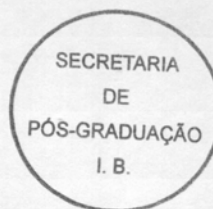


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FLAVIA VISCHI WINCK

**“ESTUDO DAS PROTEÍNAS HrpF E AvrXacE2 NA
PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FLAVIA VISCHI WINCK
M. Machado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Biologia Funcional e
Molecular, na área de
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Machado

Campinas, 2007.

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

W721e

Winck, Flavia Vischi
Estudo das proteínas HrpF e AvrXacE2 na
patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri /
Flavia Vischi Winck. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Marcos Antônio Machado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteômica. 2. Proteínas - Análise. 3.
Xanthomonas axonopodis pv. citri. 4. Citros. 5.
Patogenicidade. I. Machado, Marcos Antônio. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Título em inglês: Study of the proteins HrpF and AvrXacE2 in pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Palavras-chave em inglês: Proteomics; Proteins - Analysis; *Xanthomonas axonopodis* pv. citri; Citrus; Pathogenicity.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marcos Antônio Machado, Carlos Alberto Labate, Sérgio Marangoni.

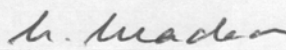
Data da defesa: 23/07/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 23 de julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

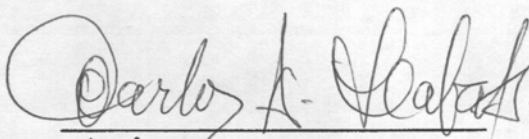
Prof. Dr. Marcos Antônio Machado (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

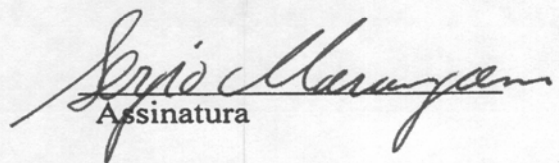
Prof. Dr. Carlos Alberto Labate


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

Dedico esta dissertação à minha mãe, por incentivar-me em todos os momentos, mesmo diante dos obstáculos impostos pela vida.

Ofereço este trabalho a todas as pessoas que assim como eu escolheram a educação como um caminho de transformação social e humana.

Agradeço especialmente aos meus mentores Prof. Dr. José Camillo Novello
e Prof. Dr. Sérgio Marangoni pela confiança, apoio e pleno incentivo
durante minha trajetória acadêmica e profissional.

AGRADEÇO,

Ao Prof. Dr. Marcos Machado, pela confiança, orientação e pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de trabalho.

Ao Dr. Alexandre Morais do Amaral pela sua especial contribuição de co-orientação neste trabalho.

À Prof^a Anete e aos colegas do laboratório de genética de microrganismos (CBMEG-UNICAMP) por me receberem muito bem, em especial Dr. Luciana Kauer, por me orientar nos ensaios de expressão de proteínas.

Ao Prof. Chuck Farah e a Paola (USP) pela ajuda nos ensaios de expressão de proteínas.

Aos colegas e amigos do laboratório de biotecnologia (CCSM) que proporcionaram bons momentos de amizade e companheirismo.

À Dr.^a Luisa, Dr.^a Mariângela e a Juliana “Baiana”, pelas viagens diárias ao CCSM, recheadas de divertidíssimas histórias e muitos risos.

À Mestre Juliana Baptista pela sua cooperação, por todos os ensinamentos que me concedeu e pela valiosa amizade que frutificou de nosso convívio.

Aos amigos do laboratório de proteômica (UNICAMP) e do laboratório de química de proteínas (LAQUIP) que me ajudaram nos trabalhos, confiaram em mim e participaram para que meus dias fossem mais felizes.

Ao meu amado companheiro Fabiano, pela paciência, compreensão e pelo seu amor.

Aos meus queridos irmãos, Orlando e Paula, por terem vivido tantas coisas que serviram de exemplo para mim, e por terem propiciado a continuação de meus estudos. Agradeço a eles também pelo apoio e pelos bons momentos de nossas vidas.

Às minhas tias Maria e Darcy, e ao meu tio Orivaldo que me apoiaram na minha escolha profissional, respeitaram minhas decisões e estiveram sempre presentes nos momentos de minha vida em que eu mais precisei. Aos meus primos Lucas, Luis e Leonardo pelos churrascos em família e pelos eternos momentos de alegria.

À Deus, por nunca me desamparar e sempre me ofertar boas oportunidades na vida, tornado concretos todos os meus sonhos.

À todos aqueles que de alguma maneira participaram deste trabalho, muito obrigado!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. A CITRICULTURA, O CANCRO CÍTRICO E A BACTÉRIA <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV CITRI3	
2.2. INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO	7
2.3. PATOGENICIDADE DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV CITRI.....	10
2.4.1. Sistema de secreção tipo III e genes <i>hrp</i>	10
2.4.2. Genes de avirulência (<i>avr</i>).....	12
2.5. GENOMA FUNCIONAL: MUTAGÊNESE E ANÁLISE PROTEÔMICA	16
2.5.1. Mutagênese.....	16
2.5.2. Análise proteômica.....	18
3.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. LINHAGENS BACTERIANAS.....	22
3.2. MANIPULAÇÃO DE DNA	24
3.2.1 Extração do DNA genômico de <i>Xac</i>	24
3.2.2 Minipreparação plasmidial.....	25
3.2.3. Purificação e quantificação de DNA	25
3.2.4. Desenho de oligonucleotídeos.....	26
3.2.5. Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	28
3.2.6 Digestões e reações de ligação	28
3.3 MUTAGÊNESE DE XAC PARA ROMPIMENTO DOS GENES <i>HRPF</i> E <i>AVRXACE2</i>	29
3.4. ESTUDO <i>IN VIVO</i> DA PATOGENICIDADE DOS MUTANTES <i>HRPF</i> E <i>AVRXACE2</i>	31
3.5. CLONAGEM DOS GENES <i>HRPF</i> E <i>AVRXACE2</i> EM VETORES DE EXPRESSÃO.....	32
3.6. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO	34
3.6.1. Bactérias eletrocompetentes	34
3.6.2. Bactérias quimiocompetentes.....	35
3.6.3. Transformação de células competentes	35
3.7. SEQUENCIAMENTO DE DNA	36
3.8. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	36
3.8.1. Testes de indução da expressão de proteínas	37
3.8.2. Extração e purificação de proteínas com tampão fosfato.....	38
3.8.3 Extração e purificação de proteínas com tampão Tris-HCl.....	39
3.9 TESTE DE INTERAÇÕES DA PROTEÍNA <i>AVRXACE2</i>	40

3.10. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS	42
3.11. ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEÍNAS DE XAC SELVAGEM <i>VERSUS</i> XAC 306ΔXAC0394	42
3.12. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISE DE IMAGEM	44
3.13. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	45
3.14. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS	46
4.0. RESULTADOS.....	47
4.1 CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE XAC MUTANTES PARA OS GENES <i>HRPF</i> E <i>AVRXACE2</i>	47
4.2 CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO E INTEGRAÇÃO PLASMIDIAL NOS MUTANTES DE XAC.....	48
4.4 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DO EFEITO DA MUTAGÊNESE DOS GENES <i>HRPF</i> E <i>AVRXACE2</i> NA PATOGENICIDADE DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV CITRI	50
4.5 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS <i>AVRXACE2</i> E <i>HRPF</i>	51
4.6 ANÁLISE DE INTERAÇÕES DA PROTEÍNA <i>AVRXACE2</i>	59
4.7 ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEÍNAS EXPRESSAS POR XAC SELVAGEM E XAC 306ΔXAC0394.	60
5.0 DISCUSSÃO	65
6.0 CONCLUSÕES	73
7.0 ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO AO TRABALHO	74
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sintomas do cancro cítrico	5
Figura 2	Erradicação de plantas de citros	5
Figura 3	Mutagênese por integração plasmidial	17
Figura 4	Mapa do vetor pK18mobGUSII.	30
Figura 5	Teste de patogenicidade.	32
Figura 6	Mapas de vetores de expressão	33
Figura 7	Teste de interação de proteínas.	41
Figura 8	Representação da Mutagênese em Xac.	47
Figura 9	Confirmação de mutagênese por PCR	48
Figura 10	Confirmação de evento único de recombinação por <i>Southern blot</i>.	49
Figura 11	Teste <i>in vivo</i> da patogenicidade de Xac	50
Figura 12	Clonagem e expressão de genes	51
Figura 13	Extração de proteínas recombinantes	52
Figura 14	Géis de eletroforese das purificações de AvrXacE2.	53
Figura 15	Testes de expressão da proteína HrpF.	54
Figura 16	Géis de eletroforese de proteínas dos testes de indução da expressão	55
Figura 17	Predição de estrutura secundária da proteína AvrXacE2	57
Figura 18	Predição de estrutura secundária da proteína HrpF	58
Figura 19	Análise de interações entre proteínas citoplasmáticas de Xac e AvrXacE2 recombinante	59
Figura 20	Géis de eletroforese bidimensional de proteínas	61
Figura 21	Análise comparativa de géis 2D	62
Figura 22	Proteínas “pericelulares”	62
Figura 23	Identificação de proteínas	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas de avirulência membros da família AvrBs3	13
Tabela 2	Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados no trabalho	22
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das seqüências de interesse	26
Tabela 4	Condições utilizadas nos testes de indução da expressão de proteínas.	38
Tabela 5	Características preditas para as proteínas AvrXacE2 e HrpF	56
Tabela 6	Proteínas de Xac identificadas por <i>peptide-mass fingerprint</i>.	64

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac) é o agente causador do cancro cítrico, doença que leva a severas perdas econômicas devido à contaminação e à erradicação de plantas de citros. Com o sequenciamento completo do genoma de Xac, vários genes supostamente envolvidos com a patogenicidade de Xac foram identificados. Os genes ligados à resposta de hipersensibilidade (*hrp*) e avirulência (*avr*) em geral estão relacionados à patogenicidade de *Xanthomonas*, entretanto, poucos estudos funcionais destes genes de Xac foram feitos. Foram construídas linhagens mutantes de Xac para a perda de função dos genes *hrpF* e *avrXacE2* e, nas análises *in vivo*, foi verificado que *hrpF* está envolvido na patogenicidade de Xac e é essencial para a manifestação dos sintomas primários da doença. A mutação de *avrXacE2* não provocou alterações na capacidade de Xac em provocar os sintomas do cancro, portanto, este gene não parece ser essencial para a patogenicidade da bactéria, podendo não estar envolvido diretamente na patogenicidade de Xac. Os genes *hrpF* e *avrXacE2* foram clonados em vetores de expressão e foram realizados testes de indução da expressão destas proteínas em sistemas heterólogos. Somente a proteína AvrXacE2 foi expressa, purificada e submetida a teste de interação com as proteínas citoplasmáticas da linhagem mutante de Xac para o gene *avrXacE2*. Os testes de interações não confirmaram a identificação de proteínas com afinidade específica pela proteína recombinante AvrXacE2. A proteína HrpF não foi super-expressa em sistema heterólogo. Nas análises de proteoma comparativo da linhagem de Xac selvagem *versus* linhagem mutante para o gene *hrpF*, foram detectadas alterações na expressão de proteínas citoplasmáticas e "pericelulares". Com base nas observações pode-se supor que HrpF possa influenciar processos celulares relacionados à respostas à situações de estresse e não somente atuar na translocação de moléculas efetoras via T3SS. A partir do que foi exposto neste trabalho, sugere-se que as técnicas de estudos funcionais de genes e análises proteômicas podem conjuntamente permitir que novos mecanismos relacionados a patogenicidade de Xac sejam interpretados. Com os mutantes produzidos neste estudo, espera-se criar condições para novos ensaios funcionais visando a melhor compreensão da patogenicidade de Xac e buscar novas formas de combate ao cancro cítrico.

ABSTRACT

The bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac) is the causative agent of the citrus canker disease, which leads to economic losses due the contamination and eradication of citrus plants. The complete sequencing of its genome identified a number of genes supposedly involved with pathogenicity. Genes that code for hypersensitivity response (*hrp*) and avirulence (*avr*), in general, are related to the pathogenicity of *Xanthomonas*, however, only a few functional studies of these genes in Xac have been made. Here we report findings based on genomics and proteomics methods for Xac. Mutant strains of Xac for genes *hrpF* and *avrXacE2* and *in vivo* assays demonstrated that *hrpF* is strongly involved in the pathogenicity of Xac and is essential for the manifestation of the primary symptoms of the citrus canker. On the other hand, the lack of *avrXacE2* expression did not result in modifications in the capacity of Xac to elicit the symptoms of canker, therefore, this gene does not seem to be essential for the pathogenicity of the bacterium. The genes *hrpF* and *avrXacE2* were cloned in expression vectors and tests of induction of the expression of these proteins in heterologous systems were carried out. The protein AvrXacE2 was expressed, purified and tested on interaction assays with cytoplasmic proteins of the mutant of Xac for the gene *avrXacE2*. The tests of interactions had not confirmed the identification of proteins with specific affinity for the recombinant protein AvrXacE2. The protein HrpF was not over-expressed in heterologous system. In the comparative proteome of the wild versus mutant strains for *hrpF*, modifications in the cytoplasmic protein expression and "pericellular" expression levels were detected. We postulate that, besides acting as a translocator of molecules through T3SS, HrpF may influence stress-related cellular responses. Thus, it is an opportune time to highlight the new and different ways in which HrpF serves Xac function. Moreover, we can assume that the techniques of functional genomics and proteomics analyses will clarify the mechanisms of pathogenicity used by Xac to cause citrus canker and, thus, enable the search for additional information to control the disease.

1. INTRODUÇÃO

Com o completo seqüenciamento do genoma da bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv citri (Xac), muitos genes tornaram-se alvo de estudos devido à possível participação na patogenicidade deste fitopatógeno. O cancro cítrico afeta a maioria das variedades comerciais de citros e causa perdas econômicas significativas em várias partes do mundo, entretanto, atualmente seu controle se restringe às medidas preventivas e curativas que envolvem a erradicação de plantas infectadas (STALL & CIVEROLO, 1993; DA SILVA et al., 2002).

A patogenicidade de Xac aparentemente não pode ser atribuída à atuação isolada de uma proteína, e deve possivelmente decorrer por múltiplos fatores. A seleção de proteínas alvo e o estudo funcional destas moléculas com abordagens de mutagênese e análise de proteomas mostram-se como formas interessantes de reconhecimento dos mecanismos moleculares relacionados à patogenicidade, ampliando as possibilidades para traçarem-se possíveis redes de organização funcional celular de Xac.

Dois dentre os diversos genes-alvo de Xac supostamente envolvidos com a patogenicidade foram escolhidos para os estudos funcionais: *hrpF* (XAC0394) e *avrXacE2* (XAC3224).

Os genes *hrp* estão relacionados ao funcionamento do sistema de secreção tipo III (T3SS), e estudos do gene *hrpF* verificaram que este gene é dispensável para a secreção *in vitro* de proteínas efetoras em *X. campestris* pv. vesicatoria, mas mostrou-se essencial na plena patogenicidade e habilidade de Xac em induzir a resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas não hospedeiras, podendo atuar como translocador de proteínas efetoras para o interior da célula do hospedeiro (ROSSIER et al., 2000; BÜTTNER et al., 2002; KIM et al., 2003; DUNGER et al., 2005).

O gene *avrXacE2* constitui-se de uma seqüência de DNA que apresenta similaridade com o gene *avrPphE* de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, bactéria fitopatogênica para plantas de feijoeiro, que codifica uma proteína efetora relacionada à patogenicidade. A mutação deste gene em *P. syringae* pv. syringae demonstrou redução da HR em plantas não-hospedeiras (tabaco) e redução do crescimento bacteriano em plantas hospedeiras (feijão). O gene *avrXacE2* foi

encontrado super-expresso em Xac cultivada no meio de cultura XVM₂, o qual possui composição que supostamente mimetiza o espaço intercelular de plantas (ASTUA-MONGE et al., 2005).

Através de mutagênese, a importância dos genes *hrp* na patogenicidade de Xac ficou demonstrada com a análise do *cluster* de genes *hrp* desta bactéria (DUNGER et al., 2005). A mutação dos genes *hrp* provocou reduções significativas na capacidade de Xac em induzir os sintomas do cancro cítrico em plantas hospedeiras.

Análises do efeito da mutagênese de oito genes *avr* de *X. campestris* pv. *campestris* feitas por Castañeda et al. (2005) revelaram que a mutação destes genes não promoveu alterações significativas na patogenicidade da bactéria.

Há, portanto, forte indicação de que os genes *hrpF* e *avrXacE2* de Xac possam ser de grande importância na patogenicidade de Xac, o que demonstra a necessidade de mais informações sobre estas proteínas para a compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos com suas possíveis funções e, como consequência, prevê-se a obtenção de alternativas viáveis para uma ação de interferência e redução da patogenicidade de Xac.

Utilizando os recursos da mutagênese e da análise proteômica, o objetivo deste trabalho foi de investigar o possível papel das proteínas-alvo HrpF e AvrXacE2 e, assim, gerar informações relevantes para elucidar o mecanismo de patogenicidade de Xac e contribuir para a busca por novas estratégias de combate ao cancro cítrico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A citricultura, o cancro cítrico e a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Hoje no Brasil, o Estado de São Paulo apresenta o maior percentual de produção de citros e derivados, com mais de 348 mil caixas de laranja (40,8 kg) de mesa e para a indústria, produzidas somente em 2006, correspondendo a um valor de produção de aproximadamente R\$ 3,5 bilhões, em aproximadamente 667 mil hectares plantados.

O Brasil é o país que produz a maior quantidade de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC) no mundo e na safra de 2006 foram obtidos acima de 1,3 milhão de toneladas de SLCC, que foram exportados principalmente para União Européia, NAFTA (Canadá, Estados Unidos e México), Ásia e Mercosul (IEA, 2007).

Análises estatísticas mostraram que em 2006 o Brasil foi o maior produto mundial de laranjas com mais de 18 milhões de toneladas de frutas. Atualmente 58 % da produção de SLCC do mundo é brasileira e isto representa 45 % das exportações mundiais deste produto, fato que o coloca na posição de líder mundial na produção e exportação de suco de laranja concentrado e congelado (FAO, 2006).

Apesar dos bons resultados na produção de laranja, a cultura de citros é alvo constante de inúmeras pragas e doenças que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, são capazes de causar significativos danos à produção. A quantidade e a qualidade das frutas cítricas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos fitossanitários, que, dependendo da intensidade da ocorrência, pode torná-la improdutiva ou levar à sua erradicação (BELASQUE JÚNIOR et al., 2005).

Mesmo utilizando-se toda a tecnologia disponível para alcançar as mais altas taxas de produtividade e reduzir ao máximo as perdas significativas ao setor, o cultivo de citros poderia ser beneficiado com a redução de perdas na produção decorrentes de ataques de patógenos.

Dentre as muitas doenças e pragas que afetam as plantas de citros, podem ser destacadas o cancro cítrico, a clorose variegada do citros (CVC), o declínio, o huanglongbing (ex-greening), a leprose, a tristeza, a gomose, ácaros, cigarrinhas e outras (FUNDECITRUS, 2007).

A doença conhecida como cancro cítrico é causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac), que pertence à família *Xanthomonadaceae*, e afeta todas as variedades de plantas de citros,

incluindo limões, pomelos, limas e laranjas (STALL & CIVEROLO, 1993; DA SILVA et al., 2002, SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram na década de 50 e desde então passou a ser uma doença submetida à rígida supervisão, com erradicação obrigatória (AMARAL, 2003).

O uso de quebra-ventos nos pomares, a utilização de mudas certificadas não contaminadas e o plantio de citros tolerantes, como as tangerinas Poncan e Satsuma, com reconhecido valor comercial, podem ajudar na redução da ocorrência do cancro cítrico. Medidas de desinfestação de veículos, uniformes e objetos de manuseio no campo para evitar a disseminação da bactéria pelas culturas de citros também são extremamente importantes. As medidas curativas incluem pulverização de plantas infectadas com compostos à base de cobre e a erradicação parcial ou total de talhões ou pomares afetados e de outras plantas próximas a um raio mínimo de trinta metros da planta infectada.

O sintoma característico da doença, o cancro, se deve à manifestação local de hiperplasia do mesófilo foliar, podendo ocorrer também em outras partes da planta como frutos e ramos. Toda a parte aérea da planta pode ser afetada pela doença, entretanto os maiores danos ocorrem nas folhas e superfície dos frutos que são contaminados e passam a apresentar pústulas. A excessiva proliferação de células leva à ruptura da epiderme vegetal favorecendo o extravasamento de células de Xac, fato este que potencializa a dispersão das bactérias e a disseminação do cancro cítrico (PRUVOST et al., 2002).

As pústulas podem apresentar halos cloróticos ao seu redor e podem aparecer como lesões necróticas que podem levar ao rompimento da superfície dos frutos. Em decorrência de condições de alta severidade do cancro, ocorre a queda prematura de folhas e frutos, o que pode representar redução na produção de frutos comercializáveis com conseqüentes perdas econômicas significativas para os produtores (Figura 1).



Figura 1. Sintomas do cancro cítrico. (A) Fruto contaminado apresentando lesões pustulares; (B) detalhe das duas faces de uma folha apresentando lesões do estágio avançado do cancro e (C) corte histológico do mesófilo foliar infectado e em fase de ruptura da epiderme foliar devido à hiperplasia. Fonte: A e C (<http://edis.ifas.ufl.edu/PP136>) e B (www.fundecitrus.com.br).

Somente entre janeiro do ano de 2006 e o primeiro trimestre de 2007, mais de dois milhões de plantas de citros foram erradicadas no Estado de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro, por apresentarem contaminação por Xac ou estarem próximas a plantas contaminadas, o que demonstra que o cancro cítrico ainda não é uma doença totalmente controlada e representa uma preocupação constante para a citricultura brasileira (FUNDECITRUS, 2007) (Figura 2).



Figura 2. Erradicação de plantas de citros. (A) Plantas infectadas são retiradas do local e queimadas, (B) área de eliminação de plantas saudáveis presentes ao redor de uma planta infectada com Xac e (C) vista aérea de plantação contendo várias áreas de erradicação de plantas infectadas por Xac e plantas ao redor. (Fonte: www.fundecitrus.com.br).

A bactéria pode sobreviver e multiplicar-se fora da planta, mas pode colonizar o hospedeiro quando encontradas aberturas naturais, como os estômatos e hidatódios, ou ferimentos nos tecidos vegetais (ABRAMOVICTH et al., 2006; MOREIRA et al., 2006). A disseminação e transmissão da doença geralmente ocorrem por intermédio de exudados de lesões, que podem ser espalhados por ventos, pela água das irrigações ou chuvas. Animais, trabalhadores do campo, utensílios de trabalho, veículos e mudas contaminadas também podem agir como potenciais agentes de dispersão de Xac, sobretudo a longas distâncias (GOTTWALD et al., 2002). Adicionalmente, a infecção é dramaticamente aumentada na presença de lesões da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), que forma galerias para se alimentar no mesófilo foliar. Este agente, embora não seja um vetor da bactéria, media a expansão do cancro em plantas de citros consideradas tolerantes (JESUS JÚNIOR et al., 2006).

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* é Gram-negativa, baciliforme, monotríquia e aeróbia. Suas colônias apresentam coloração amarelada, devido à presença de um pigmento denominado xanthomonadina, são convexas, redondas e mucóides, características fenotípicas estas classificatórias do gênero *Xanthomonas*. A temperatura ótima de crescimento de Xac varia entre 28 a 30 °C e as colônias levam de 40 à 44 hrs para atingir 1 mm de diâmetro (PRUVOST et al., 2002).

Testes bioquímicos e microbiológicos demonstraram que a bactéria é capaz de utilizar os substratos maltose, manitol, arabinose, celobiose e lactose, sendo capaz também de hidrolizar pectato, reduzir ácido aspártico e liquefazer gelatina (SCHAAD et al., 2005).

O sequenciamento completo do genoma de Xac foi realizado por um consórcio de laboratórios do Estado de São Paulo com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O material genético da bactéria é constituído por um cromossomo de ~5 Mpb e dois plasmídeos de 33,7 Kpb (pXAC33) e 64,92 Kpb (pXAC64) (DA SILVA et al., 2002).

Do total de seqüências obtidas, foi identificada a possível função de 62,8 % dos genes deste microrganismo e as outras seqüências foram reconhecidas como genes hipotéticos. No total, 4427 regiões codificadoras (RCs) foram identificadas e a possível função de 2770 proteínas está disponível via *web* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Estes dados abriram possibilidades para estudos nas mais diversas áreas, como nas comparações entre o genoma de Xac e o genoma de outros fitopatógenos (VAN SLUYS et al., 2002; VAN SLUYS et al., 2003; MOREIRA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005), o exame da

expressão de seus genes (ASTUA-MONGE et al., 2005; METHA & ROSATO, 2005), ensaios de interação entre proteínas por sistema de duplo-híbrido (ALEGRIA et al., 2004; ALEGRIA et al., 2005; KHATER et al., 2007) e análise de proteomas (METHA & ROSATO, 2003).

Estas comparações se mostraram importantes, pois deram embasamento para novas discussões sobre as possíveis adaptações específicas de Xac para infectar seu hospedeiro e abriram perspectivas para o estudo de genes que poderiam estar envolvidos com a patogenicidade, propiciando o entendimento mais preciso dos processos moleculares envolvidos com a manifestação do cancro cítrico.

2.2. Interação planta-patógeno

As interações entre microrganismo e plantas nem sempre resultam no desenvolvimento de condições desvantajosas para a planta. Muitas vezes, as relações entre planta e microrganismo podem culminar em uma relação simbiótica (LIPKA & PASTRUGA, 2005). Para as bactérias, a infecção do hospedeiro permite o acesso a nutrientes e a local adequado para o seu crescimento e reprodução (LAM et al., 2001).

Em outras vezes, quando a relação apresenta desvantagens para a planta, esta pode desenvolver sintomas que são respostas auto-limitantes e reduzem a sobrevivência do patógeno, evitando assim sua disseminação de um hospedeiro para outro. Entretanto, em outros casos, uma doença fatal pode ocorrer quando o patógeno encontra um hospedeiro que seja enfraquecido pelas circunstâncias que tenham alterado o delicado balanço da interação planta-patógeno (GALÁN & COLLMER, 1999; LIPKA & PASTRUGA, 2005).

Inúmeras alterações celulares podem ocorrer nas células de plantas hospedeiras em resposta a invasão por um microrganismo, como sinalizações celulares específicas para formação de vesículas e secreção de compostos antimicrobianos, alterações na organização do citoesqueleto e redirecionamento de organelas e proteínas (LIPKA & PASTRUGA, 2005).

O reconhecimento entre planta e patógeno é considerado o evento chave inicial no processo de resposta das plantas aos patógenos e pode ocorrer através de interações físicas de adesinas, fímbrias, flagelos e sistemas de secreção do tipo III (T3SS) e IV (T4SS) ou através da sinalização por pequenas moléculas (LUGTENBERG et al., 2002). Algumas das interações proteína-proteína descobertas recentemente foram reconhecidas como componentes-chave das

trocas entre plantas e patógenos, que, em última instância, definem o sucesso tanto para as plantas (resistência) como para os patógenos (doença) (BOGDANOVE, 2002).

