

SUSAN IENNE DA SILVA VANÇAN

PHYTOMONAS SERPENS:
CARACTERIZAÇÃO DA PIRUVATO/INDOLPIRUVATO
DESCARBOXILASE E FUNCIONALIDADE DA
AUXINA PRODUZIDA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo
2012

SUSAN IENNE DA SILVA VANÇAN

PHYTOMONAS SERPENS:
CARACTERIZAÇÃO DA PIRUVATO/INDOLPIRUVATO
DESCARBOXILASE E FUNCIONALIDADE DA
AUXINA PRODUZIDA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Bianca S. Zingales

Versão original.

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

lenne, Susan

Phytomonas serpens: Caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida / Susan lenne da Silva Vançan. -- São Paulo, 2012.

Orientadora: Bianca Silvana Zingales

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de Pesquisa: Biologia Molecular e Bioquímica de *Phytomonas*.

Versão do título para o inglês: *Phytomonas serpens*: characterization of the pyruvate/indolepyruvate decarboxylase and functionality of the auxin produced.

1. *Phytomonas* 2. Transferência horizontal gênica. 3. Tripanossomatídeos. 4. Piruvato descarboxilase. 5. Indolpiruvato descarboxilase. 6. Ácido indol-3-acético. I. Zingales, Bianca Silvana. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB055/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas

Candidato(a): Susan lenne da Silva Vançan

Tese: *Phytomonas serpens*: Caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida

Orientador(a): Bianca Silvana Zingales

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovada

Reprovada

Examinador(a) Nome

Instituição

Examinador(a) Nome

Instituição

Examinador(a) Nome

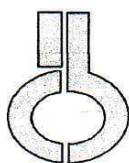
Instituição

Examinador(a) Nome

Instituição

Presidente Nome

Instituição



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 246/08, referente ao projeto intitulado: "*Phytomonas serpens: Caracterização da Piruvato/indolpiruvato Descarboxilase e Funcionalidade de Putativa Auxina Produzida*" sob a responsabilidade de Susan Ienne da Silva, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 22 de abril de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Ao meu esposo, Fernando,
com muito amor
e por todo amor,
incentivo e apoio constante.

“Lá vem os jovens gigantes de mármore
Trazendo anzóis na palma da mão.
Não é belo todo e qualquer mistério?
O maior segredo é não haver mistério algum.”
Legião Urbana
(1991)

“As pessoas temem o desconhecido, mas o verdadeiro
aprendizado, assim como o discernimento real,
depende de se examinar o que seja desconhecido e,
talvez, o que seja impossível saber.”
Roger C. Shan
In: J. Diocman & I. C. Matson
As coisas são assim. Pequeno repertório
científico do mundo que nos cerca. 1994.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua divina providência, por ter colocado em meu caminho as pessoas certas nos momentos certos e porque, assim, meu sonho de fazer pesquisa pôde se concretizar. E aos anjos que também me acompanham.

À Profa. Dra. Bianca S. Zingales minha sincera gratidão pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela orientação, pela confiança, pelo incentivo tão importante em todos os momentos, e pelo exemplo de dedicação, competência e comprometimento com a Ciência!

Ao meu esposo, Fernando Vançan, pelo amor incondicional, pela dedicação e incentivo constantes, pela compreensão e paciência infindáveis! E por compartilhar de sonhos que, juntos, estamos batalhando para tornar realidade!

Às famílias lenne, Silva e Vançan em toda a sua extensão pelos ensinamentos compartilhados e pelos exemplos de vida. Em especial, aos meus pais, Sônia e Armênio, meu irmão, Alexandre, minhas avós, Iolanda e Olímpia, meus sogros, Neide e Vair, e sobrinhos, Andressa e Vítor.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos: Aurélio, Camila, Jaques, Júlio César, Marcelo e Solange, Margoth, Rafael, Simone e Vanessa, pelo aprendizado, pela agradável convivência e pela amizade que permearam nosso convívio.

Aos amigos que, cada qual à sua maneira, deram um novo significado à palavra *AMIZADE*, em especial: Ana Cláudia, Elisabete, Fabiano, Flávia, Giulliana, Jeanine, Jeanete, Karen, Leslie, Vítor e Cristina, Vanessa.

Ao Prof. Dr. Georgios G. Pappas Júnior (Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasil) por suas sugestões criativas e sua disponibilidade constante em colaborar e resolver problemas.

Ao Prof. Dr. Antonio Gonzalez (Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Espanha) pela colaboração e compartilhamento de dados.

Aos Profs. Drs. Marta M. G. Teixeira (Departamento de Parasitologia - ICB USP), pela ajuda, sugestões e disposição constantes, e também por gentilmente ter cedido organismos vivos e amostras de DNA de tripanossomatídeos, agradecimento este que também se estende à Especialista e Mestre Marta Campaner.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber pela ajuda, sugestões, incentivo e disposição constantes. E todos os colegas do laboratório: Carolina, Elisabete, Flávia, Flávia

Damasceno, Jean, Lisvane, Maria Julia, Marcel, Sandra, e em especial ao doutorando Brian A. S. Mantilla, pela amizade, disponibilidade e ajuda imprescindíveis na produção da proteína recombinante de *P. serpens*!

Aos Profs. Drs. Helenice Mercier e Luciano Freschi (do Departamento de Botânica - IB USP) e Eduardo Purgatto (do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - FCF USP) pela enriquecedora colaboração e disponibilidade!

Aos Profs. Drs. Marta M. G. Teixeira, Ariel M. Silber e Gilberto Barbante Kerbauy pelas valiosas sugestões no exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, pelo incentivo e sugestões durante o Mestrado e Doutorado e “quase” pós-doutorado! Seu incentivo, dedicação, competência e comprometimento com a Ciência são dignos de inspiração e motivação!

Aos professores do Instituto de Ciências Biomédicas, Instituto de Biociências, Instituto de Química e Faculdade de Educação, responsáveis por uma parte importante de minha formação acadêmica na pós-graduação. E aos funcionários e secretárias, especialmente do Departamento de Parasitologia, Ângela, Sabrina, Sílvia e Wilma, que, com disposição, atenção e simpatia, sempre procuraram sanar minhas dúvidas e resolver problemas burocráticos.

Agradeço a todos vocês que têm contribuído em muito para minha formação humana e acadêmica!

“E vinte e nove anjos me saudaram
e tive vinte e nove amigos outra vez”
Legião Urbana
(1993)

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (bolsa) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), instituições às quais sou muito grata.

RESUMO

lenne, S. *Phytomonas serpens*: Caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida. [Tese (Doutorado em Parasitologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Entre os tripanossomatídeos, o gênero *Phytomonas* está especificamente adaptado a infectar plantas. Evidências indicam que a produção de ATP de *Phytomonas* spp deriva principalmente da glicólise (fosforilação no nível do substrato), tendo em vista que o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória não são funcionais neste gênero. A sequência-consenso de um agrupamento de Etiquetas de Sequências Transcritas (ESTs) de *P. serpens* apresentou altos índices de similaridade com sequências proteicas de indolpiruvato descarboxilases (IPDCs) de fitobactérias, piruvato descarboxilases (PDCs) de fungos e PDC/IPDCs putativas de *Leishmania* spp. A PDC converte piruvato a acetaldeído, passo chave que conecta a glicólise à fermentação alcoólica, enquanto que a IPDC participa da biossíntese de um dos principais hormônios vegetais, o ácido indol-3-acético (AIA), convertendo indolpiruvato a indol-3-acetaldeído. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*, investigar sua possível origem e avaliar as atividades PDC e IPDC neste organismo. A conservação da sequência do gene *PDC/IPDC* foi verificada em 14 isolados de *Phytomonas* analisados. Em *P. serpens*, o gene está presente em pelo menos seis cópias em tandem. Análises filogenéticas mostram que a proteína de *P. serpens* é robustamente monofilética com as enzimas de *Leishmania* spp. e *Crithidia fasciculata*, clado grupo-irmão de IPDCs de gama-proteobactérias, sugerindo um evento de transferência horizontal gênica de uma fitobactéria doadora para um tripanossomatídeo ancestral não-*Trypanosoma*. Não foram encontrados genes ortólogos nos genomas de *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, enquanto que possíveis ortólogos estariam presentes nos gêneros *Leishmania*, *Herpetomonas* e *Crithidia*. A análise de meios de cultura condicionados de *P. serpens* permitiu correlacionar a adição de glicose com o aumento no teor do principal produto da fermentação alcoólica, etanol. A quantificação de AIA e precursores também mostrou uma correlação direta entre a adição de triptofano, precursor da biossíntese de AIA, e o aumento na quantidade do fitormônio e seu intermediário, triptofol. A funcionalidade do AIA presente no meio condicionado foi confirmada em ensaios de alongamento de hipocótilos de tomates Micro-Tom. A quantificação de AIA no pericarpo de tomates inoculados com *P. serpens* mostrou um aumento significativo na quantidade de AIA conjugado (amida e éster) nos frutos, sugerindo que o tripanossomatídeo esteja contribuindo com o pool do fitormônio, e que o excesso de auxina seria conjugado possivelmente para evitar o comprometimento da viabilidade do fruto. A atividade PDC foi avaliada em extratos de *P. serpens* e na enzima PDC/IPDC recombinante, revelando uma K_M para piruvato de 1,4 mM (extratos) e 2,4 mM (enzima recombinante). Indolpiruvato age como inibidor competitivo da atividade PDC, elevando a K_M tanto nos extratos quanto na enzima recombinante. Dados preliminares indicam atividade IPDC em extratos e bactérias recombinantes, com a formação de indol-3-acetaldeído. Concluímos que a PDC/IPDC seria uma 2-cetoácido descaboxilase, com atividade catalítica variável para diferentes substratos, por exemplo, piruvato e indolpiruvato. A atividade PDC parece ser predominante em *P. serpens*, permitindo sua

sobrevivência no meio rico em carboidratos do hospedeiro vegetal, conferindo ao flagelado uma rota alternativa e necessária para a re-oxidação de parte do NADH produzido na via glicolítica.

Palavras-chave: *Phytomonas*. Piruvato/indolpiruvato descarboxilase. Transferência Horizontal Gênica. Ácido indol-3-acético.

ABSTRACT

lenne, S. *Phytomonas serpens*: Characterization of the pyruvate/indolepyruvate decarboxylase and functionality of the auxin produced. [PhD thesis (Parasitology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Among trypanosomatids, the genus *Phytomonas* is specifically adapted to infect plants. Evidence indicates that ATP production in *Phytomonas* spp. derives mainly from glycolysis (substrate level phosphorylation), since the Krebs cycle and the cytochrome-mediated respiratory chain are non-functional in this genus. The consensus sequence of one Expressed Sequence Tag (EST) cluster of *P. serpens* showed high similarity with protein sequences of indolepyruvate decarboxylases (IPDCs) of phytobacteria, pyruvate decarboxylases (PDCs) of fungi and putative PDC/IPDCs of *Leishmania* spp. PDC converts pyruvate to acetaldehyde, a key step that connects glycolysis to fermentation, whereas IPDC participates in the biosynthesis of the major plant hormone, indol-3-acetic acid (IAA), converting indolepyruvate to indol-3-acetaldehyde. The goals of this study were to characterize *P. serpens* PDC/IPDC gene, investigate the possible origin of the gene and evaluate PDC and IPDC activities in this organism. The conservation of the PDC/IPDC gene sequence was observed in 14 analysed *Phytomonas* isolates. In *P. serpens* the gene is present in at least six copies in tandem. Phylogenetic analyses showed that *P. serpens* protein is robustly monophyletic with *Leishmania* spp. and *Crithidia fasciculata* enzymes, a sister-group clade of gamma-proteobacteria IPDCs, suggesting a horizontal gene transfer event from a donor phytobacteria to a non-*Trypanosoma* trypanosomatid ancestor. No orthologous genes were found in *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* genomes, whereas potential orthologs are present in the genera *Leishmania*, *Herpetomonas* and *Crithidia*. Analysis of *P. serpens* conditioned culture media allowed us to correlate glucose addition to increased amounts of the fermentation main product, ethanol. Quantification of IAA and its precursors also showed a direct correlation between the concentration of tryptophan, precursor of IAA biosynthesis, and the levels of the phytohormone and its intermediary, tryptophol. The functionality of IAA produced *in vitro* was confirmed in bioassays of Micro-Tom hypocotyl elongation response. In the pericarp of tomatoes inoculated with *P. serpens* we verified an increase of conjugated IAA (ester and amide), suggesting that the trypanosomatid contributes to the fruit phytohormone pool, and that the excess of auxin is conjugated to avoid compromising the fruit viability. PDC activity was measured in *P. serpens* extracts and in the PDC/IPDC recombinant enzyme, showing a K_M for pyruvate of 1.4 mM (extracts) and 2.4 mM (recombinant enzyme). Indolepyruvate acts as a competitive inhibitor of the PDC activity, increasing the K_M both in the extracts and recombinant enzyme. Preliminary data indicate IPDC activity in extracts and recombinant bacteria with the formation of indol-3-acetaldehyde. We concluded that *P. serpens* PDC/IPDC could be a 2-ketoacid decarboxylase with variable catalytic activity for different substrates, such as pyruvate and indolepyruvate. PDC activity seems to be prevalent in *P. serpens*, allowing the flagellate survival in the carbohydrate-rich medium of the host plant by providing an alternative and necessary route to re-oxidate part of the NADH produced in the glycolytic pathway.

Key words: *Phytomonas*. Pyruvate/indolepyruvate decarboxylase. Horizontal Gene Transfer. Indole-3-acetic acid

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
AIA	Ácido indol-3-acético
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais)
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifostato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DO	Densidade óptica
EC	<i>Enzyme Commission</i> (número de cadastro da enzima)
EDTA	Ácido Etineldiaminotetracético
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (Etiquetas de Sequências Transcritas)
gGAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa)
H₂O	Água
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta performance)
IAAId	<i>Indole-3-acetaldehyde</i> (Indol-3-acetaldeído)
ILA	<i>Indole-3-lactic acid</i> (Ácido indol-3-lático)
IPDC	Indolpiruvato descarboxilase
iPDH	<i>Isopropyl alcohol dehydrogenase</i> (Isopropil álcool desidrogenase)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
IPyA	<i>Indole-3-pyruvic acid</i> (Ácido indol-3-pirúvico)
kDNA	DNA do cinetoplasto
K_M	Constante de Michaelis
K_M^{ap}	Constante de Michaelis aparente
LB	Luria Bertani (Meio de cultura)
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (Meio de cultura)

ML	<i>Maximum Likelihood</i> (Máxima verossimilhança)
MP	<i>Maximum parcimony</i> (Máxima parcimônia)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - EUA)
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase aberta de leitura)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em Cadeia)
PDC	Piruvato descarboxilase
PPDC	Fenilpiruvato descarboxilase
rDNA	Gene para RNA ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SL	Gene <i>Spliced Leader</i>
TAE	Solução tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	Solução tampão Tris-borato-EDTA
TE	Solução tampão Tris-EDTA
THG	Transferência Horizontal Gênica
Tol	Triptofol
TPP	<i>Thiamin Pyrophosphate</i> (Tiamina pirofosfato)
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
Trp	Triptofano
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galacto-piranosídeo

AMINOÁCIDOS:

Ácido aspártico (**D**)

Ácido glutâmico (**E**)

Alanina (**A**)

Arginina (**R**)

Asparagina (**N**)

Cisteína (**C**)
Fenilalanina (**F**)
Glicina (**G**)
Glutamina (**Q**)
Histidina (**H**)
Isoleucina (**I**)
Leucina (**L**)
Lisina (**K**)
Metionina (**M**)
Prolina (**P**)
Serina (**S**)
Tirosina (**Y**)
Treonina (**T**)
Triptofano (**W**)
Valina (**V**)

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS:

Adenina (**A**)
Citosina (**C**)
Guanina (**G**)
Timina (**T**)

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Aceleração da gravidade
cm	Centímetro
K_M	Constante de Michaelis-Menten
°C	Graus Celsius
h	Hora
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
pmoles	Picomoles
p/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
V/cm	Volts por centímetro
v/v	Volume por volume
U	Unidades

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1. 1 <i>Phytomonas</i>	22
1. 1. 1 O Gênero <i>Phytomonas</i>	22
1. 1. 2 Transmissão e Patogenicidade	23
1. 1. 3 Identificação de gênero e espécie	25
1. 1. 4 Biologia de <i>Phytomonas serpens</i> e a importância de estudos centrados nesta espécie	26
1. 1. 5 Metabolismo	28
1. 1. 5 Genômica e a identificação da sequência objeto desta Tese	28
1. 2 Transferência Horizontal Gênica	31
1. 3 Enzimas dependentes de TPP	33
1.4 PDC/IPDC de <i>P. serpens</i>	34
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Meios de Cultura e Soluções	39
3.2 Tripanossomatídeos e seu cultivo	39
3.3 Extração de DNA	41
3.4 Análise de ortólogos em tripanossomatídeos	41
3.4.1 Amplificação por PCR	41
3.4.2 Southern blot	42
3.5 Abundância de transcritos do gene <i>PDC/IPDC</i>	43

3.5.1	<i>Preparo das amostras e Slot Blot</i>	43
3.5.2	<i>Preparo das sondas</i>	43
3.5.3	<i>Hibridização, lavagem das membranas e aquisição do sinal de hibridização</i>	43
3.6	Caracterização de parâmetros cinéticos da atividade IPDC em lisados de <i>P. serpens</i>	44
3.6.1	<i>Avaliação da atividade IPDC</i>	44
3.6.2	<i>Quantificação de AIA e precursores em meio reacional</i>	45
3.7	Clonagem e expressão do gene <i>PDC/IPDC</i> de <i>P. serpens</i>	45
3.7.1	<i>Amplificação do gene <i>PDC/IPDC</i></i>	45
3.7.2	<i>Clonagem do gene <i>PDC/IPDC</i> no plasmídeo pGEM T-Easy</i>	46
3.7.3	<i>Clonagem do gene <i>PDC/IPDC</i> no plasmídeo pET28(a+)</i>	47
3.7.4	<i>Obtenção da <i>PDC/IPDC</i> recombinante</i>	47
3.7.5	<i>Purificação da <i>PDC/IPDC</i> recombinante</i>	48
3.7.6	<i>Quantificação de AIA e intermediários no meio de cultura da bactéria recombinante</i>	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Caracterização do gene <i>PDC/IPDC</i> de <i>P. serpens</i>	50
4.1.1	<i>Características do gene <i>PDC/IPDC</i> e presença em isolados de <i>Phytomonas</i></i>	50
4.1.2	<i>Determinação do número de cópias do gene <i>PDC/IPDC</i> e sequência da região intergênica</i>	51
4.1.3	<i>Abundância relativa de transcritos do gene <i>PDC/IPDC</i></i>	52
4.2	Evidências do processo de THG para a <i>PDC/IPDC</i> de <i>P. serpens</i>	53
4.2.1	<i>Análises filogenéticas</i>	53
4.2.2	<i>Avaliação do uso de códons (codon usage)</i>	54

4.3 Análise de ortólogos em tripanossomatídeos	55
4.4 Produção de etanol e AIA por <i>P. serpens</i>	58
4.4.1 <i>Justificativa</i>	58
4.4.2 <i>Cultivo dos organismos</i>	58
4.4.3 <i>Produção de etanol em meio condicionado de <i>P. serpens</i> e <i>L. major</i></i>	60
4.4.4 <i>Produção de AIA e seus precursores em meio condicionado de <i>P. serpens</i> e <i>L. major</i></i>	62
4.4.5 <i>Abundância de transcritos de PDC/IPDC</i>	66
4.4.6 <i>Bioensaio da funcionalidade de AIA produzido in vitro</i>	69
4.4.7 <i>Produção de AIA em tomates infectados com <i>P. serpens</i></i>	70
4.5 Parâmetros cinéticos da atividade PDC/IPDC de <i>P. serpens</i>	74
4.5.1 <i>Caracterização de parâmetros cinéticos da atividade PDC/IPDC em lisados de <i>P. serpens</i></i>	74
4.5.2 <i>Algumas características estruturais do sítio ativo da PDC/IPDC de <i>P. serpens</i></i>	79
4.5.3 <i>Clonagem do gene PDC/IPDC de <i>P. serpens</i> em sistema de expressão</i>	83
4.5.4 <i>Obtenção e purificação da PDC/IPDC recombinante</i>	86
4.5.5 <i>Caracterização de parâmetros cinéticos na PDC/IPDC recombinante</i>	87
4.5.6 <i>Acúmulo de indol-3-acetaldeído no meio de cultura da bactéria recombinante</i>	89
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	106
Anexo A - Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid <i>Phytomonas serpens</i>	
Anexo B - Indole-3-acetic acid and ethanol production by the plant trypanosomatid <i>Phytomonas serpens</i>	

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Phytomonas*

1.1.1 O Gênero *Phytomonas*

O gênero *Phytomonas* pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esta ordem abrange organismos que apresentam um ou dois flagelos que se originam da bolsa flagelar, e uma estrutura bastante peculiar, o cinetoplasto, que corresponde a uma região de DNA condensado localizada no interior de uma mitocôndria única que se ramifica por toda a célula (Camargo, 1999). A ordem Kinetoplastida inclui patógenos de diferentes grupos de invertebrados, vertebrados e plantas, e a adaptação ao hospedeiro pode ter sido o principal mecanismo para sua evolução (Hamilton et al., 2007).

A descoberta de tripanossomatídeos em vegetais ocorreu em 1909, com a identificação de flagelados no látex de *Euphorbia pilulifera* denominados *Leptomonas davidi* por Lafont (Jankevicius et al., 1988). No mesmo ano, Donovan propôs o gênero *Phytomonas* para agrupar tripanossomatídeos parasitas de vegetais (Jankevicius et al., 1988). No entanto, esta denominação passou a ser aceita cerca de 70 anos mais tarde. Até então os flagelados de plantas eram referidos como *Leptomonas*, *Herpetomonas* e até mesmo *Trypanosoma* (Camargo, 1999).

A definição de *Phytomonas* de Donovan era artificial, uma vez que outros tripanossomatídeos de insetos, tais como *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas*, também haviam sido isolados de plantas (Conchon et al., 1989). Desta forma, a classificação de organismos baseada apenas no hospedeiro de origem é falha (Conchon et al., 1989; Dollet et al., 2011). Embora os isolados de *Phytomonas* apresentem características verificadas ao microscópio de transmissão eletrônica, tais como arranjo peculiar dos ribossomos, cisternas endoplasmáticas e presença de corpos elétron-densos no citoplasma, essas características não são suficientes para diagnosticar um parasita como pertencente ao gênero *Phytomonas* (Camargo, 1999). Logo, o tipo de hospedeiro e os caracteres de morfo-desenvolvimento não permitem a correta distinção do gênero *Phytomonas* de outros tripanossomatídeos

(Camargo, 1999). Mais recentemente marcadores moleculares vêm se popularizando na identificação do gênero (ver abaixo).

1. 1. 2 Transmissão e Patogenicidade

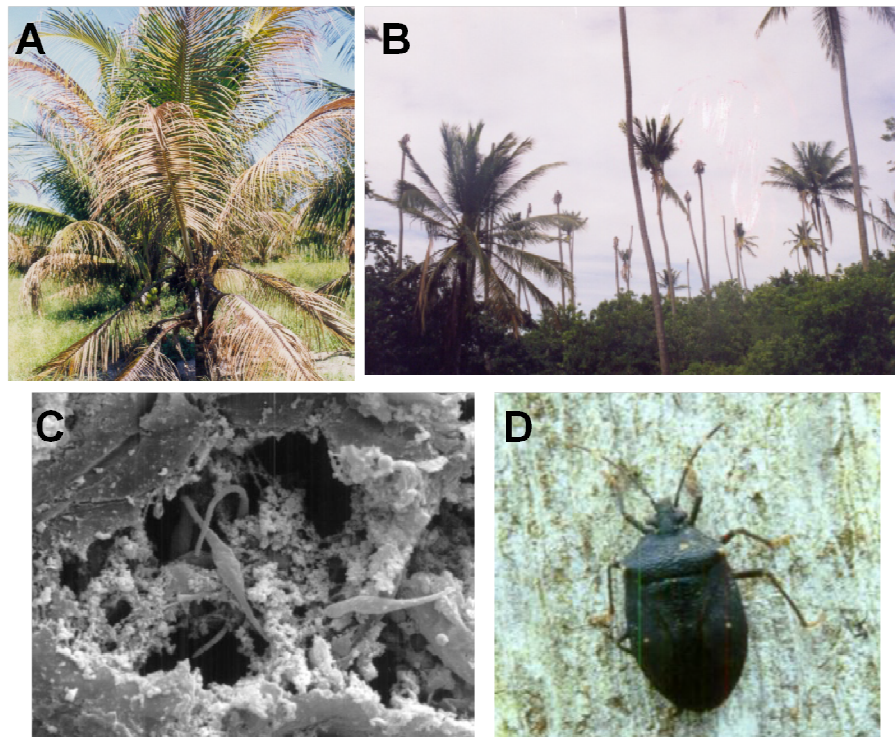
O ciclo de vida de *Phytomonas* é dixênico, envolvendo insetos fitófagos que agem como vetores na transmissão mecânica das formas promastigotas para os diferentes hospedeiros vegetais (Jankevicius et al., 1989; Canepa et al., 2007). Os vetores descritos pertencem à ordem Hemiptera, sendo os insetos das famílias Coreidae, Pentatomidae e Lygaeidae os principais candidatos (Dollet, 1984; Sbravate et al., 1989).

A comunidade científica começou a ter um interesse especial no gênero *Phytomonas* ao constatar que estes organismos causavam enfermidades devastadoras em plantações de interesse econômico, tais como mandioca (“chochamento das raízes”), café (necrose do floema), coco (“*hartrot*”) e palmeiras produtoras de óleo (“*marchitez sorpressiva*”), principalmente na América Latina (Dollet, 1984). Por outro lado, foi verificado que outros vegetais infectados por *Phytomonas*, tais como tomate e batata, não apresentavam nenhum dano aparente (McGhee e Cosgrove, 1980; Camargo et al., 1990; Sánchez-Moreno et al., 1995; Camargo, 1999). Esta diferença intrigante foi relacionada com o tipo de tecido do hospedeiro onde os flagelados se concentravam. Desta forma, os tripanossomatídeos que infectam plantas são classificados em:

- lactícolas: presentes no látex de várias plantas, especialmente de Euphorbiaceae e Asclepiadaceae (Dollet, 1984; Camargo et al., 1990). Nestes vegetais, os isolados não são patogênicos, com exceção de *P. francai*, encontrada em mandioca (*Manihot esculenta*) (Kitajima et al., 1986; Vainstein e Roitman, 1986; Miranda et al., 2004);
- frutícolas: encontrados na polpa e nas sementes de frutos de diversas famílias. Não se sabe se são parasitas dos frutos ou apenas invasores oportunistas, pois, na maioria dos frutos, poucos flagelados são detectados (Jankevicius et al., 1989; Camargo et al., 1990; Vickerman, 1994). Uma exceção é *P. serpens*, extremamente abundante na polpa de tomates, sem, no entanto, promover patogênese (Jankevicius et al., 1989; Camargo et al., 1990);

- floemícolas: presentes no floema de plantas não lactíferas; como coco, café e palmeiras produtoras de óleo. Os isolados são patogênicos, causando murchamento/definhamento (necrose do floema; Figura 1) (Dollet, 1984; Vickerman, 1994; Camargo, 1999);
- florícolas: presentes em flores e inflorescências. Foram descritos em poucas espécies vegetais (Camargo, 1999) e aparentemente não causam patogênese.

Figura 1 - Necrose do floema, causada por *P. staheli*, em coqueiral.



A: primeiros sintomas de um coqueiro atacado por *Phytomonas*: empardecimento e ressecamento da folhagem. B: doença disseminada em coqueiral: sintoma conhecido como “poste-de-telefone”. C: *P. staheli* no floema de coqueiro (x 3.500 - fotografia de Flavio C. Miguens - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF). D: percevejo vetor adulto, *Lincus lobuliger*.

FONTE: A e B: Reprodução de Warwick (2005); C e D: Reprodução de CEPLAC¹ e Sgrillo et al. (2005).

Em resumo, apenas *Phytomonas* encontradas no floema estariam associadas com uma patogênese severa (Camargo et al., 1990; Vickerman, 1994; Uttaro et al., 1997; Camargo, 1999; Dollet et al., 2001a). Entretanto, a classificação baseada

¹ Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/FITOMONAS%20NO%20COQUEIRO.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

apenas no tecido do hospedeiro onde o flagelado é encontrado parece insuficiente, conforme indicam dados bioquímicos e moleculares de caracterização desses tripanossomatídeos, como veremos a seguir.

1. 1. 3 Identificação de gênero e espécie

Os primeiros estudos de biologia molecular em fitoflagelados visavam a taxonomia e o diagnóstico (Hollar e Maslov, 1997; Serrano et al., 1999). Desta forma, foram caracterizados predominantemente genes de múltiplas cópias, tais como a sequência do gene de mini-exon ou *spliced leader* (SL) *gene* (Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999; Dollet et al., 2001b), genes de RNA ribossômico (Dollet et al., 2000) e os minicírculos do kDNA (Dollet et al., 2001a).

Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos na tentativa de distinguir espécies de *Phytomonas* de outros tripanossomatídeos, porém, nem todas as espécies de *Phytomonas* reagem igualmente com os anticorpos utilizados (Petry et al., 1989; Teixeira e Camargo, 1989). Em 1996, o grupo de Teixeira desenvolveu um teste para confirmar a real existência do gênero baseado na hibridização de DNA genômico com uma sonda específica (SL3') complementar à sequência SL (Teixeira et al., 1996). Três anos mais tarde, o mesmo grupo desenvolveu uma PCR baseada em regiões que flanqueiam a sequência SL3', amplificando um fragmento de DNA específico de *Phytomonas*, facilitando o diagnóstico do gênero (Camargo, 1999; Serrano et al., 1999).

Como visto no item anterior, a identificação do gênero é insuficiente no contexto de estudos epidemiológicos de doenças de importância agrícola, sendo necessária a compreensão da relação entre o tripanossomatídeo e sua localização em determinado hospedeiro (Batistoti et al., 2001; Dollet et al., 2001a; Dollet et al., 2011). Assim, ferramentas para a definição de espécies dentro do gênero *Phytomonas* ou para a identificação de populações começaram a ser desenvolvidas e avaliadas.

Diferentes marcadores moleculares permitiram a separação de um grupo de isolados floemícolos patogênicos de palmeiras de grupos de isolados não-patogênicos de outros vegetais, permitindo uma distinção dos organismos causadores de doenças em palmeiras. Dentre os marcadores cita-se a análise da sequência do gene da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA) (Marché

et al., 1995); o padrão de isoenzimas (Guerrini et al., 1992; Muller et al., 1994); RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Muller et al., 1997); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) (Muller et al., 1995) e análise da sequência SL (Dollet et al., 2001a) e de minicírculos de kDNA (Sturm et al., 2007).

A classificação por sequências de genes de RNA ribossômico 5S indicou que o espectro de *Phytomonas* spp. era composto por pelo menos oito grupos (grupos A a I) (Dollet et al., 2000). Dados mais recentes, baseados na análise das sequências do gene do RNA ribossômico 5,8S e das regiões ITSs (*Internal Transcribed Spacers* - Espaçadores internos transcritos) e de microssatélites (Dollet et al., 2011) apontam para a existência de pelo menos dez grupos (grupos A a J).

Estas análises mostram que os isolados floemícolos formam um grupo bastante homogêneo (grupo H) que se diferencia dos demais agrupamentos heterogêneos de isolados de látex e de frutos e de tripanossomatídeos de insetos (Sturm et al., 2007). No entanto, nenhum critério objetivo foi estabelecido para a classificação das espécies dentro de *Phytomonas*.

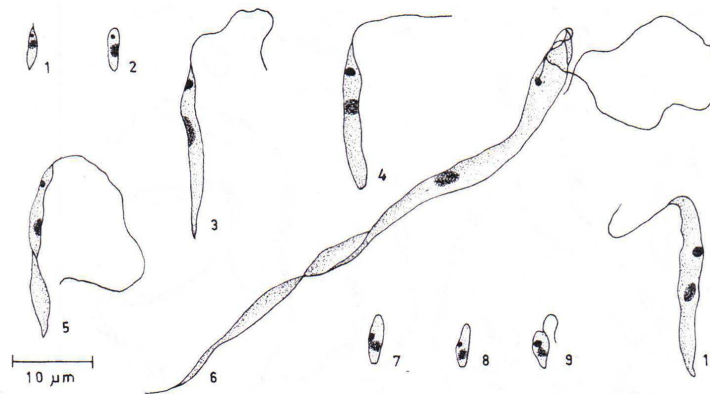
1. 1. 4 Biologia de *Phytomonas serpens* e a importância de estudos centrados nesta espécie

Em 1957, foram descobertos flagelados na polpa de tomates na África do Sul, denominados *Leptomonas serpens* por Gibbs (Gibbs, 1957 *apud* Jankevicius et al., 1989). Sua denominação foi alterada posteriormente por Podlipaev para *Phytomonas serpens* (Podlipaev, 1986 *apud* Jankevicius et al., 1989). Devido à possibilidade de cultivo *in vitro*, conseguiu-se fechar o ciclo biológico de *P. serpens* em insetos e plantas em condições laboratoriais, observando-se elevado polimorfismo (Figura 2) (Jankevicius et al., 1988, 1989).

Os estudos mostraram que apenas tomates maduros eram infectados com sucesso por *P. serpens* (Jankevicius et al., 1988). Os autores sugeririam que a não infecção de tomates em fase de maturação estaria associada à presença de fitoalexinas (tomatina ou tomaditina) e receptores de superfície que funcionam como defesa contra a invasão de microorganismos. Estes componentes têm expressão reduzida ou ausente no fruto maduro. Jankevicius et al. (1988, 1989) concluíram

haver pelo menos dois vetores (*Phthia picta* e *Nezara viridula*) transmissores de *P. serpens* em tomate, que transmitiriam os flagelados para a polpa do tomate através da saliva.

Figura 2 - Polimorfismo de *Phytomonas serpens*, parasita de tomate.



1 e 2, formas de seiva do fruto; 3 e 4, flagelados de meio bifásico ágar-sangue/LIT; 5 e 6, formas alongadas de fase estacionária de meio de cultura LIT; 7 e 8, formas não-flageladas de urina de vetores hemípteros; 9 e 10, flagelados do trato digestivo de vetor.

FONTE: Camargo (1999), modificado de Jankevicius et al. (1989).

A observação de que o soro de pacientes com doença de Chagas apresentava alta reatividade com antígenos de *P. serpens* levou o grupo do Dr. J. V. Jankevicius a investigar a natureza dos antígenos de *P. serpens* que apresentavam reatividade cruzada com *T. cruzi* (Breganó et al., 2003). O grupo verificou que antígenos de superfície do fitoflagelado induzem uma imunidade protetora em camundongos, protegendo-os parcialmente contra um desafio com *T. cruzi* (Breganó et al., 2003; Pinge-Filho et al., 2005; Graça-de Souza, et al., 2010). Com base nestes resultados, foi sugerido que a imunização oral com um tripanossomatídeo de plantas, não-patogênico para o homem, poderia representar uma vacina contra a doença de Chagas.

Foi verificado posteriormente que outros tripanossomatídeos de insetos e de plantas, incluindo *Phytomonas* spp., compartilham com *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp. a metaloprotease de superfície gp63 (Santos et al., 2006). Além desta enzima, uma ferro superóxido dismutase de *Phytomonas* spp. também apresenta epitopos de reação cruzada com tripanossomatídeos patogênicos (Quesada et al., 2001; Marín et al., 2004, 2006).

1. 1. 5 Metabolismo

Adaptações metabólicas profundas são esperadas para permitir que *Phytomonas* prospere em ambientes tão díspares como floema e látex de plantas hospedeiras e tubos digestivos de insetos vetores. Algumas características do metabolismo de *Phytomonas* foram investigadas em maior detalhe no isolado de tomate *P. serpens*, devido à facilidade de cultivo *in vitro* (Jankevicius et al., 1989). Dentre estas características, o aspecto mais marcante foi a observação de que vários genes da cadeia respiratória estão ausentes do genoma da mitocôndria, afetando funções mitocondriais como a respiração mediada por citocromo e a produção de ATP (Maslov et al., 1999; Nawathean e Maslov, 2000; González-Halphen e Maslov, 2004). Também foi relatado que a produção de ATP deriva principalmente da glicólise, tendo em vista que o ciclo de Krebs aparentemente não é funcional (Sánchez-Moreno et al., 1992). A excreção de enzimas envolvidas na degradação do amido em di- e monossacarídeos e de enzimas que degradam celulose e pectina (Sanchez-Moreno et al., 1992), bem como a concentração elevada de glicosomas, que compartimentalizam as enzimas da via glicolítica (Sánchez-Moreno et al., 1992), são evidências que reforçam a adaptação de *Phytomonas* ao meio rico em carboidratos do hospedeiro vegetal.

Pouco se conhece sobre o metabolismo de *Phytomonas* nos insetos vetores, mas postula-se que os aminoácidos seriam a principal fonte de energia (Molinas et al., 2003; González-Halphen e Maslov, 2004), dada sua disponibilidade no hospedeiro. Entretanto, Canepa et al. (2007) mostraram que em *Phytomonas* sp. o transporte de glicose e frutose é muito mais eficiente que o de aminoácidos, o que reforça a sugestão de que os requerimentos energéticos destes organismos seriam dependentes da fosforilação em nível do substrato que ocorre na via glicolítica.

1. 1. 5 Genômica e a identificação da sequência objeto desta Tese

Há uma escassez de informações referentes à genômica e proteômica de membros do gênero *Phytomonas*. Como um primeiro passo na definição do genoma de *Phytomonas*, foi caracterizado o cariótipo molecular de isolados de látex e do grupo H (floemícolas) (Marín et al., 2008; 2009). Mais recentemente, foi sequenciado pela técnica de pirosequenciamento o genoma de *Phytomonas* sp. isolada de

Jatropha macrantha (TCC 066E). No entanto os dados ainda não estão disponíveis ao público (Alves et al., 2011).

Há alguns anos, com o intuito de expandir o conhecimento básico sobre a biologia e metabolismo de *Phytomonas*, nosso grupo, em colaboração com o grupo do Dr. Antonio Gonzalez (Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Espanha) e do Dr. Georgios Pappas Júnior (Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasil), gerou, sequenciou e analisou 2.190 etiquetas de sequências transcritas (ESTs) de uma biblioteca de cDNA de *P. serpens* (Pappas et al., 2005). Após a formação de agrupamentos, as categorias funcionais das sequências-consenso foram designadas. À época, cerca de 36% das sequências não apresentaram precedentes, ao passo que as restantes apresentaram similaridade com enzimas de várias vias metabólicas, proteínas implicadas em processos de tradução, biogênese e estrutura ribossômica, modificações pós-transducionais, *turnover* de proteína e chaperonas, transporte de carboidratos, dentre outros (Pappas et al., 2005).

O agrupamento mais populoso de *P. serpens* continha 45 ESTs homólogas a membros da família de transportadores de glicose (Pappas et al., 2005). Este achado pode ser diretamente correlacionado com a adaptação de *Phytomonas* ao ambiente rico em carboidratos das plantas hospedeiras e sua dependência da produção de ATP a partir da glicólise, conforme descrito acima.

A sequência-consenso (540 nucleotídeos) de um dos agrupamentos de ESTs de *P. serpens*, resultantes do trabalho de Pappas e colaboradores (2005), apresentou os maiores índices de similaridade de sequência no nível de aminoácido com indolpiruvato descarboxilases (IPDCs) de fitobactérias, com enzimas dependentes de tiamina pirofosfato (TPP) e com uma putativa piruvato/indolpiruvato carboxilase de *L. major*.

A sequência completa do gene da putativa IPDC de *P. serpens*, representada por 2.364 pb, sendo 1.647 pb correspondentes à fase aberta de leitura (ORF), foi obtida por nós (Lenne et al., 2012) e a busca pelo programa BLAST X no banco de dados não reduntante (*nr, non redundant*) do NCBI utilizando como entrada (*query*) a sequência nucleotídica completa (2.364 pb) confirmou a elevada similaridade com enzimas dependentes de TPP (Tabela 1) e as putativas enzimas de *Leishmania*.

Tabela 1 - Lista das dez primeiras sequências com maior similaridade com a sequência nucleotídica completa de *PDC/IPDC* de *P. serpens* obtidas por BLAST X (*translated query versus protein database*) contra o banco de dados *nr* de sequências nucleotídicas traduzidas do NCBI, ranqueadas pelo *bit-score* do alinhamento.

Número de Acesso no GenBank	Descrição da sequência	E-value	Bit-score	Identidade	Similaridade
XP_001564563	pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904] ^a	6e-137	493	46	61
XP_001686429	pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin] ^a	1e-136	492	47	62
XP_001468661	pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5] ^a	4e-136	490	47	61
ZP_06639356	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582]	2e-130	471	44	62
ZP_06191191	thiamine pyrophosphate binding domain-containing protein [<i>Serratia odorifera</i> 4Rx13]	2e-130	471	45	64
CAX60783	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Erwinia billingiae</i> Eb661]	2e-128	464	46	64
YP_001479638	thiamine pyrophosphate binding domain-containing protein [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]	9e-128	462	44	63
AAB06571	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Pantoea agglomerans</i>]	2e-126	457	45	62
YP_051693	indole-3-pyruvate decarboxylase [<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCR11043]	2e-126	457	45	60
YP_001005545	indole-3-pyruvate decarboxylase [<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081]	8e-126	456	44	60

^a Como será discutido no texto, a designação correta da enzima de *Leishmania* deveria ser piruvato/indolpiruvato **descarboxilase**.

FONTE: Adaptado de lenne et al., 2012.

As três primeiras entradas correspondem às putativas piruvato/indolpiruvato **carboxilases** de *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*, ao passo que outras entradas correspondem a **descarboxilases** e proteínas com domínio de TPP (ver Tabela 1). O fato de encontrarmos acertos com carboxilases e descarboxilases nos causou estranheza, uma vez que as carboxilases têm como cofator biotina, ao passo que a descarboxilases têm como cofator TPP. Ao fazer a análise dos domínios das putativas enzimas de *Leishmania* com o programa PFAM (Bateman et al., 2004) (*site*: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>), observamos a presença de domínios para TPP, indicando tratarem-se de descarboxilases e não de carboxilases. Desta forma, a designação equivocada das enzimas de *Leishmania* sp. provavelmente é decorrente da anotação automática, usual em projetos Genoma.

