes em CsHMG Δ N Δ C já atribuídos	55
Figura 28 – Espectros N ¹ H ¹⁵ QC correspondentes à titulação RNA/proteína	56
Figura 29 – O anticorpo Anti-HMG é específico para a proteína CsHMG e reage cruzado com o provável homólogo em <i>A. thaliana</i>	57
Figura 30 – A proteína CsHMG endógena pôde ser imunoprecipitada porém não houve co-precipitação de um complexo com PthA	58
Figura 31 – Presença de cristais na condição 200 mM formato de magnésio e 20% w/v PEG-3350	59
Tabela 1 – Relação da seqüência 5'3' dos oligonucleotídeos usados na clonagem e seqüenciamento das construções utilizadas	16
Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados no isolamento dos promotores de citros.	24
Tabela 3 – Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA com CsARF	25
Tabela 4 – Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA de RNA com CsHMG.	29
Tabela 5 – Relação dos boxes TGTC encontrados nas prováveis regiões promotoras de genes up regulados por Xac	39

Lista de Abreviações

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

LRR – Leucine Rich Repeats

PRR – Pathogen Recognition Receptors

NB-LRR – Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeats

ETS – Effector-Triggered Susceptibility

PTI – Pathogen-Triggered Immunity

ETI – Effector-Triggered Immunity

MAPK – Mitogen-activated Phosphatase-Kinase

TTSS – Type III Secretion System

Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Xaa – *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolia*

HMG – High-Mobility Group Protein

ARF – Auxin Response Factor Protein

ORFs – Open Reading Frames

PCR – Polimerase Chain Reaction

RACE – Rapid Amplification of cDNA ends

RPM – Rotações por minuto

FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography

IPTG - Isopropyl β -D-1 thyogalactopiranoside

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

EST – Expressed Sequence Tags

GFP – Green Fluorescent Protein

PPM – Partes por milhão

CSI – Chemical Shift Index

3-AT – 3-aminotriazole

UPA – Up-Regulated by AvrBs3

NLS – Nuclear Localization Signal

AAD – Acidic Activation Domain

pb – Par de base

Kb – Kilobases

nt - Nucleotídeos

Resumo

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é uma doença que afeta a maioria das espécies do gênero *Citrus*, ocorrendo praticamente em todos os continentes, e se destaca como uma das ameaças à citricultura brasileira. O mecanismo molecular pelo qual *Xac* causa o cancro não é inteiramente conhecido, entretanto, sabe-se que a bactéria ao infectar a planta, utiliza o sistema secretório tipo III (TTSS) para injetar proteínas de patogenicidade, entre elas PthAs da família AvrBs3/PthA. Quando expresso na célula hospedeira, PthA induz lesões características do cancro como hipertrofia e hiperplasia. Estudos recentes demonstram que membros dessa família atuam como fatores de transcrição. Portanto, a elucidação de como PthA ativa a transcrição é de grande importância para o entendimento do seu mecanismo de ação e desenvolvimento das lesões do cancro. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo caracterizar interações entre a proteína PthA de *Xac* e as proteínas CsARF (*Auxin Response Factor*) e CsHMG (*High-mobility group*) de laranja doce (*Citrus sinensis*), previamente identificadas em ensaios de duplo híbrido de leveduras. CsARF tem elevada similaridade com AtARF2, um repressor transcricional envolvido na via de sinalização por auxinas. Hormônios vegetais desempenham um importante papel na interação planta-patógeno e em nosso laboratório verificamos que auxinas são importantes para o desenvolvimento dos sintomas do cancro. CsARF foi capaz de interagir com a maioria das variantes de PthA tanto *in vitro* quanto em ensaios de duplo-híbrido de leveduras. A interação de CsARF com PthA se dá através dos domínios C-terminal Aux/IAA e B3 de ligação ao DNA. Verificamos que o promotor do gene de uma expansina de citros, induzido por *Xac* e auxina, apresenta possíveis sítios de ligação das proteínas CsARF e PthA. Dados de EMSA indicam que PthA e CsARF ligam em sítios adjacentes no promotor da expansina de citros e que a interação de PthA com CsARF poderia deslocá-la do promotor. A proteína CsHMG é semelhante a AtHMGB1 de *Arabidopsis thaliana*, envolvida em crescimento celular. CsHMG interagiu com todas as variantes de PthA, sendo que essa interação envolve uma região rica em leucinas (LRR), idêntica nas quatro variantes de PthA. Verificou-se também que CsHMG é capaz de ligar DNA de forma inespecífica. Por outro lado, CsHMG ligou RNA *in vitro*, com especificidade para RNAs ricos em uridina (poly-U). Como PthA age como fator de transcrição eucarioto, não é surpreendente que proteínas do hospedeiro envolvidas com regulação gênica sejam capazes de interagir com esse efetor, sugerindo um novo modo de ação de proteínas efetoras bacterianas.

Abstract

Citrus canker disease, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), affects almost all citrus species and represents a major threat to the Brazilian citriculture. The molecular mechanism by which Xac causes citrus canker disease is poorly understood, however the bacterium injects pathogenicity proteins through a type III secretion system (TTSS) including proteins of AvrBs3/PthA family proteins. When transiently expressed in host cells, PthAs alter transcription of the host cell to the benefit of the pathogen, leading to the development of the cancer lesions, including hypertrophy and hyperplasia. These proteins are thought to act as eukaryotic transcriptional factors, binding and activating directly promoters of host genes. Therefore, elucidating how PthA activates transcription is very important to understanding the mechanisms governing the development of canker lesions. To elucidate how PthA activates transcription and to establish its molecular mode of action, a two-hybrid approach was used to identify host proteins that interact with PthA and therefore could be important for the development of the canker lesions. Among the citrus proteins identified, we selected for studies a CsARF (*Auxin Response Factor*) and a CsHMG (*High-mobility group*), both involved in regulation of gene transcription. CsARF shares high similarity to the *Arabidopsis thaliana* ARF2, involved in the auxin signaling pathway. This is in line with our previous studies showing that auxin is required for canker development. The interactions between all variants of PthA were analyzed both *in vivo* and *in vitro* and depend on the repeat domain of PthAs. The B3 DNA binding and the Aux/IAA domains of CsARF are both involved in protein-protein interactions. Interestingly, the citrus promoter of a citrus expansin gene that is up-regulated by Xac and auxin contains putative CsARF and PthA binding sites. Since these sites are located adjacent in this promoter, it is suggested that the interaction of PthA with CsARF might somehow affect the regulation of the expansin promoter. CsHMG is highly similar to the *A. thaliana* HMGB1 involved in cell growth. CsHMG interacts with all PthA variants and its interaction was shown to be mediated primarily by the leucine-rich repeat (LRR) region of PthAs. CsHMG binds to DNA in a non-specific fashion; surprisingly, however, CsHMG shows an as yet unreported ability to bind to synthetic RNA forms with an apparent specificity to poly-U probes. PthA acts like an eukaryotic transcription factor and is not surprising that host proteins involved with gene regulation can interact with this effector, suggesting a new mode of action of these bacterial effector proteins.

1. Introdução

1.1 Interação Patógeno-Hospedeiro

A relação entre organismos patogênicos e seus hospedeiros é um exemplo de como uma pressão co-evolutiva constante na natureza pode culminar na seleção de estratégias cada vez mais eficientes e específicas de ambas as partes, como uma “corrida armada” (McCann & Guttman, 2008). A ilustração mais recorrente dessa relação é a adaptação do princípio da Rainha Vermelha, criado pelo escritor e matemático inglês Lewis Carroll, em uma de suas obras mais conhecidas, *Alice Through the Looking Glass* de 1872: “*Now, here you see, it takes all the running you can do to keep in the same place. If you get to somewhere else, you must run at least twice as fast as that*” . Em ambiente natural, no entanto, os hospedeiros não são acometidos por um só patógeno, mas sim por um grupo gigantesco e extremamente diversificado deles. É no mínimo surpreendente que doenças causadas por patógenos sejam tão raras em populações naturais, mesmo que as estratégias de virulência sejam cada vez mais refinadas, exigindo que hospedeiros desenvolvam estratégias de defesa cada vez mais eficientes contra organismos patogênicos (Stavrínides *et al*, 2008).

A especificidade de reconhecimento de organismos estranhos é uma característica herdada provavelmente de mecanismos existentes em organismos eucariotos basais. E é condizente dizer que essa especificidade é uma das características básicas de qualquer sistema imune. Sendo assim, é parcimonioso que eucariotos superiores, como animais e plantas, dividam mecanismos moleculares semelhantes de reconhecimento de organismos estranhos (Nürnbergger & Brunner, 2002). Um dos exemplos mais interessantes disso são os motivos de interação proteína-proteína ricos em leucina - LRR (*leucine rich repeats*) presentes em células animais nos receptores de antígenos *Toll-like* (Aderem & Ulevitch, 2000; Underhill & Ozinsky, 2002). Esses motivos também estão presentes em receptores transmembrana de células vegetais e têm como função o reconhecimento de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Gómez-Gómez, 2004; Altenbach & Robatzek, 2007). Os mecanismos de virulência utilizados por patógenos para vencer as defesas do hospedeiro também co-evoluíram com os sistemas de defesa existentes e são tão conservados que podem atingir tanto animais quanto plantas (Prithiviraj *et al*, 2005), como é o caso da

bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, causadora de doenças oportunistas no homem e que também pode infectar plantas (Cao & Rahme, 2001).

Plantas possuem um tipo de imunidade não específica, diferente da imunidade inata em animais, conhecida como PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Jones & Dangl, 2006). Ela também é baseada no reconhecimento de PAMPs e flagelinas (Gómez-Gómez & Boller, 2002), como em animais. O reconhecimento de PAMPs é mediado por receptores transmembrana conhecidos por PRRs (*pathogen recognition receptors*) (Gómez-Gómez, 2004). Esse reconhecimento ativa vias de sinalização mediadas por MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) que podem conter a proliferação dos patógenos (Felix *et al*, 2009), como esquematizado na Figura 1A. Esse reconhecimento pode induzir o fechamento dos estômatos das folhas antes que o patógeno atinja o mesófilo, através de interferências em vias hormonais como auxinas e ácido abscísico (Melotto *et al*, 2006). Patógenos bacterianos de sucesso podem driblar a PTI através da translocação de proteínas efetoras para a célula vegetal (Jones & Dangl, 2006). Uma grande quantidade de efetores bacterianos podem ser translocados por cepa virulenta através de um complexo protéico conhecido como TTSS (*type III secretion system*) e por isso são conhecidos por efetores tipo III (Tampakaki *et al*, 2004). Esses efetores contribuem para a virulência e/ou supressão de defesa, mimetizando ou inibindo vias de sinalização do hospedeiro (Jones & Dangl, 2006). Um exemplo interessante são os efetores AvrPto e AvrPtoB de *Pseudomonas syringae*, que inibem precocemente uma via de sinalização de defesa da planta, dependente de MAPKs (Zipfel & Rathjen, 2008). Nesse caso há o que se chama de ETS (*effector-triggered susceptibility*) e o patógeno consegue se proliferar e crescer nos tecidos vegetais (Jones & Dangl, 2006).

A imunidade “específica” em plantas é conhecida como ETI (*effector-triggered immunity*) e é mediada pelos genes de resistência (R). A maioria dos genes R codifica proteínas NB-LRR (*nucleotide-binding leucine rich repeats*) que reconhecem alvos diretos específicos do patógeno, como os próprios efetores tipo III ou subprodutos de sua ação (Jones & Dangl, 2006), como mostrado na Figura 1B. Devido a essa habilidade de serem reconhecidas por não hospedeiros essas proteínas podem ser chamadas de proteínas Avr (avirulentas) (Tampakaki *et al*, 2004). A resposta ETI é uma versão acentuada e mais efetiva de PTI, que ocasiona freqüentemente uma reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada por intensa morte celular

local das células vegetais, freando o crescimento do patógeno (Jones & Dangl, 2006). A dinâmica e especificidade do reconhecimento mediado por NB-LRRs ainda é pouco conhecida, mas seu modo de ação consiste em um *cross-talk* entre vias de sinalização mediadas por MAPKs e hormônios vegetais. Proteínas efetoras bacterianas podem inibir a ETI e nesse caso há novamente um estado ETS e proliferação do patógeno (Jones & Dangl, 2006).

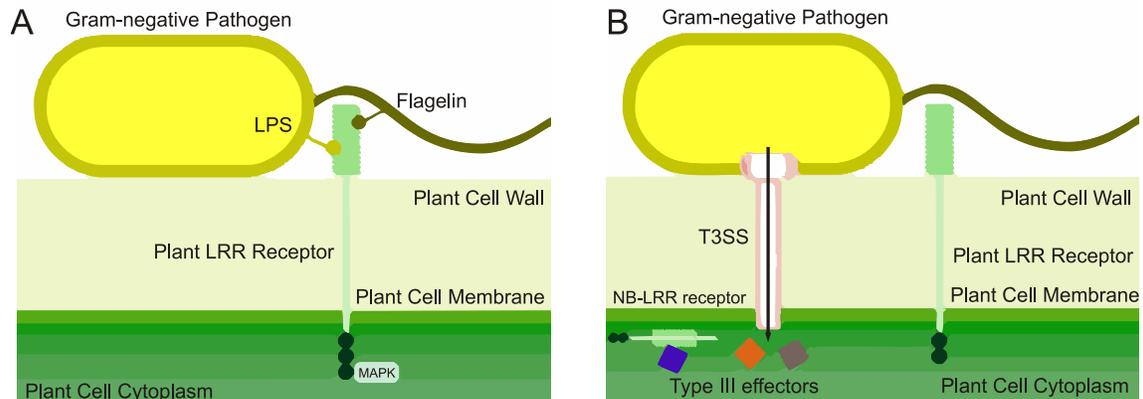


Figura 1 – Tipos de imunidade em plantas. **(A)** PTI – PAMPs presentes nos patógenos, como LPS (lipopolissacarídeos) e flagelinas, podem interferir com receptores transmembrana e ativar cascatas de sinalização envolvendo MAPKs e ativar uma resposta de defesa. **(B)** ETS – Proteínas efetoras são translocadas por TTSS para o interior da célula vegetal, interferindo em mecanismos de defesa PTI e/ou induzindo virulência. ETI – As próprias proteínas efetoras, ou subprodutos de sua presença, são reconhecidos por produtos dos genes de resistência que em sua maioria são receptores NB-LRR. O reconhecimento ativa vias de sinalização, que resultam comumente em uma rápida resposta de morte celular, conhecida como HR, contendo o avanço do patógeno.

Um exemplo que abrange a alternância entre ETI - ETS é o caso da proteína RIN4 de *Arabidopsis thaliana* e os efetores tipo III de *P. syringae* (van der Hoorn & Kamoun, 2008). RIN4 é um alvo de fosforilação dos efetores AvrRpm1 e AvrB (ETS) que quando fosforilada ativa a proteína de defesa NB-LRR RPM1 (ETI) (Mackey *et al*, 2002; Mackey *et al*, 2003). Um último efector, AvrRpt2, é uma cisteína-protease que é ativada dentro da célula hospedeira (Coaker & Staskawicz, 2006) e cliva RIN4 em dois pontos, eliminando-a e gerando uma resposta tipo ETS (Day *et al*, 2005). A clivagem de RIN4 por sua vez ativa outra proteína NB-LRR, RPS2 gerando uma resposta tipo ETI (Kim *et al*, 2005; Kim *et al*, 2005B).

1.2 O Cancro Cítrico

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e exportador de suco concentrado de laranja (Rodrigues & Baldini-Ribeiro *et al*, 2002) A citricultura no país gera divisas superiores a um bilhão de dólares

anuais e estima-se que mais de três bilhões de dólares sejam movimentados anualmente em toda a cadeia produtiva de suco cítrico (Neves *et al*, 2001).

Entre as doenças causadas por bactérias que afetam os citros, o cancro cítrico se destaca como uma das maiores ameaças à citricultura brasileira. A doença é facilmente disseminada e pode atacar todas as variedades comerciais de citros. Ainda não há método curativo para a doença e a única forma de eliminar o cancro cítrico é por erradicação e queima das árvores contaminadas e quarentena por dois anos da área erradicada (Rodrigues & Baldini-Ribeiro, 2002). Atualmente a doença está sob controle, mas ainda há ocorrências em praticamente todo o Estado de São Paulo com um índice de incidência em pomares comerciais de cerca de 0,14% (Fonte: Fundecitrus -2009).

O cancro cítrico é causado por dois grupos de linhagens da bactéria do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), que afeta principalmente a laranja doce e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa), que é restrita ao limão galego. Os dois grupos causam sintomas idênticos, sugerindo um comum mecanismo de patogenicidade, porém atingem hospedeiros diferentes. Todas as culturas de citros são suscetíveis ao cancro, entretanto o grau de suscetibilidade difere entre as culturas (Brunings & Gabriel, 2003).

Os sintomas do cancro cítrico são caracterizados por lesões circulares (*water soaked*) tornando-se elevadas como bolhas à medida que a infecção aumenta. Dentro das lesões crescem pústulas amarelas ou brancas que então escurecem e engrossam. O cancro causa desfolhação, caimento prematuro dos frutos e hiperplasia tecidual (Civerolo, 1984 ; Gottwald *et al*, 2002).

Xac é disseminada pelas chuvas de tempestades e penetra no hospedeiro naturalmente através dos estômatos ou pequenos ferimentos na epiderme das folhas, frutos e ramos e pode ser facilitada por insetos herbívoros. A bactéria cresce abundantemente no espaço intracelular; grandes pústulas ou cânceres são formados nas folhas, caules e frutos; o patógeno induz a hipertrofia (aumento no tamanho celular) e hiperplasia (divisão celular) do tecido (Swarup *et al*, 1991). Após proliferação, a epiderme é rompida e a bactéria é liberada para a superfície da planta, estando disponível para iniciar um novo ciclo de infecção (Duan *et al*, 1991).

Embora Xac possa causar cancro em todas as variedades de citros, Xaa é restrita ao limão galego, causando uma resposta de defesa HR em *C. sinensis* (Swarup *et al*, 1992 ; Cernadas *et al*, 2008). Análises do transcriptoma de folhas de *C. sinensis* infiltradas com Xac e Xaa resultaram em mudanças na expressão de 2% do total de genes examinados (Cernadas *et al*, 2008). Tanto Xac quanto Xaa são capazes de modular genes comuns associados à PTI. Entre 6-48h pós-inoculação (HPI), porém, há uma mudança considerável na expressão gênica e Xac modula genes exclusivos, associados ao remodelamento e crescimento celular, tráfico de vesículas e supressão de defesa. Xaa também modula genes exclusivos, como WRKY e fatores de transcrição associados ao hormônio etileno, envolvidos em cascatas de defesa da planta. Isso é consistente com o fato de que Xac suprime a resposta de defesa da planta ao mesmo tempo em que induz virulência através de proteínas específicas, como aquelas codificadas pelos genes *pthas* (Cernadas *et al*, 2008).

O gene *ptha* é necessário e suficiente para causar lesões do tipo cancro para outras espécies de Xanthomonas que usualmente não causam cancro, como *X. campestris* pv. *citrumelo* (Swarup *et al*, 1992). Todas as cepas virulentas de Xac testadas possuem homólogos de *pthA* sendo que somente a expressão transiente desse gene em folhas de citros, através de transformação por bombardeamento, foi capaz de causar pequenas lesões do tipo cancro em folhas (Duan *et al*, 1991). Esse gene foi o primeiro a ser descrito como tendo função de patogenicidade na família PthA/AvrBs3 em *Xanthomonas*. Os genes dessa família possuem similaridade de 90 a 97%, codificam proteínas efetoras tipo III e podem ser translocadas pelo sistema TTSS para o interior da célula hospedeira (Swarup *et al*, 1992).

1.3 Proteínas Efetoras Tipo III

Bactérias gram-negativas utilizam diferentes sistemas de secreção de moléculas para células hospedeiras. Um dos sistemas mais complexos de secreção é o sistema secretório tipo III (TTSS), formado por mais de 20 proteínas envolvidas em um complexo em formato de agulha, que evoluiu provavelmente de estruturas flagelares. Esse complexo é responsável pela translocação de proteínas, processo intimamente regulado para que seja formado somente em condições de *stress* como carência nutricional, situação esta encontrada no espaço extracelular apoplástico *in planta* (McCann & Guttman, 2008).

Para que uma proteína possa ser exportada pelo TTSS e para que haja seletividade na exportação, *motifs* de reconhecimento devem estar presentes nos alvos (Büttner & Bonas, 2002). Além disso, acredita-se que as proteínas sejam translocadas parcialmente ou totalmente desenoveladas para a passagem por TTSS, sugerindo mecanismos de reenovelamento e ativação pós translocação (Cheng & Schneewind, 2000). Foi demonstrado também que AvrBs3 (membro da família PthA/AvrBs3 de *Xanthomonas*) é translocada pelo sistema TTSS de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* para o interior da célula vegetal (Van den Ackerveken *et al*, 2003) sugerindo que os membros dessa família também devem ser translocados através de TTSS (Szurek *et al*, 2002).

1.3.1 Efetores TAL e a família PthA/AvrBs3

Os membros da família de proteínas PthA/AvrBs3 de *Xanthomonas* têm domínios característicos de fatores de transcrição e atuam como transativadores na célula hospedeira (Kay & Bonas, 2009). Por essa razão são classificados como uma nova classe de efetores, denominada de Efetores TAL (*Transcription Activators-like*). Fazem parte dessa classe de proteínas diversos efetores de patógenos bacterianos que afetam pimentão, tomate, arroz dentre outros. Pelo menos AvrBs3 pode agir como fator de transcrição na planta promovendo virulência (Kay *et al*, 2007) ou resistência em não hospedeiros (Römer *et al*, 2007).

As proteínas PthA/AvrBs3 possuem uma estrutura de domínios semelhantes, composta por 3 regiões básicas: uma região N-terminal, um domínio central repetitivo e uma região C-terminal ácida (Figura 2). O membro mais estudado da família PthA/AvrBs3 é a proteína efetora AvrBs3 de *X. campestris* pv *vesicatoria*, bactéria que causa a “*bacterial spot disease*” em tomate e pimentão (Szurek *et al*, 2002). Essa proteína tem similaridade de aminoácidos que variam de 90-97% com as proteínas PthAs. A região N-terminal de AvrBs3 é essencial para a secreção através de TTSS, mas não para a indução de HR em não-hospedeiros (Büttner & Bonas, 2002). Sua região central consiste em 17,5 repetições *in tandem* de 34 aminoácidos (Figura 2), está envolvida na interação com DNA e pode estar implicada também em interações proteína-proteína (Gürlerbeck *et al*, 2005). As principais diferenças entre os membros dessa família estão justamente na região central da proteína, que pode conter de 5,5 a 28,5 repetições.

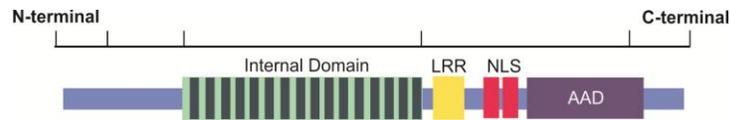


Figura 2 – Estrutura das proteínas da família *PthA/AvrBs3*. As principais diferenças estão no domínio interno, que pode conter de 5,5 a 28,5 repetições *in tandem* de 34 aminoácidos.

A proteína efetora AvrBs3 dimeriza-se no interior da célula hospedeira (Gurlebeck *et al*, 2005), através da região central e interage por meio de NLS com importinas da planta, sendo direcionada para o núcleo onde interage diretamente com promotores de genes-alvo, ativando genes envolvidos com o desenvolvimento de hiperplasia celular no caso de plantas susceptíveis (Kay *et al*, 2007) ou genes de resistência em plantas resistentes (Römer *et al*, 2007).

Foi demonstrado também que AvrBs3 pode se ligar com certa especificidade a uma região consenso localizado na região do TATA box, denominada de UpaBox (Kay *et al*, 2007). Esse box está presente em vários genes com expressão dependente de AvrBs3, os chamados genes *UPA* (*upregulated by AvrBs3*). Um desses genes é um tipo de fator de transcrição que, quando ativado por AvrBs3 em plantas susceptíveis, gera um fenótipo diretamente relacionado com hipertrofia tecidual.

AvrBs3 interage com o UpaBox nos promotores dos genes *upa20* e *bs3* próxima ao TATA box, (Kay *et al*, 2007; Römer *et al*, 2007) ativando esses genes, sendo que um deles, *upa20*, é um gene que codifica um fator de transcrição *basic helix-loop-helix* envolvido em hipertrofia celular em plantas susceptíveis (Kay *et al*, 2007). Em não hospedeiros, a ativação direta de *bs3* ativa uma cascata do tipo ETI de resistência, sendo esse um novo mecanismo de resposta imune da planta não-hospedeira, que também culmina em HR e, conseqüentemente, resistência à infecção (Römer *et al*, 2007).