A resistência geralmente depende da combinação de um gene de resistência dominante específico da planta (*R*) e o correspondente gene de avirulência dominante do patógeno (*avr*). A expressão do gene *avr* pode acionar as respostas de defesa da planta governadas pelo produto do gene *R*. Se o produto deste gene *R* estiver ausente, a doença ocorrerá (JEFFERY et al., 2001; CHISHOLM et al., 2006).

Esta resistência denominada “gene-a-gene” foi proposta originalmente por Flor (1955) e foi confirmada com a clonagem e análises de genes *R* e *avr* em interações ditas incompatíveis entre planta e patógeno (BOGDANOVE, 2002).

Se a planta reconhece o patógeno através de um estímulo inicial, vários mecanismos de defesa são acionados como resposta de resistência à infecção. Muitas moléculas produzidas pelos patógenos, mesmo sendo aplicadas isoladamente nas plantas, são capazes de induzir a transcrição dos genes relacionados aos mecanismos de resistência (GREENBERG et al., 1997).

Existem hipóteses de que os genes *avr* direta ou indiretamente geram sinais que são “reconhecidos” pela planta. Acredita-se que os genes *R* codificam receptores de membrana que percebem os sinais do patógeno, acionando os primeiros passos de uma via de sinalização para a ativação de reações de defesa da planta (CHISHOLM et al., 2006).

As respostas de defesa da planta podem incluir a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mudanças na expressão e ativação de quinases, morte celular programada (PCD) localizada ou resposta de hipersensibilidade (HR) (ABRAMOVIC et al., 2006).

Um fator adicional que afeta a resistência mediada pelo reconhecimento dos produtos dos genes *avr* e *R* é que os genes *avr* podem ser dependentes da funcionalidade dos produtos dos genes *hrp* para exercer suas funções. Os produtos dos genes *avr* podem representar, portanto, uma classe de proteínas de patogenicidade/virulência secretadas via T3SS (LINDGREN, 1997).

Atualmente, são conhecidos alguns mecanismos envolvendo receptores de membrana de plantas capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* ou PAMPs). Se a planta reconhece os PAMPs, vias de sinalização celular envolvidas com a ativação da resposta de defesa da planta podem ser acionadas, entretanto, podem existir proteínas do patógeno, denominadas efetoras, capazes de inibir as vias de sinalização ativadas na célula vegetal (CHISHOLM et al., 2006).

Este processo de inibição pode favorecer o acúmulo do patógeno no apoplasto. Caso a planta possua proteínas capazes de inibir as moléculas efectoras do patógeno, é possível ainda a manutenção da resistência da planta ao patógeno, que pode ser evidenciada pelo desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade (CHISHOLM et al., 2006; ABRAMOVIC et al., 2006).

A denominação de HR foi um termo primeiramente usado por Stakman (1915) para descrever a morte celular rápida e localizada que ocorre em plantas e foi considerada como um indício da resistência das plantas às doenças que possibilitaria a restrição da proliferação do patógeno. A indução da morte celular programada parece ser uma resposta comum das plantas aos diferentes tipos de estresse sofridos, sejam eles bióticos ou abióticos, e a HR parece ser uma das respostas celulares ativadas por estes sinais de estresse (LAM et al., 2001; HEATH, 2000; ABRAMOVIC et al., 2006).

Ainda não existem maneiras totalmente confiáveis de diferenciação de uma morte celular programada (PCD), como a que ocorre durante a HR em plantas, de uma morte por envelhecimento. Diversos genes envolvidos com o acionamento da PCD e da HR já foram descritos, entretanto há casos onde os mesmos genes estavam sendo expressos nas duas condições, o que fortalece a idéia de que os mecanismos podem estar ligados. Portanto, a dificuldade em se encontrar genes exclusivos das duas condições ainda permanece (HEATH, 2000; ABRAMOVIC et al., 2006).

A bactéria Xac induz a HR em diferentes plantas não-hospedeiras como o algodão, tabaco e feijão (SWARUP et al., 1992; DUAN et al., 1999; DUNGER et al., 2005). O gene *pthA* foi o primeiro a ser descrito como um gene de patogenicidade da bactéria capaz de ativar os sintomas de hiperplasia e necrose, típicos do cancro cítrico, e pode ser responsável pela indução da HR nas plantas não-hospedeiras (SWARUP et al., 1991). Algumas plantas, entretanto, podem ser efetivamente resistentes a patógenos sem utilizar do recurso de HR, o que pode ser um indício de que a HR seja um estágio final na resposta de resistência da planta ao patógeno usada somente se certos sinais de estresse são percebidos (LAM et al., 2001).

A HR é considerada importante componente da resistência da planta à doença. Estudos dos genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) e seus produtos reforçam a hipótese de que estes atuam como determinantes da patogenicidade. Vários genes da família *hrp* possuem homologia com genes que codificam componentes do T3SS de bactérias patogênicas. Além de componentes do T3SS, as proteínas expressas pelos genes *hrp* mostraram possuir funções

regulatórias, ativadoras da HR (“harpins”) e enzimáticas na síntese de glucanos periplasmáticos (LINDGREN, 1997; HEATH, 2006).

O fenótipo característico observado em linhagens de bactérias apresentando mutação dos genes *hrp* é a incapacidade de causar doença em plantas hospedeiras susceptíveis, assim como a incapacidade de promover reações de hipersensibilidade em cultivares resistentes de plantas susceptíveis e plantas não-hospedeiras (GÁLÁN & COLLMER, 1999; KOIDE et al., 2004).

2.3. Patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

2.4.1. Sistema de secreção tipo III e genes *hrp*

O termo “secreção do tipo III” foi primeiramente utilizado por Salmond e Reeves (1993) para descrever um dos mecanismos pelos quais bactérias Gram-negativas exportam proteínas da célula. Estas bactérias podem ser patogênicas para animais e plantas e compartilham um mecanismo comum para atacar e explorar os hospedeiros eucariotos: O Sistema de secreção tipo III (HE et al., 2004). Atualmente, é sugerido que este mecanismo receba a abreviação “T3SS” (DESVAUX et al., 2006).

O T3SS vem sendo muito estudado em diversos organismos, incluindo espécies de patógenos de animais como *Yersinia*, *Shigella* e *Salmonella* e patógenos de plantas como *Ralstonia solanacearum*, espécies de *Erwinia*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (MARIE et al., 2001). Acreditava-se que a existência do T3SS era restrita a bactérias patogênicas, entretanto inesperadamente foram identificados genes do T3SS em rizóbios simbioses do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Mesorhizobium loti*. Estes genes podem atuar como co-reguladores dos genes responsáveis pela indução da formação dos nódulos, contribuindo para a simbiose (VIPREY et al., 1998; BÜTTNER & BONAS, 2006).

O T3SS é considerado necessário para a transição e secreção de proteínas efetoras para o interior das células do hospedeiro. O T3SS é geralmente codificado por plasmídeos móveis e ilhas de patogenicidade, ambos podendo ser transferidos horizontalmente entre bactérias Gram-negativas (SAIER, 2004).

Os T3SS compartilham quatro importantes características: (I) são amplamente distribuídos e encontrados em bactérias patogênicas a animais e plantas, e mutações afetando este sistema de secreção geralmente eliminam a virulência bacteriana; (II) muitos dos genes

pertencentes ao T3SS apresentam similaridade com genes que codificam a maquinaria de formação do flagelo ou estruturas similares; (III) o T3SS é ativado *in vivo* quando a bactéria está em contato com a célula do hospedeiro e (IV) o T3SS é Sec-independente, ou seja, as proteínas secretadas via T3SS não apresentam peptídeo-sinal passível de clivagem, mas para a secreção de muitas destas proteínas são necessárias proteínas acessórias específicas (chaperonas) (GALÁN & COLLMER, 1999; LUGTENDERB et al, 2002; TAMPAKAKI et al., 2004).

Os genes que codificam o T3SS foram originalmente isolados de várias bactérias fitopatogênicas e muitos destes genes foram nomeados como *hrp*, codificam componentes do T3SS e estão relacionados ao crescimento da bactéria em hospedeiros susceptíveis e à ocorrência da doença (GALÁN & COLLMER, 1999; MI et al., 2007).

No cromossomo principal de Xac existe uma cópia do grupo de genes responsáveis pela síntese e regulação do T3SS, composta de 24 genes (DA SILVA et al., 2002).

Identificada como uma proteína pertencente ao conjunto de proteínas Hrp e possivelmente envolvida com patogenicidade, a proteína HrpF de *X. campestris* pv. vesicatoria foi analisada com diversas abordagens para sua caracterização funcional, com a clonagem de *hrpF* e expressão da proteína HrpF, que foi analisada em sistemas de bicamadas lipídicas (BÜTTNER et al., 2002).

Há evidências que mutantes para o gene *hrpF* de *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria apresentem atenuação da virulência e da capacidade de indução da HR quando submetidos a crescimento em plantas hospedeiras e não hospedeiras, com exceção para plantas de pimenta. Estes estudos verificaram ainda que este gene não é crucial para a secreção de proteínas efetoras em *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria, mas acredita-se que possa ter outras funções na patogenicidade e habilidade de induzir HR em plantas não hospedeiras (ROSSIER et al., 2000; KIM, 2003).

Estudos do comportamento desta proteína em bicamada lipídica demonstraram uma atividade de ligação desta proteína com a membrana e uma formação de poro dependente de sua presença. HrpF, portanto, parece estar envolvida na interação entre o patógeno e a interface da planta, translocando proteínas efetoras para o interior da célula vegetal (BÜTTNER et al., 2002a).

Análises funcionais de *hrpF* de *Pseudomonas syringae* pv syringae descreveram que HrpF pode atuar como proteína reguladora juntamente com as proteínas HrpG e HrpV. A mutação de *hrpF* de *P. syringae* pv syringae e sua influência sobre a expressão de outros genes *hrp* levanta

novos questionamentos a respeito da real função de HrpF e sua possível atuação multifuncional na regulação ou co-regulação de genes (RAMOS et al., 2007).

Outros estudos da mutação do *cluster hrp*, inclusive *hrpF* de Xac, demonstram que este gene, assim como outros do *cluster hrp*, genes *hrpB* e *hrpD*, são relevantes para a patogenicidade de Xac pois os respectivos mutantes não produziram a HR quando submetidos a testes *in vivo* de inoculação em plantas não-hospedeiras (algodão, pimenta, feijão, tabaco e tomate) (DUNGER et al., 2005). Atualmente, mais de 12 genes envolvidos com a regulação da expressão dos genes *hrp* foram analisados e seu possível papel descrito (BÜTTNER & BONAS, 2006).

Em *X. campestris* pv vesicatoria, a expressão dos genes *hrp* é induzida quando o patógeno infecta folhas de plantas e pelo meio mínimo XVM2 e é controlada pelos genes regulatórios *hrpG* e *hrpX*, ambos localizados fora do *cluster* de genes *hrp* (NOËL, et al., 2002). Em particular, o produto do gene *hrpG* parece pertencer à família de proteínas OmpR e regular a expressão de genes *hpa* (“*hrp-associated*”), que podem então regular os genes *hrpB* (ROSSIER et al., 2000; BÜTTNER et al., 2006).

Nos estudos com *X. campestris* pv vesicatoria o produto do gene *hrpX* também parece participar da regulação da expressão dos genes *hrpB* e *hrpF*, entretanto, outros estudos demonstraram que o produto do gene *hpaC* atua não somente para a secreção de proteínas efetoras mas também da proteína HrpF via T3SS. De maneira intrigante, a formação do pilus Hrp e a secreção da proteína HrpE não foram afetadas pela mutação do gene *hpaC*. Estas observações indicam que a secreção das subunidades do pilus Hrp e a translocação de proteínas são regulados por mecanismos diferentes, o que sugere que HpaC seja um tipo de proteína que controla a exportação de proteínas efetoras (BÜTTNER & BONAS, 2006; KOEBNIK et al., 2007).

Mesmo existindo algumas informações sobre a possível função de HrpF demonstrando a importância deste gene na patogenicidade de Xac, ainda não se sabe quais seriam as moléculas translocadas para o interior do hospedeiro através de HrpF e se realmente HrpF atue como translocador de proteínas especificamente envolvidas com a patogenicidade ou pode possuir algum outro papel funcional na regulação de genes *hrp* ou outros genes envolvidos com a patogenicidade de Xac.

2.4.2. Genes de avirulência (*avr*)

As bactérias fitopatogênicas são capazes de se multiplicar em determinadas plantas hospedeiras às quais estão adaptadas. Análises de bactérias patogênicas sugerem que a supressão

dos sistemas de defesa é mediada por ações sinérgicas de várias proteínas efetoras. Em alguns casos, as proteínas efetoras que suprimem a resposta de defesa basal das plantas ativam uma segunda resposta de defesa. Os genes que codificam as moléculas efetoras foram funcionalmente definidos como de avirulência (*avr*) (SCHORNACK et al., 2006).

Do vasto número de proteínas efetoras que foram identificadas até agora, somente um pequeno número foi bioquimicamente caracterizada. Nos últimos vinte anos, mais de 40 genes foram identificados como sendo genes de avirulência de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas* estão depositados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) (Tabela 1). Portanto, o desafio é elucidar as funções e alvos destas proteínas efetoras (SCHORNACK et al., 2006; CHISHOLM et al., 2006).

A proteína AvrBs3 foi o primeiro membro descrito da família *avrBs3* de genes de avirulência de *X. campestris* pv *vesicatoria* que teve sua função da HR descrita em plantas de pimenta, bem como sua translocação do citoplasma do patógeno diretamente para o interior da célula hospedeira (VAN DER ACKERVENKEN et al., 1996). O gene *avrBs3* de *X. campestris* pv. *vesicatoria* apresenta alta similaridade com o gene *pthA* de *Xac*, que também foi descrito como um gene de avirulência cuja mutação levou à perda de indução de HR em plantas não hospedeiras de feijão, mas permaneceu induzindo a HR em plantas não hospedeiras de algodão, o que pode demonstrar uma avirulência gratuita e não específica ao hospedeiro (SWARUP et al., 1992)

Tabela 1. Proteínas de avirulência membros da família AvrBs3.

Proteína de avirulência	Código de acesso GenBank	Gene R
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>		
AvrBs3	X16130, CAA34257	<i>Bs3</i>
AvrBs4	X68781, CAA48680	<i>Bs4</i>
<i>X. oryzae</i> pv <i>oryzae</i>		
AvrXa3	AY129298, NC_006834, AAN01357, YP_199878.1	<i>Xa3</i>
AvrXa5	AY377126, AAQ79773	<i>Xa5</i>
AvrXa7	AF262933, AAF98332, AAF98343	<i>Xa7</i>
AvrXa10	U50552, AAA92974	<i>Xa10</i>
AvrXa27	AY986494, AAY54168	<i>Xa27</i>
<i>X. oryzae</i> pv <i>oryzicola</i>		

Avr/pth3	AY875712, AAW59492	
Avr/pth13	AY875711, AAW59491	
Avr/pth14	AY875713, AAW59493	
<i>X. campestris</i> pv <i>armoraciae</i>		
Hax2	AY993937	
Hax3	AY993938	Bs4
Hax4	AY993939	Bs4
<i>X. campestris</i> pv <i>malvacearum</i>		
Avrb6	L06634, AAB00675	B1
PthN	AF016221, AAB69865	
<i>X. axonopodis</i> pv <i>citri</i>		
Apl1	AB021363, BAA37119	
Apl2	AB021364, BAA37120	
Apl3	AB021365, BAA37121	
PthA	U28802, AAC43587	
PthA1	a0022, AAM39226	
PthA2	a0039, AAM39243	
PthA3	b0015, AAM39261	
PthA4	b0065, AAM39311	
PthB	AY228335, AAO72098	

(Adaptado de SCHORNACK et al., 2006).

Membros da família de genes *avrBs3/pthA* (“*avirulence/pathogenicity*”) são amplamente encontrados nas espécies de *Xanthomonas*, entretanto poucos genes desta família demonstraram possuir efeitos dramáticos na virulência de linhagens de *Xanthomonas* que os possuem (SCHORNACK et al., 2006).

Dentre estes genes, um em especial, denominado *pthA* mostrou-se essencial para a completa virulência de Xac em plantas hospedeiras do gênero *Citrus*. As linhagens de Xac também contêm no mínimo três genes homólogos a *avrBs3/pthA*, e entre eles somente um homólogo a *pthA*, denominado *apl1*, possui uma função de virulência importante na formação do cancro cítrico, enquanto outros genes homólogos tiveram funções não significativas ou não mensuráveis (SHIOTANI et al., 2007).

Os produtos gênicos de *avr* isoladamente pareciam ser suficientes para causar a HR e a morte celular (HEATH, 2000), mas estudos recentes em *X. campestris* pv *campestris* demonstraram que mutações de alguns genes *avr*, isoladamente ou em grupos, não afetam diretamente a manifestação dos sintomas da doença, mas podem, em alguns casos, alterar a especificidade da indução da HR pelos produtos de genes *avr*. Isto pode ser um indício de que os genes *avr* estejam relacionados ao reconhecimento planta-patógeno, mas não necessariamente são determinantes para a patogenicidade (CASTAÑEDA et al., 2005).

Algumas das proteínas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* mostraram-se essenciais para a patogenicidade, e dentre elas encontramos as proteínas externas de *Xanthomonas* (Xop) como as XopB e proteínas de avirulência AvrBs3, AvrBs4, AvrRxv, AvrBsT e AvrBs1 (NOËL et al., 2002).

Os produtos de genes de avirulência compartilham características únicas: repetições de 34 aminoácidos na porção central da molécula, um “zíper” de leucina, três seqüências-sinais de localização nuclear e um domínio de ativação de transcrição na região C-terminal. As diferenças nas disposições e número de unidades repetidas da porção central parecem contribuir para função e especificidade durante o acionamento de resistência e virulência nos respectivos hospedeiros na ausência de genes de resistência (SHIOTANI et al., 2007). A existência de sinais de localização nuclear sugere que o produto destes genes sejam translocados para o interior do núcleo das células do hospedeiro e possam atuar como reguladores da expressão de genes necessários para a HR ou patogenicidade.

Estudos comparativos utilizando micro-arranjos de DNA, analisaram a expressão gênica de Xac cultivada em dois meios de cultura diferentes, *Nutrient Broth* (NB) e XVM2, e demonstraram que três genes *avr* são super-expressos na condição de cultivo XVM2: os genes *avrXACE₁*, *avrXacE2* e *avrBs₂-like*, que supostamente podem participar da regulação da expressão dos genes *avr* (ASTUA-MONGE et al., 2005), entretanto nenhum estudo funcional destes genes foi realizado.

Os dois meios de cultura NB e XVM2 são distinguidos pela composição nutricional. O meio XVM2 apresenta-se como um meio cuja composição supostamente mimetiza as condições nutricionais do espaço intercelular de folhas de plantas e é capaz de induzir a expressão de alguns genes *hrp* envolvidos com a patogenicidade de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, sabidamente *hrpA* e *hrpF* (SCHULTE & BONAS, 1992; WENGELNIK et al., 1996).

2.5. Genoma funcional: mutagênese e análise proteômica

Na atual era de “omas” (coleções), tecnologias inovadoras permitem a medição de mudanças temporais e condicionais em vários níveis celulares. Não há dúvidas de que as análises individuais de cada um destes dados “ômicos” resultam em achados interessantes, entretanto é somente pela integração destes dados que será possível uma visão global sobre o comportamento celular (DE KEERSMAECKER et al., 2006).

A caracterização funcional de uma molécula de proteína é de fundamental importância para a análise de seu papel em um determinado evento biológico, entretanto se considerarmos o número de genes do genoma de *Xac* cuja anotação se refere a seqüências homólogas a genes supostamente envolvidos com a adaptação e infecção bacteriana, percebe-se que há pouca informação a respeito da relevância e funcionalidade de tais genes.

2.5.1. Mutagênese

Como uma das ferramentas úteis para análises funcionais de genes potencialmente envolvidos com a patogenicidade de *Xac* está a mutagênese. A utilização de métodos de mutagênese que permitam a descoberta de novos genes envolvidos com a patogenicidade é de grande importância no estudo de fitopatógenos (AMARAL et al., 2007).

Geralmente, a inativação de uma proteína através da produção de um mutante contendo o gene de interesse “desligado” é a principal maneira de iniciar os estudos sobre sua função. Enfim, é o estudo de um gene através da “perda de função”.

Se não houver a expressão íntegra deste gene, é possível avaliar, pelo menos parcialmente, as conseqüências da ausência da proteína correspondente para a sobrevivência do patógeno ou possíveis alterações na sua capacidade de colonização do hospedeiro. Dentre os métodos mais relevantes nesse tipo de estudo, há a transformação genética da bactéria, que permite a modificação do organismo, seja pela introdução de novas características, seja pela interrupção (nocaute) de genes presentes em seu genoma. Sem dúvida, uma das principais ferramentas úteis na análise biológica de dados genômicos é a mutação através da transformação genética (AMARAL et al., 2005). Vários estudos têm sido realizados recentemente com ênfase na utilização da técnica para a obtenção de mutantes das mais variadas bactérias, incluindo fitopatógenos (MONTEIRO et al., 2001; BRUMBLEY et al., 2002; DUNGER et al., 2005).

Diversos trabalhos puderam analisar a função de diferentes genes de *Xanthomonas* através de técnicas que combinam mutagênese com análises fenotípicas de mutantes e caracterizações

bioquímicas de proteínas (DE FEYTER et al., 1993; ROSSIER et al., 2002; BÜTTNER et al., 2002a; DUNGER et al., 2005; BÜTTNER et al., 2006; KOEBNIK et al., 2007).

Os plasmídeos que são incapazes de replicar em uma célula hospedeira específica, mas que carregam seqüências homólogas ao cromossomo desta linhagem, podem integrar-se no genoma do hospedeiro através de transformação com posterior recombinação homóloga. Este tipo de evento foi observado inicialmente em *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Lactobacillus lactis* subps. *lactis* e foi explorado para a geração de mutantes, mapeamento de genes não selecionáveis e clonagem de genes específicos (CASEY et al., 1991).

Este processo de mutagênese, também conhecido como “integração Campbell” (Figura 3), permite a integração de um plasmídeo, cujo local da integração corresponde à localização cromossomal do fragmento carregado pelo plasmídeo (PAIDHUNGAT & SETLOW, 1991; CAMPBELL, 1992; CAMPBELL, 1993; GUTTMAN & GREENBERG, 2001).

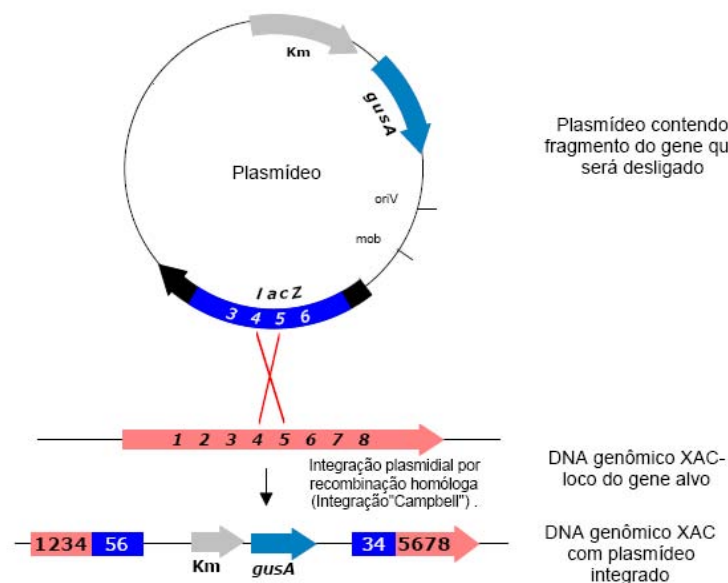


Figura 3. Mutagênese por integração plasmidial. Desenho esquemático da integração plasmidial no DNA cromossomal de Xac por recombinação homóloga e “interrupção” da seqüência do gene alvo (Integração “Campbell”) (Modificado de Guttman & Greenberg (2001).

A região de homologia entre o plasmídeo e o DNA cromossomal estimula a integração do plasmídeo, que ocorre com o auxílio de enzimas integrases (recombinases) (LEENHOUTS et al., 1989; CASEY et al., 1991).

A criação de plasmídeos específicos utilizados na mutagênese pela integração plasmidial por recombinação homóloga simples no DNA cromossomal em linhagens de *Xanthomonas*, permitiu o estudo funcional de vários genes. Esta estratégia mostrou-se eficiente para a mutagênese de *Xac* e *Pseudomonas syringae* (KATZEN et al., 1999; GUTTMAN & GREENBER, 2001).

2.5.2. Análise proteômica

Existem dois caminhos distintos para a análise do conjunto de proteínas de um organismo (ou seja, do proteoma): (I) análise proteômica quantitativa e (II) análise proteômica baseada no genoma. Na análise proteômica quantitativa ou “proteômica clássica”, as mudanças na expressão do proteoma entre duas ou mais amostras biológicas são analisadas verificando-se as alterações resultantes de perturbações externas e internas. Na proteômica baseada no genoma, a abordagem é baseada na análise gene a gene e o objetivo é obter o maior número de características relevantes de cada proteína expressa pelo genoma (AGATON et al., 2004).

A “proteômica clássica” geralmente envolve a eletroforese de duas dimensões (2DE) ou cromatografia líquida multidimensional, seguida da identificação das proteínas ou peptídeos utilizando espectrometria de massas (MS) (AGATON et al., 2004).

As plataformas tecnológicas geralmente utilizadas na proteômica baseada no genoma incluem sistemas duplo-híbrido, *tag-affinity fusion* e *tag-reporter fusion*, onde um gene repórter é fusionado ao gene de interesse e conseqüentemente expresso junto à proteína de interesse. Na técnica de *tag-reporter fusion*, há a possibilidade de reconhecimento da localização celular da proteína de interesse. No caso da técnica de *tag-affinity fusion*, é possível a purificação da proteína de interesse fusionada ao produto do gene repórter em seus níveis de expressão naturais e em condições nativas, juntamente com possíveis proteínas também participantes do complexo. Nestas duas técnicas não há a limitação da identificação de interação entre somente duas proteínas, porque os ligantes co-purificados podem também ser caracterizados (RIGAUT et al., 1999; AGATON et al., 2004).

Outras plataformas utilizadas para a análise proteômica envolvem a proteômica de afinidade, onde existe uma sistemática geração e uso de reagentes e anticorpos com afinidade específica para algumas proteínas permitindo a exploração funcional do proteoma e os arranjos de proteínas, cujas proteínas de interesse podem ser analisadas visando a análise de interações proteína-proteína ou proteína-compostos não protéicos (AGATON et al., 2004; SMITH & FIGEYS, 2006).

Combinados com os atuais métodos de espectrometria de massas, os métodos de purificações sequenciais por afinidade (*tandem affinity purification* –TAP) serão úteis para caracterizar complexos de proteínas e para confirmar e/ou testar a atividade de proteínas mono- ou multiméricas que foram identificadas em larga escala nos projetos de sequenciamento de ácidos nucléicos e constituem importantes ferramentas para a investigação de proteomas (RIGAUT et al., 1999; PUIG et al., 2001).