Outro ponto que nos chamou a atenção foi não termos encontrado genes ortólogos às enzimas putativas de *Leishmania* spp. nos genomas de *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, ao contrário do que ocorre para muitos genes que são conservados nestes tripanossomatídeos (El-Sayed et al., 2005).

Na Tabela 1 nota-se que as entradas que apresentam elevada similaridade com a sequência proteica de *P. serpens* correspondem a indolpiruvato descarboxilases e enzimas dependentes de TPP de bactérias dos gêneros *Pantoea*, *Erwinia* e *Pectobacterium*. Estas bactérias, comumente encontradas na superfície de plantas (Brandl et al., 1996; Brandl e Lindow, 1997, 1998; Brandl et al., 2001), pertencem à classe Gammaproteobacteria - família Enterobacteriaceae.

1. 2 Transferência Horizontal Gênica

Múltiplos eventos de transferência horizontal gênica (THG) têm sido implicados na aquisição de peculiaridades estruturais e bioquímicas dos tripanossomatídeos, o que permitiu a adaptação destes organismos a uma vasta gama de hospedeiros (Opperdoes e Michels, 2007). O sucesso adaptativo destes organismos, atestado por sua complexidade metabólica e organizacional, só teria sido possível graças à aquisição de um grande número de genes a partir de ancestrais doadores representados por vírus, bactérias, cianobactérias endossimbiontes e bactérias não-fototróficas, por exemplo, residentes no intestino do inseto hospedeiro (Opperdoes e Michels, 2007).

Hannaert et al. (2003) reportam uma coleção de genes de tripanossomas que apresentam similaridade com genes de plantas e de procariotos. Muitos destes genes estão envolvidos no metabolismo de carbono, biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos aromáticos, metabolismo do glicerol, proteção contra espécies reativas de oxigênio, respiração e bombeamento de prótons (Hannaert et al., 2003; Waller et al., 2004). Por exemplo, dados dos projetos genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* indicam que estes organismos possuem muitos genes codificadores de quinases de açúcares, cujos produtos estariam localizados em glicossomas (Berriman et al., 2005). A presença de tantas quinases específicas para açúcares diferentes da glicose provavelmente reflete uma adaptação precoce voltada para fontes ricas em carboidratos presentes nos hospedeiros vetores e em plantas (Opperdoes e Michels, 2007). Esta adaptação pode ter sido facilitada por múltiplos eventos de THG entre

bactérias (endo)simbiontes presentes tanto no intestino do inseto quanto no próprio parasita (Oppendoes e Michels, 2007; Kořený et al., 2010; Alves et al., 2011). De fato, os tripanossomatídeos parasitam uma grande variedade de insetos com diferentes hábitos alimentares. Como exemplos citam-se as espécies de *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* que podem não apenas habitar o intestino de uma variedade de insetos, mas também são capazes de estabelecer infecções transitórias em plantas (Catarino et al., 2001), e *Phytomonas* spp., que alternam o ciclo entre insetos e plantas hospedeiras.

O fato de o gene da putativa piruvato ou indolpiruvato descarboxilase (PDC/IPDC) de *P. serpens* apresentar elevada similaridade com IPDCs e enzimas dependentes de TPP de fitobactérias sugere que este gene também poderia ter sido adquirido por transferência horizontal.

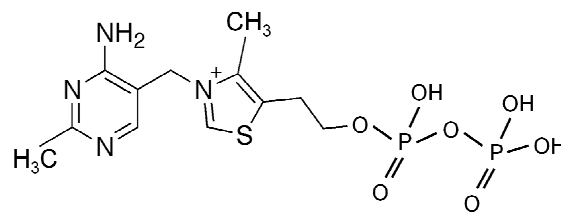
A hipótese de THG já havia sido levantada anteriormente para a aquisição do gene de *Phytomonas* que codifica uma isopropil álcool desidrogenase (iPDH) (Molinas et al., 2003). A partir de análises filogenéticas, os autores verificaram que a sequência do gene de iPDH de *Phytomonas* sp. comporta-se de forma monofilética com o clado de álcool desidrogenases (ADH) de *Mycoplasma penetrans* e de várias proteobactérias (Molinas et al., 2003). A análise da sequência proteica e das propriedades cinéticas da iPDH de *Phytomonas* sp. e da ADH da proteobactéria *Ralstonia eutropha* levou os autores a postular que a enzima iPDH apareceu no gênero *Phytomonas* como resultado de um processo de THG entre uma bactéria estritamente aeróbica atuando como doadora e um tripanossomatídeo ancestral atuando como receptor. O fato de a iPDH não ter sido encontrada nos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* (Uttaro et al., 1997) sugere que a aquisição deste gene teria conferido uma vantagem seletiva para um tripanossomatídeo que vive em floema e látex de plantas (Molinas et al., 2003).

Em resumo, o fato de termos encontrado no fitoflagelado *P. serpens* uma sequência que apresenta elevada similaridade com enzimas dependentes de TPP de bactérias associadas a plantas sugere um processo de transmissão horizontal gênica, como proposto para o gene de iPDH comentado acima.

1.3 Enzimas dependentes de TPP

A coenzima TPP (Figura 3), forma biologicamente ativa da vitamina B₁, é um cofator essencial em diversas reações enzimáticas metabolicamente críticas que envolvem a quebra de pontes C-C (carbono-carbono) adjacentes a um grupo carbonila. A primeira estrutura tridimensional determinada para uma enzima dependente de TPP foi a da transcetolase (Lindqvist *et al.*, 1992). Subsequentemente, foram obtidas as estruturas da piruvato oxidase (Muller e Schulz, 1993), piruvato descarboxilase (Dyda *et al.*, 1993), e de outras enzimas dependentes de TPP (Duggleby, 2006).

Figura 3 - Estrutura química da Tiamina Pirofosfato (TPP).



FONTE: lenne (2012).

Estas enzimas incluem uma vasta classe de α -cetoácido descarboxilases, tanto não-oxidativas (como as PDCs e IPDCs), quanto oxidativas (as piruvato desidrogenases e piruvato oxidases), assim como as transcetolases. O conhecimento da estrutura tridimensional, aliado à análise de sequências, permitiu classificar as enzimas dependentes de TPP em cinco famílias: DC (descarboxilases), TK (transcetolases), OR (oxidoreduções), e K1 e K2 (desidrogenases). Todas estas enzimas possuem uma região conservada, conhecida como assinatura das enzimas dependentes de TPP, que começa com os resíduos -GDG- e termina com -NN- e que corresponde a um sítio de ligação de Mg²⁺ e da porção difosfato da TPP (Hawkins *et al.*, 1989; Koga *et al.*, 1992; Koga, 1995; Schütz *et al.*, 2003a).

Duggleby (2006) verificou que os domínios N- e C-terminal estão presentes nas cinco famílias de enzimas dependentes de TPP, e que o terceiro domínio (Central) está presente somente nas famílias DC (descarboxilases) e TK (transcetolases), embora a ordem dos domínios na sequência proteica não seja

similar nas duas famílias. Para assumir sua atividade, as descarboxilases precisam estar ligadas aos cofatores TPP e Mg^{2+} , uma interação altamente conservada entre as enzimas dependentes de TPP (Schütz *et al.*, 2003b).

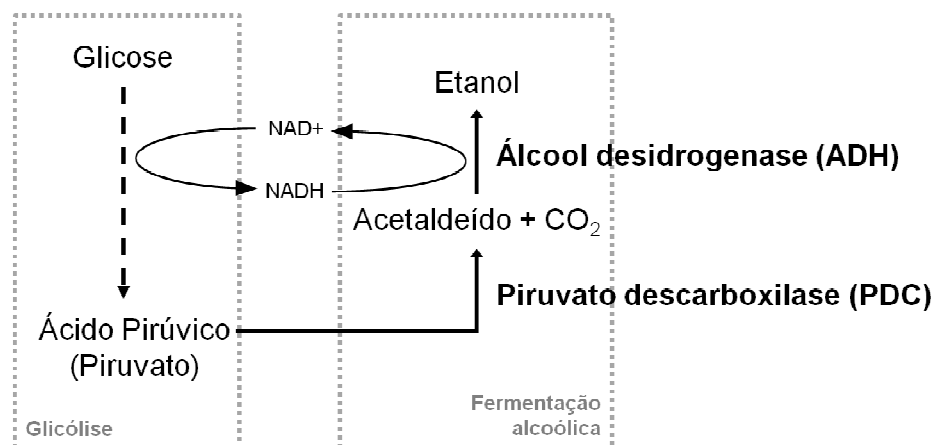
1.4 PDC/IPDC de *P. serpens*

As enzimas PDC (EC 4.1.1.1) e IPDC (EC 4.1.1.74) apresentam elevada similaridade estrutural, que não permite a atribuição funcional inequívoca baseada unicamente em suas sequências nucleotídicas ou proteicas. Diferenças significativas entre as duas enzimas residem na especificidade e afinidade pelos substratos (Schütz *et al.*, 2003a). As PDCs apresentam K_M para ácido pirúvico da ordem de mM (1,3 mM para a PDC de *Saccharomyces cerevisiae*; Boiteux e Hess, 1970); ao passo que a K_M das IPDCs para ácido indol-3-pirúvico é da ordem de μM (15 μM para a IPDC de *E. cloacae*; Koga *et al.*, 1992, 1995).

Nesta altura surgem as perguntas – a enzima codificada pelo gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* teria atividade de piruvato descarboxilase ou de indolpiruvato descarboxilase? Que vantagem adaptativa esta atividade conferiria ao fitoflagelado?

A PDC é a enzima chave do processo de fermentação alcoólica, no qual a enzima converte o ácido pirúvico produzido na glicólise em acetaldeído e dióxido de carbono. O acetaldeído é subsequentemente reduzido a etanol por uma álcool desidrogenase (ADH), com a oxidação concomitante de NADH (Figura 4).

Figura 4 - Esquema do processo de fermentação alcoólica e as principais enzimas envolvidas: piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase.



FONTE: lenne (2012).

A aquisição de uma atividade PDC é particularmente interessante para *Phytomonas* uma vez que a fermentação alcoólica representaria um mecanismo para oxidar parte do NADH formado na glicólise (Figura 4), garantindo o funcionamento desta via, principal responsável pela produção de ATP (Bringaud et al., 2006). Conforme especificado acima, em *Phytomonas* a cadeia respiratória não é funcional, assim como o ciclo de Krebs (Sánchez-Moreno et al., 1992; Maslov et al., 1999; Nawathean e Maslov, 2000; González-Halphen e Maslov, 2004). Nossa hipótese de uma atividade PDC explicaria observações anteriores de que em *Phytomonas* etanol é um dos produtos principais do catabolismo da glicose em condições de aerobiose e anaerobiose (Sanchez-Moreno et al. 1992; Chaumont et al., 1994). Digno de nota é o fato de uma atividade de PDC nunca ter sido descrita nestes flagelados.

A enzima IPDC é considerada a enzima-chave na via de biossíntese do ácido indol-3-acético (auxina, AIA) (Koga et al., 1991a; Koga, 1995) (Figura 5), um dos hormônios vegetais mais importantes. A auxina desempenha papel fundamental nos processos de formação de raiz e divisão celular, promovendo o alongamento do caule e inibindo o alongamento da raiz, atuando ainda na dominância apical, abscisão foliar e desenvolvimento de fruto partenocárpico (Purves et al., 2002; Woodward e Bartel, 2005).

Embora seja amplamente aceito que as plantas usam diversas vias para sintetizar AIA, as enzimas, intermediários metabólicos e genes codificadores não estão bem caracterizados (Woodward e Bartel, 2005). Até o momento, não foi descrita uma IPDC em plantas. Supõe-se que, caso esta enzima esteja presente, seja instável e/ou exista em baixas concentrações (Koga et al., 1991b, 1992).

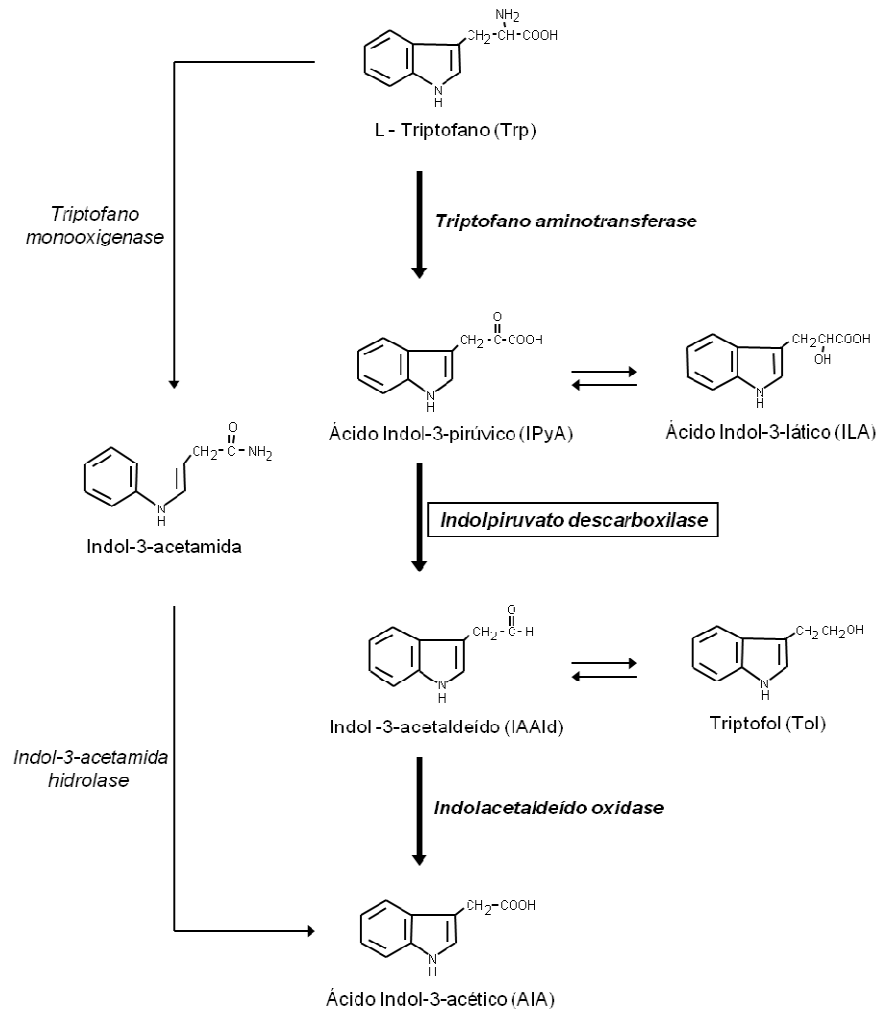
A capacidade de produzir AIA é amplamente difundida em bactérias associadas a plantas (Patten e Glick, 1996; Spaepen e Vanderleyden, 2010). O interesse no estudo da produção de AIA em bactérias não deriva apenas dos efeitos fisiológicos que os fitormônios promovem em plantas, mas também do possível papel nas interações planta-bactéria. Bactérias cujos genes codificam enzimas que levam à síntese de AIA estão envolvidas em patogênese de plantas ou podem ser responsáveis por promover o crescimento destas (Costacurta e Vanderleyden, 1995). Vários destes microorganismos, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *E. herbicola* e patovars de *Pseudomonas syringae* (*savastanoi* e *syringae*) estão relacionados com patogênese em plantas, ao passo que outros microorganismos

como *E. cloacae*, *Azospirillum brasilense*, *P. putida*, *E. herbicola*, *Halomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Acetobacter diazotrophicus* e *Bradyrhizobium japonicum* são reportados como agentes que estimulam o crescimento vegetal contribuindo para o “pool” endógeno de AIA da planta (Costacurta e Vanderleyden, 1995; Brandl et al., 1996; Patten e Glick, 1996; Ona et al., 2005; Spaepen et al., 2007).

A síntese de AIA em bactérias a partir de triptofano pode seguir duas vias principais (Figura 5). Na primeira via (setas em negrito), o triptofano sofre transaminação a ácido indol-3-pirúvico, o qual é descarboxilado a indol-3-acetaldeído pela IPDC. Subsequentemente uma indolacetaldeído oxidase transforma o indol-3-acetaldeído em ácido indol-3-acético. Ácido indol-3-lático e triptofol são formados de forma reversível a partir de ácido indol-3-pirúvico e indol-3-acetaldeído, respectivamente, e podem ser produtos de armazenamento importantes envolvidos na regulação da biossíntese de AIA (Koga et al., 1991a). Na segunda via (setas finas), o triptofano é convertido em indol-3-acetamida, que dá origem ao AIA. A segunda via seria preferencial em cepas consideradas patogênicas (Spaepen e Vanderleyden, 2010) e ocorreria sem a participação da IPDC.

Pelo exposto acima, em tese, a aquisição de uma atividade IPDC também poderia trazer vantagens adaptativas a *P. serpens*, flagelado encontrado em tomates e que não causa patogenia (Jankevicius et al. 1988; Jankevicius et al., 1989, Camargo et al. 1990).

Figura 5 - Vias de síntese de AIA em bactérias a partir do Triptofano.



Em itálico encontram-se os nomes das enzimas que catalisam as reações. A IPDC, tema desta tese, é indicada com um retângulo. As setas em negrito indicam a via preferencial em cepas não patogênicas. ILA e Tol são reversivelmente formados, respectivamente, a partir de IPyA e IAAld, de maneira não enzimática.

FONTE: Adaptado de Koga et al., 1991a.

2 OBJETIVOS

A presença de um gene *PDC/IPDC* em *P. serpens* com alta similaridade com genes de fitobactérias levanta a hipótese de que um evento de THG pode ter ocorrido e conferido vantagens adaptativas a este organismo.

A fermentação alcoólica, dependente de uma atividade PDC, pode ter conferido um ajuste metabólico extenso em *Phytomonas*, promovendo a oxidação do NADH produzido na glicólise e assim sustentando altas taxas desta via, principal responsável pela produção de ATP neste organismo.

A atividade IPDC, enzima chave na biossíntese de AIA em fitobactérias, determinaria a produção de auxina com implicações na interação entre o flagelado e a planta hospedeira.

Desta forma, os objetivos centrais do presente trabalho são: (i) caracterizar o gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* e investigar sua possível origem, e (ii) avaliar as atividades PDC e IPDC em *P. serpens*.

São objetivos específicos:

- I. caracterizar o gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* e avaliar sua presença em isolados de *Phytomonas*;
- II. verificar a existência de ortólogos de *PDC/IPDC* em outros tripanossomatídeos;
- III. obter evidências de um possível evento de THG para a aquisição do gene *PDC/IPDC*;
- IV. investigar a produção de etanol e do fitormônio AIA em culturas de *P. serpens*;
- V. caracterizar a atividade PDC em extratos de *P. serpens*;
- VI. analisar a funcionalidade do AIA produzido por *P. serpens* por bioensaio;
- VII. investigar a produção de AIA em sistema *in vivo* representado por vegetais infectados com *P. serpens*;
- VIII. clonar, expressar e purificar a enzima recombinante de *P. serpens* visando a determinação de parâmetros cinéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nota: Serão apresentados apenas os detalhes metodológicos não inclusos em Material e Métodos dos artigos anexos ao corpo desta tese.

3.1 Meios de Cultura e Soluções

Meio LB: Bacto-triptona 10 g/L; Extrato de Levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; (pH 7,0).

Meio LB-ágar: meio LB com 15 g/L de ágar bacteriológico.

PBS: tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2; NaCl 150 mM.

SSC 1x: NaCl 150 mM; Citrato de Sódio 15 mM (pH 7,0).

Tampão de Amostra 6x: Azul de Bromofenol 0,25%; Glicerol 30%; SDS 0,6%; EDTA 6 mM (pH 8,0).

TBE 1x: Tris-base 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2 mM (pH 8,0).

X-Gal: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-galactopiranosídeo 2% (p/v) em dimetil-sulfóxido (DMSO).

3.2 Tripanossomatídeos e seu cultivo

As culturas de *P. serpens* e de *L. major* foram gentilmente cedidas, respectivamente, pelas Profas. Dras. Marta Maria Geraldês Teixeira (Instituto de Ciências Biomédicas, USP) e Lucile Floeter-Winter (Instituto de Biociências, USP), a quem somos gratas.

Formas promastigotas de *P. serpens* foram cultivadas em meio Grace (Grace, 1962), contendo 10% de soro fetal bovino, a 28 °C, sem agitação. Formas promastigotas de *L. major* foram cultivadas em meio 199 segundo Kapler et al. (1990) com as seguintes modificações: adição de 0,09 g/L de L-Triptofano (Trp) e 0,00001 g/L de Tiamina Pirofosfato (TPP) (para igualar às concentrações encontradas no meio Grace), contendo 10% de soro fetal bovino, a 25 °C. Quando necessário, *P. serpens* e *L. major* foram também cultivadas em meios com 0,5 g/L e 2,5 g/L de triptofano ou 3,5 g/L e 17,5 g/L de glicose (concentrações 5 e 25 vezes maiores do que as encontradas no meio Grace). Os organismos provenientes de meio de cultura foram lavados duas vezes com PBS por centrifugação a 5900 g a 4

°C por 7 min. e os sedimentos de células (*pellets*) foram utilizados ou estocados a -80 °C até o momento do uso, para extração de DNA e RNA.

Formas coanomastigotas de *Crithidia fasciculata* e *C. acanthocephali*, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marta M. G. Teixeira, foram cultivadas em Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*; preparado segundo Castellani et al., 1967), contendo 10% de soro fetal bovino, a 28 °C, sem agitação.

As demais preparações de DNA foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marta M. G. Teixeira. A Tabela 1 apresenta as características das espécies de tripanossomatídeos analisadas neste estudo.

Tabela 1 - Características dos tripanossomatídeos utilizados no estudo.

Espécie/Isolado	Identificação	Hospedeiro	
		Tipo de hospedeiro	Espécie
<i>P. serpens</i>	TCC 060	Planta	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>L. major</i>	-	Humano	<i>Homo sapiens</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i> (CL Brener)	-	Inseto	<i>Triatoma infestans</i>
<i>Trypanosoma rangeli</i> (San Agustin)	-	Humano	<i>Homo sapiens</i>
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	-	Humano	<i>Homo sapiens</i>
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	TCC 374	Inseto	<i>Lutzomia umbratilis</i>
<i>Endotrypanum schaudinni</i>	TCC 014	Mamífero	<i>Choloepus hoffmanni</i>
<i>Herpetomonas muscarum</i>	TCC 001	Inseto	<i>Musca domestica</i>
<i>Herpetomonas megaseliae</i>	TCC 002	Inseto	<i>Megaselia scalaris</i>
<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	TCC 004	Inseto	<i>Muscina stabulans</i>
<i>Crithidia fasciculata</i>	TCC 039	Inseto	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>
<i>Crithidia acanthocephali</i>	TCC 037	Inseto	<i>Acanthocephala femorata</i>
<i>Crithidia deanei</i>	TCC 036	Inseto	<i>Zelus leucogrammus</i>

O cálculo do tempo de dobramento das culturas foi realizado usando-se pontos da fase exponencial de crescimento, segundo as equações 1 e 2 abaixo (Pelczar et al., 1996).

$$n = 3,3 \cdot \frac{(\log b)}{(\log B)} \quad (1)$$

Onde *n* se refere ao número de gerações, *B* = concentração de células no tempo inicial e *b* = concentração de células no tempo final. Tendo definido *n*, o tempo

de geração g , que representa o tempo que leva para uma população dobrar é calculado pela equação 2:

$$g = \frac{t}{n} \quad (2)$$

Onde t corresponde ao tempo transcorrido entre a medida de B e b (ver equação 1)

3.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizados os procedimentos descritos por Ozaki e Cseko (1984) e Sambrook e Russell (2001), com modificações. O DNA foi extraído a partir de *pellets* de *P. serpens*, *L. major*, *C. fasciculata* e *C. acanthocephali*. As células foram ressuspensas em Solução de Lise [NaCl 0,15 M; EDTA 2,5 mM (pH 8,0); Tris-HCl 2,5 mM (pH 8,0); Lauril Sarcosinato de Sódio 0,5%] contendo 100 µg/mL de Proteinase K e 10 µg/mL de RNase A (livre de DNase), e incubou-se a 50 °C por 1 hora, sob agitação esporádica. Realizou-se a extração com Fenol/Tris-HCl (pH 8,0), Fenol/Clorofórmio, Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) e com Clorofórmio. Precipitou-se o DNA com acetato de sódio 0,3 M (pH 7,0) e dois volumes de Etanol Absoluto por aproximadamente 14 horas, a 4 °C. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com Etanol 70%, centrifugou-se e, após secagem completa do *pellet*, este foi ressuspensão em TE. A concentração final de DNA em cada amostra foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific®), a partir da medida da absorbância a 260 nm. As preparações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7%, com tampão TBE 1x acrescido de brometo de etídio em uma concentração final de 0,5 µg/mL. A eletroforese ocorreu em um campo elétrico ≤ 5 V/cm.

3.4 Análise de ortólogos em tripanossomatídeos

3.4.1 Amplificação por PCR

O par de oligonucleotídeos degenerados Try.IPDC.N.For/Try.IPDC.M.Rev (Figura 1 - Anexo A) foi desenhado com base no alinhamento das sequências

nucleotídicas *PDC/IPDC* de *P. serpens* e *L. major/L. brasiliensis/L. infantum* (número de acesso no GenBank: XP_001686429, XP_001564563 e XP_001468661). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 μ L, contendo 50 ng de DNA, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase Biolase (Bioline), tampão da enzima *Taq* 1x, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,2 μ M, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo. As condições da PCR incluíram 5 min de desnaturação a 95 °C, seguido de 30 ciclos de três temperaturas: 1 min de desnaturação a 95 °C; 1 min de anelamento dos oligonucleotídeos a 61 °C, e 1 min de alongação a 72 °C; seguido de 9 min de alongação a 72°C. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose em Tampão TBE 1x, em campo elétrico $\leq 5V/cm$. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e fotografado em transiluminador de luz UV.

3.4.2 Southern blot

O DNA genômico (7 μ g) de *T. cruzi*, *L. major*, *C. fasciculata* e *C. acanthocephali* digerido com a enzima de restrição *Sac* I (New England Biolabs) foi fracionado em gel de agarose 1% e transferido para membrana de náilon (Hybond-N, Amersham Biosciences) usando protocolo padronizado por Sambrook e Russell (2001). O produto de amplificação de DNA genômico de *C. acanthocephali* com os oligonucleotídeos degenerados foi utilizado como sonda para hibridização. A sonda foi marcada com $\alpha[P^{32}]dATP$ (PerkinElmer). A incorporação dos nucleotídeos radioativos foi realizada com o kit *Random Primer DNA Labeling Kit* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. O DNA marcado foi purificado por cromatografia de filtração em gel Sephadex-G50 (segundo Sambrook e Russell, 2001). A hibridização ocorreu a 60 °C em solução contendo Ficoll 0,05%, PVP 0,05%, EDTA 0,5 mM, SSC 3x, SDS 0,1%, DNA de esperma de salmão 100 μ g/mL. A membrana foi lavada até a estringência final de final de SSC 0,1x/SDS 0,1% a 60 °C. As imagens das autorradiografias foram coletadas em *Phosphor Screens* (Kodak Rochester) e analisadas por densitometria com o aplicativo Image QuantTM TL (versão de demonstração, 2005 - Molecular Dynamics).

3.5 Abundância de transcritos do gene *PDC/IPDC*

3.5.1 Preparo das amostras e Slot Blot

RNA total de *P. serpens* e de *L. major* foi extraído com o reagente de TRIzol (Invitrogen) e tratado com DNase RQ1 RNase-free (Promega) de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de RNA nas amostras foi estimada em espectrofotômetro NanoDrop. As amostras de RNA total tratado com DNase foram ressuspensas em 30 µL de SSC 20x e 20 µL de Formaldeído 37% e incubadas a 60 °C por 30 minutos. As amostras foram aplicadas a membranas de náilon Hybond-N (previamente hidratadas com SSC 10x) com o molde de aplicação em *slots* (BIO-DOT *Slot Format* - BioRad) e bomba de vácuo Red-Evac (*Hoefler Scientific Instruments San Francisco*) a uma pressão negativa de 30 mm de Hg. O RNA foi fixado à membrana por aquecimento a 80 °C por 2 horas.

3.5.2 Preparo das sondas

Foram utilizados como sondas os produtos de amplificação obtidos a partir de amplificação do DNA genômico de *P. serpens* e *L. major* com o par de oligonucleotídeos degenerados Try.IPDC.N.For/Try.IPDC.M.Rev (item 3.4.1). Como controle, desenhamos o par de oligonucleotídeos iniciadores GAPDPhy1 e GAPDPhy2, com base no alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *GAPDH* de *P. serpens* e *L. major* (vide localização dos oligonucleotídeos no item 4.4.5 de Resultados e Discussão). As condições de amplificação por PCR, purificação dos produtos de amplificação e marcação das sondas por *random priming* com α [P³²]dATP estão descritas no item 3.4.2.

3.5.3 Hibridização, lavagem das membranas e aquisição do sinal de hibridização

As membranas de *slot blot* foram pré-hibridizadas em forno HyBaid a 42 °C por 90 minutos com 12 mL de tampão de hibridização (SSPE 5x, Formamida 50%, Denhardt's 5x, SDS 0,1%). A sonda foi desnaturada por aquecimento a 100 °C por 5 minutos e adicionada ao tampão de hibridização. A hibridização ocorreu por 12 horas a 42 °C. Inicialmente as membranas foram hibridizadas com as sondas do

gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* e *L. major*. A lavagem das membranas foi feita a 42 °C com solução SSPE 1x e SDS 0,1% por 30 minutos, SSPE 0,5x e SDS 0,1% por 1h00 e SSPE 0,1x e SDS 0,1% por 1h00. As imagens das autorradiografias foram coletadas em *Phosphor Screens* (Kodak Rochester) e escaneadas com o aparelho *PhosphorImager Storm 840* (Molecular Dynamics). A intensidade do sinal de hibridização foi determinada a partir das imagens escaneadas, utilizando-se o programa ImageJ (versão 1.36b)².

Para reutilização das membranas, as sondas dos genes *PDC/IPDCs* foram removidas por lavagem com SDS 0,1% (inicialmente a 100 °C) até o resfriamento da solução. As membranas foram expostas em *Phosphor Screens* para verificar a eficiência do processo. As membranas foram subsequentemente hibridizadas com sonda derivada do gene *GAPDH*. As condições de hibridização, lavagem e aquisição do sinal foram as mesmas descritas acima.

3.6 Caracterização de parâmetros cinéticos da atividade IPDC em lisados de *P. serpens*

3.6.1 Avaliação da atividade IPDC

Extratos semi-purificados de *P. serpens* foram obtidos conforme metodologia adaptada de Camargo et al. (1978) e Camargo et al. (1987). Os sedimentos de 10⁹ células foram ressuspensos em 2 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 6,5, MgCl₂ 5 mM e TPP (Tiamina Pirofosfato) 0,1 mM e rompidos por vibração sônica. A sonicação foi realizada a 4 °C, por 7 ciclos de 15 segundos, com intervalos de 1 minuto entre os ciclos, em equipamento *Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor* (Heat Systems) na potência 80%. O lisado celular foi centrifugado a 16000 g por 30 minutos. A atividade enzimática foi avaliada no sobrenadante. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), a 595 nm, utilizando-se espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Biosciences). Albumina sérica bovina foi utilizada para construir a curva padrão.

A atividade IPDC foi determinada em meios reacionais consistindo de tampão fosfato de potássio 10 mM, MgCl₂ 5 mM, TPP 0,1 mM, indolpiruvato (IPyA) 0,5 mM e

² desenvolvido por W. S. Rasband. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA, 1997-2007.

extrato semi-purificado de *P. serpens* (80 ou 160 µg de proteína), em volume final de 1 mL. Após o tempo de incubação de 15 ou 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de Metanol. Foram adicionados 10 µL do padrão interno ácido Indol-propiónico (0,093 µg/mL) e as reações enzimáticas foram filtradas (0,22 µm) e estocadas a -80 °C.

3.6.2 Quantificação de AIA e precursores em meio reacional

As reações enzimáticas foram analisadas em cromatógrafo à líquido HP-1100 (Hewlett-Packard®) equipado com coluna C18 Luna (30 cm x 4 mm, tamanho de partícula: 5 µm – Supelco, Sigma-Aldrich). As amostras foram eluídas em gradiente de Metanol/Ácido Acético 0,1% (20:80, v/v - condição inicial) a 100:0 (v/v) em 30 min., sendo re-equilibrada por 10 min. na condição inicial entre cada uma das corridas. As injeções (40 µL) foram feitas por injetor automático modelo ALS-1100. Os analitos foram monitorados por fluorescência em um detector HP-1046A em 270 nm de comprimento de onda (λ) de excitação e 350 nm de λ de emissão. Para cada analito (IPyA, IAAlD, Tol e AIA) foram feitas curvas de calibração no intervalo de 25 - 1250 ng, corrigidas pela área do padrão interno ácido indol-propiónico.

3.7 Clonagem e expressão do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*

3.7.1 Amplificação do gene *PDC/IPDC*

O gene *PDC/IPDC* completo de *P. serpens* foi amplificado com o par de oligonucleotídeos IPDCexpF (5'-CCCTCGGAAACCTAC-3') e IPDCexpR (5'-CACTACCCCTTCCTTA- 3'). A PCR foi realizada em termociclador PTC-200 MJ Research (GMI®), em volume final de 25 µL, contendo 200 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgSO₄, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão 10x e 1 U de enzima *Pfu* DNA polimerase (Fermentas). As condições de reação foram: 5 min. de desnaturação a 95 °C, seguida de 30 ciclos de três temperaturas: 1 min. de desnaturação a 95 °C; 1 min. a 57 °C de anelamento dos oligonucleotídeos; e 4 min. de alongação a 72 °C; seguido de 9 min. de alongação a 72 °C. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, com tampão TBE 1x acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese ocorreu em um campo

elétrico ≤ 5 V/cm. A banda de interesse foi purificada com o *PureLink™ PCR Purification Kit* (Invitrogen) e a concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro NanoDrop.

3.7.2 Clonagem do gene *PDC/IPDC* no plasmídeo *pGEM T-Easy*

A *Pfu* polimerase não adiciona desoxiadenosinas trifosfatadas (dATPs) às pontas 3' dos produtos de PCR, desta forma, o produto amplificado do gene *PDC/IPDC* foi incubado com dATP e a enzima *Taq* polimerase (Fermentas), segundo instruções do fabricante, para posterior clonagem no plasmídeo *pGEM T-Easy* (Promega). Este vetor contém resíduos desoxitimidina (T) nas pontas 3', permitindo que o inserto gerado pela PCR ligue-se eficientemente ao vetor. A reação de ligação do plasmídeo *pGEM* com o gene *PDC/IPDC* foi realizada seguindo as instruções do Kit e utilizada na transformação de bactérias cálcio-competentes *E. coli* DH5 α por choque térmico a 42 °C. As bactérias foram plaqueadas em placas contendo LB-ágar, ampicilina (100 μ g/mL) e 1,6 mg de X-Gal e incubadas a 37 °C durante a noite. As colônias contendo os plasmídeos recombinantes (clones 2 a 9 e clone B) foram inoculadas em 4 mL de meio LB contendo Ampicilina 100 μ g/mL, a 37 °C, sob agitação, por aproximadamente 14 horas. A confirmação da presença do inserto nas bactérias foi feita por PCR de colônia com 1 μ L da cultura bacteriana, os oligonucleotídeos IPDCexpF e IPDCexpR e a enzima *Taq* DNA polimerase (condições descritas no item anterior). A extração de DNA plasmidial foi realizada com o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento das duas fitas do inserto do DNA plasmidial foi feita com *Big Dye Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems) conforme protocolo do fabricante e usando iniciadores específicos para o plasmídeo *pGEM* (T7 e SP6), além do oligonucleotídeo Ps.IPDC.C.Rev, interno ao gene *PDC/IPDC* (Figura 1 - Anexo A). Foi utilizado o seqüenciador ABI-PRISM® 3100 (IQ-USP).

As sequências *forward* e *reverse* foram analisadas manualmente para montagem das sequências completas *PDC/IPDC* de cada plasmídeo, com auxílio do programa BIOEDIT (*Biological Sequence Alignment Editor for Windows*) (Hall, 1999). As sequências nucleotídicas foram traduzidas e alinhadas com a sequência depositada *PDC/IPDC* de *P. serpens* (GenkBank AEX33309) e com *PDCs* de

Zymomonas mobilis (alfa-proteobactéria) e *S. cerevisiae* e IPDCs de *E. cloacae* e *P. agglomerans*. O alinhamento foi feito com o programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) e submetido a checagem manual no programa BIOEDIT (*Biological Sequence Alignment Editor for Windows*) (Hall, 1999)

3.7.3 Clonagem do gene *PDC/IPDC* no plasmídeo *pET28(a+)*

Os plasmídeos pGEM recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I (New England Biolabs), que não possuem sítio de restrição interno ao gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*, para linearizar o vetor, segundo as recomendações do fabricante. As reações foram interrompidas por adição de Tampão de Amostra 6x. O gene liberado foi purificado do gel de agarose e inserido no vetor de expressão pET28(a+) (Novagen), previamente digerido com as mesmas enzimas. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 0,8% e as bandas correspondentes ao gene completo *PDC/IPDC* de *P. serpens* e ao plasmídeo pET28(a+) foram purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) segundo protocolo do fabricante.

A reação de ligação entre o gene e o plasmídeo ocorreu com a enzima T4 DNA ligase (Gibco) segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação foi utilizada na transformação de bactérias cálcio-competentes *E. coli* BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7 (Takara). As colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram inoculadas em 4 mL de meio LB contendo Cloranfenicol 20 µg/mL e Kanamicina 30 µg/mL.

3.7.4 Obtenção da *PDC/IPDC* recombinante

Bactérias BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7 contendo o vetor pET28(a+) recombinante foram cultivadas em meio LB líquido contendo antibióticos (item anterior) e a indução da expressão foi realizada com adição de L-arabinose 0,5 mg/mL e após atingir $A_{600\text{ nm}}$ de 0,6 adicionou-se IPTG 0,1 mM, sendo mantidas por 16 horas a 25 °C.

As bactérias foram lisadas por tratamento com Lisozima, em tampão de lise (conforme indicações da fabricante da coluna de níquel, Qiagen) e submetidas a vibração sônica no sonicador *Ultrasonic Processor VCX130 130 Watt* (Sonics) na

potência 80%, em ciclos de 2 segundos, com intervalos de 2 segundos a 4 °C entre ciclos, por 10 minutos. As amostras foram submetidas a centrifugação a 13.000 g e o perfil proteico do precipitado e sobrenadante foi analisado em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Utilizou-se como marcador de tamanho molecular a SDS-6H - *High Molecular Weight Standard Mixture* (Sigma). Ao término da eletroforese, o gel foi fixado por 30 minutos à temperatura ambiente com solução de Ácido acético 10% e Etanol 45%, corado por 7 minutos a 67 °C com *Coomassie Brilliant Blue R* (Sigma) (Coomassie 0,25%, Metanol 45% e Ácido Acético 10%) e descorado por aproximadamente 14 horas à temperatura ambiente com Ácido Acético 7%.

3.7.5 Purificação da PDC/IPDC recombinante

A purificação da fração solúvel da enzima recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando a resina de agarose carregada com níquel (Ni-NTA, Qiagen), e após as lavagens, a proteína foi eluída com tampão de eluição (conforme orientações do fabricante, Qiagen). A segunda e terceira fração da eluição foram unidas e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.7.6 Quantificação de AIA e intermediários no meio de cultura da bactéria recombinante

Após a adição de L-arabinose e IPTG ao cultivo das bactérias recombinantes (item 3.7.4), a cultura foi dividida em três alíquotas de 10 mL cada. A primeira alíquota foi utilizada como controle, e, na segunda e terceira alíquotas adicionou-se 0,5 g/L e 2,5 g/L de Triptofano, respectivamente. Todas as culturas foram mantidas a 25 °C por 16 horas, e no final deste período foram centrifugadas a 15000 g para remoção das bactérias. O sobrenadante foi filtrado (0,22 µm) e uma alíquota de 1 mL foi separada para a quantificação por HPLC. Para tanto, adicionou-se 10 µL de padrão interno (ácido indolpropiónico a 0,093 µg/mL) e o sobrenadante foi desproteínizado pela adição de 4 mL de metanol e incubação por 15 min. à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. a 20 °C. O sobrenadante foi concentrado a 1 mL sob corrente de nitrogênio e filtrado em

membrana Durapore[®] (0,45 µm de diâmetro de poro). A presença de IAAld, Tol e AIA nos meios foi analisada em cromatógrafo à líquido HP-1100 (Hewlett-Packard[®]) equipado com coluna C18 Luna (30 cm x 4 mm, tamanho de partícula: 5 µm – Supelco[®]). As amostras foram eluídas em gradiente de Metanol/Ácido Acético 0,1% (20:80, v/v - condição inicial) a 100:0 em 30 min., sendo re-equilibrada por 10 min. na condição inicial entre cada uma das corridas. Injeções (40 µL) feitas por injetor automático modelo ALS-1100. Os analitos foram monitorados por fluorescência em um detector HP-1046A em 270 nm de comprimento de onda (λ) de excitação e 350 nm de λ de emissão. Para cada analito foram feitas curvas de calibração no intervalo de 25 - 1250 ng, corrigidas pela área do padrão interno ácido indol-propiónico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nota: Quando apropriado, será apresentado apenas o resumo dos Resultados e Discussão apresentados nos artigos anexos ao corpo desta tese.

Anexo A - Trabalho aceito para publicação: lenne, S., Pappas Jr., G., Benabdellah, K., González, A., Zingales, B. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Infection, Genetics and Evolution, 2012. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.016

Anexo B - Manuscrito em fase de elaboração: lenne, S., Freschi, L., Vidotto, V.F., Mercier, H., Purgatto, E., Zingales, B. Indole-3-acetic acid and ethanol production by the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*.

4.1 Caracterização do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*

Nota: Resumo de dados apresentados no Anexo A.