Essa região consenso de ligação no DNA varia de acordo com pares de aminoácidos localizados no domínio central da proteína de seu domínio central (responsável pela interação com DNA), em que cada par de aminoácidos tem relação com uma base no DNA, formando uma espécie de código (Boch *et al*, 2009). Esse tipo de código foi validado também com efetores de *Xanthomonas oryzae* e é conservado em efetores da família AvrBs3/PthA (Moscou & Bogdanove, 2009).

Sendo assim, a elucidação desse código pode permitir a construção de proteínas ligadoras de uma sequência-alvo de um determinado gene R, dando origem a uma nova técnica de tratamento de doenças que afetam a agricultura (Römer *et al*, 2009).

Xac possui quatro variantes de PthA, sendo que elas diferem entre si principalmente no número de repetições do domínio central (Figura 3): *PthA1* possui 16,5 repetições, *PthA2* e *PthA3* possuem 15,5 repetições e *PthA4* possui 17,5 repetições (da Silva *et al*, 2002). A região C-terminal é composta por uma sequência rica em leucinas (LRR), dois NLS e um domínio ácido de transcrição (AD) (Figura 3). A região NLS de AvrBs3 interage com uma alfa-importina de pimentão, endereçando a proteína efetora para o núcleo (Szurek *et al*, 2001). Como demonstrado pelo nosso laboratório, todas as variantes de PthA interagem com uma alfa-importina de *C. sinensis* pelas seqüências NLS e LRR (Domingues *et al*, 2010). O restante da região C-terminal, composto por um domínio ácido de ativação transcricional (AAD), é necessário para a transativação de genes do hospedeiro (Szurek,2001).

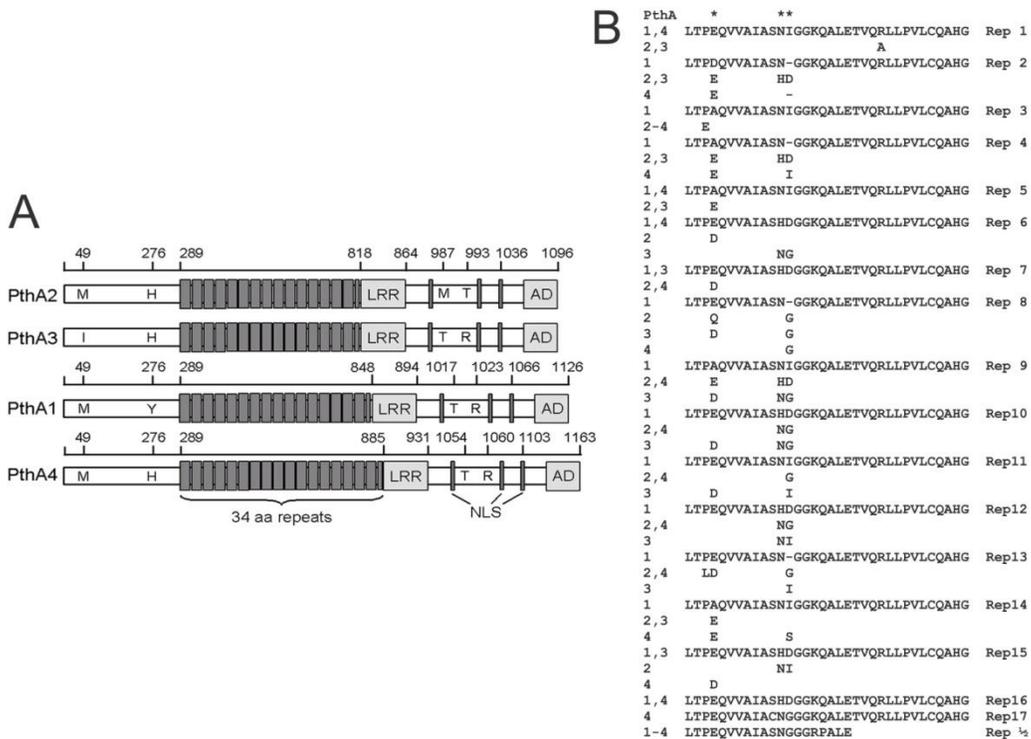


Figura 3 – Variantes de PthA de Xac. (A) Esquema dos domínios e polimorfismos das quatro variantes de PthA de Xac. As variantes PthA1 (16.5) e PthA4 (17.5) são maiores em tamanho sendo que PthA2 e PthA3 possuem o mesmo tamanho e o mesmo número de repetições do domínio interno (15.5). LRR indica a região rica em leucinas e AD o domínio ácido ativador da transcrição. **(B)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da região central repetitiva de 34 aminoácidos das quatro variantes de PthA e os polimorfismos existentes entre elas ao longo das repetições *in tandem*.

O contexto eucarioto de transcrição gênica que *PthA* pode estar envolvido como fator de transcrição compreende uma extensa e complexa maquinaria de regulação, composta por diversos tipos de proteínas e elementos cis-reguladores no DNA. Sendo assim, não é surpreendente que duas proteínas encontradas no screening de duplo-híbrido, como parceiros de interação de *PthA*, sejam proteínas diretamente relacionadas com o processo de transcrição gênica. A primeira delas, um membro do grupo de fatores de resposta à auxina (ARFs), é um fator de transcrição diretamente relacionado à sinalização desse hormônio *in planta*, podendo reprimir ou ativar genes específicos. A segunda é uma HMG (proteína do grupo de alta mobilidade) e que faz parte de uma família de proteínas arquiteturais ligadoras de DNA que facilitam o acesso de outros fatores ao próprio DNA. A elucidação do contexto funcional de interação dessas proteínas no desenvolvimento do cancro cítrico é o objetivo desse estudo.

1.4 Auxin Response Factor (ARF)

Os ARFs formam, em *A. thaliana*, uma família de fatores de transcrição de 23 proteínas sendo que todas elas possuem uma estrutura em comum de domínios conservados (Figura 4). Esses fatores de transcrição têm módulos envolvidos na ligação ao DNA, ativação/repressão da transcrição e na regulação gênica, como a extensa maioria de proteínas desse tipo. São fatores de transcrição envolvidos com a sinalização por auxina em plantas (Guilfoyle & Hagen, 2007).

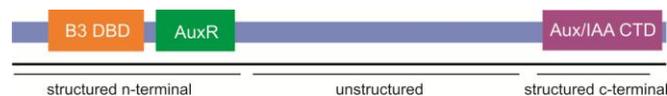


Figura 4 – Estrutura de domínios de proteínas do grupo das ARFs. A região N-terminal é formada pelo domínio de ligação ao DNA B3 e o domínio AuxR. Uma longa região predita como desestruturada liga o N-terminal ao domínio de dimerização proteína-proteína Aux/IAA CTD.

A região N-terminal possui um domínio de ligação ao DNA conhecido como domínio B3, semelhante ao encontrado na proteína Viviparous-1 de *A. thaliana*. Esse domínio está presente em vários fatores de transcrição e parece ser exclusivo de plantas superiores (Swaminathanm *et al*, 2008). Uma segunda região sem função definida, mas conservada em todos os ARFs, é definida como AuxR. Na região central encontra-se uma região aparentemente desestruturada, mas rica em determinados aminoácidos (Tiwari *et al*, 2003).

A região C-terminal consiste no domínio Aux/IAA CTD muito semelhante ao domínio de interação proteína-proteína encontrado nas proteínas Aux/IAA, mas sem os *motifs*-alvo de ubiquitinação I e II, sendo que as ARF possuem apenas os *motifs* III e IV não envolvidos na ubiquitinação (Guilfoyle & Hagen, 2007). Os ARFs são componentes essenciais na via de sinalização por auxina, descrita a seguir e esquematizada na Figura 5.

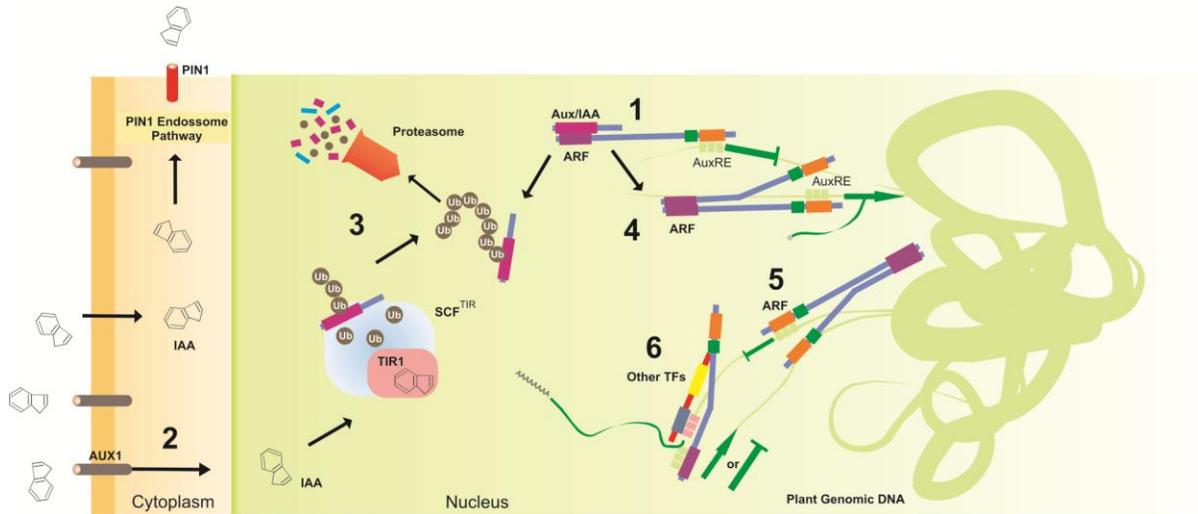


Figura 5 – Esquema da sinalização molecular por auxina. **1)** Na ausência de auxina as Aux/IAA estão interagindo com ARFs ligados em determinados promotores que podem conter um box AuxRE, bloqueando a expressão gênica. **2)** A auxina pode ser produzida endogenamente ou ser transportada célula a célula por AUX1 ou PIN1. **3)** Quando a auxina entra no núcleo, ela promove a formação do complexo SCF^{TIR1} que ubiquitina as Aux/IAA direcionando-as para degradação. **4)** Sem as Aux/IAA, os ARFs são liberados ativando a expressão gênica. **5)** Alternativamente, mesmo com auxina, alguns ARFs repressores podem bloquear a expressão gênica. **6)** A ativação da transcrição gênica pode também ocorrer de maneira auxina-independente, pela interação com outros fatores de transcrição. Nesse caso, pode ocorrer ativação ou repressão da expressão gênica.

A auxina é produzida por uma via dependente de triptofano no citoplasma das células e pode ser transportada ativamente para outras células de maneira coordenada e polar através da via de endossomos PIN1 (Teale *et al*, 2006). No citoplasma, a auxina passa pelos poros nucleares passivamente e entra em contato com um complexo hormônio receptor, o primeiro desse tipo a ser caracterizado, conhecido como SCF^{TIR1}. A auxina interage com TIR1 (como um adesivo molecular), aumentando sua afinidade por outras proteínas conhecidas como Aux/IAA. Esse aumento de afinidade recruta o restante do complexo, que adiciona cadeias de ubiquitinas K-48 a resíduos presentes nos *motifs* I e II das proteínas Aux/IAA (Tan *et al*, 2007), que são direcionadas para o proteossomo e degradadas (Dharmasiri & Estelle, 2004).

Essas proteínas Aux/IAA contêm um potente domínio de repressão transcricional (Ulmasov *et al*, 1997) e interagem com fatores de transcrição denominados fatores de resposta à auxina (ARF) de forma auxina-independente (Guilfoyle & Hagen, 2007). Na presença de auxina, as Aux/IAA são degradadas (Rogg *et*

al, 2001), liberando os ARFs que podem ativar a expressão gênica de genes sensíveis à auxina (Abel & Theologis, 2006). Em *A. thaliana* as Aux/IAA formam uma grande família de potentes repressores (Tiwari *et al*, 2004) caracterizada por conter um domínio conservado de interação proteína-proteína chamado de domínio de dimerização Aux/IAA. As proteínas dessa família podem formar múltiplas interações entre si (com certa especificidade) e com os ARFs que também possuem o mesmo domínio de interação (Kim *et al*, 1997). Como as proteínas Aux/IAA, os ARFs também formam uma extensa família de proteínas com diferentes características que podem interagir, além das proteínas Aux/IAA, também entre si (Li *et al*, 2004). Acredita-se que essa multiplicidade de possibilidades de interações esteja envolvida na fina regulação hormonal por auxina durante todo o desenvolvimento da planta (Weijers *et al*, 2005). Além disso, outras proteínas podem estar envolvidas com essa regulação estabelecendo complexos estáveis no DNA, através da interação proteína-proteína com ARFs, como no caso do fator MYB77 (Shin *et al*, 2007). Isso aumenta muito a possibilidade de parceiros e a complexidade da regulação gênica.

Análises de mutantes dos genes tanto da família Aux/IAA (Wang *et al*, 2005 ; Fukaki *et al*, 2006) quanto ARF (Harper *et al*, 2000 ; Tian *et al*, 2004 ; Okushima *et al*, 2005) revelaram que esses mutantes possuem efeitos drásticos no desenvolvimento, porém com certo padrão nos fenótipos dependendo da classe dos genes mutados, revelando envolvimento distintos e independentes (Liscum *et al*, 2002).

AtARF2 é o ARF mais abundante em *A. thaliana*, sendo encontrado desde raízes até folhas e frutos (Ulmasov *et al*, 1999). É um regulador importante no desenvolvimento, como em flores, senescência (Ellis *et al*, 2005) e fenótipos associados à mutantes no gene *arf2* tem hipersensibilidade à auxina e defeitos pleiotrópicos graves (Okushima *et al*, 2005), com o aumento no tamanho de sementes e ramos (hipertrofia e hiperplasia) (Schruff *et al*, 2005). Análises de transcriptoma desses mutantes apontam mudanças na expressão de vários genes envolvidos em regulação de crescimento celular e remodelamento, como expansinas, regulação de outros importantes hormônios e supressão de defesa (Okushima *et al*, 2005), semelhante ao observado em análises de transcrição gênica de plantas de citros infectadas por Xac (Cernadas *et al*, 2008). *PthA* pode contribuir, através da interação com *CsARF*, para que a planta fique mais sensível à própria auxina endógena como forma de patogenicidade, como o observado em ensaios de lesões *in planta* na presença de 2,4-D (Cernadas & Benedetti, 2009). *AtARF2* é também um regulador chave na

comunicação entre as sinalizações por brassinoesteróides sendo alvo de regulação por fosforilação (Vert *et al*, 2008).

Foi demonstrado que os ARFs são capazes de ligar especificamente uma região consenso, obtida através de análises de mutagênese dirigida, do promotor do gene *gh3* de soja, precocemente ativado por auxinas (Ulmasov *et al*, 1995). Seleções mutacionais nessa região promotora permitiram o mapeamento da mínima região de DNA ligadora (Ulmasov *et al*, 1997b) que foi chamada de AuxRE box e consiste na seqüência TGTCTC (ou GAGACA) (Ulmasov *et al*, 1995). ARFs foram capazes de ligar *in vitro* e de ativar ou reprimir *in vivo* genes repórteres sob o controle de um promotor mínimo 35S e repetições *in tandem* variadas do AuxRE *upstream* ao promotor mínimo (Ulmasov *et al*, 1999). Essas construções repórteres são de extrema sensibilidade à auxina e constituem excelentes marcadores artificiais da ação da auxina em tecidos vegetais (Hagen & Guilfoyle, 2002). Recentemente foi descrita a primeira interação *in vivo* de um ARF (MONOPTEROS) com seu alvo no promotor do gene *Dornröschen* no desenvolvimento do cotilédone de *A. thaliana* (Cole *et al*, 2009).

1.4.1 Hormônios Vegetais e Patógenos

Vários sintomas de doenças vegetais como excessivo crescimento celular e tumores têm sido associados, desde o século 19, com níveis perturbados de hormônios vegetais. Técnicas bioquímicas possibilitaram o isolamento de hormônios vegetais de crescimento produzidos por bactérias e fungos. Um tipo de giberelina, o ácido giberélico (GA), por exemplo, foi encontrado inicialmente em um fungo patogênico para depois ser identificado em plantas (Robert-Seilaniantz *et al*, 2007).

Muitos hormônios vegetais, como auxinas e citocininas, são produzidos em condição de infecção por vários patógenos virulentos, sugerindo uma interessante relação entre hormônios e o crescimento descontrolado do tecido vegetal quando infectado.

Como forma de defesa, principalmente em ETI, as plantas também utilizam moléculas sinalizadoras, como os hormônios ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), e etileno (ET). O papel desses hormônios na aquisição de resistência e defesa contra patógenos é muito estudado (Jones & Dangl, 2006). Um dos modelos mais usados para entender essa situação é o sistema *A. thaliana* e a bactéria PstDC3000. A

virulência dessa bactéria é dependente de coronatina, um mímico de JA produzido pela própria bactéria que consegue induzir sistematicamente vários genes da biossíntese de auxinas e ácido abscísico (ABA) na planta. De fato, quando a sinalização por auxinas está ativada, *A. thaliana* se torna muito mais susceptível à PstDC3000 e quando essa via hormonal está inibida através de microRNAs há um aumento considerável da resistência também contra outras bactérias. A aplicação prévia da forma artificial de uma auxina, o 2,4-D, aumentou os sintomas cloróticos, mas sem afetar o crescimento de PstDC3000 (Robert-Seilaniantz *et al*, 2007).

Estudos recentes mostram que a ativação da via de sinalização por auxinas está associada ao desenvolvimento de doenças em plantas (Ding *et al*, 2008 ; Domingo *et al*, 2009 ; Navarro *et al*, 2006 ; Wang *et al*, 2007). Em trabalho recentemente publicado por nosso grupo (Cernadas & Benedetti, 2009), verificou-se que a auxina é necessária para o desenvolvimento do cancro cítrico. Esses dados são corroborados por dados ainda não publicados do nosso grupo que mostram que PthAs de Xaa reprimem a via de sinalização de auxinas em laranja doce (dados não publicados). Além disso, vários genes regulados pela infecção também são regulados por auxinas, como genes de remodelamento de parede celular, sugerindo um *cross-talk* entre as vias de sinalização do patógeno e vias hormonais do hospedeiro. Se isso ocorre diretamente pelos efetores tipo III ou não, ou se essa alteração envolve proteínas da própria planta hospedeira relacionadas com a auxina em nível molecular ainda é uma questão a ser respondida.

1.5 *High Mobility Group (HMG)*

As HMGs são a segunda classe mais abundante de proteínas cromossomais ligadoras de DNA conhecidas, sendo menos abundantes apenas que as histonas. Essas proteínas são subdivididas, em mamíferos, de acordo com características da estrutura primária em três grupos distintos (Grasser *et al*, 2007): HMGA (formalmente HMGI/Y), HMGB (formalmente HMG1/2) e HMGN (formalmente HMG14/17). O primeiro grupo constitui uma família de proteínas que contem motifs de ligação a sequências ricas em AT (*AT-hook sequences*) (Webster *et al*, 2001). Os membros do grupo HMGB contém pelo menos um *box* conservado chamado de HMG-Box (Stros *et al*, 2007). Finalmente, o último grupo é caracterizado por ter um domínio de ligação a nucleossomos. Em plantas, o grupo HMGN é ausente e não há evidências, pelo menos

nos genomas disponíveis atualmente, de que plantas tenham proteínas dessa subfamília (Launholt *et al*, 2006).

Essas proteínas têm como função quebrar a barreira de rigidez do DNA para promover a formação de complexos nucleoprotéicos. Uma vez que o reconhecimento das HMG pelo DNA não é seqüência-específico, acredita-se que a presença de outros fatores é necessária para determinar a especificidade da ligação à certas regiões do DNA (Grasser *et al*, 2007). A característica de ligar DNA das proteínas que têm pelo menos um domínio HMG box é bem descrita (Stros *et al*, 2007) sendo que membros da família HMGB1 tem alta afinidade por formas aberrantes de DNA como minicírculos e *four-ways junctions* (Grasser *et al*, 2006). Algumas proteínas dessa família, no entanto, não ligam DNA e sua função permanece desconhecida (Grasser *et al*, 2006).

Os domínios HMG-box (responsáveis pela interação com DNA) são bem conservados e várias estruturas tridimensionais desse domínio em mamíferos já foram resolvidas. Ele é constituído por aproximadamente 75 aminoácidos formando 3 alfa-hélices, que se dispõem em formato de L, em ângulo de 80° (Stros *et al*, 2007). Esse domínio em eucariotos pode ser dividido em A e B e é capaz de ligar DNA linear (A) ou aberrante (B) (Launholt *et al*, 2006).

Dependendo da espécie de planta, um ou dois genes *hmga* estão presentes no genoma, enquanto várias proteínas HMGB são codificadas em genomas de plantas. As proteínas dessa família, que têm entre 13 e 27kDa, são diferentes daquelas encontradas em mamíferos, sendo que todas têm somente um HMG-box central, flanqueado por um N-terminal básico exclusivo de plantas e podendo conter ou não uma região C-terminal ácida, que pode variar de tamanho (Stros *et al*, 2007). Até o momento, a maioria das HMGB de plantas foi caracterizada como sendo proteínas envolvidas em remodelamento de cromatina e que ligam DNA de forma inespecífica, com alta afinidade por formas aberrantes, como minicírculos e *four-way junctions* (Grasser *et al*, 2006). O nível de expressão de *AtHMGB1* tem enormes efeitos no transcriptoma da célula, influenciando entre outras características, o crescimento celular (Lilballe *et al*, 2008).

A proteína *AtHMGB1* localiza-se no núcleo, mais precisamente em *speckles* nucleares (Launholt *et al*, 2006). *AvrBs3* também localiza-se no núcleo celular, de maneira bem semelhante aos mesmos *speckles* (Kay *et al*, 2007). Ensaios de localização com GFP em *Nicotiana benthamiana* de *PthA* também indicam a

mesma localização (Domingues *et al*, 2010). Essas regiões são normalmente atribuídas à presença de fatores de transcrição e a complexos envolvidos na transcrição e regulação gênica em regiões muito ativas do DNA, com a presença de proteínas ligadoras de RNA e DNA (Handweger & Gall, 2006).

2. Objetivos e Justificativa

A proposta desse trabalho foi caracterizar as novas interações protéicas entre a proteína PthA de Xac e as proteínas ligadoras de DNA CsARF e CsHMG de laranja doce (*Citrus sinensis*), identificadas em ensaio de *screening* de duplo-híbrido e verificar a interferência dessas interações na transcrição gênica mediada por proteínas do próprio hospedeiro no desenvolvimento do cancro cítrico. Para isso foram utilizadas diversas abordagens para a caracterização dessas interações tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além de tentativas de contextualizar as interações e verificar a relevância biológica das mesmas.

Diversos estudos mostram que membros da família PthA/AvrBS3 atuam como fatores de transcrição e alteraram o padrão transcricional da planta em benefício do patógeno, entretanto o mecanismo molecular pelo qual essas proteínas funcionam não está inteiramente claro. A análise das interações encontradas entre a proteína XcPthA e fatores de transcrição como CsARF e CsHMG poderão auxiliar no entendimento da patogenicidade de Xac em citros. A caracterização da interferência direta de uma proteína bacteriana de um patógeno na transcrição gênica através da própria maquinaria do hospedeiro pode abrir a nova perspectiva de interferência humana não só no caso de citros, mas de outras espécies vegetais afetadas por patógenos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Clonagem

As técnicas gerais de biologia molecular foram realizadas de acordo com (Sambrook & Russel, 2001). Todas as construções obtidas foram confirmadas por seqüenciamento de DNA. A Tabela 1 mostra todos os oligonucleotídeos usados nas clonagens e seqüenciamentos abaixo descritos.

Tabela 1 – Relação da seqüência 5'3' dos oligonucleotídeos usados na clonagem e sequenciamento das construções utilizadas.