As tecnologias proteômicas atualmente englobam técnicas visando o estudo em larga escala de proteínas e complexos protéicos. Diversos estudos sobre proteoma baseiam-se em métodos de separação e detecção simultânea de proteínas utilizando técnicas como a eletroforese bidimensional ou cromatografias, acoplados a métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação e quantificação dos níveis de expressão das proteínas utilizando a espectrometria de massas (AGATON et al, 2004; WITTMANN-LIEBOLD et al., 2006).

Entretanto, contrariamente ao que ocorre com o estudo de DNA e RNA, em que mesmo quantidades mínimas destas moléculas podem ser multiplicadas (PCR) e analisadas, até o presente momento não existe nenhuma plataforma tecnológica aplicável para o estudo de proteomas que se equipare às técnicas usadas nos estudos de ácidos nucléicos (HAMDAN & RIGHETTI, 2003).

A análise de proteomas, em particular utilizando MS, requer métodos rápidos e confiáveis de purificação de proteínas. Um dos métodos mais confiáveis para a padronização é a purificação por afinidade. Realizando-se a fusão de uma cauda ou etiqueta, geralmente um peptídeo ou uma pequena proteína, a uma proteína de interesse através da tecnologia de DNA recombinante, é possível a purificação desta em condições nativas de forma confiável e relativamente rápida (HO et al., 2002).

Com a técnica de proteína de fusão, é possível a análise particular de complexos protéicos celulares (SHEVCHENKO et al., 1996; GOULD et al., 2004). Considerando os prévios dados

sobre o genoma de *Xac*, a análise de complexos protéicos pode representar um avanço na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na sua patogenicidade.

Diversos trabalhos já foram concluídos com o estudo de complexos protéicos, elucidando novas redes de interações entre proteínas. Estudos em larga escala já conseguiram processar mais de 1739 genes, onde aproximadamente 78 % apresentaram-se com outras proteínas associadas. Recente trabalho também demonstrou possibilidades de análise de interações entre proteínas recombinantes de *Xanthomonas oryzae* fusionadas a GST (Glutathione S-transferase) e proteínas citoplasmáticas de *Xac*, revelando interações entre a proteína RecA (recombinase A) e as proteínas HrpB1, HrpB2 e Hpa2, sugerindo que RecA possa ter uma função central na rede de interações de proteínas envolvidas com a patogenicidade de *X. oryzae* (PUIG et al., 2001; MI et al., 2007).

Diversas estratégias foram desenvolvidas para produzir proteínas recombinantes em larga escala e uma delas utiliza um pequeno peptídeo (poli-histidina) como “etiqueta” que não deveria influenciar funcionalmente a proteína fusionada (TERPE, 2003). Uma das etiquetas que permitem a realização da purificação por afinidade consiste de seis resíduos de histidina e é chamada de His₆-tag (LITCHY et al., 2005). Esta técnica foi primeiramente descrita em 1987 e mostrou-se eficiente mesmo para a purificação de compostos em condições fisiológicas e na separação de complexos protéicos, devido às suaves condições de eluição das proteínas (TERPE K., 2003).

De forma complementar as técnicas descritas para as análises de interação entre proteínas, a análise proteômica clássica permite verificar as alterações dos níveis de expressão das proteínas envolvidas com um determinado fenômeno biológico. Estas informações adicionam uma visão ampla a respeito de mudanças e conjuntos de proteínas que podem estar atuando em um mesmo evento biológico.

Nas análises proteômicas clássicas, a técnica de 2DE ainda aparece como uma técnica aplicável, mesmo se considerando as análises proteômicas em larga escala com uso de métodos cromatográficos multidimensionais, ambos acoplados à espectrometria de massas (WITTMANN-LIEBOLD et al., 2006).

A 2DE consiste de uma técnica que promove a separação, de acordo com o ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (mW), de centenas a milhares de proteínas simultaneamente em um mesmo gel de poliacrilamida, gerando um perfil de pontos ou *spots* denominado de gel bidimensional (2D), permitindo ainda uma quantificação relativa da expressão das proteínas. Além disto, é ainda um dos métodos disponível mais poderoso para separar misturas complexas de

proteínas (O' FARRELL, 1975; PUIG et al., 2001; SHEVCHENCKO et al., 2002). A alta resolução da 2DE resulta do fato da primeira e segunda dimensões serem baseadas em parâmetros físico-químicos independentes (pI e peso molecular das proteínas). Após a separação por 2DE e determinação do pI e MW de todos os *spots*, é necessário obter dados adicionais sobre cada proteína utilizando análises pós-separação. As metodologias de análise pós-separação mais utilizadas para a identificação de proteínas são: sequenciamento N-terminal (Edman) e MS (WITTMANN-LIEBOLD et al., 2006).

Para organismos com genoma inteiramente sequenciado, a identificação de proteínas se baseia em comparar os dados experimentalmente, obtidos pela análise das proteínas providas dos mapas 2D, com as predições de ORFs (*open reading frames* ou “quadros de leitura aberta”), geradas pela análise das informações de sequência de nucleotídeos do genoma. Como geralmente um projeto genoma informa a sequência inteira da ORF, a identificação de uma proteína resulta no conhecimento de sua sequência completa de amino-ácidos (RAPPSILBER & MANN, 2002).

Com o advento das técnicas de espectrometria de massas ESI (*electron spray ionization*) e MALDI (*matrix assisted laser desorption ionization*), a análise de quantidades próximas a femtomoles de proteínas com massa molecular de até 100 kDa, geralmente com precisão melhor que 0,01 %, tem se tornado acessível para aqueles que se dedicam ao estudo da química de proteínas (ASCHCROFT, 2003).

Concomitantemente ao avanço das novas tecnologias para o estudo de proteomas, outras formas de quantificação relativa da expressão de proteínas estão sendo desenvolvidas e aplicadas, acoplando-se métodos cromatográficos e marcações de peptídeos, sem que haja a necessidade do uso da eletroforese bidimensional. Dessa forma, realiza-se a quantificação relativa das proteínas de acordo com a intensidade dos sinais gerados por cada peptídeo analisado (HOOG & MANN, 2004).

Uma das mais severas limitações dos estudos de proteoma utilizando a eletroforese bidimensional é a dificuldade de detecção de proteínas de baixa abundância, o que pode reduzir a chance da identificação de proteínas regulatórias, geralmente pouco expressas, que em muitos casos são consideradas como a parte mais interessante do estudo de um proteoma (HAMDAN & RIGHETTI, 2003).

Mesmo estas técnicas robustas mais recentes envolvendo técnicas cromatográficas e espectrometria de massas possuem suas limitações, como as relacionadas à sensibilidade para a

detecção de proteínas de baixa abundância celular, a correta interpretação dos dados gerados e a necessidade de programas computacionais capazes de processar o grande número de informações geradas (BRÖTZ-OESTERHELT et al., 2004).

Existem, portanto, diversas técnicas complementares disponíveis para o estudo de proteomas na investigação e identificação das variações de expressão protéica e a relação entre as proteínas, na busca pela informação integrada e dinâmica de um determinado fenômeno biológico.

O aumento da geração de informações provenientes de trabalhos desta natureza contribui para a crescente necessidade do desenvolvimento de ferramentas ou plataformas computacionais capazes de integrar as informações obtidas e extrair informações biologicamente relevantes (SMITH E FIGEYS, 2006; DE KEERSMAECKER et al., 2006).

Baseado no exposto, pode-se considerar que a utilização conjunta de técnicas aplicadas ao estudo funcional de genomas, como a mutagênese, e de metodologias de estudo de proteomas e interações entre proteínas, como a eletroforese bidimensional e proteínas de fusão, permitirão auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos com a patogenicidade de *Xac* e na formação do cancro cítrico.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas

As linhagens das bactérias *Xac* e *E. coli* produzidas e utilizadas durante este estudo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados no trabalho.

Linhagem ou plasmídeo	Genótipo	Fonte ou referência
<i>E. coli</i>		
	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>endA1 deoR</i>	
DH5 α	<i>recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> Δ <i>thi-1 gyrA96</i> <i>relA1</i>	Gibco
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen

BL21(DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)	Novagen
BL21 Star TM (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131</i> (DE3)	Novagen
BL21-CodonPlus-RIL	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) dcm</i> + Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene
BL21-CodonPlus-RP	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) dcm</i> + Tetr gal endA Hte [argU proL Camr]	Stratagene
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>		
306	Tipo Selvagem, Ap ^r	da Silva et al. (2002)
306ΔXAC3224	Mutante de 306, XAC3224 (<i>avrXacE₂</i>), Km ^r	Este estudo
306ΔXAC0394	Mutante de 306, XAC0394 (<i>hrpF</i>), Km ^r	Este estudo
306ΔXAC0394C	Mutante de 306, XAC0394 (<i>hrpF</i>), Km ^r , Gm ^r , contendo pUFR047_0394	Este estudo
Plasmídeo		
pk18mobGUSII	derivado de PUC18, <i>lacZα</i> , <i>mob</i> , <i>gusA</i> , Km ^r	Katzen et al. (1999)
pk18mobGUSII3224	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 433 a 899 do gene <i>avrXacE₂</i>	Este estudo
pk18mobGUSII0394	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 751 a 1239 do gene <i>hrpF</i>	Este estudo
pET15b	origem de replicação de pBR322, <i>lacI</i> , <i>bla</i> , promotor T7, terminador T7, <i>N-terminal His₆-tag</i> , Ap ^r	Novagen
pET15b AvrXacE2	Ap ^r , pET15b expressando AvrXacE2, His ₆ tag	Este estudo
pET15bHrpF	Ap ^r , pET15b expressando HrpF, His ₆ tag	Este estudo
pET28a(+)	origem de replicação de pBR322, origem de replicação de f1, <i>lacI</i> , <i>bla</i> , promotor T7, terminador T7, <i>N-terminal e C-terminal His₆-tag</i> , Kan ^r	Novagen
pET28a(+)HrpF	Kan ^r , pET28a(+) expressando HrpF, N-terminal His ₆ tag	Este estudo
pCR2.1	Kan ^r , Ap ^r , origem de replicação de PUC, origem de replicação de f1, <i>lacZα</i> , promotor T7.	Invitrogen
pCR2.1HrpF	Kan ^r , Ap ^r , contendo HrpF	Este estudo

As seqüências completas dos genes-alvo *avrXacE₂* e *hrpF* identificadas durante o seqüenciamento completo da bactéria Xac (DA SILVA et al., 2002), respectivamente, como XAC3224 (NP_643532) e XAC0394 (NP_640749), estão depositadas no banco NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2. Manipulação de DNA

3.2.1 Extração do DNA genômico de Xac

Para a extração de DNA genômico da linhagem 306 de Xac selvagem e linhagens mutantes produzidas neste estudo foi utilizado o método CTAB modificado (DOYLE & DOYLE, 1987; GÁLAN & COLLMER, 1999).

A bactéria foi inoculada em 2 ml de meio de cultura *Nutrient Broth* (NB) (pH 7,0; 5 g/L peptona; 2 g/L K₂HPO₄; 3 g/L extrato de carne; 0,5 g/L KH₂PO₄ e 15 g/L ágar) e cultivada por 14 hrs a 37 °C sob agitação constante de 180 x g. Volume de 1,5 ml desta cultura foi centrifugado por 5 min a 7500 x g seguido da ressuspensão do precipitado em 400 µl de tampão TE (1 mM EDTA e 10 mM Tris-HCl, pH 8,8). Nesta suspensão foram adicionados 30 µl de 10 % SDS (p/v) e 1 µl de 20 mg/ml de proteinase K, com incubação por 1 h a 37 °C e posterior adição de 100 µl de 5 M NaCl. Os tubos foram agitados em *vortex* e tiveram adição de 80 µl de solução CTAB [10 % (p/v) CTAB e 0,7 M NaCl], então novamente agitados em *vortex* e incubados por 25 min a 65 °C.

Ao volume da solução aquecida, igual volume de solução 1:24 (v/v) de álcool isoamílico:clorofórmio foi adicionado e misturado. Esta solução foi então centrifugada por 25 min a 14000 x g à temperatura ambiente. Para a precipitação do DNA contido no sobrenadante obtido, dois volumes de solução de etanol a 95 % (v/v) foram adicionados e a solução foi mantida a temperatura de -20 °C por 30 min.

Após este período, a amostra foi centrifugada por 10 min a 14000 x g à temperatura de 4 °C. O precipitado obtido foi lavado duas vezes com solução de etanol 70 % (v/v), mantido à temperatura de 37 °C por 1 h e misturado a 80 µl de água deionizada estéril.

3.2.2 Minipreparação plasmidial

Para o cultivo das bactérias e seleção de transformantes, os antibióticos foram acrescentados aos meios de cultura, quando apropriado, nas seguintes concentrações finais: 100 µg/ml ampicilina, 30 µg/ml canamicina. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Luria Bertani) e as linhagens de Xac foram cultivadas em meio NB ou NBY (pH 7,0, 5 g/L peptona, 2 g/L K₂HPO₄, 3 g/L extrato de carne, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L extrato de levedura e 15 g/L ágar).

Aproximadamente 3 ml de meio de cultura contendo o antibiótico apropriado foram inoculados com o material das colônias bacterianas de interesse e cultivados à noite a 37 °C (*E. coli*) e 28 °C (Xac) com agitação constante de 140 x g. Volume de 1,5 ml desta suspensão foi centrifugado a 6000 x g à temperatura ambiente e ao precipitado obtido foram adicionados 100 µl de solução I (10 mM EDTA pH 8,0; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,01 mg/ml RNase) gelada, seguido de incubação por 15 min a 37 °C. Após este período, a suspensão foi homogeneizada e adicionados 200 µl de solução II [0,2 N NaOH e 1 % SDS (p/v)] fresca, seguida de mistura da solução por inversão suave do tubo.

Foram então adicionados a esta solução 150 µl de solução III [3 M acetato de potássio e 11,5 % ácido acético (v/v)] gelada. O conteúdo foi misturado por inversão e mantido em banho de gelo por 30 min. A suspensão foi centrifugada a 12000 x g por 15 min à temperatura de 4 °C e o sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo.

Ao sobrenadante foi adicionado 1 ml de etanol absoluto gelado seguido de homogeneização e centrifugação por 15 min a 15000 x g à temperatura de 4 °C. O precipitado obtido foi lavado com solução de 70 % etanol (v/v), seco à temperatura ambiente e ressuspenso com 30 µl água deionizada estéril (LIOU et al., 1999).

3.2.3. Purificação e quantificação de DNA

Todos os produtos de amplificação, vetores digeridos e fragmentos utilizados nas construções de DNA recombinante foram purificados a partir de gel de agarose *low melting* 1% utilizando o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Health Care-Life Sciences) (STADLER et al., 2004). As amostras de DNA purificadas foram submetidas à quantificação

indireta através da comparação de intensidade de banda das amostras de concentração desconhecida com amostras de λ DNA de concentrações conhecidas (STELLWAGEN, 1983).

3.2.4. Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação de genes de interesse ou de fragmentos destes genes foram desenhados com base nas informações do genoma da bactéria Xac 306 selvagem (<http://genoma4.fcav.unesp.br/xanthomonas/>) e nos próprios mapas dos vetores pET15b, pET28a(+), pCR2.1 (<http://www.invitrogen.com/>) e pK18mobGII (KATZEN et al., 1999).

Para a análise *in silico* dos sítios de restrição contidos nas seqüências dos vetores e dos genes de interesse, foi utilizado o programa “Restriction mapper” (<http://www.restrictionmapper.org/>).

Após o desenho dos oligonucleotídeos, foi utilizado o *software* “primer3” (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) para a determinação da temperatura de anelamento e da porcentagem de nucleotídeos C e G (“% CG”) (ROZEN & SKALETSKY, 2000). A seqüência dos oligonucleotídeos foi submetida à análise de alinhamento básico de nucleotídeos utilizando o programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmação da especificidade do oligonucleotídeo pela seqüência do gene ou região de interesse (ALTSCHUL et al., 1990). Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das seqüências de interesse.

Denominação	Seqüência do nucleotídeo (5'→3')	Uso
AvrXacE2XbaIF	GCTCTAGAGCGGTCGTATCTG	Construção do mutante 306ΔXAC3224 (Recombinação simples)
	AATTCGT	
AvrXacE2XbaIR	GCTCTAGAGTAGCCAGACTTT	Construção do mutante 306ΔXAC3224 (Recombinação simples)
	GCCGAAC	
avrXacE2 NdeIF	GGGAATTCCATATGATGGGTT GCACTATC	Expressão da proteína AvrXacE2

avrXacE2 XhoIR	CCGCTCGAGTTACTGGCTCTG CTC	Expressão da proteína AvrXacE2
HrpFXbaIF	GCTCTAGAGGGAAGAACGACC AGTTCAA	Construção do mutante 306ΔXAC0394 (Recombinação simples)
HrpFXbaIR	GCTCTAGACAGATCGTCCGGC AGATAGT	Construção do mutante 306ΔXAC0394 (Recombinação simples)
HrpF16FXhoI	CCTCGAGATGGGCGCACCCGT GCG	Expressão da proteína HrpF
HrpF26RBamHI	CCGGGATCCTTATCTACGACG CACTCTGATATTCC	Expressão da proteína HrpF
T7 promoter F	TAATACGACTCACTAT	Seqüenciamento da construção usada para expressão de proteína
T7 terminator R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Seqüenciamento da construção usada para expressão de proteína
aphF	GAA GGG ACT GGC TGC TAT TG	Produção de sonda para <i>Southern blot</i> de mutantes. Amplificação de fragmento do gene <i>Kan^R</i>
aphR	AAT ATC ACG GGT AGC CAA CG	Produção de sonda para <i>Southern blot</i> de mutantes. Amplificação de fragmento do gene <i>Kan^R</i>
XAC3224 INT 536-555	ATGTCCAGCACAAACCATCAG	Seqüenciamento do gene <i>avrXacE2</i>
XAC0394 INT 418-437	CCCAAGGACATCAAGGGTAA	Seqüenciamento do gene <i>hrpF</i>
XAC0394	GGGAAGAACGACCAGTTCAA	Seqüenciamento do gene

INT 751-770		<i>hrpF</i>
XAC0394	GATCTCGGCAAGTTCGTCTC	Seqüenciamento do gene
INT 1057-1076		<i>hrpF</i>
XAC0394	GACTCCATTTCGAAGGACGA	Seqüenciamento do gene
INT 1513-1532		<i>hrpF</i>
XAC0394	TTGCACGAGTTCCTCAAGTG	Seqüenciamento do gene
INT 1864-1883		<i>hrpF</i>

Em negrito, inserção de sítio de restrição.

3.2.5. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a amplificação dos genes e fragmentos de genes usados no trabalho, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) e todos os reagentes utilizados foram obtidos da InvitrogenTM, com exceção da enzima *Pfu* e seus tampões específicos, que foram obtidos da empresa Fermentas.

Como condição inicial para as otimizações da PCR foi considerado o parâmetro de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e 30 s. Todas as reações tiveram extensão final de 72 °C por 7 min. Apenas as amplificações do gene *hrpF* utilizando a enzima *Pfu* tiveram tempos de anelamento e extensão acrescidos de 2 min.

Na PCR, foi utilizado volume reacional de 50 µl contendo 10-100 ng de DNA, 1 x tampão de reação, 0,4 mM MgCl₂ ou MgSO₄ (quando utilizada a enzima *Pfu*), 0,2 mM dNTPs, 2 µM de cada oligonucleotídeo e 1 U de polimerase de DNA (*Taq* ou *Pfu*).

3.2.6 Digestões e reações de ligação

As reações de digestão de vetores e insertos foram feitas em volume final de 50 µl, contendo: 5 % de solução de enzima de restrição (v/v) (20 U/µl), 10 % tampão de reação (v/v) e solução contendo aproximadamente 10 µg de DNA. As reações foram processadas a 37 °C, por período de 12 h. Vetores submetidos a duas digestões com enzimas de restrição diferentes foram

digeridos sequencialmente e, entre as digestões, foram defosforilados e purificados. A defosforilação foi realizada adicionando-se 1 µl de fosfatase alcalina (1 U/µl) (Amersham Biosciences) diretamente na solução de digestão, que foi então incubada por 30 min à 37 °C. Após este período, foi adicionada mais uma unidade da enzima fosfatase alcalina e a amostra foi incubada por mais 15 min à 37 °C. A inativação das enzimas foi realizada incubando-se a amostra à 75 °C por 10 min.

Após as digestões os produtos obtidos foram purificados para a subsequente reação de ligação, nas quais quantidades equimolares de inserto e vetor foram utilizadas. A ligação de vetores e insertos foi realizada em volume final de 10 µl contendo 1 X tampão T4 DNA *ligase*, 1 U de T4 DNA *ligase* (InvitrogenTM, Life technologies) seguidas de incubação durante a noite à temperatura de 14 °C. As reações de ligação ficaram armazenadas à temperatura de -20 °C até o momento da transformação das bactérias competentes.

3.3 Mutagênese de Xac para rompimento dos genes *hrpF* e *avrXacE2*

A influência dos genes *hrpF* e *avrXacE2* na manifestação visual dos sintomas do cancro cítrico foi avaliada através da mutação para perda de função destes genes na linhagem Xac 306 selvagem.

A construção dos mutantes de Xac foi baseada na inserção do plasmídeo pK18mobGII contendo marca de seleção (gene que confere resistência ao antibiótico canamicina) em região específica do genoma e, através de recombinação homóloga simples, na ruptura da sequência original do gene a ser “desligado” (GALLI-TALLIADOROS et al., 1995 ; KATZEN et al., 1999).

Para a obtenção dos mutantes funcionais de Xac para os genes *avrXacE2* e *hrpF*, fragmentos de 466 pares de bases (pb) e 488 pb, respectivamente, contendo nas suas extremidades a sequência do sítio de restrição da enzima *XbaI*, foram amplificados pela PCR. Estes fragmentos amplificados foram então separados por eletroforese em gel de agarose, purificados e subclonados em vetor pCR2.1 (TA system – InvitrogenTM). Células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram transformadas com este vetor e selecionadas através da manifestação da resistência ao antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Para a confirmação da inserção do DNA plasmidial nas células de *E. coli* DH5 α , foi feita a PCR do plasmídeo extraído das colônias selecionadas utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o fragmento clonado, seguido de eletroforese em gel de agarose 1 % para confirmação, por tamanho de banda, do fragmento de DNA amplificado.

O DNA plasmidial isolado dos transformantes contendo o inserto correto foi digerido com a enzima *Xba*I. Estes fragmentos foram então separados por eletroforese em gel de agarose *low melting* 1 % e purificados para posterior clonagem no vetor suicida pK18mobGUSII previamente isolado, digerido com a enzima *Xba*I, defosforilado e purificado. Este plasmídeo apresenta 5349 pb de tamanho e é replicativo em *E. coli*, porém não se replica em *Xac* (Figura 4) (KATZEN et al., 1999).

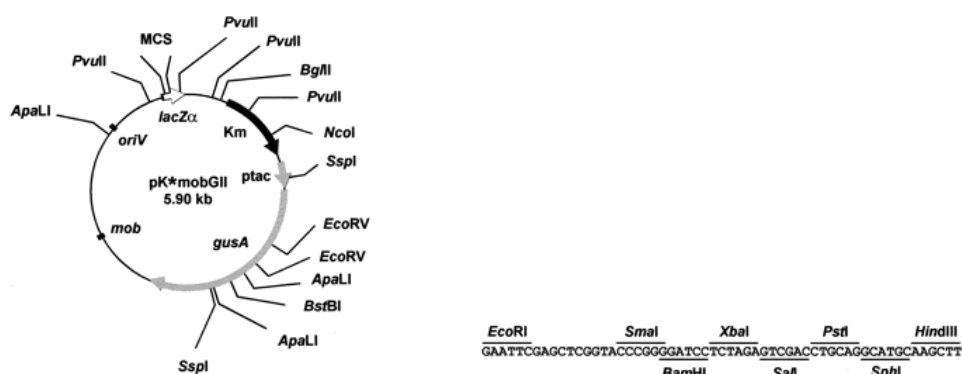


Figura 4. Mapa do vetor pK18mobGUSII. Vetor utilizado para a mutagênese de *Xac*. Plasmídeo não replicativo em *Xac*. O asterisco no centro do mapa indica que esta ilustração pode ser a representação do plasmídeo pK18 e pK19 (KATZEN et al., 1999).

O vetor suicida contendo os fragmentos dos genes alvo foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes que foram cultivadas em meio LB contendo canamicina (30 μ g/ml). O DNA plasmidial das colônias resistentes ao antibiótico foi analisado por PCR e digestão com a enzima de restrição *Xba*I, seguido de gel de agarose 1 % para verificação da presença do fragmento de DNA clonado.

Os plasmídeos contendo a construção correta foram utilizados na transformação de células competentes de *Xac* selvagem. Os transformantes foram inoculados em meio NB e as células de *Xac* que apresentaram resistência a canamicina foram selecionadas.

A inserção do vetor suicida pK18mobGUSII no genoma de *Xac* selvagem foi verificada através da PCR específica para a detecção do gene de resistência a canamicina *aph*

(aminoglicosídeo-fosfotransferase) utilizando o DNA das linhagens mutantes obtidas. Nesta etapa, o DNA genômico de Xac selvagem foi utilizado como controle negativo da reação.

Para confirmar a incorporação da marca de seleção para canamicina (gene *aph*) e a ocorrência de um único evento de recombinação nas células transformadas de Xac, foi realizado o ensaio de *Southern blot* dos clones resistentes a canamicina.

Aproximadamente 400 ng de DNA genômico de cada linhagem mutante de Xac que foram extraídos com o Kit “MasterPure™ DNA purification” (Epicentre Technologies) foram digeridos com a enzima *EcoRI*. O produto das digestões foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e transferido para membrana de nylon Hybond™-N (Amersham Biosciences) em solução 5 M NaOH, com subsequente fixação por *cross-linking* com exposição a irradiação UV.

As hibridações foram realizadas a 65 °C, durante a noite, no equipamento “Hybridizer HB – 1000” (UVP® Laboratory Products) (SAMBROOK et al., 1989). A sonda utilizada na hibridação, que corresponde ao fragmento de 422 pb do gene para resistência a canamicina (*aph*), foi produzida a partir de produtos de PCR marcados com digoxigenina (DIG) com o uso dos kits “PCR DIG Probe Synthesis Kit” e “DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnosis).

A presença do fragmento do gene *aph* foi detectada através da exposição e subsequente revelação de filme sensível a quimioluminescência, mantido em contato com a membrana hibridada. A ocorrência de uma única banda no filme foi considerada como a existência de evento único de recombinação simples no genoma de Xac.

3.4. Estudo *in vivo* da patogenicidade dos mutantes *hrpF* e *avrXacE2*

Folhas jovens, ou seja, em pleno crescimento, de laranjeira doce foram utilizadas nos testes de verificação de sintomas de cancro cítrico causados pelas linhagens mutantes 306ΔXAC0394 e 306ΔXAC3224 obtidas neste trabalho.