4.1.1 Características do gene *PDC/IPDC* e presença em isolados de *Phytomonas*

A sequência completa do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* foi obtida a partir do clone p228 do conjunto de ESTs da biblioteca de cDNA de *P. serpens* (Pappas et al., 2005). A análise da ORF pelo programa PFAM (Bateman et al., 2004) revelou a presença de domínios para a coenzima TPP incluindo uma região conservada para ligação de Mg²⁺ e a porção difosfato da TPP, característica de enzimas dependentes deste cofator. A busca com o programa BLAST X no banco de dados não redundante (*nr, non redundant*) do NCBI utilizando como entrada a sequência nucleotídica completa de *P. serpens* (2.364 pb) confirmou a elevada similaridade com IPDCs de fitobactérias, PDCs de fungos, e de *Leishmania* (Tabela 4 - Anexo A). Nenhum gene ortólogo foi encontrado nos genomas de *T. cruzi* e *T. brucei*, observação intrigante, visto que muitos genes codificadores de proteínas são conservados nestes tripanossomatídeos (*TriTryp database*, El-Sayed et al., 2005). Uma busca no mesmo banco de dados nos permitiu encontrar duas sequências com similaridade com o gene de *P. serpens* e *Leishmania* spp. no genoma de *Crithidia fasciculata*, o que sugere uma origem comum do gene *PDC/IPDC* em *Leishmania*, *Crithidia* e *P. serpens*.

Amplificações por PCR com dois pares de oligonucleotídeos direcionados para os domínios TPP indicam a conservação da sequência do gene *PDC/IPDC* nos 14 isolados de *Phytomonas* analisados (Figura 1 - Anexo A), sugerindo alta conservação do gene neste gênero. Nenhum produto de amplificação foi obtido para os 18 isolados de outros gêneros de tripanossomatídeos analisados (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas* e *Trypanosoma*) (Tabela A1 - Material Suplementar - Anexo A). A ausência de amplificação observada nas quatro espécies de *Leishmania* e em *C. fasciculata* deve-se ao fato de os oligonucleotídeos não parearem com a sequência correspondente nos genes *PDC/IPDC* destes organismos.

4.1.2 Determinação do número de cópias do gene *PDC/IPDC* e sequência da região intergênica

O número de cópias de genes PDC e IPDC pode variar em diferentes organismos. Em *S. cerevisiae* e *S. kluyveri* três cópias de PDC foram relatadas (Hohmann, 1991; Møller et al., 2004), enquanto que em fitobactérias geralmente o gene IPDC encontra-se em uma única cópia (Costacurta et al., 1994; Patten e Glick, 2002). Sabendo desta variação, resolvemos investigar o número de cópias do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* por *Southern blot* e análise da região intergênica.

O resultado do *Southern blot* (Figura 4A - Anexo A), acoplado à análise do mapa de restrição da sequência nucleotídica completa do gene de *P. serpens* (Número de acesso no GenkBank JN400885), indica que o gene está presente em pelo menos seis cópias contíguas. A análise da região intergênica foi realizada utilizando oligonucleotídeos que permitem a amplificação de um fragmento que vai da porção 3' UTR de um gene à porção 5' UTR do gene contíguo (Figura 4B - Anexo A). O produto de aproximadamente 900 pb foi clonado e sequenciado (Números de acesso JN400886 a JN400894). Os dados indicam que a região intergênica possui 124 pb e é bastante conservada nas cópias do gene *PDC/IPDC*. Encontramos apenas três variantes na região 3' UTR, diferindo em três posições (Figura 4 C - Anexo A). Por sua vez, a análise do genoma de *Leishmania* spp. (site: <http://www.genedb.org>) nos permitiu identificar apenas uma cópia do gene da putativa *PDC/IPDC* nas três espécies deste gênero estudadas (*L. major*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*).

Considerando que a variação no número de cópias gênicas tem sido correlacionada com a adaptação a condições ambientais e/ou patológicas em diversas espécies (Corradi et al., 2007, 2009), o aumento no número de cópias do gene em *P. serpens* poderia estar relacionado a uma adaptação metabólica para a sobrevivência na planta hospedeira.

4.1.3 Abundância relativa de transcritos do gene *PDC/IPDC*

Uma vez que observamos um aumento no número de cópias do gene *PDC/IPDC* em *P. serpens*, quando comparado ao número de cópias em *Leishmania* spp., perguntamo-nos se isto acarretaria um aumento no nível de transcritos correspondentes no fitoflagelado. Para isto, a abundância relativa de transcritos de *PDC/IPDC* foi avaliada por RT-PCR em tempo real, a partir de cDNA obtido de *P. serpens* e *L. major*. Os valores de C_t resultantes da amplificação dos genes *PDC/IPDC* e *gGAPDH* (oligonucleotídeos usados estão descritos na Tabela 3 - Anexo A) foram utilizados para calcular a abundância relativa de transcritos *PDC/IPDC* pelo método delta- C_t . Os resultados indicam um aumento de 5,7 vezes na abundância de transcritos do gene de *P. serpens* em comparação com *L. major* (Tabela 7 - Anexo A).

Desta forma, concluímos que o aumento no número de genes *PDC/IPDC* de *P. serpens* (pelo menos seis cópias) determinaria o incremento de ~5,7 vezes na abundância dos transcritos correspondentes.

No Anexo A levantamos a pergunta: qual seria a relevância funcional da *PDC/IPDC* em *Leishmania*? O estágio promastigota deste parasita, encontrado no inseto, depende do catabolismo de aminoácidos para obter energia, ao passo que os amastigotas proliferam no compartimento lisossomal de macrófagos e preferem ácidos graxos como fontes de energia (Bringaud et al., 2006). Que seja de nosso conhecimento, uma única comunicação descreve o etanol como metabólito intracelular em quatro cepas de *L. donovani* (Singha et al., 1996). Por outro lado, dados de outros autores (Darling et al., 1987; Rainey e MacKenzie, 1991) indicam que *Leishmania* não produz etanol. Além disto, Bringaud et al. (2006) propõem que em *L. major* o excesso de piruvato seria canalizado para o ciclo Krebs, funcional neste organismo. Desta forma, a atividade *PDC/IPDC* neste gênero merece ser investigada (ver item 4.4.3).

4.2 Evidências do processo de THG para a PDC/IPDC de *P. serpens*

Nota: Resumo de dados apresentados no Anexo A.

4.2.1 Análises filogenéticas

Dada a similaridade da sequência de *P. serpens* com PDCs e IPDCs de distintos organismos, a possível origem do gene *PDC/IPDC* em *Phytomonas* foi inferida a partir da análise filogenética de sequências proteicas de enzimas dependentes de TPP: IPDCs e IPDC/PPDCs de bactérias e PDCs de fungos e plantas. As árvores foram geradas por diferentes métodos (NJ, MP e ML). Em todas as análises obtivemos agrupamentos distintos de enzimas de plantas, fungos e bactérias. A PDC/IPDC putativa de *Phytomonas* comportou-se de forma monofilética com as enzimas de *Leishmania* spp. e *C. fasciculata*, aparecendo em 91% das pseudo-réplicas de *bootstrap* na árvore de MP (Figura 3B - Anexo A). As análises mostram também que o clado de tripanossomatídeos forma um grupo monofilético com IPDCs das gama-proteobactérias *P. agglomerans*, *E. cloacae* e *P. putida*, com suporte de *bootstrap* de 93% na árvore de MP. Isto levanta a possibilidade de que um evento de THG a partir de uma fitobactéria ancestral foi responsável pela aquisição do gene *PDC/IPDC* no ramo dos tripanossomatídeos não-*Trypanosoma*.

A aquisição de um gene que codifica uma putativa PDC representaria uma vantagem adaptativa para *P. serpens*, que vive em um ambiente rico em glicose. De fato, neste organismo a síntese de ATP ocorreria quase exclusivamente via fosforilação ao nível do substrato (Bringaud et al., 2006), uma vez que a cadeia de transporte de elétrons não é funcional (Sánchez-Moreno et al., 1992; Maslov et al., 1999; Nawathean e Maslov, 2000; González-Halphen e Maslov, 2004). A presença de uma atividade PDC, enzima que participa da fermentação alcoólica (ver Figura 4 da Introdução) contribuiria para a re-oxidação do NADH, necessário para o funcionamento da glicólise. Devemos salientar que, até o presente, a oxidação do NADH em *Phytomonas* havia sido atribuída exclusivamente a uma oxidase alternativa (*plant-like alternative oxidase*) (Tielens e Van Hellemon, 1998).

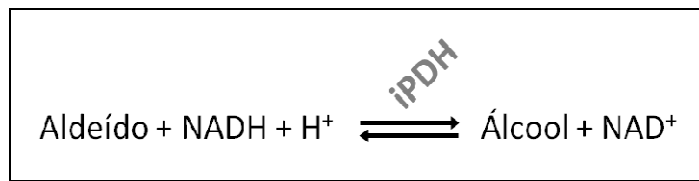
4.2.2 Avaliação do uso de códons (codon usage)

Além de análises filogenéticas, indicações sobre eventos de THG podem ser obtidas pela análise do conteúdo (A + T) do genoma, conteúdo GC na primeira e terceira posição dos códons e uso de códons sinônimos (Lawrence e Ochman, 1997), dado que o DNA transferido horizontalmente muitas vezes tem composição de nucleotídeos diferente do resto do genoma (Monier et al., 2007). Desta forma, analisamos o conteúdo GC e uso de códons do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* e *L. major*. Para este propósito, duas IPDCs de fitobactérias (*E. cloacae* e *E. herbicola*) e duas PDCs de fungos (*Aspergillus parasiticus* e *Rhizopus oryzae*) com atividades enzimáticas comprovadas foram selecionadas com base na proximidade com as PDC/IPDCs de *P. serpens* e *Leishmania* spp. nas filogenias (Figuras 2 e 3 - Anexo A). Os genes *gGAPDH* de *P. serpens* e *L. major* foram utilizados como controle. Os resultados indicaram uma utilização de códons semelhante para o genes *PDC/IPDC* e *gGAPDH* de *P. serpens* e *L. major*. A comparação do índice de GC3s (índice do conteúdo G + C na terceira posição de códons sinônimos) e uso de códons dos genes *PDC/IPDCs* de *P. serpens* e *L. major* com os genes homólogos de fitobactérias e fungos não apoiam um evento de HGT recente.

É importante salientar que se um evento de HGT for antigo, ao longo do tempo os genes adquiridos estarão sujeitos às mesmas pressões mutacionais que afetam todos os genes do genoma receptor (Lawrence e Ochman 1998). Desta forma, critérios baseados no uso de códons permitem a identificação de eventos recentes de transferência gênica, mas são ineficientes na detecção de eventos que ocorreram há muito mais tempo (Boto, 2010). Por outro lado, um evento de HGT recente parece ter ocorrido na aquisição do gene de uma isopropil álcool desidrogenase (iPDH) de *Phytomonas* sp. a partir de uma gama-proteobactéria (Molinas et al., 2003). Este gene não foi encontrado nos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* (Uttaro et al., 1997).

É interessante notar que a iPDH de *Phytomonas* sp. é capaz de atuar sobre isopropanol ou etanol, embora com maior afinidade para o primeiro substrato (Molinas et al., 2003) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema de atuação da isopropil álcool desidrogenase (iPDH) de *Phytomonas* sp. descrito por Molinas et al. (2003).



FONTE: lenne (2012).

A análise da coleção de ESTs de *P. serpens* (Pappas et al., 2005) mostrou a presença de um agrupamento cuja sequência consenso apresenta similaridade com uma putativa álcool desidrogenase de *T. cruzi* (número de acesso no GenBank AAL96371). Desta forma, esta enzima ou a iPDH poderia participar do processo de fermentação alcoólica, juntamente com a PDC levando à produção de etanol por *P. serpens*.

4.3 Análise de ortólogos em tripanossomatídeos

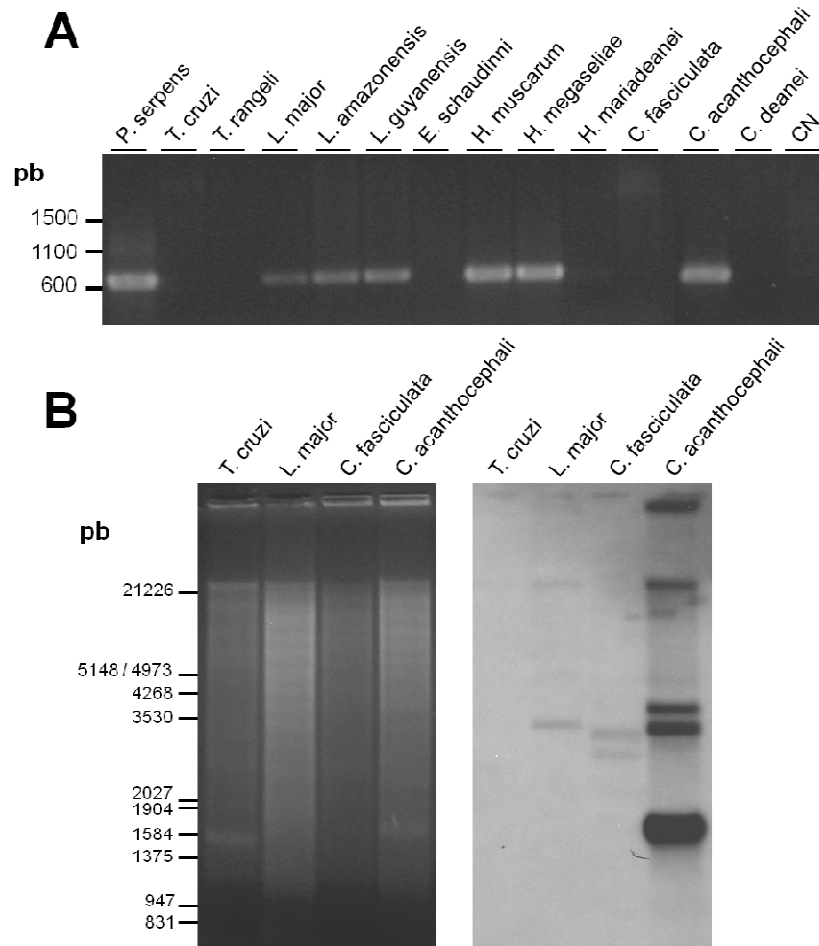
Nota: Este estudo ainda não foi publicado.

A proximidade das enzimas PDC/IPDC putativas de *P. serpens*, *Leishmania* spp. e *C. fasciculata* com as IPDCs de fitobactérias sugeria um evento de THG a partir de uma bactéria doadora para um tripanossomatídeo ancestral receptor. Investigamos a possibilidade de outros tripanossomatídeos terem herdado um ortólogo do gene em questão.

Para esta finalidade, um par de oligonucleotídeos degenerados (ver item 3.4.1 de Material e Métodos) foi desenhado com base no alinhamento das sequências nucleotídicas dos genes *PDC/IPDC* de *P. serpens* e *Leishmania* spp. Estes oligonucleotídeos geraram um produto de amplificação com o tamanho esperado (657 pb) em isolados do gênero *Leishmania*, em *Herpetomonas* spp. e *C. acanthocephali*, mas não em *C. fasciculata* (Figura 7A). O produto de *C. acanthocephali* foi utilizado como sonda em um *Southern blot* contendo DNA de *T. cruzi*, *L. major*, *C. fasciculata* e *C. acanthocephali* digerido com *Sac I* (Figura 7B). Observamos que a sonda não hibridizou com o DNA de *T. cruzi* e reconheceu bandas de diferentes tamanhos nos outros tripanossomatídeos. O fato de não ter havido amplificação do DNA de *C. fasciculata* com os oligonucleotídeos

degenerados (Figura 7A), provavelmente foi ocasionado pelo não anelamento destes iniciadores.

Figura 7 - Busca de ortólogos da PDC/IPDC em tripanossomatídeos.



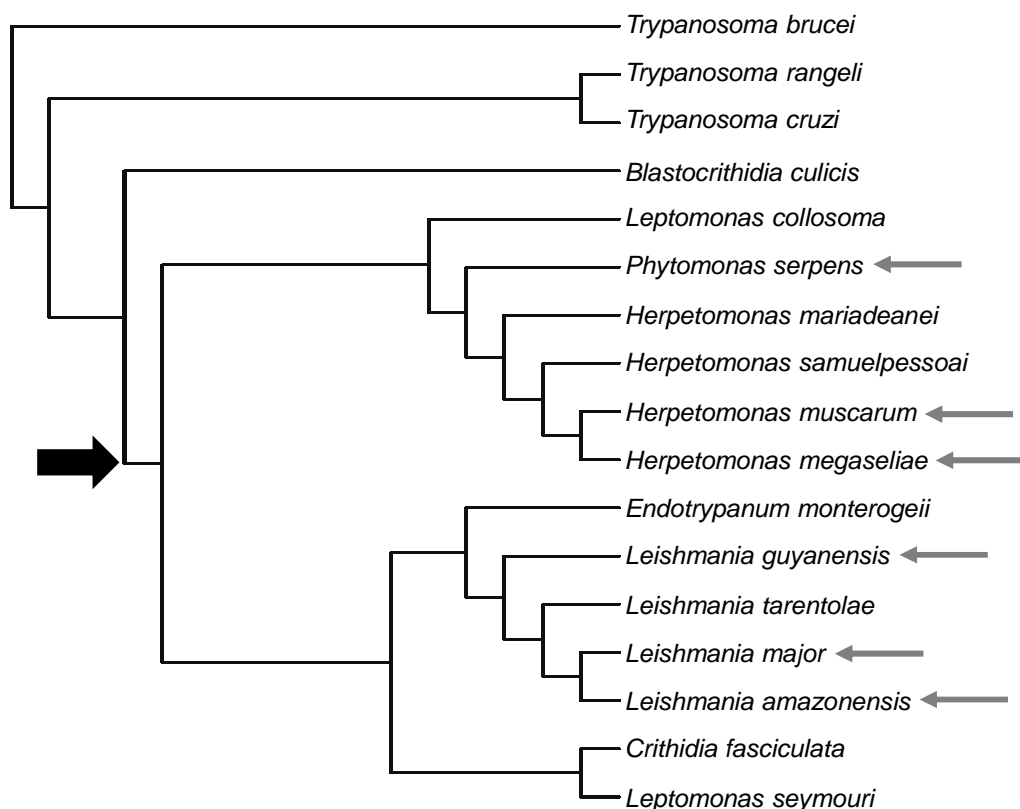
Painel A: amplificação do gene *PDC/IPDC* com oligonucleotídeos degenerados (item 3.4.1 de Material e Métodos). Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda. CN, controle negativo. O tamanho dos produtos de amplificação corresponde a ≈ 650 pb. **Painel B:** *Southern blot* do DNA genômico de tripanossomatídeos digerido com *Sac I* por 16 h. À esquerda está o gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e à direita as amostras transferidas para uma membrana de náilon e hibridizadas com a sonda de ≈ 650 pb de *Crithidia acanthocephali*. Tempo de exposição em *Phosphor Screen*: 90 horas.

FONTE: lenne (2012).

Na Figura 8 apresenta-se uma árvore de consenso gerada manualmente a partir da comparação de árvores obtidas diversos autores com sequências de SSU rRNA de vários tripanossomatídeos. Nesta árvore estão indicadas as espécies em que houve produtos de amplificação com oligonucleotídeos degenerados. Esses resultados, somados aos resultados de *Southern blot* (Figura 7B), sugerem que

espécies pertencentes aos gêneros *Leishmania*, *Herpetomonas* e *Crithidia* contenham sequências gênicas que apresentam similaridade com a PDC/IPDC de *P. serpens* e de *Leishmania spp.* Estas sequências não existiriam nas duas espécies do gênero *Trypanosoma* analisadas. De fato, buscas por similaridade realizadas no genoma de *T. cruzi* e *T. brucei* indicam a inexistência de PDCs ou IPDCs nesses gêneros. Estes resultados apoiam a hipótese levantada no item 4.2.1 de que a aquisição do gene *PDC/IPDC* teria ocorrido após a separação do gênero *Trypanosoma* dos demais tripanossomatídeos.

Figura 8 - Árvore de consenso de maioria, gerada manualmente a partir da comparação de árvores obtidas por diversos autores (Marché et al., 1995; Hollar e Maslov, 1997; Briones et al., 1999; Maslov et al., 2001; Hughes e Piontkivska, 2003) com sequências de SSU rRNA de vários tripanossomatídeos.



As setas cinza indicam as espécies com resultado positivo para a amplificação por PCR com os oligonucleotídeos degenerados (Figura 7A). A seta preta indica o posicionamento do possível ancestral tripanossomatídeo não-*Trypanosoma* que teria recebido o gene *PDC/IPDC* por THG.

FONTE: lenne (2012).

4.4 Produção de etanol e AIA por *P. serpens*

Nota: Parte dos resultados aqui apresentados são descritos no Anexo B.

4.4.1 Justificativa

As análises filogenéticas apresentadas no item 4.2.1 mostram a proximidade da sequência da PDC/IPDC de *P. serpens*, *Leishmania* spp. e *C. fasciculata* com IPDCs de fitobactérias e, em menor grau, com PDCs de fungos. As PDCs e IPDCs possuem elevada similaridade estrutural, o que impede a anotação funcional inequívoca baseado-se unicamente em dados de sequências (Koga, 1995; Schütz et al., 2003). Costelloe et al. (2008) advertem que a anotação das enzimas como PDC ou IPDC é complicada pelo fato que muitas IPDCs, além de descarboxilar indolpiruvato, podem também atuar sobre piruvato. Desta forma, neste capítulo investigamos a atividade enzimática da PDC/IPDC de *P. serpens*.

4.4.2 Cultivo dos organismos

Vários meios de cultura complexos ou definidos foram descritos para o cultivo de *Phytomonas* spp. Para os estudos que visavam determinar a presença de etanol e/ou AIA no meio de cultura de *P. serpens*, demos preferência ao meio Grace que é quimicamente definido.

Tendo em vista a presença de um putativo gene ortólogo em *L. major*, também determinamos a presença dos dois compostos no meio condicionado deste organismo, neste caso, meio 199 (com as modificações citadas no item 3.2 de Material e Métodos). Na Tabela 2 apresentamos as concentrações de glicose (Glc), sacarose, L-triptofano (Trp) e tiamina HCL nos dois meios. O meio Grace possui baixa concentração de Glc e Trp em sua composição, o que permite incrementá-las e avaliar o efeito no acúmulo de metabólitos.

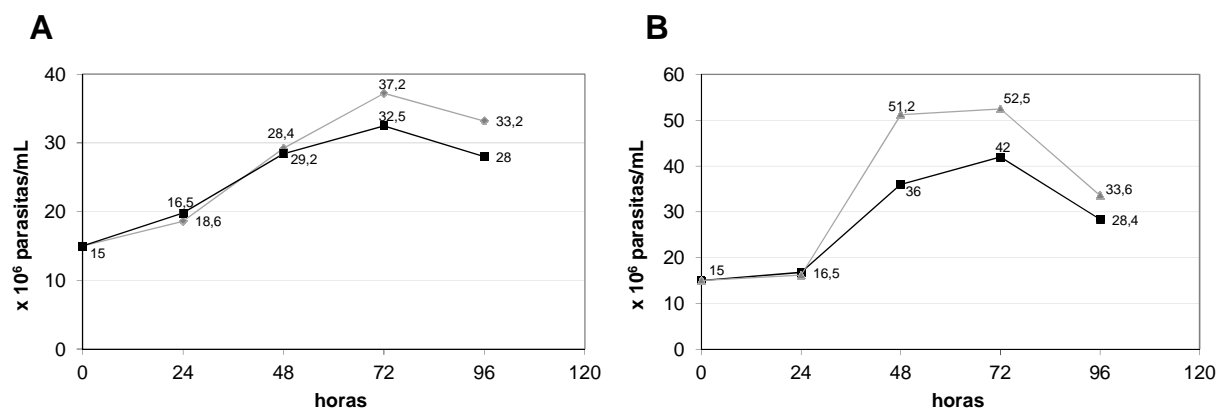
Tabela 2 - Concentração de componentes de interesse nos meios de cultura Grace (para *P. serpens*) e 199 (para *L. major*).

Componentes	Concentrações (valores em g/L)	
	Meio Grace (Sigma)	Meio 199 (Cultilab)
Glicose	0,7	1,0
Sacarose	26,68	----
L-Triptofano	0,1	0,01
Tiamina HCl	0,00002	0,00001

Os dois tripanossomatídeos foram cultivados (duplicatas) a partir de um inóculo inicial de 15×10^6 células/mL, em 10 mL de meio de cultura. A densidade de células no meio foi estimada por contagem em câmara de Neubauer, com intervalos de 24 horas. As contagens foram realizadas até as culturas atingirem a fase de declínio. Com base nas curvas de crescimento (Figura 9), definiu-se que o final da fase exponencial ocorre no 4^o dia para *P. serpens* e no 3^o dia para *L. major*. Calculamos ainda o tempo de dobramento dos flagelados. Para *P. serpens*, o tempo médio de dobramento foi de 47,2 horas, e para *L. major*, de 18,3 horas.

As características da cinética de crescimento dos organismos foram semelhantes às descritas anteriormente para *Phytomonas* Jma (isolada do látex de *Jatropha macrantha*) nos meios de cultura LIT (Canepa et al., 2007) e SDM79 (Marcora et al., 2010) e *L. major* linhagem LT252 no meio M199 (Kapler et al., 1990).

Figura 9 - Curvas de crescimento (duplicatas) para *P. serpens* em meio Grace (A) e *L. major* em meio 199 (B).



FONTE: lenne (2012).

4.4.3 Produção de etanol em meio condicionado de *P. serpens* e *L. major*

Nota: Resumo de dados apresentados no Anexo B. No manuscrito constam apenas dados relativos a *P. serpens*.

O acúmulo de etanol no meio condicionado de *P. serpens*, contendo diferentes concentrações de Glc e Trp é mostrado na Figura 3B do Anexo B (Ienne et al., 2012³, em fase de elaboração) e na Figura 10 abaixo. Nossos dados corroboram relatos anteriores (Sánchez-Moreno et al., 1992; Chaumont et al., 1994) que indicam que *P. serpens* produz etanol em meio rico em glicose. Mostram ainda que o aumento da concentração de glicose no meio de 0,7 a 3,5 g/L estimula cerca de seis vezes a produção de etanol (Tabela 3). Comparada ao meio controle, a análise de variância de um fator (ANOVA) confirma que há diferença significativa entre estas condições (0,7 e 3,5 g/L de Glc) ($p = <0,001$). Por outro lado, o aumento da concentração de Glc de 3,5 para 17,5 g/L causa pequeno incremento da produção do composto, possivelmente por haver saturação do sistema. Por sua vez, o aumento na concentração de Trp (de 0,1 para 0,5 e 2,5 g/L) causa um incremento estatisticamente não significativo ($p = 0,335$ e $0,062$, respectivamente) na produção de etanol.

Também investigamos a presença de etanol no meio 199 condicionado pelo crescimento de *L. major*. Neste caso também variamos as concentrações de Glc e Trp. Na Tabela 3 e Figura 10 compara-se o acúmulo de etanol nos meios condicionados de *P. serpens* e *L. major*.

³ Ienne et al., 2012.

Contrariamente ao observado para *P. serpens*, os dados da Tabela 3 indicam que a concentração de etanol no meio condicionado de *L. major* não varia com o aumento da concentração de Trp ou Glc, sugerindo a não funcionalidade da PDC/IPDC nesta espécie. Por outro lado, como comentado no item 4.1.3, uma única comunicação descreve o etanol como metabólito intracelular em quatro cepas de *L. donovani* (Singha et al., 1996). Sendo assim, nossa observação merece estudos mais aprofundados que avaliem a real importância da atividade PDC/IPDC neste gênero.

Tabela 3 - Quantificação de etanol em meios de cultura condicionados por *P. serpens* e *L. major*.

Meio condicionado	<i>P. serpens</i>		<i>L. major</i>	
	mg/10 ⁸ células ^a	mmol/10 ⁸ células	mg/10 ⁸ células ^a	mmol/10 ⁸ células
Controle ^b	36,04 ± 6,31	0,78	4,7 ± 2,89	0,102
+ Triptofano 0,5 g/L	58,98 ± 9,79	1,28	1,37 ± 0,21	0,028
+ Triptofano 2,5 g/L	81,97 ± 11,39	1,78	2,24 ± 2,06	0,049
+ Glicose 3,5 g/L	238,74 ± 34,62	5,18	2,4 ± 0,52	0,053
+ Glicose 17,5 g/L	289,07 ± 37,98	6,27	2,4 ± 0,92	0,052

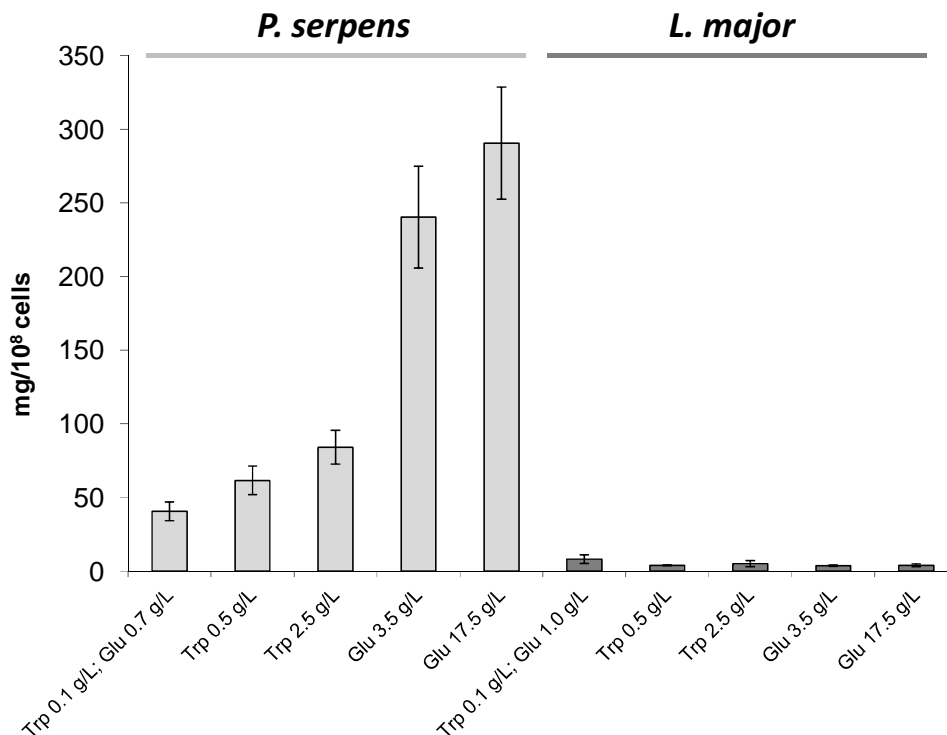
^a Os dados representam a média ± desvio padrão das triplicatas biológicas, descontado o valor do *background* encontrado nos meios não condicionados.

^b Molaridade da média das triplicatas biológicas, descontado o *background* dos meios não condicionados.

^c Concentrações de triptofano e glicose no meio Grace (*P. serpens*), respectivamente, 0,1 g/L e 0,7 g/L e no meio 199 (*L. major*), 0,1 g/L e 1,0 g/L.

A elevada produção de etanol por *P. serpens* pode ser justificada pelo fato de este organismo possuir uma cadeia respiratória deficiente (Maslov et al., 1999), sendo a glicólise a única via responsável pela produção de ATP. Neste sentido, foi inferido (Molinas et al., 2003) que seu metabolismo seria essencialmente fermentativo, com o piruvato sendo descarboxilado a acetaldeído por uma PDC glicosomal, e o acetaldeído reduzido a etanol por uma álcool desidrogenase (ver discussão no item 5).

Figura 10 - Quantificação de etanol em meios de cultura condicionados de *P. serpens* e *L. major*.



As barras indicam o desvio padrão das triplicatas biológicas.
 FONTE: lenne (2012).

4.4.4 Produção de AIA e seus precursores em meio condicionado de *P. serpens* e *L. major*

Nota: Resumo de dados apresentados no Anexo B. No manuscrito constam apenas dados relativos a *P. serpens*.

A fim de verificar se *P. serpens* é capaz de produzir AIA, a concentração deste fitormônio e seus precursores: ácido indol-3-pirúvico (IPyA), triptofol (Tol), e indol-3-acetaldeído (IAAld) (ver Figura 5 da Introdução) foi avaliada em meios de cultura condicionados contendo diferentes concentrações de Trp ou Glc, nas condições descritas acima (Figura 3A – Anexo B) (lenne et al., 2012⁴, em fase de elaboração). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 4 e Figura 11. Observa-se que a adição de 0,5 g/L e 2,5 g/L de Trp, substrato conhecido da via de biossíntese de AIA em bactérias, promoveu um aumento de 8,4 e 20,6 vezes,

⁴ lenne et al., 2012.

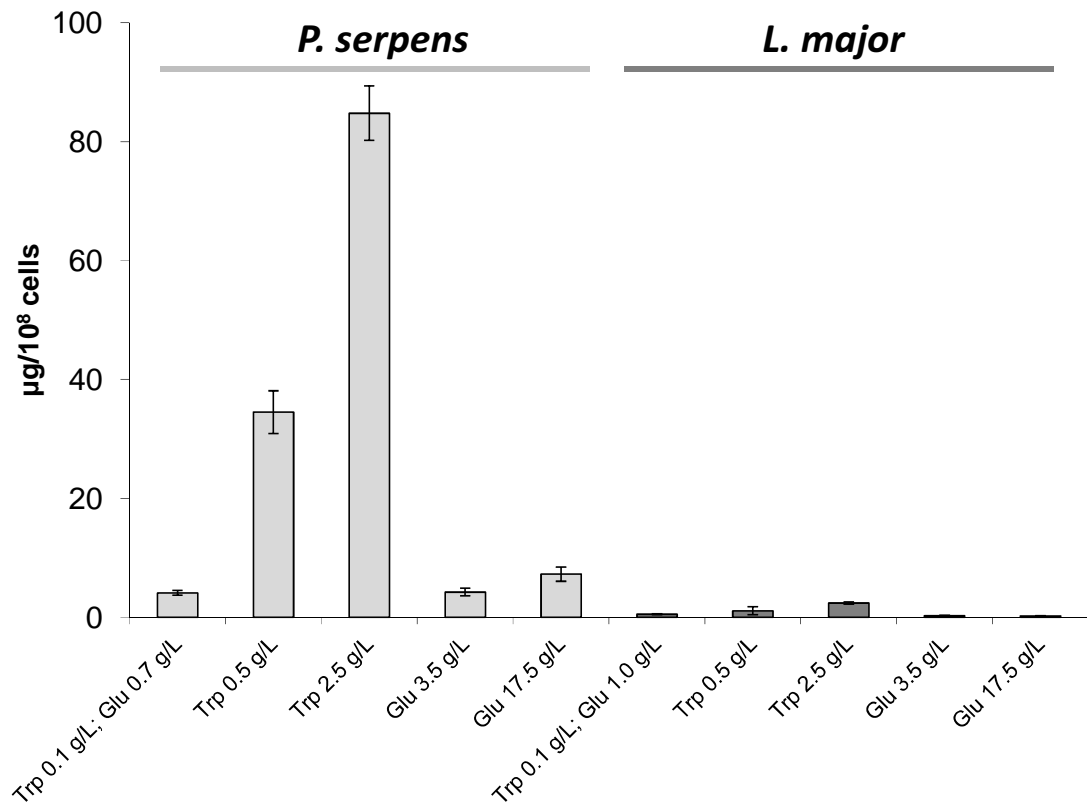
respectivamente, na concentração de AIA em relação ao controle. Comparada ao meio controle, a análise de variância de um fator (ANOVA) confirma que há diferença significativa entre estas condições (0,1; 0,5 e 2,5 g/L de Trp) ($p = <0,001$ para AIA e Tol). Nossos dados concordam com observações anteriores de que a adição de Trp estimula a biossíntese do fitormônio AIA em muitos microorganismos, por exemplo, *Acetobacter diazotrophicus* (Patil et al., 2011), *Azotobacter* spp. (Ahmad et al., 2005), *Pseudomonas* spp. (Ahmad et al., 2005; Karnwal, 2009) e *Azospirillum* spp. (Bashan e de-Bashan, 2010).

A concentração de triptofol (Tol) também foi monitorada, verificando-se um incremento de 2,8 e 9,8 vezes com a adição de 0,5 g/L e 2,5 g/L de Trp, respectivamente. Concluímos haver uma correlação positiva entre o aumento da concentração do substrato Trp e do produto AIA e do intermediário Tol. Os baixos níveis de IPyA determinados no meio condicionado de *P. serpens* é uma forte evidência da existência de uma IPDC funcional neste organismo, que converteria IPyA em IAAld, Tol e AIA.

Apesar de investigado, nos meios de cultura não detectamos a presença de IAAld, provavelmente em função de sua conversão em Tol e AIA. De fato, IAAld pode ser rapidamente convertido a Tol de maneira não enzimática (Moore and Shaner, 1968; Gibson et al., 1972; Koga et al., 1992).

A quantificação de AIA e seus precursores em meio 199 condicionado pelo crescimento de *L. major* também foi realizada (Tabela 4; Figura 11). Neste parasita o acúmulo de AIA é cerca 8 vezes menor que em *P. serpens*. O incremento da concentração de Trp no meio promove um ligeiro aumento das quantidades de IPyA, Tol e AIA, muito inferior àquele observado em *P. serpens* (Tabela 4). A análise de variância de um fator (ANOVA) indicou não haver diferenças significativas (dados não mostrados) entre as condições (0,1; 0,5 e 2,5 g/L de Trp) e, portanto, não há uma correlação como observada no meio de *P. serpens* onde o aumento da concentração do substrato Trp leva ao aumento do produto AIA e do intermediário Tol. Desta forma, é possível que o AIA detectado no meio não siga a mesma via de biossíntese de *P. serpens*, ou que a atividade enzimática de PDC/IPDC seja muito baixa neste organismo, ou mesmo que algum composto do meio de cultura, com um anel indólico e tempo de retenção semelhante, esteja interferindo nas medições.

Figura 11 - Quantificação de AIA em meios de cultura condicionados de *P. serpens* e *L. major*.



As barras indicam o desvio padrão das triplicatas biológicas.
FONTE: lenne (2012).

Tabela 4 - AIA e seus precursores em meios condicionados de *P. serpens* e *L. major*.

Meio condicionado	$(\mu\text{g}/10^8 \text{ células}^a)$			$(\text{mmol} \times 10^{-5})$		
	AIA	IPyA	Tol	AIA	IPyA	Tol
<i>P. serpens</i>						
Controle ^c	4,1 ± 0,4	1 ± 0,4	5,4 ± 0,5	2,34	0,49	3,35
+ Triptofano 0,5 g/L	34,5 ± 3,6	0,6 ± 0,2	15,4 ± 2,02	19,69	0,29	9,55
+ Triptofano 2,5 g/L	84,8 ± 4,6	1,1 ± 0,5	52,9 ± 2,2	48,40	0,54	32,82
+ Glicose 3,5 g/L	4,24 ± 0,64	0,19 ± 0,04	12,35 ± 2,03	2,42	0,09	7,66
+ Glicose 17,5 g/L	7,27 ± 1,19	0,32 ± 0,19	12,87 ± 1,84	4,15	0,16	7,98
<i>L. major</i>						
Controle ^c	0,5 ± 0,06	2,2 ± 0,6	0,08 ± 0,007	0,28	1,08	0,05
+ Triptofano 0,5 g/L	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3	0,63	0,54	0,87
+ Triptofano 2,5 g/L	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,7	1,1 ± 0,2	1,37	0,79	0,68
+ Glicose 3,5 g/L	0,29 ± 0,02	0,99 ± 0,20	0,30 ± 0,02	0,16	0,49	0,18
+ Glicose 17,5 g/L	0,24 ± 0,02	0,92 ± 0,32	0,33 ± 0,03	0,14	0,45	0,20

^a Os dados representam a média ± desvio padrão das triplicatas biológicas.

^b Molaridade da média das triplicatas biológicas.

^c Concentrações de triptofano e glicose no meio Grace (*P. serpens*), respectivamente, 0,1 g/L e 0,7 g/L e no meio 199 (*L. major*), 0,1 g/L e 1,0 g/L.

Ao convertermos em moles os dados referentes ao acúmulo de etanol e AIA no meio condicionado por *P. serpens* (sem adição suplementar de Glc ou Trp), nota-se que no mesmo período de observação são produzidos 0,78 mmoles de etanol (Tabela 3) e $2,3 \times 10^{-5}$ mmoles de AIA (Tabela 4). Isto indica que *P. serpens* produziria 34.000 vezes mais etanol que AIA. A análise dos agrupamentos de ESTs de *P. serpens* indica que a sequência consenso do agrupamento mais populoso (contendo 45 ESTs) apresenta elevada similaridade com membros da família de transportadores de glicose (Pappas et al., 2005). Esta reiteração de transcritos pode ser correlacionada com o metabolismo energético de *Phytomonas*, dependente, quase exclusivamente, da fosforilação no nível do substrato que ocorre na glicólise. A maior concentração de Glc no meio e principalmente a elevada expressão de transportadores de hexose justificam o maior acúmulo de etanol no meio condicionado controle. Por outro lado, quando Trp é adicionado ao meio de cultura (0,5 e 2,5 g/L) observa-se um incremento notável no acúmulo de AIA, gerando-se 19,7 e 48,4 moles, respectivamente (Tabela 4). O conjunto destas observações apoiaria a presença de atividades PDC e IPDC em *P. serpens*.

No meio Grace há elevada concentração de sacarose (26,68 g/L), que poderia gerar glicose + frutose pela ação de invertases. A presença desta atividade enzimática foi relatada no sobrenadante de culturas de uma *Phytomonas* sp. isolada do látex de *Euphorbia characias* (Sánchez-Moreno et al., 1992). No entanto, na nossa coleção de ESTs não encontramos sequências com similaridade com invertases (Pappas et al., 2005). Por um lado, isto poderia ser ocasionado pelo tamanho de nossa coleção, mas, por outro, por ser uma característica inerente a *P. serpens* isolada de um fruto. De fato, foi observado que flagelados de frutos crescem bem em meios contendo monohexoses, e não crescem em meios contendo dissacarídeos (Camargo, 1999). Estas observações sugerem que *P. serpens* não utilize a sacarose presente no meio Grace.