Nome	Seqüência 5'3'	Uso
HMGF	CAT ATG AAG GTT ACC AGG GGC	Clonagem
HMGR	GCG GCC GCT CCT GAA TCT AGT C	Clonagem
HMGBOXF	CATATGAAGAGGCCCTTCTAGTGC	Clonagem
HMGBOXR	GCGGCCGCTAGTTGTATGCTGTCATCAGC	Clonagem
ARFF	CAG AGG TGC ATA TGA AGT CTT GTA AC	Clonagem
ARFR	GCG GCC GCA ACA AAA CCT TGA ACC	Clonagem
ARF1	CGC AGT GTC ATA TGA CTA GGA GTT G	Clonagem
ARF2	CAT ATG TTG CCC TCA TCA CCT GAC	Clonagem
PthAIDF	CGG GAT CCC CCA TGA ACC TGA CCC	Clonagem
PthAIDR	GAG CTC GAG ATT ACT GGG CAA CAA TGC T	Clonagem
pOADF	CAG GAT GTT TAA TAC CAC TAC AAT G	Sequenciamento
pOBDF	CGG AAG AGA GTA GTA ACA AAG GTC	Sequenciamento
pOAD/BDR	GTT GAA GTG AAC TTG CGG GG	Sequenciamento
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Sequenciamento
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA	Sequenciamento
pGEX/YEXF	CCA GCA AGT ATA TAG CAT GG	Sequenciamento

3.1.1 CsHMG

A construção correspondente a ORF inteira de *C. sinensis* (DR909165.1 - GenBank) foi obtida através de PCR utilizando os oligonucleotídeos HMGF e HMGR, e como *template* cDNA total de folhas de *C. sinensis*. O produto de PCR obtido de aproximadamente 500bp foi clonado em pGEM-T-Easy (Promega) e então digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *NotI*. O fragmento liberado foi purificado e ligado nos plasmídeos pOAD e pET28a (Novagen), previamente digeridos com as mesmas enzimas. Células de *Escherichia coli* DH5 α competentes foram transformadas por choque térmico ou eletroporação. As colônias transformantes foram selecionadas por PCR de colônia usando os mesmos oligonucleotídeos HMGF e HMGR. Após confirmação da clonagem em pOAD, o plasmídeo obtido foi digerido com *Sall* e *NotI* e o inserto obtido foi então clonado em pGEX4T-1 (GE HealthCare).

3.1.1.1. Truncagens de CsHMG

Formas truncadas de CsHMG foram obtidas através da amplificação por PCR da construção *full-length* clonada em pET28a. Para a construção sem o N-terminal (CsHMG Δ N) foram usados os oligonucleotídeos HMGBOXF (flanqueando o domínio central HMG-BOX) e HMGR. A construção contendo somente o domínio HMG BOX foi obtida através da amplificação com os oligonucleotídeos HMGBOXF e HMGBOXR. Uma última construção, sem o C-terminal, foi obtida com os oligonucleotídeos HMGF e HMGBOXR. Todas as construções foram clonadas no vetor pET28a nos sítios *NdeI* e *NotI*, sendo assim, em todas as construções, a cauda de polihistidina está no N-terminal da proteína.

3.1.2 CsARF

Para a amplificação da ORF inteira CsARF (*full-length*) foi inicialmente proposta uma abordagem que envolveria a técnica 5'RACE (*5' Rapid Amplification of cDNA Ends*). Porém foi possível construir um *contig in silico* usando os ESTs de *C. sinensis* (CB290624, CX5416 e CD575895 – Biblioteca CltEST). Dessa maneira, foram desenhados os oligonucleotídeos ARFF e ARFR e realizada uma reação de PCR usando como *template* o cDNA total de *C. sinensis*. Foi obtido um produto único na amplificação com tamanho correspondente de aproximadamente 2,5Kb. O produto de PCR foi clonado em pGEM-T-Easy (Promega), digerido com as enzimas *NdeI* e *NotI* e ligados em pOAD (doado pelo Prof. Shaker C. Farah – USP) e pET28a (Novagen) previamente digeridos com as mesmas enzimas. A construção pOAD-CsARF foi digerida com *Sall* e *PstI*, subclonada no vetor pBluescript SK+ (Stratagene), novamente digerida com *NdeI* e *XbaI* e inserida no vetor pT7SUP23 (doado pelo Dr. Nilson Zanchin) para futuros testes de expressão *in vitro* usando reticulócitos de coelho.

A obtenção das formas truncadas CsARF Δ N₍₁₋₇₀₈₎ e CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ foram obtidas por PCR com o uso dos pares de oligonucleotídeos ARF1 e ARFR, ARF2 e ARFR, respectivamente. Os produtos foram clonados em pGEM-T-Easy, digeridos com *NdeI* e *NotI* e ligados em pOAD.

Algumas formas truncadas de CsARF foram obtidas por digestões específicas da construção *full-length* pOAD-CsARF. Foi realizada uma digestão com as enzimas *NsiI* e *PstI* liberando um produto único de digestão de aproximadamente 1,7Kb. O plasmídeo foi então religado originando a construção CsARF Δ C₍₂₃₈₋

⁸³⁵) e o produto da digestão foi subclonado em pOAD previamente digerido com *PstI*, dando origem à forma truncada CsARFΔN₍₁₋₃₉₁₎. Essa construção foi novamente digerida com a enzima *EcoRI*. O fragmento obtido, de aproximadamente 300bp, foi subclonado em pOAD digerido com *EcoRI*, originando finalmente a construção CsARFMR₍₂₄₁₋₄₃₈₎.

Para a obtenção da construção CsARF no vetor pCDNA-FLAG (INVITROGEN), o vetor pOAD-ARF foi digerido com as enzimas *Sall* e *NotI* e subclonado no vetor pET28a. Uma nova subclonagem foi feita através da digestão com os enzimas *BamHI* e *NotI* finalmente para o vetor pCDNA-FLAG, gerando uma construção com o cDNA do epítopo FLAG na porção 5' do cDNA correspondente à ARF inteira de citros.

3.1.3 Domínios Internos de PthA

Para a obtenção do domínio interno repetitivo de PthA foram desenhados os oligonucleotídeos PthAIDF e PthAIDR, flanqueando o domínio em questão. Como *template* para reação de PCR foram utilizados separadamente as construções disponíveis pOBD-PthAΔN1 (16,5 repetições), pOBD-PthAΔN3 (15,5 repetições) e pOBD-PthAΔN4 (17,5 repetições). Os três fragmentos obtidos foram clonados em pGEM-T-Easy e então digeridos com as enzimas *BamHI* e *SacI*. Os fragmentos liberados, ao redor de 1,6Kb, correspondentes foram subclonados em pET28a e então novamente digeridos com *NdeI* e *NotII*. Os fragmentos resultantes foram finalmente subclonados em pOAD e pOBD para a geração dos clones PthAΔNΔC16,5; PthAΔNΔC15,5; PthAΔNΔC17,5.

3.1.4 Demais Construções

Foram utilizadas construções previamente disponíveis ou que foram preparadas paralelamente por outros membros de nosso laboratório. Nesse grupo estão as construções das formas truncadas e inteiras das quatro variantes de PthA em pET28a e pOBD, sendo elas: PthA1,2,3 e 4; PthAC; PthAΔN1, 2, 3 e 4; XcPthΔN5,5 e PthALRR.

3.2 Duplo-híbrido de Leveduras

3.2.1 Transformação

A linhagem de levedura PJ694-a (MATa *trp1* – 901 *leu* 2-3, 112 *ura* 3-52 *his3*-200 gal 4Δ gal 80Δ *LYS2*:: *GAL1* – *HIS3* *GAL2* – *ADE2* *met2* :: *GAL7* – *LacZ*) foi crescida em meio YPAD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% de D-glicose; 0,003% adenina) à 30°C (250 rpm) até OD₆₀₀ 0.7 e então procedeu-se à transformação das leveduras com o plasmídeo pOBD contendo a construção de interesse pelo método PEG3350-acetato de lítio como descrito em (Gietz & Woods, 2002). As leveduras foram então plaqueadas em meio seletivo SC–W (0,66% base nitrogenada sem aminoácidos; 2% glicose; 0,008% adenina; 0,008% histidina; 0,008% leucina; 2% Bacto-ágar). Após confirmação da transformação as leveduras foram novamente crescidas e procedeu-se à nova transformação com os plasmídeo pOAD de interesse. As leveduras foram novamente plaqueadas e somente aquelas capazes de crescer em meio seletivo SC –W–L foram selecionadas para a análise dos genes repórteres.

3.2.2 Ativação de genes repórteres *ade2* e *his3*

As colônias duplo-transformantes selecionadas pelos marcadores auxotróficos foram plaqueadas em meio SC –W –L –H por 3-4 dias (30°C) e novamente plaqueadas em meio seletivo SC –W –L–H –Adenina contendo 0mM, 3mM e 5mM de 3-AT por 3-4 dias (30°C), para o teste de ativação dos genes repórteres *ade2* e *his3*.

3.3 Expressão e Purificação

Todas as construções (em pET28a ou pGEX4T-1) para expressão heteróloga em *E. coli* foram inseridas na cepa BL21(DE3) por choque-térmico ou eletroporação e plaqueadas em meio LB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio pH7,0) sólido contendo o antibiótico apropriado para seleção. O pré-inóculo em meio líquido LB ou TB (12 g/L triptona; 24 g/L extrato levedura; 0,72M fosfato de potássio dibásico; 0,17M fosfato de potássio monobásico 0,4% Glicerol) foi preparado com as colônias transformantes selecionadas e crescido por 16h à 37°C e 200 rpm. A melhor condição para crescimento do inóculo, indução, lise e etapas de purificação estão indicadas abaixo, conforme cada caso. Quando necessário, a concentração de proteína foi determinada pela medida da absorbância a 280nm

(usando o coeficiente de extinção molar específico obtido pelo algoritmo *ProtParam*) ou pelo método de BCA, de acordo com as normas do fabricante (Thompson Scientific).

3.3.1 6xHis-CsHMG

O inóculo contendo o plasmídeo pET28a-CsHMG foi crescido em meio LB/TB contendo canamicina (50 µg/mL) até $OD_{600}=0.6$ a 37°C e 200 rpm. A indução foi feita pela adição de 0,4 mM IPTG, sendo que no caso de indução em meio LB foi por 3 horas e no caso de meio TB foi feita por 20 horas. Após a indução as células foram centrifugadas por 20 minutos, 5000 rpm e 4°C. As células foram então congeladas e ressuspendidas em tampão de lise (PBS - 140mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄; pH 7,4) com o coquetel de inibidores de protease *CompleteMini* (Roche). Foi então adicionado 0,2 µL/mL de Nonidet-P40, lisozima (1 mg/mL) e DNase I (0,1 U), as células foram incubadas no gelo por 30 minutos e então procedeu-se 20 pulsos de sonicação (Branson Sonifier 450) de 10 segundos com intervalos de 20 segundos. O lisado celular foi centrifugado à 20.000 x g por 30 minutos (4°C) para separação das frações solúveis e insolúveis. O lisado foi filtrado em filtro de 0,45 µm e submetido às etapas de purificação.

A primeira etapa para a purificação de 6xHis CsHMG consistiu em uma cromatografia de afinidade utilizando colunas *Hi-Trap* (GE Healthcare) em FPLC (Äkta - GE Healthcare). A coluna foi lavada com tampão de lavagem PBS + (10 mM β-mercaptoetanol; 15 mM imidazol) e eluída em tampão (Tris-HCl pH8,0; 10mM β-mercaptoetanol) por gradiente crescente de imidazol (0-500 mM). As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE e então dialisadas em tampão fosfato 20 mM; 50 mM NaCl; pH6,6. Procedeu-se então à etapa seguinte de purificação por cromatografia de troca iônica usando a coluna aniônica MonoQ (Pharmacia) e os tampões A (fosfato 20 mM; NaCl 50 mM) e B (fosfato 20 mM; NaCl 1M) e novamente dialisadas em tampão fosfato 20 mM; 50 mM NaCl; pH6,6 . Aproximadamente 2 mg/mL foram liofilizados e enviados para a produção de anticorpos policlonais a fim de serem utilizados em futuros experimentos e detecções.

3.3.2 GST-CsHMG

Diversas condições foram testadas para que houvesse expressão significativa da proteína CsHMG fusionada com GST (pGEX4T-1). A melhor condição obtida consistiu do crescimento do inóculo em LB

acrescido de ampicilina (100µg/mL) a 37°C até $OD_{600}=0.6$ e indução com 0,4mM IPTG por 4 horas a 30°C e 200 rpm. As células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBS + 1mM DTT e incubadas por 30 minutos no gelo, sonicadas e as frações solúveis e insolúveis foram colhidas para análise em SDS-PAGE. Apenas a fração solúvel foi utilizada nos ensaios de GST-pulldown.

3.3.3 Expressão e Purificação das formas truncadas 6xhis-HMGΔN, HMGΔNΔC e HMGΔC

As formas truncadas de HMG foram expressas e purificadas conforme 3.3.1. Porém para a forma 6xHis-HMGΔNΔC a etapa de troca-iônica foi realizada com a coluna catiônica Mono-S HR (Pharmacia).

3.3.4 6xHis-CsARFΔN₍₁₋₂₅₇₎

O inóculo foi crescido à temperatura de 30°C até OD_{600} 0.4 e induzido com 1 mM IPTG por 4 horas. As células foram centrifugadas 5000 rpm 4°C por 20 minutos e congeladas. As células foram ressuspensas em tampão (20 mM TRIS-HCL pH 8,0; 5 mM imidazol; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5 mM DTT), adicionou-se lisozima em concentração final de 1mg/mL e as células foram incubadas no gelo por 30 minutos. Foram realizados pulsos no sonicador de 10s com intervalos de 10s , por 3 minutos, e o lisado foi centrifugado por 30 minutos à 20.000 x g (4°C). A fração solúvel foi filtrada e utilizada para uma etapa de purificação por cromatografia de afinidade com a resina TALON (Clontech). A resina foi equilibrada em tampão de lavagem (20 mM TRIS-HCl pH 8,0; 15mM imidazol; 150mM NaCl; 1mM PMSF, 20% glicerol e 0,5mM DTT), incubada com a fração solúvel obtida e lavada com 20 volumes de coluna com o tampão de lavagem. A proteína de interesse foi eluída com 1 volume de coluna com o tampão 20 mM TRIS-HCl pH 8,0 contendo 100 mM imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5 mM DTT) e dialisada para o tampão 20 mM TRIS-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl. Além de análises por SDS-PAGE a concentração da proteína foi medida por absorbância a 280nm. A correta produção da proteína recombinante foi confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF. Aproximadamente 2mg/mL de 6xhis-CsARFΔN₍₁₋₂₅₇₎ foi liofilizada e enviada para a produção de anticorpos policlonais e será utilizada em futuras detecções e experimentos.

3.3.5 GST-CsARFΔN₍₁₋₂₅₇₎

Suspensões de *E. coli* transformadas com a construção GST-CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ foram crescidas a 37°C até OD₆₀₀ 0,4 induzidas com 0,4 mM IPTG por 4 horas, centrifugadas 5000 rpm 4°C por 20 minutos e congeladas. As células foram então ressuspensas em tampão PBS + 1 mM DTT foi adicionada lisozima e incubadas no gelo por 30 minutos. O lisado foi submetido a pulsos no sonificador de 10s com intervalos de 10s e centrifugado por 30 minutos à 20.000 x g (4°C). A fração solúvel foi filtrada (filtro 0,45µm) e utilizada para os ensaios de GST *pulldown*.

3.3.6 Expressão de FLAG-CsARF através de reticulócitos

A expressão da proteína *full-length* foi realizada através de transcrição e tradução *in vitro*, uma vez que tentativas de produção da proteína em *E. coli* não foram bem sucedidas. O sistema utilizado foi o TNT® *Coupled Rabbit Reticulocyte System* (PROMEGA) e a expressão foi feita de acordo com as orientações do fabricante, em reações de 1h30min em um total de 50 µL ou 25 µL de reação total. O produto dessa reação foi utilizado para as reações de EMSA descritas a seguir.

3.3.7 6xhis-PthA Δ N Δ C

A expressão das três construções do domínio interno de PthA foi realizada com os os mesmos procedimentos usados para expressão e purificação das outras construções já disponíveis em nosso laboratório como descrito em 3.3.6.1.

3.3.8 Demais Proteínas

A expressão e purificação de todas as construções utilizadas nesse estudo envolvendo PthA foi efetuada de acordo com protocolos e otimizações feitas por outros membros de nosso grupo. Todas as formas truncadas de PthA foram expressas em *E. coli* de acordo com o protocolo descrito abaixo:

3.3.8.1 Expressão e Purificação das formas truncadas e inteiras de PthA.

O inóculo foi crescido a 25°C em meio LB suplementado com canamicina até OD₆₀₀=0,6 e induzido com 0,4 mM IPTG por 3 horas. As células foram coletadas, congeladas e ressuspensas em tampão A (20

mM TRIS-HCL pH 8,0; 5 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5 mM DTT). Foi adicionada lisozima por 30 minutos no gelo e a suspensão foi sonicada e centrifugada à 20.000 x g para coleta da fração solúvel. O extrato foi filtrado e carregado em coluna de Ni-NTA. Após a passagem do extrato solúvel a resina foi lavada com 20 volumes de coluna, com o tampão B (20 mM TRIS-HCl pH 8,0; 15 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5mM DTT) e eluída com um volume de coluna com o tampão C (20 mM TRIS-HCl pH 8,0; 100 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5 mM DTT) em 5 frações distintas. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE para confirmar o sucesso da purificação.

3.4 GST pulldown

A resina *GST-Fastflow* (GE-Healthcare) foi lavada 3 vezes com 4 volumes de coluna de água e equilibrada com tampão PBS +1mM DTT. A fração solúvel da proteína fusionada à cauda de GST foi incubada por 1 hora e 30 minutos (4°C). A resina foi lavada 4 vezes com 10 volumes de coluna com o mesmo tampão e novamente incubada com frações purificadas das proteínas fusionadas à cauda 6xhis por 3 horas (4°C). A resina foi novamente lavada por 7 vezes com 10 volumes de coluna. As proteínas foram então eluídas com tampão de eluição (20 mM Tris-HCl; pH8,0) contendo 12 mg/mL de glutatona reduzida (Sigma) e analisadas por SDS-PAGE e *Western Blot*.

3.4.1 Western Blot

As proteínas separadas em gel de SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana PVDF (Milipore) em tampão de transferência (48 mM de Tris-base; 39 mM de glicina; 0,037% de SDS e 20% de metanol) por 1 hora (350 mA). A membrana foi então incubada em solução bloqueadora TBS(20 mM de Tris-base; 150 mM de NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5) + 5% de leite por 1 hora e incubadas com diluições específicas dos anticorpos primários utilizados: Anti-GST (Assman *et al*, 2001) 1:5 e Anti-PthA 1:5000, também por uma hora. A membrana foi lavada com tampão TBS e incubada com os anticorpos secundários *Anti-Rabbit* ou *Anti-Mouse* (GE-HealthCare) e novamente lavada com tampão TBS. A detecção foi realizada com o kit ECL Fast Blotting Analysis System (GE-HealthCare) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5 Clonagem da Região 5' UTR do Gene CsEXP

A estratégia utilizada para o isolamento do provável promotor do gene de uma expansina (CsEXP) consistiu na modificação da técnica de 5'RACE. Foram construídos dois oligonucleotídeos reversos (EXPR1 e EXPR2) localizados perto da extremidade 5' do maior EST anotado no banco de dados. Membros do laboratório construíram bibliotecas genômicas de *C. sinensis* digeridas com as enzimas de restrição *NlaIII* e *SphI* ligadas em ambas as extremidades com o adaptador Nested A. As duas bibliotecas foram utilizadas como *templates* separadamente para a realização de um primeiro ciclo de PCR envolvendo os oligonucleotídeos NESTEDA e EXPR1. Os produtos de PCR purificados na região entre 800kb e 3Kb e não purificados foram utilizados como *templates* separadamente na segunda reação de PCR envolvendo os oligonucleotídeos EXPR2 e NESTEDA. Alternativamente, para o aumento da eficiência e especificidade da reação o oligonucleotídeo NESTEDA era adicionado somente após 8 ciclos de PCR contendo apenas EXPR2. Os produtos de PCR obtidos foram purificados separadamente e clonados em sistema pGEM-T-Easy para seqüenciamento e análise dos dados obtidos. Os oligos utilizados para esse procedimento estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados no isolamento dos promotores de citros.

Nome	Oligonucleotídeos - Sequência 5' 3'
EXPR1	GCC ATA CCC ACA AGC ACC ACC C
EXPR2	GCC ACC CAC CAC CAT AGT CTC C
CP450R1	CTC TGG GCA TGT TCT TCA AGC C
CP450R2	CCG CAT AGA GCC TAT GTG ACC C
NESTEDA	GAT CTG CAC CAG AAT TCC ATG

3.5.1 CsEXP

Como citado acima, duas bibliotecas foram utilizadas como *template* para a realização dos experimentos. No caso de CsEXP, a utilização de ambas as bibliotecas tiveram resultados semelhantes e satisfatórios. Porém o clone encontrado foi amplificado à partir da biblioteca *NlaIII*. A primeira etapa de amplificação consistiu em 35 ciclos de PCR sendo o melhor ciclo composto por uma etapa de desnaturação de 95°C, anelamento de 57°C e alongamento de 72°C. A segunda etapa consistiu de primeiros 8 ciclos idênticos ao primeiro e mais 35 ciclos após a adição de EXPR2. Os produtos de amplificação decorrentes, compostos por fragmentos que variavam de 150bp-600bp foram clonados em pGEM-T-Easy e seqüenciados.

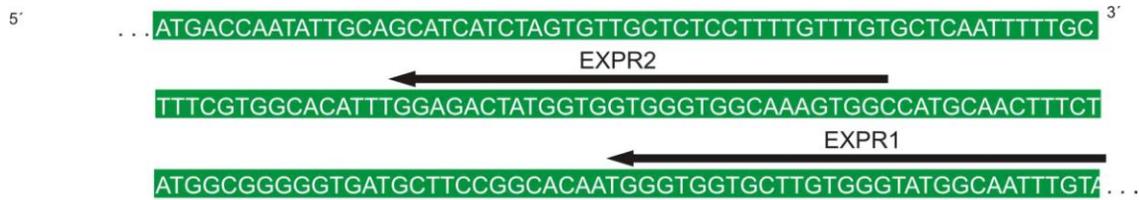


Figura 6 – Esquema representando os oligonucleotídeos utilizados no isolamento da região 5'UTR de CsEXP. Oligonucleotídeos reversos foram desenhados em duas regiões da ORF de CsEXP para amplificação da região 5'UTR não anotada. Reações de PCR foram realizadas usando como template bibliotecas genômicas digeridas e ligadas ao adaptador NESTEDA primeiramente com EXPR1 e NESTEDA. O produto de amplificação dessa reação foi utilizado como template para um segundo ciclo de amplificação com NESTEDA e EXPR2. Os produtos dessa amplificação foram clonados em pGEM e seqüenciados.

3.5.2 EMSA com CsARF

As reações de *binding* foram realizadas com o tampão de ligação (20 mM HEPES-KOH 50 mM KCl 16% glicerol pH 7.9) utilizando as sondas marcadas com α -ATP através de preenchimento com o fragmento *klenow* da DNA polimerase. Os produtos da transcrição/tradução *in vitro* nos volumes indicados foram utilizados juntamente com o DNA competidor (*nonsense*) para formar o total da ligação. As reações foram incubadas por 25 minutos a temperatura ambiente e aplicados em gel não denaturante de poliácridamida (4-6%) a 180 V por 1 hora e 30 minutos, secos e expostos para revelação em filme.

As sondas utilizadas para os ensaios de ligação de CsARF foram construídas a partir da provável região de ligação de PthA ao longo de um provável TATA box na região 5'UTR obtida do gene da expansina. Quatro sondas foram construídas (Tabela 3):

Tabela 3 – Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA com CsARF

Nome	Oligonucleotídeos - Sequência 5` 3`
WT	CCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
MUT1	CCGCATCTCACGGACTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
MUT2	CCGCATCTCACTGTCTACAGAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
Nonsense	GACGGCATGGCCAGGCCTCGAGACGTCGAGTGGACCGGAGGC

As sondas fita simples foram aneladas em gradiente de temperatura, iniciando a denaturação à 95°C durante 3 minutos, com decréscimo a cada 5°C, até a temperatura ambiente. As sondas foram resfriadas no gelo por 15 minutos e então marcadas radioativamente pelo método da polimerase Klenow.

3.6 Ensaios Estruturais e Bioquímicos de CsHMG

Todos os ensaios foram realizados com a proteína 6xHisCsHMG purificada de acordo com o descrito no item 3.3.1 .

3.6.1 Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de CD foram realizados em um espectropolarímetro *J-810* (JASCO), acoplado a um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier Type Control System PFD 425S* – JASCO) e controlador externo de temperatura (*NESLAB RTE Series* – NESLAB). As cubetas de quartzo usadas possuíam caminho óptico de 1 mm ou 0,1 mm e as proteínas foram diluídas suficientemente para fornecer um sinal em 222 nm entre – 20 e – 40 mDeg.

Os espectros de CD foram coletados em temperatura constante de 20°C, sendo que os espectros de CD em ultravioleta distante iniciavam em 260 nm e cobriam até a banda na qual a voltagem do detector atingisse o limite de 600V. Espectros cumulativos de 6 coletas (velocidade de coleta = 100 nm/min e tempo de resposta 2s) foram analisados pela subtração do branco (tampão fosfato 20 mM 50 mM NaCl pH 6,6). A porcentagem de estrutura secundária foi calculada à partir do programa CDNN Decovoluntion. No caso dos experimentos de desnaturação térmica, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 mm e a temperatura foi controlada pelo sistema.