Cinco mililitros de meio NB contendo antibiótico apropriado foram inoculados com 50 µl de cultura permanente dos mutantes de Xac e cultivados a 28 °C com agitação constante de 130 x g até atingirem O.D._{600 nm} = 0,6. O mesmo procedimento foi realizado paralelamente para a linhagem de Xac selvagem.

Nos testes *in vivo*, realizados em triplicata, o dorso (epiderme abaxial) das folhas jovens de plantas de *C. sinensis* foi infiltrado com aproximadamente 500 µl de suspensão de células de Xac das linhagens mutantes ao lado da nervura central e a suspensão de células de Xac selvagem

foi infiltrada, paralelamente, no lado oposto da nervura, com o uso de seringas de 1 ml com agulha (26-gauge needle). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação localizada no Instituto Biológico (Campinas-S.P.) e, após 7 dias, os sintomas foram registrados e analisados visualmente (Figura 5).

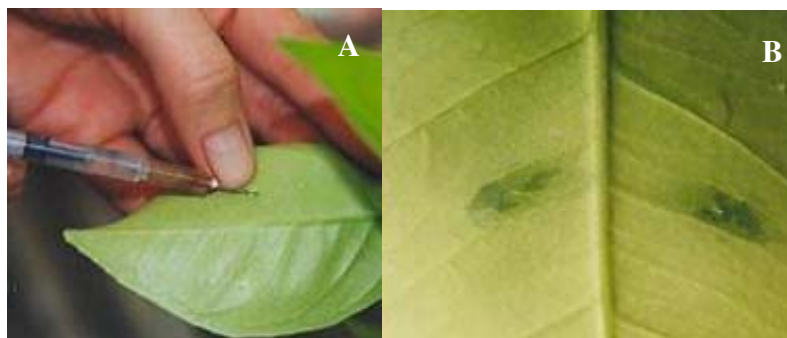


Figura 5. Teste *in vivo* de patogenicidade de *Xac*. (A) Infiltração de folhas jovens de laranjeira com suspensão bacteriana. (B) Aspecto visual da superfície abaxial das folhas instantes após infiltração da suspensão bacteriana. (Fonte: BAPTISTA, 2006. Fotos gentilmente cedidas pela autora).

3.5. Clonagem dos genes *hrpF* e *avrXacE2* em vetores de expressão.

Os genes *avrXacE2* e *hrpF* foram amplificados por PCR, utilizando a enzima DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), a partir do DNA genômico da linhagem selvagem de *Xac*. Os oligonucleotídeos utilizados continham em suas extremidades sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, para o gene *avrXacE*, e *XhoI* e *BamHI*, para o gene *hrpF*, objetivando a clonagem em vetor pET15b.

Os genes amplificados foram purificados e subclonados em vetor pCR2.1 e as colônias de *E. coli* DH5 α transformadas foram selecionadas com antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) e confirmadas por PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes clonados (TESTORI et al., 1994).

Os plasmídeos contendo os genes clonados foram isolados por minipreparação e digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, para o gene *avrXacE2*, e *XhoI* e *BamHI*, para o gene *hrpF*. Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes-alvo foram então purificados e ligados aos vetores de expressão também digeridos com as mesmas enzimas de restrição mencionadas.

Estas construções foram usadas na transformação de células de *E. coli* DH5 α e as colônias transformadas resistentes a ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) foram confirmadas por PCR e análise com enzimas de restrição. O DNA plasmidial contendo o gene clonado foi isolado para o sequenciamento e para a posterior transformação de linhagens de *E. coli* de expressão.

O vetor pET15b contendo o gene *hrpF* foi digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI* para a remoção do gene *hrpF*, que foi também clonado no vetor de expressão pET28a(+), que havia sido previamente digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI* e purificado. O produto desta ligação de *hrpF* e pET28a(+) foi então usado na transformação de células de *E. coli* DH5 α e as colônias transformantes resistentes a canamicina foram confirmadas por PCR e tiveram seu plasmídeo isolado para a transformação de células de *E. coli* BL21(DE3) (SORENSEN et al., 2005).

Portanto, o gene *hrpF* foi clonado em dois vetores de expressão diferentes, pET15b e pET28a(+), enquanto o gene *avrXacE2* foi clonado somente no vetor pET15b (Figura 6).

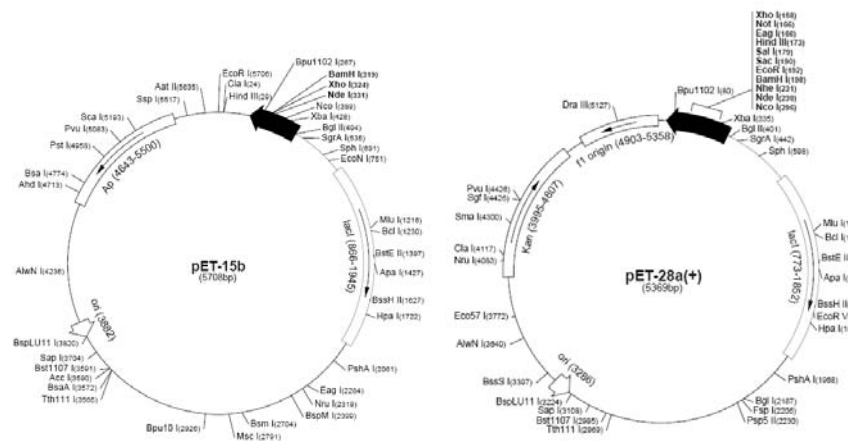


Figura 6. Mapas de vetores de expressão. Os vetores pET15b e pET28a(+) contêm promotor T7 e foram utilizados nos testes de expressão de proteínas.

3.6. Preparação de bactérias competentes e transformação

3.6.1. Bactérias eletrocompetentes

3.6.1.1. *E. coli* e *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Com base no trabalho de Amaral et al. (2005) foram preparadas células eletrocompetentes de *E. coli* linhagens DH5 α e linhagens BL21 e células de linhagem 306 de Xac selvagem.

Células provenientes da cultura permanente [suspensão bacteriana em 15 % glicerol (v/v) estéril preservada a -80°C] das linhagens de *E. coli* e Xac 306 selvagem foram, respectivamente, inoculadas (“estriadas”) em placas de Petri contendo meio de cultura LB e NB. O meio NB foi acrescido de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Uma única colônia isolada obtida foi cultivada durante a noite em 5 ml de meio líquido, contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina para Xac, sob agitação constante de 300 x g e temperatura de 37°C para as células de *E. coli* e agitação de 140 x g e temperatura de 28°C para células de Xac. Este pré-inóculo foi diluído 100 vezes em volume de 500 ml de meio. À cultura de Xac foi adicionado o antibiótico ampicilina na concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$. As culturas de *E. coli* e Xac foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e agitação mencionadas anteriormente, até atingir O.D._{600 nm} entre 0,6 e 0,7.

Esta cultura foi então transferida para tubos de centrífuga de 250 ml estéreis e submetida a resfriamento em banho de gelo por 30 min. Estas suspensões de células foram centrifugadas a 4000 x g por 10 min a 4°C e o precipitado ressuspenso em 125 ml de solução estéril de glicerol 10 % (v/v) gelado, passando posteriormente a outro ciclo de centrifugação a 4000 x g por 10 min a 4°C . O precipitado resultante foi ressuspenso em 50 ml de solução estéril de glicerol 10 % (v/v) gelado e submetido a outro ciclo de centrifugação igual ao descrito anteriormente.

Ao precipitado resultante de células de *E. coli* foi adicionado 1 ml de solução estéril de glicerol 10 % gelado e a suspensão foi fracionada em alíquotas de 50 μl em microtubos estéreis que foram conservadas a -80°C .

No precipitado resultante de células de Xac, foi realizada ainda a adição de 1 mL de glicerol a 10 % (v/v) estéril e resfriado, seguida de centrifugação a 13000 x g, durante 2 min à temperatura de 4°C . O sobrenadante foi parcialmente removido para permitir apenas a suspensão do sedimento à concentração final de aproximadamente 4×10^{10} UFC/mL. Finalmente, as células competentes foram alíquotadas em frações de 100 μl e mantidas no gelo até a transformação, ou estocadas a -80°C para uso posterior.

3.6.2. Bactérias quimiocompetentes

7.6.2.1. *E. coli* BL21

A partir de uma cultura permanente de *E. coli* BL21(DE3), uma placa de meio LB sem antibiótico foi estriada e incubada durante a noite a 37 °C. Uma única colônia obtida deste cultivo foi inoculada em 5 ml de meio LB sem antibiótico durante a noite, a 37 °C, com agitação constante de 300 x g. Uma fração desta cultura foi diluída 100 vezes em 10 ml de TYM (20 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5,8 g/L NaCl, 2,5 g/L MgSO₄.7 H₂O) e cultivada a 37 °C, com agitação constante de 300 x g até O.D._{600nm}= 0,3. Esta cultura foi então transferida para tubo Erlenmeyer contendo 40 ml de TYM e mantida nas mesmas condições de cultivo até atingir O.D._{600nm}= 0,6.

A cultura obtida foi novamente transferida para tubo Erlenmeyer contendo 200 ml de TYM e mantida a 37 °C com agitação constante de 300 x g até atingir O.D._{600nm}= 0,6. Após o período de cultivo, a cultura foi resfriada em “banho de gelo” e dividida em frações de 25 ml em tubos de centrífuga de 50 ml previamente resfriados em gelo.

Os tubos foram então centrifugados a 4000 x g por 15 min a temperatura de 4 °C e em seguida as células foram ressuspensas em 25 ml de TBF 1 [0,03 M Acetato de potássio, 0,05 M MgCl₂, 0,1 M KCl, 0,01 M CaCl₂ . 2 H₂O, 15 % Glicerol (v/v)] estéril e resfriado. As células foram centrifugadas a 4000 x g, por 8 min a 4 °C e ressuspensas em 10 ml de TBF 2 [0,01 M MOPS, 0,075 M CaCl₂, 0,01 M KCl, 15 % Glicerol (v/v)] estéril e resfriado. A suspensão resultante foi fracionada em alíquotas de 100 µl e estocada a temperatura de -80 °C até o momento do uso.

3.6.3. Transformação de células competentes

Para as linhagens de expressão de *E. coli* quimiocompetente, foi utilizada a transformação por choque térmico: aproximadamente 5 µl da solução contendo 50 ng do plasmídeo de interesse foram misturados a 20 µl de tampão de transformação [0,1 M KCl, 0,03 M CaCl₂, 0,05 M MgCl₂ e 1,5 % PEG (p/v)] estéril e mantidos no gelo por 1 min enquanto as células competentes estocadas a -80 °C foram descongeladas.

Após o descongelamento das células, as mesmas foram misturadas à solução que continha o plasmídeo e novamente mantidas em gelo, por 15 min. Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 20 min e a eles foi adicionado 1 ml de meio LB. Esta cultura foi então

incubada por 1 hora à temperatura de 37 °C e sem agitação. Volume de 50 µl desta suspensão foi inoculado em placa contendo meio LB com antibiótico, permanecendo durante a noite a 37 °C.

Para a transformação de *E. coli* DH5α e Xac eletrocompetentes foi utilizado o método de eletroporação, com uso do aparelho “Gene Pulser II Electroporator” (Bio-Rad), com os seguintes parâmetros: 50 Ω, 50 µF e 2,5 kV para Xac (AMARAL et al., 2005) e 400-600 Ω, 25 µF e 2,5 kV, para *E. coli*. Foram utilizadas cuvetas de 0,2 cm de “gap”.

Frações de 50 µl ou 100 µl da suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 α e Xac foram misturadas a 2 µl da solução contendo o DNA de interesse e eletrotransformadas. Imediatamente após o pulso elétrico, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido SOC [2 % triptona (p/v), 0,5 % extrato de levedura (p/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose] e cultivadas por 1-2 h a 37 °C (*E. coli*) e 28 °C (Xac) sob agitação constante de 180 x g. Logo em seguida, a suspensão de células transformadas foi inoculada em placa de Petri contendo meio de cultura apropriado e o antibiótico necessário para a seleção dos transformantes. As placas foram mantidas durante a noite a temperatura de 37 °C (*E. coli*) e 28 °C (Xac) para o cultivo das bactérias.

3.7. Seqüenciamento de DNA

A partir dos plasmídeos isolados das culturas de interesse foi feita a PCR para o seqüenciamento de DNA. A PCR foi realizada utilizando-se 2 µl de solução contendo 100 ng de DNA, 5,1 µl H₂O, 2 µl de solução *save money* (2 M MgCl₂, 1 M Tris-HCl e pH 9,0) 0,4 µl de solução *big dye* (Applied Biosystems) e 0,5 µl de solução contendo o oligonucleotídeo específico (5 pmoles/µl). As reações de seqüenciamento foram concentradas por precipitação com isopropanol absoluto e lavadas com etanol a 70%. O DNA foi então submetido ao seqüenciamento utilizando equipamento “ABI 3730 DNA analyser” (Applied Biosystems).

3.8. Expressão e purificação de proteínas

Neste trabalho foi utilizada a técnica de fusão de cauda de polihistidina a proteína alvo. A técnica de proteína de fusão envolve a clonagem de um gene-alvo em um vetor de expressão que em uma dada linhagem de células de expressão, geralmente *E.coli*, possibilite a expressão da

proteína recombinante contendo uma etiqueta (*tag*) fusionada a porção terminal (N ou C-terminal) (JANA & DEB, 2005). A proteína alvo com suas proteínas associadas pode ser purificada através de cromatografia de afinidade a metais. Na purificação de afinidade a metal, os resíduos de histidina da proteína recombinante se ligam ao metal contido na resina usada e as proteínas que não possuem a cauda de histidina são eluídas e descartadas (PORAH et al., 1975 e PUIG et al., 2001).

Pela coluna de afinidade contendo a proteína alvo pode-se passar o extrato de proteínas solúveis extraídas das linhagens mutantes de Xac. As proteínas deste extrato que tiverem afinidade pela proteína alvo poderão ficar ligadas a ela. Os produtos obtidos da purificação de afinidade podem ser submetidos à caracterização bioquímica, separação por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas (MS).

3.8.1. Testes de indução da expressão de proteínas

Para os testes de expressão de proteínas, foram utilizadas as seguintes linhagens de *E. coli* de expressão: BL21(DE3), BL21(DE3) pLys, BL21StarTM(DE3), BL21Codon plus RIL e BL21Codon plus RP. Estas linhagens foram escolhidas porque as linhagens de BL21(DE3) são apropriadas à expressão de proteínas em sistemas de expressão que utilizam o promotor T7 e são linhagens deficientes na expressão dos genes *ompT* e *lon* que codificam proteases. As derivações das linhagens de BL21(DE3), denominadas “codon plus” foram utilizadas pois permitem a expressão de tRNAs para códons raros, o que pode determinar maior eficiência na expressão de proteínas “tóxicas” a célula. A linhagem pLys confere maior estringência na expressão de proteínas apresentando capacidade de inibição da T7 RNA polimerase, o que auxilia na redução da expressão basal do gene alvo em condições não induzidas. Na linhagem Star existe a mutação do gene que codifica uma enzima de degradação de RNA, o que favorece que as moléculas de RNA fiquem intactas para o processo de síntese de proteínas.

Após a transformação e seleção dos clones, foi iniciada a etapa de expressão de proteínas. Uma pequena porção da suspensão dos clones de expressão foi transferida para 5 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado e cultivada durante a noite a 37° C, com agitação constante de 300 x g.

Parte da suspensão bacteriana foi armazenada como cultura permanente e outros 3 µl foram utilizados para iniciar pré-cultura de 3 ml de meio LB contendo antibiótico, a qual foi usada

nos testes de indução da expressão de AvrXacE2 e HrpF. A suspensão foi cultivada durante a noite à 37 °C com agitação constante de 300 x g. No dia seguinte, a pré-cultura foi inoculada em 500 ml de meio LB contendo antibiótico e cultivada à 37 °C com agitação constante de 300 x g até atingir O.D._{600nm} entre 0,7 e 0,8.

Após este período, 1,5 ml do meio foi retirado e ao restante do meio de cultura foi adicionado o agente indutor da expressão de proteínas, lactose ou seu análogo estrutural IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

As induções ocorreram sob agitação constante e em temperaturas que variaram de 28 a 37 °C e por períodos de duas a quatro horas. As condições das diversas tentativas de expressão das proteínas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições utilizadas nos testes de indução da expressão de proteínas.

Teste	Indutor/ [mM]	Tempo de indução (hrs)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)
1	Lactose/5,6	3	300	37
2	Lactose/5,6	4	140	28
3	IPTG/2,0	2	150	30
4	IPTG/1,0	4	230	37

3.8.2. Extração e purificação de proteínas com tampão fosfato

Após o período de indução, as culturas foram centrifugadas por 15 min a 4000 x g a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a temperatura de -20 °C, enquanto o precipitado foi ressuspenso em 22 ml de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF e 1 mg/ml lisozima), incubado por 30 min em gelo e submetido a lise celular em gelo utilizando disruptor de células ultra-sônico (Cole-Parmer Instrument). O material obtido foi centrifugado a 15000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C para posterior análise em gel tipo SDS-PAGE.

O precipitado foi ressuspenso em 12 ml de solução contendo 100 mM tampão fosfato pH 7,8; 2 M uréia; 5 mM EDTA e 2 % Triton X-100 (v/v) e homogeneizado utilizando o desruptor de células ultra-sônico. Este material foi então centrifugado a 15000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de solução 100 mM tampão fosfato pH 7,8 e transferido para Becker, com agitação constante. À esta solução foi adicionada, gota-a-gota, solução de uréia (8 M) até a solução resultante se tornar translúcida, indicando que toda a proteína foi solubilizada.

Para a reestruturação da proteína (*refolding*), foram utilizados dois métodos: diálise e diluição (TSUMOTO et al., 2003).

No procedimento de diálise, 20 ml da solução contendo a proteína solubilizada em 8 M uréia foram dialisados durante a noite à temperatura de 10 °C em 5 L de tampão de diálise [100 mM tampão fosfato pH 7,8, 5 % glicerol (v/v) e 100 mM NaCl]. Após a diálise, a amostra contendo proteína foi concentrada utilizando tubos Amicon Ultra-15 (limite de retenção para moléculas maiores de 10 KDa) (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

Na realização do procedimento de diluição, 100 ml do tampão de diálise [100 mM tampão fosfato pH 7,8; 5 % glicerol (v/v) e 100 mM NaCl] foram mantidos à temperatura ambiente com suave agitação constante e a esta solução foi adicionada, gota-a-gota, a solução que continha a proteína solubilizada em 8 M de uréia, até que a solução de diluição se tornasse turva. Esta solução foi então centrifugada a 15000 x g por 20 min à 4 °C e o sobrenadante foi concentrado em tubos Amicon Ultra-15 (Millipore).

3.8.3 Extração e purificação de proteínas com tampão Tris-HCl

Após o período de indução da expressão de proteínas, as culturas foram centrifugadas por 15 min a 4000 x g a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi armazenado à temperatura de -20 °C, enquanto o precipitado foi ressuspenso em 22 ml de tampão (100 mM fosfato de sódio dibásico, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF, 1mM lisozima) e incubado em banho de gelo por 30 min seguido de lise celular utilizando desruptor de células ultra-sônico. O material obtido foi centrifugado a 14000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C para posterior análise em gel tipo SDS-PAGE. O precipitado foi então ressuspenso em 10 ml de “tampão A” (8 M uréia, 100 mM fosfato de sódio dibásico e 10 mM Tris-HCl pH 8,0). A amostra foi submetida à homogeneização utilizando o desruptor de células ultra-sônico, seguido de

centrifugação a 14000 rpm, por 20 min à 4 °C. O sobrenadante produzido nesta etapa foi utilizado no procedimento de purificação usando resina contendo níquel e nos testes de interação (PORAH et al., 1975; LICHTY et al., 2005).

A coluna contendo 1 ml de resina Ni-NTA (“nickel-nitrilotriacetic acid”) (Qiagen) foi lavada com água deionizada estéril e equilibrada com 3 ml de “tampão A”. O volume total da fração contendo a proteína solubilizada foi adicionado à coluna cromatográfica que foi posteriormente lavada com 12 ml de “tampão B” (100 mM fosfato de sódio dibásico e 10 mM Tris-HCl pH 6,3), e teve a proteína eluída com “tampão C” (150 mM Imidazol, 100 mM fosfato de sódio dibásico e 10 mM Tris-HCl, pH 6,3) (BÜTTNER et al., 2002b). As frações obtidas da purificação foram coletadas e armazenadas a -20 °C. Volume de 40 µl de cada uma das frações foi misturado a 40 µl de 2x tampão de amostra “Laemlli” (6,6 % SDS; 30 % glicerol; 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 100 mM DTT e 0,02 % azul de bromo fenol) e foram analisadas em gel tipo SDS-PAGE.

3.9 Teste de interações da proteína AvrXacE2

Com base nos trabalhos de Puig et al. (2001), foi idealizado um teste para identificar interações entre as proteínas recombinantes de Xac expressas no sistema heterólogo e outras proteínas citoplasmáticas de Xac que possivelmente interagissem com esta proteína-alvo.

Para permitir que as possíveis interações entre as proteínas citoplasmáticas de Xac ocorressem apenas com a proteína-alvo fusionada à cauda de polihistidina e não com a proteína-alvo endógena de Xac selvagem, a linhagem mutante de Xac 306ΔXAC3224 foi utilizada nos testes de interação de proteínas.

A proteína AvrXacE2 contendo cauda His6-tag, produzida durante este estudo, foi submetida a três testes de interação com as proteínas citoplasmáticas da linhagem mutante 306ΔXAC3224. A opção em produzir e utilizar as proteínas do mutante 306ΔXAC3224 para estes testes de interação foi reconhecida como importante a fim de evitar que fossem encontradas falsas interações devido ao fato de as verdadeiras interações terem ocorrido entre a proteína-alvo AvrXacE2 endógena de Xac e as próprias proteínas citoplasmáticas de Xac (Figura 7).

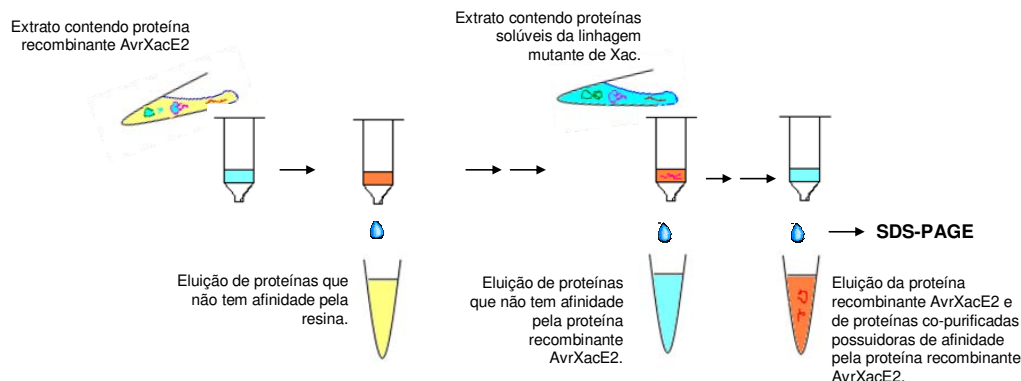


Figura 7. Teste de interação de proteínas. Sequência esquemática da estratégia metodológica para análise de interações entre a proteína recombinante AvrXacE2 com as proteínas solúveis extraídas da linhagem mutante 306ΔXAC3224.

Para os testes de interação, foi realizada a expressão da proteína AvrXacE2 em 500 ml de meio LB, seguido da extração com tampão Tris-HCl como descrito anteriormente. Esta proteína extraída foi adicionada à coluna cromatográfica contendo níquel “*His-gravity column*” (GE Healthcare- Life sciences) previamente lavada e equilibrada com 20 ml do “tampão A” (8 M uréia, 100 mM fosfato de sódio dibásico, 10 mM Tris-HCl pH 8,0). A coluna foi lavada com 30 ml de tampão de lavagem contendo 100 mM fosfato de sódio dibásico, 10 mM Tris-HCl, pH 6,3 para eluição de proteínas contaminantes. Nesta mesma coluna foi adicionado o extrato de proteínas solúveis da linhagem mutante de Xac 306ΔXAC3224. O extrato de proteínas solúveis da linhagem mutante foi obtido pelo seu cultivo em 500 ml de meio NB, a 28 °C, até atingir D.O. 600nm = 0,6. Esta suspensão foi centrifugada a 5000 x g por 10 min e o precipitado foi ressuspensão em 22 ml de tampão de extração (100 mM fosfato de sódio dibásico, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF e 1mM lisozima), incubado por 30 min em gelo e submetido a lise celular mecânica utilizando disruptor de células ultra-sônico (Cole–Parmer Instrument).

O lisado celular foi então centrifugado a 15000 x g por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante foi adicionado a coluna cromatográfica contendo a proteína recombinante AvrXacE2. A coluna foi então lavada com 30 ml de solução contendo 100 mM fosfato de sódio dibásico, 10 mM Tris-HCl, pH 6,3, e a eluição das proteínas foi realizada com gradiente crescente da concentração de

imidazol na solução 100 mM fosfato de sódio dibásico, 10 mM Tris-HCl, pH 6,3. As soluções de eluição continham as seguintes concentrações de imidazol: 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM.

Paralelamente a este ensaio, foi realizada, como controle negativo, a purificação do extrato de proteínas solúveis da linhagem mutante em outra coluna cromatográfica que não continha a proteína recombinante AvrXacE2, para reconhecimento de proteínas que supostamente estariam interagindo inespecificamente com a resina cromatográfica. As condições cromatográficas usadas neste teste controle foram as mesmas utilizadas nas análises com a proteína recombinante. Todas as frações obtidas nestes testes foram analisadas por SDS-PAGE.

3.10. Separação de proteínas

Os sobrenadantes, frações cromatográficas e amostras dialisadas ou concentradas foram analisados através de géis tipo SDS-PAGE para determinação da presença da proteína de interesse e sua massa molecular aparente (LAEMMLI, 1970).

Foram confeccionados géis de poliacrilamida de concentração de 12,5 % [12,5 % solução acrilamida (30 % acrilamida: 0,8 % bis-acrilamida (p/p)], 0,04 % APS (p/v), 0,05 % TEMED (v/v), 0,37 M Tris-HCl pH 8,8] para o gel de separação e 5 % para os géis de empacotamento {5 % solução acrilamida [30 % acrilamida: 0,8 % bis-acrilamida (p/p)], 0,04 % APS (p/v), 0,05 % TEMED (v/v), 0,37 M Tris-HCl pH 6,8] de dimensões 8,3 cm x 7,3 cm x 1 mm.

3.11. Análise comparativa de proteínas de Xac selvagem *versus* Xac 306ΔXAC0394

Para melhor compreensão do papel do gene *hrpF* na manifestação do cancro cítrico, foi proposta também neste trabalho a análise comparativa das possíveis proteínas diferencialmente expressas nas linhagens de Xac selvagem e 306ΔXAC0394 através da análise comparativa de géis de eletroforese bidimensional (2D).

Na eletroforese bidimensional (2DE) as proteínas podem ser separadas de acordo com duas características físico-químicas: ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (mW). Desta forma, um número significativo de proteínas, oriundas de uma mesma amostra, pode ser simultaneamente separado (O'FARRELL, 1975).