4.4.5 Abundância de transcritos de PDC/IPDC

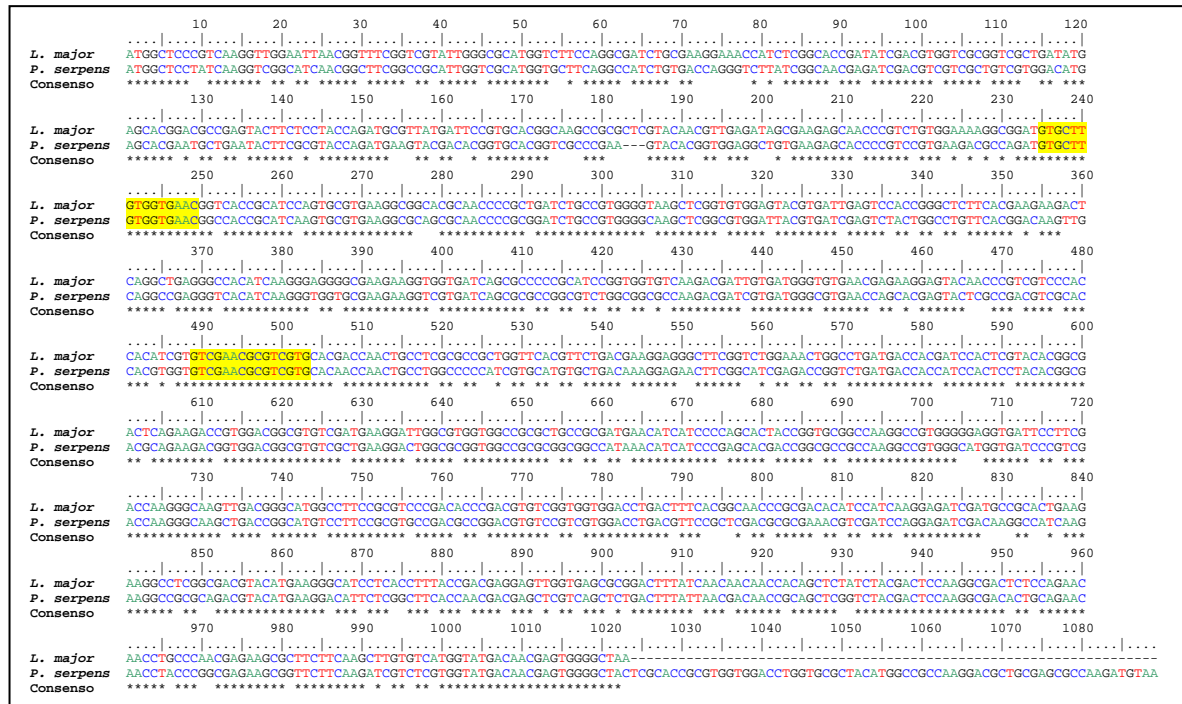
Nota: Os resultados descritos a seguir não constam do Anexo B.

Variações na concentração de Trp no meio de cultura de *A. brasilense* e *E. cloacae* são responsáveis pelo aumento no nível dos transcritos relacionados com a biossíntese do fitormônio e, conseqüentemente, na concentração final de AIA (Ona

et al., 2005; Ryu e Patten, 2008). Embora em tripanossomatídeos a transcrição seja policistrônica e a regulação da expressão gênica ocorra por processos pós-transcricionais (Clayton e Shapira, 2007), decidimos investigar por *Slot blot* se haveria alguma alteração na abundância de transcritos da IPDC/PDC em preparações de RNA de *P. serpens* e *L. major* cultivadas em meios com diferentes concentrações de Trp e Glc.

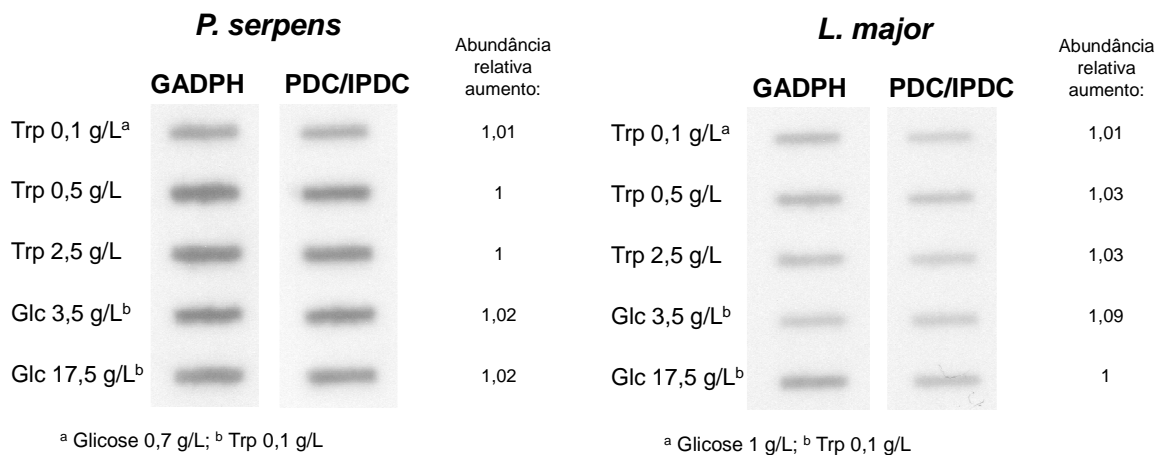
Após a transferência para membranas, as amostras de RNA foram hibridizadas com a sonda correspondente ao produto amplificado do gene *PDC/IPDC* (como descrito no item 3.5 de Material e Métodos) de *P. serpens* ou de *L. major*. Como controle, as membranas foram hibridizadas com sondas do gene com expressão constitutiva (*housekeeping gene*) *GAPDH* de *P. serpens* ou de *L. major*. A sonda foi desenhada com base em regiões em comum no alinhamento das sequências nucleotídicas (Figura 12) do gene *GAPDH* de *P. serpens* (Número de acesso no GenkBank EU084892) e de *L. major* (Número de acesso XM_001684852). A abundância relativa dos transcritos correspondentes a *PDC/IPDC* foi determinada a partir dos sinais de hibridização com as sondas (Figura 13) e os dados foram normalizados em relação ao sinal obtido para o gene *GAPDH* (Tabela 5). Concluímos não haver variação na abundância dos mRNAs de *PDC/IPDC* nos dois tripanossomatídeos, cultivados em diferentes concentrações de Trp ou Glc.

Figura 12 - Alinhamento de seqüências pelo Clustal W (versão 1.83): GAPDH de *P. serpens* (Número de acesso no GenBank EU084892) e de *L. major* (Número de acesso no GenBank XM_001684852).



A localização do par de oligonucleotídeos iniciadores GAPDPhy1 e GAPDPhy2 está destacada em amarelo.

Figura 13 - RNA isolado de *P. serpens* e *L. major* cultivadas em meios contendo diferentes concentrações de Triptofano (Trp) e Glicose (Glc) foi aplicado em membrana de náilon. A membrana foi hibridizada com sondas correspondentes aos genes *PDC/IPDC* e *GAPDH* de *P. serpens* ou *L. major*.



^a Glicose 0,7 g/L; ^b Trp 0,1 g/L

^a Glicose 1 g/L; ^b Trp 0,1 g/L

O sinal de hibridização foi determinado e normalizado com os dados da hibridização da sonda de GAPDH. À direita de cada painel indica-se a abundância relativa dos transcritos de *PDC/IPDC* (ver Tabela 5).

FONTE: lenne (2012).

Tabela 5 - Análise densitométrica dos sinais de hibridização obtidos nos experimentos de *Slot blot* para avaliação da abundância de transcritos do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* e *L. major* em diferentes condições de cultivo.

Organismo	Sonda	Meio de cultura	Sinal de hibridização (unidade arbitrária)	Sinal de hibridização após Normalização ^(c)	Abundância relativa dos transcritos ^(d)
<i>P. serpens</i>	<i>GAPDH</i>	Controle ^(a)	164 (1)		
		+ Trp 0,5 g/L	189 (1,15)		
		+ Trp 2,5 g/L	187 (1,14)		
		+ Glc 3,5 g/L	184 (1,12)		
		+ Glc 17,5 g/L	177 (1,07)		
<i>P. serpens</i>	<i>PDC/IPDC</i>	Controle ^(a)	157	157	1,01
		+ Trp 0,5 g/L	179	155	1
		+ Trp 2,5 g/L	178	156	1
		+ Glc 3,5 g/L	178	159	1,02
		+ Glc 17,5 g/L	170	159	1,02
<i>L. major</i>	<i>GAPDH</i>	Controle ^(b)	152 (1,04)		
		+ Trp 0,5 g/L	156 (1,06)		
		+ Trp 2,5 g/L	151 (1,03)		
		+ Glc 3,5 g/L	146 (1)		
		+ Glc 17,5 g/L	166 (1,13)		
<i>L. major</i>	<i>PDC/IPDC</i>	Controle ^(b)	141	135	1,01
		+ Trp 0,5 g/L	147	138	1,03
		+ Trp 2,5 g/L	142	138	1,03
		+ Glc 3,5 g/L	145	145	1,09
		+ Glc 17,5 g/L	151	133	1

^a Concentrações de triptofano (Trp) e glicose (Glc) no meio Grace, respectivamente, 0,1 g/L e 0,7 g/L.

^b Concentrações de triptofano e glicose no meio 199, respectivamente, 0,1 g/L e 1,0 g/L.

^c O sinal de hibridização com a sonda do *housekeeping gene GAPDH* foi utilizado para corrigir as diferenças nas quantidades de RNA aplicadas à membrana. Com estes valores, foi corrigido o sinal de hibridização com a sonda do gene *PDC/IPDC*.

^d A abundância relativa dos transcritos foi calculada a partir da razão de hibridização do ponto experimental com a sonda de menor sinal de hibridização (valor arbitrário = 1).

4.4.6 Bioensaio da funcionalidade de AIA produzido *in vitro*

Nota: Resumo de dados apresentados no Anexo B.

A funcionalidade do AIA detectado no meio Grace condicionado por *P. serpens* foi avaliada no alongamento de hipocótilos de tomateiros Micro-Tom. Este ensaio apresenta a vantagem de ser simples e rápido, com resultados visíveis e quantificáveis. Os segmentos de hipocótilos foram mensurados antes e após 24 horas de incubação à temperatura ambiente com meio Grace (controle) ou condicionado por *P. serpens* (Tabela 2 - Anexo B) (Ienne et al., 2012⁵, em fase de

⁵ Ienne et al., 2012.

elaboração). O meio condicionado promoveu cerca de 15% de aumento no comprimento dos hipocótilos ($t = 8,88$; t crítico = 2,09302; Tabela 6) quando comparado com o controle (apenas 0,9% de aumento) (não significativa; $t = 2,03$; Tabela 6). Além disso, o meio condicionado promoveu a curvatura dos hipocótilos, uma resposta típica ao fitormônio AIA (Kelly e Bradford, 1986) (Figura 3A e B - Anexo B). Por sua vez, o controle positivo, representado por incubação com meio Grace suplementado com AIA exógeno 9 μM também promoveu o incremento de cerca de 10% no alongamento dos hipocótilos ($t = 6,37$; Tabela 6), acompanhado da curvatura em resposta ao fitormônio (Figura 3C - Anexo B). Estes dados confirmam a funcionalidade do fitormônio produzido por *P. serpens* (Ienne et al., 2012⁶, em fase de elaboração).

Tabela 6 - Teste t pareado com um intervalo de confiança de 95%, com 19 graus de liberdade ($t_c = 2,86094$), aplicado aos resultados da incubação de hipocótilos de tomateiros Micro-Tom em meios de cultura condicionados ou não pela presença de *P. serpens*, *L. major* ou AIA exógeno.

Meio de cultura	Estatística descritiva ^a				Teste t pareado	
	\bar{d}	s^2	s	s.e.m.	Valor de t	Conclusão ^b
GRACE	0,12	0,07	0,26	0,05	2,03	Não significativa
GRACE condicionado com <i>P. serpens</i>	1,82	0,84	0,92	0,21	8,88	Significante
GRACE + 9 μM AIA	1,19	0,70	0,84	0,19	6,37	Significante

^a \bar{d} = média da diferença observada em cada hipocótilo ($T_{24} - T_0$, sendo T_0 = antes da incubação; T_{24} = 24 horas após incubação).

s^2 = variância, calculada segundo Ryder e Robakiewicz, 1998.

s = *standard deviation* (desvio padrão da média).

s.e.m. = *standard error of the mean* (erro padrão da média).

^b Conclusão sobre a significância da diferença início-fim de cada experimento, com base no valor de t_c .

4.4.7 Produção de AIA em tomates infectados com *P. serpens*

Nota: Resumo de dados apresentados no Anexo B.

Os dados apresentados acima indicam que *P. serpens* produz AIA, que se acumula no meio de cultura, e que este fitormônio é funcional. Surgiu então a pergunta se *P. serpens* seria capaz de produzir AIA *in vivo*. Para responder esta questão, avaliamos a produção de AIA em tomates Micro-Tom (Figura 14)

⁶ Ienne et al., 2012.

inoculados com 10^7 células de *P. serpens* e mantidos nas plantas. Como controle, alternativamente, os frutos foram inoculados com 10^7 células de *T. cruzi*, PBS ou $1,34 \mu\text{g}$ ($7,8 \mu\text{M}$) de AIA exógeno. As plantas foram mantidas em estufa sob condições controladas por até 14 dias. Não houve alterações morfológicas visíveis nas plantas ou frutos observados ao longo deste período, assim como observado em outras variedades de tomate inoculadas com *P. serpens* (Jankevicius *et al.*, 1988; Jankevicius *et al.*, 1989; Camargo *et al.*, 1990). Por outro lado, Sánchez-Moreno *et al.* (1995) reportam ter encontrado protozoários em frutos de tomate e de anona com deformações e alteração da pigmentação no epicarpo (pontos amarelados) e que apresentavam tendência a cair antes do completo amadurecimento. Nos tomates infectados por nós, todos os frutos foram destacados e em nenhuma planta os frutos maduros caíram espontaneamente.

No 7º ou 14º dia pós inoculação (p.i.), os frutos foram colhidos, pesados e a polpa (pericarpo sem epicarpo) foi extraída e a presença dos tripanossomatídeos foi monitorada (Tabela 7). Nos tomates inoculados com *P. serpens* verificamos flagelados numerosos e ativos. Isto não ocorre nos frutos inoculados com *T. cruzi* onde os parasitas são pouco abundantes e com baixa motilidade.

Figura 14 - Tomateiros *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom utilizados nos experimentos.



A barra branca representa 10 cm.
 FONTE: lenne (2012).

Tabela 7 - Características dos tomates *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom utilizados nos experimentos para monitorar a produção de AIA *in vivo*.

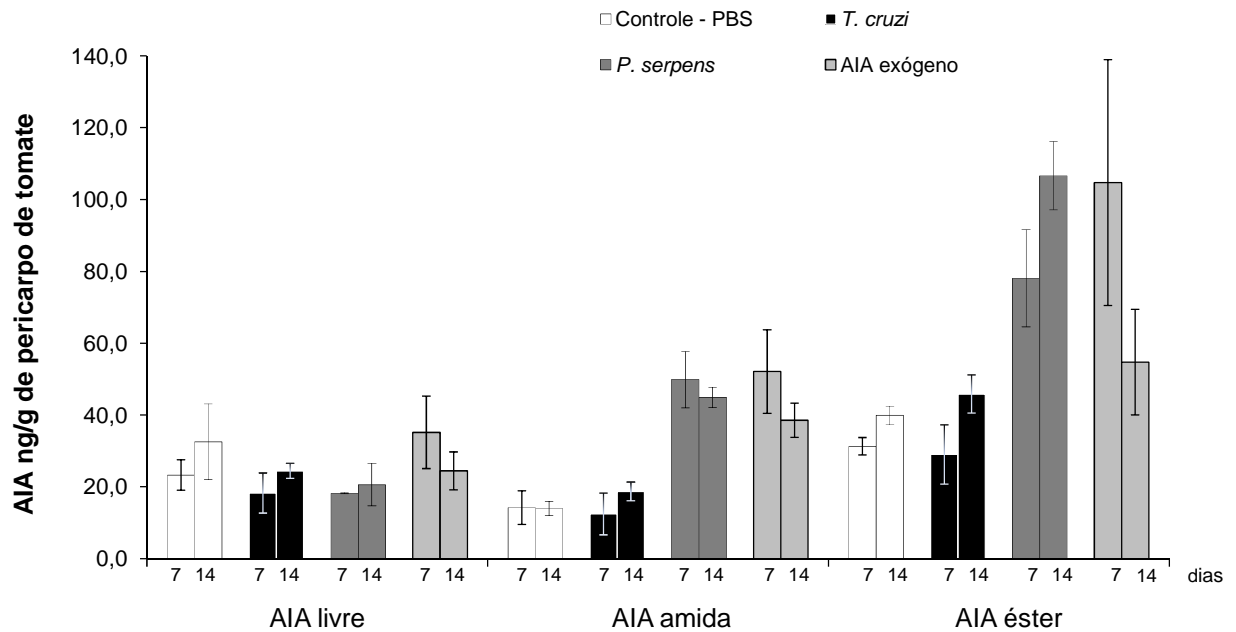
Inoculação	Dias pós-infecção	Número do tomate	Peso do fruto (g)	Peso da polpa extraída (g)	Contagem de tripanossomatídeos (células/g de polpa)
Controle PBS 20 µL	7	5	6,069	1,93	-
		6	4,58	1,78	-
		8	4,015	2,08	-
	14	4	3,728	1,33	-
		6'	5,023	1,754	-
		7	4,283	1,694	-
<i>P. serpens</i> 10 ⁷ células em 20 µL de PBS	7	3	4,613	1,851	3,8 x 10 ⁶
		4	3,816	1,379	3,4 x 10 ⁶
		7	5,553	2,125	2,8 x 10 ⁶
	14	2	4,501	1,917	1,8 x 10 ⁶
		3'	5,397	2,328	2 x 10 ⁶
		5	5,539	2,055	0,6 x 10 ⁶
<i>T. cruzi</i> - CL Brenner 10 ⁷ células em 20 µL de PBS	7	2	3,552	0,995	0,4 x 10 ⁶
		4	5,876	2,488	0,6 x 10 ⁶
		6	4,291	1,23	0,2 x 10 ⁶
	14	3	5,301	1,652	0
		5	4,348	1,913	0
		7	3,627	1,345	0,2 x 10 ⁶
AIA exógeno 1,34 µg em 20 µL de PBS	7	2	5,762	2,293	-
		7	4,548	1,452	-
		8	6,12	2,044	-
	14	1	4,142	1,789	-
		3	4,411	1,821	-
		5	4,096	1,506	-

O fitormônio AIA foi quantificado em todos os frutos, seja na sua forma livre, seja conjugado na forma AIA-amida e AIA-éster. Os resultados são apresentados na Tabela 3 - Anexo B. Para melhor visualização, na Figura 15 compilamos os resultados brutos obtidos. Os dados indicam não haver variação significativa na quantidade de AIA livre seja nos frutos controle inoculados com PBS, quanto nos frutos inoculados com *P. serpens*, *T. cruzi* ou AIA exógeno (Ienne et al., 2012⁷, em fase de elaboração). Por outro lado, as quantidades de AIA-amida e AIA-éster

⁷ Ienne et al., 2012.

aumentaram significativamente nos frutos inoculados com *P. serpens* e AIA exógeno, em comparação com o controle PBS e frutos inoculados com *T. cruzi* (ver análise estatística na Tabela 4 - Anexo B).

Figura 15 - Quantificação de AIA livre e conjugado (amida e éster) em tomates coletados no 7^o e 14^o dias após a injeção com PBS, 10⁷ células de *T. cruzi*, 10⁷ células de *P. serpens* ou 1,34 µg de AIA exógeno.



As barras indicam o desvio padrão com relação ao número amostral (dados brutos na Tabela 3 - Anexo B).

FONTE: lenne (2012).

A observação de que a inoculação com AIA exógeno e com *Phytomonas* causou um aumento na quantidade de AIA conjugado, sugere que o tripanossomatídeo esteja contribuindo com o *pool* do fitormônio nos frutos, e que o excesso de auxina seja convertido na forma de éster ou amida. Purgatto et al. (2002) observaram fenômeno análogo ao infiltrarem AIA em bananas em processo de amadurecimento. Nesta situação, o fruto respondeu conjugando o excesso de hormônio com açúcares e aminoácidos, possivelmente com vistas a evitar o comprometimento da viabilidade do fruto (Purgatto et al., 2002).

Em nossos ensaios verificamos que o teor de AIA-éster, aos 7 dias p.i., é maior nos frutos inoculados com AIA exógeno do que nos frutos infectados com *P. serpens*. O quadro se inverte aos 14 dias p.i., quando o teor de AIA-éster é maior nos frutos infectados com o fitoflagelado. Uma possível explicação para o fato seria

a de que AIA exógeno seria prontamente convertido em AIA conjugado, ao passo que, nos frutos infectados com *P. serpens*, a produção de AIA e sua conjugação seria dependente do tempo de infecção. Verificamos que a concentração de AIA-amida apresenta pequena variação com o tempo de inoculação, seja com AIA exógeno, seja com o flagelado.

A maior parte do AIA dos vegetais encontra-se conjugada a uma variedade de aminoácidos, peptídeos, açúcares e mio-inositol (Cohen e Bandurski, 1982; Normanly, 1997). Estes conjugados podem desempenhar diversas funções, estando envolvidos no transporte de AIA, armazenamento, proteção contra degradação, catabolismo e controle dos níveis do fitormônio (Cohen e Bandurski, 1982; Spaepen et al., 2007). De fato, uma vez conjugado, AIA pode ser catabolizado ou armazenado para subsequente hidrólise (Catalá et al., 1992; Normanly e Bartel, 1999). AIA-éster é a forma pela qual o AIA pode tanto ser mobilizado para a forma livre, como ser deslocado para a forma amida (Catalá et al., 1992). Por outro lado, AIA-amida também pode ser formado diretamente a partir do AIA livre (Cohen e Bandurski, 1982; Normanly, 1997). Acredita-se que a forma amida seja um precursor para a degradação do fitormônio (Böttcher et al., 2010), embora já tenha sido observado que esta forma pode gerar AIA livre (Normanly, 1997).

Tendo em vista que em frutos de tomate os níveis de AIA começam a cair ao longo do processo de maturação (Buta e Spauling, 1994; Böttcher et al., 2010), na infecção por *P. serpens* a conversão do AIA produzido por este organismo nas formas conjugadas seria uma resposta do hospedeiro no controle dos níveis de AIA livre, atuando, portanto, na homeostasia da relação parasita-hospedeiro.

4.5 Parâmetros cinéticos da atividade PDC/IPDC de *P. serpens*

Nota: Parte dos dados são apresentados no Anexo A e Anexo B.

*4.5.1 Caracterização de parâmetros cinéticos da atividade PDC/IPDC em lisados de *P. serpens**

Tendo observado o acúmulo de etanol e AIA em meios condicionados de *P. serpens*, levantamos a possibilidade de que a PDC/IPDC poderia ser uma enzima bifuncional que atuaria de acordo com a disponibilidade dos substratos, ou seja, na presença de excesso de glicose, a enzima atuaria como PDC, ao passo que em

presença de excesso de triptofano, atuaria como IPDC. Para investigar esta hipótese, inicialmente, determinar os parâmetros cinéticos da atividade PDC com o substrato piruvato, em ausência e presença de indolpiruvato (IPyA, substrato da IPDC) para verificar se este composto atuaria como inibidor competitivo.

A atividade PDC foi avaliada em extratos semi-purificados de *P. serpens*, em meio reacional contendo o substrato piruvato, álcool desidrogenase (ADH) de *S. cerevisiae* e NADH, em tampão contendo fosfato de potássio 10 mM, MgCl₂ 5 mM e TPP 0,1 mM. A adição de ADH e NADH teve por objetivo converter acetaldeído em etanol, com a consequente oxidação de NADH a NAD⁺ (Figura 1A - Anexo B). A velocidade da reação foi determinada a partir da medida da oxidação de NADH (decréscimo da absorbância a 340 nm). O efeito do IPyA na velocidade da reação também foi monitorado. Determinamos os valores de V_{max} e K_M da atividade PDC, após transformação de Lineweaver-Burk (Figura 5 - Anexo A e Figura 6 - Anexo B). A enzima apresentou comportamento Michaeliano típico, com um valor médio de K_M de 1,4 mM para o substrato piruvato (Ienne et al., 2012⁸, em fase de elaboração). A afinidade da enzima de *P. serpens* pelo substrato é semelhante à afinidade da PDC de *S. cerevisiae* para piruvato ($K_M = 1,3$ mM) e da IPDC de *E. cloacae* ($K_M = 2,5$ mM) (Koga et al., 1992).

Para verificar o efeito de IPyA na atividade PDC, diferentes concentrações deste composto foram adicionadas no ensaio (Tabela 8) e a velocidade da reação de PDC foi determinada a partir da oxidação de NADH (decréscimo da absorbância a 366 nm). Concluimos que este composto é um inibidor da atividade PDC no extrato de *P. serpens*. Em uma segunda abordagem, fixamos a concentração de IPyA em 1 e 2 mM (concentrações que promovem inibição de 26,4 e 31,5%, respectivamente; Tabela 8) e adicionamos concentrações crescentes do substrato piruvato. Nestas condições observamos, respectivamente, um aumento de 4 a 9 vezes no valor da K_M^{ap} para piruvato, sem alteração de V_{max} (Tabela 5 - Anexo B). Tal comportamento indica que IPyA é um inibidor competitivo da atividade PDC, diminuindo a afinidade da enzima pelo substrato piruvato, por se ligar ao sítio ativo da enzima, favorecendo a hipótese de que a PDC/IPDC seria uma enzima bifuncional (Ienne et al., 2012⁹, em fase de elaboração).

⁸ lenne et al., 2012.

⁹ lenne et al., 2012.

Tabela 8 - Decréscimo da Velocidade inicial (V_o) da reação promovida pela atividade PDC em função da concentração de indolpiruvato adicionado ao meio reacional, pelo ensaio acoplado com ADH usando 100 μg do sobrenadante de células de *P. serpens* sonicadas e centrifugadas a 16.000 g^a .

Concentração de indolpiruvato (mM)	V_o ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	% inibição em relação ao controle
0	113,4	--
0,1	99,6	12,1
1	83,4	26,4
2	77,6	31,5
2,5	39,2	65,4
3	16,9	85,1

Segundo alguns autores (Weiss et al., 1988; Schütz et al., 2003a, 2005; Spaepen et al., 2007) a atividade IPDC pode ser monitorada num ensaio simples, similar àquele utilizado para medir a atividade PDC, substituindo-se a ADH de *S. cerevisiae* por uma álcool desidrogenase de fígado de cavalo (ADH *Horse Liver*; ADH HL). Esta enzima possuiria alta afinidade por substratos cíclicos, como por exemplo o indol acetaldeído (IAAId). Desta forma, nos propusemos a utilizar este ensaio. Lamentavelmente, no início dos estudos, verificamos que a ADH HL, comercializada pela empresa Sigma-Aldrich, não estava mais disponível comercialmente. Em 2010 a enzima voltou a ser produzida pela mesma companhia, na forma recombinante. Adquirimos a enzima e avaliamos a atividade IPDC conforme protocolo adaptado de Schütz et al. (2003a) e Spaepen et al. (2007). Nossos dados indicam que a ADH HL recombinante está contaminada com algum composto, uma vez que verificamos o consumo de NADH na ausência do substrato indolpiruvato. A enzima recombinante foi submetida a cromatografia em Sephadex G-25 na tentativa de eliminar o(s) contaminante(s). A enzima foi recuperada, mas não mostrou nenhuma atividade. Desta forma, a ADH HL não pôde ser utilizada nos ensaios.

Decidimos então monitorar a atividade IPDC nos extratos de *P. serpens* analisando os produtos da reação: indol-3-acetaldeído e AIA por HPLC, conforme

metodologia descrita por Koga et al. (1992). Fica claro que os testes são muito trabalhosos e demorados e que poucos pontos experimentais podem ser analisados.

O meio reacional consistiu de tampão fosfato de potássio 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, TPP 0,1 mM, indolpiruvato (IPyA) 0,5 mM e extrato semi-purificado de *P. serpens* (80 e 160 μg de proteína). Os produtos foram quantificados conforme descrito no item 3.6.2 de Material e Métodos.

Inicialmente analisamos o consumo do substrato IPyA e a formação de indol-3-acetaldeído (IAAId) e AIA catalisada por duas quantidades de extrato de *P. serpens* (80 e 160 μg de proteína), a 25 °C por 15 minutos (Tabela 9). Não foi detectado Tol nas reações enzimáticas.

Tabela 9 - Avaliação da atividade IPDC em extrato semi-purificado de *P. serpens*. Compostos detectados ao final da reação^a. Compostos quantificados por HPLC.

Extrato	$\mu g/mL$			mmol ($\times 10^{-5}$) /min		
	IPyA ^b	IAAId ^c	AIA ^c	IPyA ^b	IAAId ^c	AIA ^c
Não adicionado (controle)	69,8	Zero	Zero	2,29	Zero	Zero
Adicionado (80 μg)	34,3	17,6	15,4	1,13	0,45	0,59
Adicionado (160 μg)	29,8	23,6	21,5	0,98	0,60	0,82
Aquecido a 100 °C por 5 min. e adicionado (80 μg)	67,7	Zero	Zero	2,22	Zero	Zero

^a 15 min. a 25 °C.

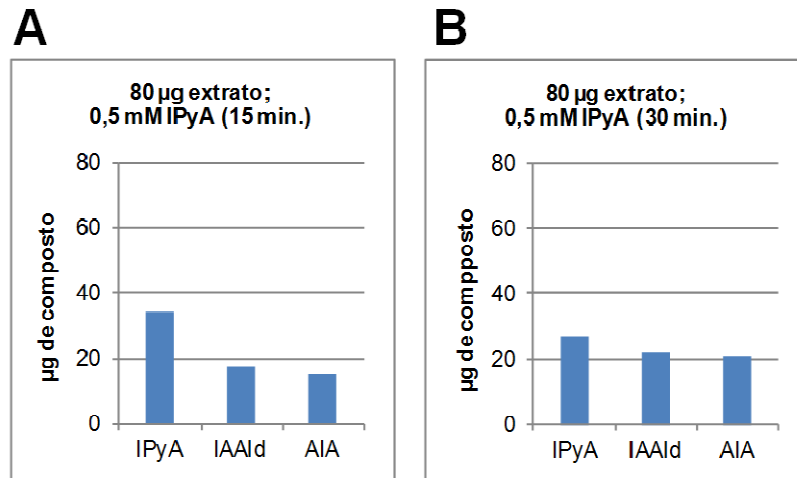
^b Substrato da reação

^c Produtos da reação

Os dados indicam que o extrato de *P. serpens* promove o consumo do substrato IPyA e a formação dos produtos IAAId e AIA, e que as quantidades dos produtos formados aumentam com a quantidade de extrato adicionado. Na ausência de substrato a reação não ocorre (dados não mostrados). A inativação do extrato por aquecimento abole o consumo do substrato e formação dos produtos.

Também verificamos que o aumento do tempo de incubação de 15 para 30 minutos aumenta a formação dos produtos IAAId e AIA, com consumo do substrato IPyA (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação da atividade IPDC em extratos semi-purificados de *P. serpens* (80 μg).



Quantificação dos produtos formados por HPLC. Valores em $\mu\text{g}/\text{mL}$. A reação foi desenvolvida a $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 15min (painel A) e 30 min (painel B).
 FONTE: lenne (2012).

O conjunto de dados indica haver atividade IPDC no extrato de *P. serpens*, uma vez que o substrato IPyA é transformado no produto indol-3-acetaldeído. Além disto, os dados indicam que no extrato também está contida a enzima que transforma indol-3-acetaldeído em AIA (em bactérias esta enzima é uma indolacetaldeído oxidase; Koga et al., 1991a).

Dada a complexidade dos ensaios, não foi possível determinar o K_M da IPDC para o substrato indolpiruvato. Futuramente, pretendemos verificar se a adição de piruvato, substrato da PDC, inibe a formação dos produtos da IPDC. Estes dados serão incluídos no manuscrito em preparação apresentado no Anexo B (lennen et al., 2012). Se os resultados esperados ocorrerem, acoplados aos dados da atividade PDC (vide acima), haverá suporte para a hipótese de que a PDC/IPDC seja uma enzima bifuncional.

Com os dados disponíveis, comparamos a atividade PDC e IPDC presente em 100 μg de extrato de *P. serpens*. Para a atividade PDC (monitorada por espectrofotometria), a velocidade inicial da reação é de 113,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Tabela 8), ao passo que, para a atividade IPDC (quantificada por HPLC) obtivemos uma velocidade inicial para a formação de IAAld e AIA de 0,0056 e 0,0073 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente (Tabela 9). Embora este cálculo seja questionável, os dados sugerem que a atividade PDC seja bem mais proeminente que a atividade IPDC.

4.5.2 Algumas características estruturais do sítio ativo da PDC/IPDC de *P. serpens*

Nota: esta análise não foi publicada.

Schütz et al. (2003b) mostraram haver diferenças estruturais no sítio ativo das PDCs de *Zymomonas mobilis* e *S. cerevisiae* e IPDCs de *E. cloacae* e *P. agglomerans*. Segundo esses autores, na cavidade do sítio ativo das PDCs, onde se liga o substrato, ocorrem resíduos de aminoácidos com cadeias laterais (grupo R) volumosos. Isto não se verifica nas cavidades das IPDCs, onde os grupos R são menores. Este aspecto determina que a cavidade das IPDCs seja maior que a das PDCs, condizente com o fato de que as IPDCs ligam indolpiruvato, um substrato maior que piruvato, substrato das PDCs. Tomando por base a sequência primária da IPDC de *E. cloacae*, os resíduos em questão ocupariam as posições 290, 387 e 542. Schütz et al. (2003b) propõem que alterações nesses três resíduos promoveriam uma mudança na especificidade pelo substrato.

Desta forma, passamos a analisar a natureza dos aminoácidos correspondentes presentes na enzima de *P. serpens*. Na Tabela 10 descrevemos os resíduos encontrados nas posições 290, 387 e 542 das IPDCs de *E. cloacae* e *P. agglomerans* e nas PDCs de *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*. Observa-se que na posição 290 das IPDCs ocorre uma treonina (grupo R pequeno), ao passo que, nesta posição, nas PDCs de *S. cerevisiae* verifica-se uma fenilalanina (grupo R volumoso) e na enzima de *Z. mobilis* uma tirosina (grupo R volumoso).

Para a análise da natureza dos aminoácidos presentes nas posições mencionadas, na enzima de *P. serpens*, e tendo em vista haver no mínimo 6 cópias do gene *PDC/IPDC* neste organismo (ver Anexo A), que poderiam não ser idênticas, amplificamos o gene com os oligonucleotídeos IPDCexpF e IPDCexpR, clonamos o produto no sistema pGEM T-*Easy* e os plasmídeos foram transformados em *E. coli* DH5 α . Colônias isoladas foram cultivadas em meio líquido LB-Ampicilina e os plasmídeos foram purificados por lise alcalina e sequenciamos 9 clones (item 3.7.2 de Material e Métodos). O gene clonado no vetor de expressão pET28(a+) (descrito no item 3.7.3 de Material e Métodos) também foi sequenciado (denominado na Tabela 11 e Figura 17 “clone 4_pET”). A sequência proteica dos 10 clones foi alinhada com as sequências das PDCs e IPDCs selecionadas com o programa CLUSTAL W e submetidas a checagem manual no programa BIOEDIT, e é

mostrada na Figura 17. Observamos que em todos os clones, na posição 290 há uma fenilalanina como verificado para a enzima de *S. cerevisiae* (Tabela 11).

Nas posições 387 e 542 de todas as sequências traduzidas dos clones de *PDC/IPDC* de *P. serpens* encontramos resíduos de aminoácidos com R pequenos, como observado para as IPDCs das fitobactérias (Tabela 10). Por outro lado, nas PDCs de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* os grupos R dos resíduos 387 e 542 são volumosos (Tabela 10). Desta forma, a cavidade da PDC/IPDC de *P. serpens* teria um aminoácido com grupo R volumoso, na posição 290, e aminoácidos com R pequenos nas posições 387 e 542, apresentando, portanto, uma estrutura que difere da estrutura “canônica” das PDCs e IPDCs proposta por Schütz et al. (2003b). Este fato sugere que a enzima de *P. serpens* possa atuar sobre diferentes substratos. Esta hipótese merecerá estudos posteriores.

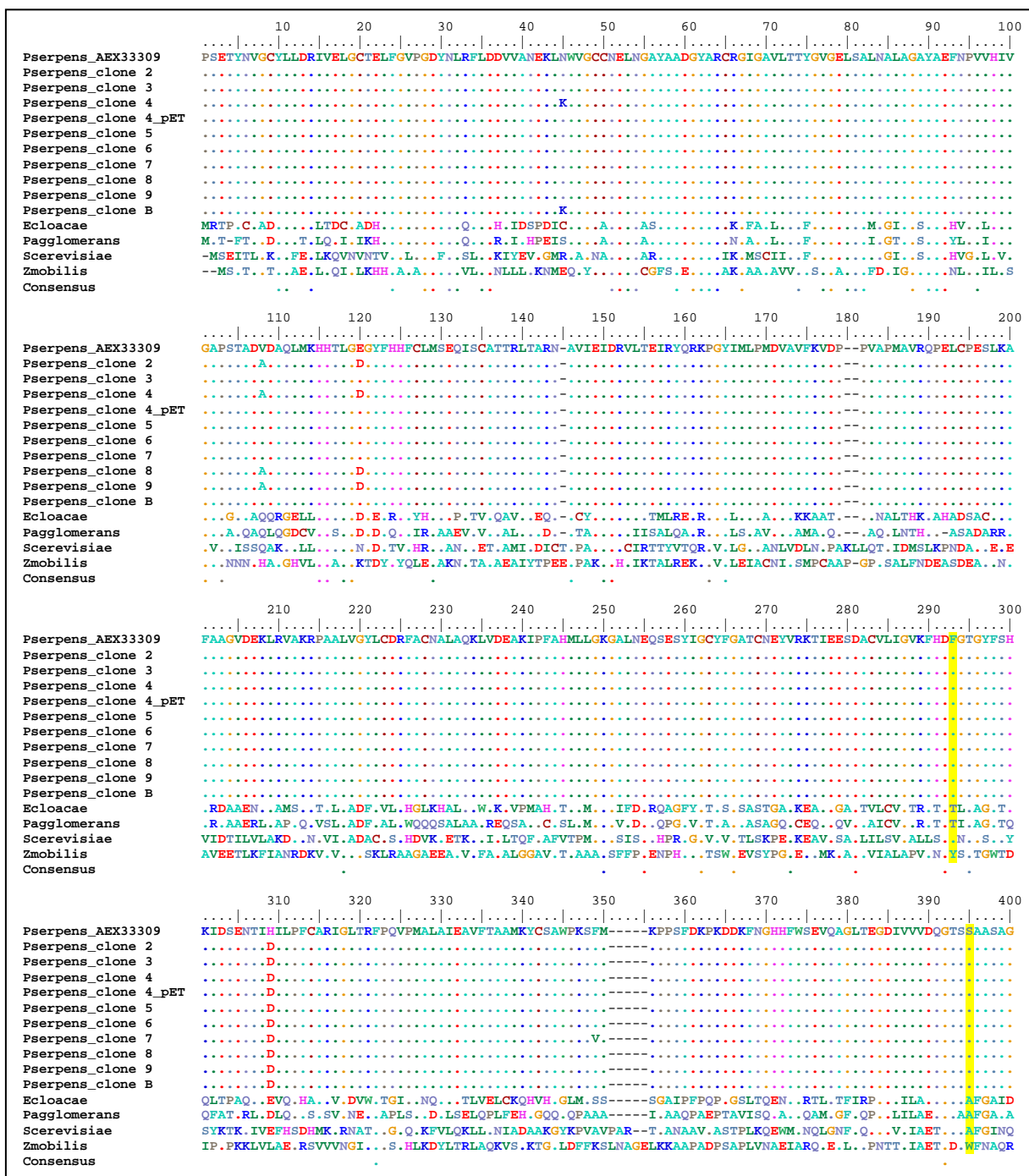
Uma análise comparativa entre as sequências traduzidas dos clones do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* indica que o gene é bastante conservado (Figura 17). Encontramos ao todo sete variantes do gene, diferindo em oito posições (Tabela 11), indicando a presença de um número maior de cópias do que sugeriam os resultados descritos no item 4.1.2 (pelo menos seis cópias contíguas observadas por *Southern blot* e três cópias por sequenciamento da região intergênica), complementando a análise do número de cópias previstos para o gene. Nenhuma variação de aminoácidos ocorre nas posições correspondentes ao sítio ativo das PDCs e IPDCs, descritas acima. Desta forma, as alterações de aminoácidos dos clones não promoveriam uma mudança na especificidade da enzima de *P. serpens* pelo substrato.

Tabela 10 - Diferenças estruturais na cavidade do sítio ativo de PDCs e IPDCs.