3.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A expressão e purificação de 6xhis-CsHMG foi efetuada como descrito em 3.3.1, porém foi utilizado meio mínimo M9 (1X sais de M9, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,4% glicose) para padronizar protocolos futuros com aminoácidos marcados. Aproximadamente 0,6 mM de proteína concentrada através de filtro centripore 5 KDa foram utilizados para os ensaios de RMN, realizados em tampão fosfato 20 mM, pH5.6 contendo 0,05% NaN₃. O espectro unidimensional foi coletado em espectrômetro Varian Inova 600MHz do grupo de RMN do LNBio.

3.6.2.1 Expressão e Purificação em Meio Mínimo para Marcação Isotópica

A melhor condição de expressão em meio mínimo foi obtida com um pré-inóculo fresco crescido e repicado por 16h a 37°C e 200 rpm em meio LB com canamicina. O inóculo foi centrifugado para retirada do meio LB duas vezes por 15 minutos a 5000 rpm e ressuspendido em meio M9 fresco, acrescido de NH₄Cl marcado com ¹⁵N para simples marcação ou com glicose C¹³ dependendo do experimento em questão. Após crescimento até OD₆₀₀=0,6 e 37°C, a indução foi feita com 0,4 mM de IPTG, por 16h, sob temperatura de 25°C e 200 rpm. A purificação foi feita conforme descrito em 3.3.1.

3.6.2.2 Coleta de Experimentos

Todos os experimentos foram coletados no espectrômetro Varian Inova 600Mhz no LNBio/CNPEN sob colaboração do grupo de RMN cujo responsável direto foi o Dr. Maurício Sforça. Os experimentos realizados foram HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CO)CA, HNCO, NHSQC e NOESY-NHSQC. Todos os dados foram coletados sob temperatura de amostra de 20°C e processados com o software NMRPIPE, NMRVIEW e SmartNotebook.

3.6.2.2.1 Experimentos de Titulação RNA/Proteína e aquisição de espectros bidimensionais NHSQC

Amostras concentradas de CsHMG de 0,3 mM foram utilizadas para os experimentos de titulação com RNA fita simples de 23 nucleotídeos de uridina ressuspendido em água. O cálculo da razão molar foi efetuado de modo a diminuir consideravelmente o volume total e a quantidade de RNA utilizado, sem que houvesse um decréscimo na intensidade do sinal de NHSQC. Após adição do RNA a mistura foi gentilmente agitada, incubada a temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos e o espectro era então coletado.

3.6.3 Ensaios de Cristalização

As tentativas de cristalização consistiram em *screening* iniciais com Kits de soluções de cristalização conduzidas pelas técnicas do ROBOLAB-LNBio. A proteína foi dosada e submetida (testes de concentração

da proteína e de DLS (*Dynamic Light Scattering*) para verificar a dispersão da proteína em solução. Para as análises de screening, 1 μ L de proteína 6xhis-CsHMG purificada em concentração de 6,41 mg/mL foi adicionado em 2 μ L dos tampões dos kits (Wizard I e II (Emerald Biosystems), PACT (Nextal/Qiagen), JCSG+ (Nextal/Qiagen), SaltRX (Hampton Research) e Precipitant Synergy (Emerald Biosystems). Observações foram realizadas nas placas de cristalização periodicamente.

3.6.4 EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) - DNA

3.6.4.1 Sondas

Foram utilizadas três sondas para esse ensaio. Duas consistiam de prováveis regiões promotoras de genes de *C. sinensis* *up*-regulados por Xac e que continham um provável alvo de ligação de PthA. Essas regiões foram isoladas por outros membros do grupo e gentilmente cedidas para esse estudo. Uma sonda foi chamada de *pr5* de tamanho (150 pb) e a outra de *cyp* (180 pb). Por fim a última sonda chamada de *pb* (100 pb) foi construída através da amplificação por PCR do *polylinker* do plasmídeo pBlueScript SK+ (Stratagene) correspondendo a um tamanho de 100 pb.

3.6.4.2 *Binding* e visualização

As reações de *binding* contendo de 0,5 μ g a 5 μ g de 6xhis-CsHMG purificada, ~200 ng de sonda no tampão de ligação (em concentração final: 20 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10% glicerol e 1 mM EDTA, pH 7,5) foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, a reação foi aplicada em gel de poli-acrilamida nativo (6% e pré-corrido por 1 hora em tampão de corrida (50 mM Tris-HCl, 380 mM glicina e 2 mM EDTA). Os géis foram corridos por 1 hora à 4°C, submetidos à coloração com brometo de etídeo por 30 minutos e visualizados em luz ultravioleta.

3.6.4.3 Proteína-RNA

3.6.4.3.1 Sondas

As sondas utilizadas nesse ensaio foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Quaresma e consistiam de quatro segmentos de 25 bases compostos por polímeros de adenina (poly-A)₂₅, uracila (poly-U)₂₅, citosina (poly-C)₂₅ e guanina (poly-G)₂₅. Foram também utilizadas sondas de tamanhos variados, como

poly-AU₁₁ e poly-AU₂₃ como indicado na Tabela 4. As sondas foram marcadas radioativamente usando [γ 32P]-ATP, através da enzima polinucleotídeo quinase (PNK). As sondas marcadas foram purificadas com o kit Illustra de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 4 – Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA de RNA com CshMG

Nome	Oligonucleotídeos de RNA - Sequência 5` 3`
PolyAU ₁₁	UUUAAAAUUUA
PolyAU ₂₃	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
PolyA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
PolyC	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
PolyG	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
PolyU	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU

3.6.4.3.2 *Binding*

As reações de *binding* contendo concentrações crescentes de proteína purificada (0,5 μ g a 5 μ g) foram incubadas com 12,5 nM de cada sonda marcada, em tampão de *binding* (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10% glicerol e pH 7,5) por 30 minutos no gelo. No caso dos ensaios competitivos as amostras foram incubadas somente com a sonda não marcada, e adicionado, após 10 minutos, a sonda marcada. Foi acrescentado o tampão de amostra de RNA e as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% em tampão 20 mM Trisma, 8 mM acetato, 0,1 mM MgCl₂ e pH 8,0 e corridas por 3 horas à 4°C. Após corrida os géis foram secos e expostos por 16h à -80°C para posterior autoradiografia.

3.6.4.3.3 *UV-Crosslinking*

Foram realizadas reações de *binding* conforme descrito em 3.6.4.1.2 . Após as reações de *binding* as amostras foram submetidas por 5 minutos em fonte de UV (UV-Stratalink 2400 – Stratagene) em comprimento de onda de 260 nM. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) 10%, secas e incubadas por 16h à -80°C para posterior autoradiografia.

3.7 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* Col-0 e *hmgb-1*

Com o intuito de utilizar um sistema mais robusto para caracterização de CsHMG, sementes mutantes e selvagens (Col-0) de *A. thaliana* oriundas do banco TAIR (WWW.arabidopsis.org), heterozigotas para o gene *hmgb1* (provável homólogo de CsHMG) foram crescidas em meio MS (sais MS, 25 g/L sacarose, 100 mg/L mio-inositol pH5,7) em estufa com temperatura e umidade controlada no CBMEG-UNICAMP, sob a supervisão do Prof. Michel Vincentz. Plântulas de 3 semanas foram utilizadas em análises preliminares para testes com o anticorpo anti-HMG e futuros experimentos de complementação com CsHMG como a caracterização funcional *in planta* e, principalmente, ensaios visando a complementação do mutante *hmgb-1* por CsHMG.

3.8 Anticorpo Anti-HMG e Tentativas de Co-imunoprecipitação

Foi utilizada aproximadamente 1mg/mL de proteína 6xhis-CsHMG purificada, como descrito anteriormente, visando a produção do soro policlonal. A amostra foi liofilizada completamente e enviada para a produção de soro por imunização seriada em coelhos, pela empresa Célula B anticorpos, sob supervisão do Prof. Itabajara da UFRGS. O soro foi testado usando diferentes diluições para detecção da própria proteína purificada através de *Western Blot*. A especificidade do anticorpo foi também testada para detecção das proteínas endógenas tanto em extratos protéicos de folha de citros quanto de *seedlings* de *A. thaliana*. Os extratos protéicos foram produzidos através de maceração mecânica em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7,2) dos tecidos congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram acrescidas de tampão de amostra pra SDS-PAGE, aquecidas por 15 minutos em banho 95°C e então centrifugadas por 30 minutos à 20.000 x g. O extrato solúvel foi utilizado para *Western Blotting*.

A tentativa de coimunoprecipitação foi realizada da seguinte maneira: O tecido transformado (epicótilos de citros, após co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* para expressão transiente de 35S-PthA (Domingues *et al*, 2010) foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2). Após a obtenção de um extrato homogêneo, procedeu-se a centrifugações de 500 rpm até a obtenção de um lisado homogêneo e límpido. O extrato foi incubado com diluições de cada antissoro, a temperatura de 4°C, por 16h. Beads de resina proteína A-sepharose foram

adicionados e o conjunto foi incubado por mais 3h, centrifugados e o sobrenadante foi aplicado em géis SDS-PAGE para análises de *western blot*.

3.9 Ferramentas de Bioinformática

Todos as buscas por similaridade de sequência foram efetuadas com o algoritmo BLAST (www.ncbi.nih.gov/blast). Análises comparativas de alinhamento de sequências e a árvore filogenética foram feitas usando o algoritmo CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw). Para as análises de busca de regiões promotoras e sequências regulatórias das regiões 5'UTR o algoritmos utilizado foi o PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

4. Caracterização das Interações Proteína-Proteína

4.1 Identificação das proteínas CsARF e CsHMG como parceiras de interação da proteína efetora PthA de Xac.

Screenings de duplo-híbrido de leveduras foram realizados com as variantes PthA2 e PthA3 como iscas e uma biblioteca de cDNA de folha de *C. sinensis* como presa. Várias proteínas de citros candidatas foram identificadas e selecionadas (Domingues *et al*, 2010). Neste estudo foram caracterizadas as interações entre as variantes de PthAs e as proteínas de *C. sinensis* CsARF e CsHMG selecionadas inicialmente pela isca PthA2 de 15,5 repetições.

Na primeira parte serão discutidos os resultados obtidos com a proteína CsARF, incluindo sua interação com *PthA*, caracterizações iniciais de sua função e uma provável conexão entre a sinalização hormonal e o desenvolvimento de sintomas do cancro cítrico.

Na segunda parte serão discutidos os resultados relacionados à interação de CsHMG com *PthAs*, caracterizações bioquímicas dessa proteína e tentativas de estudos estruturais.

Primeira Parte: Caracterização da proteína CsARF e sua interação com a proteína efetora PthA.

4.2 CsARF tem elevada similaridade com ARF2 de *A. thaliana*, um repressor transcricional da sinalização por auxinas

A Figura 7A mostra um alinhamento múltiplo com todos os 23 membros da família ARF de *Arabidopsis thaliana*, cujos ARFs são em sua maioria, bem caracterizados. Dentre os membros da família de ARFs de *A. thaliana*, CsARF apresenta maior similaridade com AtARF2. A proteína CsARF tem cerca de 69% de identidade de seqüência de aminoácidos com AtARF2 (Figura 7B). A estrutura de domínios de CsARF é típica de um ARF e consiste em dois domínios bem caracterizados (Figura 7C): um domínio N-terminal B3 de ligação ao DNA e um domínio Aux/IAA de interação proteína-proteína. A região central é composta por um domínio conservado (MR) sem função definida e uma extensa região predita como desestruturada, que dependendo dos resíduos que a compõe, pode estar envolvida na ativação ou repressão transcricional.

CsARF foi identificada no *screening* de duplo-híbrido como parceiro de interação da variante *PthA2*, sendo que nesse ensaio *CsARF* estava truncada, sem a região N-terminal. A Figura 8 mostra os ensaios que confirmam essa interação e a interação com outras variantes de *PthA*. *CsARF* inteira (Figura 8A) é capaz de interagir com todas as variantes de *PthA*, em ensaio de duplo híbrido de leveduras, exceto com a variante *PthA1*, de 16,5 repetições. Não há transativação das presas nem das iscas, conforme mostrado na Figura 8B nas condições testadas (genes repórteres *ade2*, *his3* e 3mM 3-AT).

Todas as interações verificadas em duplo-híbrido foram confirmadas *in vitro* através de ensaios de GST-*pulldown* (Figura 8C) com as proteínas recombinantes *CsARF* Δ ₍₁₋₂₅₇₎ fusionada à GST e *PthAs* (1-4) fusionadas à 6xHis. A forma truncada de *CsARF* utilizada no ensaio de GST-*pulldown* mantém o mesmo padrão de interação em sistema de duplo-híbrido (Figura 8D) obtido com *CsARF* inteira (Figura 8A).

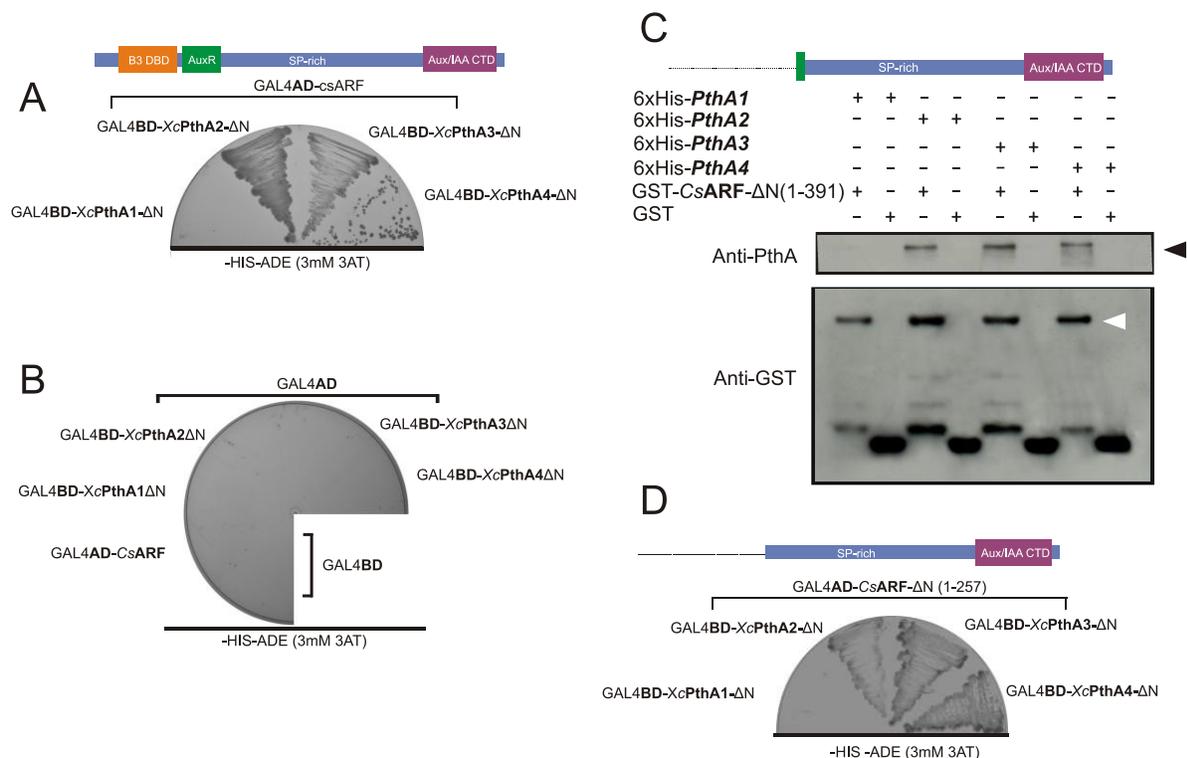


Figura 8 – Interações entre *CsARF* e as variantes de *PthA*. (A) As leveduras duplo-transformantes foram crescidas por 4-5 dias em meio seletivo SC-L-W-H-A com 0,3 e 5 mM de 3-AT. As construções correspondentes às formas Gal4BD foram obtidas pela clonagem em vetores pOBD e as formas Gal4AD pela clonagem em pOAD. (B) Como controles de auto-ativação dos genes repórteres, as leveduras contendo pOBD-*PthA* Δ Ns foram transformadas com pOAD vazio e as leveduras contendo pOAD-*CsARF* foram transformadas com pOBD vazio e plaqueadas em meio seletivo SC –L-W. Não houve crescimento em meio SC-L-W-H-A indicando que as proteínas sozinhas não ativam os genes repórteres em levedura. (C) Houve ativação do gene repórter no mesmo padrão observado em A com a construção *CsARF* Δ ₍₁₋₂₅₇₎. (D) Para confirmação das interações a maior forma truncada expressa em bactérias, GST-*CsARF* Δ ₍₁₋₂₅₇₎ (75kDa) foi imobilizada na resina (seta clara) e incubadas com as variantes purificadas de *PthA* (116-122kDa) fusionadas com cauda de histidina. A resina foi lavada e as proteínas imobilizadas foram eluídas com glutatona reduzida. A seta escura indica as bandas correspondentes às variantes de *PthA*. Não houve ligação quando GST (26kDa) era incubada na resina, indicando que não houve interação com a fusão e com resina de glutatona.

4.4 As repetições do domínio interno de PthA são suficientes para a interação com CsARF.

CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ é capaz de interagir fracamente com a construção PthA Δ N5,5 *in vitro* mas não com a região C-terminal de PthA (PthAC), como mostrado pelo ensaio de GST-*pull-down* (Figura 9A), indicando que a região central é importante para a interação. A Figura 9B mostra que os três tipos de região central de PthA (15,5; 16,5 e 17,5 repetições) fusionadas com 6xHis são capazes de interagir com CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎-GST, comprovando o envolvimento dessa região na interação. CsARF não foi capaz de interagir com PthA1 (Figura 9A) no entanto CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ foi capaz de interagir fracamente com a forma truncada de 16,5 repetições correspondente à variante 1 (Figura 9B).

Segundo os dados obtidos tanto *in vivo* e *em vitro* (Figuras 8 e 9), a interação de CsARF com as variantes PthA2, 3 e 4 envolve seus domínios internos repetitivos. No entanto a razão pela qual PthA1 não interage com CsARF permanece desconhecida.

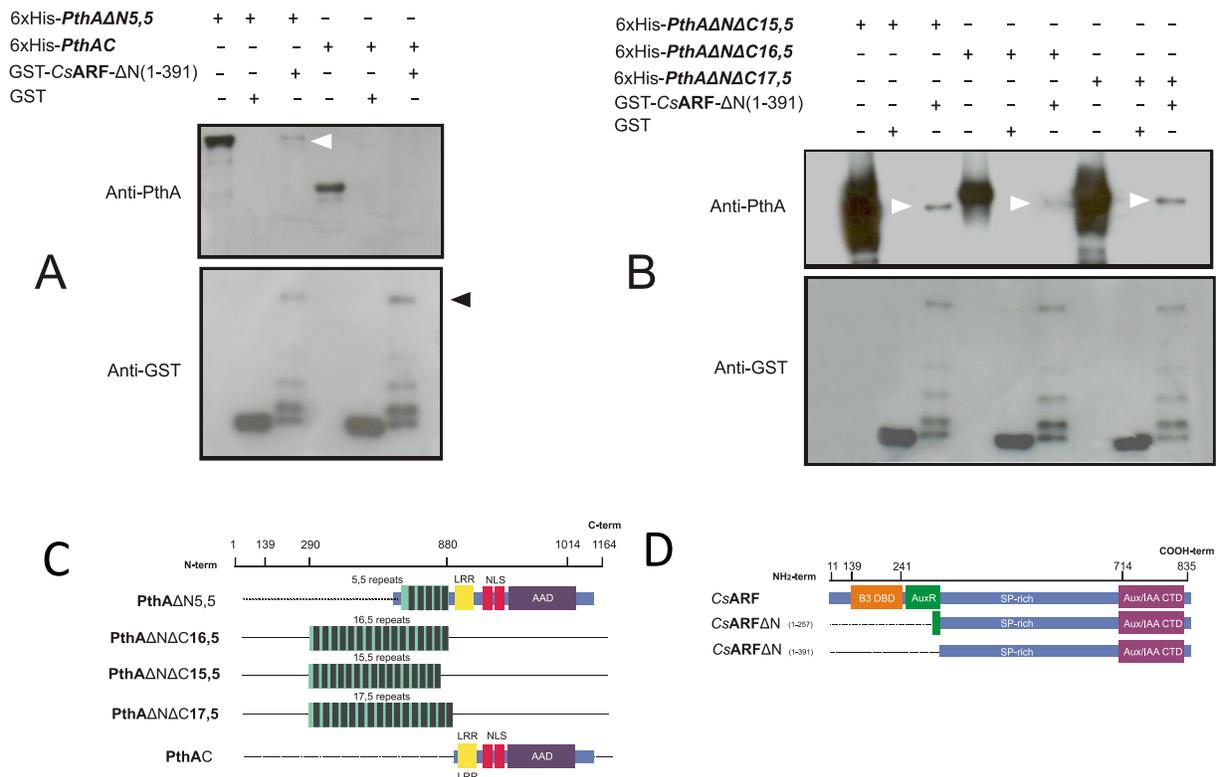


Figura 9 – Mapeamento do domínio de PthA envolvido na interação com CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎. **(A)** A resina de glutationa foi imobilizada com GST- CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ e incubada com 6xhis-*PthAC* (45kDa) ou *PthA* Δ N5,5 (55kDa), como indicado. Apenas a forma *PthA* Δ N5,5 foi co-purificada (seta clara), de forma muito pouco efetiva. A seta escura GST- CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ (75kDa). Nenhuma forma foi capaz de interagir com GST sozinha, indicando que não houve interação inespecífica. **(B)** GST-*pull-down* com os domínios internos de *PthA*. As setas brancas indicam as formas co-purificadas de *PthA* (em torno de 60kDa) e a seta escura indica a banda correspondente à CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎. **(C)** Esquema das construções de *PthA* e **(D)** de CsARF.

4.5 Os domínios C-terminal Aux/IAA e N-terminal B3 estão envolvidos na interação com PthA.

O mapeamento dos domínios de CsARF foi realizado através de ensaios de duplo-híbrido com várias construções truncadas como presas e com as quatro variantes de PthA como iscas (Figura 10). A Figura 10A mostra que a interação com os PthAs 2 e 3 (ambos com 15,5 repetições em seus domínios internos) foi mantida com as construções CsARF Δ C₍₂₃₈₋₈₃₅₎, CsARF Δ N₍₁₋₇₀₈₎ e CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎ mas não com CsARFMR₍₂₄₁₋₄₃₈₎. De acordo com os esquemas mostrados na Figura 10E, somente o domínio B3 de ligação ao DNA e o domínio Aux/IAA são suficientes para manter a interação de forma independente. A adição da região central (CsARF Δ N₍₁₋₂₅₇₎) ao domínio Aux/IAA não teve efeito na interação (Figura 10A e 10B).

Os mesmos resultados foram obtidos com a variante PthA4, de 17,5 repetições (Figura 10B). Nenhuma construção foi capaz de transativar os genes repórteres *his3* e *ade2* nas condições testadas (Figuras 10C e 10D).

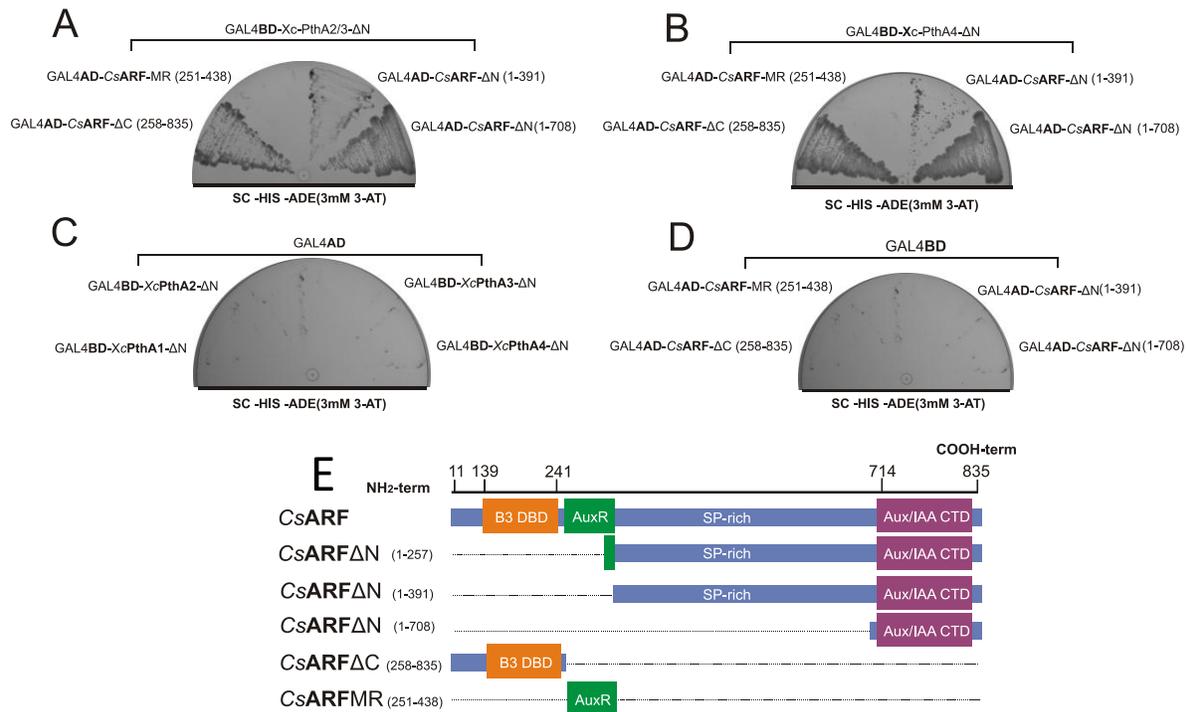


Figura 10 – Ensaios de mapeamento do domínio de interação de CsARF com PthA. **(A)** As leveduras duplo-transformantes foram plaqueadas em meio SC-W-L-H-A com 0, 3 e 5 mM de 3-AT. As análises de interação com *PthA2* Δ N e *PthA3* Δ N foram idênticas e optou-se por mostrar somente a interação com *PthA2* Δ N. **(B)** O padrão de interação com *PthA4* Δ N também foi semelhante. **(C)** Não houve transativação dos genes repórteres pelas variantes de *PthA* Δ N. **(D)** As formas truncadas de CsARF também não foram capazes de transativar *ade2* e *his3* em levedura. **(E)** Esquema das construções de CsARF.