A primeira dimensão da 2DE é a focalização isoelétrica (IEF), na qual as proteínas são separadas em um gradiente de pH até alcançarem a posição estacionária onde a carga total é zero (ponto isoelétrico). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são novamente separadas por eletroforese do tipo SDS-PAGE (baseada no peso molecular –MW - das proteínas). O resultado da separação é um perfil onde cada proteína representa um ponto, ou *spot*, e o tamanho de cada *spot* é proporcional à quantidade. Segundo um sistema Cartesiano, da esquerda para a direita há um aumento do pI e de baixo para cima um aumento da massa molecular.

As células das linhagens de Xac selvagem e mutante 306ΔXAC0394 foram cultivadas separadamente em 500 ml de meio NB por 20h, a 28 °C sob agitação constante de 180 x g até atingir densidade óptica de 0.6 lida a 600 nm. Estas culturas foram centrifugadas por 10 min a 4000 x g a 4 °C e as células contidas no precipitado foram lavadas três vezes em tampão de lavagem (10mM Tris-HCl pH8,8, 3mM KCl, 50mM NaCl, 5mM EDTA, 2mM PMSF e 1:50 coquetel inibidor de proteases) e posteriormente centrifugadas por 2 min a 5000 x g.

Volume de 400 µl do sobrenadante da terceira lavagem de células de cada cultura foi armazenado e as proteínas, aqui denominadas de “pericelulares” contidas nesta solução foram precipitadas com 1200 µl de solução contendo 50% acetona, 49% etanol, 1% ácido acético (v/v/v) por 30 minutos em banho de gelo.

A solução foi centrifugada a 14 000 x g por 15 minutos, o precipitado lavado duas vezes com solução contendo 80 % etanol e depois de seco a temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspenso em 50 µl tampão [1% SDS (p/v), 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM PMSF, 100 mM DTT e 2 % (v/v) coquetel inibidor de proteases de bactérias (Sigma)]. As amostras foram dosadas pelo método de Bradford e 400 µg de proteínas foram utilizados para a isoeletrofocalização de proteínas “pericelulares”.

Aproximadamente 100 mg de células presentes no precipitado proveniente da etapa de lavagem, foram lisados com 100 µl de tampão [1% SDS (p/v), 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM PMSF, 100 mM DTT e 2 % (v/v) coquetel inibidor de proteases de bactérias (Sigma)] e homogeneizadas com auxílio de micro-seringas. Anteriormente à adição do DTT, parte da amostra foi retirada para realização da dosagem protéica utilizando-se Kit comercial (“BIO RAD – DC protein assay kit”) ou Bradford (BRADFORD, 1976). O extrato de proteínas citoplasmáticas foi fracionado e estocado à –80 °C. Estas alíquotas foram posteriormente utilizadas para a realização da isoeletrofocalização (IEF).

Na IEF, volume de amostra contendo 500 µg de proteínas foi solubilizado no tampão SB1D [8 M uréia, 4 % CHAPS (p/v), 70 mM DTT, 2 % anfólitos (v/v), 0,001% (p/v) azul de bromo fenol] completando o volume final para 350 µl. As amostras foram homogeneizadas em *vortex* por 1 minuto e incubadas por 15 min a temperatura ambiente sendo posteriormente centrifugadas em temperatura ambiente a 10000 x g por 2 min e o sobrenadante foi utilizado na IEF.

Foram feitas isoeletrofocalizações de amostras protéicas utilizando-se géis de poliacrilamida desidratados pré-feitos ou *strips* (Amersham Biosciences) com faixas de gradiente fixo de pH 3 a 10 não-linear (NL) utilizando-se o aparato IPGphor (Amersham Biosciences) (GÖRG et al., 1980; TAYLOR & COORSSEN, 2006).

Os parâmetros elétricos usados para esta corrida foram: rehidratação por 12 hrs, 500 V durante 1 h, 3500 V durante 1 h e 8000 V até acumularem-se 70 kVh totais de corrida, sob refrigeração constante de 20 °C e amperagem máxima de 50 µA por gel.

Após a IEF, as *strips* foram incubadas no tampão SDS-DTT [8 M uréia, 2 % SDS (p/v), 28 % glicerol (v/v), 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,5 % DTT (p/v)] por 8 min e no tampão SDS-IAA [8 M uréia, 2 % SDS (p/v), 28 % glicerol (v/v), 1 % iodoacetamida (p/v), 50 mM Tris-HCl pH 8,8] por 12 min. Após este período, foram adicionados 200 µl de tampão 1 M Tris-HCl pH 6,8 em cada *strip*, que permaneceram 2 min adicionais sob esta condição.

Subseqüentemente a este passo, aproximadamente 2 ml de agarose 0,5 % (p/v) aquecidos a 70 °C foram adicionados sobre o gel de poliacrilamida de concentração de 12,5 % [12,5 % solução acrilamida (30 % acrilamida: 0,8 % bis-acrilamida (p/p)), 0,04 % APS (p/v), 0,05 % TEMED (v/v), 0,37 M Tris-HCl pH 8,8] de dimensões 15cm x 16cm x 1,5mm, que recebeu em sua superfície as *strips* da IEF.

As corridas da segunda dimensão da 2DE foram realizadas no aparato para eletroforese modelo SE-600 (Hoefer) sob refrigeração constante de 20 °C e com uso de tampão de corrida contendo 14,42 % glicina (p/v), 1 % SDS (p/v) e 3 % Tris (p/v).

3.12. Detecção de proteínas e análise de imagem

Na etapa de coloração dos géis foram utilizados reagentes dos fabricantes Sigma e solventes Merck de alto grau de pureza (p.a.). Os géis SDS-PAGE das frações cromatográficas

foram lavados com água deionizada por 5 min após o término da corrida eletroforética e colocados diretamente em solução corante contendo 40 % metanol (v/v), 10 % ácido acético (v/v), 0,2 % Comassie B. Blue (p/v) onde permaneceram por 40 min e posteriormente foram descorados com trocas sucessivas de solução descorante composta de 40 % metanol (v/v) e 10 % ácido acético (v/v). Após a etapa de descoloração dos géis estes foram mantidos em solução descorante 10 % (v/v) e as imagens digitalizadas em *scanner* HP Scanjet 2400 (Hewlett-Packard Development Company).

Alternativamente, os géis bidimensionais que foram confeccionados para a identificação de proteínas por MS foram corados por tempo mínimo de 24 horas com solução contendo 0,12 % Comassie Blue G-250 (p/v), 10 % sulfato de amônio (p/v), 10 % ácido fosfórico (v/v) e 20 % metanol (v/v), sob constante agitação e à temperatura ambiente (CANDIANO et al., 2004).

A descoloração dos géis foi realizada através de trocas sucessivas de água deionizada, sob agitação constante, até que os *spots* se tornassem visivelmente nítidos.

Estes géis foram digitalizados em *scanner* Image Master Scanner (GE Healthcare Life Sciences) ou Sharp Scanner JX-330 (Pharmacia Biotech) em 8 *bits* e resolução de 300 dpi. Os *spots* diferencialmente expressos foram selecionados com o uso do programa PDQuest v.8.0 (Free Trial version-BioRad). Neste programa, três géis 2D de cada condição foram agrupados e os *spots* foram automaticamente detectados. Os valores obtidos da densidade óptica foram normalizados e os *spots* comparados. Automaticamente, foi criado gel virtual que possibilitou as análises estatísticas comparativas entre os dois grupos de géis (teste-t) e as análises quantitativas, permitindo o reconhecimento dos *spots* diferencialmente expressos.

3.13. Identificação de proteínas

Para a identificação de proteínas, os *spots* detectados nos géis bidimensionais podem ser extraídos do gel 2D e digeridos para a obtenção de seus peptídeos. Esta mistura de peptídeos é passível de ser analisada em um espectrômetro de massas, onde cada *spot* resultará em um *pool* de massas ou *Peptide mass fingerprint* (dados experimentais).

As proteínas detectadas nos géis foram removidas dos géis bidimensionais através de “recorte” e processadas para a identificação por MS de acordo com o protocolo modificado de Schevchenko (1996).

Os fragmentos de gel foram lavados em água por 10 min, seguido de três lavagens com solução de 60 % acetonitrila (v/v) e 25 mM bicarbonato de amônio (AMBIC). Cada *spot* foi cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 1 mm³ e desidratado com solução 100 % acetonitrila por 20 min, seguido de concentração em equipamento *speed vac* (Savant) por 20 min à temperatura ambiente.

Cada *spot* foi digerido em banho-maria a 37 °C, por 14 h, com aproximadamente 150 ng de tripsina (*modified porcine trypsin*- Promega) em solução 50 mM AMBIC.

A extração dos peptídeos dos géis foi feita através de três incubações de 15 min em solução contendo 50 % acetonitrila (v/v), 1 % ácido fórmico (v/v), seguida de incubação por 15 min em 100 % acetonitrila. A solução contendo os peptídeos extraídos foi concentrada em *speed vac* a 37 °C até a total secagem e os peptídeos foram ressuspensos em 20 µl de solução 60 % acetonitrila (v/v), 0,1 % ácido fórmico (v/v) e purificados em microcoluna “zip-tip” C18 (Millipore) utilizando instruções do fabricante para eluição direta dos peptídeos em placa de amostra com solução de matriz [60 % acetonitrila (v/v), 0,1 % ácido fórmico (v/v) e 2 % ácido alfa-ciano hidroxicinâmico (p/v)] para análise em equipamento Voyager DE-PRO MALDI-ToF (Applied Biosystems).

Os programas MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/>) e ALDENTE (<http://www.expasy.ch/tools/aldente/>) foram utilizados para a identificação das proteínas. A análise dos espectros de massas em associação com os dados de pI e MW estimados pela análise da imagem dos géis bidimensionais, possibilita a identificação praticamente inequívoca da proteína (AEBERSOLD & MANN, 2003; JOHNSON ET AL., 2005).

3.14. Análise in silico das proteínas

Métodos computacionais de predição de estrutura secundária (PsiPred - <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), localização subcelular e peptídeo-sinal (PSORT- <http://www.psort.org/psortb/index.html> e NucPred- http://www.sbc.su.se/~maccallr/nuc_pred/), propriedades físico-químicas e de composição de aminoácidos (ProtParam - <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) foram aplicados às seqüências de aminoácidos das proteínas AvrXacE2 e HrpF depositadas nos bancos de dados do genoma de Xac (<http://genoma4.fcav.unesp.br/xanthomonas/>) (JONES, 1999; GARDY et al., 2003; GASTEIGER et al., 2005; BRAMEIER ET AL., 2007).

4.0. RESULTADOS

4.1 Construção de linhagens de Xac mutantes para os genes *hrpF* e *avrXacE2*.

Para analisar o possível papel funcional das proteínas AvrXacE2 e HrpF na patogenicidade de Xac e na manifestação de sintomas do cancro cítrico, foram construídas linhagens mutantes para estes dois genes através de inserção plasmidial.

A mutação do gene de interesse ocorreu através da integração do plasmídeo “suicida” pK18mobGUSII, contendo fragmento de 488 pb do gene alvo *hrpF* no cromossomo de Xac. O mesmo foi feito com fragmento de 466 pb do gene *avrXacE2*. As células competentes de Xac selvagem foram transformadas por eletroporação.

De acordo com a teoria de mutagênese de Campbell (“Integração Campbell”) (GUTTMAN & GREENBERG, 2001), com a recombinação homóloga simples, o plasmídeo foi integrado no genoma de Xac na posição do gene alvo (Figura 8).

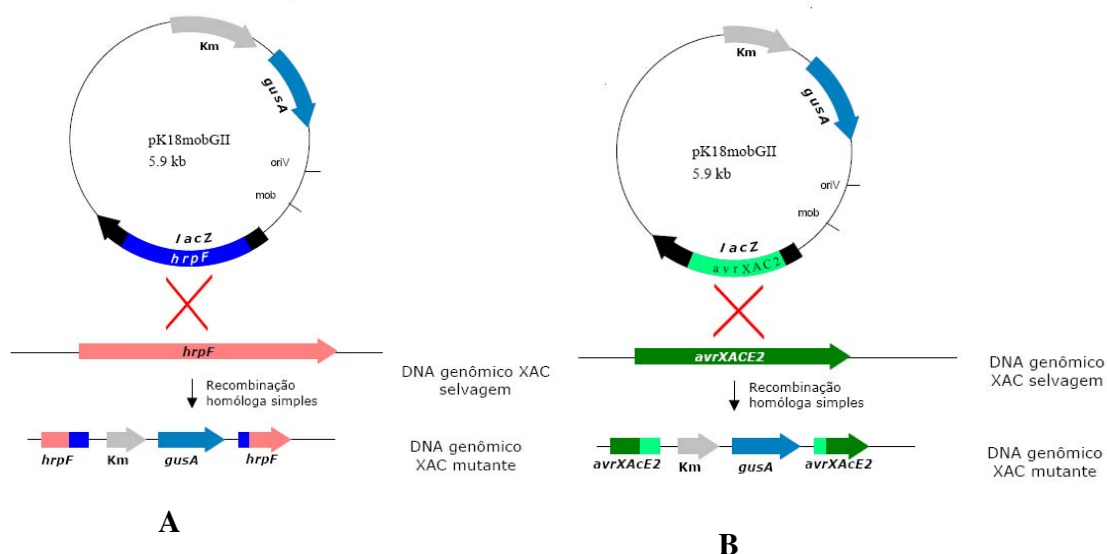


Figura 8. Representação da Mutagênese em Xac e Integração plasmidial de pK18mobGUSII contendo fragmentos dos genes alvo no genoma de Xac. (A) Interrupção do gene *hrpF*; (B) Interrupção do gene *avrXacE2*.

4.2 Confirmação da inserção e integração plasmidial nos mutantes de Xac

As células de Xac transformadas que sobreviveram a quatro subcultivos em meio NB contendo canamicina foram selecionadas e submetidas aos testes de PCR e *Southern blot*, que confirmaram a mutagênese de Xac.

O DNA genômico extraído dos mutantes foi submetido a análises por PCR onde foi verificada a presença do fragmento de gene de resistência a canamicina (*aph*), cujo tamanho da sonda utilizada é de 422 pb (Figura 9).

Aqueles mutantes cuja confirmação por PCR foi positiva tiveram seu DNA genômico analisado por *Southern blot* para a confirmação do evento único de inserção plasmidial no genoma de Xac (Figura 10). As amostras de DNA genômico dos mutantes de Xac que foram digeridas com a enzima *XhoI* não tiveram resultados positivos nos testes de *Southern blot* pois a digestão foi parcial e não permitiu a eficiente hibridação da membrana com a sonda de *aph*. A melhor digestão do DNA genômico de Xac para a realização do ensaio de *Southern blot* foi obtida com a enzima *EcoRI*.

As colônias mutantes que apresentaram resistência a canamicina e resultados positivos para as análises por PCR para o gene *aph* e confirmação, através de *Southern blot*, da presença de apenas um único evento de recombinação, foram submetidas a testes de patogenicidade *in vivo* em folhas de laranjeira.

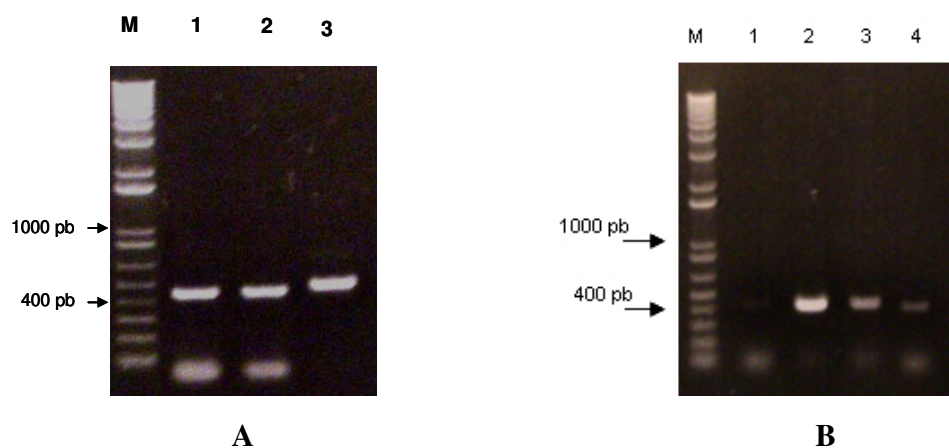


Figura 9. Eletroforese em géis de agarose (0,8 %). (A) Amplificação de fragmentos dos genes alvos que foram clonados em plasmídeo pK18mobGUSII. M: marcador 1 Kb plus (InvitrogenTM); 1e 2 Fragmentos de 466 pb do gene *avrXacE2* de colônias isoladas; 3: Fragmento de 488 pb do gene *hrpF*. (B) Amplificação de fragmento do gene *aph* (422 pb) a partir de DNA genômico de linhagens mutantes. M- marcador 1 Kb plus (InvitrogenTM); 1- controle negativo da reação, utilizando DNA genômico de Xac selvagem; 2 – controle positivo da reação, utilizando DNA plasmidial pK18mobGUSII; 3- Mutante 306ΔXAC0394; 4 - Mutante 306ΔXAC3224.

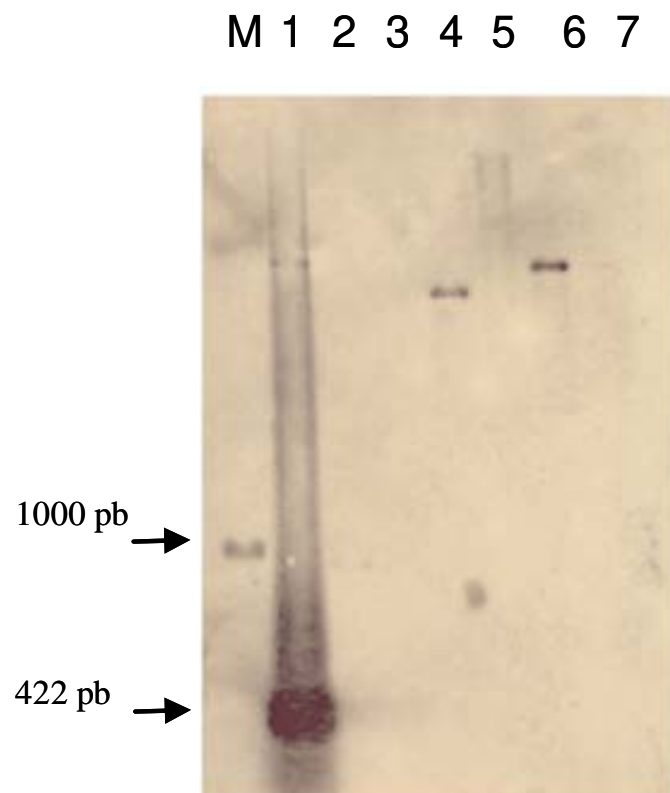


Figura 10 – Confirmação de evento único de recombinação por *Southern blot*. M- marcador 1 Kb plus (InvitrogenTM); 1- controle positivo com sonda do gene *aph* (422 pb); 2- controle negativo da reação utilizando DNA genômico de Xac selvagem digerido com *EcoRI*; 3- controle negativo da reação utilizando DNA genômico de Xac selvagem digerido com *XhoI*; 4- DNA genômico de Xac linhagem 306ΔXAC3224 digerido com *EcoRI*; 5- DNA genômico de Xac linhagem 306ΔXAC3224 parcialmente digerido com *XhoI*; 6- DNA genômico de Xac linhagem 306ΔXAC0394 digerido com *EcoRI*; 7- DNA genômico de Xac linhagem 306ΔXAC0394 parcialmente digerido com *XhoI*.

4.4 Avaliação *in vivo* do efeito da mutagênese dos genes *hrpF* e *avrXacE2* na patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Alterações na manifestação de sintomas característicos do cancro cítrico foram avaliadas em folhas de laranjeira inoculadas com as suspensões de células das linhagens mutantes 306XAC0394 e 306XAC3224 para verificação da contribuição dos genes *hrpF* e *avrXacE2* na patogenicidade de Xac.

Folhas jovens de laranjeira foram analisadas sete dias após a infiltração da suspensão de células de Xac selvagem e das linhagens mutantes. Suspensões de células de Xac selvagem quando infiltradas em folhas, desencadeiam os sintomas iniciais característicos de cancro cítrico, que constituem em acúmulo de água (*water soaking*) e hiperplasia, e que evoluem para sintomas tardios constituídos de manchas marrom-ferrugem e pústulas, com halos cloróticos ao redor das lesões.

A possibilidade de sintomas de hiperplasia foi monitorada e as imagens das folhas registradas. Apenas a linhagem mutante para o gene *hrpF* (306ΔXAC0394) apresentou incapacidade em produzir sintomas iniciais do desenvolvimento do cancro cítrico (hiperplasia do mesófilo). As folhas infiltradas com suspensão de células da linhagem mutante para o gene *avrXacE2* (306ΔXAC3224) não manifestaram alterações visíveis dos sintomas do cancro cítrico, havendo, portanto, a visualização típica de hiperplasia foliar (Figura 11).

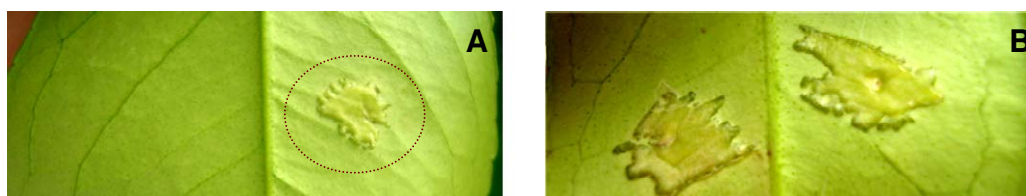


Figura 11. Teste *in vivo* da patogenicidade de Xac. (A) Região abaxial da folha infiltrada com suspensão de células da linhagem de Xac selvagem (direita da nervura central), e suspensão de células da linhagem mutante de Xac 306ΔXAC0394 (esquerda da nervura central). A área destacada na figura mostra a região de manifestação da hiperplasia. **(B)** Região abaxial da folha infiltrada com suspensão de células da linhagem de Xac selvagem (direita da nervura central), e suspensão de células da linhagem mutante de Xac 306ΔXAC3224 (esquerda da nervura central).

4.5 Clonagem e expressão de proteínas AvrXacE2 e HrpF

Os genes *avrXacE2* e *hrpF* de *Xac* foram clonados em vetores de expressão e a confirmação da clonagem foi realizada através de PCR para o gene de interesse e sequenciamento de DNA (Figura 12). Os dados obtidos do sequenciamento de DNA das construções foram analisados contra o banco de dados NCBI para verificação de existência de alterações na sequência e possíveis deleções. Os clones com resultados positivos para as análises por PCR, cujas seqüências apresentaram identidade mínima de 99 % aos genes-alvo, foram utilizados nos testes de expressão de proteínas.

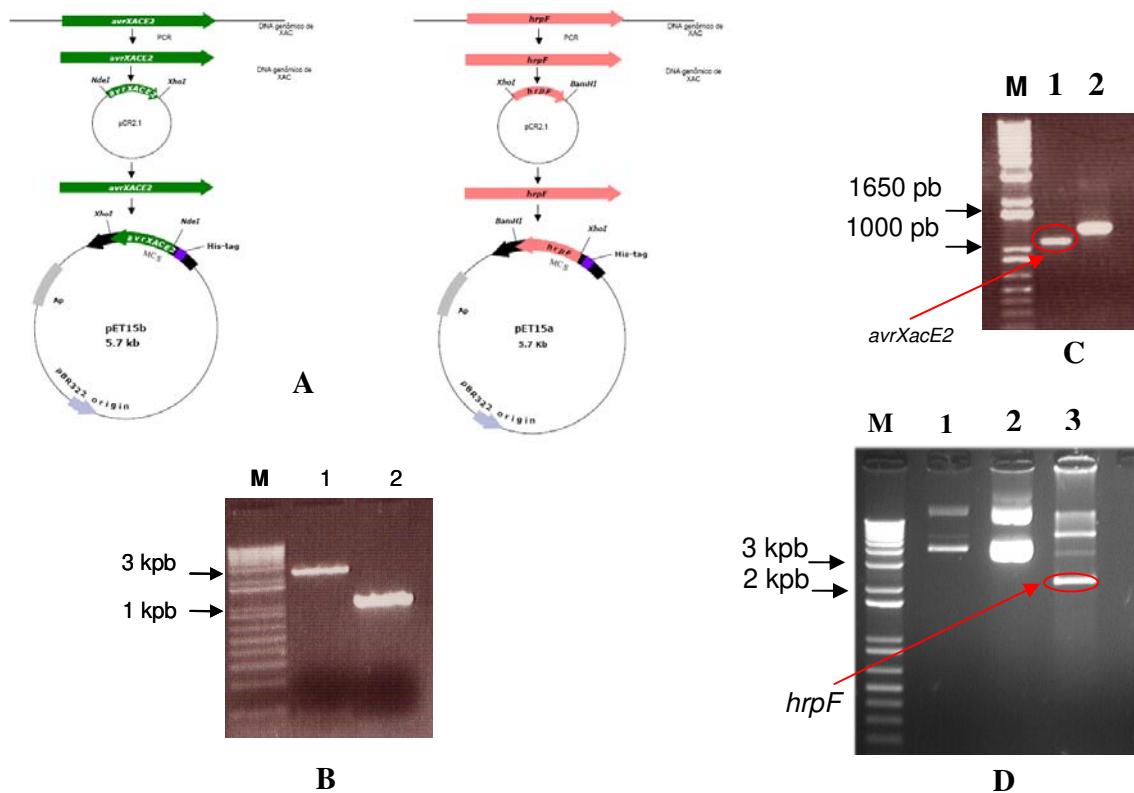


Figura 12. Clonagem e expressão de genes. (A) Esquemática gráfica da estratégia utilizada na construção de vetores para a expressão de HrpF e AvrXacE2. (B) Amplificação de *hrpF* e *avrXacE2* utilizando enzima polimerase *Pfu*, M- marcador 1kb plus (Invitrogen™), 1- amplificação do gene *hrpF* (2475 pb) a partir do DNA genômico de *Xac*, 2- amplificação do gene *avrXacE2* (1071 pb) a partir do DNA genômico de *Xac*. (C) Confirmação da clonagem do gene *avrXacE2* no plasmídeo pET15b, M- marcador 1kb plus (Invitrogen™), 1- amplificação do gene *avrXacE2* clonado no vetor pET15b utilizando primers específicos do gene, 2- amplificação do gene *avrXacE2* clonado no vetor pET15b utilizando primers específicos do vetor de expressão. (D) Confirmação da clonagem do gene *hrpF* no plasmídeo pET15b, M- marcador 1kb plus (Invitrogen™), 1- plasmídeo pET15b não digerido, 2- plasmídeo pET15b contendo o gene *hrpF* clonado, 3- plasmídeo pET15bHrpF digerido com as enzimas *BamHI* e *XhoI*.

Nenhuma das proteínas AvrXacE2 ou HrpF clonadas nos vetores pET15b foram super-expressas nas frações solúveis ou no sobrenadante das culturas induzidas (Figura 13).