Espécie	Enzima	GenBank	Posição do aminoácido ^a		
			290	387	542
<i>E. cloacae</i>	IPDC	P23234	Treonina	Alanina	Leucina
<i>P. agglomerans</i>	IPDC	AAB06571	Treonina	Alanina	Valina
<i>S. cerevisiae</i> PDC1	PDC	CAA54522	Fenilalanina	Alanina	Glutamina
<i>Z. mobilis</i>	PDC	CAA42157	Tirosina	Triptofano	Triptofano
<i>P. serpens</i>	PDC/IPDC	AEX33309	Fenilalanina	Serina	Valina

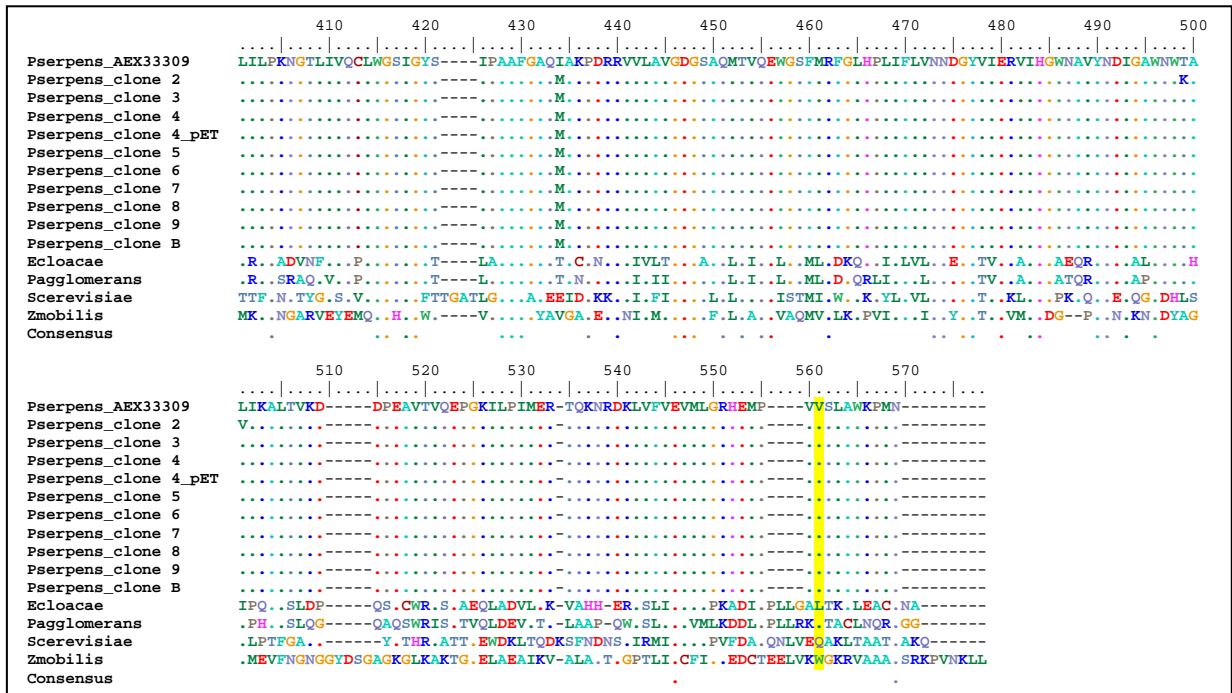
^a com base sequência proteica primária da IPDC de *E. cloacae*.

Figura 17 - Alinhamento de seqüências pelo Clustal W (versão 1.83): putativa PDC/IPDC de *P. serpens* (GenBank AEX33309), clones sequenciados do gene de *P. serpens*, IPDC de *E. cloacae* (GenBank P23234), PDC1 de *S. cerevisiae* (GenBank CAA54522) e PDC de *Z. mobilis* (GenBank CAA42157).



continua

conclusão Figura 17



Os pontos indicam correspondência de aminoácidos em todas as sequências. A numeração corresponde à primeira sequência de *P. serpens*. As posições 290, 387 e 542 baseadas na sequência proteica primária da IPDC de *E. cloacae* estão destacadas em amarelo.

Tabela 11 - Diferenças entre os clones do gene PDC/IPDC de *P. serpens*. As sequências nucleotídicas foram traduzidas segundo o código genético padrão e alinhadas com o programa CLUSTAL W e submetidas a checagem manual no programa BIOEDIT.

Sequência PDC/IPDC de <i>P. serpens</i> depositada	Posição do aminoácido ^a							
	45	108	120	309	349	434	499	501
	N	V	E	H	F	I	T	L
clone 2	.	A	D	D	.	M	K	V
clone 3	.	.	.	D	.	M	.	.
clone 4	K	A	D	D	.	M	.	.
clone 4_pET	.	.	.	D	.	M	.	.
clone 5	.	.	.	D	.	M	.	.
clone 6	.	.	.	D	.	M	.	.
clone 7	.	.	.	D	V	M	.	.
clone 8	.	A	D	D	.	M	.	.
clone 9	.	A	D	D	.	M	.	.
clone B	K	.	.	D	.	M	.	.

^a com base no alinhamento apresentado na Figura 17. Os pontos indicam aminoácidos idênticos à sequência de PDC/IPDC depositada (GenBank AEX33309).

4.5.3 Clonagem do gene PDC/IPDC de *P. serpens* em sistema de expressão

Nota: estes dados não foram publicados.

Para uma conclusão definitiva sobre a bifuncionalidade da enzima PDC/IPDC de *P. serpens*, os ensaios de atividade enzimática deveriam ser conduzidos com a enzima recombinante.

Desta forma, o gene de *P. serpens* foi clonado em diferentes vetores e sistemas bacterianos e a forma com a qual a proteína recombinante é expressa é resumida abaixo :

- pQE-30Xa (Qiagen). A proteína recombinante (≈ 62 kDa) foi expressa na bactéria *E. coli* XL-1 Blue MRF' como corpos de inclusão tanto a 37 °C quanto a 15 °C, após a indução com IPTG 0,1, 0,3 e 1 mM.
- pMAL-c4X (New England Biolabs). A proteína recombinante (≈ 99 kDa) foi expressa em *E. coli* XL-1 Blue MRF' e *E. coli* Origami 2 como corpos de inclusão a 37 °C e 25 °C, após a indução com IPTG 0,3 mM.
- pET28(a+) (Novagen). A proteína recombinante (≈ 64 kDa) foi expressa em *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS e BL21(DE3)-codon plus como corpos de inclusão a 28 °C, após a indução com IPTG 0,2 mM.

No total, foram feitas nove tentativas para produzir a proteína recombinante na forma solúvel. Em todos os casos a proteína foi obtida sob forma de corpos de inclusão, o que impede sua purificação a fim de realizar estudos cinéticos. Nossa suposição é que a formação de corpos de inclusão é favorecida pela presença de 16 resíduos de cisteína na proteína PDC/IPDC (Figura 18).

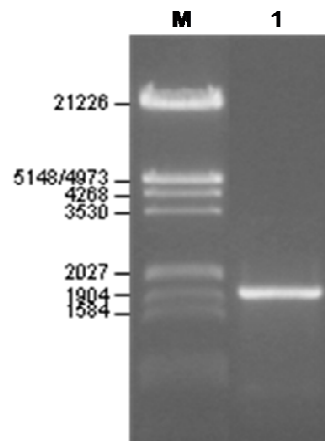
Figura 18 - Sequência proteica traduzida (548 aminoácidos) codificada pelo gene PDC/IPDC de *P. serpens*.

```
>PDC/IPDC sequência proteica
MPSETYNVGCYLLDRIVELGCTELFGVPGDYNLRFLLDDVVANEKLNWVGCNENLNGAYAADGYARCRGIGAVLT
TYGVGELSALNALAGAYAEFNPVVHIVGAPSTADVDAQLMKHHTLGEGYFHHFCMLMSEQISCATTRLTARNAVI
EIDRVLTEIRYQRKPGYIMLPMDVAVFKVDPPVAPMAVRQPELCPESLKAFAGAAGVDEKLRVAKRPAALVGYLCD
RFACNALAQKLVDEAKIPFAHMLLGKALNEQSESYIGCYFGATCNEYVRKTIEESDA CVLIGVKFHDFGTGYF
SHKIDSENTIHILPFCARIGLTRFPQVPMALAI EAVFTAAMKYCSAWPKSFMKPPSFDKPKDDKFNHGHFWSEV
QAGLTEGDIVVVDQGTSSAASAGLILPKNGTLIVQCLWGSIGYSIPAAFGAQIAKPD RRVVLA VGDGSAQMTVQ
EWGSFMRFLHPLIFLVNNDGYVI ERVIHGWNNAVYNDIGAWNWTALIKALTVKDDPEAVTVQEPGKILPIMERT
QKNRDKLVFVEVMLGRHEMPVVS LAWKPMN-
```

Os resíduos de cisteína são indicados em vermelho.
FONTE: lenne (2012).

Apenas na décima tentativa conseguimos obter a proteína recombinante na forma solúvel. Neste caso o gene foi clonado em pET28(a+) e expresso em *E. coli* BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7. Esta cepa co-expressa as chaperonas groES e groEL sob indução do promotor bacteriano *araB*, ativado na presença de L-Arabinose no meio de cultura. Isto favorece o dobramento correto de proteínas recém-produzidas, evitando sua agregação em corpos de inclusão (Thomas et al., 1997). A seguir resumimos os processos de clonagem, produção da proteína recombinante e atividade enzimática.

Figura 19 - Produto de amplificação com os oligonucleotídeos IPDCexpF e IPDCexpR em *P. serpens* (1). Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.



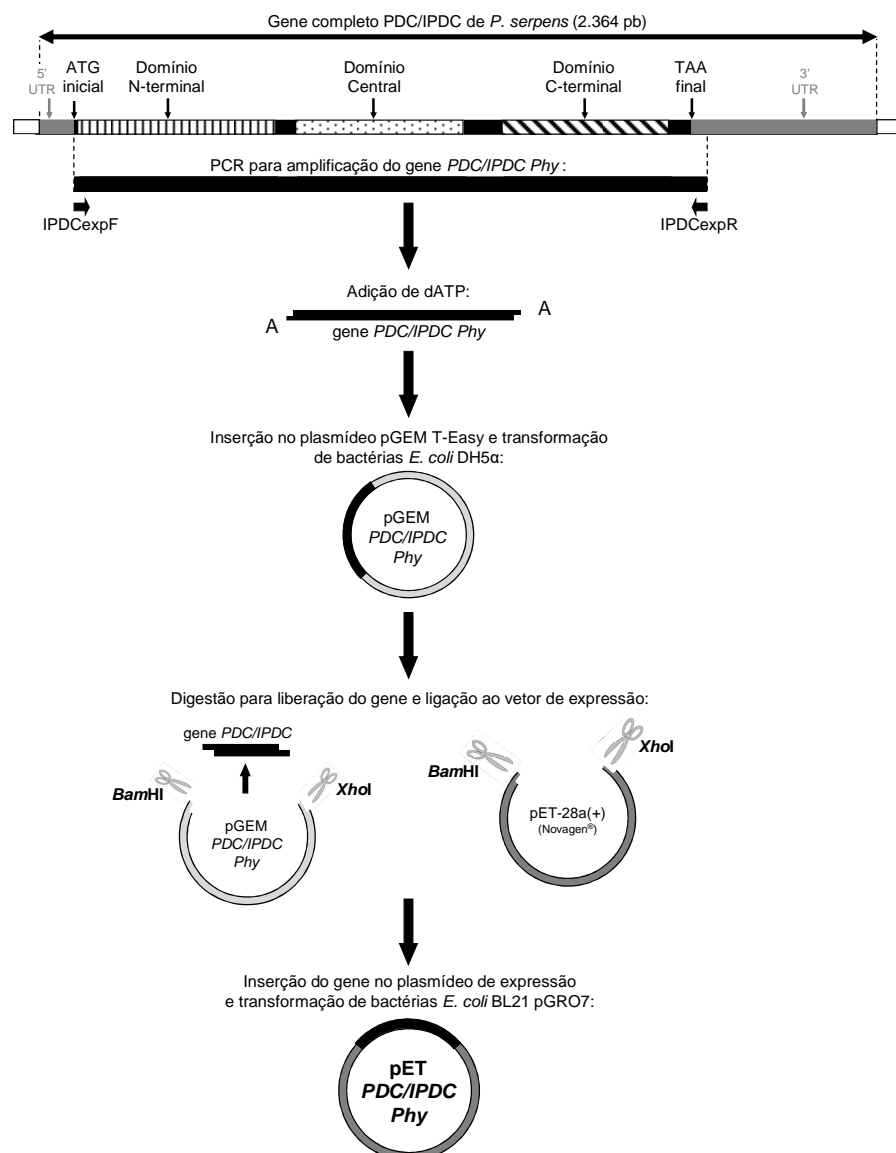
O marcador de tamanho molecular (DNA de fago λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III) é indicado (M).

FONTE: lenne (2012).

A partir do gene completo *PDC/IPDC* de *P. serpens* (Número de acesso GenBank JN400885), a região codificante (ORF) compreendida entre o códon de iniciação (ATG) e o putativo códon de terminação (TAA) foi amplificada a partir do DNA genômico de *P. serpens* com os oligonucleotídeos IPDCexpF e IPDCexpR, que flanqueiam a ORF (Figura 19). As etapas de clonagem do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* estão esquematizadas na Figura 20. O produto de amplificação do gene *PDC/IPDC* foi purificado do gel de agarose, clonado com o sistema pGEM T-*Easy* (item 3.7.2 de Material e Métodos) e os plasmídeos foram transformados em *E. coli* DH5 α . Colônias isoladas foram cultivadas em meio líquido LB-Ampicilina e os plasmídeos foram purificados. Os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I, que não possuem sítio de restrição interno ao gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*, para linearizar o vetor. O gene liberado foi purificado

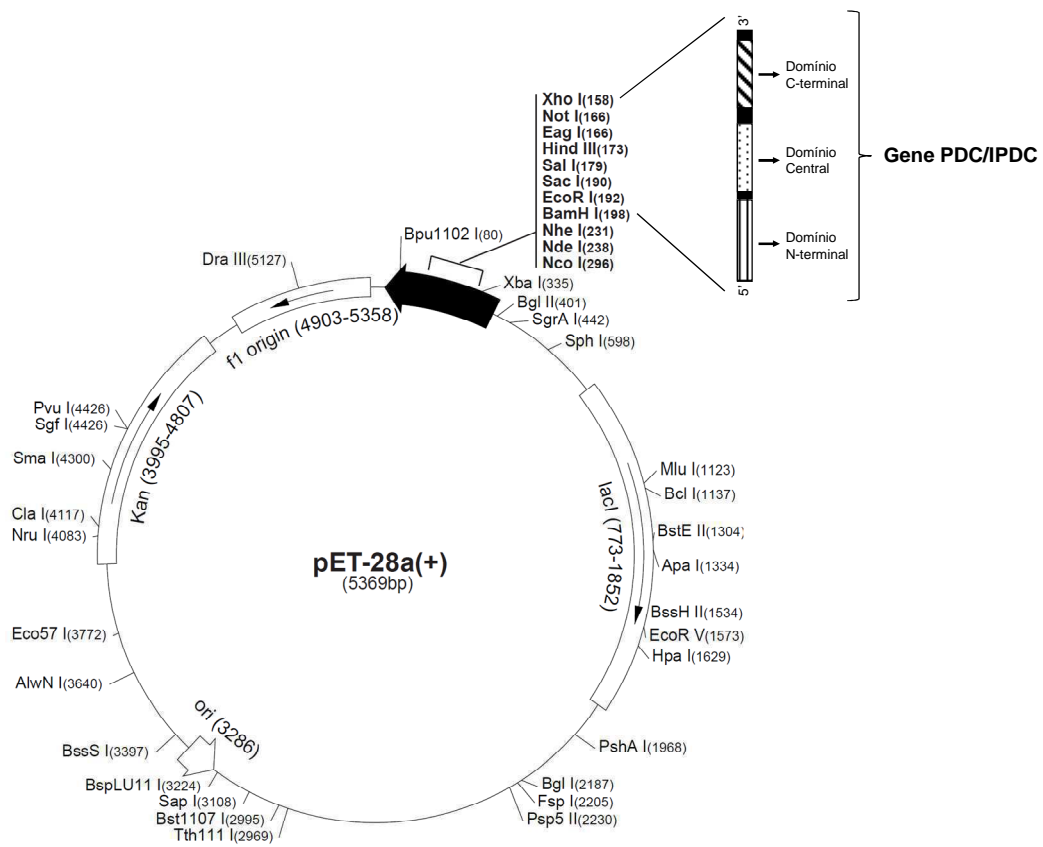
do gel de agarose e inserido no vetor de expressão pET28(a+) (item 3.7.3 de Material e Métodos), previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 21). O vetor escolhido originou uma construção com duas caudas de histidina, nas posições N- e C-terminal, dada a necessidade de combinação entre as possíveis enzimas de restrição do sítio múltiplo de clonagem no vetor e a ausência dos mesmos sítios de restrição internos ao gene de *P. serpens*. A cauda de histidina ligada à proteína de fusão simplificaria sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, cujo sistema é baseado na seletividade e afinidade da matriz níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), que possui afinidade por biomoléculas marcadas com seis resíduos consecutivos de histidina.

Figura 20 - Diagrama das etapas de clonagem do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*.



FONTE: lenne (2012).

Figura 21 - Mapa do plasmídeo pET-28a(+), destacando o local de inserção da região codificadora do gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*.



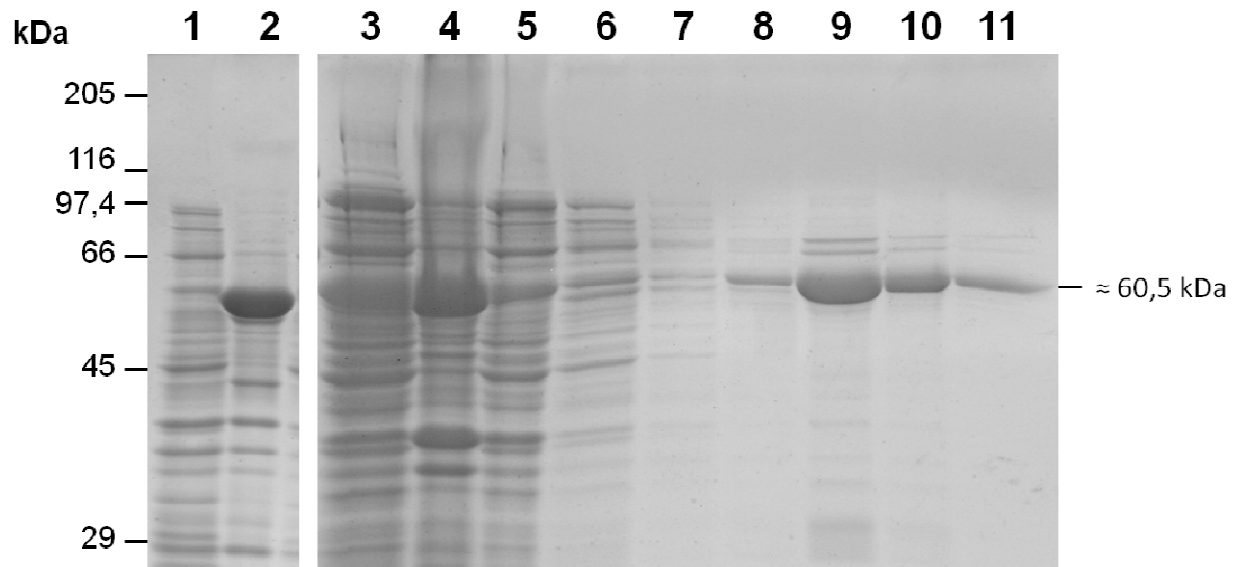
FONTE: Adaptado de: Novagen.

4.5.4 Obtenção e purificação da PDC/IPDC recombinante

Para investigar se a proteína era produzida na forma solúvel ou como corpos de inclusão, sedimentos de bactérias BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7 contendo o vetor pET28(a+) recombinante foram cultivadas após adição de IPTG 0,1 mM a 25 °C por 16 horas, conforme orientações dos fabricantes da bactéria (Takara) e vetor (Novagen) (Figura 22 - canaletas 1 e 2). As bactérias foram lisadas por tratamento com Lisozima (conforme orientações da fabricante, Qiagen) e submetidas à sonicação. O lisado celular foi centrifugado a 13.000 g e o perfil proteico do precipitado e sobrenadante foi analisado em SDS-PAGE (Figura 22 - canaletas 3 e 4). Observa-se que a banda correspondente à enzima recombinante, de tamanho aparente de 60,5 kDa, encontra-se no sobrenadante de 13.000 g, e aparentemente em menor proporção no sedimento de 13.000 g do lisado celular, sugerindo estar tanto na porção solúvel do extrato quanto sob forma de corpos de inclusão. A

purificação da fração solúvel foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de agarose carregada com níquel (Ni-NTA, Qiagen), e após as lavagens (Figura 22 - canaletas 5 a 7), a proteína foi eluída com tampão de eluição (Figura 22 - canaletas 8 a 11). A segunda e terceira fração da eluição (Figura 22 - canaletas 9 e 10) eram as mais abundantes em termos de quantidade de proteína. As frações foram unidas e quantificadas.

Figura 22 - Análise eletroforética de extratos de *E. coli* BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7 contendo o vetor de expressão pET28(a+) com o gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*.



Gel de poliacrilamida 10% corado com *Coomassie Brilliant Blue R*. O Padrão de tamanho molecular está indicado à esquerda. 1 – Cultura não-induzida; 2 – Cultura induzida por 16 horas com IPTG 0,1 mM a 25 °C; 3 – Sedimento de 13000 g obtido após 16 horas de indução; 4 – Sobrenadante de 13000 g obtido após 16 horas de indução; 5 – Fluxo escoado após passagem do sobrenadante na coluna carregada com níquel; 6 – Primeira fração coletada após a lavagem com tampão contendo imidazol 20 mM; 7 – Segunda fração coletada após a lavagem com tampão Imidazol 20 mM; 8 a 11 – Primeira à quarta fração (respectivamente) coletada após a eluição com tampão contendo imidazol 250 mM. FONTE: lenne (2012).

4.5.5 Caracterização de parâmetros cinéticos na *PDC/IPDC* recombinante

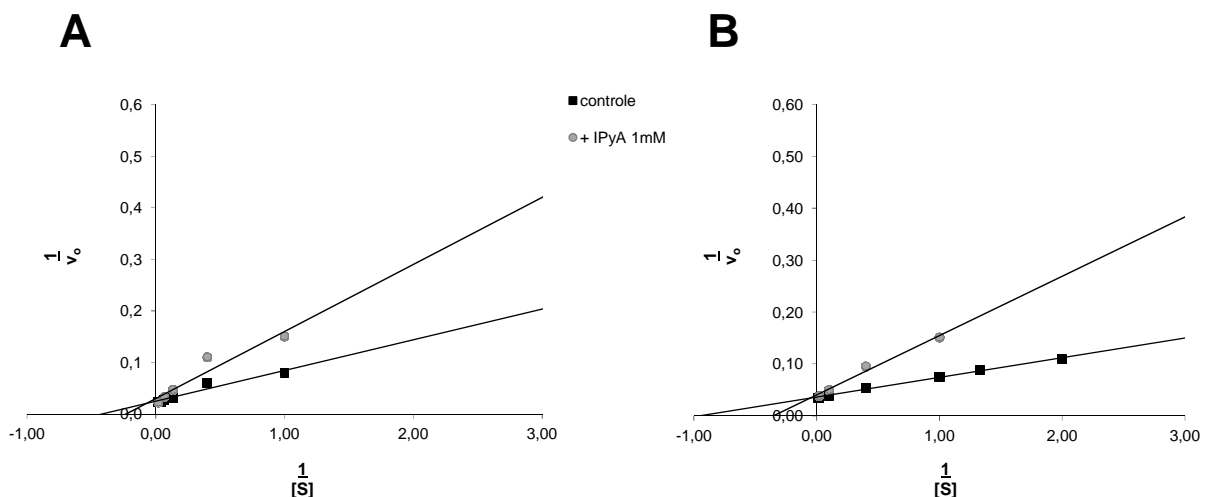
Nota: estes dados não foram publicados.

Para avaliar a atividade da proteína recombinante purificada, removemos a cauda de histidina N-terminal por tratamento com trombina e nova purificação em coluna de níquel. Este tratamento resultou na perda total de atividade *PDC* (dados não mostrados). Desta forma, os testes foram conduzidos com a proteína

recombinante com as duas caudas de histidina, N- e C-terminal. Verificamos que a enzima era instável, perdendo atividade após congelamento, e que sua atividade só poderia ser mensurada logo após sua purificação.

A atividade PDC foi determinada nas mesmas condições reacionais utilizadas para medir a atividade PDC nos extratos de *P. serpens* (item 4.5.1). Nos ensaios (réplicas biológicas) utilizamos 150 μg de proteína recombinante purificada (Figura 22 - canaletas 9 e 10), cujo pH do eluato foi previamente corrigido de 8,0 (tampão de eluição da proteína) para 6,5, favorecendo a tetramerização da enzima (Koga, 1995). A média do K_M para piruvato foi de 2,4 mM, próximo ao valor obtido para a atividade PDC presente no extrato de *P. serpens* (1,4 mM, ver item 4.5.1). O efeito de 1 mM indolpiruvato, substrato da IPDC, também foi avaliado (Figura 23), verificando-se que este composto atua como inibidor competitivo da atividade PDC, causando um aumento do K_M^{ap} para piruvato que passa a ser 3,6 mM, sem alteração na V_{max} .

Figura 23 - Transformação de Lineweaver-Burk para a atividade PDC da enzima recombinante de *P. serpens* em função da concentração do substrato (piruvato), na ausência e presença de indolpiruvato 1 mM (monitorada pelo decréscimo da absorbância a 366 nm).



Os gráficos representam dados de réplicas biológicas. V_0 foi determinada a partir da oxidação de NADH em função do tempo.

FONTE: lenne (2012).

Chama a atenção a elevada massa de proteína recombinante utilizada nos ensaios das medidas de atividade. Isto pode ser resultante de fatores não excludentes: apenas uma parte da proteína recombinante adquire sua conformação tetramérica funcional, como resultado (ou não) da presença de duas caudas de histidina; e/ou as duas caudas de histidina interferem na catálise.

Futuramente pretendemos avaliar a atividade IPDC da proteína recombinante, utilizando o substrato indolpiruvato, em presença e ausência de piruvato, para verificar se este composto compete com o substrato da IPDC. Os produtos da reação serão quantificados por HPLC. O conjunto de dados será incluído no manuscrito em preparação (Anexo B¹⁰).

4.5.6 Acúmulo de indol-3-acetaldeído no meio de cultura da bactéria recombinante

Nota: estes dados não foram publicados.

Como alternativa para verificar atividade IPDC na proteína recombinante, a bactéria *E. coli* BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7 contendo o gene *PDC/IPDC* clonado no plasmídeo pET28(a+) foi cultivada em meio LB. Após a cultura atingir $A_{600\text{ nm}}$ de 0,4 foi adicionado L-arabinose 0,5 mg/mL e após atingir $A_{600\text{ nm}}$ de 0,6 foi adicionado 0,1 mM IPTG para induzir a expressão da proteína recombinante. A cultura foi dividida em três alíquotas de 10 mL cada. Na primeira alíquota, Trp não foi adicionado, na segunda e terceira alíquotas adicionou-se, respectivamente, 0,5 g/L e 2,5 g/L de Trp. A presença de indol-3-acetaldeído (IAAId) no meio foi quantificada por HPLC, após cultivo a 25 °C por 16 horas (Tabela 12).

Tabela 12 - Acúmulo de IAAId, em meios de cultura condicionados pela presença de bactérias *E. coli* BL21(DE3)-*codon plus* pGRO7 contendo o plasmídeo pET28(a+) com o gene *PDC/IPDC* (ver texto). Resultados em microgramas por mL de cultura ($\mu\text{g/mL}$).

Condição experimental	IAAId
Meio LB	0
Meio LB + triptofano 0,5 g/L	5,48
Meio LB + triptofano 2,5 g/L	7,00

¹⁰ lenne et al., 2012.

Os dados indicam haver acúmulo de IAAld, produto da reação catalisada pela IPDC, de 5,5 e 7 vezes, respectivamente, nos meios contendo triptofano 0,5 e 2,5 g/L, em relação ao meio controle, onde este produto não foi detectado. Os dados seriam condizentes com a presença de uma atividade IPDC na bactéria recombinante. No meio de cultura condicionado pela presença de bactérias contendo vetores pET28(a+) vazios não foi detectada a presença deste metabólito. Supomos que alguma aminotransferase bacteriana deve ter atuado sobre Trp promovendo a formação de indolpiruvato, substrato da IPDC.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Caracterizamos a sequência completa do gene que codifica uma PDC/IPDC de *P. serpens* e verificamos que esta sequência é conservada em 14 isolados de *Phytomonas*. Em *P. serpens* este gene está presente em pelo menos seis cópias em tandem, separadas por uma região intergênica de 124 pb de sequência bastante conservada (apenas três variantes na região 3' UTR). O aumento do número de cópias gênicas determinaria um incremento de 5,7 vezes na abundância dos transcritos correspondentes. A amplificação do número de cópias e transcritos sugere que o gene *PDC/IPDC* desempenhe funções importantes no metabolismo do fitoflagelado e, possivelmente, em sua adaptação à planta hospedeira.

Verificamos que a proteína codificada pelo gene *PDC/IPDC* apresenta elevada similaridade com sequências proteicas de *Leishmania* spp., fitobactérias e fungos. Por outro lado, esta sequência não foi encontrada no genoma de *T. cruzi* ou *T. brucei*.

A análise filogenética indica que a proteína de *Phytomonas* é robustamente monofilética com as enzimas de *Leishmania* spp. e *C. fasciculata*. Este clado aparece como grupo-irmão de IPDCs de gama-proteobactérias. Isso apoia a proposição que um evento de transferência horizontal gênica a partir de uma fitobactéria doadora para um tripanossomatídeo ancestral tenha ocorrido antes da separação entre *Phytomonas*, *Leishmania* e *Crithidia*.

A partir de ensaios de PCR e *Southern blotting*, inferimos a presença de genes *PDC/IPDC* ortólogos putativos em alguns representantes dos gêneros *Herpetomonas*, *Crithidia* e *Leishmania*.

Investigamos a funcionalidade da PDC/IPDC. Detectamos a presença de etanol nos meios condicionados de *P. serpens*, cuja concentração aumenta com a adição de glicose ao meio. Isto apoia observações de outros grupos e a hipótese que a enzima seja uma piruvato descarboxilase (PDC) atuante na fermentação alcoólica.

Também detectamos AIA e seus precursores no meio condicionado de *P. serpens*, embora em níveis bem inferiores quando comparado com os de etanol. O acúmulo de AIA e seu intermediário Tol mostrou uma correlação direta com a adição de triptofano ao meio. Lembrando que triptofano é precursor da biossíntese do fitormônio AIA, os dados sugerem que a enzima de *P. serpens* também tenha atividade de IPDC.

A funcionalidade do AIA produzido por *P. serpens* foi investigada em bioensaios de alongamento de hipocótilos de tomate. Verificamos que o meio condicionado promoveu um alongamento de 15% dos hipocótilos e promoveu sua curvatura, efeito análogo ao observado quando AIA exógeno foi adicionado aos hipocótilos.

Para verificar se AIA seria produzido *in vivo*, tomates Micro-Tom foram inoculados com *P. serpens* e mantidos nas plantas. Como controle, alternativamente, os frutos foram inoculados com PBS, *T. cruzi*, ou AIA exógeno. A quantificação do fitormônio no pericarpo dos tomates ao longo do período de infecção (7 ou 14 dias) indica não haver variação significativa na quantidade de AIA livre tanto nos frutos inoculados com *P. serpens* quanto nos demais controles. Por outro lado, as quantidades de AIA-amida e AIA-éster aumentaram significativamente apenas nos frutos inoculados com *P. serpens* e AIA exógeno. Desta forma, os dados sugerem que o tripanossomatídeo esteja contribuindo com o *pool* do fitormônio nos frutos, e que o excesso de auxina seja convertido na forma de éster ou amida, para seu armazenamento ou degradação. Tendo em vista que em frutos de tomate os níveis de AIA começam a cair ao longo do processo de maturação, na infecção por *P. serpens* a conversão do AIA produzido por este organismo nas formas conjugadas seria uma resposta do hospedeiro no controle dos níveis de AIA livre, atuando, portanto, na homeostasia da relação parasita-hospedeiro.

Tomados em seu conjunto os dados indicam que a enzima de *P. serpens* tenha atividade PDC e IPDC.

Caracterizamos a atividade PDC em extratos de *P. serpens* e na enzima PDC/IPDC recombinante. Nos extratos a atividade enzimática exibe uma cinética clássica michaeliana com K_M para piruvato de 1,4 mM. Na enzima recombinante o K_M obtido foi de 2,4 mM. A afinidade pelo substrato é similar à afinidade para piruvato da PDC de *S. cerevisiae* e IPDC de *E. cloacae*. Indolpiruvato age como inibidor competitivo da atividade PDC, elevando o valor da K_M para 4,0 e 9,3 (extratos de *P. serpens*) quando da adição deste composto nas concentrações de 1 ou 2 mM, respectivamente, sem alteração da V_{max} . Para a enzima recombinante, também foi confirmada a atuação de indolpiruvato como inibidor competitivo da reação, elevando a K_M para 3,6 mM quando da adição deste composto na concentração de 1 mM.

Dados preliminares indicam haver atividade IPDC no extrato de *P. serpens*, com a formação dos produtos IAAId e AIA nos meios reacionais. A análise

comparativa das atividades PDC e IPDC nos extratos de *P. serpens* sugere que a atividade PDC seja cerca de 30.000 vezes maior que a atividade IPDC. Talvez isto explique por que não foi possível determinar, até o momento, atividade IPDC na enzima recombinante. Por outro lado, conseguimos detectar IAAld, produto da reação da IPDC, no meio de cultura da bactéria recombinante que expressa o gene *PDC/IPDC*. O acúmulo deste produto aumenta com a adição de triptofano ao meio de cultura.

Desta forma, concluímos que a PDC/IPDC seria uma 2-cetoácido descaboxilase, com atividade catalítica variável para diferentes substratos, como por exemplo piruvato e indolpiruvato. A atividade PDC parece ser predominante em *P. serpens*, permitindo sua sobrevivência no meio rico em carboidratos do hospedeiro vegetal. A aquisição de uma PDC, enzima chave no processo de fermentação alcoólica, conferiria ao flagelado uma rota alternativa e necessária para re-oxidação de parte do NADH produzido na via glicolítica.

A enzima PDC/IPDC poderia ainda atuar sobre o ácido indolpirúvico, produzido a partir do triptofano, gerando AIA como sub-produto. Nossos dados sugerem, no entanto, que a produção de AIA não esteja contribuindo para a adaptação do flagelado ao hospedeiro vegetal, uma vez que nos tomates infectados o AIA excedente é convertido nas formas AIA-éster e AIA-amida.

Tendo em vista que o gene *PDC/IPDC* apresenta estrutura conservada em diferentes isolados de *Phytomonas* será de interesse verificar a funcionalidade da enzima correspondente em flagelados que causam enfermidades devastadoras em plantações de interesse econômico.

*“It is clear that not only plants and
bacteria will take part in
the IAA conversations [...],
researchers in plant science and
microbiology will undoubtedly continue talking
about this intriguing molecule.”*
(Spaepen, Vanderleyden e Remans, 2007).

REFERÊNCIAS¹¹

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol.* 2005;29:29-34.

Alves JM, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS One* 2011;6:e23518.

Bashan Y, de-Bashan LE. Chapter Two: How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 2010;108:77–136.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D138-41. Database Issue.

Batistoti M, Cavazzana M Jr, Serrano MG, Ogatta SF, Baccan GC, Jankevicius JV, Teixeira MM, Jankevicius SI. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J Parasitol.* 2001;87(6):1335-41.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005;309(5733):416-22.

Boiteux A, Hess B. Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Lett.* 1970;9(5):293-6.

¹¹ **De acordo com:** International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html [2007 May 22].

Boto L. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc Biol Sci.* 2010;277(1683):819-27.

Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J Exp Bot.* 2010;61(13):3615-25.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brandl MT, Lindow SE. Environmental signals modulate the expression of an Indole-3-Acetic Acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1997;10:499-505.

Brandl MT, Lindow SE. Contribution of Indole-3-Acetic Acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microb.* 1998;64:3256-3263.

Brandl M, Clark EM, Lindow SE. Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. *Can. J. Microbiol.* 1996;42:586-92.

Brandl M, Quiñones B, Lindow SE. Heterogeneous transcription of an indoleacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98:3454-9.

Breganó JW, Picão RC, Graça VK, Menolli RA, Itow Jankevicius S, Pinge Filho P, Jankevicius JV. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;39(3):257-64.

Bringaud F, Rivière L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;149(1):1-9.

Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;104(2):219-32.

Buta JG, Spaulding DW. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. *J Plant Growth Regul.*, 1994;13:163-6.

Camargo EP, Silva S, Roitman I, de Souza W, Jankevicius JV, Dollet M. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J Eukaryot Microbiol.*, 1987;34:439-41.

Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol.* 1978;46(2):141-4.

- Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999;42:29-112.
- Camargo EP, Kastelein P, Roitman I. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitol Today.* 1990;6(1):22-5.
- Canepa GE, Carrillo C, Armesto AR, Bouvier LA, Miranda MR, Pereira CA. *Phytomonas*: transport of amino acids, hexoses and polyamines. *Exp Parasitol.* 2007;117(1):106-10.
- Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Protozool.* 1967;14(3):447-51.
- Catalá C, Ostin A, Chamarro J, Sandberg G, Crozier A. Metabolism of indole-3-acetic acid by pericarp discs from immature and mature tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Physiol.* 1992;100(3):1457-63.
- Catarino LM, Serrano MG, Cavazzana M Jr, Almeida ML, Kaneshina EK, Campaner M, Jankevicius JV, Teixeira MM, Itow-Jankevicius S. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;201(1):65-72.
- Chaumont F, Schanck AN, Blum JJ, Opperdoes FR. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67(2):321-31.
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;156(2):93-101.
- Cohen JD, Bandurski RS. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol.* 1982;33:403-30.
- Conchon I, Campaner M, Sbravat C, Camargo E P. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1989;36:412-4.
- Corradi N, Croll D, Colard A, Kuhn G, Ehinger M, Sanders IR. Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(1):366-9.
- Corradi N, Ruffner B, Croll D, Colard A, Horák A, Sanders IR. High-level molecular diversity of copper-zinc superoxide dismutase genes among and within species of arbuscular Mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(7):1970-8.
- Costacurta A, Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 1995;21(1):1-18.

Costacurta A, Keijers V, Vanderleyden J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet.* 1994;243(4):463-72.

Costelloe SJ, Ward JM, Dalby PA. Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family. *J Mol Evol.* 2008;66(1):36-49.

Darling TN, Davis DG, London RE, Blum JJ. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(20):7129-33.

Dollet M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1984;22:115-32.

Dollet M, Sturm NR, Sánchez-Moreno M, Campbell DA. 5S ribosomal RNA gene repeat sequences define at least eight groups of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): phloem-restricted pathogens form a distinct section. *J Eukaryot Microbiol.* 2000;47(6):569-74.

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The spliced leader RNA gene array in phloem-restricted plant trypanosomatids (*Phytomonas*) partitions into two major groupings: epidemiological implications. *Parasitology.* 2001a;122(Pt 3):289-97.

Dollet M, Sturm NR, Ahomadegbe JC, Campbell DA. Kinetoplast DNA minicircles of phloem-restricted *Phytomonas* associated with wilt diseases of coconut and oil palms have a two-domain structure. *FEMS Microbiol Lett.* 2001b;205(1):65-9.

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolves 10 groups. *Infect Genet Evol.* 2011. In press. [doi: 10.1016/j.meegid.2011.11.010]

Duggleby RG. Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Acc Chem Res.* 2006;39(8):550-7.

Dyda F, Furey W, Swaminathan S, Sax M, Farrenkopf B, Jordan F. Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1993;32(24):6165-70.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 2005;309(5733):404-9.

Gibson RA, Schneider EA, Wightman F. Biosynthesis and Metabolism of Indol-3yl-acetic acid: II. In vivo experiments with ¹⁴C-labelled precursors of IAA in tomato and barley shoots. *J Exp Bot.* 1972;23:381-99.

González-Halphen D, Maslov DA. NADH-ubiquinone oxidoreductase activity in the kinetoplasts of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Parasitol Res. 2004;92(4):341-6.

Graça-de Souza VK, Monteiro-Góes V, Manque P, Souza TA, Corrêa PR, Buck GA, Ávila AR, Yamauchi LM, Pinge-Filho P, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. Biol Res. 2010;43(2):233-41.

Grace TD. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature. 1962;195:788-9.

Guerrini F, Segur C, Gargani D, Tibayrenc M, Dollet M. An Isoenzyme Analysis of the Genus *Phytomonas*: Genetic, Taxonomic and Epidemiologic Significance. J Eukaryot Microbiol. 1992;39(4):516–21.

Hall, TA, BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 1999;41:95-8.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol. 2007;44(1):15-25.

Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PA, Opperdoes FR. Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(3):1067-71.

Hawkins CF, Borges A, Perham RN. A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. FEBS Lett. 1989;255(1):77-82.

Hohmann S. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1991;173:7963-9.

Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. Mol Biochem Parasitol. 1997;89(2):295-9.

Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: Evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. Mol Biol Evol. 2003;20:644-652.

Huysamer M, Greve LC, Labavitch JM. Cell wall metabolism in ripening fruit. VIII. Cell wall composition and synthetic capacity of two regions of the outer pericarp of mature green and red ripe cv. Jackpot tomatoes. Physiol Plantarum 1997;101(2):314-22.

Ienne, S. *Phytomonas serpens*: Caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida. [Tese (Doutorado em Parasitologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

lenne S, Pappas G Jr, Benabdellah K, González A, Zingales B. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Infect Genet Evol. 2012. In press. [doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.016]

Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, do Carmo JB, Dutra-Menezes MC, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Csekö YM; Borges MB; Moreira N. Ciclo biológico de *Phytomonas* [Biological cycle of *Phytomonas*]. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988;83(Suppl 1):601-10.

Jankevicius JV, Jankevicius SI, Campaner M, Conchon I, Maeda LA, Teixeira MMG, Freymuller E, Camargo EP. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. J. Protozool. 1989;36:265-271.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. Mol Cell Biol. 1990;10(3):1084-94.

Karnwal, A. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. J Plant Pathol. 2009;91(1):61-3.

Kelly MO, Bradford KJ. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. Plant Physiol. 1986;82(3):713-7.

Kitajima EW, Vainstein MH, Silveira JSM. Flagellate Protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo State, Brazil. Phytopathology 1986;76:638-642.

Koga J. Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. Biochim Biophys Acta. 1995;18:1249(1):1-13.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. IAA Biosynthetic Pathway from Tryptophan via Indole-3-pyruvic Acid in *Enterobacter cloacae*. Agric. Biol. Chem., v. 55, p. 701-706, 1991a.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. Mol Gen Genet. 1991b;226(1-2):10-6.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. J Biol Chem. 1992;267(22):15823-8.

Korený L, Lukes J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? Int J Parasitol. 2010;40(2):149-56.

Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vanderleyden J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. Trends Microbiol. 2000;8(7):298-300.

Lawrence JG, Ochman H. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol.* 1997;44:383-397.