O domínio Aux/IAA é um domínio de interação proteína-proteína, sendo descrito inicialmente como responsável nas interações entre ARFs e na interação com as proteínas Aux/IAA (Guilfoyle & Hagen, 2007). Porém, esse domínio também está envolvido na interação com outras proteínas, como MYB77 (Shin *et al*, 2007). Não há descrições de interações proteína-proteína envolvendo o domínio B3, mas o tipo de contexto encontrado em nossos experimentos pode sugerir que as regiões das proteínas envolvidas com ligação ao DNA (no caso de PthA o domínio interno) possam estar próximas facilitando o acesso ao DNA. Outra hipótese poderia consistir no bloqueio da interação com o DNA de CsARF com boxes AuxREs por PthA, ativando a transcrição de genes-alvo de PthA.

4.6 A região de DNA 5'UTR do gene CsEXP apresenta uma sequência similar à encontrada em promotores regulados por AvrBs3 e um box putativo AuxRE.

Um provável gene-alvo (CsEXP) de regulação conjunta por PthA e CsARF foi selecionado por ser *up*-regulado por Xac (Cernadas *et al*, 2008) e por ser também *up*-regulado por análogos de auxina (Cernadas & Benedetti, 2009), além de estar envolvido diretamente com o processo de expansão celular (Li *et al*, 2003). A Figura 11A e 11B mostra a região 5'UTR de aproximadamente 330pb isolada do gene CsEXP que pode corresponder à região promotora desse gene. Como mostrado na Figura 113B, um provável TATA box foi identificado, distante 100pb do ATG correspondente ao primeiro aminoácido dessa expansina de citros. Adjacente ao TATA box há uma sequência TGTCTA, que é muito similar ao box AuxRE (TGTCTC) cujos ARFs de *A. thaliana* ligam com especificidade. Essa mesma região é muito similar (Figura 11C) às regiões de ligação de AvrBs3 em genes regulados por essa proteína efetora, como Upa20 e principalmente Upa10, denominado de Upa Box.

Essa mesma região em torno do provável TATA box é muito similar à uma outra região promotora isolada do gene PR5.1 de citros, também *up*-regulado por Xac (Cernadas *et al*, 2008), que é alvo de ligação de PthAs (Pereira, *dados não publicados*).



Figura 11 – Análise da sequência 5'UTR do gene de uma expansina (*CsEXP*). **(A)** Esquema do gene *CsEXP* com a região isolada. Um provável TATA box está -100 pb do ATG correspondente à ORF e um core AuxRE (TGTCTa) flanqueia o TATA. Dois GARE box, TAACAA estão à 170 e 205 pb do mesmo ATG. **(B)** Sequência 5' UTR do gene *exp*. **(C)** Alinhamento das prováveis regiões promotoras em torno do TATA box dos genes *upa20*, *upa10*, *pr5.2* e *exp*. As setas escuras indicam os alinhamentos mais relevantes: entre *CsEXP* e *CsPR5.2* e entre *CsEXP* e *Upa10*.

Dois boxes GARE também foram identificados a 170 e 205bp do ATG inicial. Esses boxes estão relacionados a genes regulados por giberelinas (Cercós *et al*, 1999) e de fato a expansina de citros também é induzida por GA₃ (Cernadas & Benedetti, 2009). Esse gene é portanto, um alvo duplo de regulação hormonal por auxinas e giberelinas

Trabalhos anteriores de nosso grupo revelaram que auxinas e giberelinas estão intimamente ligadas com o desenvolvimento de sintomas do cancro. Dentre esses hormônios, a auxina mostrou-se essencial para o desenvolvimento dos sintomas relacionados ao cancro (Cernadas & Benedetti 2009). Genes sensíveis ao tratamento por análogos desse hormônio (e provavelmente por ARFs) também são regulados prematuramente na infecção por Xac (Cernadas *et al*, 2008). Notavelmente, PthAs de Xac ativam genes de resposta à auxina enquanto PthCs de Xaa reprimem genes dessa via (Pereira, *dados não publicados*). Além disso, a expressão transiente de AvrBs3 altera a expressão de vários genes induzíveis por auxinas, os chamados SAURs (*small auxin-regulated RNAs*) (Marois *et al*, 2002).

ARFs podem se ligar em sequências de DNA específicas chamadas de AuxRE (Ulmasov *et al*, 1997; Ulmasov *et al*, 1999), encontradas nos promotores do gene *gh3* de soja (Ulmasov *et al*, 1995). Mesmo que a sequência TGTCTC seja muito abundante, pelo menos no genoma de *A. thaliana*, há somente uma evidência direta da ligação de um ARF a um promotor específico de um determinado gene (Cole *et al*, 2009). Vários genes sensíveis ao tratamento por auxina possuem boxes AuxRE, alguns sendo muito degenerados (Hagen & Guilfoyle, 2002). Não se sabe o quão degenerado ou abundante um box desse tipo possa ser para que ainda

seja alvo da ligação de ARFs, sendo que é esperado que pequenas alterações nesse box possam ocorrer de espécie para espécie (Guilfoyle & Hagen, 2007). Porém há indícios que essa região pode variar entre plantas (Nag *et al*, 2005) e somente o core TGTC seja conservado (Chung & Sano, 2007).

Com o objetivo de testar se CsARF liga à sequência *upstream* do gene da expansina de citros, ensaios de EMSA foram realizados. A Figura 12A mostra um ensaio de EMSA tendo como sonda marcada a região 5'UTR inteira de CsEXP. De fato CsARF e PthA são capazes de ligar essa região *in vitro* como mostrado pelas bandas de *shift* da Figura 12A. A proteína CsARF inteira foi produzida por transcrição e tradução *in vitro* em reticulócitos de coelho. O extrato expressando a proteína recombinante fusionada ao epítopo FLAG foi imunodetectada por *western blot* conforme demonstrado na Figura 12B, juntamente com duas proteínas controle fusionadas com FLAG (FLAG-HsNip7 e HsNip7-FLAG).

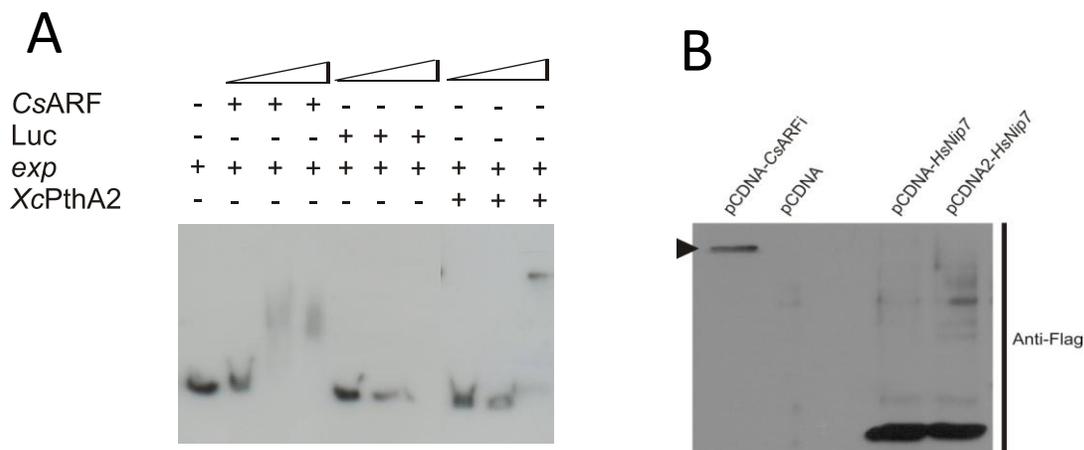


Figura 12 – EMSA com a região inteira 5' UTR de CsEXP e extrato de reticulócitos expressos com a construção PT7Sup23. **(A)** Aparentemente CsARF e PthA ligam em alguma região dessa possível região promotora. Porém não há como comprovar a expressão de CsARF nos reticulócitos através de *Western Blotting*. O extrato de reticulócitos expressando o gene da Luciferase foi usado como controle negativo. **(B)** Para comprovar a expressão de CsARF nos reticulócitos foi utilizada a construção pCDNA-Flag-CsARF, para que houvesse detecção através do anticorpo anti-Flag. Como mostrado CsARF é expressa em reticulócitos sendo que as duas últimas canaletas correspondem a dois controles positivos de uma proteína não relacionada e a segunda canaleta à expressão do vetor pCDNA vazio.

CsARF liga, pelo menos *in vitro*, a região ao redor do TATA box (que inclui o box TGTC) como demonstrado no ensaio de EMSA (sonda WT) da Figura 13. E essa interação depende da integridade do box TGTC adjacente ao TATA Box, uma vez que mutado nessa região (troca de TGTC por GGAC - sonda MUT1), a interação se torna bem mais fraca do que as bandas de *shift* obtidas com a sonda não mutada (WT).

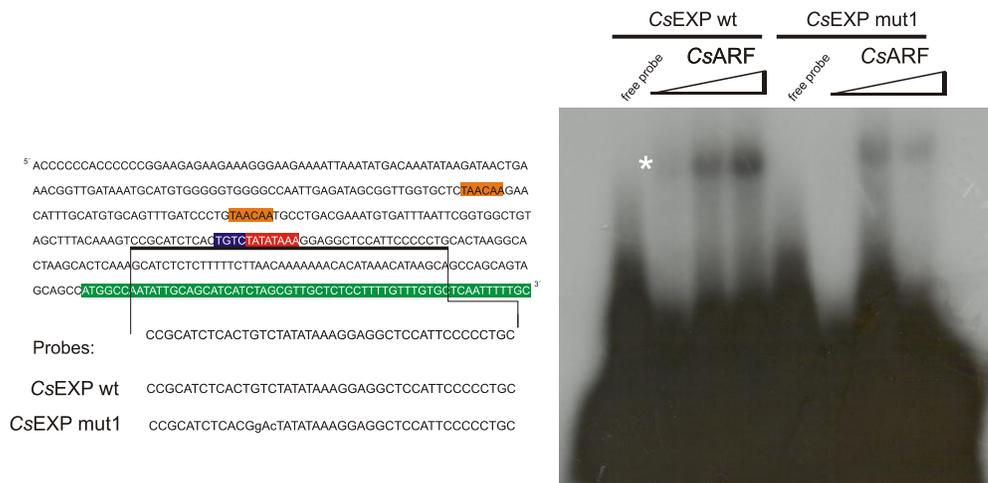


Figura 13 – EMSA com a potencial região promotora de *CsEXP* e extrato de reticulócitos expressando *CsARF*. As sondas de 41nt foram desenhadas e aneladas de acordo como descrito anteriormente. As reações foram corridas em gel não desnaturante de acrilamida 4% e expostas em filme radiográfico. Conforme demonstrado pelo asterisco houve uma maior ligação por *CsARF* na sonda *CsEXP* wt do que na sonda mutada *CsEXP* mut1. As quantidades de sonda e de extrato de reticulócitos foram normalizadas em todos os experimentos.

Nossos resultados sugerem um interessante mecanismo de regulação gênica. Embora ARFs possam se comportar diferentemente em outros organismos e condições (Guilfoyle & Hagen, 2007) e que ainda não esteja completamente estabelecido o papel funcional de *CsARF*, essa proteína têm características de um repressor transcricional e liga-se em uma região que corresponde à um provável TATA Box. Essa ligação depende de um box muito semelhante ao AuxRE e que está adjacente ao próprio TATA Box. *CsARF* pode reprimir o gene *CsEXP*, possivelmente através do impedimento da ligação da maquinaria de transcrição ao promotor. Quando há infecção por Xac, PthA entra no núcleo da célula vegetal e interage com *CsARF* através de seu domínio de dimerização (Aux/IAA) e de seu domínio B3 de ligação ao DNA. Essa interação proteína-proteína impede que *CsARF* desempenhe sua função de repressão e ligação ao DNA e permite que PthA tenha acesso à sua seqüência alvo no DNA através do seu domínio central, ativando a transcrição de genes de maneira auxina-independente. Ensaios de competição de EMSA serão realizados para verificar se PthA compete com *CsARF* para a ligação no promotor da expansina de citros.

Proteínas efetoras tipo III parecem participar ativamente nessa relação entre auxinas, desenvolvimento de sintomas e susceptibilidade. A expressão *in planta* do efector AvrPt2 de *P. syringae*, na ausência de genes de resistência, altera completamente a resposta à auxina, tendo o crescimento alterado e com excessiva sensibilidade ao análogo de auxina 2,4D (Chen *et al*, 2007). A interação de *CsARF* com uma

proteína tipo III como *PthA* pode ser uma ligação ainda não descrita entre sinalização hormonal por auxinas e virulência.

4.7 Outros promotores podem ser alvos da ligação conjunta de *PthA* e CsARF.

Outros genes induzidos prematuramente por Xac (Tabela 5) oriundos de estudos de expressão gênica são considerados alvos em potencial da ligação por *PthA*. Sendo assim alguns genes tiveram suas regiões 5'UTR (Pereira, *dados não publicados*) isoladas.

Tabela 5 – Relação dos boxes TGTC encontrados nas prováveis regiões promotoras de genes up-regulados por Xac

5'UTR	TGTC core	Origem
PR5.2	1	CERNADAS <i>et al</i> (dados não publicados)
PR1	1	CERNADAS <i>et al</i> (dados não publicados)
CYP	3	PEREIRA <i>et al</i> (dados não publicados)
WRKY-50	5	PEREIRA <i>et al</i> (dados não publicados)
CHIT-2	1	PEREIRA <i>et al</i> (dados não publicados)

Todos os prováveis TATA box desses genes possuem elevada similaridade com as regiões de ligação de AvrBs3, principalmente PR5 (Benedetti, *dados não publicados*). Por isso esses genes também constituem prováveis alvos de ligação de *PthA* e ensaios para comprovar essa hipótese estão em andamento pelo aluno de doutorado André Pereira. No entanto todos esses genes têm pelo menos um TGTC em suas prováveis regiões promotoras, com destaque para PR5.2 e CYP com um core TGTC distante (Tabela 5) do TATA box e WRKY com um distante AuxRE completo.

4.8 Expressão e Purificação de 6xHis-CsARFΔN₍₁₋₂₅₇₎

Para a realização de futuros experimentos, como detecção de produtos de expressão *in vitro*, ensaios de co-imunoprecipitação *in vivo* e ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) visando a identificação de alvos de ligação de CsARF, anticorpos policlonais foram produzidos contra a proteína 6xHis-CsARFΔN₍₁₋₂₅₇₎ purificadas (Figura 14). A correta produção da proteína recombinante foi confirmada por espectrometria de massa pela técnica MALDI-TOF.

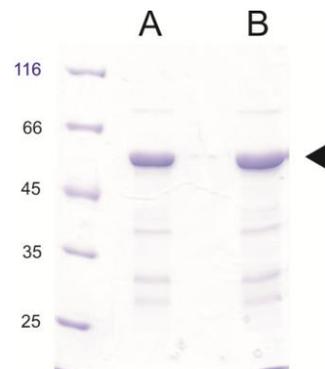


Figura 14 – Purificação da forma truncada 6xHis- CsARFΔN₍₁₋₂₅₇₎. **(A)** A proteína purificada, indicada pela seta escura (53kDa) por cromatografia de afinidade **(A)** foi dialisada em tampão Tris-HCl 20 mM, 150 mM NaCl. **(B)** A identidade da proteína foi confirmada por espectrometria MALDI-TOF e liofilizada para preparação dos anticorpos policlonais.

Segunda Parte: Caracterização da proteína CsHMG e sua interação com a proteína efetora PthA.

4.9 CsHMG pertence à família HMGB1 de *A. thaliana*.

CsHMG possui um HMG-BOX central conservado cercado por uma região N-terminal básica e por uma região C-terminal ácida (Figura 15A). A região central é composta por três alfa-hélices sendo que as porções flangeadoras são desestruturadas (Figura 15B). CsHMG também possui alta similaridade de sequência de aminoácidos com HMGB1 de *A. thaliana* e está, provavelmente, dentro do chamado grupo B (Figura 15C), que é caracterizado por um domínio HMG-box conservado entre os membros, mas com grande variabilidade nas porções N e C-terminal. (Grasser *et al*, 2007). O alinhamento e a árvore filogenética descritos na Figura 15C foram feitos utilizando todas as proteínas com alguma caracterização funcional em plantas e incluem proteínas de *A. thaliana* e milho, além de CsHMG.

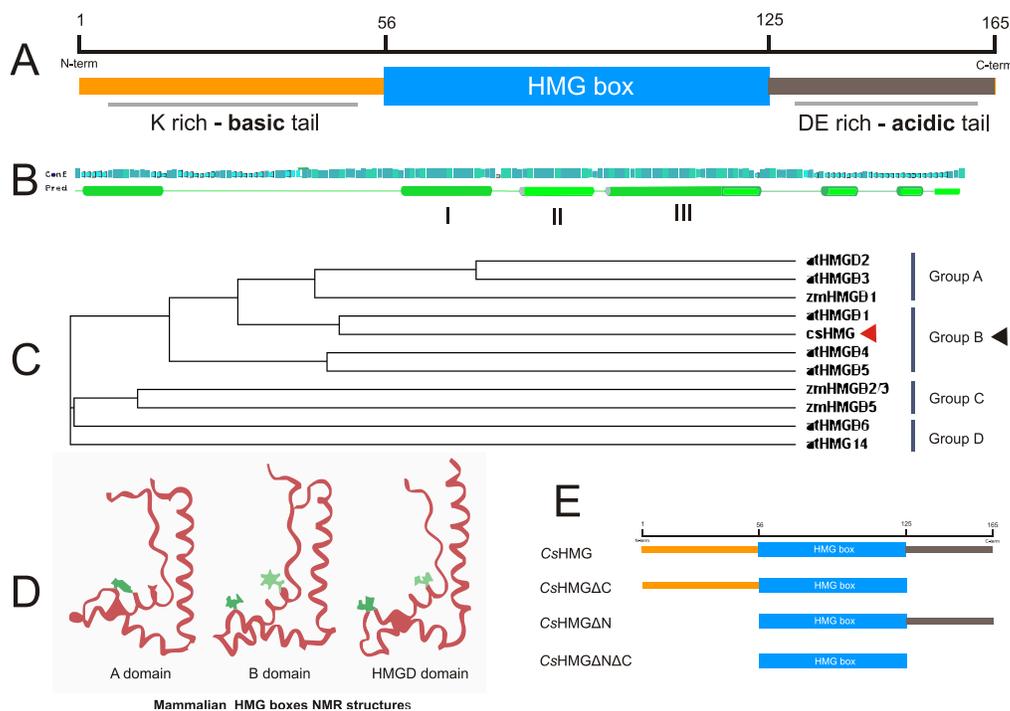


Figura 15 – CsHMG tem elevada identidade de sequência de aminoácidos com o grupo B de HMGB. **(A)** CsHMG possui uma região básica, rica em lisina (K), até o 50º aminoácido, aproximadamente. A região entre o 56º até o 125º aminoácido é uma região com elevada similaridade com um HMG-box e uma cauda ácida nos últimos 45 aminoácidos, rica em ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E). **(B)** A predição de estrutura secundária de CsHMG indica que a região N-terminal e C-terminal são bem desestruturadas, com considerável confiabilidade (Conf.), dada pelo algoritmo PSIPred. O domínio HMG-Box possui, também com elevada confiabilidade, as três alfa-hélices I, II e III que compõe o domínio HMG-box. **(C)** O alinhamento das sequências de proteínas de plantas caracterizadas em diferentes grupos por (Grasser, 2007). CsHMG (seta vermelha) é mais semelhante com AtHMGB1 do que qualquer outra proteína testada e com outras proteínas do grupo B (seta escura). **(D)** Estruturas tridimensionais de HMG-Boxes de mamíferos, com diferentes afinidades por determinados tipos de DNA (Thomas, 2001). **(E)** Construções de CsHMG utilizadas nos experimentos. Em azul o HMG-BOX conservado, em amarelo o N-terminal básico e em cinza o C-terminal ácido.

Estruturalmente o domínio HMG-box é composto por três alfa-hélices dispostas em formato de “L” , com pequenas variações de conformação entre os *boxes* com estrutura resolvida (Figura 15D). Essas estruturas são derivadas somente de animais (especialmente mamíferos) e foram resolvidas tanto por RMN quanto por cristalografia de raios-X.

4.10 CsHMG interage *in vivo* e *in vitro* com todas as variantes de PthA.

Como mostrado na Figura 16 CsHMG foi capaz de interagir com todas as variantes de PthA tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Todas as variantes de PthA foram usadas como iscas e a construção inteira de CsHMG usada como presa em ensaios de duplo-híbrido (Figura 16A). Não houve transativação de nenhuma construção utilizada (Figura 16B) nas condições usadas. Todas as interações obtidas em duplo-híbrido foram confirmadas por GST-*pull-down* (Figura 16C) com fusões GST-CsHMG e fusões 6xHis-PthA.

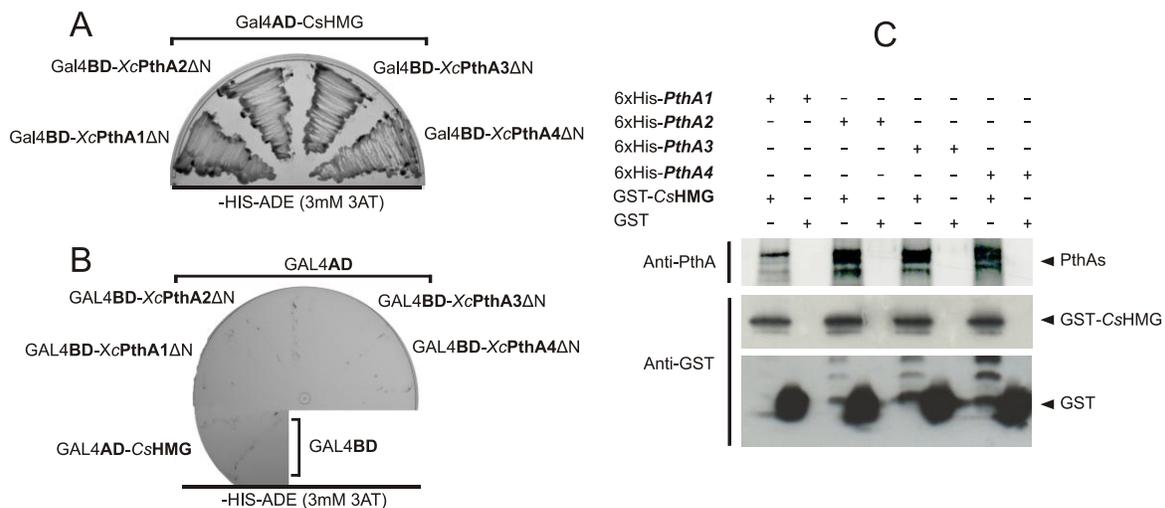


Figura 16 – Interações entre CsHMG e as variantes de PthA. (A) As leveduras duplo-transformantes foram crescidas por 4-5 dias em meio seletivo SC-L-W-H-A com 0, 3 e 5mM de 3-AT. As construções correspondentes às formas Gal4BD foram obtidas pela clonagem em vetores pOBD e as formas Gal4AD pela clonagem em pOAD. (B) Como controles de auto-ativação dos genes repórteres, as leveduras contendo pOBD-*PthA*ΔNs foram transformadas com pOAD vazio e as leveduras contendo pOAD-CsHMG foram transformadas com pOBD vazio e plaqueadas em meio seletivo SC –L-W. Não houve crescimento em meio SC-L-W-H-A indicando que as proteínas sozinhas não ativam os genes repórteres em levedura. (C) GST-CsHMG (44kDa) foi imobilizada na resina e incubadas com as variantes purificadas de *PthA* (116-122kDa) fusionadas com cauda de histidina. A resina foi lavada e eluída com glutatona reduzida. Não houve ligação quando GST (26kDa) era incubada na resina, indicando que não houve interação inespecífica com GST ou com a resina de glutatona.