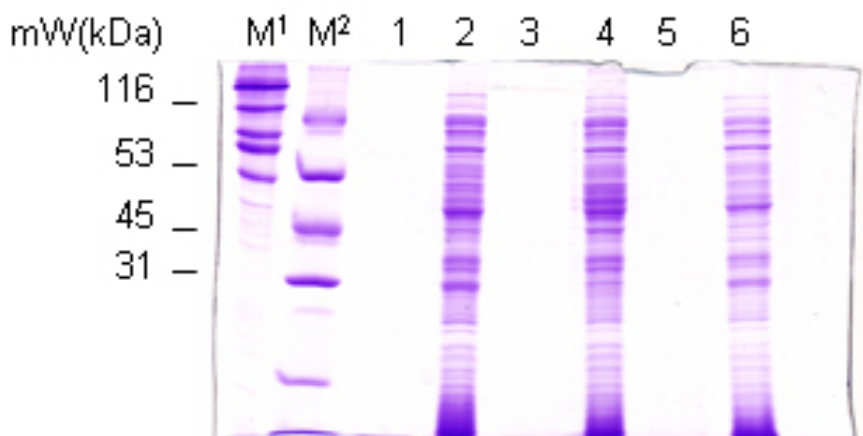


Figura 13. Extração de proteínas recombinantes. M¹- marcador de alto peso molecular (GE Life Sciences), M²- marcador de peso molecular *Broad range* (BioRad), 1- sobrenadante de cultura induzida de pET28a(+)HrpF, 2- proteínas solúveis de pET28a(+)HrpF induzido, 3- sobrenadante de cultura induzida de pET15bHrpF, 4- proteínas solúveis de pET15bHrpF induzido, 5- sobrenadante de cultura induzida de pET15bAvrXacE2, 6- proteínas solúveis de pET15bAvrXacE2 induzido.

A expressão da proteína AvrXacE2 (~39 kDa) foi realizada em diversas linhagens de *E. coli* e a proteína super-expressa na linhagem BL21(DE3) foi extraída da fração insolúvel do extrato protéico para ser purificada. Para o renovelamento da proteína purificada, foram usados os métodos de diálise, diluição e renovelamento em coluna. Estes três métodos de renovelamento não permitiram alta recuperação da proteína, devido à precipitação da proteína durante os ensaios de diálise resultando no baixo rendimento após a concentração da proteína pós-diálise e diluição (Figura 14). Houve baixa capacidade de eluição cromatográfica da proteína em tampões de baixa força iônica (menor do que 100 mM fosfato), fatores estes que podem interferir em ensaios funcionais.

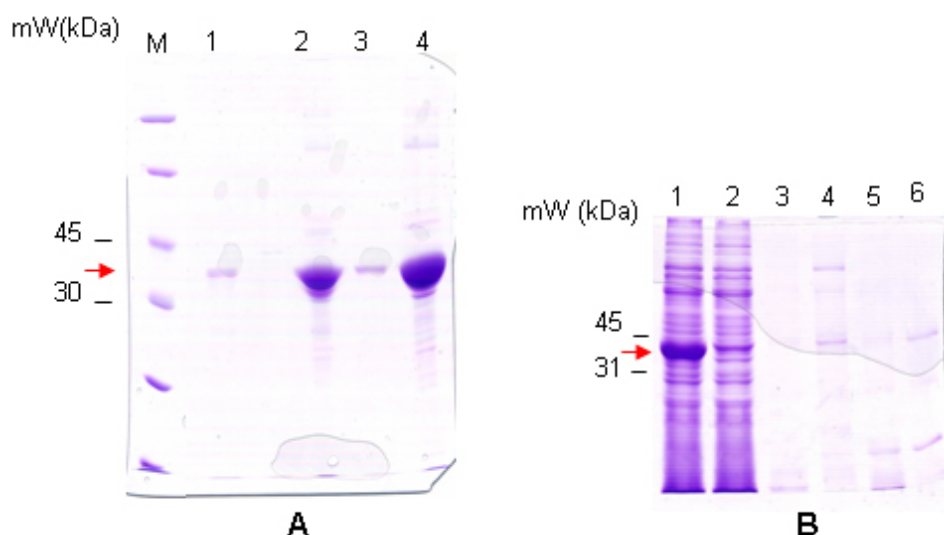


Figura 14. Géis de eletroforese das purificações de AvrXacE2. (A) M- Marcador de peso molecular, 1- AvrXacE2 dialisada (7 μ g), 2- AvrXacE2 solubilizada em solução 8M uréia, 3- AvrXacE2 diluída (6 μ g), 4- proteínas precipitadas durante diálise de AvrXacE2. (B) 1- extrato total da fração de proteínas insolúveis do lisado celular pET15bAvrXacE2 usado na purificação de afinidade, 2- *flow through* da purificação de afinidade, 3- eluato da lavagem, 4- eluato com solução contendo 50 mM de imidazol, 5- eluato com solução contendo 100 mM imidazol e 6- eluato com solução contendo 150 mM de imidazol. As setas vermelhas indicam a mobilidade eletroforética da proteína AvrXacE2.

Na tentativa da expressão da proteína HrpF foram usados dois vetores de expressão pET15b e pET28a (+) e foram testadas diversas linhagens de expressão de *E.coli*, entretanto, em nenhuma delas a proteína HrpF (~88 kDa) foi super-expressa (Figura 15).

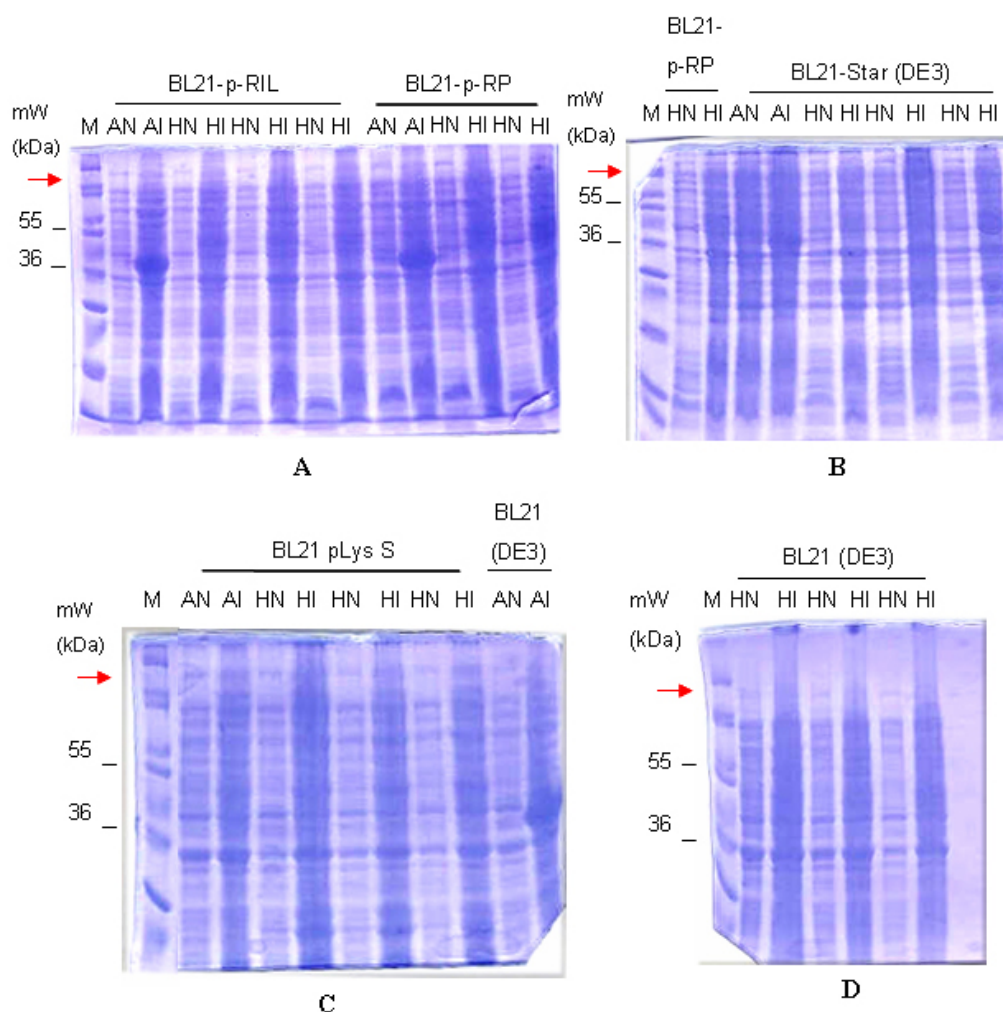


Figura 15. Teste de expressão da proteína HrpF. Géis de poliacrilamida 12 %, contendo as frações de proteínas das culturas induzida (AI ou HI) e não induzida (NA ou HN) das diferentes linhagens de *E.coli* de expressão BL21p-RIL, BL21 p-RP, BL21 Star (DE3), BL21-pLysS e BL21 (DE3). (A, B, C e D) M- marcador de peso molecular Broad Range (Bio-Rad). AN- suspensão de *E.coli* contendo a construção pET15bAvrXacE2 não induzido. AI- suspensão de *E.coli* contendo a construção pET15bAvrXacE2 induzido. HN- suspensão de *E.coli* contendo a construção pET15bHrpF não induzido. HI- suspensão de *E.coli* contendo a construção pET15bHrpF induzido. A suspensão de *E.coli* contendo pET15bAvrXacE2 foi utilizada como um controle positivo nos testes de indução de HrpF. Os extratos de proteínas de três colônias (1, 5 e 6) de *E.coli* contendo pET15bHrpF induzido e não induzidos foram utilizados sequencialmente nos testes, para cada uma das diferentes linhagens de *E.coli* de expressão. As setas vermelhas indicam a possível mobilidade eletroforética onde HrpF deveria ser visível em caso de super-expressão.

Quatro testes foram realizados variando-se as condições de indução da expressão de *hrpF* no vetor pET15b, os tempos de indução e a velocidade de agitação, entretanto em nenhuma condição a proteína foi encontrada super-expressa (Figura 16).

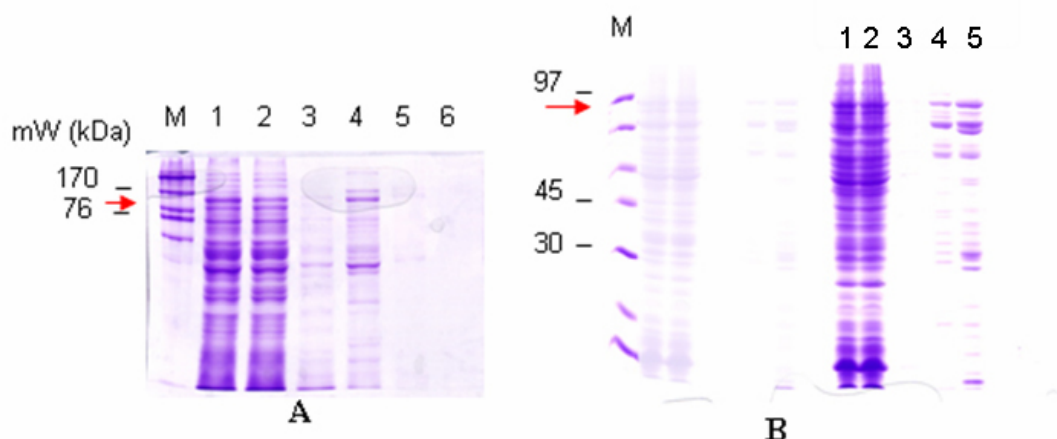


Figura 16. Géis de eletroforese de proteínas dos testes de indução da expressão e purificação de HrpF. (A) Indução da expressão de HrpF a 37 °C. M- marcador de alto peso molecular (Amersham), 1- extrato total de proteínas solúveis em solução 8M uréia, 2- *flow through* da purificação de afinidade, 3- eluato da lavagem da coluna, 4- eluato com solução contendo 50 mM de imidazol, 5- eluato com solução contendo 100 mM de imidazol, 6- eluato com solução contendo 150 mM de imidazol. (B) Indução da expressão de HrpF a 30 °C. M- marcador de peso molecular, 1- extrato total de proteínas solúveis em solução 8M uréia, 2- *flow through* da purificação de afinidade, 3- eluato da lavagem da coluna, 4- eluato com solução contendo 100 mM de imidazol, 5- eluato com solução contendo 150 mM de imidazol. As setas vermelhas indicam a possível mobilidade eletroforética que a proteína HrpF apresentaria .

Atualmente vários programas computacionais têm auxiliado nas caracterizações bioquímicas e estudos de predição estrutural *in silico* de proteínas. Isto vem ao encontro às novas necessidades de informações a respeito do possível comportamento das moléculas, conhecimento este que podem beneficiar as otimizações de métodos de caracterização de proteínas.

Utilizando alguns destes programas foram realizadas predições de características de ambas as proteínas, AvrXacE2 e HrpF e que podem auxiliar nos estudos posteriores sobre estas proteínas e nas otimizações ou adaptações de protocolos (Tabela 5).

Tabela 5. Características preditas para as proteínas AvrXacE2 e HrpF.

Característica predita	AvrXacE2	HrpF	Programa utilizado para predição
Localização celular	citoplasma	membrana interna bacteriana	PSORT
Massa molecular	38635.5	88460.9	ProtParam
Número de aminoácidos	359	824	ProtParam
Ponto isoelétrico	7.82	5.52	ProtParam
Regiões transmembrana	ausentes	Presente (a.a.682 – 698)	PSORT
Sequência para localização nuclear	Presente (a.a 44 – 48)	ausente	NucPred
Sequência sinal (N-terminal)	ausente	ausente	PSORT SIGNAL P 3.0
Sítio de fosforilação	11 sítios (treonina), 1 sítio com alta probabilidade	30 sítios (treonina), 3 sítios com alta probabilidade (aa. 1069, 1325 e 2422)	NetPhos 2.0

Através de uma caracterização parcial *in silico*, além das predições de características físico-químicas das proteínas, foi possível também prever uma possível região sinalizadora de localização nuclear na proteína AvrXacE2 e uma região de domínio transmembrana na proteína HrpF (Figura 17 e 18).

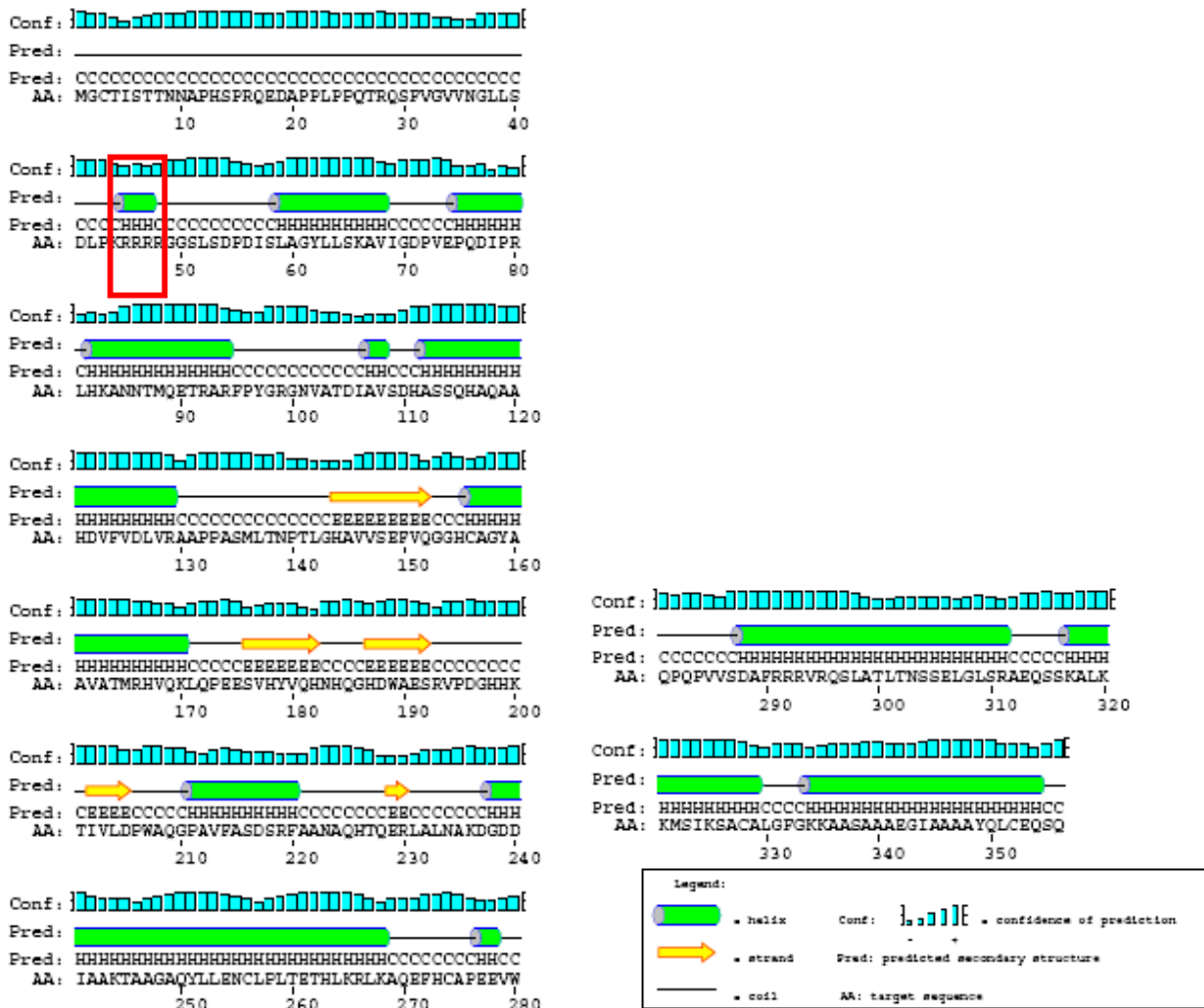


Figura 17. Predição de estrutura secundária da proteína AvrXacE2. Material obtido pelo processamento da sequência de aminoácidos da proteína pelo programa PsiPred (a região destacada em vermelho constitui a sequência sinalizadora de localização de núcleo celular predita nos estudos *in silico*).

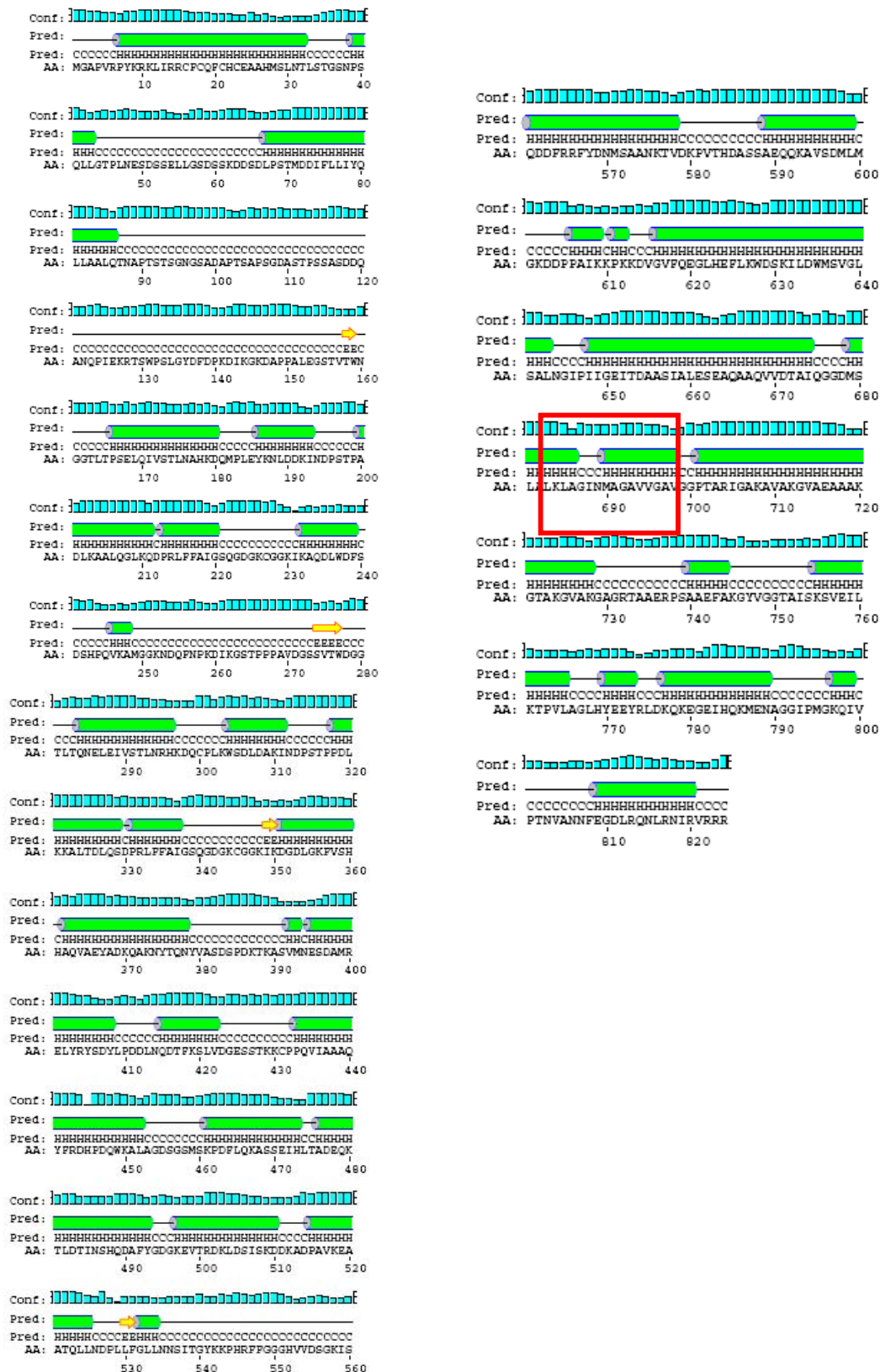


Figura 18. Predição de estrutura secundária da proteína HrpF. Material obtido pelo processamento da sequência de aminoácidos da proteína pelo programa PsiPred (a região destacada em vermelho constitui a sequência de domínio transmembrana predita nas análises, *in silico*, entre os aminoácidos 682 a 698).

4.6 Análise de interações da proteína AvrXacE2

Para analisar a possível interação de AvrXacE2 com outras proteínas citoplasmáticas de Xac, foram realizados ensaios de interação entre a proteína recombinante AvrXacE2 com as proteínas citoplasmáticas extraídas da linhagem 306 Δ XAC3224. Como controle negativo, o extrato total de proteínas da linhagem mutante 306 Δ XAC3224 de Xac foi submetido às mesmas condições de purificação realizadas nos ensaios de interação, permitindo a eliminação de resultados falso-positivos. Foi visto que algumas proteínas de Xac se ligam inespecificamente à coluna cromatográfica de níquel, entretanto nenhuma proteína se ligou à proteína recombinante AvrXacE2 de maneira específica (Figura 19).

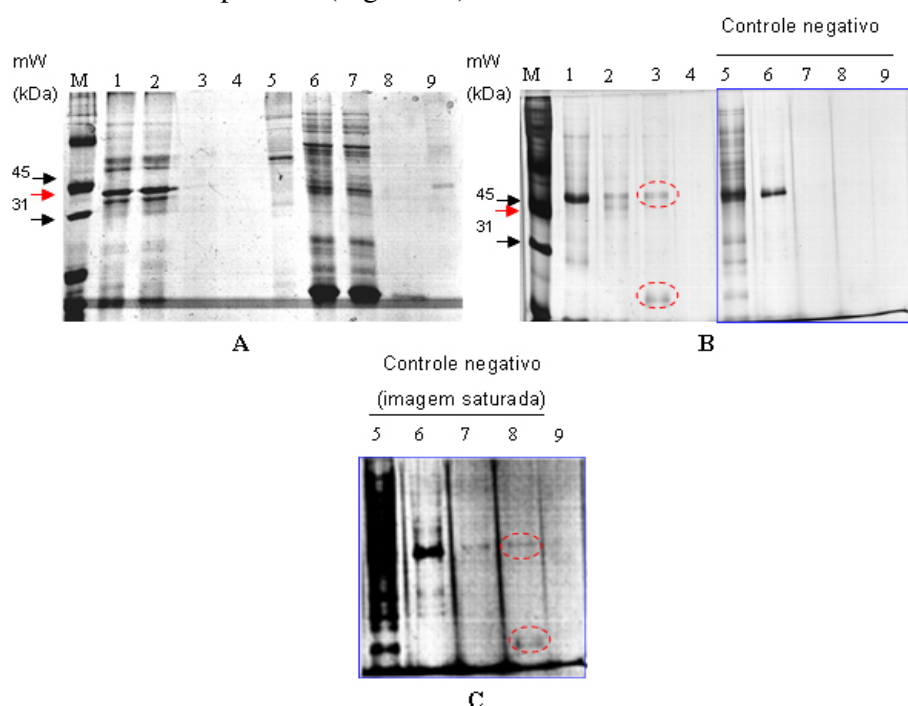


Figura 19. Géis SDS-PAGE para a análise de interações entre proteínas citoplasmáticas de Xac e AvrXacE2 recombinante. (A). M-marcador de peso molecular *Broad Range* (BioRad), 1- extrato total de proteínas contendo AvrXacE2 dialisada e concentrada, 2- *flow through*, 3- lavagem, 4 e 5- eluato da passagem de solução 5 mM imidazol e 50 mM imidazol respectivamente, 6- extrato total de proteínas da linhagem 306 Δ XAC3224, 7- *flow through* do extrato de proteínas totais de 306 Δ XAC3224, 8- lavagem, 9- eluato da passagem de solução 5 mM imidazol. (B) M-marcador de peso molecular *Broad Range* (BioRad), 1, 2, 3 e 4- eluato da passagem de solução 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM de imidazol, respectivamente, 5, 6, 7 e 8- eluato da passagem de solução 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM imidazol, respectivamente (a área destacada por um retângulo azul corresponde ao controle negativo da reação, feito através da purificação do extrato de proteínas totais de 306 Δ XAC3224). (C) Imagem saturada da região do gel contendo amostras do controle negativo da reação de interação (as elipses em vermelho destacam as proteínas de 306 Δ XAC3224 com afinidade inespecífica pela resina cromatográfica e que são encontradas também no ensaio de interação de AvrXacE2 e as setas em vermelho indicam a mobilidade eletroforética de AvrXacE2 recombinante).

4.7 Análise comparativa de proteínas expressas por Xac selvagem e Xac 306 Δ XAC0394.

Considerando a alteração da patogenicidade observada na linhagem 306 Δ XAC0394, mutante para o gene *hrpF*, foram analisados comparativamente os perfis de proteínas expressas pelas linhagens de Xac selvagem e 306 Δ XAC0394 (Figura 20). Para isto, foram confeccionados géis bidimensionais das duas amostras de células de Xac e de suas frações “pericelulares” (Figura 22).

Os ensaios foram realizados em triplicata e três géis de cada condição foram comparados e os *spots* diferencialmente expressos foram detectados. Para a análise de imagens, foram realizadas análises automáticas de detecção e comparação de *spots*, havendo pouca edição manual nas detecções.