Lawrence JG, Ochman H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9413-7.

Lindqvist Y, Schneider G, Ermler U, Sundström M. Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 1992;11(7):2373-9.

Marché S, Roth C, Philippe H, Dollet M, Baltz T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;71(1):15-26.

Marcora MS, Cejas S, González NS, Carrillo C, Algranati ID. Polyamine biosynthesis in *Phytomonas*: biochemical characterisation of a very unstable ornithine decarboxylase. *Int J Parasitol.* 2010;40(12):1389-94.

Marín C, Hitos AB, Rodríguez-González I, Dollet M, Sánchez-Moreno M. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;234(1):69-74.

Marín C, Rodríguez-González I, Sánchez-Moreno M. Identification of excreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(6):649-54.

Marín C, Alberge B, Dollet M, Pagès M, Bastien P. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). *Genomics.* 2008;91(1):88-93.

Marín C, Dollet M, Pagès M, Bastien P. Large differences in the genome organization of different plant Trypanosomatid parasites (*Phytomonas* spp.) reveal wide evolutionary divergences between taxa. *Infect Genet Evol.* 2009;9(2):235-40.

Maslov DA, Nawathean P, Scheel J. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;99(2):207-21.

Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(3):397-402.

Maslov DA, Yurchenko VY, Jirků M, Lukes J. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol.* 2010;57(2):177-88.

McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* 1980;44(1):140-73.

Miranda K, Rodrigues CO, Hentchel J, Vercesi A, Plattner H, de Souza W, Docampo R. Acidocalcisomes of *Phytomonas françai* possess distinct morphological characteristics and contain iron. *Microsc Microanal.* 2004;10(5):647-55.

Molinas SM, Altabe SG, Oppendoes FR, Rider MH, Michels PA, Uttaro AD. The multifunctional isopropyl alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp. could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36169-75.

Møller K, Langkjaer RB, Nielsen J, Piskur J, Olsson L. Pyruvate decarboxylases from the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. *Mol Genet Genomics.* 2004;270(6):558-68.

Monier A, Claverie JM, Ogata H. Horizontal gene transfer and nucleotide compositional anomaly in large DNA viruses. *BMC Genomics.* 2007;8:456.

Moore TC, Shaner CA. Synthesis of indoleacetic acid from tryptophan via indolepyruvic acid in cell-free extracts of pea seedlings. *Arch Biochem Biophys.* 1968;127(1):61321.

Muller YA, Schulz GE. Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 1993;259(5097):965-7.

Muller E, Gargani D, Schaeffer V, Stevens J, Fernandez-Becerra C, Sanchez-Moreno M, Dollet M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops: isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Eur J Plant Pathol.* 1994;100:425-434.

Muller E, Ahomadegbe JC, Coulaud D, Gargani D, Fernandez-Becerra C, Dollet M. Variability of kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for hartrot and marchitez diseases. *Phytopathology* 1995;85:942-947.

Muller E, Gargani D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dollet M. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Parasitology* 1997;115(Pt 4):403-9.

Nawathean P, Maslov DA. The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Curr Genet.* 2000;38(2):95-103.

Normanly J. Auxin metabolism. *Physiol Plant.* 1997;100:431-42.

Normanly J, Bartel B. Redundancy as a way of life - IAA metabolism. *Curr Opin Plant Biol.* 1999;2(3):207-13.

Ona O, Van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;246(1):125-32.

Opperdoes FR, Michels PA. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. Trends Parasitol. 2007;23(10):470-6.

Ozaki LS, Cseko YMT. Genomic DNA cloning and related techniques. In: Morel CM (Ed.). Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual. 2nd ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. Cap. 3.4, p. 165-185.

Pappas GJ Jr, Benabdellah K, Zingales B, González A. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol Biochem Parasitol. 2005;142(2):149-57.

Patil, N.B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S.S., Gunjal, A.B., Kapadnis, B.P. Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. Int J Environ Sci. 2011;2(1).

Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol. 1996;42(3):207-20. Review.

Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl Environ Microbiol. 2002;68(8):3795-801.

Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 333 p.

Petry K, Gargani D, Baltz Th, Kastelein P, Dollet M. Use of Monoclonal Antibodies for Differentiation of Different Isolates of *Phytomonas* (Plant Trypanosomatids). Journal of Phytopathology 1989;126(Issue 1)59-68.

Pinge-Filho P, Peron JP, de Moura TR, Menolli RA, Graça VK, Estevão D, Tadokoro CE, Jankevicius JV, Rizzo LV. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. Immunol Lett. 2005;96(2):283-90.

Purgatto E, Nascimento JRO, Lajolo FM, Cordenunsi BR. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. J Plant Physiol. 2002;159:1105-11.

Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC. Vida: a ciência da biologia. Tradução de Anapaula Somer Vinagre et al. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 1126 p.

Quesada JM, Entrala E, Fernández-Ramos C, Marín C, Sánchez-Moreno M. *Phytomonas* spp: superoxide dismutase in plant trypanosomes. Mol Biochem Parasitol. 2001;115(1):123-7.

Rainey PM, MacKenzie NE. A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1991;45:307-15.

Ryder EF, Robakiewicz P. Statistics for the molecular biologist: group comparisons. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley, 1998. pp. A.31.1-A.31.22.

Ryu RJ, Patten CL. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol.* 2008;190(21):7200-8.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

Sanchez-Moreno M, Lasztity D, Coppens I, Opperdoes FR. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;54(2):185-99.

Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra C, Mascaro C, Rosales MJ, Dollet M, Osuna A. Isolation, in vitro culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Annona cherimolia*) in southeastern Spain. *Parasitol Res.* 1995;81(7):575-81.

Santos AL, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Cienc.* 2006;78(4):687-714.

Sbravate C, Campaner M, Camargo LEA, Conchon I, Teixeira MMG, Camargo EP. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous Hemiptera in Brazil. *J Eukaryot Microbiol.* 1989;36(Issue 6):543-547.

Schütz A, Golbik R, Tittmann K, Svergun DI, Koch MH, Hübner G, König S. Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur J Biochem.* 2003a;270(10):2322-31.

Schütz A, Sandalova T, Ricagno S, Hübner G, König S, Schneider G. Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem.* 2003b;270(10):2312-21.

Schütz A, Golbik R, König S, Hübner G, Tittmann K. Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. *Biochemistry.* 2005;44(16):6164-79.

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol.* 1999;91(3):268-79.

Sgrillo RB, Moura JIL, Sgrillo KRPA. Simulation model for phytomona epidemics in coconut trees. *Neotrop. Entomol.* 2005;34(4). [doi: 10.1590/S1519-566X2005000400001]

Singha UK, Bhakuni V, Ali V, Roy R. *Leishmania donovani*: metabolite mapping of promastigotes using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol Cell Biochem.* 1996;162(1):17-22.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(4):425-48.

Spaepen S, Vanderleyden J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. [doi: 10.1101/cshperspect.a001438]

Spaepen S, Versées W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J, Vanderleyden J. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol.* 2007;189(21):7626-33.

Sturm NR, Dollet M, Lukes J, Campbell DA. Rational sub-division of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) based on minicircle conserved region analysis. *Infect Genet Evol.* 2007;7(5):570-6.

Teixeira MMG, Camargo EP. Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 1989;36:262-264.

Teixeira MM, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp Parasitol.* 1996;84(3):311-9.

Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol.* 1997;66(3):197-238.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-80.

Tielens AG, Van Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol Today.* 1998;14(7):265-72.

Uttaro AD, Sanchez-Moreno M, Opperdoes FR. Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;90(1):337-42.

Vainstein MH, Roitman I. Cultivation of *Phytomonas françai* associated with poor development of root system of cassava. *J. Protozool.* 1986;33:511-513.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994;24(8):1317-31.

Vilas Boas EVB, Chitarra AB, Maluf WR, Chitarra MIF. Modificações texturais de tomates heterozigotos no loco alcobaça. *Pesq Agropec Bras.* 2000;35(7):1447-53.

Waller RF, McConville MJ, McFadden GI. More plastids in human parasites? *Trends Parasitol.* 2004;20(2):54-7.

Warwick DRN. Principais características do anel-vermelho e murcha-de-fitomonas. Embrapa Tabuleiros Costeiros 2005;comunicado Técnico 38, Aracaju, SE.

Weiss PM, Garcia GA, Kenyon GL, Cleland WW, Cook PF. Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using ^{13}C and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry.* 1988;27(6):2197-205.

Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot.* 2005;95(5):707-35.

ANEXOS

Anexo A - lenne, S., Pappas Jr., G., Benabdellah, K., González, A., Zingales, B. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012 (in press).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*

Susan lenne^a, Georgios Pappas Jr.^{b,c}, Karim Benabdellah^{d,1}, Antonio González^d, Bianca Zingales^{a,*}

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

^b Programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Av. W5 Norte – SGAN Quadra 916 Asa Norte, Brasília, DF 70790-160, Brazil

^c Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, Av. W5 Norte, Brasília, DF 70770-917, Brazil

^d Instituto de Parasitología y Biomedicina. IPBLN-CSIC. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Av. del Conocimiento, s/n, 18100 Armilla (Granada), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2011

Received in revised form 11 January 2012

Accepted 14 January 2012

Available online xxx

Keywords:

Trypanosomatids

Genealogy

Pyruvate decarboxylase

Horizontal gene transfer

 γ -Proteobacteria

Ethanol

NADH oxidation

ABSTRACT

Among trypanosomatids, the genus *Phytomonas* is the only one specifically adapted to infect plants. These hosts provide a particular habitat with a plentiful supply of carbohydrates. *Phytomonas* sp. lacks a cytochrome-mediated respiratory chain and Krebs cycle, and ATP production relies predominantly on glycolysis. We have characterised the complete gene encoding a putative pyruvate/indolepyruvate decarboxylase (PDC/IPDC) (548 amino acids) of *P. serpens*, that displays high amino acid sequence similarity with phytobacteria and *Leishmania* enzymes. No orthologous PDC/IPDC genes were found in *Trypanosoma cruzi* or *T. brucei*. Conservation of the PDC/IPDC gene sequence was verified in 14 *Phytomonas* isolates. A phylogenetic analysis shows that *Phytomonas* protein is robustly monophyletic with *Leishmania* spp. and *C. fasciculata* enzymes. In the trees this clade appears as a sister group of indolepyruvate decarboxylases of γ -proteobacteria. This supports the proposition that a horizontal gene transfer event from a donor phytobacteria to a recipient ancestral trypanosome has occurred prior to the separation between *Phytomonas*, *Leishmania* and *Crithidia*. We have measured the PDC activity in *P. serpens* cell extracts. The enzyme has a Km value for pyruvate of 1.4 mM. The acquisition of a PDC, a key enzyme in alcoholic fermentation, explains earlier observations that ethanol is one of the major end-products of glucose catabolism under aerobic and anaerobic conditions. This represents an alternative and necessary route to reoxidise part of the NADH produced in the highly demanding glycolytic pathway and highlights the importance of this type of event in metabolic adaptation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Kinetoplastids are a remarkable group of protists that includes pathogens of invertebrates, vertebrates and even plants. The genus *Phytomonas* designates trypanosomatids found in latex, phloem, fruits and seeds of different plant species with a wide geographical distribution (reviewed by Dollet, 1984; Camargo, 1999). *Phytomonas* are thought to be transmitted by phytophagous insects and, accordingly, are classified as dixenous trypanosomatids.

Besides *Phytomonas* other trypanosomatids of the *Leptomonas*, *Herpetomonas* and *Crithidia* genera have been isolated from plants (Conchon et al., 1989). These monogenetic organisms are insect-specific and their presence in fruits, seeds and flowers results from accidental inoculation into the insect feeding sites (Conchon et al., 1989; Jankevicius et al., 1989; Serrano et al., 1999a; Fiorini et al.,

2001). Genetic markers allow the distinction of the *Phytomonas* genus from the monogenetic insect kinetoplastids (Teixeira et al., 1996; Muller et al., 1997; Serrano et al., 1999b; Sturm et al., 2007).

Multiple horizontal gene transfer (HGT) events have been implicated in the acquisition of structural and biochemical peculiarities of the trypanosomatids that allowed the adaptation of these organisms to a vast range of different hosts (Oppendoes and Michels, 2007). The authors speculate that these genes were probably originated from bacterial donors that could have been endosymbionts or organisms resident in the midgut of an insect host.

Accordingly, profound metabolic adaptations are expected to permit *Phytomonas* to thrive in the phloem and laticiferous tubes of host plants. Due to the facility of *in vitro* cultivation, some characteristics of *Phytomonas* metabolism have been investigated in detail for the tomato isolate *Phytomonas serpens*. These studies concluded that several mitochondrial functions, such as cytochrome-mediated respiration, ATP production and Krebs cycle, are missing, and cell energetics are based predominantly on glycolysis (Maslov et al., 1999; Nawathean and Maslov, 2000). Another distinctive characteristic of *Phytomonas*, shared only by *Crithidia*, is ethanol production

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30912686; fax: +55 11 38155579.

E-mail address: zingales@iq.usp.br (B. Zingales).

¹ Present address: GENYO (Pfizer-University of Granada-Andalusian Government Centre for Genomics and Oncological Research), Armilla, Granada, Spain.

as one of the major end-products of glycolysis (Cazzulo et al., 1985; Chaumont et al., 1994).

Little genomic and proteomic information regarding members of the genus *Phytomonas* is available. As a first step toward the definition of the *Phytomonas* genome, the molecular karyotypes of isolates from latex and phloem have been reported (Marín et al., 2008, 2009). Aiming to expand basic knowledge on the biology and metabolism of *Phytomonas*, our group undertook a moderate gene survey by means of the generation, sequencing and analysis of *P. serpens* expressed sequence tags (ESTs) (Pappas et al., 2005). A number of enzymes of metabolic pathways were identified, as well as several ESTs that can shed some light on physiological aspects of the parasite lifestyle.

The 540-bp consensus sequence of one EST cluster (cluster 53) showed high sequence similarity at the amino acid level with pyruvate/indole-pyruvate decarboxylases of phytobacteria. Pyruvate decarboxylases (PDC; EC 4.1.1.1) are key enzymes in alcoholic fermentation, functioning as a “gateway” leading from glycolysis to fermentation, while indolepyruvate decarboxylases (IPDCs; EC 4.1.1.74) are key enzymes in the biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid of many bacteria (reviewed by Koga, 1995). The two classes of decarboxylases (PDC and IPDC) display high structural similarities, but different affinities for their substrates (Schütz et al., 2003).

The presence of *P. serpens* PDC/IPDC gene displaying high similarity to genes of phytobacteria raised the stimulating hypothesis that a HGT event may have occurred.

In this study we have characterised the complete gene encoding a putative PDC/IPDC of *P. serpens*, shown that this sequence is conserved in *Phytomonas* members and obtained phylogenetic evidence of a probable HGT event providing the molecular basis for alcoholic fermentation in *Phytomonas*.

2. Material and methods

2.1. Trypanosomatid isolates, cultivation and DNA extraction

Phytomonas isolates used in this study were obtained from two cryopreserved collections of the Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brazil) (Table 1). PCR assays targeted to the spliced-leader region were used to identify *Phytomonas* isolates (Catarino et al., 2001 and references therein). Information on other trypanosomatids used in this study is provided in Supplementary material (Table A1). *P. serpens* and *L. major* stocks were kindly provided,

respectively, by Dr. Marta M. G. Teixeira (Instituto de Ciências Biológicas, USP) and Dr. Lucile Floeter-Winter (Instituto de Biociências, USP). Promastigotes of *P. serpens* were grown at 28 °C in Grace's insect medium (Sigma) supplemented with 10% foetal calf serum; promastigotes of *L. major* were grown at 25 °C in 199 medium (Vitrocell) supplemented with 10% foetal calf serum. *P. serpens* and *L. major* genomic DNA was prepared by the conventional phenol-chloroform extraction method. DNA preparations of other trypanosomatids were kindly provided by Dr. Marta M. G. Teixeira (Instituto de Ciências Biológicas, USP).

2.2. PCR amplification

Three pairs of primers were employed for the amplification of *P. serpens* PDC/IPDC gene (Table 2; Fig. 1) designed based on the nucleotide sequence of this gene here determined (GenBank JN400885). For the amplification of *P. serpens* housekeeping gene *glycosomal glyceraldehyde dehydrogenase (gGAPDH)* the pair of primers Ps.GAPDH.For/Ps.GAPDH.Rev (Table 2) was designed based on the nucleotide sequence (GenBank No EU084892). Amplification reactions were performed in 25 µL total volume, containing 50 ng DNA, 1 unit *Taq* DNA polymerase Biolase (Bioline), 1 × enzyme buffer, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (for Ps.IPDC.N.For/Ps.IPDC.N.Rev and Ps.IPDC.M.For/Ps.IPDC.C.Rev primers), 0.2 µM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 5% DMSO (for Ps.IPDC.U.For/Ps.IPDC.U.Rev primers). PCR conditions included 1 min denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles at three temperatures: 1 min denaturation at 95 °C; 1 min primer annealing at the temperature specified in Table 2; and 1 min elongation at 72 °C; followed by 9 min elongation at 72 °C. PCR products were separated in agarose gels and stained with ethidium bromide.

2.3. Cloning and sequencing of the PDC/IPDC gene

The 2400 bp insert of clone pBSSK⁺ p228, belonging to the EST cluster 53 was fully sequenced by standard procedures using sub-clones obtained with a number of restriction enzymes. Sequencing was carried out with an ABI 377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems Inc.).

2.4. Sequencing of the PDC/IPDC intergenic region

The intergenic region was amplified from *P. serpens* genomic DNA with the Ps.IPDC.U.For/Ps.IPDC.U.Rev primers (Table 2; Fig. 1) and *Pfu* DNA polymerase (Fermentas). The amplification

Table 1
Characteristics of *Phytomonas* isolates used in this study.

Isolate	Identification ^a	Host		
		Species	Source	Country
<i>P. serpens</i>	TCC 060	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Fruit	Brazil
<i>P. françai</i>	TCC 064	<i>Manihot esculenta</i> (cassava)	Latex	Brazil
<i>P. mcgheeii</i> 163	TCC 300	<i>Zea mays</i> (maize)	Seed	Brazil
1G	Trycc 56	<i>Nezara viridula</i> (insect)	NA	Brazil
412 U	Trycc 55	<i>Bixa orellana</i> (annatto)	Seed	Brazil
492 FG	Trycc 72	<i>Cajanus flavus</i> (bean)	Seed	Brazil
Bni	TCC 086	<i>Blepharodon nitidus</i>	Latex	Surinam
EC2	TCC 052	<i>Euphorbia characias</i>	Latex	France
Epi 053 (=Em1)	TCC 053	<i>Euphorbia pinea</i>	Latex	France
Jma	TCC 066	<i>Jatropha macrantha</i>	Latex	Peru
Msc 084	TCC 084	<i>Mandevilla scabra</i>	Latex	Surinam
Sam 225	TCC 225	<i>Solanum americanum</i>	Fruit	Brazil
Ser 226 (Seri 226)	TCC 226	<i>Solanum erianthum</i>	Fruit	Brazil
Svi 223	TCC 223	<i>Solanum viarum</i>	NA	Brazil

insert NA = not aware

^a TCC: Trypanosomatids Culture Collection of the Universidade de São Paulo; TryCC: Trypanosomatids Culture Collection of the Department of Parasitology – Universidade de São Paulo.

Please cite this article in press as: lenne, S., et al. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Infect. Genet. Evol. (2012), doi:10.1016/j.meegid.2012.01.016

Table 2Primers for PCR amplification of *P. serpens* genes.

Primer name	Sequence (5'–3')	Localisation	Product size (bp)	Primer annealing temperature (°C)
<i>PDC/IPDC</i> gene				
Ps.IPDC.N.For	CCTCGGAAACCTACAACGTC	N-domain ^a	403	57
Ps.IPDC.N.Rev	CAGGAGATCTGCTCGCTCAT			
Ps.IPDC.M.For	CATGAAGCACCGAGCTT	Middle and C-domain ^a	297	57
Ps.IPDC.C.Rev	CACTCCTGCACCGTCATCT			
Ps.IPDC.U.For	AGATGCCCGTCGTTCTCTT	C- to N- domain ^{a,b}	769	57
Ps.IPDC.U.Rev	TCCGAGGGCATCGATATTAG			
<i>GAPDH</i> gene				
Ps.GAPDH.For	GTGCTTGTGGTGAAC	N-terminal domain [NAD(P) binding fold]	269	51
Ps.GAPDH.Rev	CACGACCGTTCGAC			

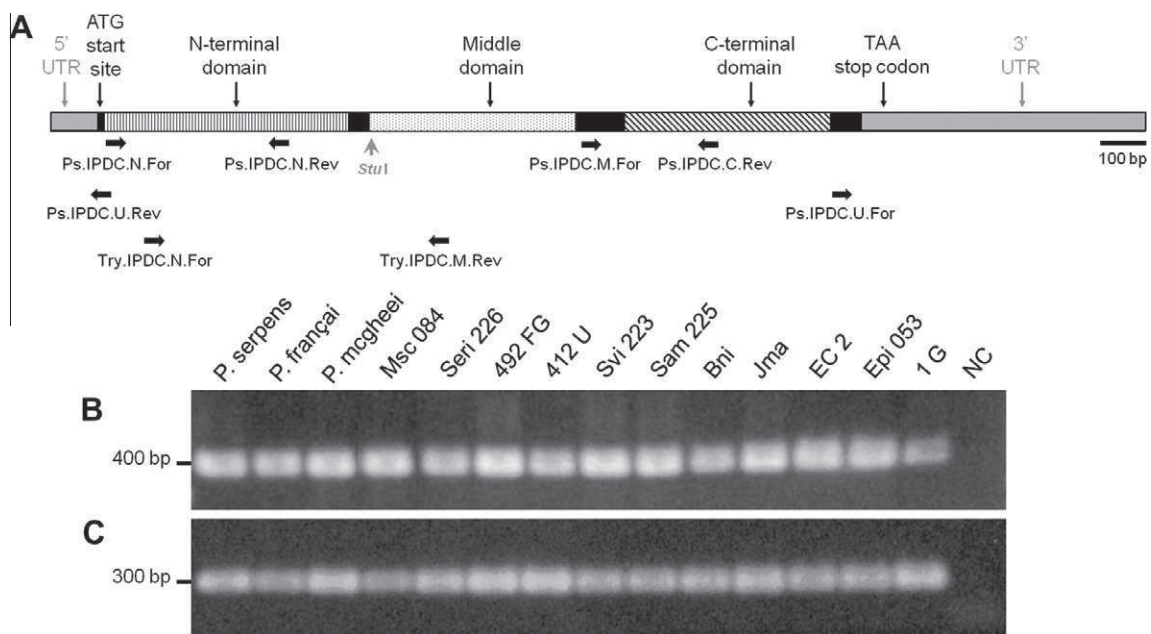
^a Domains for the ThDP coenzyme. See localisation in Fig. 1.^b Primers used for the amplification of the intergenic region.

Fig. 1. *Phytomonas PDC/IPDC* gene. Schematic representation of *P. serpens PDC/IPDC* gene (Panel A). The localisation of the three ThDP binding domains and primers used for PCR amplification is indicated (see Table 2). The *PDC/IPDC* gene of *Phytomonas* isolates was PCR amplified with Ps.IPDC.N.For/Ps.IPDC.N.Rev primers (Panel B) and Ps.IPDC.M.For/Ps.IPDC.C.Rev primers (Panel C). Ethidium bromide stained agarose gels. Molecular mass markers are indicated. NC, negative control.

product was purified using a PCR purification kit (RBC – Real Biotech Corporation), incubated with dATP and *Taq* polymerase (Fermentas) and cloned into the TOPO TA plasmid (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Recombinant plasmids were purified and sequenced as described above with TOPO TA primers (M13 Forward and M13 Reverse).

2.5. Phylogenetic analyses

The deduced protein sequence of *P. serpens PDC/IPDC* together with protein sequences of PDCs and IPDCs from *Leishmania* spp., bacteria, fungi and plants were subjected to phylogenetic analyses. The databases accessed for selection of the sequences were GenBank and SWISS-PROT. Preference was given to the inclusion of sequences that have been characterised experimentally, corroborating the enzymatic function. Two *PDC/IPDC* homologs were found in *C. fasciculata* genome following a search in the TriTryp database (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) using as query *P. serpens* protein sequence: contig 653 (nucleotide position 1531–3168) and contig 1012 (nucleotide position 116893–118548). The corresponding protein sequences were included in the analysis. Sequences were aligned with CLUSTALW (Thompson et al., 1994) and visualised with BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor for Windows) (Hall,

1999). PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2003) was used for the reconstruction of phylogenetic trees. The reconstructions were performed using the neighbor-joining distance method (Saitou and Nei, 1987), maximum parsimony method (Fitch, 1971), with heuristic search algorithm by stepwise addition, and with the maximum likelihood method (Felsenstein, 1981). To determine the best substitution model for the dataset the Likelihood Ratio Test (LRT) with ProtTest program (Drummond and Strimmer, 2001; Guindon and Gascuel, 2003; Abascal et al., 2005) was applied. Bootstrap values (1000 pseudo-replicates) were used for internal consistency of data in the maximum parsimony method, assessed with PAUP*. The generated trees were displayed with TreeView (version 1.6.6; Page, 1996).

2.6. Gene sequence characteristics and codon usage

The nucleotide sequences of the following genes were analysed: *P. serpens* and *L. major PDC/IPDCs* and *GAPDHs*; *E. cloacae* and *E. herbicola IPDCs* and *A. parasiticus* and *R. oryzae PDCs*. GenBank accession numbers are indicated in Section 3. The nucleotide sequences were subjected to codon usage analysis with the CodonW program (John F. Peden; available at <http://codonw.sourceforge.net/>).

2.7. Southern blot

P. serpens DNA (7 µg) was digested with *Stu* I restriction enzyme (New England Biolabs), run on 1% agarose gels and blotted to nylon membranes (Hybond-N, Amersham Biosciences) using standard protocols. Hybridisation was performed using as probe the 297-bp purified amplification product of the *P. serpens* PDC/IPDC gene obtained with the Ps.IPDC.M.For/Ps.IPDC.C.Rev primers (Table 2). The probe was labelled with [α^{32} P]dATP using a Random Primer DNA Labeling Kit (Invitrogen). Blots were hybridised at 60 °C in 0.05% Ficoll, 0.05% PVP, 0.5 mM EDTA, 3× SSC, 0.1% SDS, 100 µg/mL salmon sperm DNA. Blots were washed to a final stringency of 0.1×SSC/0.1% SDS at 60 °C. The radioactive images were recorded on Phosphor Screens (Kodak).

2.8. Relative abundance of PDC/IPDC transcripts

P. serpens and *L. major* total RNA was isolated using TRIzol® (Invitrogen) and treated with DNase RQ1 RNase-free (Promega) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNA were used for cDNA synthesis with random hexamers as primers and Super Script II Reverse Transcriptase First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen), as indicated by the manufacturer. For quality control, RNA absorbance was measured at 260 nm and individual samples were analysed by agarose gel electrophoresis. Sequences of the primer sets used for real-time PCR analysis were designed with the PrimerExpress program (Applied Biosystems) and are shown in Table 3. All real-time PCR runs were performed in triplicate and each reaction mixture (20 µL final volume) contained 1× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM each primer and 96 ng of cDNA template. Amplification was performed in Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems) instrument with the following thermal cycling protocol: 10 min initial denaturation at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The fluorescence signal was measured at the end of each extension step at 60 °C. After amplification, a melting peak analysis with a temperature gradient from 60 to 95 °C was performed to confirm that only the specific products were amplified. The threshold cycle (C_t) was determined with the 7500 Software Version 2.0.1 (Applied Biosystems). In all experiments, the species-specific housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as normaliser.

2.9. PDC activity in *P. serpens* cell extracts

P. serpens (10^9 cells) were disrupted by sonication. The protein concentration of the 16,000g supernatant was determined with the Bradford's method (Bradford, 1976). PDC activity was measured using a coupled photometric assay with alcohol dehydrogenase (ADH) as an auxiliary enzyme. The reaction mixture (1 mL) contained 10 mM potassium phosphate, pH 6.5, 5 mM MgCl₂, 0.35 mM NADH, 0.1 mM thiamin diphosphate (ThDP), 10 U *S. cerevisiae* ADH (Sigma), 100 µg protein *P. serpens* 16,000g supernatant

and different pyruvate concentrations. NADH oxidation was followed at 340 nm with a Cary Win UV spectrophotometer (Varian Inc.). The reaction was followed for 10 min at 25 °C. The data were plotted and fitted according to Michaelis–Menten kinetics.

3. Results

3.1. Characteristics of *P. serpens* PDC/IPDC gene

Clone p228 from the *P. serpens* EST survey (Pappas et al., 2005) is one of the members of EST cluster 53, which shows homology to PDC/IPDC genes. This clone contains a full-size cDNA including spliced leader (SL) (also named mini-exon) and polyA sequences. The SL sequence is followed by a 102-bp 5'-untranslated region (UTR), a 1647-bp open reading frame (ORF) that encodes 548 amino acids, and a 615-bp 3' UTR (Fig. 1A).

Protein domain searches against the Pfam database (Bateman et al., 2004) revealed three ThDP binding domains, schematically shown in Fig. 1A. The N-terminus domain (residues 6–181) binds the pyrimidine site of ThDP; the middle domain (residues 199–347); and the C-terminal domain (residues 383–530) that contains a conserved motif for binding the diphosphate region of ThDP + Mg²⁺ (Fig. 1A). The N- and C-terminal domains are present in all families of ThDP-dependent enzymes, while the middle domain is present only in the decarboxylase and transketolase families (reviewed by Duggleby, 2006).

BLASTX similarity searches against the non-redundant (nr) NCBI database indicated high similarity to pyruvate/indole-pyruvate carboxylases of *Leishmania* species and bacterial IPDCs (Table 4). Interestingly, no orthologous genes of *Leishmania* enzyme were found in the *Trypanosoma cruzi* or *T. brucei* genomes.

The similarity of *P. serpens* PDC/IPDC with *Leishmania* pyruvate carboxylases (PC; EC 6.4.1.1) was intriguing because the two classes of enzymes catalyse different reactions, both irreversible: PDCs catalyse the reaction pyruvate → acetaldehyde + CO₂, having ThDP as coenzyme, whereas PCs catalyse the reaction pyruvate + HCO₃⁻ + ATP → oxaloacetate + ADP + P_i, and have biotin as prosthetic group. To elucidate this aspect, the putative pyruvate/indole-pyruvate carboxylase of *L. major* was searched for conserved domains against Pfam database. Three ThDP binding domains were disclosed, indicating that the correct designation of *Leishmania* enzyme should be PDC/IPDC and not PC/IPC, as automatically annotated in the genome project (Ivens et al., 2005).

3.2. Presence of PDC/IPDC in *Phytomonas* isolates

To investigate the distribution of the PDC/IPDC gene in *Phytomonas* isolates two pairs of primers were designed: Ps.IPDC.N.For and Ps.IPDC.N.Rev primers, both located in the ThDP N-terminal domain; and Ps.IPDC.M.For primer (located in the middle domain) and Ps.IPDC.C.Rev primer (located in the C-terminal domain) (see Table 2; Fig. 1A). For all 14 *Phytomonas* isolates the two pairs of primers amplified products of the sizes observed for

Table 3
Primers for Real-Time PCR.

Primer	Sequence (5'–3')	Localisation	Product size (bp)
Ps.IPDC.RTP.For	GGTGTTCCCGTGACTATAACC	<i>P. serpens</i> PDC/IPDC gene; N-domain	76
Ps.IPDC.RTP.Rev	AGCAGCCAACCAATTGAGT		
Ps.GAPD.RTP.For	AGACGATTGTGATGGGTGTGAA	<i>P. serpens</i> gGAPDH gene	70
Ps.GAPD.RTP.Rev	GACCGGTTTCGACACGATGT		
Lm.IPDC.RTP.For	CACCTGATTCACCGCCATCA	<i>L. major</i> PDC/IPDC gene; N-domain	70
Lm.IPDC.RTP.Rev	CGTACGGGATGCGGATGT		
Lm.GAPD.RTP.For	GTGATCGAGTCTACTGGCCTGT	<i>L. major</i> gGAPDH gene	71
Lm.GAPD.RTP.Rev	TTCTTCGCACCACCTTGAT		

Table 4List of ten best BLASTX hits against NCBI's nr database ranked by the alignment bit-score using as query *P. serpens* PDC/IPDC nucleotide sequence.

GenBank Accession	Description	E-value	Bit-score	Identity	Similarity
XP_001564563	Pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904] ^a	6e-137	493	46	61
XP_001686429	Pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin] ^a	1e-136	492	47	62
XP_001468661	Pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5] ^a	4e-136	490	47	61
ZP_06639356	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582]	2e-130	471	44	62
ZP_06191191	Thiamine pyrophosphate binding domain-containing protein [<i>Serratia odorifera</i> 4Rx13]	2e-130	471	45	64
CAX60783	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Erwinia billingiae</i> Eb661]	2e-128	464	46	64
YP_001479638	Thiamine pyrophosphate binding domain-containing protein [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]	9e-128	462	44	63
AAB06571	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Pantoea agglomerans</i>]	2e-126	457	45	62
YP_051693	Indole-3-pyruvate decarboxylase [<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043]	2e-126	457	45	60
YP_001005545	Indole-3-pyruvate decarboxylase [<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081]	8e-126	456	44	60

^a As discussed in the text, the correct designation of the *Leishmania* enzyme should be pyruvate/indole-pyruvate decarboxylase.

P. serpens (Fig. 1B and C), suggesting high conservation of the PDC/IPDC gene sequence in this trypanosomatid genus. No amplification products were obtained with the same primers in 18 isolates of other trypanosomatid genera (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas* and *Trypanosoma*) (Table A1 – Supplementary material). The lack of amplification observed in four *Leishmania* species and *C. fasciculata* is due to the fact that the primers do not recognise the sequence of the PDC/IPDC genes in these organisms (data not shown), which serves as a negative control.

3.3. Phylogenetic analysis

Given the similarity of the *P. serpens* PDC/IPDC protein with bacterial IPDCs (Table 4), we performed a phylogenetic analysis to infer the origin of this sequence in *Phytomonas*. Twenty-six protein sequences of IPDCs, IPDC/PPDCs (PPDCs: phenylpyruvate decarboxylases, E.C. 4.1.1.43; Baudoin et al., 2010) and PDCs of bacteria, fungi and plants were selected for comparison. The selected sequences are summarised in Table 5; and fully described in Table A2 (Supplementary material). Preference was given to enzymes whose function has been confirmed experimentally because PDCs and IPDCs have a very similar amino acid sequence and structure (Koga et al., 1992; Schütz et al., 2003), which precludes unequivocal functional assignment based solely on sequence data. Sequences of PDCs and IPDC/PPDCs were included because both have binding domains to ThDP and Mg²⁺ similarly to IPDCs, showing significant differences only in the specificity and affinity for the substrate (Koga et al., 1992; Schütz et al., 2003; Baudoin et al., 2010). PDC/IPDC protein sequences of three *Leishmania* species and two PDC/IPDC homologs, identified in the genome of *C. fasciculata* using as query the protein sequence of *P. serpens*, were also incorporated in the analysis.

After multiple sequence alignment, phylogenetic trees were generated by maximum likelihood (ML; Fig. 2), neighbor-joining and maximum parsimony methods (NJ and MP; Fig. 3A and B, respectively). The resulting trees revealed distinct clusters of plant PDCs, fungi PDCs, bacterial IPDCs and bacterial IPDCs/PPDCs. The phylogenies suggested that *P. serpens*, *Leishmania* spp. and

C. fasciculata PDC/IPDC form a monophyletic group with IPDCs of the γ -proteobacteria *P. agglomerans*, *E. cloacae* and *P. putida*, with bootstrap support of 93% in the MP tree (Fig. 3B). This raises the possibility that a HGT event from an ancestral phytobacteria was responsible for the acquisition of the PDC/IPDC gene in the trypanosomatids branch. Interestingly, the protein sequences of *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum* and *C. fasciculata* grouped in a monophyletic clade with the *P. serpens* protein. This clade was supported by bootstrap analysis, appearing in 91% of pseudo-replicates in the MP tree (Fig. 3B), suggesting that a putative HGT event may have occurred before the separation of *Phytomonas*, *Leishmania* and *Crithidia*. Phylogenetic trees obtained with the inclusion of PDCs and IPDCs electronically annotated sequences were also constructed by NJ and ML methods (Fig. A1, Supplementary material). The trees show that the main clusters are retained.

The trees also evoke a common ancestor for the fungal PDCs and bacterial IPDCs. Considerable differences between the IPDCs/PPDCs of α -proteobacteria (*Azospirillum lipoferum* and *A. brasilense*) and the IPDCs of γ -proteobacteria (*P. agglomerans*, *P. putida* and *E. cloacae*) were in evidence, in agreement with Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) that showed two distinct clades, one composed by strict IPDCs and another by *A. brasilense* IPDCs/PPDCs and other related sequences (Spaepen et al., 2007a).

The trees also suggest a putative HGT event for the acquisition of *Neurospora crassa* PDC, because, as opposed to what is observed for the other fungal PDCs, *N. crassa* PDC showed a closer relationship to plant and bacteria PDCs.

3.4. Gene sequence characteristics and codon usage

To explore the hypothesis that lateral gene transfer has participated in the acquisition of the *P. serpens* and *Leishmania* spp. PDC/IPDC gene we analysed the GC content and codon usage of the gene, given that horizontally transferred DNA often has anomalous nucleotide compositions differing from the rest of the genome (Monier et al., 2007). For this purpose, two phytobacterial IPDCs and two fungal PDCs were selected (Table 6). *P. serpens* and *L. major* gGAPDH housekeeping genes were used as controls (Table 6). The phytobacterial and fungal species were selected based on their proximity to *P. serpens* and *Leishmania* spp. in the PDC/IPDCs phylogenies (Fig. 2 and 3) and to the fact that their enzymatic activity has been demonstrated experimentally. The analysis of the proportion of codons (Relative Synonymous Codon Usage – RSCU) in the ORFs of IPDC, PDC and gGAPDH genes was conducted with the CodonW program and is shown in Table A3 of Supplementary material. From this analysis the GC3s index was calculated, which describes the G + C content at the third position of synonymous codons (Table 6). The data indicated a similar codon usage for the PDC/IPDC and gGAPDH genes of *P. serpens* and *L. major*. The GC3s index of these genes is higher than the indexes of the bacterial and fungal genes examined.

Table 5

Summary of protein sequences selected for the phylogenetic analyses.

Group	IPDCs/ PPDCs ^a	IPDCs ^a	PDCs ^a
Bacteria – Proteobacteria – Alphaproteobacteria	2	0	0
Bacteria – Proteobacteria – Gammaproteobacteria	0	3	1
Eukaryota – Fungi – Ascomycota	0	0	11
Eukaryota – Fungi – Zygomycota	0	0	1
Eukaryota – Viridiplantae	0	0	8
TOTAL	2	3	21

^a Enzymatic function confirmed experimentally.

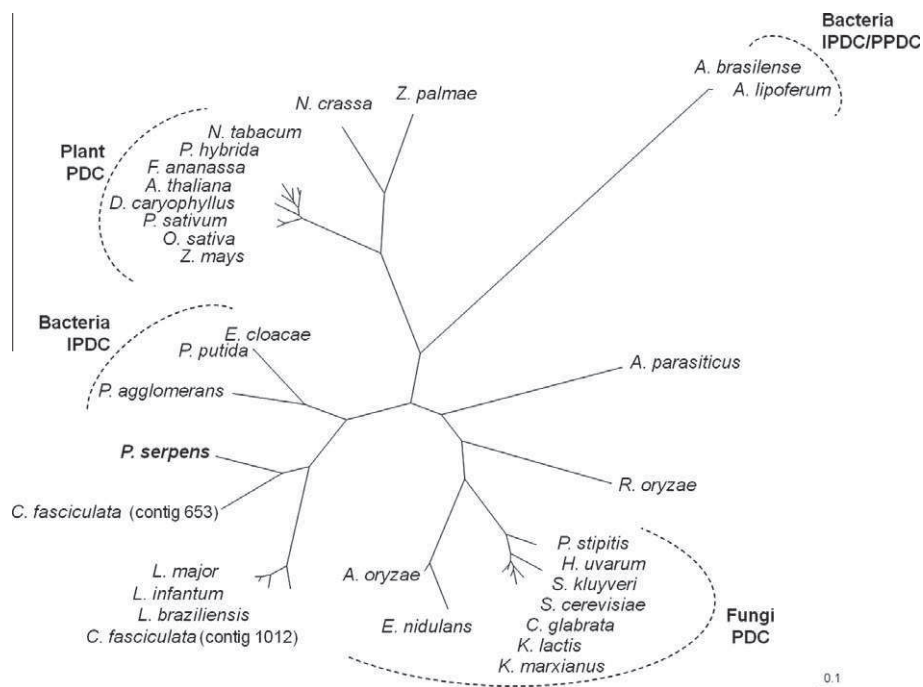


Fig. 2. Maximum Likelihood tree generated with *P. serpens* PDC/IPDC (*P. serpens*), the putative PDC/IPDC of *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, and *C. fasciculata*, and protein sequences of IPDCs, PDCs and IPDCs/PPDCs of Bacteria, Fungi and Plants (see Table 5). The bar indicates the number of substitutions per site. (Evolutionary model: LG + I + G + F = -21627.59).