A interação forte de CshMG com todas as quatro variantes de PthA pode indicar, devido ao papel funcional de HMGs na maquinaria basal de transcrição, que todos os PthAs atuam funcionalmente como fatores de transcrição, mesmo que somente PthA4 seja essencial para o desenvolvimento do cancro em citros (Al Saadi *et al*, 2007). Além disso, é importante destacar que em ensaios conduzidos por outros membros de nosso grupo, verificou-se que PthAs com PthA2, PthA3 e PthA4 por exemplo, são capazes de formar heterodímeros (Domingues *et al*, 2010) e ambas ativam a transcrição de genes na laranja associados ao desenvolvimento do cancro (Pereira & Benedetti, dados não publicados).

4.11 A interação pode ser dependente de dímeros de PthA e envolve a região rica em leucinas (LRR).

Com a finalidade de mapear a região responsável pela interação com CshMG algumas formas truncadas de PthA foram utilizadas em ensaios de GST-*pull-down*. As análises *in vitro* revelaram que CshMG interage com a forma truncada *PthA* Δ N5,5, composta pela região C-terminal (Figura 17A), incluindo LRR e AAD, adicionada de 5,5 repetições do domínio central. Como foi demonstrado em estudos anteriores que 5,5 repetições do domínio central é o mínimo necessário para que AvrBs3 forme dímeros (Gurlebeck *et al*, 2005) os dados podem sugerir que a interação de PthA com CshMG também seja dependente da formação de dímeros (Figura 17A).

CshMG não interagiu, pelo menos em GST-*pull-down*, com os domínios repetitivos de 15,5, 16,5 e 17,5 repetições. Ensaios biofísicos de fluorescência de triptofano (dados não mostrados) também não indicaram interação com um peptídeo composto por uma só repetição de 34 aminoácidos da região central de PthA2.

Como CshMG interage com todas as variantes de PthA era esperado que a região envolvida na interação fosse comum à todas elas. De fato CshMG foi capaz de interagir em duplo-híbrido com a região LRR, idêntica em todas as variantes de PthA (Figura 17B) e essa interação foi confirmada em um ensaio de GST-Pulldown (Figura 17C). Domínios ricos em leucinas são normalmente associados com interação

proteína-proteína e no caso de PthA são idênticos nas variantes, sem que nenhuma função (nem mesmo para AvrBs3) fosse identificada.

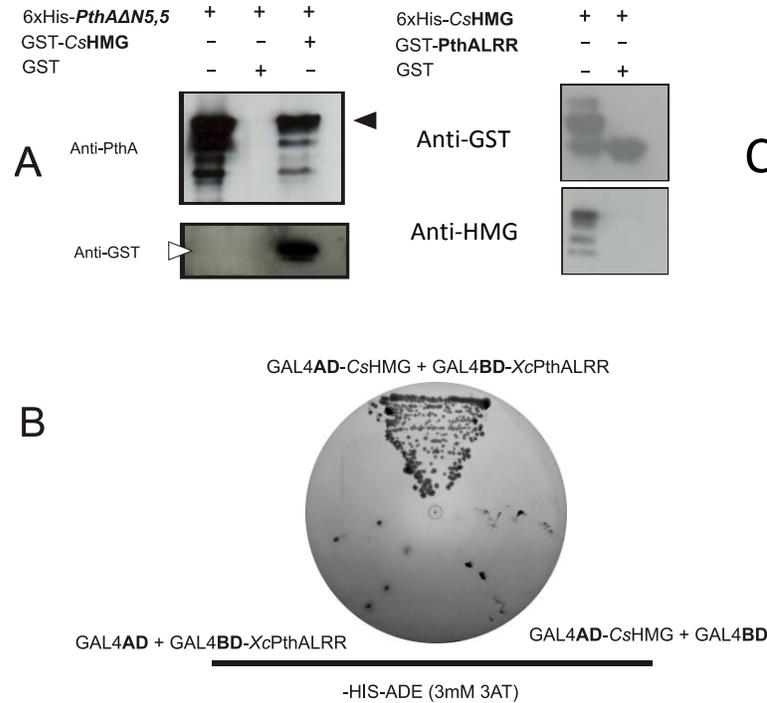


Figura 17 – Mapeamento do domínio de PthA envolvido na interação com CshMG. **(A)** A resina de glutationa foi imobilizada com GST-CshMG e incubada com PthAΔN5,5 (55kDa), como indicado. Apenas a forma PthAΔN5,5 foi co-purificada (seta escura). A seta clara indica GST-CshMG (44kDa). Nenhuma forma foi capaz de interagir com GST sozinha, indicando que não houve interação inespecífica. **(B)** As leveduras duplo-transformantes com as plasmídeos pOBD-*PthALRR* e AD-CshMG foram plaqueadas em meio selectivo SC –L-W-H-A com 0, 3 e 5 mM de 3-AT e crescidas por 4-5 dias. Não houve transativação dos repórteres nas leveduras transformadas com os plasmídeos pOAD vazio e pOBD vazio. **(C)** Após imobilização da região LRR de PthA (*PthALRR*) fusionada com GST a resina foi incubada com a proteína CshMG purificada, fusionada com cauda de histidina. Indicando que a região LRR de PthA pode estar envolvida diretamente na interação com CshMG.

HMGs estão envolvidas em ativação e repressão da transcrição como aumento da afinidade de ligação por vários fatores de transcrição como Oct, HoxD9, p53, Rel, receptores esteróides de mamíferos (Grasser, 2003) e o fator Dof2 de *A.thaliana* (Cavalari *et al*, 2003). Em muitos casos essa interação foi detectada *in vitro* e pode servir de mecanismo de recrutamento para sítios particulares no DNA. A interação com fatores de transcrição basais também foi reportada como é o caso da interação com TBP, TFIIB, TFIIA e TFIID (Das & Scovell, 2001). Além disso, há relatos do envolvimento de HMGs em processos de recombinação V(D)J mediada por RAG1/RAG2 na geração de variabilidade de anticorpos (van Gent *et al*, 1997). Como a interação de CshMG é mediada pela região LRR de PthA, o domínio central fica livre para interagir com DNA. Sendo assim, é coerente a hipótese de que CshMG possa aumentar a afinidade de PthA

por regiões específicas nos promotores de genes de citros que são up-regulados por PthA, como num complexo de transcrição gênica.

Caracterização funcional e estrutural de CsHMG.

4.12 Expressão e Purificação de 6xHis-CsHMG.

Os primeiros testes de expressão foram realizados em meio LB, com indução por 3 horas com 0,4 mM IPTG. Alternativamente, testes de indução *overnight* em meio TB também foram feitos. Em todos esses testes houve expressão satisfatória da proteína recombinante na fração solúvel, embora a purificação por cromatografia de afinidade (Figura 18A) indicou degradação parcial da amostra (Figura 18B). Para resolver esse problema, que dificultaria estudos biofísicos e bioquímicos, foram realizados testes com vários *cocktails* de inibidores de protease durante a lise, que diminuíram consideravelmente a degradação de 6xHis-CsHMG (Figura 18C).

A proteína pura (Figura 18D), após as etapas de purificação descritas anteriormente no item materiais e métodos, foi dosada pelo método de BCA, devido à interferência de moléculas de DNA (que co-purificavam com CsHMG) no método de dosagem por absorvância à 280nm, em até cerca de 6mg/mL.

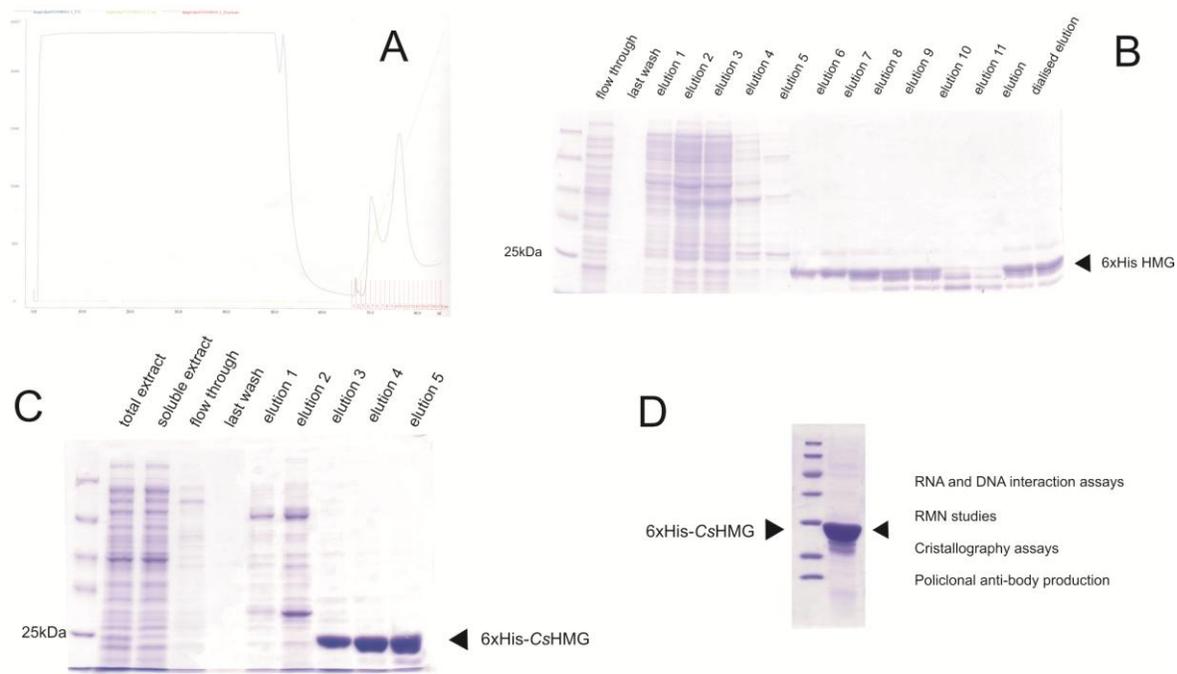


Figura 18 – Expressão e purificação de 6xHis-CsHMG. (A) Cromatograma da purificação por afinidade de CsHMG (22kDa). A proteína de interesse foi eluída no terceiro pico após o início da eluição com imidazol, com a concentração de aproximadamente 200mM de imidazol. (B) SDS-PAGE das frações coletadas correspondentes à purificação descrita em (A). (C) Para solucionar o problema da degradação foi adicionado durante a lise um coquetel de inibidores de protease. A purificação foi semelhante à demonstrada em (A). (D) Após as diálises e cromatografia de troca-iônica, a proteína foi submetida a diversos estudos estruturais e funcionais.

Todas as análises bioquímicas e biofísicas, incluindo os experimentos estruturais de CsHMG foram realizados em colaboração com o Dr. Alexandre Quaresma.

4.13 CsHMG interage com DNA de forma inespecífica *in vitro*.

A propriedade de ligação ao DNA linear é a característica mais comum em proteínas com domínio HMG-box. Essa característica foi observada em ensaios de EMSA realizados com a proteína recombinante purificada e sondas de DNA lineares (Figura 19).

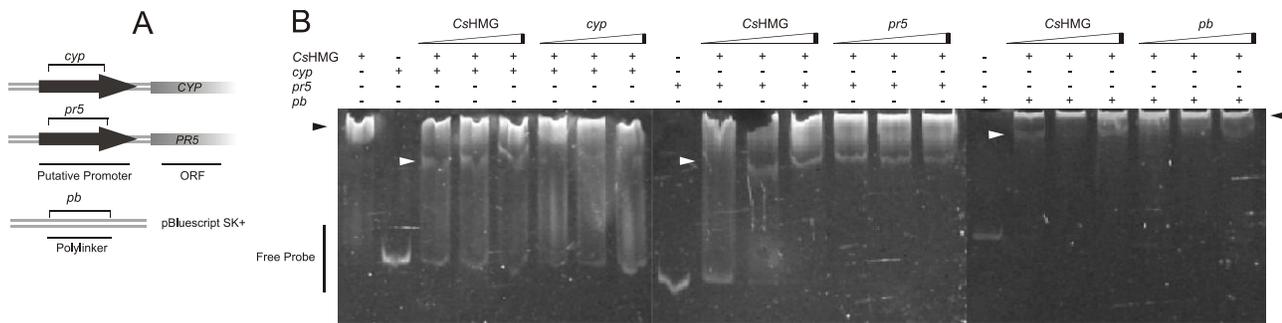


Figura 19 – EMSA com 6xHis-CsHMG e sondas de DNA. **(A)** As sondas utilizadas nos experimentos *pr5* e *cyp* são fragmentos amplificados por PCR das regiões promotoras de genes *up*-regulados por Xac. A sonda *pb* foi derivada do polilinkers do vetor pBluescript SK+, também amplificado por PCR. **(B)** As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas em luz UV após coloração com brometo de etídeo. As setas claras indicam a banda deslocada e a formação do complexo DNA-proteína. As setas escuras indicam a formação de agregados protéicos que não entram totalmente no gel. A proteína sozinha interage com DNA proveniente da bactéria, sugerindo mais uma vez sua capacidade de ligar DNA de forma inespecífica.

Foram utilizadas três sondas para esse experimento, sendo que duas delas foram gentilmente cedidas por outros membros de nosso grupo. A sonda *cyp* consiste de um fragmento de 120 pb oriunda de uma região 5'UTR de uma ciclofilina de *C. sinensis*. A sonda *pr5* consiste de um fragmento de 100 pb correspondente à região 5'UTR da proteína de citros PR5. As duas sondas foram testadas pois contêm prováveis sítios de ligação de *PthA* (Pereira, dados não publicados) (Figura 19A). A terceira sonda "*pb*" utilizada correspondia ao polilinkers do vetor pBluescript SK+ amplificada por PCR e serviria como DNA "inespecífico". Como esperado CsHMG foi capaz de ligar as sondas *cyp* e *pr5*, como também à sonda *pb* formando um complexo DNA-proteína na região indicada pelas setas brancas (Figura 19B). Pelo menos nas condições testadas, com excesso de proteína, CsHMG liga DNA de forma inespecífica a DNA dupla-fita linear. De fato, a proteína recombinante expressa em *E. coli* foi purificada com DNA proveniente da bactéria, como

indicada nas setas escuras (Figura 19B) sugerindo mais uma vez a capacidade de ligar DNA de forma não específica. Se o experimento fosse conduzido com sondas marcadas radioativamente não seria possível a constatação da co-purificação de DNA proveniente do sistema de expressão.

Devido a sua característica de causar DNA *bending*, a proteína HMGB5, que liga DNA de forma inespecífica, foi capaz de interagir com o fator de transcrição DOF2 e aumentar sua afinidade pelo seu DNA-alvo específico (Grasser *et al*, 2007). Sendo assim, experimentos visando o papel da interação *PthA*-C5HMG serão conduzidos para verificar o efeito dessa interação na ligação com o DNA.

4.14 C5HMG é capaz de ligar RNA *in vitro* de forma específica para regiões ricas em uridina sem sofrer influência da presença de DNA linear dupla-fita.

Surpreendentemente, C5HMG foi capaz de interagir com RNA *in vitro* de forma específica, principalmente para RNA rico em uridina (Figura 20). No entanto, nesse primeiro experimento, não houve um controle preciso da quantidade de cada tipo de sonda marcada na reação de *binding*, o que poderia acarretar conclusões equivocadas. Como observado na Figura 20, não foi possível analisar corretamente as reações com a sonda poli-G uma vez que além da marcação fraca não foi possível verificar a formação do complexo RNA-proteína. Mas mesmo assim, para concentrações crescentes de proteína, foi possível observar a formação de complexos RNA-proteína nas sondas poli-A e poli-U.

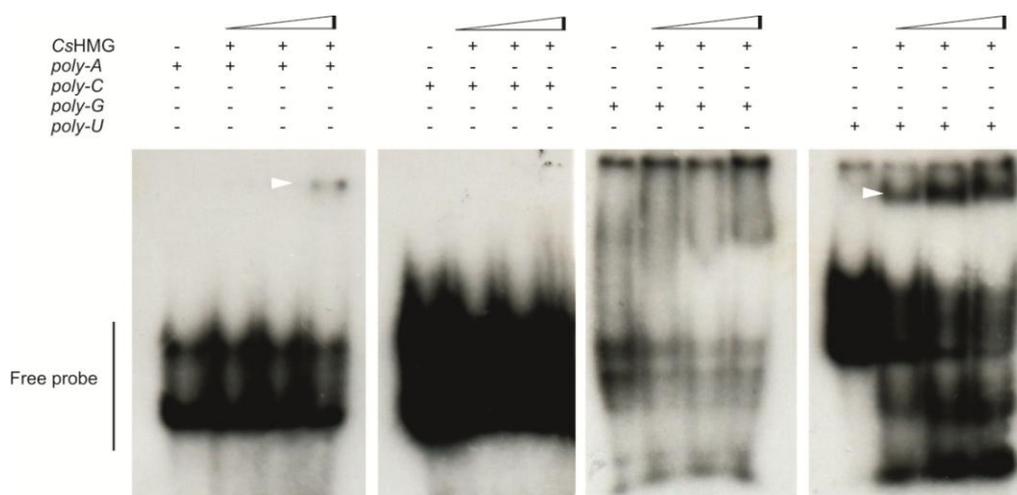


Figura 20 – EMSA com 6xHis-C5HMG com sondas de RNA . As reações foram feitas com concentrações crescentes de proteína, como indicado em cada caso. As setas brancas indicam as bandas deslocadas e a formação do complexo RNA-proteína. A formação desse complexo só foi verificada na sonda poli-U, onde pode ser observada uma crescente diminuição na sonda livre. Houve também a formação de um complexo DNA-proteína na sonda poli-A, mas na concentração máxima de proteína. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% e expostos à autoradiografia.

Para a confirmação das ligações foi realizado em conjunto um ensaio de UV-crosslinking (Figura 21), que eliminaria a necessidade de um controle mais refinado na concentração das sondas marcadas, por ser um teste mais sensível. Nesse experimento, portanto, só houve ligação detectável com a sonda *poly-U*, na região de 22 kDa no gel desnaturante (Figura 21), sugerindo que essa ligação ocorre com maior afinidade.

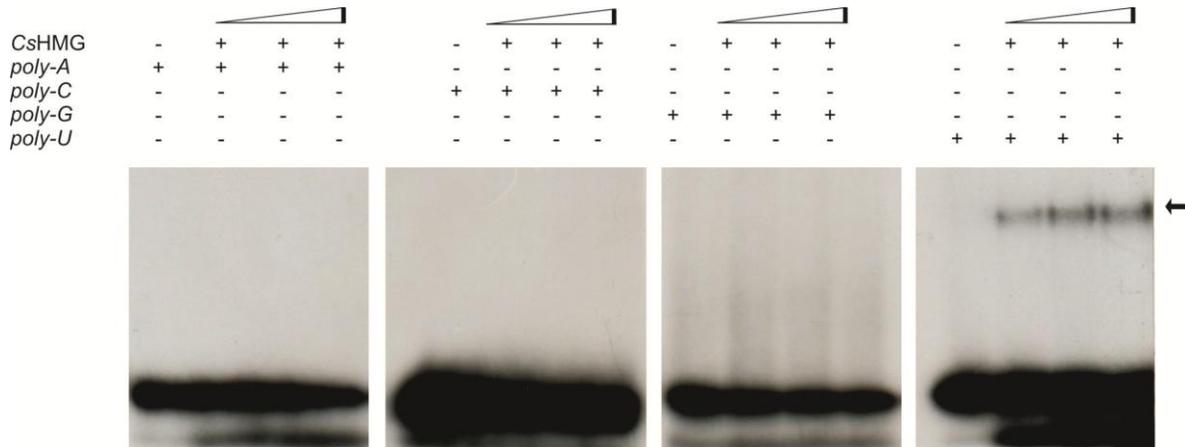


Figura 21 – UV-crosslinking das sondas poli A, C, G e U com 6xHis-CsHMG. A seta escura indica a formação de ligação covalente entre a proteína e a sonda, catalisadas pela luz UV. Foi observada a formação apenas na sonda poli U, indicando certa especificidade. As amostras foram carregadas em gel 10% de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e expostas à autoradiografia.

Só há um relato na literatura descrevendo a atividade de ligação à RNA pela família das HMGs em humanos (Bell *et al*, 2008). Sendo assim, tem crescido especulações do envolvimento direto de HMGs na estabilização do RNA após ser transcrito, ou antes, como alteração do *transcriptional start site* no contexto da ação de PthAs. Isso é muito interessante pois o transcrito de Upa20 gerado por AvrBs3 tem o TSS alterado sem que haja uma explicação plausível para o fenômeno (Kay & Bonas, 2007). Regiões ricas em U e também A compreendem, em eucariotos, as regiões encontradas na porção 5'UTR de mRNAs, indicando um envolvimento no metabolismo de RNA (Bell *et al*, 2008).

Para testarmos a hipótese de um possível envolvimento em vias de metabolismo de RNA foram feitos ensaios de EMSA com sondas de RNA ricas em AU (Figura 22A), porém não houve interação com esse tipo de RNA, nem de maior comprimento (*poly-AU*₂₃) e nem menor (*poly-AU*₁₁). Isso significa que a interação parece ser muito específica (e depende de mais de 3 nucleotídeos de uridina em sequência). Para testar essa

especificidade, um ensaio de competição com sondas poly-AU₂₃ não marcadas e a sonda poly-U marcada foi efetuado, de forma a acentuar a estringência do ensaio. Como mostrado na Figura 22B não houve deslocamento do complexo poly-U-CsHMG mesmo com excesso molar de 30 vezes de sonda competidora e a banda de shift desaparece com a adição de poly-U não marcado, demonstrando que a banda visualizada é devido à formação do complexo RNA-Proteína.

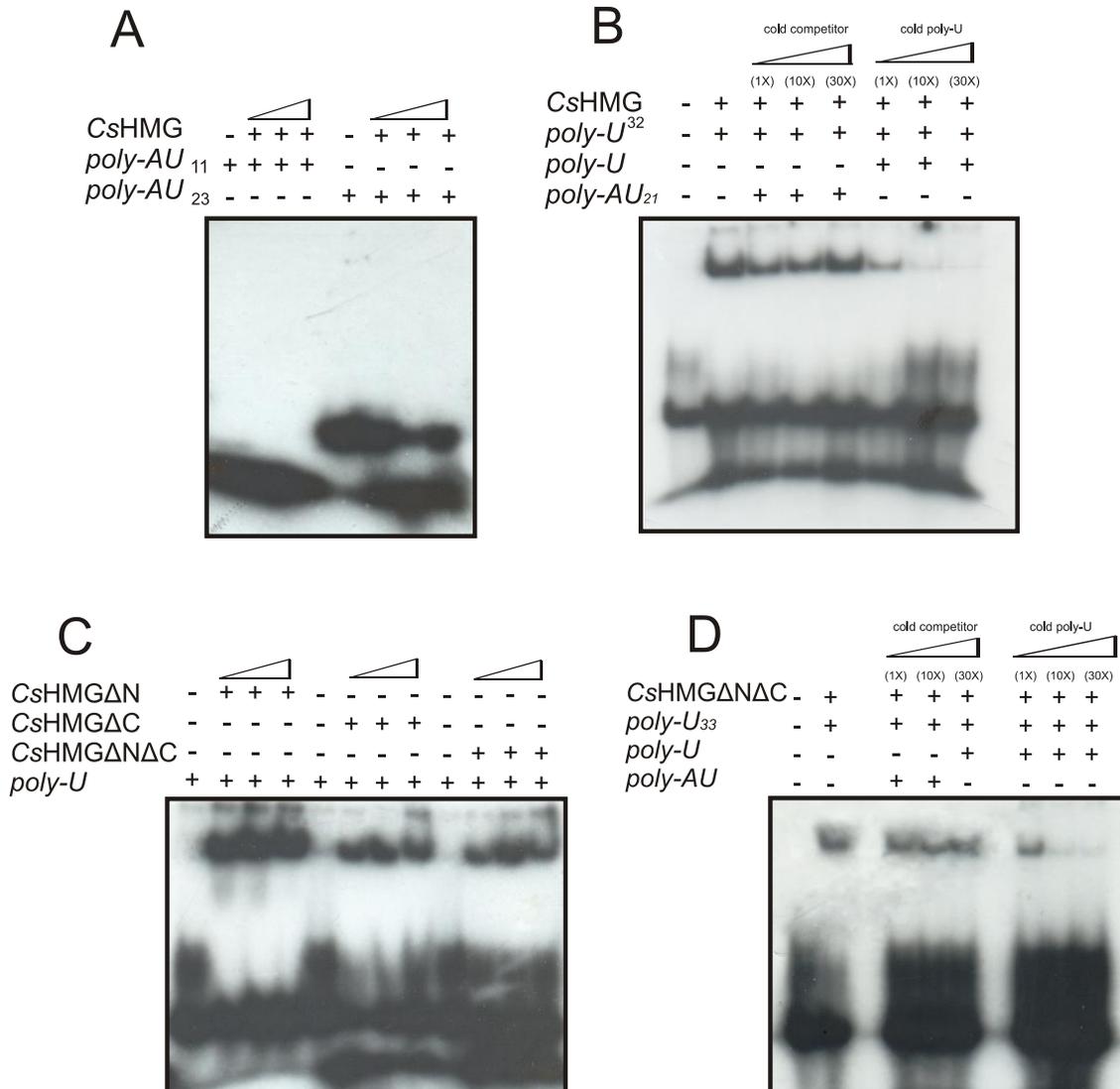


Figura 22 – Especificidade e ensaios competitivos da ligação CsHMG-RNA poly-U e CsHMG-BOX ($\Delta N\Delta C$). **(A)** Não foram observados banda correspondente ao *shift* de um eventual complexo das sondas polyAU₂₃ e polyAU₁₁ sugerindo que não há uma interação significativa com tais sondas. **(B)** Nesse ensaio de competição utilizando a sonda poly-U marcada e a sonda poly-AU₂₃ como competidor verificou-se que a interação proteína-RNA de até 30X de excesso molar foi mantida. A interação também é específica, pelo menos *in vitro*, já que a banda de *shift* desaparece pela adição de poly-U não marcado na reação. **(C)** Todas as formas protéicas de CsHMG construídas foram capazes de interagir com RNA sugerindo que somente o HMG-box é suficiente para a interação. **(D)** A construção CsHMG $\Delta N\Delta C$ que contém somente o HMG-BOX foi também suficiente para promover uma interação específica semelhante à observada em **(B)**.