Os géis das amostras de Xac selvagem apresentaram uma média de número de *spots* igual a 402, com desvio padrão (DP) igual a 12. Os géis das amostras Xac 306 Δ XAC0394 apresentaram média de número de *spots* igual a 432 e DP igual a 9. Percebe-se que ocorreu apenas uma pequena alteração do número de *spots* entre as duas condições analisadas, se considerarem-se os dados de DP.

Com as análises computacionais, após a normalização e comparação dos géis, foi possível determinar as alterações na intensidade dos *spots*. Através da análise estatística pelo teste- t, foi possível detectar os *spots* com variação estatística significativa ($p < 0,05$). Pelas análises qualitativas e quantitativas foi possível detectar quais *spots* de uma condição estavam com seus níveis de intensidade aumentados de duas vezes em relação ao mesmo *spot* de outra condição. Isto permitiu a avaliação da possibilidade de identificação de alguns destes *spots* diferencialmente expressos.

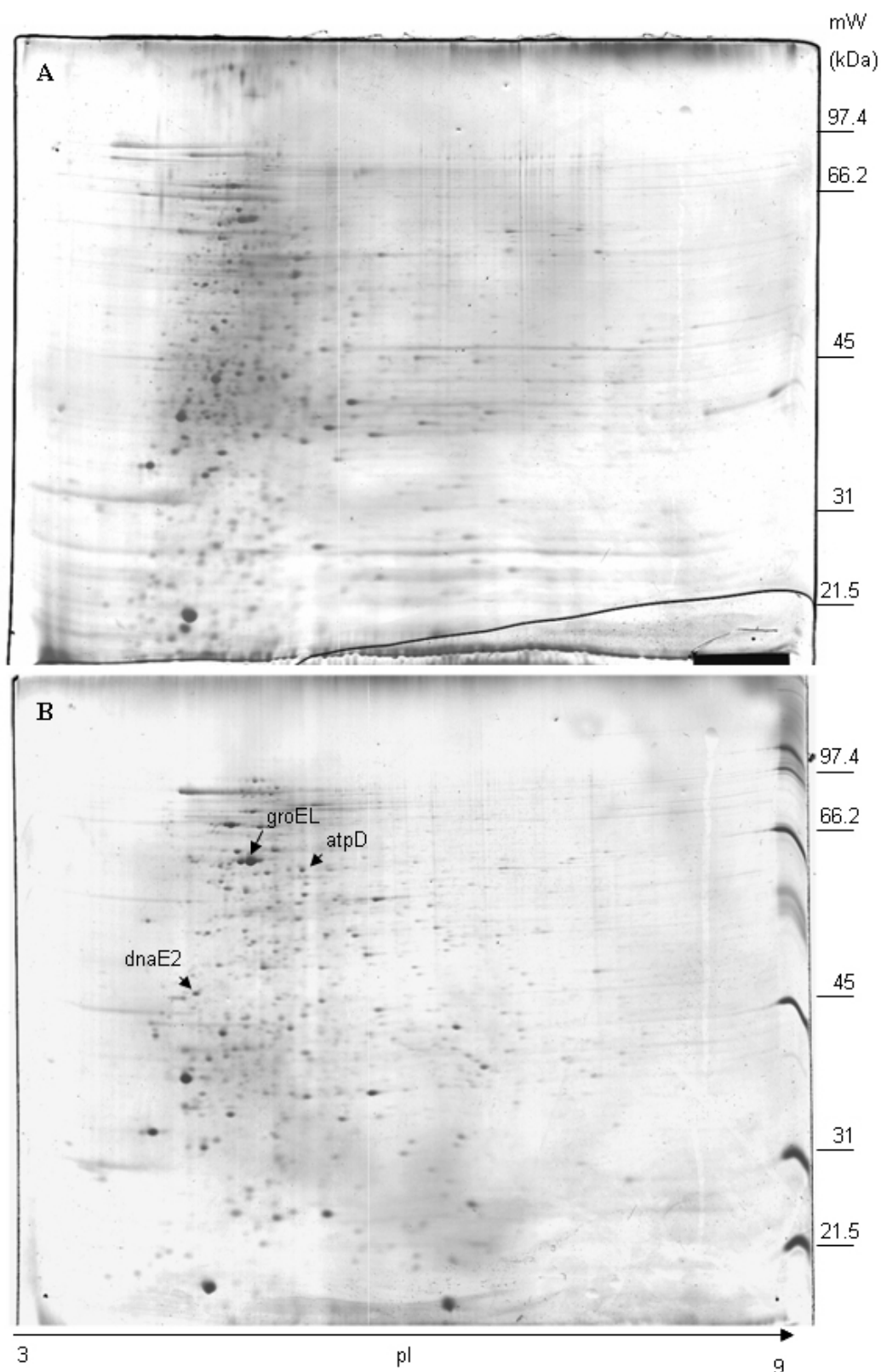


Figura 20. Géis de eletroforese bidimensional de proteínas. (A) Perfil bidimensional de proteínas extraídas da linhagem de Xac selvagem. (B) Perfil bidimensional de proteínas citoplasmáticas extraídas da linhagem Xac 306ΔXAC0394 (as setas apontam para os *spots* analisados e possuem a indicação do correspondente nome do gene da proteína identificada).

Do total de *spots* analisados e comparados, 69 foram considerados como estatisticamente relevantes, apresentando alterações de intensidade. Dentre eles, 29 estavam duas vezes mais abundantes no grupo de géis da linhagem 306ΔXAC0394 e 14 estavam duas vezes mais abundantes no grupo de géis de Xac selvagem (Figura 21).

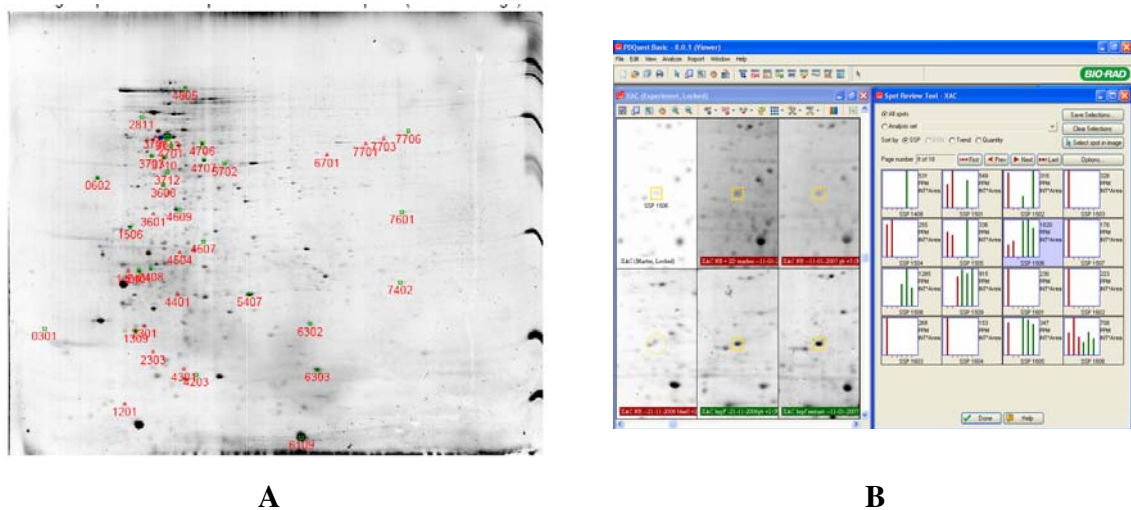


Figura 21. Análise comparativa. (A) Gel bidimensional com os *spots* diferenciais indicados e numerados (apenas estão indicados os *spots* cuja alteração foi duas vezes maior). (B) Página do programa para comparação simultânea dos géis 2D e análise dos histogramas mostrando as intensidades relativas dos *spots* e grupos de géis.

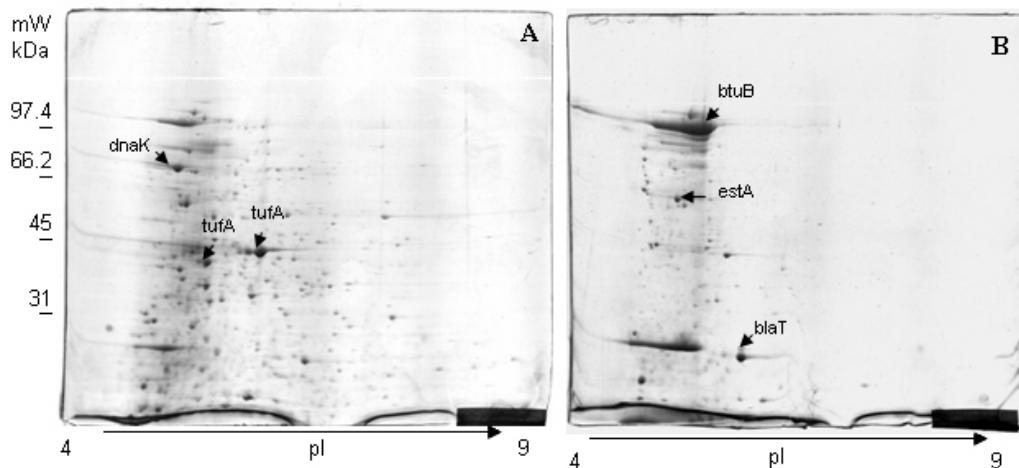


Figura 22. Proteínas “pericelulares”. (A) Perfil bidimensional de proteínas “pericelulares” da linhagem selvagem de Xac. (B) Perfil bidimensional de proteínas “pericelulares” da linhagem 306ΔXAC0394 (as setas apontam os *spots* que foram analisados e identificados por espectrometria de massas e possuem a indicação do correspondente gene identificado).

Dentre todas as proteínas diferencialmente expressas, apenas três proteínas citoplasmáticas e cinco proteínas “pericelulares” mais abundantes foram analisadas por espectrometria de massas, identificadas por *peptide-mass fingerprint* e validadas com o uso do software Aldent (Figura 23). Picos monoisotópicos dos espectros de massas com intensidade entre 2 e 4 %, foram submetidos à busca no banco de dados SwissProt (<http://www.expasy.ch>) pelo programa Aldent, considerando tolerância em massa de 100 ppm para erros de calibração externa e tolerância máxima de 50 ppm para erros de calibração interna. Para a calibração externa e interna dos espectros de massas foi utilizado o kit Peptide Sequazyme (Applied Biosystems) que contém peptídeos com massas conhecidas. Nas buscas no programa Aldent foi mantida a faixa de maior abrangência de pI (0 a 14) e mW (0 a 250 kDa) e foram consideradas variáveis as modificações de carbamidometilação e metilação. A lista das proteínas identificadas está descrita na Tabela 6.

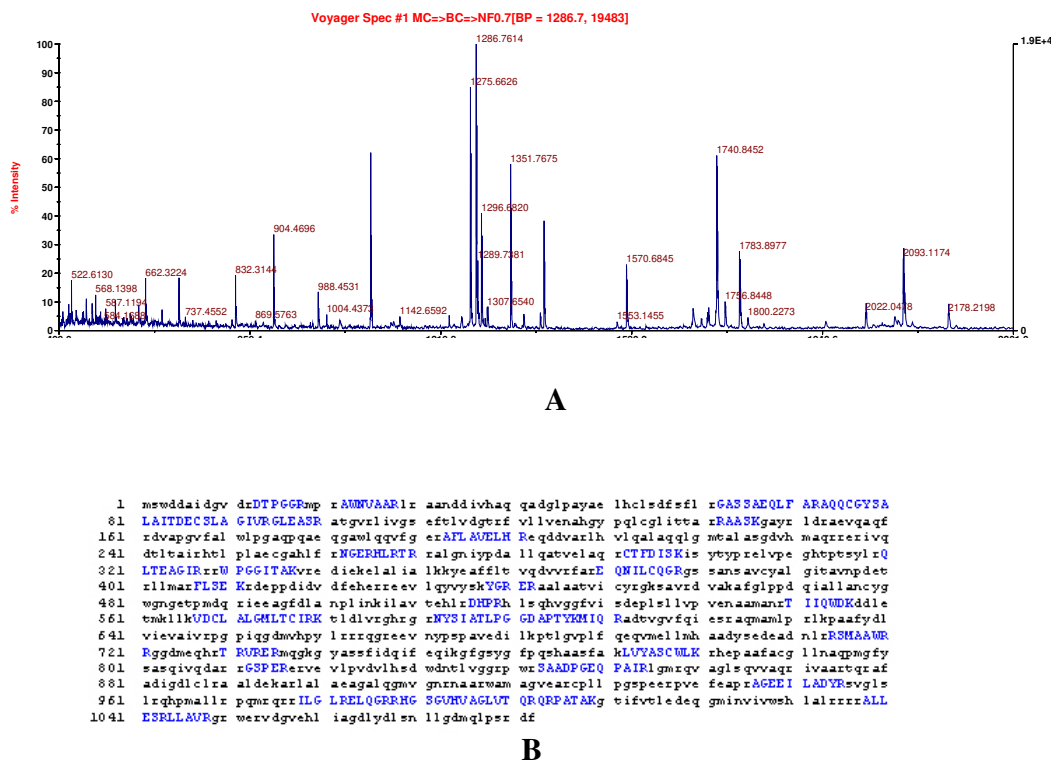


Figura 23. Identificação de proteínas. (A) Imagem de um dos espectros de massas utilizado para as identificações das proteínas. (B) Sequência da proteína identificada (as regiões em azul destacam os peptídeos identificados da proteína e o conjunto destes peptídeos representa a cobertura da sequência).

Tabela 6. Proteínas de Xac identificadas por *peptide-mass fingerprint*.

Gene / loci	Cód. acesso (UniProt/ Swiss Prot)	pI*	mW (kDa)*	Cobertura (%)*	Proteína
<i>Proteínas citoplasmáticas super-expressas em Xac 306ΔXAC0394</i>					
dnaE2 /XAC1199	Q8PN74	7.88	120	15	Error prone DNA polymerase
groEL /XAC0542	Q8PPZ1	5.06	57	19	60kDa chaperonin GroEL
atpD /XAC3649	Q8PGG7	5.17	50	13	ATP synthase subunit beta
<i>Proteínas “pericelulares” super-expressas em Xac 306ΔXAC0394</i>					
estA / ND*	Q8PHF7	4.9	62	14	Lipase
blaT / ND*	P62593	5.7	31	56	Beta-lactamase TEM precursor
btuB / ND*	Q8PH16	4.8	103	9	TonB
<i>Proteínas “pericelulares” super-expressas em Xac selvagem</i>					
dnaK/ XAC1522	Q8PMB0	4.96	68	15	DnaK chaperone
tufA / XAC0957	Q8PNL22	5.45	43	28	Elongation factor Tu

* **pI**: ponto isoelétrico teórico, **mW**: peso molecular teórico, **cobertura**: porcentagem da sequência da proteína que foi identificada, **ND**: loci não determinado.

5.0 DISCUSSÃO

A disponibilidade das seqüências de ORFs do genoma de Xac e as anotações disponíveis destes genes permitiram que análises de proteínas de Xac fossem feitas suscitando novos questionamentos a respeito dos mecanismos envolvidos com a sua patogenicidade.

De fato, as informações geradas auxiliaram em estudos específicos de interações entre proteínas e estudos de mutagênese de *Xanthomonas* (ALEGRIA et al., 2004; AMARAL et al., 2005).

No presente estudo, o gene *avrXacE2* não afetou a patogenicidade de Xac quando inoculada em planta hospedeira (*Citrus sinensis*), entretanto podem existir alguns fatores que podem ter influenciado neste fenótipo.

As pesquisas sobre algumas bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* incluem estudos particularizados de alguns genes potencialmente envolvidos com a patogenicidade, seja pelo envolvimento em sistemas de secreção, seja pela atuação como proteínas efetoras (SCHULTE & BONAS, 1992; DE FEYTER et al., 1993; VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1996; ROSSIER et al., 2000; BALVORA et al., 2001; BÜTTNER et al., 2002b; DUNGER et al., 2005; SCHORNACK et al., 2005; KHATER et al., 2007; KOEBNIK et al., 2007; MI et al., 2007).

Novas informações sobre a possível função de alguns genes e produtos de genes de avirulência (*avr*) e de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*) de *Xanthomonas* foram obtidas através de ensaios de mutagênese e análises de interação entre proteínas, demonstrando a potencialidade dos recursos tecnológicos atualmente disponíveis para analisar a patogenicidade de Xac (ALEGRIA et al., 2004; DUNGER et al., 2005; CASTAÑEDA et al., 2005).

Entretanto, embora sejam de fundamental importância, as informações parciais sobre a função das proteínas não nos contextualizam em uma visão fisiológica dinâmica dos processos celulares (DE KEERSMAECKER et al., 2006).

Parece, portanto, que o desenvolvimento de trabalhos que envolvam análises mais abrangentes das alterações de expressão de proteínas de Xac devam ser realizados. Mesmo com as informações disponíveis atualmente nos bancos de dados, poucos trabalhos focados no estudo do proteoma de Xac foram publicados (ROSATO & METHA 2001, ROSATO & METHA 2003; AMARAL et al, 2007).

Os efeitos pleiotrópicos dos produtos de genes *avr* na patogenicidade de *Xanthomonas* são comuns, mas não universais, e foram caracterizados em diversas espécies de patógenos (BOGDANOVE et al., 1998; ABRAMOVICHTH et al, 2003; ALFANO & COLLMER, 2004; WICHMANN & BERGELSON, 2004).

Embora o gene *avrXacE2* tenha sido identificado em estudos de micro-arranjos de DNA como super-expresso nas condições de cultivo que supostamente mimetizam o espaço intercelular de folhas (ASTUA-MONGE et al., 2005), não existe evidência concreta em citros de que este produto gênico possua função de avirulência.

A mutação de oito supostos loci de genes de avirulência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* não afetaram a sua patogenicidade, mesmo durante a colonização de diferentes espécies de plantas hospedeiras e não hospedeiras (CASTAÑEDA et la., 2005).

O desenvolvimento de hiperplasia foliar apresentado pelas folhas de laranjeira inoculadas com a linhagem de Xac mutante 306ΔXAC3224 indicam que *avrXacE2* pode não estar diretamente relacionado aos mecanismos de patogenicidade de Xac ou pode ter uma possível função de virulência, entretanto, não há informação de seu efeito no desenvolvimento da HR quando da infecção de plantas não-hospedeiras.

Pode-se supor que existam diversas razões para que o efeito de avirulência de *avrXacE2* não tenha sido determinado. Há possíveis indícios de que o gene *avrXacE2* é um pseudogene de avirulência. Predições *in silico* utilizando a ferramenta NucPred indicam que este gene possui uma única e pequena região de sinalização de localização nuclear, em contraposição aos genes de avirulência pertencentes à família de genes *avrBs3*, e notoriamente atuantes no processo de infecção, cujas seqüências de aminoácidos possuem duas ou três regiões de sinalização de localização nuclear preditas e cujos mutantes apresentaram alterações na patogenicidade (LAHAYE & BONAS, 2001; SHIOTANI et al., 2007).

A comparação entre as seqüências teóricas de aminoácidos de AvrXacE2 com a seqüência de outras seis proteínas de avirulência pertencentes à família AvrBs3/PthA, utilizando as ferramentas ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e BioEdit v. 7.0.5.3, demonstraram que AvrXacE2 apresenta apenas a conservação de 1 resíduo de leucina, 1 resíduo de triptofano e 2 resíduos de alanina, enquanto que as seqüências das outras seis proteínas de avirulência de *Xanthomonas* analisadas (PthA, PthA2, AvrBs3, AvrBs4, AvrXa3 e AvrXa5) conservam, identicamente entre si, 5 resíduos de leucina, 4 resíduos de triptofano, 11 resíduos de alanina e 7

resíduos de prolina (dados não mostrados). Esta baixa correlação de conservação de resíduos de AvrXacE2 em relação aos resíduos presentes em outras proteínas de avirulência reforça a possibilidade de que *avrXacE2* não atue como uma proteína de avirulência.

Outro fator que poderia estar associado à ausência de alteração de patogenicidade do mutante 306ΔXAC3224 seria a inexistência de chaperonas associadas à manutenção da estrutura de AvrXacE2, fato este que poderia impedir a plena função de avirulência da proteína AvrXacE2. Durante os ensaios funcionais de interação entre proteínas, não houve determinação de interações específicas de AvrXacE2 com nenhuma proteína citoplasmática de 306ΔXAC3224 e, portanto, não foi reconhecida nenhuma proteína chaperona com afinidade por AvrXacE2.

Aparentemente, os níveis de expressão do gene *avrXacE2* não são determinantes para a função de avirulência, visto que este gene foi reconhecido como super-expresso nos estudos de arranjos de DNA de Xac cultivada em meio XVM2 (ASTUA-MONGE et al., 2005).

Para complementar as informações sobre a função de AvrXacE2, ainda são necessários estudos posteriores sobre a sua possível secreção via T3SS, visto que não existem relatos sobre tal evento. Para tanto, as perspectivas são de produzir antisoros anti-AvrXacE2 utilizando a proteína recombinante AvrXacE2, capazes de detectar a presença deste produto nas frações intra e extracelular de Xac.

Nenhum estudo até o momento pôde comprovar a função de avirulência de AvrXacE2, mas com os dados do presente estudo sobre o efeito da mutagênese de *avrXacE2* na patogenicidade de Xac, associados às predições e possíveis ensaios de secreção, poder-se-á reconhecer se AvrXacE2 é um substrato do T3SS e potencial gene de avirulência ou um pseudogene de avirulência com funções não diretamente relacionadas à patogenicidade de Xac.

A participação fundamental dos genes *hrp* na patogenicidade de Xac já foi confirmada em estudos da mutagênese dos genes pertencentes ao *cluster hrp* (DUNGER et al., 2005). O gene *hrpF* foi considerado dispensável para a secreção de proteínas efetoras *in vitro*, mas essencial para a patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *in vivo*, atuando como possível molécula translocadora de proteínas efetoras, entretanto, não houve confirmação até o momento sobre quais proteínas efetoras HrpF possivelmente transloca (BÜTTNER et al, 2002b).

Para possibilitar futuras análises funcionais de HrpF, o gene *hrpF* foi clonado em dois sistemas de expressão, pET15b e pET28a(+), entretanto, não houve sucesso na indução da super-

expressão da proteína recombinante HrpF, mesmo utilizando-se várias linhagens de *E. coli* de expressão.

Alguns diferentes fatores podem ter influenciado nestes resultados, se observarem-se as propriedades bioquímicas da proteína preditas *in silico*. Com estas análises computacionais utilizando a seqüência de aminoácidos de HrpF, foi possível prever a existência de uma região transmembrana da proteína entre os resíduos de aminoácidos de posição 682 e 698.

A existência desta região transmembrana pode ter alterado a eficiência da expressão desta proteína nos sistemas heterólogos utilizados, pET15b e pET28a(+). Os sistemas utilizados para a expressão desta proteína foram escolhidos por sua disponibilidade e também por permitirem a clonagem do gene na orientação e *frame* corretos, entretanto, não existem relatos até o momento sobre a expressão de HrpF em sistemas que utilizem vetores de expressão da família pET, como pET15b (5,7 kb) e pET28a(+) (5,3 kb). Em todos os trabalhos nos quais a expressão de HrpF foi bem sucedida, foram utilizados vetores de expressão com tamanhos superiores a 10 kb, como pDSK e pLAFR, contendo triplo-promotores *lac* (BÜTTNER et al., 2002a; DUNGER et al., 2005).

Possivelmente a clonagem do gene *hrpF* (2475 pb) nos vetores da família pET não tenha sido apropriada para a expressão desta proteína em larga escala. Sem obter-se a super-expressão da proteína HrpF não foi possível a realização de ensaios funcionais de interação desta proteína com outras proteínas citoplasmáticas da linhagem mutante 306ΔXAC0394, permanecendo ainda incógnitas as possíveis proteínas efectoras translocadas por HrpF.

As avaliações sobre o fenótipo desenvolvido por folhas de citros inoculadas com a suspensão de células da linhagem 306ΔXAC0394, mutante para *hrpF*, indicaram a anulação da manifestação de sintomas primários do cancro cítrico. A função de *hrpF* parece essencial para a patogenicidade de Xac, como já demonstrado em estudos anteriores de Dunger et al. (2005).

Com a intenção de verificar algum tipo de interferência causada pela mutação de *hrpF* em outros mecanismos celulares de Xac, foram realizadas análises de géis bidimensionais das proteínas citoplasmáticas e “pericelulares” da linhagem selvagem de Xac *versus* linhagem 306ΔXAC0394. O presente estudo detectou 402 ± 12 spots no perfil bidimensional de proteínas citoplasmáticas extraídas da linhagem selvagem de Xac e 432 ± 09 spots no perfil bidimensional de proteínas extraídas da linhagem 306ΔXAC0394.

A mutação de *hrpF* alterou significativamente a expressão de 69 proteínas citoplasmáticas nas duas condições avaliadas, sendo que 29 proteínas da linhagem 306ΔXAC0394

estavam no mínimo duas vezes mais expressas do que na condição selvagem e 14 proteínas de Xac selvagem estavam no mínimo duas vezes mais expressas do que na linhagem 306ΔXAC0394.

Além dos perfis de proteínas citoplasmáticas obtidos, foram também analisadas as frações de proteínas “pericelulares” das duas linhagens de Xac, selvagem e 306ΔXAC0394, e foram observadas alterações nos perfis bidimensionais e detecção de algumas proteínas diferencialmente expressas.

Do conjunto de proteínas citoplasmáticas e “pericelulares” diferencialmente expressas, 31 *spots* foram analisados por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF e 8 proteínas foram identificadas.

A partir de nossas análises, foram identificadas alterações na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, chaperonas, enzimas, e um componente do sistema de captação de ferro.

Através da mutação de *hrpF* e das análises dos perfis bidimensionais de proteínas podemos demonstrar que a mutação de *hrpF*, caso não seja polar e atinja somente o gene alvo, está relacionada direta ou indiretamente a alterações na expressão de outras proteínas de Xac, o que pode ser um indício de uma função múltipla de HrpF.

A proteína HrpF de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria foi identificada inicialmente como uma possível proteína translocadora de proteínas efetoras, dependente do T3SS, formadora de poro e que poderia ter uma função importante no reconhecimento entre planta e patógeno, essencial para a patogenicidade de *X. campestris* pv vesicatoria, mas dispensável para o funcionamento do T3SS (BÜTTNER et al., 2002a; BÜTTNER & BONAS, 2006).

Intrigantemente, a influência da mutação do gene *hrpF* de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* na expressão dos genes que supostamente estão envolvidos com a patogenicidade de *P. syringae* foi analisada através de *real time PCR* (RT-PCR). Com a mutação de *hrpF*, houve reduções significativas na expressão dos genes *hrpA2*, *hrpP* e *hrpL* analisados (RAMOS et al., 2007).

Nenhum estudo da influência da mutação de *hrpF* na expressão de outros genes de Xac foi realizado até o momento, entretanto a alteração dos perfis bidimensionais de proteínas parecem reforçar a idéia de que HrpF seja um componente multifuncional envolvido na patogenicidade de Xac, podendo participar direta ou indiretamente da regulação de expressão de outros genes.