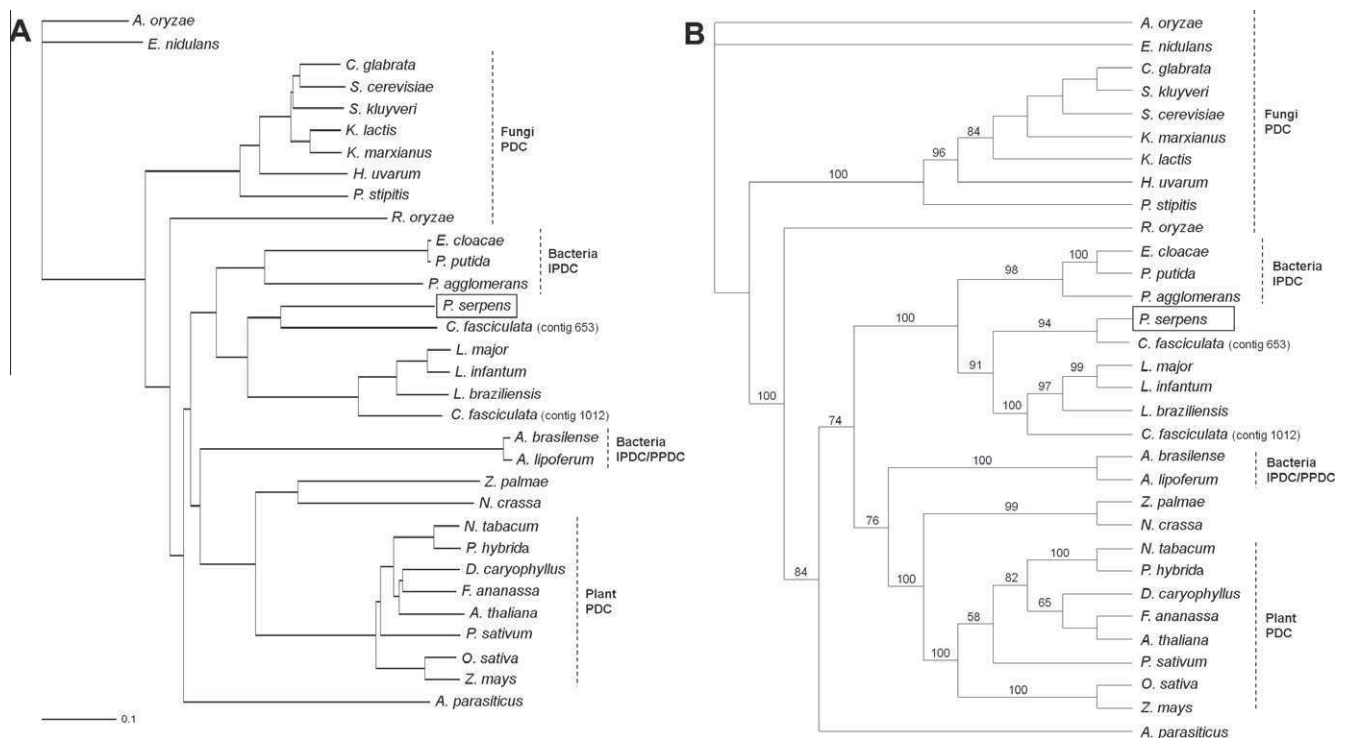


Fig. 3. Neighbor-Joining (A) and Maximum parsimony (B) trees generated with *P. serpens* PDC/IPDC, the putative PDC/IPDC of *L. major*, *L. infantum* and *L. braziliensis*, and protein sequences of IPDCs, PDCs and IPDCs/PPDCs of Bacteria, Fungi and Plants (Table 5). The bar indicates the number of substitutions per site.

3.5. *P. serpens* PDC/IPDC gene copy number and sequence of the intergenic region

The gene copy number of *PDC* and *IPDC* varies in different organisms. In *S. cerevisiae* and *S. kluyveri* three copies of *PDC* are

reported (Hohmann, 1991; Møller et al., 2004), whereas *IPDC* is a single copy gene in *Leishmania* spp. (genome data at <http://www.genedb.org>) and in phytobacteria (Costacurta et al., 1994; Patten and Glick, 2002). We investigated the gene copy number in *P. serpens*. For this purpose *P. serpens* genomic DNA was digested

Table 6
GC content and codon usage indexes.

Organism	Gene	GenBank	GC ^a	GC3s ^b
<i>P. serpens</i>	PDC/lpdC	JN400885	0627	0849
<i>P. serpens</i>	gGAPDH	EU084892	0599	0758
<i>L. major</i>	PDC/lpdC	CAJ08046	0590	0801
<i>L. major</i>	GAPDH	XM_001684852	0617	0884
<i>Enterobacter cloacae</i>	lpdC	P23234	0567	0470
<i>Erwinia herbicola</i>	lpdC	ERWIPDC	0595	0617
<i>Aspergillus parasiticus</i>	PDC	P51844	0504	0523
<i>Rhizopus oryzae</i>	PDC	AF282846	0475	0446

^a GC content of the gene.^b GC3s index, G + C content at the third position of synonymous codons (excluding Met, Trp and termination codons).

with *Stu* I (position 961 of the gene, indicated in Fig. 1A) for 30 min or 16 h and hybridised with the 297-bp *PDC/IPDC* probe (Table 2; Fig. 4A). This probe identified a series of bands of similar intensity (a 2.5-Kb band, followed by five visible bands at multiples of 2.5 Kb) in the 30-min digested DNA (Fig. 4A, lane a) and a prominent 2.5-Kb band in the 16-hour digestion (Fig. 4A, lane b). This result is indicative of at least six tandemly-repeated gene copies.

Next the size and sequence of the intergenic region was determined. *P. serpens* genomic DNA was amplified with Ps.IPDC.U.For and Ps.IPDC.U.Rev primers (Table 2), localised, respectively on the 3' UTR of the gene and the 5' UTR of the putative contiguous gene (Fig. 4B). A product of ~900 bp was obtained, cloned and sequenced (GenBank JN400886 to JN400894). Sequence analysis of nine independent clones and alignment with the 3' and 5' *PDC/IPDC* UTRs indicated that the intergenic region is 124 bp in length. Three 3' UTR variants were obtained, differing at only three positions (Fig. 4C).

3.6. Relative abundance of *PDC/IPDC* transcripts

The relative abundance of *PDC/IPDC* transcripts in *P. serpens* and *L. major* was assessed by real time RT-PCR. To test the primer efficiencies, eightfold serial dilution series of linearised plasmids containing *P. serpens* or *L. major* *PDC/IPDC* or *gGAPDH* inserts were used to construct standard curves. The C_t values were plotted against the logarithm of their initial template copy concentrations. The standard curves were generated for each pair of primers by a

linear regression of the plotted points. From the slope of each curve, PCR amplification efficiency (E) was calculated according to Lee et al. (2008, and references therein). The efficiency of the target and reference gene amplifications were similar (data not shown) and could be used to calculate the delta C_t . cDNA extracted from *P. serpens* and *L. major* were used as template for the real time PCR assays. The C_t values obtained from the *PDC/IPDC* and *gGAPDH* were used to calculate the relative abundance of *PDC/IPDC* transcripts by the delta- C_t method. The results of three biological replicates indicate a 5.7-fold increase in the abundance of gene transcripts in *P. serpens* as compared with *L. major* (Table 7).

3.7. *PDC* activity in *P. serpens*

Although the production of ethanol has been reported in *Phytomonas* sp. cultured in glucose-rich medium (Chaumont et al., 1994), a *PDC* activity has not been demonstrated in these organisms. Accordingly, we measured *PDC* activity in the 16,000g supernatant of *P. serpens* extracts using a coupled photometric assay with ADH as an auxiliary enzyme. Plots of initial reaction rates versus pyruvate concentrations indicate classical Michaelis-Menten kinetics (Fig. 5). Based on the kinetic data, we determined that *P. serpens* *PDC* has a K_m value for pyruvate of 1.4 mM.

4. Discussion

Here we describe a gene in *P. serpens* encoding a *PDC/IPDC* enzyme potentially related to fermentation metabolism. We estimate that *P. serpens* contains at least six *PDC/IPDC* gene copies in tandem, separated by a small 124-bp intergenic sequence. The G + C content of the 1647-bp ORF is 62.5%, which is identical to the average G + C content reported for *L. major* protein-coding genes (Ivens et al., 2005). *P. serpens* *PDC/IPDC* protein has high similarity with the enzyme of three *Leishmania* species, *C. fasciculata* and bacterial *IPDCs*. No orthologous genes were found in the *T. cruzi* or *T. brucei* genomes, an intriguing observation as many protein-coding genes are conserved in the three trypanosomatid species (TriTryp, El-Sayed et al., 2005). Accordingly, this suggests a putative common origin of *Leishmania*, *Crithidia* and *P. serpens* gene.

PCR assays with two pairs of primers targeting the ThDP domains indicate conservation of the *PDC/IPDC* gene sequence in

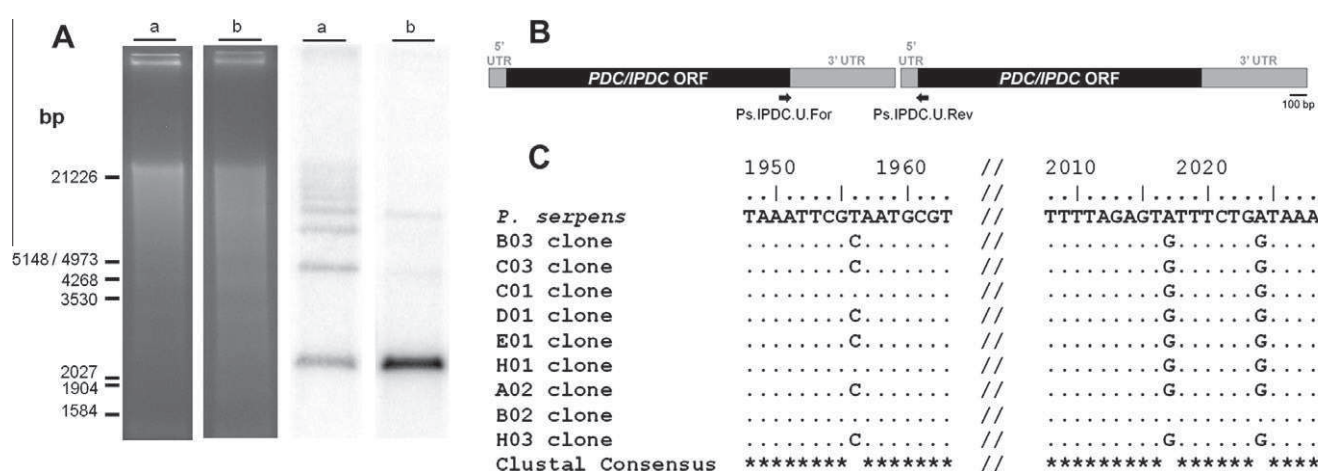


Fig. 4. Multiple copies of the *PDC/IPDC* gene. Panel A: Southern blot of *P. serpens* DNA digested with *Stu* I for 30 min (lane a) and 16 h (lane b). Ethidium bromide stained gel and hybridisation with the 297-bp *PDC/IPDC* ³²P-labelled probe. Molecular mass markers are indicated in bp. Exposure time in Phosphor Screen: 24 h. Panel B: Schematic representation of two tandem *P. serpens* *PDC/IPDC* genes. The localisation of the primers used for the amplification of the intergenic region is indicated. Panel C: Nucleotide sequence variation in the 3' UTR region of the *PDC/IPDC* gene copies. Nine positions derived from the amplification product obtained with Ps.IPDC.U.For and Ps.IPDC.U.Rev primers (Table 2), localised as indicated in Fig. 2B, were sequenced. The nt positions indicated in the upper line correspond to the sequence of the *P. serpens* *PDC/IPDC* gene (GenBank JN400885).

Table 7
Relative abundance of PDC/IPDC transcripts of *P. serpens* and *L. major*.

Biological replicate	cDNA	Target gene	C _t mean and SD ^a	ΔC _t and SD	2 ^{-ΔC_t}	Fold difference (<i>P. serpens</i> / <i>L. major</i>)	Mean fold difference and SD
1	<i>P. serpens</i>	PDC/IPDC	11.19 ± 0.058	-1.08 ± 0.18	2.13	5.3	5.73 ± 1.69
		GAPDH	12.27 ± 0.178				
	<i>L. major</i>	PDC/IPDC	15.59 ± 0.123	1.33 ± 0.14	0.4		
		GAPDH	14.26 ± 0.071				
2	<i>P. serpens</i>	PDC/IPDC	10.59 ± 0.07	-1.80 ± 0.09	3.5	7.6	
		GAPDH	12.39 ± 0.06				
	<i>L. major</i>	PDC/IPDC	15.76 ± 0.06	1.12 ± 0.08	0.46		
		GAPDH	14.65 ± 0.06				
3	<i>P. serpens</i>	PDC/IPDC	10.36 ± 0.07	-1.03 ± 0.08	2.05	4.3	
		GAPDH	11.39 ± 0.03				
	<i>L. major</i>	PDC/IPDC	15.67 ± 0.03	1.06 ± 0.10	0.48		
		GAPDH	14.61 ± 0.10				

^a SD: standard deviation.

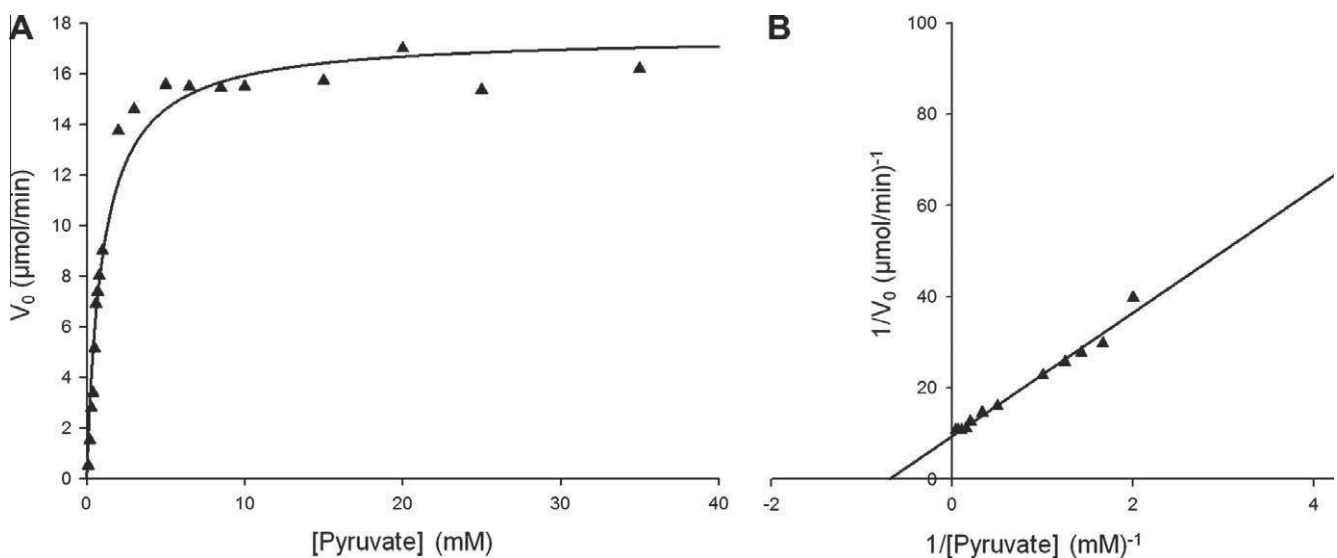


Fig. 5. Kinetics for PDC of *P. serpens*. The data represent mean results from triplicate determinations of PDC activity by the ADH coupled assay using 100 μg of the 16,000g supernatant of *P. serpens* sonicated cells. Panel A: Plot of initial reaction rate vs. substrate concentration. Panel B: Lineweaver-Burk plot of kinetic data.

14 analysed *Phytomonas* isolates of different origins. No amplification products in trypanosomatids of the genera *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas* and *Trypanosoma* were obtained.

The possible origin of the PDC/IPDC gene in *Phytomonas* was inferred from the phylogenetic analysis of protein sequences of IPDCs, IPDC/PPDCs and PDCs of bacteria, fungi and plants. In the process of sequence selection we verified that no IPDC sequences were annotated for fungi or plants, nor PDCs for Archaea. The lack of Archaea PDCs likely reflects the limited amount of data from these microorganisms in sequence databases.

The phylogenetic analyses revealed distinct clusters of plant, fungal and bacterial enzymes. *Phytomonas* PDC/IPDC was robustly monophyletic with the *Leishmania* and *C. fasciculata* enzymes. In the trees obtained by NJ, MP and ML this clade appeared as a sister group of IPDCs of the γ -proteobacteria *P. agglomerans*, *E. cloacae* and *P. putida*, with 98% bootstrap support in the MP tree. The proximity of the trypanosomatid enzymes with IPDCs of phytobacteria suggests a HGT event from a donor phytobacteria to a recipient ancestral trypanosome. We propose that this event occurred prior to the separation between *Phytomonas*, *Leishmania* and *Crithidia*.

Interestingly, two recent studies based on extensive phylogenetic analysis concluded that the genomes of trypanosomatids other than members of the genus *Trypanosoma* seem to have incorporated at least three γ -proteobacterial genes that encode

enzymes required for haeme biosynthesis (Kořený et al., 2010; Alves et al., 2011). The localisation of these genes in different *Leishmania* chromosomes is suggestive that more than one HGT event from γ -proteobacteria may have occurred before the diversification of non-*Trypanosoma* trypanosomatids.

In *Phytomonas* sp., as in the long-slender stages of African trypanosomes, both living in glucose-rich medium, ATP is produced via substrate level phosphorylation instead of the classical cytochrome-based respiratory chain (reviewed by Bringaud et al., 2006). The acquisition of a PDC activity by *Phytomonas* offers a parallel route to reoxidise part of the NADH instead of exclusive reliance on the plant-like alternative oxidase as previously proposed (Tielens and Van Hellemond, 1998). This leads to the possibility that higher glycolytic rates could be sustained in *Phytomonas* by alcoholic fermentation, where PDC converts the excess of pyruvate to acetaldehyde, which is subsequently reduced by an ADH to ethanol, with the concomitant regeneration of oxidative equivalents (NAD⁺). Here we report for the first time a PDC activity in *P. serpens* cell extracts. The enzyme displays a classical Michaelis-Menten kinetics with a Km value for pyruvate of 1.4 mM. The substrate affinity of *P. serpens* enzyme is very similar to the affinity for pyruvic acid of *S. cerevisiae* PDC (Km = 1.3 mM) and *E. cloacae* IPDC (Km = 2.5 mM) (Koga et al., 1992). *E. cloacae* enzyme also catalyses decarboxylation of indolepyruvate with a Km of 15 μM (Koga et al., 1992). We have tried to obtain the recombinant *P. serpens* enzyme

in order to perform more broad kinetic studies. The gene was successfully cloned and expressed in three different vector/bacterial systems. However in all cases the protein was produced as inclusion bodies most probably due to the presence of 16 cysteine residues. In the future other cloning and expression systems will be explored.

One attractive aspect to be considered is that *Phytomonas* putative ADH could be represented by an isopropyl alcohol dehydrogenase (iPDH) (Uttaro and Opperdoes, 1997) supposedly acquired by a HGT event from a strictly aerobic bacterium (Molinas et al., 2003). Interestingly iPDH activity was detected in 20 isolates of *Phytomonas* and was absent in the genera *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, and *Herpetomonas* (Uttaro et al., 1997).

At this point the functional relevance of the PDC/IPDC in *Leishmania* arises. The promastigote insect stage of these parasites relies on amino acid catabolism to obtain energy, whereas amastigotes proliferate in the lysosomal compartment of macrophages and prefer fatty acids as energy sources (Bringaud et al., 2006). Since, to our knowledge, no reports describe ethanol production in *Leishmania*, the PDC function in this genus is a matter that deserves further investigation. The 6-fold increase in the abundance of the PDC/IPDC gene copy number and corresponding transcripts in *P. serpens* as compared with *Leishmania* further supports that the acquisition of the PDC/IPDC gene represents an adaptive advantage for *Phytomonas* sp.

In addition to phylogenetic analyses, clues about HGT can be obtained following the examination of genome (A + T) content, GC content at first and third codon positions, dinucleotide frequencies, and synonymous codon usage (Lawrence and Ochman, 1997). The comparison of GC3s index and codon usage of *P. serpens* and *L. major* PDC/IPDCs genes with homologous genes of phyto bacteria and fungi does not support a recent HGT event. On the other hand, this seems to be the case of the acquisition of *Phytomonas* sp. iPDH gene (Molinas et al., 2003). We verified that the GC3s index of this gene is 0.602, which is lower than the GC3s index of *P. serpens* PDC/IPDC and *GAPDH* genes (0.849 and 0.758, respectively) and closer to the indexes of bacteria IPDCs (0.617 for *E. herbicola*). Criteria based on codon usage bias and differential base compositions have undergone several criticisms (Kuo and Ochman, 2009). Over time introgressed genes are subject to the same mutational pressures affecting all genes in the recipient genome (Lawrence and Ochman, 1998). In this way, these criteria may allow the identification of recent gene transfer events but are inefficient in detecting events that occurred a long time ago (Boto, 2010).

Among trypanosomatids, the genus *Phytomonas* is the only one found to be specifically adapted to infect plants. These hosts provide a particular habitat with a steady and plentiful supply of carbohydrates. Several molecular adaptations reflect *Phytomonas* mobilisation to this environment, such as high expression levels of at least two glucose transporter isoforms (Pappas et al., 2005) necessary for replenishing the intracellular carbohydrate pool for glycolysis. Notwithstanding, several HGT events seem to have mediated a systematic introduction of functional novelties along *Phytomonas* evolutionary record. The potential HGT process for the acquisition of PDC/IPDC and iPDH in *Phytomonas* increases the list of foreign genes that may have entered a trypanosomatid ancestor through lateral gene transfer, conferring adaptive advantages (Opperdoes and Michels, 2007). Alcoholic fermentation ensued from these events might have introduced an extensive metabolic adjustment, sustaining high glycolytic rates in anaerobic conditions. This might have significantly contributed to the adaptation to a unique environment for kinetoplastids and transition to obligate parasitism.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Dr. Marta M. G. Teixeira for providing *P. serpens* culture and DNA preparations of several trypanosomatids and to Dr. Lucile Floeter-Winter for providing *L. major* culture. We are grateful to Dr. Nancy Sturm for insightful suggestions. This work was supported by Grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil (BZ), Grant BIO2002-02228 of Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (AG). SI received a fellowship from FAPESP.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.meegid.2012.01.016.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Alves, J.M., Voegtly, L., Matveyev, A.V., Lara, A.M., da Silva, F.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Teixeira, M.M., Camargo, E.P., 2011. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS One* 6, e23518.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C., Eddy, S.R., 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32, D138–141.
- Baudoin, E., Lerner, A., Mirza, M.S., El Zemrany, H., Prigent-Combaret, C., Jurkevich, E., Spaepen, S., Vanderleyden, J., Nazaret, S., Okon, Y., Moënne-Loccoz, Y., 2010. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Res. Microbiol.* 161, 219–226.
- Boto, L., 2010. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc. R. Soc. B* 277, 819–827.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V., 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149, 1–9.
- Camargo, E.P., 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv. Parasitol.* 42, 29–112.
- Catarino, L.M., Serrano, M.G., Cavazzana, M.Jr., Almeida, M.L., Kaneshina, E.K., Campaner, M., Jankevicius, J.V., Teixeira, M.M., Itow-Jankevicius, S., 2001. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 65–72.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C., Cannata, J.J., 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 329–343.
- Chaumont, F., Schanck, A.N., Blum, J.J., Opperdoes, F.R., 1994. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 321–331.
- Conchon, I., Campaner, M., Sbravat, C., Camargo, E.P., 1989. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp. isolated and cultured from fruit. *J. Eukaryot. Microbiol.* 36, 412–414.
- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J., 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243, 463–472.
- Dollet, M., 1984. Plant diseases caused by flagellate protozoa. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22, 115–132.
- Drummond, A., Strimmer, K., 2001. PAL: an object-oriented programming library for molecular evolution and phylogenetics. *Bioinformatics* 17, 662–663.
- Duggleby, R.G., 2006. Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Acc. Chem. Res.* 39, 550–557.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A.N., Wortman, J.R., Alsmark, U.C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberg, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B., Stuart, K.D., Hall, N., 2005. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309, 404–409.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- Fiorini, J.E., Takata, C.S., Teófilo, V.M., Nascimento, L.C., Faria-e-Silva, P.M., Soares, M.J., Teixeira, M.M., De Souza, W., 2001. Morphological biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelssoni* camargoi n. subsp.

- a trypanosomatid isolated from the flower of the squash *Cucurbita moschata*. J. Eukaryot. Microbiol. 48, 62–69.
- Fitch, W.M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst. Zool. 20, 406–416.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696–704.
- Hall, T.A., 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98.
- Hohmann, S., 1991. Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 173, 7963–7969.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. Science 309, 436–442.
- Jankevicius, J.V., Jankevicius, S.I., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L.A., Teixeira, M.M.G., Freymuller, E., Camargo, E.P., 1989. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs) a trypanosomatid parasite of tomatoes. J. Protozool. 36, 265–271.
- Koga, J., Adachi, T., Hidaka, H., 1992. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. J. Biol. Chem. 267, 15823–15828.
- Koga, J., 1995. Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 1249, 1–13.
- Kořený, L., Lukes, J., Obornik, M., 2010. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? Int. J. Parasitol. 40, 149–156.
- Kuo, C., Ochman, H., 2009. Inferring clocks when lacking rocks: the variable rates of molecular evolution in bacteria. Biol. Direct 2009 4, 35.
- Lawrence, J.G., Ochman, H., 1997. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. J. Mol. Evol. 44, 383–397.
- Lawrence, J.G., Ochman, H., 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 9413–9417.
- Lee, C., Lee, S., Shin, S.G., Hwang, S., 2008. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 371–376.
- Marín, C., Alberge, B., Dollet, M., Pagès, M., Bastien, P., 2008. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). Genome 91, 88–93.
- Marín, C., Dollet, M., Pagès, M., Bastien, P., 2009. Large differences in the genome organization of different plant Trypanosomatid parasites (*Phytomonas* spp) reveal wide evolutionary divergences between taxa. Infect. Genet. Evol. 9, 235–240.
- Maslov, D.A., Nawathean, P., Scheel, J., 1999. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol. Biochem. Parasitol. 99, 207–221.
- Molinas, S.M., Altabe, S.G., Opperdoes, F.R., Rider, M.H., Michels, P.A., Uttaro, A.D., 2003. The multifunctional isopropyl alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. J. Biol. Chem. 278, 36169–36175.
- Møller, K., Langkjaer, R.B., Nielsen, J., Piskur, J., Olsson, L., 2004. Pyruvate decarboxylases from the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. Mol. Genet. Genomics 270, 558–568.
- Monier, A., Claverie, J.M., Ogata, H., 2007. Horizontal gene transfer and nucleotide compositional anomaly in large DNA viruses. BMC Genomics 8, 456.
- Muller, E., Gargani, D., Banuls, A.L., Tibayrenc, M., Dollet, M., 1997. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Parasitol. 115, 403–409.
- Nawathean, P., Maslov, D.A., 2000. The absence of genes for cytochrome *c* oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Curr. Genet. 38, 95–103.
- Opperdoes, F.R., Michels, P.A., 2007. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. Trends Parasitol. 23, 470–476.
- Page, R.D., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357–358.
- Pappas Jr., G.J., Benabdellah, K., Zingales, B., González, A., 2005. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol. Biochem. Parasitol. 142, 149–157.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3795–3801.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S., Schneider, G., 2003. Crystal structure of thiamin diphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae* an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 270, 2312–2321.
- Serrano, M.G., Nunes, L.R., Campaner, M., Buck, G.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M., 1999a. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. Exp. Parasitol. 91, 268–279.
- Serrano, M.G., Campaner, M., Buck, G.A., Teixeira, M.M., Camargo, E.P., 1999b. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. FEMS Microbiol. Lett. 176, 241–246.
- Spaepen, S., Versées, W., Gocke, D., Pohl, M., Steyaert, J., Vanderleyden, J., 2007a. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 189, 7626–7633.
- Sturm, N.R., Dollet, M., Lukes, J., Campbell, D.A., 2007. Rational sub-division of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp) based on minicircle conserved region analysis. Infect. Genet. Evol. 7, 570–576.
- Swofford, D. L., 2003. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Teixeira, M.M., Serrano, M.G., Nunes, L.R., Campaner, M., Buck, G.A., Camargo, E.P., 1996. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. Exp. Parasitol. 84, 311–319.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions – specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Tielens, A.G., Van Hellemond, J.J., 1998. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. Parasitol. Today 14, 265–272.
- Uttaro, A.D., Opperdoes, F.R., 1997. Purification and characterisation of a novel isopropyl alcohol dehydrogenase from *Phytomonas* sp. Mol. Biochem. Parasitol. 85, 213–219.
- Uttaro, A.D., Sánchez-Moreno, M., Opperdoes, F.R., 1997. Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. Mol. Biochem. Parasitol. 90, 337–342.

Anexo B - lenne, S., Freschi, L., Vidotto, V.F., Mercier, H., Purgatto, E., Zingales, B.
Indole-3-acetic acid and ethanol production by the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*.

Indole-3-acetic acid and ethanol production by the plant trypanosomatid
Phytomonas serpens

Susan Ienne^a, Luciano Freschi^b, Vanessa F. Vidotto^a, Helenice Mercier^b, Eduardo Purgatto^c, Bianca Zingales^a

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, 05508-000 Brazil

^b Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, travessa 14, 321, São Paulo, 05508-090 Brazil

^c Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 580, São Paulo, 05508-000 Brazil

1. INTRODUCTION

The flagellate protozoan *Phytomonas serpens* belongs to the Trypanosomatidae family, Kinetoplastida order. This order includes pathogens of invertebrates, vertebrates and plants. The genus *Phytomonas* designates trypanosomatids found in latex, phloem, fruits and seeds of several plant species and is thought to be transmitted by phytophagous insects (reviewed by Dollet, 1984; Camargo, 1999). Besides *Phytomonas*, other trypanosomatids of the genera *Leptomonas*, *Herpetomonas* and *Crithidia* have been isolated from fruits, seeds and flowers as the result of accidental inoculation into the insect feeding sites (Conchon et al., 1989). Accordingly, *Phytomonas* is considered the only kinetoplastid genus specifically adapted to infect plants.

Multiple horizontal gene transfer (HGT) events have been implicated in the acquisition of structural and functional characteristics of the trypanosomatids that allowed the adaptation of these organisms to a vast range of hosts (Opperdoes and Michels, 2007). In a previous study (Ienne et al., 2012) we have characterized the complete gene encoding a putative pyruvate/indolepyruvate decarboxylase (PDC/IPDC) of the tomato isolate *P. serpens*, which displays high amino acid sequence similarity with phytobacteria, and with the trypanosomatid *Leishmania* spp. and *Crithidia fasciculata* enzymes. A phylogenetic analysis showed that the clade that contains the trypanosomatid proteins appears as a sister group of IPDCs of γ -proteobacteria. We have proposed that the *PDC/IPDC* gene was acquired by an ancestral trypanosome by a HGT event from a donor phytobacteria. In that study we also measured PDC activity in the parasite cell extracts and speculated that the acquisition of this enzyme has conferred an adaptive advantage for survival in the rich carbohydrate medium of the plant host (see below).

PDCs and IPDCs display high structural similarities but participate in different metabolic pathways. PDC (EC 4.1.1.1) is a key enzyme in alcoholic fermentation, a pathway in which the pyruvate produced in glycolysis is converted into ethanol and carbon dioxide (Fig. 1A). IPDC (EC 4.1.1.74) is a key enzyme in the biosynthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) in many bacteria (reviewed by Costacurta and Vanderleyden, 1995; Patten and Glick, 1996; and Spaepen and Vanderleyden, 2010) (Fig. 1B). Of note is the fact that many bacterial IPDCs besides decarboxylating indolepyruvate can also decarboxylate pyruvate (Schütz et al., 2003; Fedorov et al., 2010). Thus Costelloe et al. (2008) warn that the PDC or IPDC

annotation can be cloudy. The PPDC (phenylpyruvate decarboxylase) of the phytobacterium *Azospirillum brasilense* and the branched-chain ketoacid decarboxylase from *Lactococcus lactis* can also use both phenylpyruvate and indolepyruvate in different pathways (Spaepen et al., 2007; Berthold et al., 2007). It is suggested that perhaps the promiscuous use of indolepyruvate by PPDC could lead to the emergence of the IPDC enzyme, after a gene duplication, although this is highly speculative (Costelloe et al., 2008). According, if duplication could have led to the adaptation to the use of different substrates, then nucleotide changes that resulted in conformational changes could have led to the emergence of bifunctional enzymes whose demand for metabolites in the organism could be channeled.

The possibility that *P. serpens* PDC/IPDC is a bifunctional enzyme is highly attractive because it could confer different adaptive characteristics. In the above mentioned study (Ienne et al., 2012) we suggested that the PDC activity, participating in alcoholic fermentation, would reoxidize a portion of the NADH produced in the very active glycolytic pathway (see Fig. 1A). This is particularly important since *Phytomonas* lacks a cytochrome-mediated respiratory chain and Krebs cycle, and ATP production relies predominantly on glycolysis (Maslov et al., 1999; Nawathean and Maslov, 2000). Now we hypothesize that the enzyme could also act in the generation of IAA, a phytohormone known to regulate many important processes of plant growth and development (Woodward and Bartel, 2005; Teale et al., 2006; Spaepen et al., 2007). According to this hypothesis the enzyme could also be important in the *Phytomonas*-plant interaction. The PDC or IPDC activities would be dictated by the substrates availability and/or regulation factors.

In this study, we provide evidence that *P. serpens* is able to produce IAA *in vitro* and *in vivo* following the infection of tomato fruits with the flagellates and show that the phytohormone is functional.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Conditioned culture media

P. serpens TCC 060 (Trypanosomatids Culture Collection of the Universidade de São Paulo) was kindly provided by Dr. Marta M. G. Teixeira (Instituto de Ciências Biológicas, USP). The flagellates were grown in Grace's insect medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Grace-FCS) at 28 °C. The initial inoculum was 1.5×10^7 cells/mL. Cell density was estimated in a Neubauer chamber. When specified, the medium was supplemented with tryptophan (Trp) or glucose (Glu). The conditioned medium was obtained from four-day cultures, when the flagellates reached the late exponential growth phase ($\approx 4 \times 10^7$ cells/mL). The cultures were centrifuged at $5,900 \times g$ at 4 °C for 7 min and the supernatant medium was filtered (0.22 μm pore diameter) for the elimination of parasites and cell debris. The medium was stored at -20 °C.

2.2. Quantification of IAA and its precursors in *P. serpens* conditioned media

For the analysis of IAA, Trp, tryptophol (Tol), indole-3-acetaldehyde (IAAld) and indole-3-pyruvic acid (IPyA), 1 mL medium was deproteinized with 4 mL methanol. The internal standard (IS) indole-propionic acid (10 μL of a 10 mg/mL solution) was added. The sample was centrifuged at $13,000 \times g$, at 25°C for 10 min. and the supernatant was concentrated to 1 mL under N_2 flow, filtered (0.45 μm) and transferred to the injection vial. The samples were analyzed in a HP-1100 liquid chromatograph (Hewlett-Packard, USA) equipped with a C18 Luna column (30 cm x 4 mm, 5 μm particle size; Supelco, Sigma-Aldrich, USA). The sample elution program started with methanol:1% acetic acid (20:80, v/v - initial) , followed by a linear gradient to 100:0 (v/v) in - 20 min. After that, the column was re-equilibrated for 10 min. in the initial condition before the next run. Injections (40 μL) were made by an automatic injector ALS-1100 (Hewlett-Packard). The analytes were monitored by UV absorbance (325 nm to IPyA) and fluorescence in a HP-1046A detector at 270 nm excitation wavelength (λ) and 350 nm emission. The concentrations of each compound in the samples were calculated through the ratio compound/IS. For each analyte calibration curves were made by the peak area ratio of the compound/IS *versus* the nominal amount (ng) of each standard.

2.3. Ethanol production in *P. serpens* conditioned culture media

For the ethanol quantification, 50 μL medium were deproteinized with 25 μL acetonitrile. Two microliters of n-propanol internal standard (8.05 mg/mL in acetonitrile) were added. The sample was centrifuged at 13,000 x g at 25°C for 10 min. The supernatant was transferred to the injection vial and analyzed by GC-FID (Gas Chromatograph - Flame Ionization Detector) on a gas chromatograph HP- 6890 (Hewlett-Packard). A Supelcowax column was used in the separations (30 m, I.D. 0.25 mm, 0.50 μm internal film thickness) with helium as carrier gas (1 mL/min. flow rate). The injections (3 μL) were made by an automatic injector ALS-7683 (Hewlett-Packard) in Splitless mode. The column was maintained at 35°C for 1 min., followed by a ramp temperature of 5°C/min. up to 150°C and 20°C/min. up to 250°C. The injector and detector temperature were 250°C and 200°C, respectively. The ethanol content of the samples was calculated by the area ratio of the compound and the area of the IS. A calibration curve that were calculated using the analyte/IS peak area ratios versus the nominal amount of the ethanol standard.

2.4. Plant material and growth conditions

Germination and cultivation of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) were performed *in vitro* according to Pino-Nunes et al. (2009) adapted method. The seeds, kindly provided by Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo), were sterilized with 95% ethanol for 30 seconds, transferred to a solution of sodium hypochlorite 50% for 15 min. and washed with sterile distilled water. For the hypocotyls bioassay, the seeds were inoculated in glass bottles containing 100 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with half the concentration of macronutrients and 0.2% Phytigel (Sigma-Aldrich) where they remained for 7 days under 12-hour photoperiod, light intensity of 200 $\mu\text{moles}/\text{m}^2 \cdot \text{seg}$ and constant temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$. For the tomato infections, the plants were grown from seeds in a greenhouse and kept under controlled conditions from the anthesis to the day of harvest (300 $\mu\text{moles}/\text{m}^2 \cdot \text{seg}$; 60 to 80% relative humidity; constant temperature of 25°C; 16/8h photoperiod).

2.5. Bioassay of IAA functionality

The bioassay was adapted from Kelly and Bradford (1986). Seven days after germination, the tomato seedlings had their hypocotyls removed and sliced into ≈ 12 mm

segments. The segments were washed in distilled water and their exact length was measured with a caliper rule. Each biological replicate contained 20 hypocotyl segments (technical replicates) that were placed in Petri dishes. The hypocotyls were submerged in 6 mL of filtered (0.22 μm pore diameter) *P. serpens* conditioned medium in the late exponential growth phase (4×10^7 cells/mL; item 2.1). Two controls were included: (i) Grace-FCS medium and (ii) Grace-FCS medium plus 9 mM IAA (Sigma-Aldrich). The closed Petri dishes were kept at room temperature (25°C) for 24 h, after which the length of the hypocotyls was measured. The results were subjected to statistical analysis (see below).

2.6. Infection of Micro-Tom tomatoes

Ripe red fruits (≈ 40 days after anthesis) were kept in the plant and were infected with *P. serpens* (10^7 cells) via needle inoculation, according to Jankevicius et al. (1989), with the following modifications. *P. serpens* cultures in the exponential growth phase were centrifuged at $5,900 \times g$, 4°C for 7 min. The flagellates were washed and resuspended in PBS 1x, and their density was estimated in a Neubauer chamber. The cell concentration was adjusted with PBS to 10^7 flagellates in 20 μL and the sample was inoculated in tomato fruits previously cleaned with 70% ethanol. Three controls were run in parallel. The fruits were injected with: (i) 20 μL PBS; (ii) 10^7 *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms in 20 μL PBS (parasites were kindly provided by Marcelo Nunes Silva, Instituto de Química, Universidade de São Paulo); and (iii) 1.34 μg of IAA (Sigma-Aldrich) in 20 μL of PBS. The inoculation site was sealed with warm melted paraffin to prevent secondary infections. After inoculation, the plants were kept in an incubator under controlled conditions as described above. Tomatoes were kept on the plants until the day of harvest. For each condition (PBS, *T. cruzi*, *P. serpens*, exogenous IAA), six tomatoes were selected (average weight of the pulp 1.8 g), three of each monitoring time (7 or 14 days) for IAA quantification.

2.7. Free and conjugated IAA quantification

In the assays, a total of 24 tomatoes were collected on the 7th or 14th days post-inoculation (pi). The fruits were weighed and the pericarp was extracted by passing through a sieve (approximately 0.07 mm pore), which retained the seeds and epicarp. The pulp was weighed (1.8 g average weight) and 10 μL aliquots were analyzed under an optical microscope, for the confirmation of infection either with *P. serpens* or *T.*

cruzi. The samples were frozen and kept at -80°C until use. For free and ester-conjugated IAA quantification, 200 mg of individual tomato pulp was homogenized in 1 mL isopropanol:acetic acid solution (95:5, v/v). One microgram of the internal standard [$^2\text{H}_5$]-IAA (D-IAA) (OlChemim, Czech Republic) was added to quantify the losses during the purification process. The mixture was kept under agitation at 4°C for 2 hours. The homogenate was centrifuged ($14,000 \times g$ for 10 min at 4°C) and the supernatant was divided into two equal portions, one for the analysis of free IAA, and the other for ester-conjugated analysis. The sample extraction was performed according to Ludwig-Müller et al. (2008) with the following modifications. For free IAA analysis, the fraction was dried under a nitrogen flow and the pH of the aqueous phase was adjusted to 3.0. Ethyl acetate was used for the removal (x) of the organic phase and the sample was taken up (x) in 20 μL methanol and methylated with 10 μL of trimethylsilyldiazomethane for 30 minutes at room temperature. The methylated sample was dried under a nitrogen flow, resuspended in 30 μL ethyl acetate and analyzed by GC-MS. For the ester-conjugated IAA quantification, 200 μL ultrapure water was added and alkaline hydrolysis was performed with an equal volume of 2 N NaOH for 1 h at room temperature as described by Chen et al. (1988). The hydrolysate was diluted with 500 mM phosphate buffer (pH 2.0), titrated to pH 2.5 with 1 N HCl and fractionation with ethyl acetate and methylation were performed as described for free IAA fraction. The quantification of amide-conjugated IAA was performed according to Chen et al. (1988), adapted by Purgatto et al. (2002). Briefly, 500 mg of individual tomato extracts were homogenized in extraction solution (65% isopropanol with 0.2 M imidazole, pH 7.0). One microgram of the same D-IAA internal standard was added. The samples were centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min. at 4°C and the supernatant was collected. Alkaline hydrolysis was obtained with 7 N NaOH at 100°C for 3 h. Then, pH was titrated to pH 2.5. The extract was applied to a pre-conditioned solid phase extraction column (Supelclean LC18 – Supelco, Sigma-Aldrich, USA, washed sequentially with hexane, methanol, water, and 1% acetic acid in water, 5 mL each) and eluted with 3 mL acetonitrile. The eluate was diluted with 0.02 M Imidazole buffer pH 7.0 and applied to the preconditioned aminopropyl cartridge Supelclean LC-NH₂–Supelco with hexane, acetonitrile, water, 200 mmol/L, pH 7.0 imidazole buffer (2mL each) and 10 mL of water)After the sample loading, the column was washed sequentially with hexane, ethyl acetate, acetonitrile and methanol (2 ml each) and the IAA-containing fraction was eluted with 6 ml acidic methanol (2% acetic acid v/v). The sample was dried under a

nitrogen flow, resuspended in 100 μ L methanol, dried again to 20 μ L methanol final volume. The sample methylation was performed as described above for free IAA quantification. Samples were analyzed by GC-MS-SIM (gas chromatography-mass spectrometry selected ion monitoring). The separation column was a HP-1701 (30 m, 0.25 mm I.D., 50 μ m film thickness), with helium as carrier gas at flow rate of 1 mL/min. Ions were monitored at m/z 130 and 189, corresponding to quinolinium and molecular ion of IAA, respectively, and 135 and 194, the equivalent ions of the labeled internal standard. The corresponding IAA areas on the extracted chromatograms at m/z 130 and 135 were used to calculate the endogenous amount of IAA. The chromatograms extracted at m/z 189 and 194 were used for confirmation.

2.8. Statistical analysis

In the bioassay to determine IAA functionality the data regarding the length of the hypocotyls were analyzed with SigmaPlot (version 11.0, Systat Software, USA) to determine the significance using paired observations (paired t test). The test was applied with a confidence level of 95% ($p = 0.05$) to accept the null hypothesis (H_0 : there is no significant difference in the lengths of hypocotyls before and after the test).

Data regarding the quantification of free and conjugated IAA were subjected to statistical analysis (SigmaPlot) to determine the significance of the results (Mann Whitney test).

2.9. Characterization of kinetic parameters of PDC/IPDC in *P. serpens* extracts

PDC activity was assayed in *P. serpens* semi-purified extracts as previously described (Ienne et al., 2012). The kinetics of enzymatic activity was determined in a coupled photometric assay with the auxiliary enzyme alcohol dehydrogenase (ADH). The reaction mixture (1 mL) contained 10 mM potassium phosphate, pH 6.5; 5 mM $MgCl_2$; 0.35 mM NADH; 0.1 mM thiamin diphosphate (ThDP); 10 U *S. cerevisiae* ADH; 100 μ g protein *P. serpens* extracts and different pyruvic acid concentrations. In some assays IPyA was also added at 1 or 2 mM concentrations. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich. NADH oxidation was followed at 366 nm with a Cary Win UV spectrophotometer (Varian Inc.) to reduce the interference of IPyA that absorbs at 340 nm (Schütz et al. 2003). The reaction was followed for 10 min at 25°C. The Michaelis constant (K_M) and K_M^{app} (apparent K_M) were determined with SigmaPlot.

3. RESULTS

3.1. Quantification of IAA and its precursors in *P. serpens* conditioned culture media

We measured the concentration of IAA and its precursors in *P. serpens* conditioned culture medium. For this purpose independent cultures of the trypanosomatid were grown in Grace-FCS medium; Grace-FCS supplemented with two Trp concentrations (0.5 g/L and 2.5 g/L); and Grace-FCS supplemented with two Glu concentrations (3.5 and 17.5 g/L). After for four days culturing (late exponential growth phase), the conditioned culture media (biological triplicates and technical duplicates of each biological sample) were analyzed by HPLC to quantify the presence of IAA (Figure 2A) and its precursors (Table 1). Addition of 0.5 g/L and 2.5 g/L Trp, known substrate of the biosynthetic pathway of IAA in bacteria (Figure 1B), promoted an increase of 8.4- and 20.6-fold, respectively, in the IAA concentration in relation to the control medium. Very poor increment of IAA production was observed following the addition of Glu (3.5 g/L and 17.5 g/L) (Fig. 2A). The concentrations of two IAA precursors IPyA and Tol (see Figure 1B) were also measured (Table 1). The data indicated that the addition of Trp besides stimulating the production of IAA also increased Tol accumulation in the media, whereas IPyA concentration remained constant. A 25-fold increase in Glu concentration in the medium (17.5 g/L) promoted 1.8- and 2.4-fold enhance of IAA and Tol accumulation, respectively, in the medium. The non-variation of IPyA concentration in the experiments as well as the absence of IAAlD in the media may be related to the instability or rapid conversion of these compounds (Moore and Shaner, 1968; Gibson et al., 1972; Koga et al., 1992).

3.2. Ethanol production in *P. serpens* conditioned culture media

Once the production of ethanol by *Phytomonas* cultured in glucose-rich media has been documented (Sanchez-Moreno et al., 1992; Chaumont et al., 1994), we quantified this compound in the above-mentioned conditioned media (Figure 2B; Table 1). As expected, a 5-fold increase of Glu concentration (from 0.7 to 3.5 g/L) stimulated about 6-fold the ethanol production. Further increase to 17.5 g/L Glu promoted very slight increment in ethanol accumulation. In turn, 5- and 25-fold increase of Trp concentration caused, respectively, 1.5 and 2.0-fold increment of ethanol production. Of

note the ethanol concentration in control Grace-FCS conditioned medium is 10^4 -fold higher than that of IAA.

3.3. Bioassay of the functionality of the IAA produced *in vitro*

The activity of IAA present in 6 mL *P. serpens* conditioned medium, corresponding to 4×10^7 cells/mL, on the growth of one week old Micro-Tom hypocotyls was evaluated. The hypocotyl length was measured after 24 hour incubation at room temperature with Grace-FCS and *P. serpens* conditioned media (Table 2). *P. serpens* medium promoted about 13% increase (significant; *t* values on Table 2) of the hypocotyls' length as compared to the control (0.9% increase; not significant). In addition the hypocotyls incubated with *P. serpens* medium, but not with Grace-FCS showed a curvature, which is a typical response to IAA (Kelly and Bradford, 1986) (Figure 3 A and B).

As an additional control, the hypocotyl elongation response was evaluated following incubation in Grace-FCS medium supplemented with 9 μ M exogenous IAA. This concentration was calculated based on the amount of IAA accumulated in *P. serpens* conditioned medium (4 μ g/ 10^8 cells, see Table 1) and adjusted to the conditioned medium used in this assay (4×10^7 cells/mL \approx 1,6 μ g IAA/mL \approx 9 μ M IAA). Exogenous IAA promoted a \sim 10% hypocotyls growth stimulation (*t* = 6.37; Table 2) and typical curvature (Figure 3C). These data indicate that IAA produced by *P. serpens* is functional.

3.4. IAA production in *P. serpens* infected tomatoes

Next we evaluated the IAA production in Micro-Tom tomatoes inoculated with 10^7 *P. serpens* cells and kept in the plant. As controls the fruits were alternatively inoculated with 10^7 *T. cruzi* cells, PBS or 1.34 μ g exogenous IAA. IAA concentration was calculated based on the total amount of IAA (free + ester + amide) found in a pilot trial of tomatoes infected with 10^6 *P. serpens* cells for 14 days (\approx 1.34 μ g in 5 g of tomato). The plants were maintained in a greenhouse under controlled conditions up to 14 days. No visible morphological alterations in the plants or fruits were observed along this period. On the 7th and 14th day pi, the fruits were harvested, weighed and the pulp (pericarp without epicarp) was extracted by passage through a sieve. Data in Table 3 indicate no significant variation in the amount of free IAA in the control and injected tomato fruits on the 7th and 14th days pi. On the other hand, the amide- and ester-

conjugated IAA amounts were significantly increased in the fruits injected with *P. serpens* or exogenous IAA, as compared to the PBS control and *T. cruzi* inoculation (see *p* values in Table 4).

The most pronounced IAA increment was observed for the amide-conjugated (≈ 3.2 -fold in relation to the PBS control) and ester-conjugated (≈ 2.7 -fold) in *P. serpens* infected fruits and amide-conjugated (≈ 2.7 -fold) in exogenous IAA injected fruits on the 14th day pi. For better visualization, in Figure 4 we compiled the ratio of free, amide- and ester-conjugated IAA of the tomatoes inoculated with *T. cruzi*, *P. serpens* or exogenous IAA on the 14th day pi in relation to the amounts found in the PBS controls.

3.5. Characterization of PDC activity in *P. serpens* cell extracts

PDC participates in the alcoholic fermentation pathway responsible for ethanol production (Fig. 1A). PDC activity was measured in *P. serpens* cell extracts. As we have previously reported (Ienne et al., 2012), the enzyme shows a typical Michaelis-Menten behavior (Fig. 5) with a K_M value for pyruvate of 1.4 mM (Table 5). To obtain preliminary indication that the PDC/IPDC enzyme could be bifunctional, PDC activity was determined in the presence of 1 or 2 mM indole-3-pyruvate (IPyA). Figure 5 depicts the kinetics of PDC activity in the presence of 2 mM IPyA (K_M^{app} of 9.3 mM). Lineweaver-Burk plot indicated that this compound acts as a competitive inhibitor of PDC activity, increasing the K_M for pyruvate with no alteration on V_{max} . The effect on the K_M for pyruvate in the presence of 1 and 2 mM IPyA is shown in Table 5.

4. DISCUSSION

Here we report that the plant trypanosomatid *P. serpens* is capable of producing IAA and associate such capacity to the presence of a *PDC/IPDC* gene in its genome. This gene was previously linked to ethanol production (Ienne et al., 2012), participating in the alcoholic fermentation, reoxidizing a portion of the NADH produced in the very active glycolytic pathway. Now, we hypothesized that the same gene could also act as an IPDC, well characterized in many phytobacteria as a key enzyme in the biosynthetic pathway of the IAA phytohormone.

The IAA production was evaluated in *P. serpens* conditioned media containing different concentrations of Trp or glucose. We found a positive correlation between the addition of exogenous Trp (0.5 and 2.5 g/L), known substrate of IAA biosynthesis pathway in bacteria, and the proportional increase of IAA produced (8.4- and 20.6-fold). This phenomenon is analogous to that observed for many other microorganisms that carry the *IPDC* gene, for example *Acetobacter diazotrophicus* (Patil et al., 2010), *Azotobacter* spp. (Ahmad et al., 2005), *Pseudomonas* spp. (Ahmad et al., 2005; Karnwal, 2009) and *Azospirillum* spp. (Bashan e de-Bashan, 2010). The data indicated that the addition of Trp besides stimulating the production of IAA also increased the amount of its intermediary, Tol, in the culture media. The low amounts of IPyA in *P. serpens* media are a strong evidence of a functional *IPDC* in this organism, since this enzymatic activity would convert IPyA into IAAld, Tol and IAA. According to Koga et al. (1991, 1992), IAA biosynthesis in bacteria involves the generation of Tol, whereas spontaneous degradation of Trp, which may lead to IAA, does not generate Tol. Our findings represent the first evidence that *P. serpens* produces IAA and indicates an active role of an *IPDC* in this organism.

Given that *P. serpens* produces ethanol in glucose-rich media (Sánchez-Moreno et al., 1992; Chaumont et al., 1994) we decided to quantify this compound in the same media as for IAA detection. The data show the accumulation of ethanol in the *P. serpens* conditioned media, and shows that increasing the concentration of glucose in the medium from 0.7 to 3.5 g/L stimulates about 6-fold the ethanol production. The high ethanol production by *P. serpens* is justified by its deficient respiratory chain, with ATP production dependent mainly on glycolysis (Maslov et al., 1999; Nawathean and Maslov, 2000). Thus, its metabolism is essentially fermentative with pyruvate been decarboxylated by a PDC to acetaldehyde, which is subsequently reduced by an ADH to

ethanol, with the concomitant regeneration of oxidative equivalents (NAD⁺) (Ienne et al, 2012).

The functionality of IAA produced by *P. serpens* was evaluated in the elongation of Micro-Tom hypocotyls. This test has the advantage of being simple and fast, with visible and measurable results. The elongation of hypocotyls (about 13% increase) incubated with *P. serpens* medium, associated with its curvature, are responses of IAA action, and indicate that the phytohormone produced by *P. serpens* is functional. The auxins main action on the growth of stem tissue is determined by weakening the links in the cell walls resultant, among others, of the xyloglucan endotransglucosylase enzyme activation (Catalá et al., 2001; reviewed by Cosgrove, 2005), leading to a longitudinal length increase in the hypocotyl cells (without cell division) and the hypocotyl curvature, a typical response to IAA phytohormone, promoted by the unequal distribution of IAA receptors (Kelly and Bradford, 1986; reviewed by Woodward and Bartel, 2005, and Wolters and Jürgens, 2009).

The Micro-Tom (MT) cultivar makes it possible to combine the direct benefits of studying a crop species with the fast life cycle and small size required for a suitable biological model (Campos et al. 2010). To our knowledge, this cultivar has never been used for infection with *P. serpens*, but offered the advantage of carrying out infection tests in fruits attached to the plant, providing a greater control of the developmental stage and nutritional and climate conditions to which these fruits are exposed, thereby avoiding contact with phytophagous insects. At the end of the monitoring time we verified that the infection does not promote morphological changes in plants and fruits in general as observed in other tomato varieties (Jankevicius et al. 1988; Jankevicius et al., 1989, Camargo et al. 1990). On the other hand, Sanchez-Moreno et al. (1995) reported finding *P. serpens* in fruits of tomato and anona deformed and with altered pigmentation of the epicarp (yellow points) and that had a tendency to fall before ripening. In tomatoes infected by us, all fruits were picked and did not fall spontaneously from plants.

For the Ailsa Craig and Pik-Red tomato varieties, IAA levels in ripe fruit pericarp varies 2-5 ng/g (Buta and Spaulding, 1994), while for Micro-Tom we found values between 23.3 and 32.5 ng/g in PBS inoculated controls, indicating considerable differences in the IAA levels according to the tomato cultivar.

PBS inoculated tomatoes served as negative control instead of healthy tomatoes to avoid distortions in the results caused by the injections. The positive control

inoculated with exogenous IAA showed that the free hormone can be conjugated when in excess in the fruits. The negative control represented by *T. cruzi* infection resulted in IAA levels similar to the PBS controls. Although belongs to the same family of *P. serpens*, *T. cruzi* not have the *PDC/IPDC* gene (see Ienne et al., 2012), which confirmed that the phytohormone production was due to the active production by *P. serpens*.

Most of the plant IAA is conjugated to a variety of amino acids, peptides, sugars and myo-inositol (Cohen and Bandurski, 1982; Normanly, 1997). These conjugates may play different roles, being involved in the IAA transport, storage, protection against degradation, catabolism and control of phytohormone levels (Cohen and Bandurski, 1982; revised by Spaepen et al., 2007). In fact, once conjugated, IAA can be catabolized or stored for subsequent hydrolysis (Catala et al., 1992; Normanly and Bartel, 1999). The ester-IAA can be either mobilized to the free form or moved to the amide conjugated form (Catala et al., 1992). Moreover, the amide-IAA can also be formed directly from the free IAA (Cohen and Bandurski, 1982; Normanly, 1997). It is believed that the amide form is a precursor for the phytohormone degradation, although it has been observed that this form can generate free hormone, but it is unclear whether this contributes significantly to the IAA regulation levels in the cell (Normanly, 1997). We verified that the *P. serpens* presence determines an increase in conjugated IAA amounts in infected fruits, suggesting that the trypanosomatid is contributing to the phytohormone production, which is stored in amide and ester conjugated form. Purgatto Purgatto et al. (2002) observed an analogous phenomenon when infiltrated IAA into banana slices throughout the ripening stage. In this case, the fruit readily reacted conjugating the hormone excess, probably to avoid compromising the viability of the fruit. Probably this also occurs in the tomato fruits, since during the ripening process the IAA levels begin to fall to very low levels (Buta and Spaulding, 1994).

We found no sequence similarity to authentic PDCs or IPDCs besides the *PDC/IPDC* gene identified by us, querying *Phytomonas* spp. sequences deposited in databases and information on the chromosomal constitution of this organism (Marín et al., 2008) with ThDP signature of *Aspergillus parasiticus* *PDC* (GenBank P51844) and *E. cloacae* *IPDC* (GenBank P23234). This signature is conserved in all ThDP dependent enzymes and begins with the -GDG- residues and ends with -NN- in the C-terminal region of the enzyme and corresponds to the binding site of Mg^{2+} and the diphosphate portion of ThDP (Hawkins et al., 1989; Koga et al., 1992; Koga, 1995; Schutz et al., 2003). Knowing that many bacterial IPDCs besides decarboxylating

indolepyruvate can also decarboxylate pyruvate (Schütz et al., 2003; Fedorov et al., 2010), this led us to hypothesize that the PDC/IPDC is a bifunctional enzyme whose demand for metabolites in the organism could be channeled: with more Trp in the medium, the enzyme would act as IPDC, and if more glucose, as a PDC.

The PDC activity was assessed in *P. serpens* semi-purified extracts in the presence and absence of indolepyruvate. The enzyme affinity for the pyruvate substrate is very similar to the affinity of *S. cerevisiae* PDC ($K_M = 1.3$ mM) and *E. cloacae* IPDC ($K_M = 2.5$ mM) for pyruvate (Koga et al., 1992). We conclude that the indolepyruvate is a competitive inhibitor of the PDC activity in *P. serpens* extracts, decreasing the affinity of the enzyme for the pyruvate substrate, possibly by binding to the active site of the enzyme, supporting the hypothesis that the PDC/IPDC is a bifunctional enzyme.

Our data set allows us to infer that *P. serpens* could channel the demand for metabolites adapting the use of different substrates, pyruvate and indolepyruvate, by the same enzyme. The PDC activity clearly could serve their own benefit, regenerating the NAD^+ needed to sustain high glycolytic rates. In turn, the IPDC activity, which culminates in the production of an important plant hormone, deserves future research attention whether this phytohormone have an active and beneficial role in plant-trypanosomatid interaction, leading to a symbiotic relationship, or whether the auxin production would not generate benefit for the plant, and then *Phytomonas* would be an endophytic organism keeping with its host a relationship of commensalism. Both hypotheses are equally interesting, in terms of deepening understanding of the *Phytomonas*-plant interaction, and in the understanding of which mechanisms *Phytomonas* could use to circumvent the plant innate immunity triggered in response to the infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to Dr. Marta M. G. Teixeira for providing *P. serpens* culture and Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres for providing the Micro-Tom seeds. This work was supported by grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). This work was supported by grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil (BZ). SI received a fellowship from FAPESP.

REFERENCES

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol.* 2005;29:29-34.
- Bashan Y, de-Bashan LE. Chapter Two: How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 2010;108:77–136.
- Berthold CL, Gocke D, Wood MD, Leeper FJ, Pohl M, Schneider G. Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carboligation reaction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63(Pt 12):1217-24.
- Buta JG, Spaulding DW. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. *J Plant Growth Regul.*, 1994;13:163-6.
- Camargo EP, Kastelein P, Roitman I. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitol Today.* 1990;6(1):22-5.
- Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999;42:29-112.
- Campos ML, Carvalho RF, Benedito VA, Peres LE. Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signal Behav.* 2010;5(3):267-70.
- Catalá C, Ostin A, Chamarro J, Sandberg G, Crozier A. Metabolism of indole-3-acetic acid by pericarp discs from immature and mature tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Physiol.* 1992;100(3):1457-63.
- Catalá C, Rose JK, York WS, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB. Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. *Plant Physiol.* 2001;127(3):1180-92.
- Chaumont F, Schanck AN, Blum JJ, Opperdoes FR. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67(2):321-31.
- Chen KH, Miller AN, Patterson GW, Cohen JD. A Rapid and Simple Procedure for Purification of Indole-3-Acetic Acid Prior to GC-SIM-MS Analysis. *Plant Physiol.* 1988;86(3):822-5.
- Cohen JD, Bandurski RS. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol.* 1982;33:403-30.

- Conchon I, Campaner M, Sbravat C, Camargo E P. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1989;36:412-4.
- Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):850-61.
- Costacurta A, Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 1995;21(1):1-18.
- Costelloe SJ, Ward JM, Dalby PA. Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family. *J Mol Evol.* 2008;66(1):36-49.
- Dollet M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1984;22:115-32.
- Fedorov DN, Doronina NV, Trotsenko YA. Cloning and characterization of indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochemistry (Mosc).* 2010;75(12):1435-43.
- Gibson RA, Schneider EA, Wightman F. Biosynthesis and Metabolism of Indol-3yl-acetic acid: II. In vivo experiments with ¹⁴C-labelled precursors of IAA in tomato and barley shoots. *J Exp Bot.* 1972;23:381-99.
- Hawkins CF, Borges A, Perham RN. A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* 1989;255(1):77-82.
- Lenne S, Pappas G Jr, Benabdellah K, González A, Zingales B. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Infect Genet Evol.* 2012. In press. [doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.016]
- Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, do Carmo JB, Dutra-Menezes MC, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Csekö YM; Borges MB; Moreira N. Ciclo biológico de *Phytomonas* [Biological cycle of *Phytomonas*]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83(Suppl 1):601-10.
- Jankevicius JV, Jankevicius SI, Campaner M, Conchon I, Maeda LA, Teixeira MMG, Freymuller E, Camargo EP. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *J. Protozool.* 1989;36:265-271.
- Karnwal, A. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *J Plant Pathol.* 2009;91(1):61-3.
- Kelly MO, Bradford KJ. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. *Plant Physiol.* 1986;82(3):713-7.
- Koga J. Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1995;18:1249(1):1-13.

- Koga J, Adachi T, Hidaka H. IAA Biosynthetic Pathway from Tryptophan via Indole-3-pyruvic Acid in *Enterobacter cloacae*. Agric. Biol. Chem., v. 55, p. 701-706, 1991.
- Koga J, Adachi T, Hidaka H. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. J Biol Chem. 1992;267(22):15823-8.
- Ludwig-Müller J, Georgiev M, Bley T. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. Process Biochem. 2008;43(1):15-23.
- Marín C, Alberge B, Dollet M, Pagès M, Bastien P. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). Genomics. 2008;91(1):88-93.
- Maslov DA, Nawathean P, Scheel J. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol Biochem Parasitol. 1999;99(2):207-21.
- Moore TC, Shaner CA. Synthesis of indoleacetic acid from tryptophan via indolepyruvic acid in cell-free extracts of pea seedlings. Arch Biochem Biophys. 1968;127(1):613-21.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-97.
- Nawathean P, Maslov DA. The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Curr Genet. 2000;38(2):95-103.
- Normanly J. Auxin metabolism. Physiol Plant. 1997;100:431-42.
- Normanly J, Bartel B. Redundancy as a way of life - IAA metabolism. Curr Opin Plant Biol. 1999;2(3):207-13.
- Opperdoes FR, Michels PA. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. Trends Parasitol. 2007;23(10):470-6.
- Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol. 1996;42(3):207-20. Review.
- Pino-Nunes LE, de O. Figueira AV, Tulmann Neto A, Zsögön A, Piotto FA, Silva JA, Bernardi WF, Peres LEP. Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato 'Micro-Tom'. Acta Hort. (ISHS) 2009;821:63-72.
- Purgatto E, Nascimento JRO, Lajolo FM, Cordenunsi BR. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. J Plant Physiol. 2002;159:1105-11.

Sanchez-Moreno M, Lasztity D, Coppens I, Opperdoes FR. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Mol Biochem Parasitol. 1992;54(2):185-99.

Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra C, Mascaro C, Rosales MJ, Dollet M, Osuna A. Isolation, in vitro culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Anona cherimolia*) in southeastern Spain. Parasitol Res. 1995;81(7):575-81.

Schütz A, Golbik R, Tittmann K, Svergun DI, Koch MH, Hübner G, König S. Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. Eur J Biochem. 2003;270(10):2322-31.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev. 2007;31(4):425-48.

Spaepen S, Vanderleyden J. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010. [doi: 10.1101/cshperspect.a001438]

Teale WD, Paponov IA, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(11):847-59.

Wolters H, Jürgens G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. Nat Rev Genet. 2009;10(5):305-17.

Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot. 2005;95(5):707-35.

TABLES

Table 1. Presence of IAA, its precursors and ethanol in *P. serpens* conditioned media^a.

Grace-FCS Medium	IAA (μg)	IPyA (μg)	Tol (μg)	Ethanol (mg)
Control	4.1 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4	5.4 \pm 0.5	36.04 \pm 6.31
+ Trp 0.5 g/L	34.5 \pm 3.6	0.6 \pm 0.2	15.4 \pm 2.02	58.98 \pm 9.79
+ Trp 2.5 g/L	84.8 \pm 4.6	1.1 \pm 0.5	52.9 \pm 2.2	81.97 \pm 11.39
+ Glu 3.5 g/L	4.24 \pm 0.64	0.19 \pm 0.04	12.35 \pm 2.03	238.74 \pm 34.62
+ Glu 17.5 g/L	7.27 \pm 1.19	0.32 \pm 0.19	12.87 \pm 1.84	289.07 \pm 37.98

^aData represent the mean \pm standard deviation of biological triplicates and refer to 4-day cultures containing a total amount of 10^8 parasites.

Table 2. Effect of *P. serpens* conditioned medium on Micro-Tom hypocotyls elongation^a.

Biological Replicate	Incubation time	Grace-FCS medium								
		control			<i>P. serpens</i> conditioned			+ 9 μM IAA		
		length (mm)	%^c	paired <i>t</i> test^d	length (mm)	%^c	paired <i>t</i> test	length (mm)	%^c	paired <i>t</i> test
1	T₀	12.32 (0.07) ^a	--	$t = 2.03$;	12.19 (0.05)	--		11.98 (0.08)	--	
	T₂₄^b	12.43 (0.09)	0.9	NS	14.01 (0.22)	14.8	$t = 8.88$; S	13.17 (0.17)	9.9	$t = 6.37$; S
2	T₀	12.25 (0.05)	--	$t = 2.46$;	12.38 (0.09)	--				
	T₂₄^b	12.45 (0.07)	1.63	NS	13.80 (0.19)	11,47	$t = 9.45$; S		ND ^e	

^aThe data represent the average of 20 hypocotyl segments (technical replicates) in each condition: control, *P. serpens* and exogenous IAA. Standard error is indicated in parentheses.

^bIncubation for 24 h.

^cPercentage of length increase in relation to T₀.

^dcritical $t = 2.86094$. NS: Not significant; S: Significant.

^enot determined.

Table 3. Quantification of free and conjugated IAA (amide and ester) in tomatoes collected on the 7th and 14th days after injection with PBS, 10⁷ *T. cruzi* cells, 10⁷ *P. serpens* cells or 1.34 µg exogenous IAA. Values in nanograms per gram of pericarp. The mean and standard deviation are shown.

	PBS		<i>T. cruzi</i>		<i>P. serpens</i>		exogenous IAA	
	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days
free IAA	23.29 ± 4.24	32.56 ± 10.56	18.28 ± 5.56	24.43 ± 2.07	18.21 ± 0.12	20.61 ± 5.90	35.18 ± 10.09	24.43 ± 5.27
IAA-amide	14.17 ± 4.69	13.97 ± 1.97	12.45 ± 5.81	18.72 ± 2.58	49.86 ± 7.84	44.29 ± 2.29	52.09 ± 11.59	38.54 ± 4.77
IAA-ester	31.26 ± 2.44	39.89 ± 2.60	29.00 ± 8.21	45.83 ± 5.30	78.02 ± 13.52	106.63 ± 9.50	104.71 ± 34.22	54.69 ± 14.69

Table 4. Mann-Whitney test applied to free and conjugated IAA amount data shown in Table 3. Confidence interval of 95% ($p = 0.05$). The p value and the significance conclusion in relation to the PBS controls are indicated.

		<i>T. cruzi</i>	<i>P. serpens</i>	exogenous IAA
7 days	free IAA	0.282; NS ^a	0.1; NS	0.133; NS
	IAA-ester	1.0; NS	0.004; S ^b	0.021; S
	IAA-amide	0.71; NS	0.002; S	0.006; S
14 days	free IAA	0.254; NS	0.333; NS	0.319; NS
	IAA-ester	0.157; NS	<0.001; S	0.4; NS
	IAA-amide	0.2; NS	<0.001; S	0.007; S

^a NS: Not significant

^b S: Significant

Table 5. K_M of PDC activity in *P. serpens* cell extracts in the absence or presence of two IPyA concentrations. The data represent the mean results from duplicate determinations.

Experimental condition	K_M (mM) in <i>P. serpens</i> lysates	K_M (mM) in the recombinant enzyme
control	1.4	0.8
+ 1 mM IPyA	4.0	2.6
+ 2 mM IPyA	9.3	ND ^a

^a not determined

FIGURES

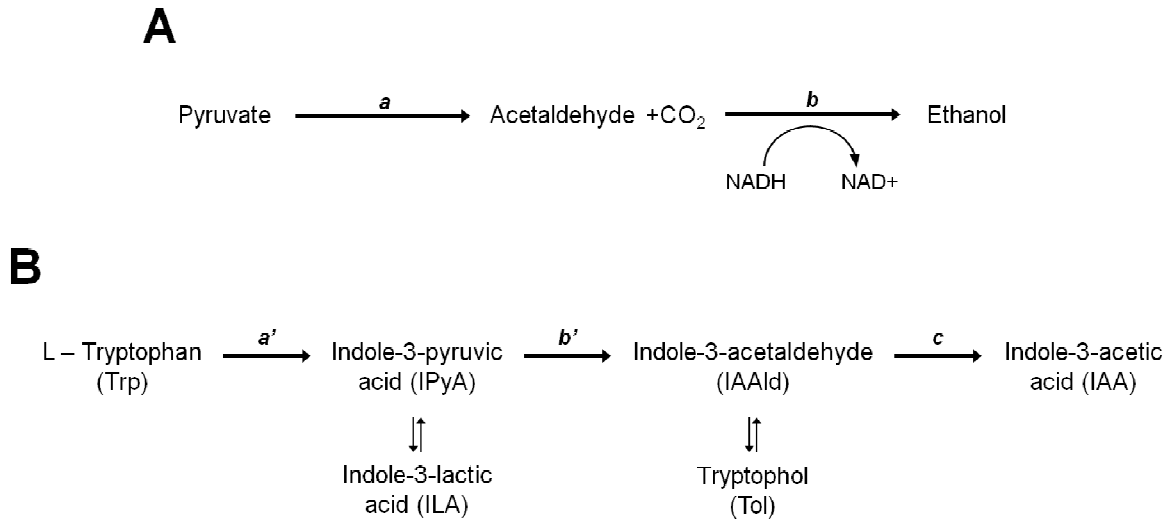


Figure 1. A: alcoholic fermentation enzymes: (a) Pyruvate decarboxylase (PDC); (b) alcohol dehydrogenase (ADH). B: IAA biosynthetic pathway in bacteria (adapted from Koga et al., 1991). Enzymes: (a') L-Tryptophan aminotransferase; (b') Indolepyruvate decarboxylase (IPDC); (c) Indole-3-acetaldehyde oxidase. ILA and Tol are reversibly formed from IPyA and IAAld, respectively, and may be important storage products involved in the regulation of IAA biosynthesis (Koga et al., 1991).

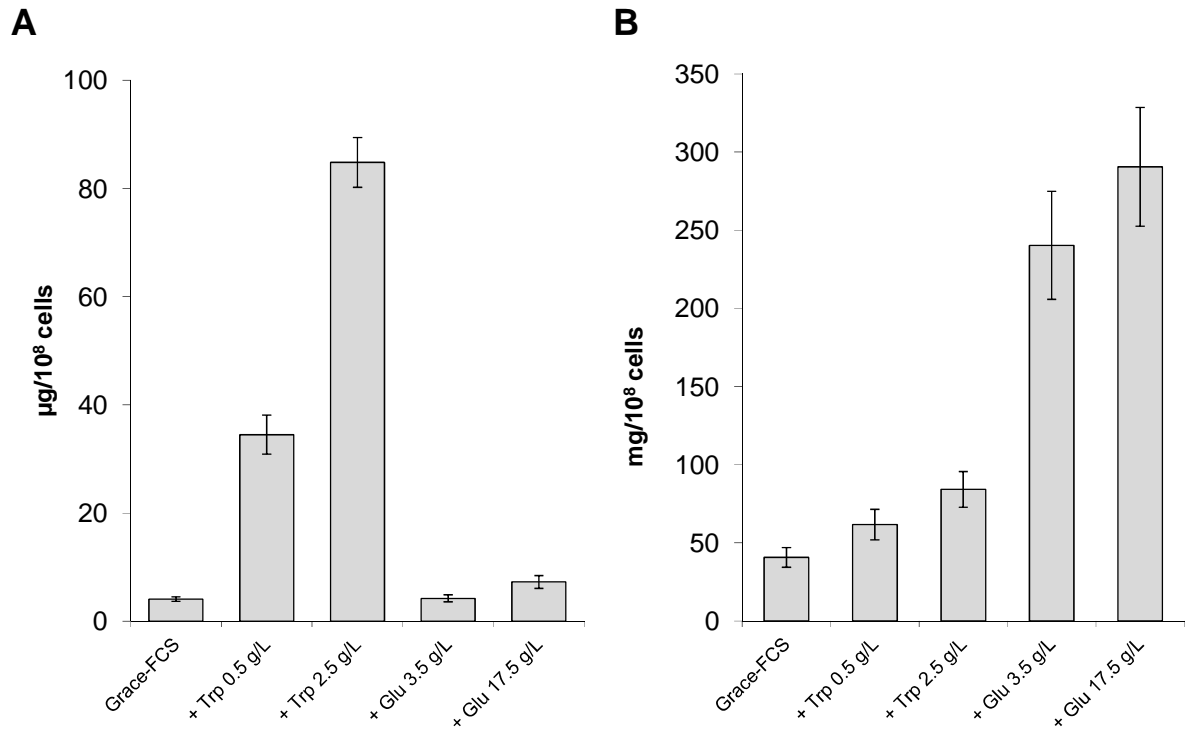


Figure 2. IAA (A) and ethanol (B) quantification in *P. serpens* conditioned media. Trp and Glu concentrations in Grace-FCS medium are, respectively, 0.1 and 0.7 g/L.

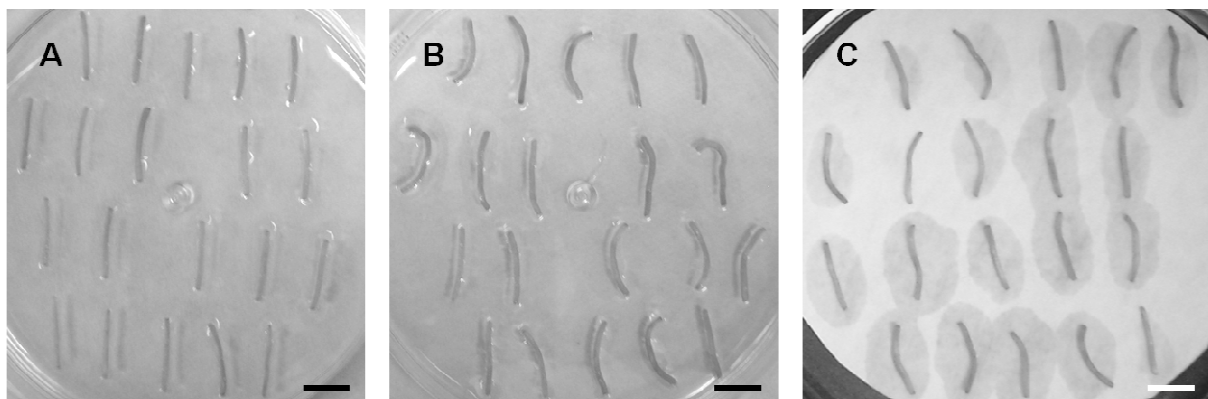


Figure 3. Elongation of hypocotyl segments of *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom incubated for 24 hours with: (A) Grace-FCS medium; (B) *P. serpens* conditioned medium; (C) Grace-FCS + 9 µM IAA. The bars corresponds to 1 cm. Note hypocotyl curvatures in (B) and (C).

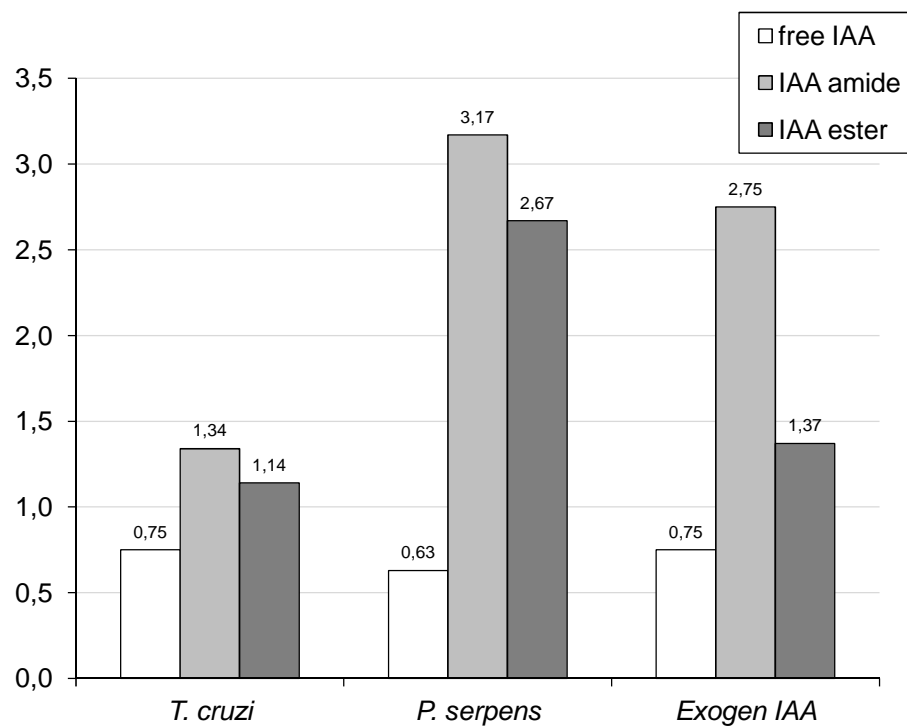


Figure 4. Ratio of free, amide- and ester-conjugated IAA of the tomatoes inoculated with 10^7 *T. cruzi* cells, 10^7 *P. serpens* cells or $1.34 \mu\text{g}$ of exogenous IAA on the 14th day pi in relation to the amounts found in the PBS controls (Table 3).

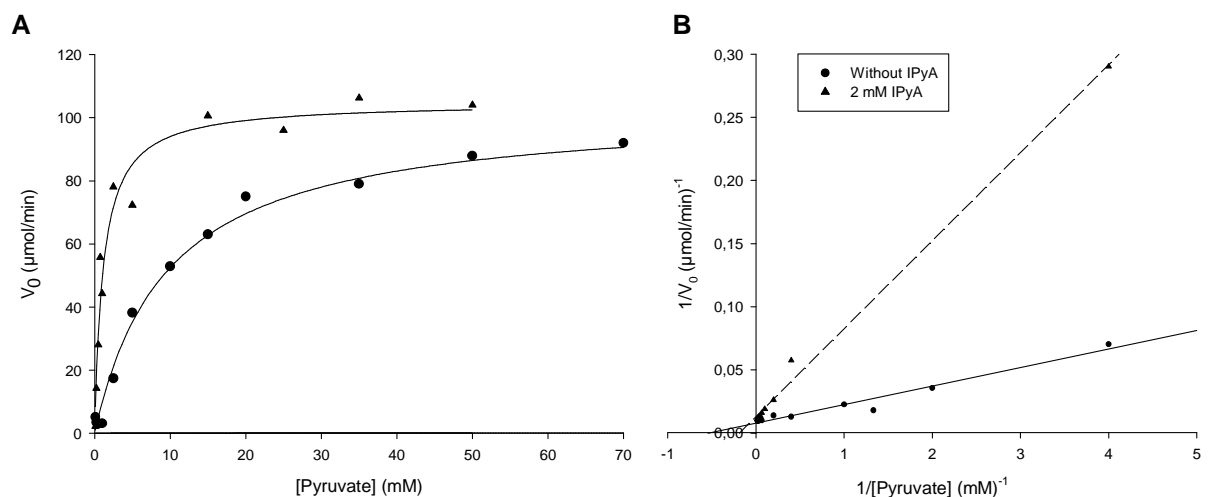
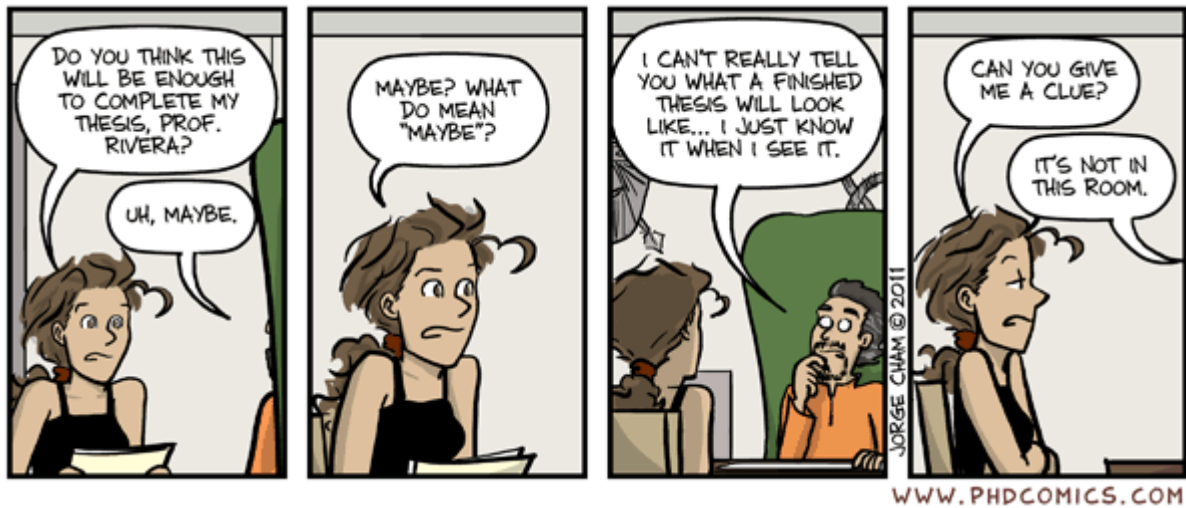


Figure 5. Kinetics of *P. serpens* PDC activity. The data represent mean results from duplicate determinations. Panel A: Plot of initial reaction rate vs. substrate concentration. Panel B: Lineweaver-Burk plot of kinetic data.



FONTE: "Piled Higher and Deeper" por Jorge Cham (site: www.phdcomics.com). Com permissão.