Com o intuito de mapear o domínio de interação com RNA e se esse domínio é capaz de mediar uma interação específica com RNA poly-U, ensaios de EMSA utilizando truncagens de CsHMG foram feitos (Figura 22C) e todas as três truncagens foram capazes de interagir com RNA poly-U. É interessante notar que todas as três construções possuem o HMG-box central, sendo que somente o HMG-box (CsHMG Δ N Δ C) foi capaz de interagir com a sonda. De acordo com a Figura 22D somente o domínio HMG-box é suficiente para manter uma interação específica com poly-U.

Proteínas que possuem o HMG-box são descritas como proteínas ligadoras de DNA, o que foi confirmado para CsHMG conforme descrito anteriormente, pelo menos *in vitro*. Essa interação é mediada também pelo HMG-box que é suficiente para promover interação específica com RNA rico em uridina. Como mostrado na Figura 23 CsHMG prefere ligar RNA poly-U em relação às concentrações de DNA usadas no ensaio de competição. Observa-se uma ligeira diminuição no sinal da banda do complexo RNA-HMG na presença de DNA (cerca de 50X), o que sugere que DNA compete pela ligação do RNA. Essa análise deverá ser repetida com excesso de DNA de até 250X para mostrar a preferência de ligação por RNA poly-U. Considerando que o domínio HMG-box é relativamente conservado, a habilidade de ligação de DNA e RNA pode ter uma importante relevância biológica nas células.

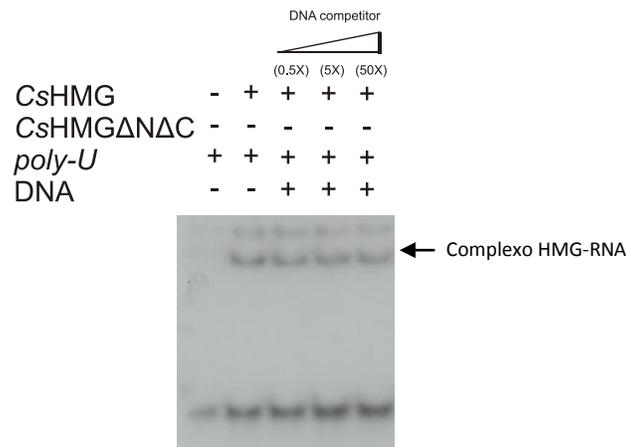


Figura 23 – Ensaio de competição *in vitro* utilizando DNA dupla-fita. Devido ao fato da possível coincidência de domínios de ligação de DNA e RNA (formado pelo HMG-box) foi realizado um ensaio de competição utilizando uma sonda de DNA fita-dupla aleatória (fragmento do polylinker do plasmídeo pBluescript) não marcada e a sonda poly-U marcada. Como observado não houve competição considerável na faixa de relação molar de até 50X sugerindo que os sítios de ligação de DNA e RNA podem ser diferentes e que a proteína pode ligar simultaneamente RNA e DNA em uma faixa de excesso molar de DNA de até 50X.

Porém qual seria a função biológica da interação com RNA rico em uridina? Quais seriam os prováveis alvos dessa proteína *in vivo*? A proteína UBF (*Upstream binding factor*) possui um HMG-box e esse

domínio é responsável pela interação com a RNA polimerase I e também pela transcrição de genes relacionados com síntese de RNA ribossomal (Sanji & Hannan, 2009). Porém essa questão ainda deve ser investigada. Um *screening* de duplo-híbrido usando como isca PthA4, no entanto, realizado pela doutoranda Adriana Soprano, detectou numerosas interações com proteínas de citros relacionadas à interação com RNA, sugerindo que PthA pode também interferir diretamente no metabolismo de RNA do hospedeiro. Experimentos para evidenciar um possível complexo envolvendo HMG e essas proteínas estão sendo conduzidos

4.15 Estudos biofísicos revelam estrutura secundária composta por alfa-hélices e regiões desestruturadas.

Mesmo esclarecido pelos ensaios de ligação ao DNA e RNA que a proteína recombinante deveria estar ativa e corretamente enovelada, decidiu-se conduzir experimentos de CD para verificar a estrutura secundária e possibilitar também outros estudos biofísicos para o estudo de CSHMG e seu contexto de interação com PthA.

Como predito *in silico*, CSHMG possui uma estrutura secundária com prevalência de estruturas desenoveladas e um certo conteúdo de alfa-hélices (Figura 24A), sem que haja indicações de estruturas em folha beta (ausentes na predição de estrutura). O conteúdo de alfa-hélices é condizente com a região do domínio HMG-box, rico nesse tipo de estrutura. O alto conteúdo de *random coils* (regiões desenoveladas) também é condizente com a predição das regiões N e C-terminal da proteína. Experimentos de desenovelamento térmico (Figura 24B) demonstraram que a partir de 25°C já há indícios de desnaturação, sendo que ao redor de 56°C praticamente todas as moléculas se encontram desnaturadas. Surpreendentemente, quando diminuimos a temperatura, parte das moléculas volta a adquirir certa estrutura secundária, demonstrando considerável capacidade de reenovelamento (Figura 24B). Porém, não foi possível o cálculo de T_m , pois não houve recuperação total do estado inicial.

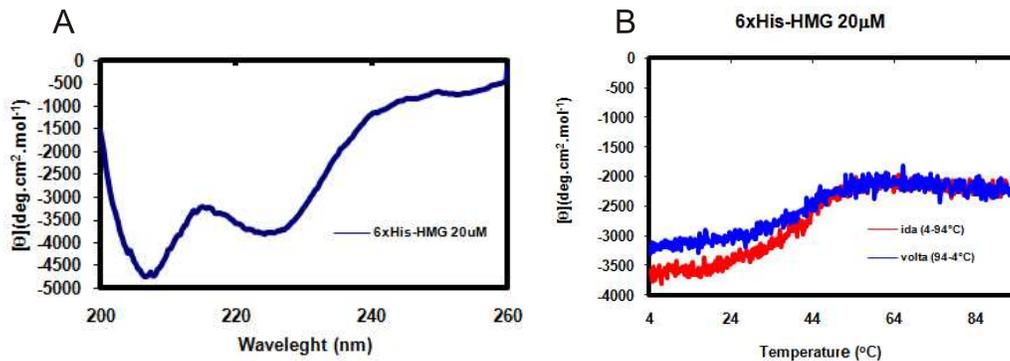


Figura 24 – Espectros de CD de 6xHis-CsHMG. **(A)** Espectro correspondente à 20 μM 6xHis-CsHMG. A região de 222 nm a 208 nm é característica de alfa-hélices, sendo que a região de 212 nm é característica de folhas betas. A região de 200 nm é característica de *random coils* (desestruturadas). **(B)** Espectro de desenovelamento térmico de 6xHis-CsHMG.

4.16 O alto índice de regiões desestruturadas de CsHMG impede a realização de estudos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da proteína inteira.

Análises de CD (Figura 25A) demonstraram que a proteína inteira é rica em regiões desestruturadas, mas tem certo conteúdo de alfa-hélices devido ao HMG-box. E é justamente um gráfico bem característico de alfa-hélice o obtido com a truncagem correspondente ao domínio HMG-BOX (CsHMGΔNΔC) com picos bem característicos em 208nm e 220nm.

Embora o domínio HMG-Box tenha uma estrutura bem definida e conservada, não há estrutura resolvida dessa família de proteínas em plantas, nem mesmo de seu domínio HMG-box. Além do aspecto estrutural, o mais interessante seria o emprego de técnicas de RMN para mapear resíduos e mudanças conformacionais decorrentes da interação com DNA-RNA dependente de PthA.

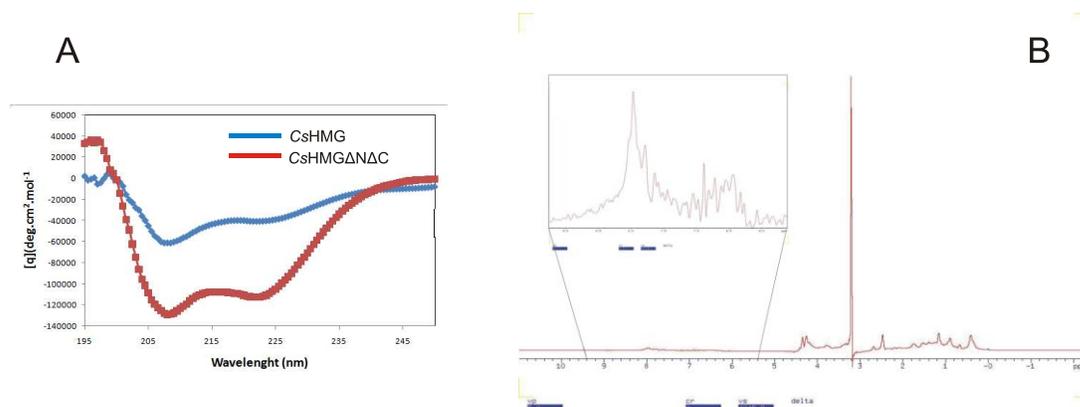


Figura 25 – Análises espectroscópicas e de RMN sobre a estruturação secundária de CsHMG. **(A)** Espectros de CD demonstrando que a região central correspondente ao domínio HMG-box é rico em alfa-hélices e a proteína inteira tem um nível considerável de regiões desestruturadas, conforme predito *in silico*. **(B)** O maior pico no deslocamento químico de 3,2ppm corresponde ao pico da água. É observado que o sinal que corresponderia à proteína alvo é muito fraco, indicando pouca concentração ou instabilidade estrutural.

Mesmo devido ao alto índice de regiões desestruturadas, que acarretam em muita instabilidade estrutural e dificultam a atribuição de dados de RMN, acreditamos em princípio que a região N-terminal positiva poderia interagir com a região C-terminal negativa estabilizando a proteína inteira, como sugerido no caso de *AtHMGB1* (Thomsen *et al*, 2004).

O experimento de 1D (Figura 25B) foi realizado com a proteína sem nenhum tipo de marcação por isótopos, devido ao fato de que somente os resíduos de hidrogênio são visíveis. Como esperado, houve pouca dispersão nos picos correspondentes da amostra, entre 6 e 9,5 ppm, aproximadamente, sugerindo uma estrutura altamente desenovelada e/ou a formação de polímeros da proteína (porém evidências de DLS sugerem que a proteína esteja monodispersa). Houve também um baixo sinal da amostra em comparação com o sinal da água, pico correspondente a um deslocamento químico de 3,2 ppm.

Para contornar esse problema foram construídas formas truncadas de *CsHMG*, incluindo o HMG-box e troncagem N e C-terminal para a realização de mais tentativas de estudos por RMN, além da possibilidade da investigação do papel das regiões básica e ácida na interação com PthA e na interação com RNA e DNA. A porção central, constituída pelo domínio HMG-BOX e representada pela construção *CsHMGΔNΔC* por suas características é um ótimo alvo de estudos por RMN tanto para estudos de interação com RNA e DNA quanto para a resolução de estrutura tridimensional.

4.17 Estudos de RMN do domínio HMG-box da proteína *CsHMG*

A maioria dos experimentos necessários para a resolução da estrutura do domínio HMG-box de *CsHMG*, incluindo a atribuição seqüencial das ressonâncias foram realizados. A Figura 26 é um exemplo de um espectro bidimensional N¹⁵HQC, que apresenta uma boa dispersão dos picos com relação ao deslocamento químico (PPM) sugerindo que a proteína está estruturada e possivelmente monomérica em solução. Além disso, a maioria dos picos está situada entre 8,5 e 7,5ppm dos hidrogênios que é uma região característica de resíduos dispostos em alfa-hélice.

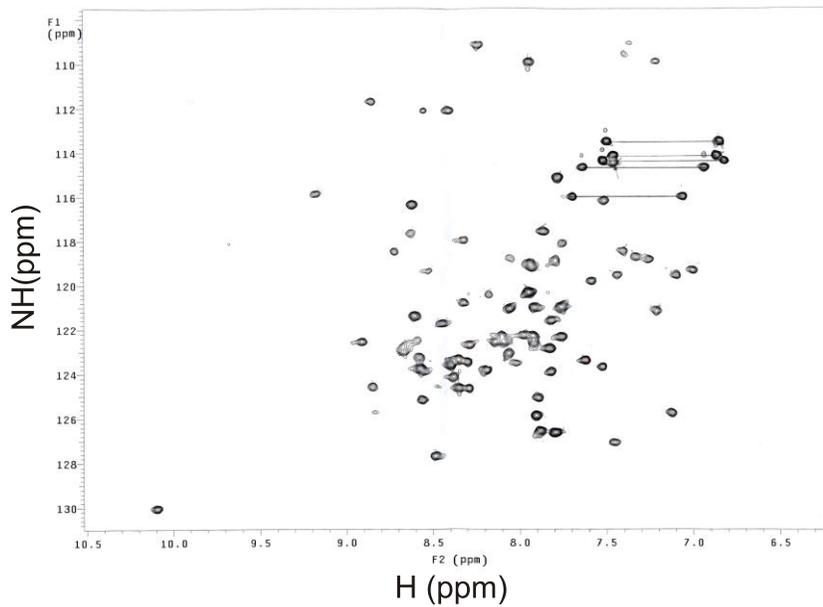


Figura 26– Espectro bidimensional N¹⁵QC da proteína 6xHis-CsHMGΔNΔC – A boa dispersão dos picos indica que a proteína encontra-se estruturada sendo que a qualidade dos sinais também revela que a concentração de proteína é suficiente para esse tipo de experimento. O número de picos também mostra que a proteína não está degradada e, provavelmente há um alto índice de estrutura secundária em alfa-hélice, uma vez que a maioria dos picos está no deslocamento químico de 7,5-8,5.

O primeiro passo para a resolução de uma estrutura por RMN e/ou mesmo para que haja possibilidade de estudos de interação é a atribuição seqüencial e identificação dos resíduos de aminoácidos nos espectros coletados. Existem, atualmente, formas que possibilitam a automatização desse tipo de procedimento através da utilização de softwares, como o SmartNotebook, que facilitam a atribuição dos picos mas exigem boa qualidade de uma série de experimentos que envolvem tripla-ressonância. Todo esse procedimento foi efetuado em colaboração com o Dr. Maurício Sforça, do grupo de RMN do CeBiME/LNLS. Porém os dados ainda são preliminares devido ao fato de que um experimento, chamado de TOCSY, deve ser repetido para maior confiabilidade tanto na atribuição das ressonâncias, quanto para estudos futuros de resolução de estrutura e interação. Porém o CSI (Figura 27) já indica que a atribuição é um sucesso, pois a estrutura secundária parece acompanhar com grande confiabilidade a predição *in silico* e os dados estruturais de estruturas com alta similaridade no banco de dados.

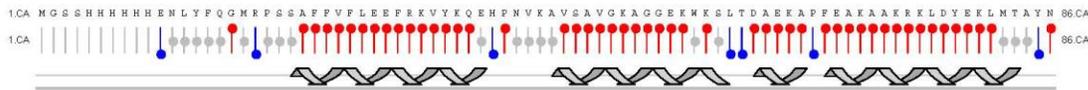


Figura 27 – Chemical shift Index (CSI) preliminar dos resíduos presentes em CSHMGΔNΔC já atribuídos. Conforme predito os resíduos se encontram em três alfa-hélices entremeadas por pequenos turns. A região correspondente à cauda de histidina adicionada do sítio de clivagem não foi atribuída.

Estudos de interação usando RMN estão em ascensão (Bonvin *et al*, 2005) e permitem estudos finos de relação ligante-ligante com experimentos consideravelmente rápidos e que podem gerar resultados com grande resolução e confiabilidade. Esse tipo de estudo também possibilita estudos de competição e cálculo de constantes de afinidade sem o conhecimento da estrutura tridimensional da proteína.

A Figura 28 mostra a primeira tentativa de titulação de RNA poly-U com a proteína CSHMGΔNΔC. Como observado há mudança considerável nos picos do espectro de NHSQC na primeira titulação, de razão molar 1:16. Com o aumento gradativo da concentração de RNA não há mudança significativa do deslocamento químico dos picos. Isso pode sugerir que pode ter ocorrido uma saturação da ligação já na primeira adição de RNA. Não houve, no entanto, precipitação da proteína na titulação devido à estabilidade na intensidade e deslocamento químico das cadeias laterais, indicadas pelas setas na Figura 28.

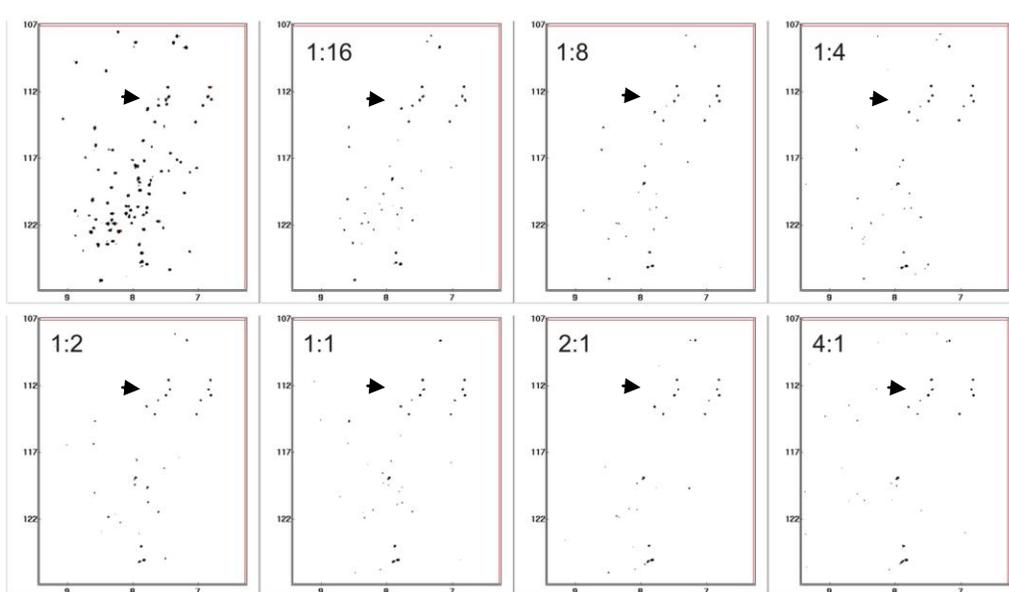


Figura 28 – Espectros NHSQC correspondentes à titulação RNA/proteína – O primeiro espectro corresponde à proteína 6xHis-CSHMGΔNΔC sem RNA, seguidas por titulações crescentes de RNA poly-U conforme indicado nas figuras (em razão molar RNA:proteína). A diminuição da intensidade dos picos pode ter ocorrido por interação mas não foi possível observar o aparente deslocamento de picos. Porém como indicado não houve alteração da região correspondente às cadeias laterais, sugerindo que a proteína está estruturada e não houve precipitação de um eventual complexo.

Os estudos de interação de CshMG usando RMN possibilitariam um aprofundamento no entendimento da ainda recente e não compreendida atividade de ligação ao RNA dessas proteínas. CshMG pode manter uma interação específica com RNA ao mesmo tempo que ainda consegue manter interação não específica com DNA. Os estudos de RMN com o domínio conservado HMG-BOX podem esclarecer quais são os resíduos envolvidos nessa interação, identificá-los e indicar o envolvimento de outras proteínas que possuem o domínio HMG-BOX com metabolismo de RNAs, como UBFs, SRYs e outras.

4.18 Detecção de HMGs de citros e *Arabidopsis thaliana* por Western Blot.

Anticorpos policlonais contra a proteína recombinante 6xHis-CshMG foram produzidos através de imunização pela empresa Célula B Anticorpos. O título do antisoro foi estabelecido em 1:8000 para a detecção da proteína por *Western Blot*. De acordo com a Figura 29 foi possível a detecção da proteína endógena nos extratos protéicos brutos tanto de folhas de citros quanto de epicótilos (utilizados para experimentos de transformação permanente e transiente, realizados em colaboração com a Dr. Maria L. Peixoto). Foi possível também confirmar a superexpressão de CshMG através de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

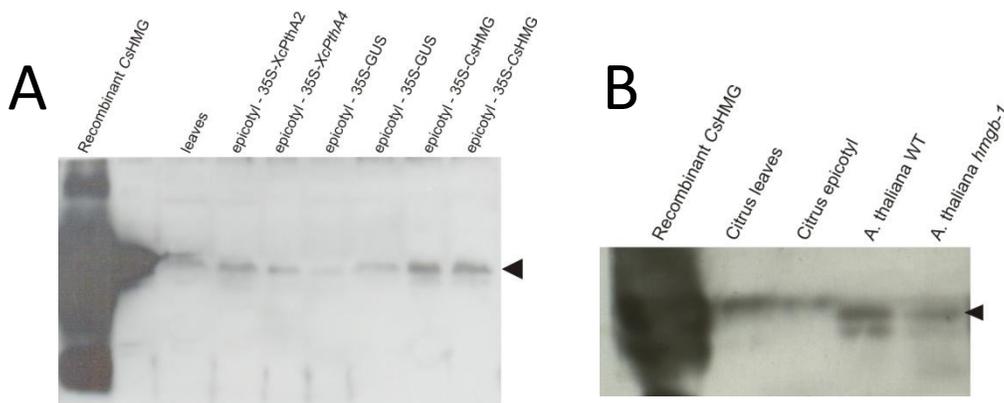


Figura 29 – O anticorpo Anti-HMG é específico para a proteína CshMG e reage cruzado com o provável homólogo em *A. thaliana* – (A) Extratos foram aplicados em cada poço, sendo possível a detecção de uma banda correspondente em todas as frações analisadas, inclusive houve um aparente aumento da quantidade de proteína nas frações correspondentes à superexpressão. (B) Foram analisadas também frações proteicas obtidas de *seedlings* de *A.thaliana*, onde houve também detecção de uma proteína menor, provavelmente *AtHMGb1*, e é o possível homólogo de CshMG.

A detecção da proteína AtHMGB1 no mutante de *Arabidopsis thaliana* era esperada uma vez que o mutante adquirido do banco de germoplasma é heterozigoto. Porém, como as amostras estão praticamente normalizadas é possível observar uma menor expressão da proteína na planta *hmgb-1*.

Como mostrado na figura 30, foi possível observar que houve imunoprecipitação da proteína CsHMG do extrato protéico de citros, porém não foi possível a detecção nem a imunoprecipitação de PthA superexpressa. Possivelmente essa detecção não foi possível devido à dificuldade na separação das cadeias pesadas e leves presentes no soro policlonal, ou ainda pela lise não efetiva das células e a liberação de poucas proteínas.