O produto do gene *hrpF* pode estar relacionado a alterações na expressão de proteínas envolvidas com respostas à situações de estresse, visto que nas comparações de perfis bidimensionais foram identificadas duas chaperonas diferencialmente expressas. Uma delas, GroEL, super-expressa na linhagem mutante 306ΔXAC0394 é reconhecida como uma proteína pertencente à classe de chaperonas que são mais expressas nas situações de resposta à condições de estresse e possivelmente interage com aproximadamente 250 proteínas em *E. coli* (KERNER et al., 2005).

De maneira interessante, foi identificado que a proteína chaperona DnaK foi super-expressa no perfil de proteínas da linhagem selvagem de Xac, o que mostra que a mutação de *hrpF* pode ter influenciado na redução da expressão desta chaperona.

A necessidade celular por chaperonas parece estar relacionada à vários fatores: 1- prevenção à agregação e enovelamento errôneo de cadeias de proteínas recentemente sintetizadas, 2- prevenção de interações não-produtivas com outras células ou componentes, 3- direcionamento da organização de proteínas grandes e complexos multiprotéicos e 4- renovar proteínas desoveladas durante a exposição à situações de estresse (FINK et al., 1999).

Uma das explicações possíveis para a observação de aumento da expressão de GroEL na linhagem 306ΔXAC0394 se baseia na possibilidade de que esta alteração ocorra como uma medida compensatória pelo retardamento funcional da célula causado pela mutação do gene *hrpF*, ou mesmo uma maneira de auxiliar o funcionamento do produto do gene mutado.

Não temos evidências sobre o papel de DnaK na patogenicidade de Xac, mas podemos supor que esta proteína esteja relacionada a patogenicidade de Xac, atuando na manutenção da estrutura e função de HrpF ou sendo direta ou indiretamente regulada por HrpF.

Estudos sobre a função da chaperona DnaK em *E.coli* indicam que a proteína é essencial para a manutenção da estabilidade de substratos do sistema Tat (*twin-arginine translocation*) no citoplasma antes de sua exportação. DnaK se associa *in vivo* com no mínimo um substrato, e é capaz de promover o eficiente transporte de substratos pela membrana citoplasmática, mesmo sob condições em que exista uma alta concentração de substratos a ser translocados (PÉREZ-RODÍGUEZ et al., 2007).

A avaliação do efeito da supressão da expressão de *dnaK* de *Streptococcus mutans* mostrou que linhagens produzindo baixos níveis de DnaK, também mostraram aumento da

expressão da proteína GroEL. Em *B. subtilis*, foi demonstrado que o complexo GroEL/GroES interage diretamente com a proteína HrcA, que em *S. mutans* controla o operon groE.

Em contraste, existem evidências que suportam que a proteína DnaK de *S. mutans* possui uma função significativa na modulação da atividade de HrcA e é necessária para a manutenção de HrcA em seu estado ativo. Linhagens mutantes de *S. mutans* para *hrcA* apresentam altos níveis de expressão de GroEL/GroES possivelmente em decorrência da perda da função repressora de HrcA na expressão de chaperonas. As linhagens de *S. mutans* com redução na regulação de DnaK e GroEL apresentaram alteração na expressão de várias proteínas, o que parece apontar que as proteínas DnaK e GroEL possuem efeitos substancialmente diferentes, confirmando o papel essencial das chaperonas em coordenar respostas fisiológicas e atributos associados à virulência (LEMOS et al., 2007).

A super-expressão das proteínas ATP sintase, TonB e lipase na linhagem 306ΔXAC0394, pode estar indiretamente relacionada à mutação de *hrpF*. As células da linhagem 306ΔXAC0394 podem apresentar um aumento das necessidades energéticas e de importação de ferro, devido à deficiência funcional de HrpF.

Em modelos recentes, a proteína TonB, participante do sistema de captação de ferro, parece induzir a alteração de conformação de proteínas receptoras, soltando os ligantes acoplados no espaço periplasmático. O sistema TonB de captação também parece mediar a transdução de sinais da superfície celular para o citoplasma, e mostrou –se essencial para a sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas de pimenta (SALMOND & REEVES, 1993; WIGGERICH & PÜHLER, 2000).

Estudos sistemáticos da regulação da produção de lipase em *P. aeruginosa* revelaram que a limitação de fontes de carbono e/ou energia pode aumentar a produção de lipase que é fortemente induzida por triglicerídeos (JAGER et.al, 1994).

As evidências do conjunto de proteínas diferencialmente expressas na linhagem selvagem de Xac e 306ΔXAC0394 parecem demonstrar que a mutação de *hrpF* pode alterar as necessidades energéticas das células de Xac, ao mesmo tempo em que perturba a regulação fisiológica mediada por moléculas chaperonas.

Nenhum relato prévio sobre alterações da expressão de proteínas chaperonas em resposta a mutação de componentes do T3SS havia sido feito anteriormente.

Pode-se considerar de maneira especulativa que a mutação do gene *hrpF* participante do T3SS pode levar à alteração de diversos outros mecanismos celulares, que podem estar envolvidos com os mecanismos básicos da sobrevivência das células. Talvez o fenótipo apresentado pela linhagem 306ΔXAC0394 seja resultante de uma série de alterações bioquímicas nas células de Xac que não propiciam a sua sobrevivência no interior do hospedeiro e não sejam decorrentes unicamente do fato de HrpF não estar integralmente funcional e não ocorrer a translocação de proteínas efetoras.

Estes dados podem, em parte, ser reforçados pelos resultados de estudos de genes envolvidos na patogenicidade de bactérias do gênero *Xanthomonas*. Vários trabalhos de mutagênese analisaram moléculas ditas essenciais para a plena patogenicidade de *Xanthomonas*, como as proteínas PthA, AvrBs3 e HrpF, entretanto, pode-se questionar se a mutação dos respectivos genes altera o conjunto das funções celulares importantes para a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro.

Não existem relatos conclusivos sobre o papel funcional destes genes ditos essenciais no metabolismo celular de bactérias do gênero *Xanthomonas*, e ainda existem questionamentos sobre os processos metabólicos essenciais para a patogenicidade de Xac. Se compreendermos melhor as questões fisiológicas e moleculares que fundamentam e suportam o funcionamento dos sistemas de secreção de proteínas efetoras, talvez consigamos avançar nas análises e interpretações sobre a patogenicidade de Xac.

Talvez a ocorrência de um desajuste metabólico celular em resposta a ausência de expressão dos genes alvo *avrXacE2* e *hrpF* possa ter influenciado manifestação dos fenótipos detectados nas linhagens mutantes 306ΔXAC3224 e 306ΔXAC0394. Podemos supor que estes fenótipos não somente sejam o resultado da ausência de um produto de virulência ou avirulência que supostamente atua como uma proteína efetora, mas da somatória de perturbações de correntes da mutação dos genes-alvo..

6.0 CONCLUSÕES

- Pelas análises realizadas, a mutagênese de *hrpF* e *avrXacE2* ocorrida no genoma de Xac é permanente e gerou as linhagens 306ΔXAC0394 e 306ΔXAC3224, respectivamente.
- A proteína AvrXacE2 não é essencial para a patogenicidade de Xac na interação com a planta hospedeira *Citrus sinensis* (laranja doce);
- A proteína HrpF é essencial para a patogenicidade de Xac na interação com a planta hospedeira *Citrus sinensis* (laranja doce);
- A mutação de *hrpF* promove a alteração de expressão de proteínas de Xac;
- Os níveis de expressão das proteínas chaperonas DnaK e GroEL de Xac são alterados na ausência de expressão do gene *hrpF*;
- A utilização complementar de técnicas de mutagênese e análise de proteomas amplia as possibilidades de análise funcional do genoma de Xac.

7.0 ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO AO TRABALHO

AMARAL, A.M. DO; BAPTISTA, J.C.; WINCK, F.V.; HOMEM, R.A. & MACHADO M.A. Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cítrico: genômica, transcriptômica e proteômica. **Laranja**. v. 27, p.355-377, 2006.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVICTH R.B.; ANDERSON J.C. & MARTIN G.B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nature Molecular Cell Biology**, v.7, p.601-611, 2006.

AEBERSOLD, R. & MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, p.198-207, 2003.

AGATON, C.; UHLÉN, M. & HOBER, S. Genome-based proteomics. **Electrophoresis**, v.25, p.1280-1288, 2004.

ALEGRIA M.C.; DOCENA C.; KHATER L., RAMOS C.H.I.; DA SILVA A.C.R. & FARAH C.S. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 18, p.6186-6197, 2004.

ALEGRIA M.C., SOUZA D.P., ANDRADE M.O., DOCENA C., KHATER L., RAMOS C.H., DA SILVA A.C. & FARAH C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal Bacteriology**, v.187, n.7, p.2315-2325, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol**, v. 215, n.3, p.403-410, 1990.

AMARAL A.M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado técnico EMBRAPA**, v. 86, p. 1-5, 2003.

AMARAL A.M.; TOLEDO C.P.; BAPTISTA J.C. & MACHADO M.A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30 (3), p.292-294, 2005.

AMARAL, A.M. DO; BAPTISTA, J.C.; WINCK, F.V.; HOMEM, R.A. & MACHADO M.A. Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cítrico: genômica, trnascriptômica e proteômica. **Laranja**, v. 27, p.355-377, 2006.

ASCHCROFT A.E. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomic. **Nat. Prod. Rep**, v. 20, p. 202-215, 2003.

ASTUA-MONGE G.; FREITAS-ASTUA J.; BACOCINA G.; RONCOLETTA J.; CARVALHO S.A. & MACHADO M.A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v. 187 (3), p. 1201-1205, 2005.

BANEYX F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current opinion Biotechnology**, v. 10, p.411-421, 1999.

BANEYX F.& MUJACIC M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature biotechnology**, v. 22 (11), p. 1399-1409, 2004.

BALLVORA A.; PIERRE M.; VAN DEN ACKERVEKEN G.; SCHORNACK S.; ROSSIER O.; GANAL M.; LAHAYE T. & BONAS U. Genetic mapping and functional analysis of the tomato Bs4 locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria AvrBs4 protein. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 14, n. 5, p. 629-638, 2001.

BAPTISTA J.C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**, 2006. 109p. Tese (Mestrado em Genética vegetal e Melhoramento) - UNICAMP, Campinas, 2006.

BELASQUE JÚNIOR J., BASSANEZI R.B., SPÓSITO M.B, RIBEIRO L.M., JESUS JÚNIOR W.C.De & AMORIM L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia brasileira**, v.30, n.4, p. 387-393 , 2005.

BERTANI G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, v. 62, p.293-300, 1951.

BITANCOURT A.A. O cancro cítrico. **Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOGDANOVE A.J. Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. **Plant molecular biology**, v. 50, p. 981-989, 2002.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMEIER M, KRINGS A & MACCALLUM RM. [NucPred - Predicting Nuclear Localization of Proteins](#). **Bioinformatics**, v.23, n.9, p.1159-1160, 2007.

BRENCIC A. & WINANS S. Detection of and Response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 10, p.155-194, 2005.

BRÖTZ-OESTERHELT H.; BANDOW J.E. & LABISCHINSKI H. Bacterial proteomics and its role in bacterial drug discovery. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 549-565, 2005.

BÜTTNER D.; NENNSTIEL D.; KLÜSENER B. & BONAS U. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 9, p. 2389-2398, 2002 a.

BÜTTNER D.& BONAS U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO Journal**, v. 21, n. 20, p. 5313-5322, 2002 b.

BÜTTNER D. & BONAS U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 192-200, 2006.

BÜTTNER D.; LORENZ C.; WEBER E. & BONAS U. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p.513-527, 2006.

CAMPBELL A.M. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 23, p. 7495-7499, 1992.

CAMPBELL A.M. Thirty years ago in genetics: prophage insertion into bacterial chromosomes. **Genetics**, v. 133, p.433-438, 1993.

CANDIANO G.; BRUSCHI M.; MUSANTE L.; SANTUCCI L.; GHIGGERU G.M.; CARNEMOLLA B.; ORECCHIA P.; ZARDI L. & RIGHETTI P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Comassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CASEY J.; DALY C. & FITZGERALD. Chromosomal integration of plasmid DNA by homologous recombination in *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* hosts harboring Tn919. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p.2677-2682, 1991.

CASTAÑEDA A.; REDDY J.D.; EL-YACOUBI B. & GABRIEL D.W. Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 8, n.12, p. 1306-1317, 2005.

CHEN Z., YANG Y. & JONG A.Y. Mini-prep in ten Minutes. **BioTechniques**, v.8 , n.2, p.172-173, 1990.

CHISHOLM S.T.; COAKER G.; DAY B. & STASKAWICZ B.J. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 24, n. 124, p.803-814, 2006.

DA SILVA A.C.R., FERRO A.J; REINACH F.C.; FARAH C.S.; FURLAN R.F. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459- 463, 2002.

DANG J.L.& JONES J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-832, 2001.

DE FEYTER R.; YANG Y. & GABRIEL D.W. Gene-for-gene interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 2, p. 225-237, 1993.

DE KEERSMAECKER S.C.J.; THLJS I.M.V.; VANDERLEYDEN J. & MARCHAL K. Integration of omics data: how well does it work for bacteria? **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 5, p.1239-1250, 2006.

DESVAUX M.; HÉBRAUD M.; HENDERSON I.R. & PALLÉN M.J. Type III secretion: what's in a name? **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 157-160, 2006.

DOYLE J.J.& DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochemical bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUAN Y.P., CASTAÑEDA A., ZHAO G., ERDOS G.& GABRIEL D.W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.556-560, 1999.

DUNGER G.; ARABOLAZA A.L.; GOTTIG N.; ORELLANO E.G.& OTTADO J. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. **Plant Pathology**, v. 54, p. 781-788, 2005.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Citrus Fruit Fresh and Processed Annual Statistics**, 2006. CCP:CI/ST/2006, p. 1-47. Disponível em <http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/28189_en_bull2006.pdf> Acesso em junho de 2007.

FINK A.L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 425-449, 1999.

FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phytopathology**, v.45, p. 680-685, 1955.

FUNDECITRUS- Fundo de Defesa da Citricultura. **Doenças e Pragas**, 2007. Disponível em <<http://fundecitrus.com.br>>. Acesso em junho de 2007.

GALÁN J.E.& COLLMER A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GALLI-TALIADOROS L.A.; SEDGWICK J.D.; WOOD S.A. & KIJRNER H. Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. **Journal of immunological methods**, v. 181, p.1-15, 1995.

GARDY J.L.; LAIRD M.R.; CHEN F.; REY S.; WALSH C.J.; ESTER M.& BRINKMAN F.S.L. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. **Bioinformatics**, v. 21, n.5, p.617-623, 2005.

GAURIVAUD P.; SOUZA L.C.; VIRGILIO A.C.; MARIANO A.G.; PALMA R.R. & MONTEIRO P.B. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4658-4665, 2002.

GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A.; DUVAUD S.; WILKINS M.R.; APPEL R.D & BAIROCH A. Protein identification and analysis tools on the EXPASY server. **The proteomics protocols handbook**, Humana Press. Totowa , NJ, p.571-607, 2005.

GÖRG A.; POSTEL W.; WESTERMEIER R.; GIANAZZA E. & RIGHETTI P.G. Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrilamide layers. **J. Biochem.Biophys. Methods**, v. 3, n. 5, p.273-284, 1980.

GOULD K.L.; REN L.; FEOKTISTOVA A.; JENNINGS J.L.& LINK A.J. Tandem affinity purification and identification of protein complex components. **Methods**, v. 33, p. 239-244, 2004.

GREENBERG J.T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 48, p.525-545, 1997.

GUTTMAN D. & GREENBERG J.T. Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 e AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n.2, p. 145-155, 2001.

HAMDAN M. & RIGHETTI P.G. Assessment of protein expression by means of 2-D gel electrophoresis with and without mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p.272-284, 2003.

HE S.Y., NOMURA K. & WHITTAM T.S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochim Biophys Acta**, v. 11, p.181-206, 2004.

HEATH M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 321-334, 2000.

HO Y.; GRUHLER A.; HEILBUT A.; BADER G.D. & MOORE L. ET AL. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**, v. 415, p.123-124, 2002.

HOOG C.L. & MANN M. Proteomics. **Annu.Rev. Genomics Hum. Genet**, v. 5, p.267-293, 2004.

IEA - Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo. **Previsões e estimativas das safras agrícolas do estado de São Paulo, ano agrícola 2006/07**. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/producao/prev_safra.php> . Acesso em 20 de maio de 2007.

JAEGER K.E.; RANSAC S.; DIJKSTRA B.W.; COLSON C.; HEUVEL M. V. & MISSET O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p.29-63, 1994.

JANA S. & DEB J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 67, p.289-298, 2005.

JESUS JÚNIOR W.C., BELASQUE JÚNIOR J., AMORIM L., CHRISTIANO R.S.C., PARRA J.R.P. & FILHO A.B. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri) infection. **Fitopatologia brasileira**, v.31, n3, p.277-283, 2006.

JOHNSON R.S.; DAVIS M.T.; TAYLOR J.A. & PATTERSON S.D. Informatics for protein identification by mass spectrometry. **Methods**, v. 35, n. 5, p. 223-236, 2005.

JONES D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J. Mol. Biol**, v. 292, p. 195-202, 1999.

KATZEN, F., BECKER A., IELMINI M. V., ODDO C. G.& IELPI L. New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3'-end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* operon. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n. 1, p.278-282, 1999.

KERNER M.J.; NAYLOR D.J.; ISHIHAMA Y.; MAIER T.; CHANG H.C.; STINES A.P.; GEORGOPOULOS C.; FRISHMAN D.; HAYER-HARTL M.; MANN M. & ULRICH

HARTL F. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. **Cell**, v. 122, p. 209-220, 2005.

KHATER L., ALEGRIA M.C., BORIN P.F., SANTOS T.M., DOCENA C., TASIC L., FARAH C.S. & RAMOS C.H. Identification of the flagellar chaperone FlgN in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri by its interaction with hook-associated FlgK. **Archives Microbiology**, May 10, 2007.

KIM J.G.; PARK B.K.; YOO C.H.; JEON E.; OH J.& HWANG I. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. glycines Hrp pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3155–3166, 2003.

KOEBNIK R.; KRÜGER A.; THIEME F.; URBAN A. & BONAS U. Specific Binding of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria araC-Type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7652-7660, 2006.

KOIDE T.; ZAINI P.A.; MOREIRA L.M.; VENCIO R.Z.; MATSUKUMA A.Y. et al. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 16, p. 5442-5449, 2004.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p.680-685, 1970.

LAM E.; KATO N.& LAWTON M. Programmed cell death, mitochondria and plant hypersensitive response. **Nature**. v. 411, p. 848-852, 2001.

LEENHOUTS K.J.; KOK J. & VENEMA G. Campbell-like Integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. lactis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 2, p.394-400, 1989.

LEMOS J.A.; LUZARDO Y. & BURNE R.A. Physiologic effects of forced down-regulation of *dnaK* and *groEL* Expression in *Streptococcus* mutans. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p.1582-1588, 2007.

LICHTY J.J.; MALECKI J.L. AGNEW H.D.; MICHELSON-HOROWITZ D.J. & TAN S. Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 98-105, 2005.

LINDGREN PB. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. **Annu. Rev. Phytopathology**, v. 35, p. 129-152, 1997.

LIOU J.T.; SHIEH B.H.; CHEN S.W.& LI C.; An improved alkaline lysis method for minipreparation of plasmid DNA. **Prep. Biochem. Biotechnol**, v. 29, n. 1, p.49-54, 1999.

LIPKA V. & PANSTRUGA R. Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 625-631, 2005.

LUGTENBERG B.J.J.; CHIN-A-WOENG T.F.C. & BLOEMBERG G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie von Leeuwenhoek**, v. 81, p. 373-383, 2002.

MARIE C., BROUGHTON W.J. & DEAKIN W.J. Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? **Curr. Opin. Plant Biol**, v. 4, p. 336-342, 2001.

MEHTA A. & ROSATO Y.B. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by representational difference analysis of cDNA. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.140-149, 2005.

MOREIRA L.M.; DE SOUZA R.F.; ALMEIDA JR. N.F.; SETUBAL J.C; OLIVEIRA J.C.F.; FURLAN L.R.; FERRO J.A. & DA SILVA A.C.R. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 163-184, 2004.

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

MI Y.; PARK B.C.; LEE D.H.; BAE K.H.; CHO S.; PARK H.S.; LEE B.R. & PARK S.G. Interaction proteome analysis of *Xanthomonas* Hrp proteins. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.17, n. 2, p.359-363, 2006.

NÖEL L.; THIEME F.; NENNSTIEL D. & BONAS U. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the hrp pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 5, p.1340-1348, 2002.

O'FARRELL P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p.4007-4021, 1975.

PÉREZ-RODRIGUÉZ R.; FISHER A.C.; PERLMUTTER J.D.; HICKS M.G.; CHANAL A.; SANTINI C.L.; WU L.F.; PALMER T. & DELISA M. P. An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. **Journal Molecular Biology**, v. 367, p.715-730, 2007.

PORAH J.; CARLSSON J.; OLSSON I. & BELFRAGE G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-599, 1975.

PUIG O.; CASPARY F.; RIGAUT G.; RUTZ B.; BOUVERET E.; BRAGADO-NILSSON E.; WILM M. & SÉRAPHIN B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. **Methods**, v. 24, p. 218-229, 2001.

PRUVOST O.; BOHER B.; BROCHERIEUX C.; NICOLE M. & CHIROLEU. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Epidemiology**, v. 92, n.4, p.336-346, 2002.

RADLOFF R.; BAUER W. & VINOGRAD J. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. **Proc.Natl.Acad. Sci**, v. 57, n. 5, p.1514-1521, 1967.

RAMOS A. R.; MORELLO J.E.; RAVINDRAN S.; DENG W.L.; HUANG H.C.; COLLMER A. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. **Journal Bacteriology**, May 25, 2007 [Epub ahead of print].

RAPPSILBER J.&, MANN M. What does it mean to identify a protein in proteomics? **Trends Biochemistry Sciences**, v.27, n. 2, p.74-78, 2002.

RIGAUT G.; SCHEVCHENKO A.; RUTZ B.; WILM M.; MANN M. & SÉRAPHIN B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1030-1032, 1999.

ROSSIER O.; VAN DEN ACKERVEKEN G. & BONAS U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Mol. Microbiol**, v. 38, p. 828–838, 2000.

ROZEN S. & SKALETSKY H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

SAIER JR. M.H. Evolution of bacterial type III protein secretion systems. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 113-115, 2004.

SALMOND, G.P. & REEVES, P.J. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. **Trends Biochemistry Sciences**, v.18, p.7–12, 1993.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F. & MANIATIS T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 ed., NY, 1989.

SCHAAD N.W.; POSTNIKOVA E.; LACY G.H.; SECHLER A.; AGARKOVA I.; STROMBERG P.E.; STROMBERG V.K. & VIDAVER A.K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. citri (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. citri (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. aurantifolii (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. citrumelo (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. malvacearum (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. smithii nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. alfalfae (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. alfalfae (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. fuscans” of *X. campestris* pv. phaseoli (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. fuscans sp. nov. **Systematic and applied microbiology**, v.28, p.494-518, 2005.

SCHAAD N.W.; POSTNIKOVA E.; LACY G.H.; SECHLER A.; AGARKOVA I.; STROMBERG P.E.; STROMBERG V.K. & VIDAVER A.K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and applied microbiology**, v.29, p.690-695, 2006.

SCHEVCHENKO A.; WILM M.; VORM O. & MANN M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem**, v. 68, p. 850–858, 1996.

SCHEVCHENKO A.; SCHAFT D.; ROGUE A.; PJINAPPELS W.W.M.; STEWART A.F. & SCHEVCHENKO A. Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, p. 204-212, 2002.

SCHORNACK S.; MEYER A.; RÖMER P.; JORDAN T. & LAHAYE T. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 256-272, 2006.

SCHULTE R. & BONAS U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 3, p. 815-823, 1992.

SHIOTANI H.; FUJIKAWA T.; ISHIRAHA H.; TSUYUMU S. & OZAKI K. A pthA homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3271-3279, 2007.

SMITH J.C. & FIGEYS D. Proteomics technology in systems biology. **Molecular BioSystems**, v. 2, p. 364-370, 2006.

SORENSEN H.P.& MORTENSEN K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p.113-128, 2005.

STADLER J.; LEMMENS R.& NYHAMMAR T. Plasmid DNA purification. **Journal of gene medicine**, v.6, p. 54-66, 2004.

STAKMAN, E.C. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. **J. Agric. Res**, v.4, p. 193–200, 1915.

STALL R.E . & CIVEROLO E.L. *Xanthomonas campestris* pv *citri*: cause of citrus canker. J. G. Swings and E. L. Civerolo (ed.), **Xanthomonas**. Chapman and Hall, London, United Kingdom, p. 48-50, 1993.

STELLWAGEN N.C. Acurate molecular weight determinations of deoxyribonucleic acid restriction fragments on agarose gels. **Biochemistry**, v. 22, p.6180-6185, 1983.

SWARUP S., DE FEYTER R., BRLANSKY R.H. & GABRIEL D.W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology**, v. 81, p. 802–809, 1991.

SWARUP S., YANG Y., KINGSLEY M.T.& GABRIEL D.W. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 5, p. 204–213, 1992.

TAHARA S.T.; MEHTA A. & ROSATO Y.B. Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* with leaf extract of the host plant (*Passiflorae edulis*). **Proteomics**, v. 3, p.95-102, 2003.

TAMPAKAKI A.P.; FADOULOGLOU V. E.; GAZI A. D., PANOPOULOS N. J. & KOKKINIDIS M. Conserved features of type III secretion. **Cell. Microbiol**, v. 6, p. 805–816, 2004.

TAYLOR R.G. & COORSSSEN J.R. Proteome resolution by two-dimensional gel electrophoresis varies with the commercial source of IPG strips. **J. Proteome Res**, v. 5 , n. 11, p.2919-2927, 2006.

TERPE K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, p. 523-533, 2003.

TESTORI A.; LISTOWSKY I. & SOLLITI P. Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site. **Gene**, v. 143, n. 1, p.151-2, 1994.

TSUMOTO K.; EJIMA D.; KUMAGAI I.& ARAKAWA T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expr. Purif**, v. 28, p.1-8, 2003.

VAN DEN ACKERVEKEN G.; MAROIS E. & BONAS U. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. **Cell**, v. 87, p. 1307-1316, 1996.

VAN SLUYS M.A.; MONTEIRO-VITORELLO C.B.; CAMARGO L.E.A.; MENCK C.F.M.; DA SILVA A.C.R.; FERRO J.A.; OLIVEIRA M.C.; SETUBAL J.C.; LITAJIMA J.P.& SIMPSON

J.A. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 40, p. 169-189, 2002.

VIPREY V., DEL GRECO A., GOLINOWSKI W., BROUGHTON W.J. & PERRET X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol Microbiol**, v. 28, p.1381-1389, 1998.

WENGELNIK K.; MARIE C.; RUSSEL M & BONAS U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 4, p. 1061-1069, 1996.

WIGGERICH H.G. & PÜHLER A. The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). **Microbiology**, v.146, p. 1053-1060, 2000.

WITTMANN-LIEBOLD B.; GRAACK H.R. & POHL T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p.4688-4708, 2006.