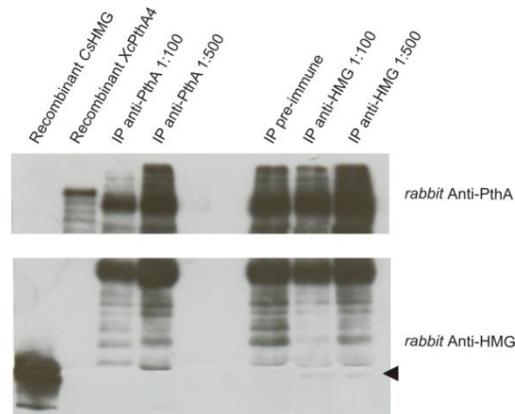


Figura 30 – A proteína CsHMG endógena pôde ser imunoprecipitada porém não houve co-precipitação de um complexo com PthA – O ensaio de co-imunoprecipitação foi realizado com extratos de epicótilos transformados superexpressando PthA4. Os soros anti-PthA e anti-HMG foram utilizados para imunoprecipitação de proteínas pela conjugação com a resina proteína A-sepharose, em ensaios independentes. A resina foi eluída e então submetida a SDS-PAGE para análises por *western blot*. A membrana foi revelada com os anticorpos primários Anti-HMG e Anti-PthA. A seta escura indica a banda correspondente à proteína CsHMG imunoprecipitada.

Devido à boa especificidade e título do anticorpo anti-HMG alguns testes preliminares de co-imunoprecipitação foram efetuados. Esses ensaios são importantíssimos para a confirmação das interações *in planta* com proteínas endógenas, gerando maior confiabilidade na descrição das interações e possibilitando também o uso de técnicas de imunohistoquímica para a caracterização do papel funcional das interações.

4.19 Tentativas de cristalização de 6xhis-CsHMG.

Com o objetivo de obter dados cristalográficos da proteína HMG de citros, foram realizados *screening* preliminares de cristalização da proteína fusionada com cauda de histidina usando os kits de matriz como descrito anteriormente. Em várias condições, após quatro semanas, foram observados pequenos esferolitos (Figura 31). Uma condição se destacou, surgindo esferolitos maiores e mais numerosos após um mês de observação. Essa condição era composta por 200 mM formato de magnésio e 20% w/v PEG-3350.

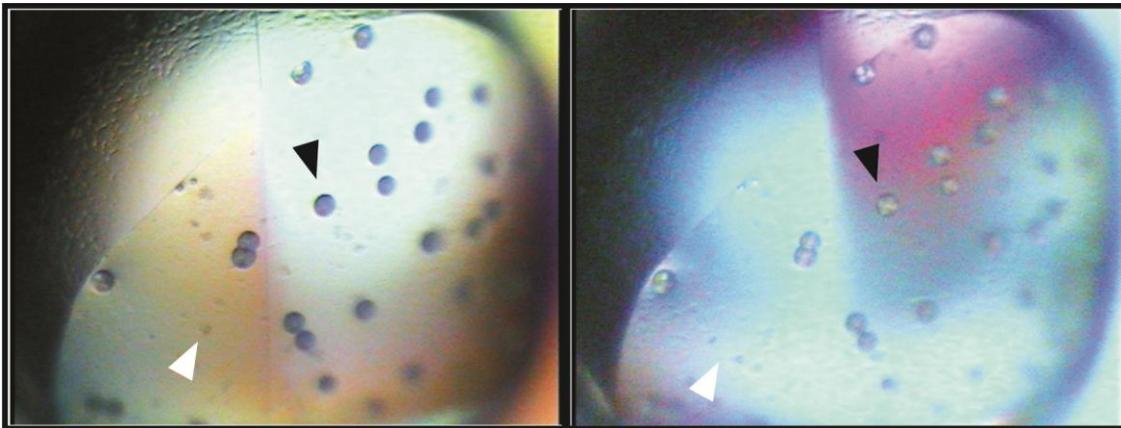


Figura 31 – Presença de cristais na condição 200 mM formato de magnésio e 20 %w/v PEG-3350 – As setas escuras indicam a presença de numerosos esferolitos. As setas brancas indicam a presença de prováveis precipitados de proteína, que podem sugerir algum tipo de processo de cristalização em andamento.

Não há registro em bancos de dados de estruturas de proteínas HMG e nem do domínio HMG-box em plantas. CsHMG possui características muito interessantes devido às porções básica e ácida nas regiões flanqueadoras do HMG-box e a estrutura tridimensional de uma HMGB poderia ajudar a elucidar a função desses domínios na interação com outras proteínas e também com o DNA e RNA.

5. Considerações Gerais e Perspectivas

O mecanismo molecular pelo qual Xac induz os sintomas do cancro em citros não é inteiramente conhecido, porém proteínas efetoras da família PthA/AvrBs3 são necessárias ao desenvolvimento de hiperplasia e hipertrofia. Embora estudos demonstrem a importância das proteínas PthA na patogenicidade, a maneira como PthAs ativam a transcrição e quais são seus genes alvos ainda não está claro. Xac possui, como citado, quatro variantes de PthA que variam quanto ao número de repetições na região central da proteína. Embora exista uma pressão seletiva para que Xac as carregue em seu genoma, é desconhecido o papel funcional de cada uma delas, mesmo que demonstrado que as proteínas dessa família atuam como fatores de transcrição. PthAs podem contudo, formar heterômeros funcionais diversificados (Domingues *et al*, 2010), sugerindo a possibilidade da formação de complexos multiméricos. De fato, complexos desse tipo são comuns em plantas, como os fatores envolvidos na regulação do desenvolvimento floral (Robles & Pelaz, 2005). Esses complexos multiméricos de PthA podem possibilitar uma mudança diversificada e acentuada no transcriptoma na planta, como o verificado em folhas de citros infiltradas com Xac (Cernadas, 2008).

O processo de regulação da transcrição gênica em eucariotos é complexo e envolve além de especificidade na ligação com o DNA, complexas redes de interação proteína-proteína compostas por outros fatores de transcrição e proteínas regulatórias. Sendo PthA uma proteína bacteriana que age como um fator de transcrição eucarioto, é esperado que ela seja alvo de interações com proteínas do hospedeiro envolvidas com a regulação da transcrição gênica, como as interações com ARF e HMG descritas nesse trabalho.

A caracterização da interferência direta de PthA na sinalização molecular de auxinas pode abrir um novo alvo de interferência humana não só no caso de citros, mas de outras espécies vegetais afetadas por patógenos. Além disso, visto que a principal forma de controle do cancro cítrico é a erradicação, consideramos que a obtenção de plantas resistentes à Xac baseadas nesses estudos poderão ser extremamente úteis no controle dessa doença.

Estudos para caracterizar a relevância biológica da interação ARF-PthA incluem: ensaios de ligação *in vitro* com DNA, para confirmar a ligação dos dois fatores nas regiões indicadas como prováveis sítios de ligação dessas proteínas no promotor da expansina de citros e ensaios de transativação do gene repórter *in*

vivo, para verificar o efeito do complexo identificado na regulação gênica da expansina. Além desses ensaios é muito importante a realização do silenciamento gênico de CsARF e a análise global de expressão gênica para a caracterização dessa proteína como um repressor e o efeito do seu silenciamento gênico no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico.

Com relação ao papel biológico da interação de CsHMG com PthA, estudos visando o provável efeito de aumento da afinidade de PthA pelos seus alvos no DNA de promotores através da interação com CsHMG deverão ser conduzidos, através de ensaios competitivos *in vitro*. Além disso, experimentos visando a caracterização do papel biológico dessas proteínas deverão ser realizados, como o silenciamento desse gene e análises de expressão gênica global por *microarray*.

Finalmente, o estudo biofísico e bioquímico de CsHMG revelou uma função até então desconhecida para proteínas dessa família e provavelmente essa função não é restrita para citros, dada a conservação do domínio HMG-box. Estudos visando o entendimento do papel biológico da interação dessa proteína com RNA poderão ser muito importantes, até mesmo para a compreensão de doenças relacionadas com proteínas HMG em humanos como câncer e doenças inflamatórias. Para isso a finalização do mapeamento dos resíduos envolvidos na interação por RMN e a resolução da estrutura tridimensional de CsHMG são essenciais.

6. Conclusões

- 1) CsHMG e CsARF interagem tanto *in vitro* quanto *in vivo* com todas as variantes de PthA, com exceção de PthA1 que não interage com CsARF. No caso de CsHMG, a interação envolve o domínio LRR, enquanto para CsARF a interação envolve as regiões repetitivas.
- 2) Os domínios C-terminal Aux/IAA de CsARF e B3 estão envolvidos na interação com as variantes de PthA. Um provável alvo de ligação no DNA pode ser encontrado na região 5'UTR da expansina. Essa região possui uma sequência elementos semelhantes do promotor do gene *Upa10*, induzido por AvrBs3 e um box semelhante ao AuxRE, flanqueando o TATA box. Os dados sugerem que essa possível região promotora é um alvo conjunto de CsARF e PthA, pelo menos *in vitro*.
- 3) CsHMG liga DNA inespecificamente, mas também pode interagir com RNA. A interação com RNA é específica para sondas ricas em uracila e somente o domínio conservado HMG-box é suficiente para promover uma interação específica, pelo menos *in vitro*. CsHMG possui estrutura secundária rica em alfa-hélices e *random coils*, o que impossibilita estudos por RMN da proteína inteira. Porém, o domínio central HMG-box é um bom alvo para estudos de interação por RMN, sendo composto majoritariamente por alfa-hélices e é bem estruturado.

7. Referências bibliográficas

- Abel, S. & Theologis, A. Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**, 9-17(1996).
- Aderem, A. & Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-7(2000).
- Al-Saadi, A, *et al.* All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one pthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 934-43(2007).
- Altenbach, D. & Robatzek, S. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1031-9(2007).
- Assmann, E.M, *et al.* FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *J Biol Chem* **281**, 9869-81(2006).
- Bell, A.J, *et al.* Interactions of recombinant HMGB proteins with branched RNA substrates. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 262-7(2008).
- Boch J, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. **11**;326(5959):1509-12. (2009).
- Bonvin AM, *et al.* NMR analysis of protein interactions. *Curr Opin Chem Biol*. **9**(5):501-8. (2005).
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, **4** (3):141-157(2003)
- Büttner, D. & Bonas, U. Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* **21**, 5313-22(2002).
- Cao, H., *et al.* Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 259-84(2001).
- Cavalar, M, *et al.* The interaction of DOF transcription factors with nucleosomes depends on the positioning of the binding site and is facilitated by maize HMGB5. *Biochemistry* **42**, 2149-57(2003).
- Cercós, Gómez-Cadenas & Ho J. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *Plant J* **19**, 107-118(1999).
- Cernadas, R.A, *et al.* Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol Plant Pathol* **9**, 609-31(2008).
- Civerolo, E.L. Bacterial canker disease of citrus. *J Rio Grande Valley Hort Assoc.*, **37**:127-146(1984).

- Chen, Z, *et al.* Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20131-6(2007).
- Cheng, L.W. & Schneewind, O. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* 8, 214-20(2000).
- Cole M, *et al.* DORNROSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the Arabidopsis embryo. *Development*. 136(10):1643-51. (2009).
- Chung, K. & Sano, H. Transactivation of wound-responsive genes containing the core sequence of the auxin-responsive element by a wound-induced protein kinase-activated transcription factor in tobacco plants. *Plant Mol Biol* 65, 763-73(2007).
- Coaker, G, *et al.* Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308, 548-50(2005).
- da Silva, A.C.R, *et al.* Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. *Nature* 417, 459-63(2002).
- Das, D. & Scovell, W.M. The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *J Biol Chem* 276, 32597-605(2001).
- Day, B, *et al.* Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. *Plant Cell* 17, 1292-305(2005).
- Ding, X, *et al.* Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice, *Plant Cell*. 20 228–240. (2008)
- Domingo C, *et al.* Constitutive expression of OsGH3.1 reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice, *Mol. Plant Microbe Interact*. 22 201–210. (2009)
- Domingues, M.N, *et al.* The Xanthomonas citri effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination, and inhibits K63-linked ubiquitination associated with DNA repair. *Mol Plant Pathol – aceito*. (2010);
- Duan, Y.P. *et al.* Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant-Microbe Interact*. 12 (6):556-560(1991)
- Ellis, C.M, *et al.* AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development* 132, 4563-74(2005).
- Dharmasiri, N. & Estelle, M. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* 9, 302-8(2004).
- Felix, G, *et al.* Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial

flagellin. *Plant J* **18**, 265-76(1999).

Fukaki, H, *et al.* PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation. *Plant J* **48**, 380-9(2006).

Gietz, R.D & Woods R.A. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Met Enzymol* **350**:87-96 (2002).

Cernadas RA, Benedetti CE (2009) Role of Auxin and Gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Plant Sci.* **177**: 190-195

Gómez-Gómez, L. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol Immunol* **41**, 1055-62(2004).

Gómez-Gómez, L. & Boller, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**, 251-6(2002).

Gottwald, T.R. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*(2002).

Grasser, K.D. Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *Plant J* **7**, 185-92(1995).

Grasser, K.D. Chromatin-associated HMGA and HMGB proteins: versatile co-regulators of DNA-dependent processes. *Plant Mol Biol* **53**, 281-95(2003).

Grasser, M, *et al.* The Arabidopsis genome encodes structurally and functionally diverse HMGB-type proteins. *J Mol Biol* **358**, 654-64(2006).

Grasser, M, *et al.* Basic and acidic regions flanking the HMG-box domain of maize HMGB1 and HMGB5 modulate the stimulatory effect on the DNA binding of transcription factor Dof2. *Biochemistry* **46**, 6375-82(2007).

Grasser, K.D, *et al.* High mobility group proteins of the plant HMGB family: dynamic chromatin modulators. *Biochim Biophys Acta* **1769**, 346-57 (2007).

Gürlebeck, D, *et al.* Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J* **42**, 175-87(2005).

Gürlebeck, D, *et al.* Type III effector proteins from the plant pathogen Xanthomonas and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol* **163**, 233-55(2006).

Guilfoyle, T.J. & Hagen, G. Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 453-60(2007).

Handwerger, K.E. & Gall, J.G. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* **16**, 19-26(2006).

Hagen, G. & Guilfoyle, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**, 373-85

Harper, R.M, *et al.* The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial Arabidopsis tissue. *Plant Cell* **12**, 757-70(2000).

Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9(2006).

Kay, S, *et al.* A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**, 648-51(2007).

Kim, J., Harter, K. & Theologis, A. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11786-91(1997).

Kim, H, *et al.* The Pseudomonas syringae effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6496-501(2005).

Kim, M.G, *et al.* Two Pseudomonas syringae type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* **121**, 749-59(2005B).

Krohn, N.M, *et al.* Specificity of the stimulatory interaction between chromosomal HMGB proteins and the transcription factor Dof2 and its negative regulation by protein kinase CK2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **277**, 32438-44(2002).

Launholt, D, *et al.* Arabidopsis chromatin-associated HMGA and HMGB use different nuclear targeting signals and display highly dynamic localization within the nucleus. *Plant Cell* **18**, 2904-18(2006).

Li, H, *et al.* Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in Arabidopsis. *Dev Cell* **7**, 193-204(2004).

Li, Y., Jones, L. & McQueen-Mason, S. Expansins and cell growth. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 603-10(2003).

Lildballe, D.L, *et al.* The expression level of the chromatin-associated HMGB1 protein influences growth, stress tolerance, and transcriptome in Arabidopsis. *J Mol Biol* **384**, 9-21(2008).

Liscum, E. & Reed, J.W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**, 387-400 (2002).

Mackey, D, *et al.* RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-54(2002).

Mackey, D, *et al.* Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-89(2003).

- Marois, E, *et al.* The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* 15(7):637-46. (2002).
- McCann, H.C. & Guttman, D.S. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol* 177, 33-47(2008).
- McDonald, P.N. Two-hybrid: Methods and Protocols. Humana Press (2001).
- Melotto, M, *et al.* Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-80(2006).
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 11;326(5959):1501. (2009)
- Nag, R., Maity, M.K. & Dasgupta, M. Dual DNA binding property of ABA insensitive 3 like factors targeted to promoters responsive to ABA and auxin. *Plant Mol Biol* 59, 821-38(2005).
- Navarro, L, *et al.* A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling, *Science* 312 436–439 (2006).
- Neves, E.M *et al.* Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros, 1996-2000. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal*, 23: 432-436(2001).
- Nürnberger, T. & Brunner, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* 5, 318-24(2002).
- Okushima, Y, *et al.* AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* 43, 29-46(2005).
- Prithiviraj, B, *et al.* Plant models for animal pathogenesis. *Cell Microbiol* 7, 315-24(2005).
- Robert-Seilaniantz, A, *et al.* Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10, 372-9(2007).
- Robles, P. & Pelaz, S. Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* 49, 633-43(2005).
- Rodrigues Neto, J& Baldini Ribeiro, J.G. Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico. Editado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento /SDA/DDIV – Brasília(2002).
- Rogg, L.E. & Bartel, B. Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. *Dev Cell* 1, 595-604(2001).
- Römer, P, *et al.* Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318, 645-8(2007).
- Römer P, *et al.* A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors

- from disparate pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;**106**(48):20526-31 (2009).
- Sambrook & Russel. *Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Fourth Edition, 2001.*
- Sanij E, Hannan RD. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* Aug;4(6):374-82 (2009).
- Schruff, M.C, *et al.* The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**, 251-61(2006).
- Shin, R, *et al.* The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *Plant Cell* **19**, 2440-53(2007).
- Stavrinos, J, *et al.* Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cell Microbiol* **10**, 285-92(2008).
- Stros, M, *et al.* The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2590-606(2007).
- Swaminathan, K, *et al.* The plant B3 superfamily. *Trends Plant Sci* **13**, 647-55(2008).
- Szurek, B, *et al.* Eukaryotic features of the Xanthomonas type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**, 523-34(2001).
- Szurek, B, *et al.* Type III-dependent translocation of the Xanthomonas AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**, 13-23(2002).
- Swarup, S *et al.* A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology.* 81:802-809(1991).
- Swarup, S, *et al.* An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Microbe-Plant Interact.* 5: 204-213(1992).
- Tampakaki, A.P, *et al.* Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**, 805-16(2004).
- Tan, X, *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-5(2007).
- Teale, W.D, *et al.* Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 847-59(2006).
- Thomas, J.O. & Travers, A.A. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **26**, 167-74(2001).
- Thomsen, M.S, *et al.* Interactions of the basic N-terminal and the acidic C-terminal domains of the maize chromosomal HMGB1 protein. *Biochemistry* **43**, 8029-37(2004).

- Tian, C, *et al.* Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of Arabidopsis affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J* **40**, 333-43(2004).
- Tiwari, S.B, *et al.* The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**, 533-43(2003).
- Tiwari, S.B, *et al.* Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**, 533-43(2004).
- Ulmasov, T, *et al.* Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7**, 1611-23(1995).
- Ulmasov, T, *et al.* ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-8(1997).
- Ulmasov, T, *et al.* Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-71(1997).
- Ulmasov, T, *et al.* T.J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5844-9(1999).
- Ulmasov, T. *et al.* Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* **19**(3):309-19. (1999B).
- Underhill, D.M. & Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**, 103-10(2002).
- Van den Ackerveken, G, *et al.* Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**, 1307-16(1996).
- van Gent, D.C, *et al.* Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J* **16**, 2665-70(1997).
- van der Hoorn, R.A.L. & Kamoun, S. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009-17(2008).
- Vert, G, *et al.* Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9829-34(2008).
- Wang, H, *et al.* The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* **17**, 2676-92(2005).
- Webster, C.I, *et al.* HMG-1 enhances HMG-I/Y binding to an A/T-rich enhancer element from the pea plastocyanin gene. *Eur J Biochem* **268**, 3154-62(2001).

Weijers, D, *et al.* Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* **24**, 1874-85(2005).

Weiss, D. & Ori, N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol* **144**, 1240-6(2007).

Zipfel, C. Rathjen J.P. Plant immunity: AvrPto targets the frontline. *Curr Biol.* **11:18**(5):R218-20. (2008)

Anexo

8. 1 Artigo Aceito em Colaboração

MOLECULAR PLANT PATHOLOGY

DOI: 10.1111/J.1364-3703.2010.00636.X

The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair

MARIANE NORONHA DOMINGUES¹, TIAGO ANTONIO DE SOUZA¹, RAÚL ANDRÉS CERNADAS^{1,†}, MARIA LUIZA PEIXOTO DE OLIVEIRA¹, CÁSSIA DOCENA^{2,‡}, CHUCK SHAKER FARAH² AND CELSO EDUARDO BENEDETTI^{1,*}

¹Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, R. Giuseppe Máximo Scolfaro 10000, Campinas, SP, CP6192, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

SUMMARY

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* utilizes the type III effector protein PthA to modulate host transcription to promote citrus canker. PthA proteins belong to the AvrBs3/PthA family and carry a domain comprising tandem repeats of 34 amino acids that mediates protein–protein and protein–DNA interactions. We show here that variants of PthAs from a single bacterial strain localize to the nucleus of plant cells and form homo- and heterodimers through the association of their repeat regions. We hypothesize that the PthA variants might also interact with distinct host targets. Here, in addition to the interaction with α -importin, known to mediate the nuclear import of AvrBs3, we describe new interactions of PthAs with citrus proteins involved in protein folding and K63-linked ubiquitination. PthAs 2 and 3 preferentially interact with a citrus cyclophilin (Cyp) and with TDX, a tetratricopeptide domain-containing thioredoxin. In addition, PthAs 2 and 3, but not 1 and 4, interact with the ubiquitin-conjugating enzyme complex formed by Ubc13 and ubiquitin-conjugating enzyme variant (Uev), required for K63-linked ubiquitination and DNA repair. We show that Cyp, TDX and Uev interact with each other, and that Cyp and Uev localize to the nucleus of plant cells. Furthermore, the citrus Ubc13 and Uev proteins complement the DNA repair phenotype of the yeast $\Delta ubc13$ and $\Delta mms2/uev1a$ mutants, strongly indicating that they are also involved in K63-linked ubiquitination and DNA repair. Notably, PthA 2 affects the growth of yeast cells in the presence of a DNA damage agent, suggesting that it inhibits K63-linked ubiquitination required for DNA repair.

INTRODUCTION

Citrus canker, caused by the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, is characterized by water-soaked eruptions and pustule formation on the surface of the host plant (Brunings and Gabriel, 2003). Although it is known that canker lesions result from the intense division and expansion of the host cells at the site of infection, the molecular events leading to cell hypertrophy and hyperplasia are not fully comprehended. Previous studies have shown that *X. axonopodis* pv. *citri* infection changes the transcription of a large set of host genes associated with cell division and expansion, including genes involved in ribosome biogenesis, cell wall remodelling, vesicle trafficking, and the synthesis and mobilization of auxin and gibberellin (Cernadas *et al.*, 2008). The expression of the cell wall remodelling genes, as well as those involved in the synthesis and mobilization of auxin and gibberellin, was shown to be similarly regulated by auxin and gibberellin, indicating that *X. axonopodis* pv. *citri* changes the active contents of both hormones to promote cell division and enlargement (Cernadas and Benedetti, 2009). Indeed, it was found that both auxin and gibberellin are required for canker development and that polar transport of auxin and vesicle trafficking mediate this process (Cernadas and Benedetti, 2009; Cernadas *et al.*, 2008).

The transcriptional changes associated with the growth and expansion of citrus cells in response to *X. axonopodis* pv. *citri* infection are thought to be triggered by the Type III effector protein PthA. PthA is recognized as the major determinant of *X. axonopodis* pv. *citri* pathogenicity (Al-Saadi *et al.*, 2007; Brunings and Gabriel, 2003). This protein is required for pathogen growth and canker elicitation, and is sufficient to promote hypertrophy and hyperplasia in citrus (Duan *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 1991, 1992). PthA belongs to the AvrBs3/PthA protein family. Members of this family, also known as transcription activator-like (TAL) effectors, are translocated by the Type III secretion system

*Correspondence: Email: celso@lnls.br

†Present address: Department of Plant Pathology, Iowa State University, Ames, IA, USA.

‡Present address: Fundação Osvaldo Cruz, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

8.2 Prêmios recebidos em Congressos

- Menção Honrosa de Melhor Poster Apresentado no II Simpósio Brasileiro de Genética e Biologia Molecular de Plantas, Sociedade Brasileira de Genética – SBG (Abril – 2009)

Trabalho Apresentado: SOUZA, T. A., DOMINGUES, M. N., CERNADAS, R. A., DOCENA, C., FARAH, S.C., BENEDETTI, C.E. **Interaction between a plant Auxin Response Factor and the effector protein PthA.**

- SBBq Award - Melhor Poster da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, SBBq (Maio – 2009)

Trabalho Apresentado: SOUZA, T. A., QUARESMA, A. J. C., ZERI, A.C., BENEDETTI, C.E. **RNA binding properties of a citrus High Mobility group Protein involved in transcriptional control.**

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada “**Caracterização Molecular da Interação entre Proteínas de Citros Envolvidas no Controle da Expressão Gênica e a Proteína Efetora Bacteriana PthA, Indutora do Cancro Cítrico**”

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança CIBio – Comissão Interna de Biossegurança da ABTLus – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron: Caracterização molecular da interação entre proteínas envolvidas no controle da expressão gênica e a proteína efetora PthA, sob Protocolo(s) nº CEB 04.03.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ac trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Tiago Antonio de Souza


Orientador: Dr. Celso Eduardo Benedetti

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome:


Prof. Dra. HELENA COUTINHO DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP