Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Identificação das interações envolvendo proteínas
relacionadas aos Sistemas de Dois-Componentes e aos
Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno
Xanthomonas axonopodis pv. *citri***

Cássia Docena

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo

06 de outubro de 2006

Ao Helotônio, minha eterna gratidão.

Agradecimentos

**Ao Prof. Dr. Chuck Farah e a
todos meus colegas e colaboradores do IQ,
em especial aos meus amigos:
Marcos Castanheira Alegria, Letícia Khater,
Ilda, Cláudia, Paola, Elaine, Izaura, Elizabeth,
Daniela, Miryam, Lucicleide, Leonor, Juliana,
Robson, Leandro, Marcelo, Stéfano, Fernando,
Diorge, Maxuel, Júlio, Carlos, Eric e Alex.**

**Ao Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio e a
Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva.**

**Ao Prof. Dr. Júlio César de Oliveira.
Ao Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti e ao Andrés Cernadas.**

**Esta tese foi financiada pela
Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo.**

ÍNDICE

1- Introdução	1
1.1- O Cancro Cítrico e a bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	1
1.1.1- Histórico	1
1.1.2- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac)	2
1.1.3- O projeto genoma de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> e estudos de genômica funcional	6
1.2- Transdução de Sinal em Bactérias	9
1.2.1- Sistemas de Dois-Componentes	9
1.3- Reconhecimento genético entre planta e patógeno	16
1.4- A importância da secreção de macromoléculas na patogênese	20
1.4.1- O Sistema de Secreção Tipo III	21
1.4.1.1- Secreção de proteínas de avirulência pelo T3SS	24
1.4.1.2- A família AvrBs3 e a proteína efetora PthA	25
1.4.1.3- Secreção de HpaA pelo T3SS de <i>Xanthomonas</i>	28
1.4.2- O Sistema de Secreção Tipo IV	29
1.4.2.1- Os Dois Sistemas de Secreção do Tipo IV em <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	30
1.5 - Análise de interações entre proteínas: o sistema duplo-híbrido	33
2- Objetivos	36
3- Materiais e Métodos	37
3.1- Seleção das Proteínas de Xac para serem testadas como “iscas” em ensaios de duplo-híbrido	37
3.2- Preparação da Biblioteca de DNA genômico de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	38
3.2.1- Fragmentação do DNA genômico de Xac	38
3.2.2- Reparo do DNA genômico nebulizado e purificação em gel de agarose	38
3.2.3- Linearização do vetor pOAD e tratamento com fosfatase alcalina (“calf intestine phosphatase”- CIP)	39
3.2.4- Reação de ligação	39
3.2.5- Transformação de células competentes DH10B	40
3.2.6- Transformação de células DH10B em larga escala	41
3.2.7- Amplificação das bibliotecas genômicas	41
3.2.8- Purificação do DNA das bibliotecas amplificadas	42
3.3- Clonagem dos genes de interesse no vetor pOBD	42
3.3.1- Amplificação dos genes	42
3.3.2- Digestão dos fragmentos dos genes amplificados e ligação com o vetor	42
3.3.3- Sequenciamento dos genes clonados	43
3.4- Ensaio de Duplo-híbrido	44
3.4.1- Transformação da linhagem PJ69-4a com a isca de interesse	44
3.4.2- Teste de auto-ativação com a isca de interesse	44
3.4.3- Transformação em larga-escala da linhagem PJ69-4a com a biblioteca de Xac	45
3.4.4- Análise dos clones positivos	47
3.4.4.1- Recuperação dos vetores pOAD e pOBD	47
3.4.4.2- Transformação de células de <i>E. coli</i>	48
3.4.4.3- Sequenciamento do vetor pOAD	49
3.4.4.4- Análise dos clones sequenciados	49
3.5- Preparação da Biblioteca de presas derivadas dos dois loci vir de Xac	50
3.5.1- Amplificação dos dois loci vir	50
3.5.2- Sonicação, reparo do DNA e purificação em gel de agarose	52
3.5.3- Transformação de células competentes DH10B em larga escala	52
3.5.4- Amplificação das bibliotecas genômicas	53

3.6- Biblioteca de cDNA de <i>Citrus sinensis</i>	53
3.6.1- Extração do RNA total.....	53
3.6.2- Isolamento de mRNA.....	54
3.6.3- Construção da biblioteca de cDNA de <i>Citrus sinensis</i>	54
3.7- Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes.....	56
3.7.1- Clonagem em Vetores de Expressão.....	56
3.7.2- Expressão de Proteínas Recombinantes em <i>E. coli</i>	58
3.7.3- Purificação das Proteínas Recombinantes.....	59
3.8- Validação das interações “in vitro” a partir de proteínas purificadas.....	60
3.8.1- Ensaio de “Overlay”.....	60
3.8.3- Ensaio de “Pull Down”.....	61
3.9- Nocaute de genes do T4SS plasmidial e cromossômico.....	61
3.9.1- Preparo de células competentes de <i>Xanthomonas</i>	61
3.9.2- Obtenção do Mutante T4SS do plasmídeo pXAC64.....	61
3.9.2.1- “Southern Blot.”.....	62
3.9.3- Obtenção do mutante não polar do T4SS cromossomal.....	63
3.9.3.1- Deleção do gene <i>virD</i> , codificado pelo locus <i>vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i>	63
3.9.3.2- Transformação e isolamento de <i>Xac</i> com o gene <i>virD4</i> deletado.....	63
3.9.3.3- Confirmação das deleções através de PCR.....	64
3.9.4- Ensaio de patogenicidade dos mutantes em plantas de <i>Citrus</i> spp.....	65
4- Resultados	66
4.1- Obtenção da biblioteca genômica de <i>Xac</i> no vetor pOAD.....	66
4.1.1- Fragmentação do DNA genômico e transformação de <i>E. coli</i> DH10B.....	66
4.1.2- Amplificação das bibliotecas genômicas.....	68
4.1.3- Transformação em larga-escala de células de levedura com a biblioteca genômica.....	69
4.1.4- Identificação de falsos-positivos.....	70
4.1.5- Controles positivos.....	71
4.1.6- Ensaios de auto-ativação e análise do repórter Gal7-LacZ.....	72
4.2- Produção da biblioteca de presas derivadas dos dois loci <i>virB</i>	73
4.2.1- Amplificação e clonagem de fragmentos dos loci <i>virB</i>	73
4.2.2- Amplificação da biblioteca.....	74
4.2.3- Transformação em Larga-Escala.....	75
4.2.4-Ensaio de Falsos-positivos.....	75
4.3- Biblioteca de cDNA de folhas de <i>Citrus sinensis</i>	75
4.3.1- Síntese do cDNA.....	75
4.3.2- Transformação de DH5α e amplificação da Biblioteca de cDNA.....	76
4.3.3- Transformação de leveduras com a biblioteca em larga-escala e experimentos controle.....	77
4.4- Sistema de Dois-Componentes.....	78
4.4.1- Interações entre proteínas identificadas por ensaios de duplo-híbrido.....	78
4.4.2- Purificação das Proteínas recombinantes XAC1669, XAC1670 e XAC1282.....	88
4.4.3- Análise de interações entre as proteínas XAC1669/XAC1282 _{6xHis} e XAC1669/XAC1670 _{6xHis} por “pull down”.....	91
4.4.4- Análise da interação de XAC1669/XAC1670 _{6xHis} por “overlay”.....	92
4.5- Sistemas de Secreção do Tipo IV.....	93
4.5.1- Interações envolvendo os loci <i>vir</i> e <i>tra</i> e genes vizinhos do plasmídeo pXAC64....	93
4.5.2- Interações envolvendo o T4SS codificado pelo locus <i>virB</i> do cromossomo.....	98
4.5.3- Nocaute de XACb0045 do T4SS codificado pelo plasmídeo pXAC64.....	101
4.5.4- Nocaute de <i>VirD4</i> do T4SS do cromossomo.....	104
4.6- Ensaios de duplo-híbrido utilizando a biblioteca de presas derivadas de cDNA de <i>Citrus sinensis</i> infectada com <i>Xac</i>	109

4.6.1 Interações envolvendo as proteínas <i>PthA2</i> e <i>PthA4</i>	109
4.6.2 Interações envolvendo a proteína <i>HpaA</i>	111
4.6.3 Interações envolvendo as proteínas <i>XAC2609</i> e <i>XAC2610</i> do T4SS do cromossomo.....	113
5- Discussão	115
5.1. Os Sistemas de Dois-componentes de <i>Xac</i>	115
5.1.1- Análise genômica dos Sistemas de Dois-Componentes em <i>Xac</i>	115
5.1.2- Principais interações envolvendo proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes.....	128
a) Interações envolvendo o sistema de dois-componentes <i>XAC1273/XAC1274</i> e o “estressomo” <i>RsbRST</i>	128
b) Interações envolvendo os agrupamentos <i>XAC1279/1283/1282/1284</i> e <i>XAC1669/1670/1672</i> : uma possível via envolvida na regulação de quimiotaxia.....	133
5.2. Interações Envolvendo o Sistema de Secreção do Tipo IV.....	139
5.2.1. Interações envolvendo o T4SS cromossômico.....	139
5.2.3- Nocautes de <i>VirD4</i> e <i>VirB4</i>	146
5.4. Interações de proteínas do T3SS e do T4SS com proteínas de <i>Citrus sinensis</i>	147
5.5- Avaliação da técnica de duplo-híbrido na identificação de interações entre proteínas em larga-escala.....	160
6- Conclusões	162
7- Referências Bibliográficas	164
8- Anexos	

RESUMO

A citricultura é de extrema importância para a economia do Estado de São Paulo. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*), é um grave problema nesse setor, causando inúmeros prejuízos à produção de frutos e seus derivados.

Nosso objetivo principal foi o estudo das interações proteína-proteína que ocorrem em *Xac*. Com este intuito, utilizamos como principal ferramenta, o sistema duplo-híbrido em leveduras, baseado nos domínios ativador e de ligação da proteína Gal4. Estivemos particularmente interessados em proteínas pertencentes aos Sistemas de dois-componentes, devido à sua importância em mecanismos de sinalização celular. A complexidade desses sistemas tornou a análise genômica comparativa de grande valor para estudos das vias de sinalização que podem levar a bactéria a colonizar o hospedeiro. *Xac* possui 37 histidina cinases (HKs) e 60 reguladores de resposta (RRs) além de 21 proteínas híbridas contendo ambos os domínios. Nossos resultados mostraram interações específicas entre várias proteínas desse sistema dentre as quais destacamos algumas HKs e seus RRs cognatos: XAC0135 e XAC0136, XAC0620 e XAC0621, XAC0683 e XAC0684, XAC0759 e XAC0760, além de interações entre XAC1669 e XAC1670 e XAC1669 e XAC1282, estas últimas possivelmente envolvidas em quimiotaxia.

Outro foco de nosso trabalho foi a identificação de interações entre proteínas com similaridade aos componentes do Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS), envolvido em processos de conjugação e secreção em bactérias. *Xac* possui dois *loci vir* que codificam proteínas com similaridade aos componentes do T4SS, um localizado no plasmídeo e outro localizado no cromossomo. Identificamos novas interações entre proteínas hipotéticas adjacentes a esse *locus* no plasmídeo: XACb0018 e XACb0019 e interações entre VirB8 e VirB9 e VirB9 e XAC2610, estas últimas codificadas por genes presentes no cromossomo. Apesar da importância de alguns T4SSs na secreção de proteínas patogênicas em bactérias, verificamos que o nocaute da proteína VirD4, codificada pelo gene *XAC2623* apresentou fenótipo de virulência alterado em apenas um, dos cinco clones infiltrados em folhas de laranja pêra. O nocaute da proteína VirB4 do T4SS plasmidial não apresentou alteração na virulência de *Xac*, quando infiltrado em folhas de laranja e limão cravo, corroborando a hipótese de o T4SS codificado pelo plasmídeo não estar envolvido em virulência, mas sim em processos conjugativos.

Outro sistema secretório importante em bactérias é o Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS). Em *Xac*, o T3SS é o responsável pela secreção de fatores patogênicos, entre eles a proteína HpaA e a proteína de avirulência PthA. Com esse intuito, estudamos possíveis alvos dessas proteínas em *Citrus sinensis*. Identificamos interações de PthA com a α -importina, corroborando dados da literatura que mostram que PthA é importada para o núcleo. Além disso, identificamos três proteínas que interagiram com HpaA, dentre elas, destacamos uma proteína dedo de zinco com domínio “RING C3HC4” característico de E3 ubiquitina-ligasas. Isto sugere que HpaA interfere na degradação de proteínas do hospedeiro através do complexo ubiquitina/proteossomo, um processo que pode contribuir para a sobrevivência de *Xac* nos tecidos de plantas infectadas.

ABSTRACT

Citriculture is an important sector of the economy of the State of São Paulo. Citrus canker, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*), is a devastating disease responsible for large losses to Agroindustry every year.

In this work, we used the yeast two-hybrid system to study protein-protein interactions that occur in *Xac*. We were particularly interested in proteins of two-component systems, due to their importance in cell signaling. The complexity of these systems makes genomic analysis an important tool in the study of signalling pathways that allow bacteria to infect the host. *Xac* has 37 histidine kinases (HK) and 60 response regulators (RR), besides 21 hybrid proteins with both domains. We detected specific interactions between several proteins that belong to this system, notably the following HKs and their cognate RRs: XAC0135 and XAC0136, XAC0620 and XAC0621, XAC0683 and XAC0684, XAC0759 and XAC0760, besides XAC1669 and XAC1670 and XAC1669 and XAC1282, the later possibly involved in bacterial chemotaxis.

We were also interested in studying interactions between proteins that make up the Type IV Secretion System (T4SS), involved in bacterial conjugation and protein secretion. *Xac* has two *loci vir*, which code for proteins with sequence similarity to T4SS components, one in the plasmid and the other in the chromosome. We identified new interactions between hypothetical proteins adjacent to this *locus* in the plasmid (XACb0018 and XACb0019) and between VirB8 and VirB9 and VirB9 and XAC2610, coded within the chromosomal *locus*. Despite the importance of T4SS in the pathogenesis of bacteria, a chromosomal VirD4 knockout strain presented altered virulence in only one out of five mutants tested in the leaves of *Citrus sinensis*. Plasmidial VirB4 knockout strains did not present any alteration in *Xac* virulence when tested in *Citrus sinensis* or *Citrus limonia*, consistent with the hypothesis that the T4SS coded by the plasmid is not involved virulence, but in bacterial conjugation.

Another secretory system involved in bacterial pathogenesis is the Type III Secretion System (T3SS), responsible for secretion of pathogenic factors like HpaA protein and the avirulence protein PthA. We investigated possible targets for these proteins using a *Citrus sinensis* cDNA library. We identified interactions between PthA and importin α , corroborating previous data that suggest PthA translocation to the host cell nucleus. We also identified three proteins which interacted with HpaA. One of them is a zinc finger protein containing the “RING C3HC4” domain characteristic of E3 ubiquitin-ligases. This suggests that HpaA interferes in the ubiquitin/proteasome-dependent degradation of host target proteins, a process that may contribute towards *Xac* survival in host tissues.

ABREVIATURAS

aa	- aminoácido
3AT	- 3-aminotriazol
ADP	- difosfato de adenosina
ATP	- trifosfato de adenosina
CHP	- proteína conservada hipotética
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	- “Fast Protein Liquid Chromatography”
HK	- histidina cinase
HP	- proteína hipotética
Hpt	- domínio de fosfotransferência
HR	- Resposta de Hipersensibilidade
IPTG	- isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	- quilodaltons
kb	- quilobases
OD	- densidade óptica
pv	- patovar
pb	- pares de bases
PCR	- reação de polimerase em cadeia
q.s.p.	- quantidade suficiente para
rpm	- rotações por minuto
RR	- regulador de resposta
SDS	- dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida
T3SS	- Sistema de Secreção Tipo III
T4SS	- Sistema de Secreção Tipo IV
TBS	- tampão Tris salino
Tris	- tris-(hidroximetil)aminometano
UFC	- unidades formadoras de colônia
<i>Xac</i>	- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xcc</i>	- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>Xcv</i>	- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

1- Introdução

Desde o começo da civilização, as doenças fitopatológicas têm merecido especial atenção devido à sua importância econômica, pois causam grandes prejuízos à produção agrícola. As plantas são hospedeiras de várias doenças infecciosas causadas por um grande número de fitopatógenos que incluem fungos, bactérias, vírus e parasitas.

O aumento da população humana e o decréscimo da área agrícola cultivável tornam cada vez mais crítico o suprimento alimentício mundial. O entendimento dos mecanismos de defesa da planta em conjunto com o estudo do processo de infecção pode levar a uma melhor compreensão das inter-relações planta-patógeno e ao desenvolvimento de mecanismos de proteção mais efetivos contra os mesmos.

A citricultura é de fundamental importância na atividade agrícola brasileira. O Brasil é o principal produtor e o maior exportador de suco de laranja (*Citrus spp.*) (ESTANISLAU *et al.*, 2001), respondendo por cerca de 80% do comércio mundial, gerando divisas superiores a um bilhão de dólares anuais e movimentando indiretamente cerca de dois bilhões de dólares (NEVES *et al.*, 2001). Com uma área cultivada de 820 mil hectares, 77% das quais localizada na região Sudeste, a laranja representa 49% de toda a produção brasileira de frutas. No Estado de São Paulo, a economia baseada em *Citrus* representa 400.000 empregos diretos envolvendo US\$ 1,5 bilhões em exportações anuais (NEVES, *et al.* 2004).

Apesar do grande potencial produtivo, a cultura de *Citrus* é alvo constante de inúmeras pragas e doenças que causam danos resultando na queda da produtividade e da qualidade dos frutos. Algumas doenças têm grande importância nesse setor, dentre elas, podemos citar o cancro cítrico, a clorose variegada dos *Citrus* (CVC), o greening, a tristeza e a morte súbita dos *Citrus*.

1.1- O Cancro Cítrico e a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

1.1.1- Histórico

A origem geográfica do cancro cítrico é motivo de controvérsias. LEE (1918) relatou a presença da doença no sul da China, no hospedeiro *Fortunella hindsii*. Entretanto, FAWCETT e JENKINS (1933) relataram a presença de lesões do cancro em folhas herborizadas de *Citrus medica* (cidra), coletadas na Índia (1827-1831) e em *Citrus*

aurantifolia (lima), na Indonésia (1842-1844). Esses dados sugerem que a doença tenha se originado em áreas tropicais da Ásia como sul da China, Indonésia e Índia.

Em 1915, a doença foi descrita na região do Golfo do México, quando, acredita-se, foi trazida pelo transporte de mudas em navios cargueiros (DAS, 2003). Diagnosticado pela primeira vez em 1957, na região de Presidente Prudente, em São Paulo (ROSSETTI, 1977), o cancro cítrico espalhou-se rapidamente pelo Brasil: em 1959 atingiu os Estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul, posteriormente tornou-se endêmico no Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, no município de Fronteira (MG) e mais recentemente, em 2002, no Estado de Roraima (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Em 1974, o Ministério da Agricultura criou a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC) que apesar de não conseguir erradicar o cancro no Brasil, contribuiu para que em São Paulo, mesmo após o término da Campanha, ocorresse relativo controle da transmissão da doença. Desde 1977, graças ao esforço do FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura) na fiscalização e erradicação de plantas doentes, o controle da doença foi garantido no Estado de São Paulo. Em 2005, o cancro cítrico foi identificado em 170.165 plantas no Estado, sendo 7,5% em pomares comerciais. Os sítios e chácaras foram os responsáveis pelo maior índice: 72% e outros 20,5% foram encontrados em residências urbanas (BOLETIM FUNDECITRUS, 2005). Apesar da diminuição dos índices do cancro cítrico nos últimos anos, a doença ainda possui grande impacto econômico mundial causando prejuízos da ordem de 10 bilhões de dólares anuais e afetando cerca de 30% da produção mundial de laranjas (DAS, 2003).

1.1.2- *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac)

O gênero *Xanthomonas* compreende bactérias Gram-negativas, pertencentes ao grupo Gamma das Proteobactérias. Apresentam-se sob a forma de bacilos, medindo entre 0,2 e 0,6 µm de diâmetro e 0,8 a 2,9 µm de comprimento (SWINGS e CIVEROLO, 1993; MOREIRA *et al.*, 2005; Figura 1). São usualmente amarelo-pigmentadas resultado da produção de xantomonadina (JENKINS e STARR, 1985) e possuem ampla distribuição ambiental causando doenças em várias espécies vegetais. Mais de 124 espécies de monocotiledôneas e 268 de dicotiledôneas são hospedeiras de *Xanthomonas*, que ainda inclui cepas que podem estar associadas aos vegetais, mas que não são patogênicas aos quais foram isoladas (LEITE *et al.*, 1994).

Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o flagelo polar de *Xac*. Fonte: Elliot Watanabe Kitajima: NAP-NEPA-Esalq-USP

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xantomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). Em folhas, ramos e frutos jovens o patógeno penetra nos tecidos vegetais do hospedeiro através das aberturas naturais como os estômatos, hidatódios e lenticelas (GOTTWALD e GRAHAM, 1992; GRAHAM *et al.*, 1992). A temperatura ótima para infecção varia entre 20 a 30°C (KOIZUMI, 1977). Uma vez no espaço mesofílico do hospedeiro, *Xac* multiplica-se nos espaços intercelulares e produz abundante polissacarídeo extracelular (EPS), principalmente goma xantana. Sob condições favoráveis, as células podem emergir das aberturas dos estômatos em menos de cinco dias após a infecção (Figura 2A). A diminuição dos espaços intercelulares e o acúmulo de goma resultam em um aspecto de encharcamento (“water-soaking”) no tecido infectado: a água do xilema é aprisionada devido ao potencial higroscópico da goma, pequenas bolhas amarelas salientes aparecem devido à hiperplasia induzida no tecido vegetal, tipicamente visíveis em ambos os lados das folhas. À medida que as lesões envelhecem, tornam-se escuras, adquirindo uma tonalidade marrom. O sintoma de encharcamento aparece freqüentemente circundado por um halo clorótico (Figura 2B) devido ao decréscimo da produção de clorofila a e b, caroteno e xantofila nessas regiões (PADMANABHAM *et al.*, 1973). Esse sintoma desaparece com o envelhecimento da lesão, cujo centro torna-se elevado com aspecto esponjoso ou corticoso (Figuras 2C e 2D) proporcionando um inóculo para a transmissão futura da bactéria em outros tecidos e plantas.

Figura 2: (A) Microscopia eletrônica de varredura de *Xac* na superfície abaxial de folha de *Citrus paradisi* (“grapefruit”). Egresso da bactéria na abertura estomatal 5 dias após a infiltração com 10^5 UFC/mL da bactéria no mesófilo foliar. (B) Foto mostrando folhas com lesões circundadas por anel clorótico. (C) Microscopia eletrônica de varredura mostrando a erupção do mesófilo infectado e formação de uma pústula com formato de cratera após 30 dias da inoculação de *Xac*, conforme descrito em (A). (D) Foto mostrando escurecimento da lesão com aspecto corticoso. Fonte: (A e C) GRAHAM *et al.*, 2004; (B e D) <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>, 2006.

Nos galhos e frutos os sintomas do cancro cítrico são similares aos das folhas: lesões corticosas circundadas por uma margem encharcada. Não há clorose nos galhos, entretanto, pode estar presente nos frutos (Figuras 3A e 3B). Nestes últimos, as lesões não penetram muito além da casca (GABRIEL, 2002). A desfolhação e abscisão prematura dos frutos ocorrem em plantas altamente infectadas (GOTO *et al.*, 1979) causando danos irreversíveis que resultam na queda da produtividade.

Figura 3: (A) Foto de lesões aglutinadas que podem causar rompimento da casca, (B) Detalhe das lesões salientes e de cor parda em ramos (crostas).

Fonte:

<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>, 2006.

Em plantas mais velhas, a bactéria penetra através de ferimentos normalmente provocados por material de colheita, veículos e, principalmente, pela larva minadora dos *Citrus* (*Phyllocnistis citrella*) (KOIZUMI e KUHARA, 1982). Introduzida no país em 1996, esta larva está associada ao aumento da incidência de cancro devido à formação de

galerias abaixo da epiderme de folhas, ramos e frutos o que acarreta lesões que facilitam a entrada da bactéria. Em propriedades com focos de *Xac* e infecção por *P. citrella* observa-se frequentemente lesões do cancro associadas às galerias formadas pelas larvas (Figura 4).

Figura 4: Foto mostrando a larva minadora dos *Citrus* e a formação de galerias nas folhas. A evolução da doença acompanha as lesões causadas pela larva. Fonte: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>, 2006.

Climas tropicais e subtropicais, com ambientes úmidos, são adequados ao desenvolvimento do cancro, que é sazonal e coincide com o início do verão quando a chuva aumenta com o aumento da temperatura. A bactéria não requer um vetor específico para sua disseminação e pode ser transferida planta a planta pelo vento, chuva e pelo próprio homem, através do trânsito indiscriminado de pessoas pelos pomares, instrumentos de colheita contaminados e veículos. Em um estudo feito por GOTO em 1992, gotas de chuva coletadas de folhagens com lesões do cancro continham cerca de 10^6 a 10^8 unidades formadoras de colônias/mL. As principais fontes de inóculo de *Xac* são as plantas de *Citrus* infectadas pela bactéria, a qual sobrevive de uma estação para a outra em lesões nos ramos e nas folhas das plantas hospedeiras. Bactérias expostas ao ambiente possuem um

período relativamente curto de sobrevivência morrendo em apenas algumas horas quando expostas à dessecação e luz solar direta (GRAHAM *et al.*, 1989), mas podendo persistir por alguns meses na rizosfera de gramíneas e em folhas e frutos em decomposição (GOTO *et al.*, 1992; CHRISTIANO, 2003).

Atualmente, 3 formas de cancro cítrico são aceitas, causadas por patovares variantes da bactéria *Xanthomonas axonopodis* (DAS, 2003). A diferenciação dessas formas é baseada principalmente na distribuição geográfica e na gama de hospedeiros que o patógeno pode infectar (STALL e SEYMOUR, 1983). A forma Asiática (cancrose A) é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ex Hasse ou *X.a.* pv. *citri* Valterin. É a forma mais comum, mais agressiva e de ampla ocorrência, que afeta praticamente todas as variedades de *Citrus* comerciais. A cancrrose A é endêmica na Índia, Paquistão, China, Japão e sudeste da Ásia, além de estar presente nas Américas, Oceania e África. Existem ainda duas variantes atípicas da cancrrose A, originárias do sudeste da Ásia, denominadas de A* (“star”) e A^W (“West India”) (BRUNINGS e GABRIEL, 2003).

A cancrrose B, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Gabriel, afeta o limão verdadeiro (*Citrus limon*) e é endêmica na Argentina, Paraguai e Uruguai. A cancrrose C, também causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*, afeta principalmente a lima ácida Galego (*Citrus aurantifolii*) e lima Mexicana e está restrita a algumas regiões do Estado de São Paulo. Os sintomas são os mesmos da cancrrose A (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; GRAHAM *et al.*, 2004).

Em 1984, uma nova doença de *Citrus* foi descoberta na Flórida. Um novo patovar foi descrito e denominado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*. A doença foi designada cancrrose E ou mancha bacteriana e afeta principalmente porta-enxertos de citrumelos Swingle. Outras formas de cancro cítrico foram relatadas: a cancrrose D, muitas vezes chamada de bacteriose dos *Citrus*, foi descrita em Colina, México, em 1980 (RODRIGUEZ *et al.*, 1985), mas é causada pela bactéria *Alternaria limicola* (DAS, 2003).

Todas as culturas de *Citrus* são susceptíveis ao cancro. Aparentemente, a resistência observada em campo está correlacionada com o tamanho e número de estômatos do hospedeiro e o crescimento da folhagem, pois quanto mais a árvore se ramifica, novos brotos jovens são formados, os quais são mais sensíveis à infecção. Assim, entre as variações comerciais de *Citrus* e portas-enxerto, são mais susceptíveis à cancrrose A: grapefruit (*Citrus paradisi*), limas (*Citrus aurantifolia* e *Citrus limettioides*), laranja trifoliata (*Poncirus trifoliata*) e seus híbridos, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Susceptibilidade de variedades de *Citrus* à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Adaptado de DAS,2003.

Altamente Susceptível	Moderadamente susceptível
<i>Citrus paradisi</i> ("grapefruit")	<i>Citrus sinensis</i> (laranja doce)
<i>Citrus aurantifolia</i> (lima ácida)	<i>Citrus aurantium</i> (laranja azeda)
<i>Citrus limettoides</i> (lima doce palestina)	<i>Citrus limon</i> (limão)
<i>Poncirus trifoliata</i> (laranja trifoliata)	<i>Citrus tangelo</i> (tangelo)
Moderadamente resistente	Altamente resistente
<i>Citrus reticulata</i> (mandarin, tangerina)	<i>Citrus medica</i> (cidra)
<i>Citrus maxima</i> (pomelo)	<i>Citrofortunella microcarpa</i> (calamondin)
<i>Citrus aurantifolia</i> (lima ácida Galego)	<i>Fortunella spp.</i> (kumquat)

A distribuição do cancro cítrico dentro de um pomar ocorre entre folhas, frutos e ramos de uma mesma planta doente e também entre plantas, vizinhas ou não. Com o passar do tempo, a doença atinge novas plantas, mais distantes das plantas inicialmente contaminadas, e pode se disseminar por todo o pomar. A implantação de quebra-ventos arbóreos diminui a ação do vento e da poeira sobre o pomar e dificulta a entrada ou disseminação da bactéria e outras pragas e doenças. No entanto, a principal medida a ser tomada é a prevenção: desinfecção do material de colheita e veículos que adentram as propriedades, compra de mudas em viveiros certificados e/ou fiscalizados e controle da larva minadora dos *Citrus*. No Japão e Argentina, a utilização da pulverização de Carbonato de Amônio e Cobre (CAC) reduziu o aparecimento de lesões do cancro (DAS, 2003). Entretanto, como não existe método curativo para a doença, no Brasil, a medida adotada é a erradicação de plantas em um raio de 30 metros a partir do foco (www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html).

1.1.3- O projeto genoma de Xanthomonas axonopodis pv. citri e estudos de genômica funcional

Na última década a Biologia, em especial a área de Biologia Molecular, passou por uma grande mudança com o advento de projetos de seqüenciamento genômico de diversos organismos como bactérias, arqueobactérias e eucariotos. O interesse na determinação da seqüência completa do genoma de um organismo baseia-se na possibilidade de identificação de genes que concedam características únicas aos mesmos e que tenham importância econômica, científica ou social (FERREIRA, 2000). Pela primeira vez, tornou-se possível a comparação do conjunto completo de proteínas presentes na célula de um determinado organismo com a identificação de proteínas responsáveis por muitas funções celulares.

A análise computacional de genomas procarióticos completos mostrou, até o momento, que as proteínas microbianas são, em geral, bem conservadas – 70% delas contêm regiões conservadas (KOONIN *et al.*, 1998). Este fato permitiu delinear famílias de ortólogos entre uma ampla extensão filogenética, e em muitos casos, predizer funções com considerável precisão.

O seqüenciamento em escala genômica e a anotação das funções dos genes constituíram um grande avanço na investigação molecular de *X. axonopodis* pv. *citri*. Entretanto, aproximadamente 20-40% dos genes identificados em cada um dos genomas bacterianos seqüenciados até o momento têm função desconhecida (VAN SLUYS *et al.*, 2002). Sendo assim, a informação gerada neste processo, ainda é insuficiente para a compreensão das bases moleculares da patogenicidade desta bactéria.

Como a maioria dos genes codifica polipeptídios, é claramente importante que a informação obtida através do seqüenciamento genômico seja convertida em informações funcionais a respeito destes polipeptídios codificados. Nesse sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas nos últimos anos para investigar a expressão, estrutura e função das proteínas em grande escala. Estas estratégias incluem verificação da expressão gênica utilizando micro arranjos de DNA (BEHR *et al.*, 1999), eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa (DUTT e LEE, 2000; WASHBURN e YATES, 2000), esforços em larga escala para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas (CHRISTENDAT *et al.*, 2000), análises de nocaute gênico (HUTCHISON *et al.*, 1999), localização protéica utilizando sondas fluorescentes (DAVIS, 2004) e identificação de redes de interação entre proteínas através do sistema duplo-híbrido (WALHOUT *et al.*, 2000; UETZ *et al.*, 2000), ou TAP-TAG (“tandem affinity purification-tagged method”, PUIG *et al.*, 2001; RIGAULT *et al.*, 1999), ou ainda “pull-down” associado à espectrometria de massa (ARIFUZZAMAN *et al.*, 2006).

No Brasil, o início dos projetos de seqüenciamento genômico ocorreu em 1997, com o projeto genoma de *Xylella fastidiosa*. Este projeto, financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Fundo de Defesa da Citricultura de São Paulo (FUNDECITRUS), teve como objetivo a determinação completa da seqüência nucleotídica deste fitopatógeno e a anotação e classificação de seus genes. Deste modo, foram identificadas 2.904 regiões codificantes sendo que 47% dessas regiões possuíam similaridade a proteínas com funções já estabelecidas (SIMPSON *et al.*, 2000). Os mecanismos associados à patogenicidade e virulência da espécie envolvem toxinas, antibióticos e sistemas seqüestrantes de íons, assim como interações bactéria-hospedeiro que são mediadas por uma variedade de proteínas. Curiosamente, os genes de avirulência

(*avr*) presentes em muitos fitopatógenos e os genes para o sistema de secreção tipo III, não foram encontrados em *X. fastidiosa*. Há suspeita de que esses genes não estejam presentes nessa bactéria pelo fato deste microrganismo ser inoculado diretamente nos vasos xilemáticos de algumas espécies de *Citrus* e por ali permanecerem ao longo da infecção.

Em 1999, devido ao sucesso do sequenciamento de *X. fastidiosa* e da ocorrência de infestações de pomares de *Citrus* pelo cancro cítrico, foram escolhidas as bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) e *Xanthomonas campestris* (*Xcc*) para serem sequenciadas por outro consórcio de Laboratórios de Pesquisa do Estado de São Paulo. O projeto foi completado em 2002 (da SILVA *et al.*, 2002).

Xac possui um cromossomo circular de 5,1 Mb e dois plasmídeos, pXAC64 (64 Kb) e PXAC33 (33 Kb) (maiores informações a respeito do projeto encontram-se no endereço eletrônico <http://genoma4.iq.usp.br/xanthomonas>). Um total de 4.313 possíveis regiões codificantes (“open reading frames”, ORFs) foi identificado: aproximadamente 2.710 ORFs possuem homologia com proteínas existentes no banco de dados, 1.272 apresentaram homologias com proteínas de função desconhecida (proteínas conservadas hipotéticas) e 331 não apresentam nenhuma homologia com as proteínas existentes nos bancos de dados públicos (proteínas hipotéticas).

Comparações, em escala genômica, de patógenos de animais e de plantas identificaram a presença de sistemas conservados para a exportação de proteínas de virulência (como os genes *hrp*), mecanismos associados à virulência para a obtenção de ferro e estratégias de patogênese convergentes. Das proteínas anotadas em *Xac*, muitas estão associadas à patogenicidade, virulência e adaptação, pelo menos potencialmente (devido à sua similaridade a proteínas com papéis patogênicos em outras bactérias). Alguns exemplos são: proteínas de avirulência da família AvrBs3/PthA, proteínas relacionadas ao Sistema Secretório do Tipo III e à resposta de hipersensibilidade (HpaA, Hrp e Hrc), proteínas relacionadas ao Sistema de Secreção do Tipo IV, proteínas associadas à degradação da parede celular do hospedeiro, enzimas envolvidas na síntese de exopolissacarídeos, mais de cem proteínas possivelmente envolvidas na produção de toxinas e detoxificação, proteínas de superfície, proteínas envolvidas em mecanismos de adaptação a condições atípicas (como as proteínas de choque térmico e vias de transdução de sinal), além de duas cópias de proteínas do Sistema Secretório Tipo II e proteínas envolvidas na secreção de enzimas extracelulares. Como os mecanismos que associam essas proteínas à patogenicidade em *Xac* são, na maior parte, desconhecidos, acreditamos que o estudo das interações envolvendo proteínas pertencentes aos grupos acima

mencionados e também proteínas conservadas sem função conhecida possa ajudar na melhor compreensão da patogenicidade da bactéria.

1.2- Transdução de Sinal em Bactérias

A rede de sinalização em bactérias inclui inúmeros componentes que monitoram parâmetros ambientais e intracelulares e, por consequência, respondem especificamente às mudanças desses parâmetros. A complexidade desses sistemas de sinalização tornou a análise genômica comparativa de valor particular para estudos de sua organização geral como: (i) a estrutura modular de muitas proteínas sinalizadoras, (ii) o fluxo de informação de domínios sensores aos domínios transmissores, (iii) a habilidade de muitos organismos em responder a sinais ambientais pela ativação de diversos circuitos regulatórios e (iv) o cruzamento de diferentes vias de sinalização.

A caracterização experimental de novas proteínas sinalizadoras é de grande importância para o melhor entendimento dos mecanismos de resposta aos diferentes estímulos e da hierarquia intracelular das diferentes vias de sinalização. Tradicionalmente, muitos componentes da maquinaria de sinalização em bactérias, como por exemplo, quimiotaxia, *quorum sensing*, proteínas envolvidas nos controles de osmorregulação e potencial redox, eram estudados como entidades separadas. Entretanto, após o sequenciamento de muitos genomas bacterianos ocorreu a necessidade da enumeração dos genes que codificam proteínas de transdução de sinal em cada organismo, com o objetivo de comparação das vias comuns ou não, para cada gênero ou espécie e avaliação da complexidade do sistema como um todo (GALPERIN, 2004).

1.2.1- Sistemas de Dois-Componentes

A característica mais importante das proteínas de transdução de sinal bacterianas é sua organização modular (Figura 5). A maioria dos domínios dessas proteínas pode ser facilmente reconhecida e, às vezes, associada a funções bioquímicas particulares.

A química da sinalização celular em eucariotos envolve a formação reversível de ésteres de fosfato em resíduos de serina, treonina e tirosina das proteínas sinalizadoras. Em bactéria, os sinais são processados por outro sistema que envolve a fosforilação de resíduos de histidina e aspartato (ALEX e SIMON, 1994). Genericamente, um sistema de transdução de sinal consiste em dois componentes: uma histidina quinase (HK), estímulo-

dependente, e seu substrato, denominado de regulador de resposta (RR) (Figura 5). A histidina quinase se autofosforila em um resíduo conservado de histidina, utilizando trifosfato de adenosina (ATP) como doador do grupo fosfato que é então transferido ao resíduo de aspartato do regulador de resposta, alterando a atividade do domínio efetor presente nessas proteínas (por exemplo, aumentando sua ligação ao DNA ou sua atividade catalítica), o que resulta em uma resposta celular adequada (STOCK *et al.*, 2000).

Uma fração significativa das HKs são proteínas homodiméricas, ligadas à membrana e associadas a um domínio sensor amino-terminal (N-terminal) periplasmático, de tamanho variado. Entretanto, muitas HKs possuem domínios sensores citossólicos e solúveis. Esses domínios sensores são acoplados a um domínio carboxi-terminal (C-terminal) citoplasmático de aproximadamente 250 resíduos, designado de “core” catalítico. Este último, mais conservado entre as HKs, pode ser identificado por um conjunto de motivos: um resíduo conservado de histidina, o qual é fosforilado, define o “H box” e outros blocos adicionais de aminoácidos conservados, denominados de “boxes” N, G1, F e G2, definem o domínio de ligação ao ATP (“nucleotide binding cleft”) (WESTAND e STOCK, 2001; Figuras 5 e 6).

Figura 5: Esquema ilustrando a natureza modular dos sistemas de 2-componentes. (A) O sistema de 2-componentes típico consiste em uma HK dimérica e um RR. A HK canônica possui regiões transmembrânicas, TM1 e TM2 e os motivos N, G1, F e G2 localizam-se no domínio de ligação ao ATP. As atividades das HKs são moduladas por sinais ambientais. O grupo fosfato (P) é transferido ao resíduo de Asp (D) localizado em um domínio conservado do RR. A fosforilação do RR tipicamente ativa um domínio efetor associado que desencadeia uma resposta celular específica. (B) Sistema multi-componente híbrido onde uma HK está associada a um RR na região C-terminal. A fosfo-transferência ocorre em mais de um módulo HK/RR envolvendo também um domínio Hpt como intermediário (WEST e STOCK, 2001).

Na maioria das HKs, o “H box” faz parte do domínio de dimerização (HisKA). Com base nessa organização modular, agrupam-se essas proteínas na Classe I das HKs. Na proteína EnvZ (envolvida em osmorregulação em *E. coli*), considerada o modelo canônico da Classe I, cada monômero é composto de 3 domínios funcionais: um domínio

periplasmático sensor, um domínio citoplasmático de dimerização (HisKA), que contém a histidina fosfoaceptora (Figura 6A) e um domínio C-terminal de ligação ao ATP ou domínio de fosfotransferência (HATPase_c) (Figura 6B).

Figura 6: “Core” catalítico de EnvZ. (A) representação do domínio de dimerização (HisKA) ilustrando o arranjo de 2 monômeros, os quais contém a histidina conservada na posição 243. (B) representação do domínio de fosfotransferência (HATPase_c) de EnvZ, na presença de um análogo de ATP (AMP-PNP). O sítio de ligação ao nucleotídeo é circundado pelos motivos conservados: “boxes” N, F, G1 e G2. (C) Domínio Hpt representado pelo domínio P1 de CheA (proteína de quimiotaxia de *E. coli*). Adaptação de STOCK *et al.*, 2000 e WEST e STOCK, 2001.

O domínio de dimerização forma um conjunto de 4 hélices (“four-helix bundle”) onde se situam as 2 histidinas expostas simetricamente. A reação de trans-fosforilação dependente de ATP ocorre através do domínio de ligação ao ATP. O resultado é a formação de fosfo-histidina cujo grupo fosfato é transferido a um resíduo conservado de aspartato no domínio RR do regulador de resposta. Finalmente, a desfosforilação do fosfo-aspartato ocorre através de uma reação de hidrólise. Todas as reações requerem a presença de íons metálicos divalentes, preferencialmente Mg^{+2} , podendo ser assim resumidas (STOCK *et al.*, 2000):

1. Autofosforilação: $HK-His + ATP \leftrightarrow HK-His\sim P + ADP$
2. Fosfotransferência: $HK-His\sim P + RR-Asp \leftrightarrow HK-His + RR-Asp\sim P$
3. Desfosforilação: $RR-Asp\sim P + H_2O \leftrightarrow RR-Asp + P_i$

Entretanto, algumas proteínas híbridas derivadas desse arquétipo possuem além do domínio de ligação a fosfato, um domínio à parte, ligado à região C-terminal, denominado de domínio de fosfo-transferência em histidina (“histidine phosphotransfer domain”, Hpt). Apesar da aparente similaridade estrutural entre o domínio monomérico Hpt e o domínio de dimerização, existem diferenças claras (Figura 6A e 6C): domínios Hpts são encontrados isoladamente ou em HKs híbridas e RRs híbridos, não possuem atividade cinásica dependente de ATP, mas exercem papel importante como intermediários na transferência do grupo fosfato entre módulos de histidina quinases e seus respectivos reguladores de resposta, conforme visto na Figura 5B (WEST e STOCK, 2001).

Todavia, na Classe II das HKs, exemplificada pela proteína de quimiotaxia CheA (Figura 7), o domínio de dimerização não serve como substrato de fosforilação. Neste caso, o domínio Hpt de um dos monômeros situa-se junto ao centro catalítico do outro monômero do dímero para formar um centro de trans-autofosforilação (DUTTA *et al.*, 1999; Figura 7).

Figura 7: Modelos de organização dos domínios das HKs Classes I e II. Os 2 monômeros dos dímeros são coloridos diferentemente (vermelho x azul). Somente a região catalítica citoplasmática está representada. (A) Representação da proteína EnvZ. No domínio de dimerização (D) está o sítio de trans-autofosforilação. (B) Em contraste, a reação de trans-autofosforilação em CheA ocorre no domínio Hpt. D: domínio de dimerização, S: ligação ao substrato, R: domínio regulatório, CA: domínio de ligação ao ATP (DUTTA *et al.*, 1999).

Na maioria dos sistemas de transdução de sinal procarióticos caracterizados, os RRs são o ponto final de uma via e regulam respostas celulares condicionadas a determinados estímulos ambientais. Um RR catalisa a transferência de um grupo fosfato de uma HK~P cognata a um resíduo de aspartato de seu domínio regulatório. Pequenas moléculas como acil-fosfato, carbamoil-fosfato, imidazol-fosfato e fosforamidato podem servir como doadores de fosfato *in vivo*, demonstrando que um RR pode catalisar a transferência do fosfato independentemente da HK (STOCK *et al.*, 2000). Estas proteínas possuem usualmente 2 domínios sendo a região N-terminal, regulatória, mais conservada e a região C-terminal, efetora, variável. A região N-terminal caracteriza-se pela presença de 3 resíduos de aspartato e um resíduo de lisina conservados. Esse domínio regulatório mínimo é exemplificado pela proteína CheY, a qual regula o sentido de rotação flagelar em respostas quimiotáticas. CheY contém aproximadamente 128 aminoácidos onde os resíduos de aspartato (Asp12, 13, e 57) formam uma cavidade acídica no sítio de fosforilação (Asp57) (Figura 8). Mg^{+2} é coordenado no sítio e a fosforilação de Asp57 resulta numa mudança estrutural de CheY, facilitando sua interação com proteínas flagelares (ALEX e SIMON, 1994; STOCK *et al.*, 2000; WEST e STOCK, 2001). Embora sempre mencionados como domínios receptores, estes domínios não são parceiros passivos no mecanismo de transdução de sinal. O seu estado de fosforilação regula a atividade do domínio efetor. Além disso, as suas atividades de auto-desfosforilação, a qual limita a

meia-vida de seu estado ativado, podem variar de segundos a horas, estando correlacionadas com funções fisiológicas e estratégias regulatórias específicas (WEST e STOCK, 2000).

A maioria dos RRs são fatores de transcrição com domínios efetores de ligação ao DNA (STOCK *et al.*, 2000), representados por 3 famílias em *E. coli*: OmpR (controle de expressão de porinas), NarL (metabolismo de nitrato e nitrito) e NtrC (ativação da transcrição de promotores dependentes de σ^{54}). Contudo, algumas proteínas possuem um domínio C-terminal com atividade enzimática, como exemplificado pelas proteínas de quimiotaxia CheB, que possui atividade metil-esterásica e a cAMP-fosfodiesterase, RegA, de *E. coli*. Além disso, alguns RRs não possuem um domínio efetor C-terminal, como o fator de esporulação de *Bacillus subtilis* Spo0F. Neste caso, a proteína funciona como um “trampolim” para o grupo fosfato entre a HK (KinA) e o domínio Hpt (Spo0B).

Figura 8: (A) domínio RR de CheY (*S. typhimurium*) contendo um “cluster” de Asp (Ca, esferas vermelhas) que se ligam ao Mg⁺² (esfera azul). (B) e (C) Domínios efetores (verde) de NarL (*E. coli*) e CheB (*S. typhimurium*), respectivamente. CheB contém uma tríade catalítica no domínio efetor. (A) STOCK *et al.*, 2000; (B e C) WEST e STOCK, 2001.

A organização modular dos sistemas de dois-componentes caracteriza-se por uma grande diversidade de domínios. Estímulos ambientais são detectados tanto diretamente quanto indiretamente pelo domínio sensor, localizado na porção N-terminal, das HKs. Esses domínios possuem baixa similaridade entre si, reforçando a idéia de que são designados para vias de sinalização específicas e podem localizar-se nas regiões periplasmática, transmembrânica e citoplasmática. A Tabela 2 relaciona os domínios sensores mais comuns.

Tabela 2: Domínios sensores mais comumente encontrados em bactérias. Domínios descritos presentes no banco de dados SMART ou GOG (adaptado de GALPERIN, 2004).

Domínio	Nome	Função	Tamanho	Referência
Citoplasmáticos				
GAF	Domínio comum em cGMP fosfodiesterases, adenilato ciclasas e Proteína FhIA	Ligação ao cGMP, cAMP e ligação a fotopigmento	150	Aravind e Ponting, 1997 Ho <i>et al.</i> , 2000
PAS	Domínio comum nas proteínas de período circadiano (Per), “Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator” (ARNT) e “Single-minded protein” (Sim)	Ligação de heme, flavina, adenina, ácido cinâmico, sensor de luz, oxigênio	100	Taylor e Zhulin, 1999
BLUF	BLUF. Domínio sensor	Ligação ao FAD. Associado aos domínios ACyc e EAL		Gomelsky e Klug, 2002
HNOB	HNOB. Domínio sensor	Ligação a heme e NO		Iyer <i>et al.</i> , 2003
KdpD	KdpD. Domínio sensor	Sensor a K ⁺ e osmolaridade		Heermann <i>et al.</i> , 2000
Extra-citoplasmáticos				
Cachê	Cachê	Ligação a pequenas moléculas		Anantharaman e Aravind, 2000
CHASE e CHASE 2, 3, 4, 5 e 6	CHASE	CHASE, ligantes de baixo peso molecular CHASE 2, estresse osmótico		Zhulin <i>et al.</i> , 2003
PASTA	PASTA	β-lactâmicos		Yets <i>et al.</i> , 2002
CitAP	CitAP	Ligação citrato		Gerharz <i>et al.</i> , 2003
NIT	NIT	Ligação a nitrato		Shu <i>et al.</i> , 2003
Transmembrânicos				
ETR1	ETR1	Sensor etileno		Mount e Chang, 2002
MHYE	MHYE	Ligação a metais		Nikolskaya e Galperin, 2002
MHYT	MHYT			
MASE	MASE	Ligação a compostos aromáticos		Nikolskaya <i>et al.</i> , 2003
Pup-like	Pup-like	Desconhecido		Häse <i>et al.</i> , 2001

Os domínios sinalizadores citoplasmáticos mais comuns são o PAS e GAF (ARAVIND e PONTING, 1997; HO *et al.*, 2000). Originalmente encontrados como domínios citoplasmáticos de HKs, estes domínios possuem estruturas similares caracterizadas pela presença de uma cavidade capaz de acomodar uma série de ligantes moleculares pequenos como heme, cofatores derivados de flavina, fotopigmentos, nucleotídeos (adenina e guanina) e gases como O₂. Além disso, domínios PAS e GAF são também sensíveis ao potencial redox, luz e outros pequenos ligantes, permitindo a transmissão desses sinais à região C-terminal (efetora) da proteína (HO *et al.*, 2000; CROSSON e MOFFAT, 2001). O domínio GAF também pode estar presente em fitocromos e algumas fosfodiesterases específicas. Os fitocromos são fotorreceptores específicos que podem existir em duas formas que se interconvertem reversivelmente de uma maneira dependente de luz.

Embora muitas histidina quinases contenham múltiplos segmentos transmembrânicos, ainda não está claro se estes atuam como sensores ou simplesmente ancoram estas proteínas à membrana. Entretanto, a conservação das seqüências de muitos desses domínios permite que sejam sugeridos ligantes para cada um destes. Por exemplo: metais para o domínio MHYT e MHYE e compostos aromáticos para MASE1 e MASE2, (Tabela 2) (NIKOLSKAYA e GALPERIN, 2002; NIKOLSKAYA *et al.*, 2003; GALPERIN, 2004). A lista de receptores de membrana ainda inclui um grupo de proteínas

onde os domínios efetores C-terminais não são histidina quinases, mas domínios citoplasmáticos com funções catalíticas como GGDEF, EAL, HD-GYP, além de outros (Tabela 3). Os domínios GGDEF e EAL são comumente encontrados aos pares formando uma combinação de diguanilato ciclase/fosfodiesterase que catalisa a síntese e hidrólise de diguanilato cíclico (c-di-GMP). O c-di-GMP é um segundo mensageiro envolvido na regulação de processos celulares como produção de biofilme (TISCHLER e CAMILLI, 2004), virulência (HISERT *et al.*, 2005) morfologia (PAUL *et al.*, 2004) e motilidade (SIMM *et al.*, 2004). Em *Xac*, análises de duplo-híbrido e de interações *in vitro* revelaram uma ligação direta entre o sistema de dois-componentes RpfC/RpfG que controla *quorum sensing* e um conjunto de proteínas que contém domínios GGDEF que presumivelmente controlam níveis de c-di-GMP (ANDRADE *et al.*, 2006). Exatamente como os sinais são transmitidos através da membrana a esses domínios citoplasmáticos ainda não está completamente elucidado.

Tabela 3: Domínios efetores mais comumente encontrados em associação com proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes. Domínios descritos presentes no banco de dados SMART ou GOG (adaptado de GALPERIN, 2004).

Domínio	Nome	Função	Tamanho(aa)	Referência
ACyc	Adenilil/guanilil ciclase tipo3. Domínio catalítico	Formação de cAMP ou cGMP	190	Yashiro <i>et al.</i> , 1996 Katayama e Ohmori, 1997
EAL	EAL	c-diGMP fosfodiesterase	250	Tal <i>et al.</i> , 1998
GGDEF	GGDEF	Diguanilato ciclase	180	Tal <i>et al.</i> , 1998
HD-GYP	HD-GYP	fosfodiesterase	170	Galperin <i>et al.</i> , 1999
MCP	“methyl carrier protein”	Sítio ativo Glu	350	Falke <i>et al.</i> , 1997
PP2A	Fosfatase da família 2A	Hidrólise pSer e pThr	180	Shi <i>et al.</i> , 1998
PP2C	Fosfatase da família 2C	Hidrólise de pSer e pThr	250	Shi <i>et al.</i> , 1998
PTP	Tirosina fosfatase. Proteína de baixo peso molecular	Hidrólise de pSer, pThr e pTyr	150	Shi <i>et al.</i> , 1998
S_TKc	Ser, Thr-quinase, domínio catalítico	Fosforilação de Ser e Thr em proteínas-alvo, incluindo fatores de transcrição	250	Shi <i>et al.</i> , 1998

Estudos da arquitetura dos domínios encontrados nas proteínas de sinalização têm demonstrado combinações variáveis entre eles o que dificulta a anotação correta de suas funções. Em muitos casos, a anotação é inconsistente e algumas vezes errada. Por muitas vezes, encontramos proteínas anotadas em *Xac* (da SILVA *et al.*, 2002) como histidina quinases, as quais possuem somente domínios sinalizadores como PAS ou efetores como GGDEF. Outras vezes, encontramos proteínas anotadas como hipotéticas, mas que possuem domínios de dimerização e de ligação ao ATP. Por esse motivo, procuramos por domínios de sinalização descritos nos bancos de dados do Pfam, SMART e COG e fizemos uma análise de suas ocorrências em *Xac* (vide Discussão).

1.3- Reconhecimento genético entre planta e patógeno

Os vegetais superiores contêm grande variedade de nutrientes que propiciam sua colonização por microrganismos. Muitas bactérias são pequenas o bastante para penetrar através de estômatos e aberturas naturais e colonizar os espaços intercelulares, denominado apoplasto. A relação entre patógenos bacterianos e seus hospedeiros vegetais é, na maioria dos casos, pacífica, pois processos coevolutivos dirigiram e asseguraram a sobrevivência de ambos, o patógeno e o hospedeiro. Contudo, alguns patógenos podem causar danos maiores: em alguns casos, os sintomas podem ser manifestações desagradáveis que levam à transmissão da bactéria de um hospedeiro a outro; entretanto, em outros casos, doenças fatais podem ocorrer quando esses patógenos encontram um hospedeiro estressado (GALÁN e COLLMER, 1999).

Muitas bactérias Gram-negativas das famílias Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae e Enterobacteriaceae especializaram-se na colonização do apoplasto causando apodrecimento, manchas e tumores na planta. Suas relações com o hospedeiro são definidas por algumas características genéticas: alguns genes de parasitismo conferem a habilidade de desenvolvimento bacteriano no hospedeiro, sem a ocorrência necessária de sintomas para a planta. Todavia, muitas espécies habitam os espaços intercelulares de muitos tecidos vegetais podendo ser necrogênicas e fatais. Suas habilidades em se multiplicar e, eventualmente, matar as células, dependem de enzimas capazes de degradar a parede celular do vegetal ou de moléculas que possivelmente atravessam essa parede (ALFANO e COLLMER, 1996).

Outros genes determinam ainda qual ou quais hospedeiros podem ser infectados: dentro de cada espécie de parasitas existem subgrupos ou patovares (*forma specialis*) com habilidade em infectar diferentes hospedeiros. Por exemplo, dentro da espécie *Xanthomonas*, *X. campestris* compreende, no mínimo, 125 patovares diferentes que se distinguem pela doença que causam. Assim, *X. campestris* pv. *malvacearum* infecta algodão, *X. campestris* pv. *citrumelo* infecta *Citrus*, *X. campestris* pv. *phaseoli* infecta feijão e *X. campestris* pv. *vesicatoria* infecta tomate e pimenta (manteremos neste texto a denominação adotada por BONAS, *et al.*, 1989 e BÜTTNER *et al.*, 2004 para a espécie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Entretanto, ressaltamos que a taxonomia do gênero *Xanthomonas* passou por uma reclassificação e que alguns patovares de *Xanthomonas campestris* passaram a *Xanthomonas axonopodis* (VAUTERIN *et al.*, 2000). Assim, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* passa a ser chamada de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* a *Xanthomonas*

axonopodis pv. *malvacearum* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*).

Dois tipos de interações podem ocorrer entre a planta e o patógeno: a interação compatível e a interação incompatível (CORDEIRO e GROSSI DE SÁ, 1999). Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca a doença. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, é reconhecido e encontra as defesas específicas da planta. As interações compatíveis e incompatíveis estão relacionadas à presença ou ausência de um gene de resistência na planta (R) e de um gene de avirulência (*avr*) no patógeno. Na presença de ambos, ocorre a ativação rápida do mecanismo de defesa conhecido como resposta de hipersensibilidade (HR). Esta resposta caracteriza-se pela morte celular programada nos tecidos vegetais que circundam o ponto inicial de infecção, atenuando seu espalhamento. Esta hipótese, denominada “gene-a-gene”, baseia-se num modelo receptor-ligante onde a proteína R funciona como receptor e a proteína Avr correspondente, como ligante (FLOR, 1971).

Mais de 40 genes *avr* de *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas campestris* já foram caracterizados (GALÁN e COLLMER, 1999). O produto do gene *avr* está relacionado não só ao mecanismo de ativação da resistência, mas também com a especificidade a um cultivar. Os genes *avr* atuam como fatores negativos os quais limitam a virulência bacteriana quando desencadeiam a resposta HR. Mutações nos genes bacterianos *avr* ou nos genes de resistência R, presentes no hospedeiro, podem causar a supressão da resposta de hipersensibilidade, em alguns casos levando à patogenicidade. Quando o gene *avr* não é reconhecido pelo mecanismo de defesa da planta resultando em uma interação compatível, a proteína Avr muitas vezes passa a ser chamada de Pth (“pathogenicity”) se tiver uma participação ativa no desenvolvimento da doença (CORDEIRO e SÁ, 2000).

Embora o modelo de interação planta-patógeno entre proteínas Avr e R na resposta de hipersensibilidade tenha sido demonstrado em alguns casos, como por exemplo, AvrPita e seu cognato Pi-ta (*Magnaporthe grisea* e arroz) (JIA *et al.*, 2000; BOGDANOVE, 2002), AvrPto/Pto (*P. syringae* pv. *tomato* e tomate) (TANG *et al.*, 1996; BOGDANOVE, 2002) e AvrBs3/Bs3 (*X.c.* pv. *vesicatoria* e pimenta) (BONAS *et al.*, 1989), ainda faltam evidências de interações diretas entre muitas das proteínas R e seus elicitadores. Este fato, juntamente com a identificação de proteínas da planta que interagem diretamente com ambos Avr e R, levaram recentemente a uma nova interpretação da hipótese “gene-a-gene”: o modelo da proteína guardiã (“the guard model”; HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003). Neste modelo, as proteínas R guardam proteínas denominadas de

“guardees” que são alvos das proteínas Avr. A interação das proteínas Avr com os “guardees” é sentida pela proteína R que subsequenteiramente dispara as respostas de defesa. O modelo sugere que as proteínas R funcionem no reconhecimento de complexos contendo seus “guardees” (Figura 9; HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003). Desde que os alvos potenciais das proteínas de avirulência são provavelmente limitados, este modelo explicaria o fato de uma planta conseguir detectar milhares de patógenos com somente algumas centenas de proteínas de resistência. Este modelo é exemplificado pela descoberta da proteína Prf de tomate: o reconhecimento da proteína de avirulência AvrPto de *P. syringae* pelo tomateiro é feito pela proteína quinase Pto e pela proteína Prf. De acordo com a hipótese do modelo da proteína guardiã, Pto representaria o alvo de AvrPto e Prf a proteína guardiã. AvrPto ligada à Pto causaria uma mudança alostérica que promoveria a ligação da proteína guardiã (Figura 9B). Evidências para esse modelo advêm da comprovação da interação entre AvrPto e Pto e de mutações em Pto que levariam a indução da resposta de hipersensibilidade dependente de Prf, na ausência de AvrPto (TANG *et al.*, 1996; RATHJEN *et al.*, 1999; INNES *et al.*, 2006).

Figura 9: Hipótese do modelo guardião para a função da proteína R. (A) Interação compatível: a existência de um alvo de virulência numa planta suscetível faz com que, após a infecção, o fator Avr se ligue ao seu alvo de virulência resultando em modificações neste alvo. Estas modificações levam à virulência do patógeno e susceptibilidade da planta. (B) Interação incompatível: em uma planta resistente podem ocorrer de duas maneiras. (1) Reconhecimento direto do fator Avr pela proteína R1, modelo gene a gene. Um exemplo deste tipo de interação ocorre entre Avr-Pita (Avr) e Pi-ta (R) (*Magnaporthe grisea* e arroz). (2) A proteína R2 é uma proteína guardiã, reconhecendo o alvo de virulência na planta modificado previamente pela ligação ao fator Avr. Um exemplo deste tipo ocorre entre as proteínas de avirulência de *Pseudomonas syringae* AvrB, AvrRpm1 e AvrRpt2 (Avr), e as proteínas RIN4 (alvo de virulência) e RPM1 (R2) de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003.

Diversos genes de resistência foram isolados e caracterizados em hospedeiros vegetais de acordo com aspectos funcionais e estruturais. A maior parte das proteínas codificadas por esses genes, denominadas de proteínas R, apresenta um domínio contendo repetições ricas em leucina (“Leucine Rich Repeat”, LRR), que contém leucinas ou outros aminoácidos hidrofóbicos em intervalos regulares em uma sequência de aproximadamente 24 aminoácidos. Estes domínios estão normalmente associados à mediação de interações proteína-proteína. Além disso, as proteínas R podem também apresentar outros domínios comuns em sua estrutura, que as dividem em 5 classes (BAKER *et al.*, 1997; INNES, 2004; Figura 10): a primeira classe compreende receptores citoplasmáticos que contém o domínio LRR, um sítio de ligação a nucleotídeos (“Nucleotide Binding Site”, NBS) e um domínio zíper de leucina (“Leucine Zíper”, LZ) na região N-terminal. Nesta família estão inclusos os genes que codificam as proteínas RPS2 e RPM1 de *Arabidopsis* (resistência ao patógeno *P. syringae*, que carrega os genes *avrRpt2* e *avrRpm1*) e Prf de tomate (resistência à *P. syringae* pv. *tomato*). A segunda classe compreende proteínas citoplasmáticas com os domínios LRR-NBS e um domínio TIR (“Toll/interleukin-1/resistance”), N-terminal, de reconhecimento proteína-proteína, homólogo ao encontrado nas proteínas Toll de *Drosophila* e no receptor de interleucina 1 (IL-1R). A terceira classe compreende serina-treonina quinases citoplasmáticas a exemplo da proteína Pto, que confere resistência ao gene *avrPto* de *P. syringae* pv. *tomato*. A quarta classe compreende proteínas transmembrânicas com domínios extracitoplasmáticos LRR; inclui as proteínas Cf-2 e Cf-9 de beterraba (resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*) e HS1 de tomate. A quinta classe inclui receptores transmembrânicos com domínio extracitoplasmático LRR e um domínio intracelular de serina-treonina quinase, inclui a proteína Xa21 de arroz que confere resistência à bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Figura 10: Esquema ilustrando as classes das proteínas de resistência R em plantas e análise comparativa com os receptores Toll, de *Drosophila* e IL-1R, de mamíferos (mam). Domínios: (LRR) Repetições Ricas em Leucina, (NBS) Sítio de ligação a nucleotídeos, (TIR) “Toll/Interleukin-1/resistance”, (LZ) zíper de leucina, HAMMOND-KOSACK e JONES (2000).

Por estar presente na grande maioria dos receptores R, o domínio LRR é o candidato principal ao reconhecimento da proteína Avr. De fato, mutações pontuais no

domínio LRR da proteína Xa21 resultaram em proteínas capazes de conferir resistência e especificidade a diferentes patógenos e suas proteínas Avr (WANG *et al.*, 1998). Já o domínio de ligação a nucleotídeos (NBS) é essencial na função das proteínas de resistência que os possuem. Mutações nesse domínio invariavelmente inativam a sinalização dessas proteínas (TAO *et al.*, 2000; TORNERO *et al.*, 2002; INNES, 2004).

1.4- A importância da secreção de macromoléculas na patogênese

A habilidade de colonização do apoplasto por fitopatógenos Gram-negativos pode ocorrer por mecanismos distintos: enquanto muitos fitopatógenos secretam enzimas levando à maceração e necrose do tecido vegetal, por exemplo, *Erwinia carotovora* (patógeno de batata e tabaco), *Erwinia amylovora* (patógeno de Rosáceas, maçã e pera) outros utilizam um repertório diverso de estratégias, como a secreção de macromoléculas, principalmente proteínas (por exemplo, *Xanthomonas*) e em alguns casos, complexos núcleo-protéicos para dentro da célula hospedeira (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens*).

No caso da secreção de proteínas, estas necessitam ser transportadas através das membranas bacterianas para fora da célula. De forma geral, os sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas podem ser divididos em 5 grupos (Tipos I a V), que podem ser agrupados em Sec-dependentes (Tipos II e V) e Sec-independentes (Tipos I e III) ou ainda conter vias que podem ser Sec-dependentes ou independentes (Tipo IV, Figura 11). Os sistemas Sec-dependentes envolvem um complexo de proteínas Sec que catalisa a translocação de proteínas através da membrana interna para o espaço periplasmático através do reconhecimento de um peptídeo de sinalização localizado na porção N-terminal. Já nos Sec-independentes, os próprios constituintes do complexo de secreção encaminham os substratos para o meio externo (DUONG e WICKNER, 1997; REMAUT e WAKSMAN, 2004). O sistema de secreção do tipo I, constituído pelas proteínas HlyD, HlyB e TolC, é conhecido por secretar toxinas, proteases e lipases, sendo responsável pelo transporte de proteínas diretamente do citoplasma para o meio extracelular (REMAUT e WAKSMAN, 2004).

O sistema de secreção do tipo II é responsável pela secreção de exoenzimas, incluindo pectato liase, poligalacturonase e celulase (SALMOND e REEVES, 1993). Em *Xac*, este sistema está presente em duas cópias: *xps* (“*Xanthomonas* protein secretion”) e *xcs* (“*Xanthomonas citri* protein secretion”) (da SILVA *et al.*, 2002). O mecanismo de secreção por esta via ocorre em duas etapas: primeiramente a maquinaria Sec exporta o

substrato, com o peptídeo de sinalização, através da membrana interna para o espaço periplasmático e posteriormente, os componentes do sistema de secreção do tipo II secretam o substrato através da membrana externa.

O sistema de secreção do Tipo V, também chamado de autotransportador, utiliza o sistema Sec para exportação da proteína para o periplasma. O domínio β , localizado na porção C-terminal do auto-transportador, associa-se a membrana externa formando um poro por onde a porção N-terminal da proteína passa e, através de auto-proteólise, é liberada no meio extracelular (THANASSI *et al.*, 1998).

Figura 11: Esquema dos principais sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas representados pelos modelos: Sistema I, exemplo de secreção de hemolisinas em *E. coli*; Sistema V, montagem do *P-pili* em *E. coli*; exemplo de secreção de pululanase pelo Sistema II de *Klebsiella oxytoca*; Sistema de Secreção III de *Salmonella* e Sistema de Secreção IV de *Agrobacterium*. ME: membrana externa, MI: membrana interna. (REMAUT e WAKSMAN, 2004).

Todavia, durante o processo infeccioso, uma grande variedade de bactérias patogênicas gram-negativas de animais e plantas além de secretar proteínas meio externo, são capazes de injetar os fatores patogênicos para dentro das células hospedeiras. Os dois principais sistemas de secreção deste tipo são denominados de Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) e do tipo IV (T4SS). O genoma de *Xac* codifica para um T3SS e dois T4SS, como veremos adiante.

1.4.1- O Sistema de Secreção Tipo III

Para muitos patógenos, os determinantes para a eficiência da colonização residem em um grupo de genes denominados *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”) assim designados pela habilidade desses fitopatógenos em desencadear patogênese em patovares susceptíveis e a resposta de hipersensibilidade (HR) em patovares resistentes. O sequenciamento do grupo de genes *hrp* de *Ralstonia solanacearum* GMI1000, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 e *P. s. syringae* 61 revelou homologias às

proteínas do sistema secretor (Yop) do patógeno animal *Yersinia* spp, deste modo, estabelecendo a existência de um Sistema de Secreção do tipo III (T3SS), conservado em bactérias Gram-negativas (ALFANO & COLLMER, 1997). Primeiramente encontrados em *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *P. s.* pv. *phaseolicola*, mutantes *hrp*⁻ comportam-se essencialmente como organismos não patogênicos em plantas sensíveis e incapazes de desencadear HR em plantas não hospedeiras. Nove genes *hrp* conservados nos T3SS de patógenos de plantas e de animais foram designados *hrc* (*hrp* e *conservada*). Além do alto grau de conservação, as proteínas Hrc também são similares a componentes do corpo basal do flagelo bacteriano, o que sugere que flagelo e T3SS derivaram de um sistema de secreção ancestral comum (GALÁN E COLLMER, 1999). Nos *loci hrp* encontram-se também os genes denominados *hpa* (de “*hrp* associated”) que em sua maioria não tem um papel claro na patogenicidade.

Estruturalmente, este sistema consiste em um grupo de 25 proteínas que formam um complexo que atravessa as membranas interna e externa do envelope bacteriano e uma estrutura supramolecular, denominada de “complexo-agulha”, alongada, com cerca de 120 nm de comprimento (em *Salmonella typhimurium*) que se projeta para fora da superfície bacteriana (KUBORI *et al.*, 1998, Figura 12). Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, os genes *hrp* perfazem um total de 25 kb do cromossomo, organizados em seis *loci* designados *hrpA* a *hrpF* (WENGELNIK e BONAS, 1996). Na cepa de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 (seqüenciada), 25 genes *hrp* localizados em um agrupamento de aproximadamente 23.573 pares de bases foram identificados (Figura 13). Este agrupamento compreende os genes *hpaF* a *hpa2*.

Figura 12: Esquema do T3SS de *Xac*.

HrcV: formação do canal que permite a passagem de proteínas pelo envelope bacteriano; HrcN: ATPase, HrcC: secretina; HrcD, J, Q, R, S, T e U: proteínas associadas à membrana interna que se assemelham aos componentes de exportação flagelar; HrpF: ligação à bicamada lipídica, papel na translocação de efetores para as células da planta (ALEGRIA *et al.*, 2004). ME: Membrana externa, MI: Membrana interna. Kegg enciclopédia: www.genome.ad.jp/dbget-bin/get_pathway (2006).

Três características distinguem o T3SS dos demais sistemas de secreção: (i) a ausência de um peptídeo sinal na extremidade N-terminal das proteínas secretadas, (ii) o requerimento de contato celular para a ativação da via secretora e (iii) a presença de chaperones para muitas proteínas secretadas (GALÁN & COLLMER, 1999). Pouco se conhece sobre essas chaperones (SecA e B em *E. coli*, FliK em *Salmonella*, SycE em

Yersinia e HpaB e HpaP/HpaC em *Xanthomonas*; BUTTNER *et al.*, 2004, ALEGRIA *et al.*, 2004) que parecem estar envolvidas na manutenção do enovelamento de muitas proteínas secretadas, através da interação com domínios protéicos localizados nos 100 primeiros aminoácidos desses efetores e prevenindo possíveis processos de agregação e degradação (BENNET e HUGHES, 2000). Diferentemente de outras chaperones como GroEL ou Hsp70, as chaperones associadas ao complexo de secreção tipo III têm uma estreita especificidade de ligação aos seus alvos (LEE *et al.*, 1998). As proteínas são provavelmente direcionadas e introduzidas ao canal de secreção, parcialmente desenoveladas. Isto ocorre devido à restrição de tamanho do canal (ao redor de 20Å), incompatível com o diâmetro de estruturas protéicas enoveladas (geralmente maiores que 30 Å) (FELDMAN e CORNELIS, 2003).

Os mecanismos envolvidos na secreção de proteínas de virulência através do T3SS ainda são pouco conhecidos. Em *Xac*, a expressão de genes estruturais e efetores é mediada, em parte pelos produtos dos genes *hrpX* e *hrpG* que se encontram num operon afastado do locus *hrp* (ALEGRIA *et al.*, 2004; da SILVA *et al.*, 2002). Para alguns dos genes regulados por HrpX, uma região promotora PIP (“Plant-inducible promoter”) foi identificada, embora existam genes adjuntos as regiões PIP que não são regulados por HrpX e genes que são controlados por HrpX e HrpG, mas que não possuem a região PIP (BÜTTNER e BONAS, 2002). Embora da SILVA *et al.* (2002) tenham identificado 20 prováveis regiões promotoras PIPs no genoma de *Xac*, poucas indicam potenciais proteínas efetoras do T3SS. Os únicos genes *avr* identificados, com homólogos em outras bactérias, são os genes *avrBs2*, *avrXacE1*, *avrXacE2* (identificados no cromossomo) e *avrXacE3*, *phtA1*, *phtA2*, *phtA3* e *phtA4* (identificados nos plasmídeos). Interessantemente, os genes *avrXacE2* assim como todos os 4 membros da família *avrBs3/phtA*, não contêm regiões PIP (da SILVA *et al.*, 2002).

Figura 13: Mapa gênico do locus *hrp* de *Xac*.

Fonte: www.genoma4.iq.usp.br/projects/xanthomonas/citri/maps/1.1.html (2006).

O T3SS media a translocação de proteínas efetoras, como as proteínas de avirulência (Avr), através da membrana bacteriana, injetando-as através da parede e membrana celular do hospedeiro. Em alguns fitopatógenos, proteínas denominadas harpinas (“harpin proteins”) também são secretadas pelo sistema de secreção tipo III

(ALFANO e COLLMER, 1996). Ao contrário das proteínas Avr, que necessitam ser infiltradas no citoplasma do hospedeiro para exercer suas funções, as harpinas podem desencadear HR quando infiltradas nos espaços intercelulares de tecidos vegetais de plantas não hospedeiras (KIM *et al.*, 2004). Estas proteínas são ricas em glicina, não contêm cisteína e são termoestáveis. Análises de harpinas em algumas bactérias revelaram que estas diferem substancialmente em sua estrutura primária, uma razão para que os mecanismos bioquímicos de desencadeamento da HR ainda permaneçam desconhecidos. Estas proteínas podem, por exemplo, servir ao parasitismo desencadeando a alcalinização do apoplasto e a liberação de nutrientes ou, alternativamente, podem atuar indiretamente no transporte de outras proteínas bacterianas em células vegetais (ALFANO e COLLMER, 1996).

1.4.1.1- Secreção de proteínas de avirulência pelo T3SS

Muitos patógenos Gram-negativos de animais e plantas dependem da secreção de proteínas pelo Sistema Secretório Tipo III para que sejam virulentos em hospedeiros susceptíveis ou induzir HR em hospedeiros resistentes. Essas proteínas, denominadas de proteínas de avirulência (Avr) possuem baixa similaridade com outras proteínas conhecidas e baixa similaridade entre si. Entretanto, entre algumas delas existe certo grau de similaridade o que permite que sejam divididas em 2 famílias principais: a família das cisteína-proteases e a família dos genes *avrBs3*, encontrada somente em *Xanthomonas spp.* (GÜRLEBECK *et al.*, 2006).

Na família das cisteína proteases encontramos 4 grupos, baseados na análise das seqüências primárias: (i) o grupo das proteínas AvrRxv/YopJ (C55) de *X.c. pv. vesicatoria* (*Xcv*) e *Yersinia enterocolitica*, respectivamente (ORTH *et al.*, 2000), (ii) o grupo de XopD (C48) de *X.c. pv. vesicatoria* (HOTSON *et al.*, 2003), (iii) o grupo HopAR1/YopT (C58) de *P. syringae* e *Y. enterocolitica* (SHAO *et al.*, 2002) e (iv) o grupo AvrRpt2 (C70) de *P. syringae* (MUDGETT e STAKAWICZ, 1999). A comparação das estruturas secundárias preditas para os membros do grupo AvrRxv/YopJ indica similaridade com a proteína Ulp1, de levedura, uma SUMO protease da família C48. Em eucariotos, a proteína SUMO liga-se covalentemente a resíduos de lisina de proteínas-alvo impedindo sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Sua remoção por uma SUMO protease permite a ligação da ubiquitina e degradação da proteína-alvo (HOTSON *et al.*, 2003). Todos os membros dessa família também possuem uma tríade catalítica necessária para a indução de HR (Figura 14). Membros do grupo XopD pertencem à classe das cisteína-proteases C48 e

juntamente com membros do grupo das C55, possuem um sinal de localização nuclear. Todavia, AvrRxv (de Xcv) localiza-se no citoplasma e XopD no *foci* subnuclear de células de tomate e pimenta (RODEN *et al.*, 2004; DESLANDES *et al.*, 2003) sugerindo que as proteínas-alvo nos vegetais são divergentes. No genoma de *Xac* não foram identificados genes que codifiquem proteínas com homologia à família das cisteína proteases.

1.4.1.2- A família AvrBs3 e a proteína efetora PthA

Desde a década de 80, mais de 40 membros da família AvrBs3 foram identificados em espécies de *Xanthomonas* e *Ralstonia solanacearum*. AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi o primeiro membro descrito, em 1989, por BONAS e colaboradores. Membros dessa família foram identificados por sua habilidade em induzir HR em hospedeiros resistentes, pela indução de sintomas de encharcamento e/ou cancroses em hospedeiros sensíveis e pelas similaridades entre as suas seqüências primárias.

A característica principal dos membros dessa família é a presença de um domínio central, rico em leucina, de 34 aminoácidos, repetido de 5,5 (Avrxa5) a 28,5 (PthXo3) vezes, arranjados em tandem (SZUREK *et al.*, 2001). A comparação entre as diferentes proteínas AvrBs3 de *Xanthomonas* revela 80-97% de similaridade onde as diferenças são confinadas às regiões de repetição (SCHORNACK *et al.*, 2006). Deleções de unidades repetitivas em diferentes homólogos de AvrBs3 evidenciaram que tanto o fenótipo de avirulência quanto o de virulência, em diferentes hospedeiros, podem ser determinados por essas regiões (YANG *et al.*, 1994; LAHAYE e BONAS, 2001). Outra característica desta família é a presença de um sítio de localização nuclear (NLS) e um domínio ácido de ativação da transcrição (AAD) na região C-terminal (ZHU *et al.*, 1998; LAHAYE e BONAS, 2001, Figura 14). Todos os genes de membros desta família são flanqueados por repetições terminais invertidas, sugerindo que possam ser transferidas horizontalmente entre espécies por transposição (BRUNINGS e GABRIEL, 2003).

Através de experimentos de imunocitoquímica foi possível determinar a translocação da proteína AvrBs3 pelo T3SS. Anticorpos específicos contra AvrBs3 detectaram a proteína no núcleo das plantas susceptíveis e resistentes após a infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (SZURECK *et al.*, 2002) e demonstraram que a região N-terminal (aa 1-27) é essencial para essa translocação embora não seja necessária para sua atividade na célula hospedeira. Estudos recentes de interação proteína-proteína demonstraram que HpaB interage com os primeiros 50 aa de AvrBs3 em (*Xcv*) (BUTTNER *et al.*, 2004).

Deleções do sítio de localização nuclear (NLS) e dos domínios AAD suprimem o reconhecimento de AvrBs3 pela planta, eliminando a resposta de hipersensibilidade em hospedeiros não susceptíveis. A importação para o núcleo é dependente do NLS e é mediada pela α -importina (demonstrado através de ensaios de duplo-híbrido, SZUREK *et al.*, 2001) a qual, juntamente com a β -importina possibilita a passagem do complexo através do poro nuclear. Além disso, AvrBs3 dimeriza-se no citoplasma antes de ser importada para o núcleo. Esta dimerização é dependente da região de repetição dos motivos de 34 aa (SZUREK *et al.*, 2001).

A) Cisteína Proteases

Família C55

YopJ 109 **H**-FSVIDYKHNGKTSILIF**E**PANFNSMG-----PAMLAIRTKTAIERYQLPDCHFMSVEMDIQRSSE**C**GIFS
 AvrRxv 180 **H**RVAFDVRNHESGHTTIIAL**E**PASAYNPD-----HMPGPFVKMRENLTQFGRKISFAVIAEAEALKSIG**G**CVIFS
 AvrXv4 155 **H**HFAVDVKHHENGASTLIV**E**SASAGNEI-----ALPGYTKLASMLRSKFGGSARMVVEAEAQKSLND**C**VIFA
 AvrBsT 154 **H**HAAIDVRFK-DGKRTMLV**E**PALAYGMKDGEEKVMAGYETLGKNVQNCLENGDMAVIQLGAKSLFD**C**VIFS
 XopJ 173 **H**HVAADVRRRPNGEASVIV**E**PARLLT-----FVTGHTQLRRQALSQLENAKFAFIQVGAQKSAAD**C**LMFD

B) AvrBs3 de *Xanthomonas*

Figura 14: Características estruturais de representantes de 2 famílias de proteínas secretadas pelo T3SS de *Xanthomonas*. (A) XopD como representante das Cisteína-proteases. A figura mostra o centro reativo (região escura) contendo a tríade catalítica (resíduos em negrito) nas famílias C48 e C55. (B) Características estruturais de AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). A região central consiste em 17,5 repetições em tandem de 34 aa, quase idênticas. A região C-terminal contém os motivos zíper de leucina (em negrito), 2 sítios de localização nuclear (barras pretas) e um domínio de ativação ácido (AAD). Na região N-terminal, estão representados os sítios de ligação à proteína HpaB e o sinal de secreção. Adaptado de GÜRLEBECK *et al.*, 2006.

O gene *pthA* de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* foi um dos primeiros genes de avirulência da família AvrBs3 para o qual se demonstrou um fenótipo no hospedeiro. Quando expresso em *Escherichia coli*, a qual contém um T3SS, *pthA* é suficiente para causar lesões do tipo cancro em *Citrus* (KANAMORI e TSUYUMU, 1998) indicando que a proteína PthA é o principal fator de indução de hipertrofia celular e hiperplasia. A expressão transitória de PthA em plantas não hospedeiras como tabaco, feijão e algodão

levam à formação de uma reação tipo HR (DUAN *et al.*, 1999). Outras evidências confirmam o papel de PthA na patogenicidade: quando expresso em folhas de *Citrus*, os sintomas do cancro, embora menos severos, são visíveis após 10 a 14 dias (DUAN *et al.*, 1999) e mutações no *locus hrp* (EL YACOUBI *et al.*, 2001) ou no gene *pthA* em *Xac* suprimem os sintomas do cancro. Além disso, mutações no gene *pthA* eliminam a habilidade de causar hiperplasia e encharcamento e reduzem a taxa de crescimento bacteriano na planta. Esta última observação sugere que o gene pode ser necessário para a liberação de nutrientes (EL YACOUBI *et al.*, 2001). Interessantemente, a capacidade de causar encharcamento está presente na maioria das espécies de *Xanthomonas*. Em *Xac*, o encharcamento é um dos primeiros sintomas visíveis após 4 dias da inoculação e coincide com a perda dos espaços intercelulares (hiperplasia) devido à divisão celular e ao inchamento das células (hipertrofia). Este fenômeno aproxima as paredes celulares proporcionando um aumento na tomada de água do xilema, devido à capilaridade (POPHAM *et al.*, 1993). Se os espaços intercelulares livres contiverem bactéria produzindo goma xantana, a água se aprisionará devido ao alto potencial higroscópico da goma (POPHAM *et al.*, 1993).

A linhagem de *Xac* sequenciada (306) (da SILVA *et al.* 2002) contém quatro membros da família AvrBs3/PthA denominados PthA1, A2, A3 e A4, os quais possuem alta identidade entre si. Dos quatro genes *pthA*, A1 e A2 estão localizados no plasmídeo pXAC33 e A3 e A4 no pXAC64. PthA4 apresenta 17,5 repetições ricas em leucina com a segunda repetição imperfeita composta por 33 resíduos ao invés de 34, como é comum nos demais membros da família AvrBs3/PthA (Figura 15). PthA1 contém uma repetição a menos que PthA4 (16,5), enquanto PthA2 e PthA3 apresentam 2 repetições a menos (15,5) (da SILVA *et al.*, 2002). Ainda não foram realizados ensaios de funcionalidade para cada uma destas proteínas, mas acredita-se que PthA4, por apresentar maior identidade com o previamente descrito PthB, um homólogo funcional de PthA do plasmídeo pXcB de *X. citri* pv. *aurantifolii* B69 (BRUNINGS *et al.*, 2001; YANG e GABRIEL, 1995), seja o principal efector do cancro cítrico em *Xac* linhagem 306.

>XACb0065 (PthA4)

MDPIRSRTPSPARELLPGPQPDGVQPTADRGVSPPAGGPLDGLPARRTMSRTRLPSPPAPSPAFSAGSFSDDLRLQDFPSLFNTSL
FDSLPPFGAHHTEAATGEWDEVQSGLRRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAAQVDLRTLGYSSQQQKEIK
PKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQL
DTGQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALE
TVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPA
QVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPDQVVVAIASHDGGKQALETV
QRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQ
VVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETV
QRLLPV.LCQAHGLTLDQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV.LCQAHGLTPDQ

Figura 15: Sequência de aminoácidos de PthA4 mostrando em azul a segunda repetição rica em leucina de 33 resíduos em vez de 34, como nas demais repetições.

1.4.1.3. Secreção de HpaA pelo T3SS de *Xanthomonas*

Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, uma proteína denominada HpaA, codificada pelo locus *hrp* foi identificada como auxiliar no processo de patogenicidade (HUGUET *et al.*, 1998). Mutantes no gene *hpaA* em *X.c.* pv. *vesicatoria* crescem até certo ponto em hospedeiros sensíveis, mas perdem a habilidade de causar os sintomas da doença, indicando que HpaA é um fator essencial para seu desenvolvimento. Todavia, em não-hospedeiros esses mutantes retêm, em parte, a capacidade de induzir a resposta de hipersensibilidade (HUGUET *et al.*, 1998). Entretanto, ainda não há na literatura a descrição de uma proteína cognata R, em não-hospedeiros e de um ou mais alvos em hospedeiros. Por esse motivo, utilizamos, no presente trabalho, a proteína HpaA como “isca” contra uma biblioteca de cDNAs de laranja (*Citrus sinensis*, em colaboração com o Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti- Lab. Nacional de Luz Síncrotron).

O produto de gene *hpaA* de *X. c.* pv. *vesicatoria* e de *Xac* possuem 275 e 271 aminoácidos, respectivamente. HpaA contém 2 sítios de localização nuclear (“nuclear localization signal”, NLS), localizados nas regiões C e N-terminais (NLS-1 e NLS-2, respectivamente). HpaA de *Xcv* possui 71% de similaridade com HpaA de *Xac* e 45% de similaridade com Hrpv. de *Ralstonia solanacearum*. HUGUET *et al.* (1998) através da observação da atividade de β -glucoronidase (GUS) em proteínas de fusão selvagens, HpaA-GUS, e mutantes nas regiões NLS1-GUS (C-terminal) e NLS2-GUS (N-terminal), mostraram que HpaA expressa como fusão heteróloga localizou-se no núcleo de células de cebola (*Allium cepa*) (Figura 16). Nosso laboratório demonstrou que HpaA de *Xac* (271 aa) interage com a proteína HpaB (ALEGRIA *et al.*, 2004), uma chaperona do T3SS. A deleção do gene *hpaB* em *Xac* eliminou a capacidade desta bactéria secretar HpaA em meio de cultura líquido suplementado com extrato de folha de laranja e alterou o fenótipo

de virulência da bactéria quando infiltrada em folhas de *Citrus sinensis*, indicando que HpaA pode ser secretada pelo T3SS de *Xac* (Dra. Miryam Marroquin Quelopana, IQ-USP, comunicação pessoal).

Figura 16: Localização histoquímica da atividade de GUS após bombardeamento de células da epiderme de cebola. Construções: (A) GUS, (B) fusão N-terminal GUS-HpaA, (C) HpaA mutante para NLS1-GUS, (D) mutante HpaA para ambos, NLS1 e NLS2 (HUGUET *et al.*, 1998).

1.4.2- O Sistema de Secreção Tipo IV

O Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS) possui grande relevância entre os sistemas de secreção, pois além de estar envolvido na secreção de proteínas patogênicas em algumas bactérias, também desenvolve a função de conjugação em muitas outras (CHRISTIE *et al.*, 2003). No processo de conjugação, um complexo proteína-ácido nucléico é transferido de uma bactéria para outra através de uma estrutura codificada pelos produtos dos genes *mpf* (“mating pair formation”) que formam um canal secretório e uma ponte (*pilus*) entre as duas células (doadora e receptora). Algumas bactérias patogênicas utilizam uma versão do T4SS para secretar fatores patogênicos. O T4SS é mais bem compreendido em *Agrobacterium tumefaciens* onde é codificado pelo operon *virB*, localizado no plasmídeo Ti (indutor de tumor) e requerido para a transferência do T-DNA, juntamente com um complexo protéico diretamente para o citoplasma da planta. Este DNA bacteriano é posteriormente incorporado no cromossomo do hospedeiro (CHRISTIE e VOGEL, 2000). Em outras bactérias o T4SS é responsável pela secreção de efetores protéicos como a proteína CagA de *Helicobacter pylori* (STEIN *et al.*, 2000), a toxina pertussis de *Bordetella pertussis* (WEISS *et al.*, 1993), as proteínas BepA-G de *Bartonella henselae* (DEHIO, 2004), as proteínas LidA, RalF, LepA-B, Sid, Sdb, Sdc e Sdh de *Legionella pneumophila* (CHEN *et al.*, 2004; CONOVER, 2003; SEXTON e VOGEL, 2002). Em alguns casos, apesar do T4SS ter um papel importante na patogenicidade, os substratos secretados por este sistema não são conhecidos. Este é o caso, por exemplo, dos T4SSs de *Brucella suis* (O’CALLAGHAN *et al.*, 1999), *Rickettsia prowazekii* (ANDERSSON *et al.*, 1998), *Wolbachia* spp e *Ehrlichia* spp (MASUI *et al.*, 2000; OHASHI *et al.*, 2002).

O T4SS de *Agrobacterium tumefaciens*, um fitopatógeno que causa tumores do tipo galha da coroa, é formado por 11 proteínas VirB, denominadas de “mating pair formation proteins” e pela proteína acopladora VirD4 (T4CP) (CASCALES *et al.*, 2005). Três ATPases (VirB4, VirB11 e VirD4) associadas à membrana interna possivelmente provêm energia para a secreção dos componentes do complexo e do T-DNA, onde VirD4 é a proteína determinante no reconhecimento inicial do substrato (SCHRÖDER e LANKA, 2005). VirB8, VirB9 e VirB10 formam o complexo do canal secretor: VirB8 é o centro periplasmático para a montagem do complexo, VirB10 percebe o estado energético de VirB11 e VirD4 e responde a essas mudanças abrindo ou fechando o canal para VirB9, a qual ancora o canal na membrana externa, juntamente com VirB7 (SCHRÖDER e LANKA, 2005). Através de sua atividade transglicosilásica, VirB1 auxilia na formação de poros na camada peptidoglicana que irão permitir a formação do *pilus* de secreção (CHRISTIE *et al.*, 2005). VirB6 controla a formação do canal e o modula para a secreção de diferentes substratos. A lipoproteína VirB7 conecta o complexo ao *pilus* extracelular, formado por VirB2 e VirB5 onde VirB2 é seu principal constituinte (Figura 17) (SCHRÖDER e LANKA., 2005).

Figura 17: Direita: Arquitetura do T4SS de *Agrobacterium*. Modelo composto pelas ATPases (vermelho), componentes do complexo periplasmático (azul), peptoglucanase (cinza) e componentes do *pilus* (amarelo). Esquerda: interações determinadas experimentalmente por vários grupos são representadas por conexões entre os componentes. ME: membrana externa, PP: espaço periplasmático, MI: membrana interna. SCHRÖDER e LANKA, 2005

1.4.2.1-Os Dois Sistemas de Secreção do Tipo IV em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

O sequenciamento do genoma de *Xac* revelou que este fitopatógeno contém dois tipos de T4SS, codificados por dois *loci virB*, sendo um localizado no cromossomo e o outro no plasmídeo pXAC64 (da SILVA *et al.*, 2002, ALEGRIA *et al.*, 2002). Esta foi a primeira descrição de um T4SS em *Xanthomonas* ou em qualquer fitopatógeno após sua descoberta em *A. tumefaciens*. Segundo ALEGRIA *et al.* (2005), o T4SS do plasmídeo pXAC64 de *Xac* provavelmente codifica um sistema conjugativo “tradicional”, pois o *locus vir* presente no plasmídeo pXAC64 possui maior similaridade ao sistema *mpfA-J*

presente no plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida*, o qual é requerido para a conjugação e formação do *pilus* (GREATER *et al.*, 2002). A maioria dos genes *vir* encontrados no pXAC64 possui 40-50% de similaridade aos genes correspondentes de pWW0 e são ordenados em uma mesma sequência (Figura 18A). Adjacente ao “cluster” *virB* do plasmídeo, estão os quatro genes XACb0024, XACb0025, XACb0030 e XACb0031, cujos produtos possuem similaridade com os genes *traD*, *A*, *B*, e *C* do plasmídeo pWW0 respectivamente (Figura 18B). As proteínas TraA-D são necessárias para a clivagem e preparação do DNA durante o processo de conjugação (CHRISTIE E VOGEL, 2000; MONCALIAN *et al.*, 1997). Também foi identificado um sítio hipotético (*oriT*, 5' GGTGCGTGATGTGTATTGA 3') entre os resíduos 24202 e 24182 do plasmídeo pXAC64, com uma grande similaridade (19/20 bases) com o sítio *oriT* do plasmídeo pWW0 (Figura 18B) (ALEGRIA *et al.*, 2005). Apesar do plasmídeo pXAC33 não apresentar os genes *vir*, é possível constatar que a região *oriT* assim como TraA e D estão presentes também neste plasmídeo. Por essa razão, acredita-se que o sistema de secreção do tipo IV encontrado no plasmídeo pXAC64 possa funcionar como um sistema de transferência conjugativo, e a presença de *oriT* nos 2 plasmídeos poderia possibilitar a mobilização de ambos para processos conjugativos (ALEGRIA *et al.*, 2005).

Já o T4SS codificado pelo *locus virB* do cromossomo de *Xac* possui uma organização diferente da encontrada no plasmídeo (Figura 18A). Alguns produtos codificados por este *locus* compartilham apenas de um baixo grau de similaridade com os seus pares codificados pelo *locus virB* do plasmídeo, por exemplo: as proteínas VirB1 respectivas apresentam 51% de similaridade, as VirB11 apresentam 34%, VirB10 e VirB4 apresentam 27%, as VirB9 22% e as demais não possuem similaridade significativa. O que se observa é que enquanto o “cluster” *virB* do plasmídeo possui grande similaridade com o plasmídeo pWW0, as proteínas codificadas pelo cluster *virB* do cromossomo possuem similaridade (em torno de 40%) com os componentes dos T4SS codificados pelos plasmídeos pSB105 e pIPO2 isolados de comunidades microbianas dos rizosferas de alfafa e trigo respectivamente (SCHNEIKER *et al.*, 2001; TAUCH *et al.*, 2002). Interessantemente, tanto o plasmídeo pSB105 quanto pIPO2 possuem uma organização gênica similar ao plasmídeo pXF51 do fitopatógeno *Xylella fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000).

Figura 18: (A) Organização dos T4SSs de *A. tumefaciens*, *Brucella* spp, *X. fastidiosa* e *Xac* (plasmídeo e cromossomo). (B) Comparação entre os T4SS do plasmídeo pXAC64 e pWW0 de *P. putida*, seqüenciado por GREATED *et al.* (2002). Fonte: tese de doutorado de Marcos Castanheira Alegria (2004).

ALEGRIA *et al.* (2005) identificaram interações com a proteína VirD4 codificada pelo gene XAC2623, presente no cromossomo, com um grupo de 12 proteínas, incluindo a proteína hipotética XAC2609 cujo gene encontra-se no *locus vir* cromossomal. Denominou essas proteínas de VIPs (“VirD interacting proteins”) por possuírem um domínio comum na região C-terminal. XAC2609 interagiu com XAC2610, outra proteína hipotética localizada nesse “cluster”. Como mencionado no item 1.4.2.1, VirD4 é uma ATPase determinante no reconhecimento dos substratos a ser secretados, desse modo, foi sugerido XAC2609 e XAC2610 pudessem estar sendo secretadas pelo T4SS presente no cromossomo.

Até 2005, não haviam dados que mostrassem a funcionalidade e importância dos T4SSs no processo de patogenicidade de *Xac* e outras *Xanthomonas*. QIAN *et al.* (2005) utilizando o método de nocaute gênico por elementos de transposição (EZ::TN transposon) identificaram que a mutação do gene VirB8, que codifica uma das proteínas formadoras do

canal periplasmático, suprimiu os sintomas de podridão negra em repolho (*Brassica oleraceae* cv Jingfeng) causada por *X. campestris* pv. *campestris*. Neste projeto, demos continuidade aos estudos de duplo-híbrido de proteínas que compõem os “clusters” que codificam os T4SSs em *Xac*, utilizando uma nova biblioteca de fragmentos exclusivos derivados dos *loci tra/vir*, com o objetivo de identificar novas interações entre proteínas destes T4SSs. Também realizamos mutações nos 2 T4SSs, com o objetivo de se verificar possíveis efeitos na virulência de *Xac*.

1.5 - Análise de interações entre proteínas: o sistema duplo-híbrido

As interações entre proteínas têm papel importante na maior parte dos processos biológicos. É estimado que mais de 50% das proteínas de levedura interajam com pelo menos uma proteína, formando complexos protéicos (GAVIN *et al.*, 2006, PUIG *et al.*, 2001). A identificação dessas interações pode fornecer informações a respeito da função protéica e de sua participação num processo metabólico específico. Isto é especialmente válido para proteínas com função desconhecida. Tipicamente, essas interações podem ser detectadas por meio de experimentos de imunoprecipitação, nos quais, um anticorpo de uma determinada proteína é utilizado para precipitar proteínas associadas. Métodos modernos envolvem a expressão de proteínas recombinantes com “tags” de afinidade que podem ser capturados ainda complexados a outras proteínas que serão identificadas por espectroscopia de massa (GAVIN *et al.*, 2006, PUIG *et al.*, 2001).

FIELDS e SONG (1989) e CHIEN e colaboradores (1991) foram os primeiros a demonstrar a eficiência da metodologia do sistema de duplo-híbrido para identificar interações entre proteínas. Neste sistema, são identificadas interações proteína-proteína *in vivo* (pelo menos, “*in levedura*”) através da reconstrução da atividade de um regulador de transcrição. Este método pode ser usado para estabelecer interações entre duas proteínas de função conhecida, assim como, para procurar por proteínas em bibliotecas genômicas que interajam com uma determinada proteína-alvo (BARTEL e FIELDS, 1995). A biblioteca pode ser gerada de uma preparação de cDNAs, de fragmentos de DNA genômico gerados ao acaso (por exemplo, através de nebulização ou sonicação), de fragmentos gerados por digestões com enzimas de restrição, ou pode ser produzida pela amplificação de genes por PCR (EVANGELISTA *et al.*, 1996).

O sistema duplo-híbrido utilizado com maior frequência é baseado nas propriedades da proteína GAL4, de levedura, a qual consiste em dois domínios funcionais separados responsáveis pela ligação ao DNA e pela ativação do complexo de iniciação de transcrição.

Plasmídeos que codificam duas proteínas híbridas: um com o domínio de ligação ao DNA unido à uma proteína de interesse (denominada “isca”) e outro, com o domínio ativador de GAL4 unido à uma proteína derivada de uma biblioteca de fragmentos de DNA ou de cDNAs (“presas”), são construídos e introduzidos na levedura. As interações entre as proteínas “isca” e “presa” levam à ativação da transcrição de um gene repórter que contém o sítio de ligação para GAL4 (FIELDS e SONG, 1989). Colocando-se o gene repórter *lacZ* sob o controle do promotor de GAL4, a associação entre as proteínas pode ser detectada simplesmente medindo a atividade da enzima β -galactosidase diretamente ou pela incorporação de um corante (X-gal) às placas de cultura de leveduras. Esses genes repórteres podem produzir colônias com coloração específica (*lacZ*) ou podem permitir o crescimento de colônias em condições restritivas, empregando-se um hospedeiro auxotrófico como *his*, *ura* e *ade*, (Figura 19).

Figura 19: Representação do sistema duplo-híbrido em levedura. GAL4-AD representa o domínio de ativação fusionado à proteína “presa”. GAL4-BD representa o domínio de ligação fusionado à proteína “isca”. (A) Não há transcrição dos genes repórteres se “isca-presa” não interagirem. (B) a interação de “isca-presa” reconstitui o complexo GAL4 possibilitando a ativação dos genes repórteres. Adaptado de ALEGRIA, 2004.

A utilização deste sistema em escala proteômica foi primeiramente realizada por BARTEL e colaboradores (1996), que elaboraram um mapa de interações protéicas das 55 proteínas expressas pelo bacteriófago T7. Em outro grande projeto, UETZ e colaboradores (2000) identificaram todas as interações estabelecidas entre proteínas no proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste último, um total de 692 pares de interações foi identificado. Aproximadamente 40% das interações envolveram proteínas de funções desconhecidas e somente 10% das interações já haviam sido descritas previamente utilizando-se métodos bioquímicos clássicos como ensaios de co-precipitação, cromatografia de afinidade e co-purificação. Em 2001, RAIN e colaboradores utilizaram esta metodologia para revelar uma rede de interações entre proteínas do patógeno gástrico *Helicobacter pylori*. Os ensaios envolveram produtos de 261 genes, expressos como

“iscas” e identificaram 1280 interações, conectando 47% do proteoma deste patógeno humano.

A identificação e redução do número de falsos-positivos em análises de duplo-híbridos tem se tornado cada vez mais importante para a aplicação da técnica em escala genômica. Algumas cepas hospedeiras devem ser sensíveis o suficiente para detectar interações fracas ou transientes e ainda gerar um baixo índice de falsos-positivos. A maioria dos repórteres *lacZ* são sensíveis, mas não selecionáveis em larga escala. JAMES *et al.*, (1996) criaram uma cepa hospedeira, denominada PJ69-4a (ou α), na qual, são usados três promotores (GAL1, GAL2 e GAL7) para a seleção dos repórteres de histidina, adenina e *lacZ*, artifício que tem se mostrado eficiente na redução de falsos-positivos. Além disso, o uso de 3-aminotriazol reduz a ativação basal do repórter HIS3 quando são observadas interações fracas entre as proteínas de fusão.

Em uma análise crítica sobre a metodologia de duplo-híbrido, von MERING *et al.* (2002) calcularam que o número de falsos-positivos obtidos em ensaios de larga-escala seja da ordem de 50%. Isso se deve ao fato de que, muitas vezes, são observadas interações entre proteínas de diferentes compartimentos celulares, proteínas expressas em diferentes estágios de desenvolvimento ou morfogênese ou em resposta a diferentes condições ambientais. Além disso, o sistema de duplo-híbrido somente detecta interações binárias. Logo, algumas interações que somente aconteceriam em complexos de três ou mais proteínas podem não ser detectadas. Contudo, o sistema de duplo-híbrido em leveduras pode ser bastante poderoso quando utilizado para a identificação de interações entre proteínas de procariotos. Isto é devido à utilização de DNA genômico total na confecção da biblioteca de presas, onde cada gene é representado numa estequiometria definida pelo número de cópias no cromossomo (NOIROT e NOIROT-GROS, 2004).

2- Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

- 1) A construção de uma biblioteca de fragmentos de DNA genômico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, clonada em um vetor contendo o domínio de ativação de GAL4, para estudos de interações proteína-proteína através da técnica de duplo-híbrido em levedura;
- 2) A investigação de interações envolvendo alguns conjuntos de proteínas de *Xac*, particularmente:
 - Proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes, devido à sua importância em processos de transdução de sinal que poderiam levar a bactéria a colonizar o hospedeiro;
 - Proteínas hipotéticas de *Xac* também presentes em *Xyllela fastidiosa*.
- 3) Verificar se os sistemas de secreção do tipo IV encontrados no *locus virB* do cromossomo e do plasmídeo pXAC64 contribuem para a patogenicidade em *Citrus*, utilizando a construção de “knock-outs” polares e não-polares em alguns genes desses dois *loci*. Deste modo, acreditamos contribuir para o esclarecimento da função destes sistemas de secreção em *Xac*, cujo papel é importante nos processos de conjugação e patogenicidade em outras bactérias.
- 4) A construção de uma biblioteca de presas derivadas exclusivamente dos dois *loci* do Sistema de Secreção do Tipo IV, dando continuidade ao trabalho de ALEGRIA (2005), na verificação de interações entre proteínas desses sistemas;
- 5) A construção de uma biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis* (em colaboração com o Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti- Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) para, por meio de ensaios de duplo-híbrido, identificar proteínas do hospedeiro que possivelmente interagem com os fatores de virulência PthA2, PthA4 e HpaA, secretados pelo sistema de secreção tipo III, além das duas proteínas, XAC2609 e XAC2610, associadas ao sistema de secreção tipo IV codificado pelo cromossomo.

3- Materiais e Métodos

3.1- Seleção das Proteínas de *Xac* para serem testadas como “iscas” em ensaios de duplo-híbrido

Como mencionado no item Objetivos, nosso interesse era estudar proteínas conservadas hipotéticas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* também codificadas pelo genoma de *Xylella fastidiosa*. Escolhemos, inicialmente, proteínas que supostamente têm localização citoplasmática e que possuem um tamanho maior que 300 aminoácidos. Neste sentido, no ano de 2000 quando o projeto foi idealizado, encontramos um total de 224 proteínas conservadas hipotéticas. Destas, selecionamos um total de 86 proteínas preditas de possuírem localização citoplasmática (através de busca realizada pelo programa P-SORT: <http://psort.nibb.ac.jp/>, NAKAI E HORTON, 1999). Deste grupo, selecionamos algumas proteínas para os teste iniciais. A Tabela 4 relaciona as proteínas conservadas hipotéticas, além de outras que foram presas de proteínas testadas como iscas. A Tabela A, em anexo, relaciona os oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes selecionados para a clonagem no vetor pOBD.

Contudo, no decorrer do projeto, muitos outros genomas bacterianos foram seqüenciados e constatamos que muitas das proteínas conservadas hipotéticas selecionadas não eram mais exclusivas à *Xylella* e *Xac*. Deste modo, mudamos o foco do projeto para analisar proteínas conservadas hipotéticas ou proteínas hipotéticas que apresentavam fenótipo de virulência alterado quando mutadas através da inserção de elementos de transposição (Tabela 5). A alteração no fenótipo de virulência foi verificada por inoculação destes mutantes de *Xac* em mudas de limão galego (Projeto realizado pelo grupo de pesquisa chefiado pelo Prof. Dr. Júlio César Franco de Oliveira, Depto. de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal).

Também selecionamos algumas proteínas com domínios HK e/ou RR indicativo da participação em vias de transdução de sinal (Tabela 6).

Proteínas dos dois *loci virB* foram escolhidas para análises utilizando a biblioteca de iscas derivadas exclusivamente dos dois *loci vir* (biblioteca de alta resolução; Tabelas 7 e 8). Finalmente, os fatores de virulência PthA2 (aa 129-1097), PthA4 (aa 129-1164) e HpaA (aa 1-271), secretados pelo T3SS e as proteínas XAC2609 e XAC2610 codificadas pelo *locus vir* cromossomal foram selecionadas para ensaios de duplo-híbrido contra uma biblioteca de cDNA de *Citrus*.

Tabela 4: Relação de proteínas de *Xac* utilizadas como iscas na triagem da biblioteca de DNA total de *Xac*, utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura. (CHP) proteína conservada hipotética. XAC0400 foi utilizada na triagem da biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*.

Isclas Conservadas hipotéticas e Outras				
Gene	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Região de clonagem	Anotação
XAC0279	663	221	1-221	CHP
XAC0501	1158	386	1-386	CHP
XAC0674	1404	468	1-468	“Pré B cell enhancing factor related protein”
XAC1088	657	219	1-219	CHP
XAC1093	384	128	1-128	CHP
XAC1171	1050	350	1-350	Serina/treonina quinase
XAC1671	1518	506	1-506	CHP
XAC1866	4599	1533	1-1533	Proteína associada à membrana: WapA
XAC2072	1089	363	1-363	Transportador de açúcar ABC. Proteína de ligação ao ATP
XAC2126	627	209	1-209	CHP
XAC2236	1224	408	1-408	CHP
XAC2657	1368	456	1-456	CHP
XAC3112	1416	472	1-472	CHP
XAC3245	4533	1511	1-1511	Proteína RhsD
XAC3852	675	225	1-225	CHP
XAC3873	447	149	1-149	CHP
XAC3956	558	186	1-186	lipocalina
XAC3980	1437	479	1-479	Protease DO
XAC4019	756	252	1-252	CHP
XAC4160	3195	1065	1-1065	Proteína do sistema de efluxo de cátion
XACa0039	3291	1097	129-1097	PthA2
XACb0045	3492	1164	129-1164	PthA4
XAC0400	816	271	1-271	HpaA

Tabela 5: Relação de proteínas de *Xac* com alteração do fenótipo de patogenicidade quando mutadas por elementos de transposição (Prof. Dr. Júlio César de Oliveira, comunicação pessoal). Estas proteínas foram utilizadas como iscas na triagem da biblioteca de DNA total de *Xac*, utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura. (CHP) proteína conservada hipotética

Gene	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Região de clonagem	Anotação	Fenótipo
XAC0340	432	144	1-144	CHP	Ausência de sintomas
XAC1201	813	271	1-271	CHP	Ausência de hiperplasia
XAC1495	405	135	1-135	Regulador de virulência	Redução de hiperplasia
XAC2053	2361	787	1-787	Proteína relacionada à transcrição: Tex	Ausência de hiperplasia
XAC3263	537	179	1-179	CHP	Redução de hiperplasia
XAC3285	429	143	1-143	CHP	Redução de hiperplasia
XAC3294	360	120	1-120	HP	Redução de hiperplasia
XAC3839	1635	545	1-545	CHP	Ausência de sintomas
XAC3984	345	115	1-115	HP	Redução de hiperplasia

Tabela 6: Relação de proteínas de *Xac* associadas aos sistemas de dois-componentes, utilizadas como iscas na triagem da biblioteca de DNA total de *Xac*, utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura. A coluna “domínios” relaciona os domínios identificados nas proteínas utilizando o banco de domínios protéicos Pfam (www.pfam.org). (TM): domínio transmembrânico, (HK) domínio de dimerização das histidinas cinases (sinônimo de HisKA), (HATPase) domínio de ligação ao ATP presente nas histidinas cinases, (PAS) domínio sensor de oxigênio, potencial redox e luz, (GAF) domínio envolvido na ligação de nucleotídeos cíclicos, (GGDEF) diguanilato ciclase, (RR) domínio regulador de resposta presente nas proteínas reguladoras de resposta, (LytR, GerE e Trans_reg_c) domínios efetores presentes em algumas proteínas reguladoras de resposta.

Isclas pertencentes aos sistemas de dois-componentes				
Gene	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Região de clonagem	Domínios
XAC0135	1227	409	195-409	TM-HK-HATPase
XAC0207	1056	352	1-352	PAS-HK
XAC0608	1008	336	1-336	GAF
XAC0610	2643	881	1-881	GAF-PAS-GGDEF
XAC0621	738	246	1-246	RR-LytR
XAC0684	441	147	1-147	RR
XAC0760	717	239	1-239	RR-Trans_reg_c
XAC1273	1407	469	1-469	HK-HATPase
XAC1274	1956	652	1-652	RR-PAS-HK-HATPase_RR
XAC1279	1131	377	1-377	RR-HK-HATPase
XAC1284	369	123	1-123	RR
XAC1669	2031	677	1-677	PAS-HK-HATPase
XAC1672	2073	691	1-691	PAS-HK-HATPase
XAC1991	1227	409	1-409	HK-HATPase
XAC2158	1530	510	1-510	RR
XAC2555	1623	541	1-541	PAS-HK-HATPase-RR
XAC3273	1266	422	1-422	PAS-HK-HATPase
XAC3292	1257	419	1-419	PAS-HK-HATPase
XAC3673	1737	579	200-579	TM-HK-HATPase
XAC3975	1410	470	240-470	TM-HAMP-HK-HATPase
XAC3993	603	201	1-201	RR-GerE

Tabela 7: Relação de proteínas de *Xac* pertencentes ao T4SS, codificados pelos *locus vir* e *tra/trw* do plasmídeo pXAC64, utilizadas como iscas na triagem da biblioteca de alta resolução.

Gene	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Região de clonagem	Descrição
XACb0018	324	108	1-108	Proteína de partição ParB
XACb0019	627	209	1-209	Proteína de partição ParA
XACb0020	453	151	1-151	Proteína Hipotética
XACb0021b	588	129	1-129	Proteína Hipotética
XACb0022	498	166	1-166	Proteína conservada hipotética
XACb0023	336	112	1-112	Proteína conservada hipotética
XACb0024	447	149	1-149	TraD do plasmídeo pWW0
XACb0025	396	132	1-132	TraA do plasmídeo pWW0
XACb0026	174	58	1-58	Proteína hipotética
XACb0027	273	91	1-91	Proteína hipotética
XACb0028	456	152	1-152	Proteína hipotética
XACb0029	375	125	1-125	Proteína hipotética
XACb0030	1575	525	1-525	TrwB/TraB, ATPase
XACb0031	2976	992	1-992	TraC do plasmídeo pWW0 e com TrwC do plasmídeo R388 de <i>E. coli</i>
XACb0032	324	108	1-108	Proteína hipotética
XACb0033	219	73	1-73	Proteína hipotética
XACb0034	423	141	1-141	Proteína hipotética
XACb0035	420	140	1-140	Proteína hipotética
XACb0036	879	293	1-293	VirB1 Transglicosilase lítica (Proteína MfpJ do plasmídeo pWW0)
XACb0037	1023	341	1-341	VirB11 ATPase (MpfI do plasmídeo pWW0)
XACb0042	396	131	33-131	Proteína hipotética
XACb0043	249	83	1-83	Proteína hipotética
XACb0045	2634	878	1-878	VirB4 ATPase
XACb0049	3751	125	1-125	Proteína hipotética

Tabela 8: Relação de proteínas de *Xac* pertencentes ao T4SS, codificado pelo *locus vir* do cromossomo, utilizadas como iscas na triagem da biblioteca de presas derivadas exclusivamente de fragmentos dos *loci tra/vir*.

Gene	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Região de clonagem	Descrição
XAC2606	492	163	1-163	Proteína conservada hipotética
XAC2609	1296	431	300-431	Proteína conservada hipotética
XAC2610	804	267	1-267	Proteína conservada hipotética
XAC2611	495	164	1-164	Proteína conservada hipotética. Apresenta similaridade com XAC2606
XAC2614	2454	817	1-817	VirB4
XAC2616	411	137	1-137	VirB2
XAC2618	1041	346	1-346	VirB11
XAC2622	420	139	1-139	Proteína conservada hipotética
XAC2623	1674	557	1-557	VirD4

3.2- Preparação da Biblioteca de DNA genômico de *X. axonopodis* pv. *citri*

3.2.1- Fragmentação do DNA genômico de *Xac*

DNA genômico de *Xac*, foi fragmentado pela metodologia de nebulização. Utilizamos um nebulizador de inalação estéril onde a amostra era forçada a passar por um pequeno orifício, sob pressão. À 50 µg de DNA genômico (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, Depto. de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal), acrescentou-se 30% de glicerol e água ultrapura em quantidade suficiente para 1 mL e efetuou-se a nebulização a uma pressão de 0,75 kgf/cm², durante 45 s. Após este processo, o nebulizador era centrifugado a 1.000 rpm por 1 minuto e o procedimento de nebulização/centrifugação repetido por mais três vezes. O DNA coletado foi precipitado em 2 V etanol/0,1 V acetato de sódio 3 M, pH 5,2, centrifugado a 14.000 rpm por 30 min e ressuspendido em TE (10 mM de Tris pH 8,0, 2 mM de EDTA). A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria através da medida da absorbância a 260 nm.

3.2.2- Reparo do DNA genômico nebulizado e purificação em gel de agarose

O DNA nebulizado foi reparado (para produzir “blunt ends”) em 40 µL q.s.p. de reação em água ultrapura contendo 5 µg do DNA, 6 U T4 DNA polimerase, 5 U Klenow, 10 U polinucleotídeo quinase, 2 mM ATP e 1x tampão 2 (New England Biolabs). A mistura foi incubada a 15°C por 20 min e adicionada de 10 µL de tampão TAE 1x, sendo então aplicada em gel de agarose “low-melting point” 0,8% contendo brometo de etídio (1 µg/mL). Após a corrida (150 V), foram cortadas duas faixas de gel, correspondentes aos fragmentos de DNA compreendidos entre 500 e 1.500 pares de bases e 1.500 e 3.000 pb. O DNA foi então extraído e purificado de cada bloco de gel através do método de extração de DNA de gel de agarose utilizando fenol/clorofórmio, segundo SAMBROOK e RUSSELL (2001). O DNA purificado foi precipitado com etanol/acetato e dissolvido em 15 µL de água ultrapura.

3.2.3- Linearização do vetor pOAD e tratamento com fosfatase alcalina (“calf intestine phosphatase”- CIP)

O vetor pOAD (UETZ *et al.*, 2000), gentilmente cedido pelo Dr. Stan Fields (Howard Hughes Medical Institute, Department of Genome Sciences and Medicine, University of Washington) foi utilizado para a construção da biblioteca genômica de *Xac* (Figura 20). Primeiramente, cerca de 20 µg deste vetor foram linearizados com 20 U de *Pvu*.*u*II por 3 h a 37°C em um volume final de 50 µL. Após a digestão, o vetor foi precipitado em etanol/acetato e dissolvido em água ultrapura (aprox. 200 µL) até uma concentração de 0,1 µg vetor/µL e submetido ao tratamento com fosfatase alcalina (CIP, Boehringer Mannheim cat. No. 713023). As melhores condições para este tratamento foram obtidas adicionando aos 5 µg do vetor linearizado, 1 U CIP em um volume final de 50 µL, incubando-se por 15 min/37°C, mais 15 min/55°C, seguido de posterior adição de mais 1 U CIP e incubação análoga. Para a inativação da enzima adicionou-se 0,1 volume de EDTA 200 mM e aqueceu-se a 68°C por 10 min; após este procedimento, procedemos à extração com 1 V fenol/1 V clorofórmio e precipitação com etanol/acetato. O material foi diluído em água ultrapura. Este método foi adaptado do protocolo de LAZO (<http://wheat.pw.usda.gov/homepage/lazo/methods/lazo/dephos>) pelo Dr. Marcos Castanheira Alegria (Dept. Bioquímica-IQ-USP), numa das muitas tentativas de desfosforilar o vetor.

3.2.4- Reação de ligação

Para testarmos a eficiência do tratamento com fosfatase alcalina e da reação de reparo do DNA genômico, o vetor digerido e os diferentes conjuntos de fragmentos foram submetidos à reação de ligação em pequena escala utilizando 0,5 µL de vetor e 1-2 µL de fragmento juntamente com 200 U T4 DNA ligase em 10 µL de água q.s.p.. A mistura foi incubada a 16°C por 12 h. O produto da ligação foi então precipitado com etanol/acetato, dissolvido em 10 µL de água ultrapura e utilizado para transformar células competentes DH10B.

3.2.5- Transformação de células competentes DH10B

Preparação das células competentes

5 mL de um pré-inóculo de uma cultura saturada de DH10B foram transferidos para 500 mL de meio 2YT (1,6 % tripton; 1% extrato de levedo e 0,5% de NaCl) e colocados para crescer sob agitação a 37°C. Após atingir uma OD_{600nm} de 0,6; esta cultura foi centrifugada e ressuspensa em 250 mL de uma solução gelada de glicerol a 10% (esterilizado por filtração). Após centrifugação, as bactérias precipitadas foram novamente lavadas com a solução de glicerol e por último, ressuspensas em 1 mL de uma solução de GYT gelada (10% glicerol; 0,125% extrato de levedura e 0,25% tripton). As células foram aliquotadas e estocadas a -80°C.

Transformação das células competentes

A transformação das células foi realizada através de eletroporação. Em uma cubeta de 0,2 mm (GenePulser Cuvette, cat No. 165-2086), adicionou-se uma mistura contendo 1 µL da reação de ligação em 40 µL de células competentes. As condições de eletroporação foram 100 Ω, 50 µF e 2,5 kV. Após a eletroporação, foram adicionados à cubeta, 800 µL de meio SOC (2% tripton; 0,5% extrato de levedo; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂ e 20 mM glicose) gelado, a suspensão foi transferida para tubo de microcentrífuga e incubada por 40 min a 37°C sem agitação. Após este tempo, 100 µL da suspensão foram plaqueados em meio 2YT contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 12 h.

Análise dos clones transformantes

Os clones obtidos foram seqüenciados em seqüenciador automático ABI 377, da Applied Biosystems após a extração do DNA plasmidial através do protocolo “boiling-prep” (adaptado do método de HOLMES e QUIGLEY, 1981), para a obtenção de 96 clones simultaneamente na mesma placa (COSTAR, cat No. 3960). A reação de seqüenciamento do DNA baseou-se numa adaptação do método Dideoxi de Sanger (SANGER *et al.*, 1997) com a utilização de um kit de seqüenciamento da Applied Biosystems (BigDye Terminator vs. 3.0). O método utilizou oligonucleotídeos de iniciação que hibridavam na região inicial do domínio de ativação (pOAD-F 5'CAAAGACAGTTGACTGTATCGAACTATC) e na região terminadora da transcrição (pOAD-R 5' TTGAGATGGTGACGATGCACAG). Estes “primers” possibilitaram a identificação de clones com inserto de *Xac* além de mostrar-nos se houve alteração nas regiões de ativação e terminadora do vetor pOAD. Diversos seqüenciamentos foram feitos

e as proporções de vetores contendo insertos de *Xac* variaram de 70-90% (vide item Resultados, 4.2). Esta análise foi realizada através da comparação das seqüências com a do genoma de *Xac* por meio do programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.2.6- Transformação de células DH10B em larga escala:

Para obtermos uma boa representatividade do genoma de *Xac*, nossa meta era obter um total de aproximadamente 10^6 clones independentes contendo insertos de 500-1.500 pares de bases e 10^6 clones independentes contendo fragmentos de 1.500-3.000 pb. Após a análise prévia das transformações em pequena escala procedemos (conjuntamente com o Dr. Marcos C. Alegria) à larga escala, totalizando 100 transformações por dia, em um total de 23 dias. A cada dia, 10 reações independentes de ligação, cada uma dividida em 10 alíquotas, eram transformadas.

Para otimizarmos as 100 transformações, a cada 10 eletroporações as células ressuspendidas em meio SOC eram coletadas em um tubo estéril de 50 mL, incubadas por 40 min/37°C, sob agitação e estocadas a – 80°C após a adição de 1 volume de glicerol a 50%. Antes do congelamento, alíquotas de 20 µL de cada tubo contendo o “pool” das 10 transformações em glicerol eram retiradas e congeladas, mimetizando as condições das bactérias nos tubos. Após este procedimento, essas alíquotas eram descongeladas, plaqueadas e incubadas para obtermos uma estimativa do número de total de transformantes a cada dia de transformação. Através do seqüenciamento dos clones obtidos nas placas, foi possível estimar o número de clones positivos independentes, isto é, que continham os fragmentos de *Xac*, e as transformações seguiram até a obtenção do número de transformantes estipulados (10^6 clones positivos) para cada biblioteca (Biblioteca 1 com fragmentos de 500-1.500 pb e Biblioteca 2 com fragmentos de 1.500-3.000 pb).

3.2.7- Amplificação das bibliotecas genômicas

As bactérias transformadas e estocadas a –80°C foram descongeladas e submetidas à amplificação. Para isso, grupos de 100-200.000 clones positivos foram combinados e inoculados em 10 L de meio 2YT, contendo 200 µg/mL de ampicilina ou carbenicilina, divididos em 16 frascos de cultura e incubados a 37°C sob agitação. Após 8 h de crescimento, amostras de 10 mL de cada frasco de cultura foram coletadas, misturadas, centrifugadas e estocadas a –80°C após adição de 1 volume de glicerol 50%; com o intuito

de preservarmos a biblioteca. O restante da cultura permaneceu a 37°C sob agitação até atingir uma OD_{600nm}=1,2. Os frascos foram então mantidos resfriados a 4°C por 30 min, a cultura foi centrifugada e o sedimento congelado a -20°C.

3.2.8- Purificação do DNA das bibliotecas amplificadas

As células estocadas a -20°C foram descongeladas e o DNA purificado utilizando o procedimento descrito por SAMBROOK e RUSSELL (2001) que consiste basicamente em lise alcalina, precipitação de RNA com cloreto de lítio, tratamento com RNase, extração com fenol:clorofórmio e precipitação do DNA plasmidial com polietilenoglicol (PEG 8000). Este DNA foi ressuspensionado em TE, aliqüotado e mantido em freezer -80°C.

3.3- Clonagem dos genes de interesse no vetor pOBD

3.3.1- Amplificação dos genes

Primeiramente, determinamos os sítios de restrição presentes em cada um dos genes selecionados e escolhemos pares de enzimas, para o desenho dos “primers” de iniciação, que fossem comuns à maioria dos genes. Cada “primer” foi desenhado de forma a regenerar a sequência ATG do gene.

Os genes escolhidos foram amplificados por PCR utilizando as especificações do protocolo de amplificação da “Platinum *Taq* DNA polimerase High Fidelity” (Invitrogen, cat No. 11304-011), com temperatura de anelamento de 60°C. Nos casos onde as amplificações não ocorreram, adicionou-se até 5% de DMSO à reação. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose e posteriormente purificados usando o “Concert Nucleic Acid Purification System” (Gibco BRL).

3.3.2- Digestão dos fragmentos dos genes amplificados e ligação com o vetor

O vetor pOBD (UETZ *et al.*, 2000, Figura 20) foi utilizado para clonagem dos genes escolhidos para uso como iscas em ensaios de duplo-híbrido. Após as digestões, vetor e fragmentos foram precipitados com etanol/acetato de sódio e ressuspensionados em TE. O DNA obtido foi corrido em gel de agarose (1%) para a verificação de sua concentração e determinação das quantidades a serem usadas nas reações de ligação. O

protocolo para as reações de ligação e eletroporação de células competentes, seguiu os mesmos procedimentos descritos nos sub-itens 3.2.4 e 3.2.5.

Figura 20- Mapa gênico do vetor pOAD e pOBD (Uetz *et al.*, 2000). A figura mostra as marcas de seleção (amp) e replicação (*ori*) em bactéria, além da marca de auxotrofia para seleção (*LEU2*) e (*TRP1*), respectivamente e replicação (*CEN4/ARS*) em levedura. Após o sítio de clonagem múltipla existem três códons de terminação em frames diferentes. Fonte: <http://depts.washington.edu/sfields/protocols/>

3.3.3- Seqüenciamento dos genes clonados

Após a transformação, cerca de 20 clones de cada gene foram repicados em meio líquido 2YT para a extração de DNA, digestão com *HindIII* (NEB cat No. RO104S) e posterior seqüenciamento. Somente os clones que apresentaram insertos condizentes com o tamanho dos genes em questão foram seqüenciados. As extrações de DNA foram adaptadas do protocolo de lise alcalina (BIRBOIM e DOLY, 1979) com modificações realizadas pelo Dr. Marcelo Bento Soares (Universidade de Iowa, EUA); volume final de DNA de 50 µL. As reações de seqüenciamento seguiram o método descrito no item 3.2.5 (Análise dos clones transformantes). Os primers utilizados foram:

pOBD(MCS)-F: '5 CAAAGACAGTTGACTGTATCGAACTATC 3'

pOBD(MCS)-R: '5 TTGAGATGGTGCACGATGCACAG 3'

3.4- Ensaio de Duplo-híbrido

3.4.1- Transformação da linhagem PJ69-4a com a isca de interesse

A linhagem PJ69-4a de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) foi usada para os testes de duplo-híbrido. A transformação desta linhagem baseou-se no protocolo descrito por GIETZ e colaboradores (1998) obtido em www.research.bmn.com (2002). Primeiramente, a levedura foi estriada em meio SC (base de nitrogênio 0,66%; glicose 2%; mistura de aminoácidos 0,083%; agar bacteriológico 1,6%; pH 5,6) ou YAPD (extrato de levedura 1%; peptona 2,5% ; glicose 2%; adenina 0,008%; pH 5,6) e incubada por 16-24 h a 30°C. Uma porção de 25 µL de células foi removida da placa e ressuspensa em 1 mL de água ultrapura em um tubo de microcentrifuga. As células foram lavadas e centrifugadas por 30 s, 8.000 rpm. Ao “pellet”, foram adicionados na seguinte ordem: 240 µL PEG MW 3350 (50%); 36 µL acetato de lítio (1 M); 50 µL ss-DNA de esperma de salmão (2 mg/mL, Sigma, cat No. L-1626); 2 µL do plasmídeo contendo a ORF de interesse, obtido através de miniprep descrita no item 3.3.3 e água ultrapura para 360 µL finais. Após a ressuspensão em vortex, as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 30 min, quando foram novamente centrifugadas. Ao “pellet”, adicionaram-se 400 µL de água ultrapura para ressuspensão das células, que foram então incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Amostras de 200 µL foram plaqueadas em meio SC-trp (SC sem triptofano) e incubadas a 30°C por 2-4 dias. Os clones obtidos foram picados para uma placa SC-trp, onde passam por repiques periódicos para sua manutenção.

3.4.2- Teste de auto-ativação com a isca de interesse

Gene Repórter GAL1-HIS3

O clone contendo a isca de interesse foi repicado em placa em meio SC-trp por 16-24 h a 30°C. Após crescimento, aproximadamente 10 µL de células foram transferidos para tubo de microcentrifuga contendo 1 mL de água estéril. Mediu-se a absorbância inicial desta suspensão (OD_{600nm} 0,1=1x10⁶ UFC/mL) após a diluição de 1 µL desta em 1 mL de água. Assim, calculou-se a diluição que continha aproximadamente 10 colônias/µL e plaquearam-se 100 µL desta diluição (1.000 colônias) em placas com meio SC-trp (controle) e SC-trp-his (SC sem triptofano e sem histidina), em concentrações crescentes de 3-amino triazol (3-AT): 0 mM; 1 mM; 5 mM; 10 mM; 25 mM e 50 mM 3-AT. As

placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e a concentração inibitória de 3-AT foi determinada para cada clone.

Gene repórter GAL2-ADE2

O clone contendo a isca de interesse foi isolado e estriado em placas com meio SC-trp-his-ade (SC sem triptofano, sem histidina e sem adenina) ou YPD. Após este procedimento, incubaram-se as placas a 30°C por 5 dias. O crescimento da colônia indicou ativação do gene.

Gene repórter GAL7-LacZ

Um círculo de papel de filtro ou membrana de nitrocelulose de 75 mm foi recortado e colocado sobre as placas já testadas para auto-ativação do reporter de histidina (somente as placas SC-trp que continham aproximadamente 1.000 colônias). Após a remoção do filtro, este foi mergulhado em nitrogênio líquido por 15 segundos e deitado em filme plástico com a face das colônias adsorvidas para cima, até o descongelamento; procedimento este, que se repetiu por 2 vezes. O papel de filtro foi colocado sobre uma placa contendo uma membrana de nitrocelulose umedecida em uma solução de tampão Z/ β -mercaptoetanol/X-gal (NaH₂PO₄.H₂O 1,38%; KCl 0,075%; MgSO₄.7H₂O 0,025%; β -mercaptoetanol 0,27%; X-gal 167 mg/mL), tomando-se o cuidado de colocar as colônias voltadas para cima. A leitura foi realizada após 1, 2 e 24 h de incubação a 37°C. Observamos, no entanto, que a própria levedura PJ69-4a, apresentou auto-ativação desse gene repórter, o que parece ser característico desta cepa devido à ativação do promotor Gal7 em resposta ao tratamento de permeabilização celular (JAMES *et al.*, 1996). Como a presença dos repórteres GAL1-HIS3 e GAL2-ADE2 mostrou ser eficiente para a triagem (UETZ *et al.*, 2000), não utilizamos o repórter Gal7-lacZ para a seleção dos clones positivos.

3.4.3- Transformação em larga-escala da linhagem PJ69-4a com a biblioteca de Xac

O rastreamento das interações entre as “iscas e presas” requer um grande número de transformantes para testar uma grande fração de presas presentes na biblioteca. Segundo o protocolo de GIETZ (1998), antes de partirmos para uma transformação em larga-escala,

é preciso testar concentrações crescentes de DNA plasmidial que permitirão uma boa cobertura da biblioteca genômica.

Para a transformação em larga escala, primeiramente testamos a eficiência da transformação dependente da quantidade de DNA das bibliotecas de *Xac*. O método de transformação seguiu o protocolo indicado no item 3.4.1, com diferentes quantidades de DNA plasmidial das bibliotecas 1 (fragmentos 500-1500 pb) e 2 (fragmentos 1500-3000 pb): 0,5; 1,0; 2,0; e 5,0 µg de DNA de cada biblioteca e seleção de transformantes em meio SC-leu + 2 mM 3-AT. Adotamos uma escala de transformação de 30 vezes, onde o número de transformantes utilizando 30 µg de DNA total (mistura das bibliotecas 1 e 2) foi de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ UFC.

Protocolo: 30 x Larga-escala

Em rastreamentos de interações utilizando-se dois plasmídeos diferentes, a estratégia que se mostrou mais simples e eficiente foi a de transformação da levedura primeiramente com a ORF de interesse (isca), utilizando o protocolo descrito no item 3.4.1, seguida da transformação em larga-escala (30x).

A linhagem contendo a isca de interesse (baseado no vetor pOBD), foi inoculada em 50 mL de meio SC-trp e incubada sob agitação a 30°C por 16 h. Após este período, mediu-se a OD_{600nm} e calculou-se o volume de pré-inóculo necessário pra a obtenção de um total de $7,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas e inoculadas em 150 mL de meio YAPD. Após incubação a 30°C por 6 h, sob agitação; novamente foi verificada a quantidade de células, que deveria atingir uma OD₆₀₀= 2,0 correspondente à aproximadamente $2,0 \times 10^7$ UFC/mL.

A cultura foi então dividida em 3 tubos de 50 mL e centrifugada a 4.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 25 mL de água estéril, quando foram novamente sedimentadas e ressuspensas em um único tubo com 3 mL de acetato de lítio (100 mM). A solução foi incubada em banho-maria a 30°C por 15 min, sendo então centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao “pellet”, na ordem indicada, foram adicionados: 7,2 mL PEG (50%); 1,08 mL acetato de lítio (1,0 M); 1,5 mL ss-DNA esperma de salmão (2 mg/mL); 30 µL DNA de biblioteca (30 µg total) e 970 µL H₂O. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 30°C por 30 min, agitando-se bem o tubo a cada 10 min. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico a 45°C por 45 min, no decorrer dos quais, o tubo era invertido a cada 5 min. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 min e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 20 mL de água ultrapura estéril e

plaquearam-se 400 µL da solução em 50 placas (150x15 mm) contendo meio SC-trp-leu-his + 3mM 3-AT (para os clones negativos em auto-ativação GAL1-HIS). Em outra placa contendo SC-leu, plaquearam-se 50 µL de uma diluição 1:100 da mistura (controle do número de transformantes totais). Incubaram-se as placas a 30°C durante 14 dias, no decorrer dos quais, efetuou-se a contagem de colônias.

Teste de crescimento em SC-HIS e SC-HIS-ADE

Os clones positivos obtidos através do ensaio do duplo-híbrido foram novamente repicados em placas contendo meio SC-trp-leu-his+ 3-AT e SC-trp-leu-his-ade+concentração adequada de 3-AT e incubados a 30°C por 48 h. Somente foram considerados positivos aqueles que apresentaram crescimento em ambas as placas.

3.4.4- Análise dos clones positivos

3.4.4.1- Recuperação dos vetores pOAD e pOBD

Isolamento do DNA plasmidial de levedura: protocolo Chengshi Jin

O protocolo para isolamento dos vetores da levedura baseou-se no método descrito por JIN (2000). Colônias His⁺/Ade⁺ foram repicadas em alíquotas de 3,0 mL de meio SC-trp-leu e incubadas a 30°C por 24 h. As células foram centrifugadas e os “pellets” transferidos para um tubo de microcentrifuga. 200 µL de uma solução de lise (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1,0 mM EDTA) foram adicionados ao “pellet”, que foi ressuspensionado em vórtex. Após este procedimento, adicionaram-se 200 µL de fenol/clorofórmio (1:1) e 0,3 g de “glass beads” (425-600 µm, lavadas em ácido nítrico concentrado e enxaguadas em água ultrapura); o conteúdo foi vortexado por 2 min e incubado em gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante recolhido para novo tubo de microcentrifuga ao qual adicionaram-se 0,1V acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5V de etanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 20 µL de TE.

Isolamento do DNA plasmidial de levedura: protocolo SAMBROOK

Alternativamente, para extração de DNA de 96 clones independentes, preferimos testar o método em placas, com pequenas modificações. Em uma placa de 96 poços (COSTAR, assay block, cat No. 3960) inocularam-se, independentemente, colônias His⁺/Ade⁺ em meio seletivo SC-trp-leu. Incubou-se a placa a 30°C, sob agitação (300

rpm) por 36 h. Centrifugou-se a 2.700 rpm a 4°C, por 5 min e descartou-se o sobrenadante. Ressuspenderam-se as células no volume residual do meio e adicionou-se 1 mL de “rescue buffer” (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,3% β-mercaptoetanol). Após este procedimento, a placa foi agitada em vórtex e as células novamente precipitadas e ressuspensas em 25 µL de solução de lise (2 mg/mL de zimolase; 0,2 mg/mL de RNase dissolvidas no tampão supracitado). Incubou-se a placa a 37°C por 1h, adicionaram-se 25 µL de SDS (10%), agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de acetato de potássio 3 M, e a placa foi levada ao freezer -80°C por 15 min. Após o descongelamento, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm, por 15 min, à 4°C e 120 µL do sobrenadante foram recolhidos em placa MicroAmp (Applied Biosystem, cat No. N801-0560). 84 µL de isopropanol foram adicionados ao sobrenadante, a placa foi agitada e incubada por 5 min à temperatura ambiente; centrifugou-se então a placa a 4.000 rpm, por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com etanol (70%). Após a drenagem, secou-se o “pellet” invertendo-se a placa sobre um papel toalha e centrifugando-a em dois pulsos de 800 rpm. O “pellet” foi, então, ressuspensado em 10 µL de TE e usado na transformação de células de *E. coli*, para a obtenção dos vetores para sequenciamento.

3.4.4.2- Transformação de células de *E. coli*

Transformação em larga-escala

Para a transformação das células de *E. coli* DH10B, utilizamos 2 µL do DNA extraído através dos protocolos descritos em 3.2.6. Num primeiro momento, o DNA extraído pelo protocolo segundo JIN (2000) foi utilizado para a transformação de células DH10B através de eletroporação e os vetores obtidos posteriormente, através da extração por “boiling-prep”. Contudo, para uma análise em larga-escala, optamos pela transformação de bactérias em placas, através do método de transformação por cloreto de cálcio.

Para o preparo das células competentes, cresceu-se uma cultura em meio 2YT por 12 h a 37°C. 1 mL deste pré-inóculo foi utilizado em 100 mL de meio 2YT até atingir OD_{600nm} = 0,6. A cultura foi centrifugada a 4°C por, 5 min, a 4.000 rpm e ressuspensa em 50 mL de cloreto de cálcio (100 mM); centrifugada novamente e ressuspensa em 10 mL da mesma solução. Segundo este método, 2 µL de DNA dos clones His⁺/Ade⁺, obtidos através da extração segundo o protocolo descrito em SAMBROOK (2001) foram usados para a transformação de 100 µL de células competentes DH10B, as quais, foram

distribuídas em placa MicroAmp. Após agitação, incubou-se a placa em gelo por 30 min e procedeu-se ao choque-térmico a 42°C por 120 s. As culturas foram transferidas para uma placa COSTAR (cat. No. 3960) contendo 1 mL de meio SOC e incubadas a 37°C, por 1h. Após este período, 20 µL da cultura foram transferidos para outra placa COSTAR contendo 1 mL de Terrific Broth + carbenicilina (200 µg/mL), para a extração do DNA através do método “boiling-prep” e posterior seqüenciamento.

Transformação por eletroporação na cepa KC8

Com o intuito de isolarmos somente o vetor pOAD utilizamos a linhagem de *E. coli* KC8 (*hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *pyrF::tn5*, *hisB463*, *lacDX74*, *strA*, *galU,K*). Em uma cubeta de 0,2 mm (Gene Pulser Cuvette, cat No. 165-2086), adicionou-se uma mistura contendo 1 µL do DNA extraído dos clones positivos de levedura em 40 µL de células competentes KC8 (preparadas segundo descrito no item 3.2.5). As condições de eletroporação foram 100 Ω, 50 µF e 2,5 kV. Após a eletroporação, foi adicionado à cubeta, 800 µL de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; NaCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM e glicose 20 mM) gelado e a suspensão transferida para microtubo e incubada por 40 min, a 37°C, sem agitação. Após a incubação, 50 µL da suspensão foram plaqueados em meio de cultura mínimo M9 (1x solução de sais, 1 mM MgSO₄, 0,4% glicose, 0,1 mM CaCl₂) acrescido somente de uracila (20 mg/L), histidina (20 mg/L), triptofano (40 mg/L) e carbenicilina (100 µg/mL), no caso de seleção de bactérias contendo o vetor pOAD. As placas foram incubadas a 37°C por 24/48 h.

3.4.4.3- Seqüenciamento do vetor pOAD

As reações de seqüenciamento seguiram o método descrito no item 3.2.5 (Análise dos clones transformantes).

3.4.4.4- Análise dos clones seqüenciados

As seqüências foram submetidas ao banco de dados do NCBI e ao sítio de *Xanthomonas* (<http://genoma4.iq.usp.br>), através do programa de alinhamento BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), após a remoção da seqüência nucleotídica do vetor até o sítio de clonagem da biblioteca em Pv.uII, com o intuito de verificarmos a fase de leitura das presas.

3.5- Preparação da Biblioteca de presas derivadas dos dois loci vir de Xac

3.5.1- Amplificação dos dois loci vir

As regiões dos dois *loci vir* de *Xac* foram amplificadas por PCR segundo a Figura 21, utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 9, com as seguintes condições de amplificação: 100 ng DNA genômico total, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (F e R), 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTP e 1 µL Taq Polimerase recombinante. As amostras foram aquecidas a 92°C por 1,50 min, seguido de 25 ciclos de amplificação: 92°C por 1 min; 57°C por 15 s; 72°C por 3 min.

Figura 21: Representação dos dois *loci* *Vir* de *Xac*. As linhas vermelhas representam os fragmentos de DNA que foram amplificados. As linhas duplas representam duas amplificações idênticas. Os números correspondem aos pares de oligonucleotídeos utilizados nas amplificações, listados na Tabela 9.

Tabela 9: Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações e tamanho dos fragmentos amplificados.

Representante	Primers	Seqüências	Sítios de restrição	Hibridação no genoma	Tamanho do fragmento
1	XACb0018R XACb0018F	5'TGACTCGAGTCAACCC TTGAGGAAGGCTTCC 5'CATGCCATGGGCATGAAGGGCAAGCCC	XhoI NcoI	20144 20464	320
2	XACb0018R XACb0020F	5'TGACTCGAGTCAACCC TTGAGGAAGGCTTCC 5'CATCGCCATGGATTGGGAACGCCTTGGTTTC	XhoI NcoI	20144 21548	1404
3	XACb0020F XACb0020R	5'CATCGCCATGGATTGGGAACGCCTTGGTTTC 5'TGACTCGAGCTATCTATGTATATACATACCGATGGG	NcoI XhoI	21548 21099	449
4	XACb0021R XACb0025R	5'ATACTCGAGTTACATCCC GGCCAGCTTGG 5'TGAATTC CTCGAGTTACGAATCCTCCGTAAAGCGG	XhoI XhoI	22037 24746	2709
5	XACb0024R XACb0028R	5'TGAATTCCTCGAGTCATTTGTGCTTCTCCATTTTCTC 5'TTTAAGCTTCTCGAGTTATTGCTCCTCTTGCGAAGGG	XhoI XhoI	23563 25974	2411
6	XACb0026F XACb0027F	5'CATGCCATGGCACAGACCACCGGCC 5'CATGCCATGGCAAAATTCCGGCGTACTGC	NcoI NcoI	24749 25336	587
7	XACb0026F XACb0028R	5'CATGCCATGGCACAGACCACCGGCC 5'TTTAAGCTTCTCGAGTTATTGCTCCTCTTGCGAAGGG	NcoI XhoI	24749 25974	1225

Tabela 9: continuação					
8	XACb0028F XACb0030R	5'GGAATTCATATGTATGGCCAGCCACCT 5'TTGCTCGAGTCACTTGATGTCGATAGCGGCC	NcoI XhoI	25522 28347	2825
9	XACb0029R XACb0030R	5'TGAATTCCTCGAGTACACCTTGGGCGCGCA 5'TTGCTCGAGTCACTTGATGTCGATAGCGGCC	XhoI XhoI	26391 28347	1956
10	XACb0030F XACb0030R	5'CATGCCATGGAGAAGCACGAAGTCGAAAGC 5'TTGCTCGAGTCACTTGATGTCGATAGCGGCC	NcoI XhoI	26776 28347	1571
11	XACb0033F XACb0030F	5'GCCATGCCATGGCACACGTCAATTCACGAGTT 5'CATGCCATGGAGAAGCACGAAGTCGAAAGC	NcoI NcoI	31719 26776	4943
12	XACb0030F XACb0034R	5'CATGCCATGGAGAAGCACGAAGTCGAAAGC 5'TTGCTCGAGTCACTTGATGTCGATAGCGGCC	NcoI XhoI	26776 32436	717
13	XACb0033R XACb0035F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATTCGCTCCAGCCATCCATGTC 5'GCCATGCCATGGACAACGCCGAAATTATGAAGATACAA	XhoI NcoI	31719 32953	1234
14	XACb0033R XACb0036F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATTCGCTCCAGCCATCCATGTC 5'CATGCCATGGCGGCAGGGCTGTTGG	XhoI NcoI	31719 33957	2238
15	XACb0036R XACb0039F	5'CTGCTCGAGTCAATTCACAACTGCACGAAAGGC 5'CCATGCCATGGCGCTGTCGATGCCGGT	XhoI NcoI	33082 37005	3923
16	XACb0036R XACb0037F	5'CTGCTCGAGTCAATTCACAACTGCACGAAAGGC 5'CCATGCCATGGCGCAGATTGCCTCCTTCC	XhoI NcoI	33082 34990	1908
17	XACb0035R XACb0036F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATGTTCCGGGTAGCTTGTGCC 5'CATGCCATGGCGGCAGGGCTGTTGG	XhoI NcoI	32537 33957	1420
18	XACb0034F XACb0035F	5'CGTATTCCATATGTATGGCCAGCCACC 5'GCCATGCCATGGACAACGCCGAAATTATGAAGATACAA	NcoI NcoI	32017 32953	936
19	XACb0035R XACb0037F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATGTTCCGGGTAGCTTGTGCC 5'CATGCCATGGAGAAGCACGAAGTCGAAAGC	XhoI NcoI	32537 34990	2453
20	XACb0037R XACb0039F	5'GGAATTCCTCGAGTATTACGCACCTGCATAGATGATCTC 5'CCATGCCATGGCGCTGTCGATGCCGGT	XhoI NcoI	33971 37005	3034
21	XACb0039F XACb0039R	5'CCATGCCATGGCGCTGTCGATGCCGGT 5'AGAATTCCTCGAGTATTATGTTCCGGGTAGC	NcoI XhoI	37005 36226	779
22	XACb0039R XACb0041F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATGTTCCGGGTAGC 5'GTTGCCATGGAGAAGCACGAAGTCGAAAGC	XhoI NcoI	36226 38567	2341
23	XACb0039R XACb0042F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATGTTCCGGGTAGC 5'TATGCCATGGAGTCGGCGCTACCACCT	XhoI NcoI	36226 38964	2738
24	XACb0042R XACb0045F	5'AGAATTCCTCGAGTATTATTCGCTCCCATCACTTCCC 5'CCATGCCATGGCGCATGGAGTCCGGT	XhoI NcoI	38572 42500	3928
25	XACb0045R XACb0048F	5'CATAAGCTTCTCGAGTATTATGCTCCTTTCTGCTTGAGGTTGT 5'GATGCCATGGGCATGAAGGGCAAGCCA	XhoI NcoI	39870 43576	3706
26	XACb0045R XACb0049F	5'CATAAGCTTCTCGAGTATTATGCTCCTTTCTGCTTGAGGTTGT 5'GAATTCATATGTCGAGGCGGCTACTCGC	EcoRI NcoI	39870 44095	4225
27	XACb0048R XACb0049F	5'TGAATTCCTCGAGTATTATTCGCTCCAGCCATCCA 5'GCCATGCCATGGACAACGCCGAAATTATGAAGA	XhoI NcoI	43220 44095	875
28	XAC2605F XAC2605R	5'CATGCCATGGGTCATGCTCAAGGTGCTGAAA 5'AGAATTCCTCGAGTTAGCGCTTCTCCAGTTCTTCG	NcoI XhoI	3072017 3072457	440
29	XAC2605R XAC2606F	5'AGAATTCCTCGAGTTAGCGCTTCTCCAGTTCTTCG 5'ATGCCATGGAATTATTTACTAATTTTCTG	XhoI NcoI	3072017 3073280	1263
30	XAC2606R XAC2609F	5'CCCTCGAGTTAGAATTTCTTAAAAAATGGCTTGA 5'CATGCCATGGGCGATGGACGTGGTCG	XhoI NcoI	3072792 3075701	2909
31	XAC2605R XAC2609F	5'AGAATTCCTCGAGTTAGCGCTTCTCCAGTTCTTCG 5'CATGCCATGGGCGATGGACGTGGTCG	XhoI NcoI	3072017 3075701	3684
32	XAC2609R XAC2610F	5'ACGCGTCGACTTACATGGACATTGAGCGCGAAG 5'CATGCCATGGTGACGCGCAATTAGCAAG	SalI NcoI	3074409 3076609	2200
33	XAC2610R XAC2611F	5'CAGCTCGAGCTAGTTGGACACCTCCTTCATTTT 5'CATGCCATGGTTATATCCGCTTGGCTTCAATTAT	XhoI NcoI	3075809 3077125	1316
34	XAC2611R XAC2612F	5'CCCTCGAGTCAATTTCTTGAATATTGGATCAGA 5'CATGCCATGGGTCATGCTCAAGTGGCTGATT	XhoI NcoI	3076634 3078209	1575
35	XAC2613R XAC2614R	5'GGAATTCCTCGAGTATTAGTCCTTGTCGATCTCTAATCTTCCAT 5'CCGCTCGAGTATTATGCATCTTCGACCTCCTTGTC	XhoI XhoI	3078310 3081580	3270
36	XAC2614R XAC2616F	5'CCGCTCGAGTATTATGCATCTTCGACCTCCTTGTC 5'CATGCCATGGGCGATGCTACGTGGTCTGTT	XhoI NcoI	3079130 3082394	3264
37	XAC2616R XAC2618R	5'ACGCGTCGACTTACATGGACATTGAGCGCGTTCG 5'ATTCTCGAGTATTAGCCGCCGCGCAGGG	XhoI XhoI	3081987 3084385	2398
38	XAC2617R XAC2618F	5'CCGCTCGAGTAAAAAACGAATGCGCTATCCACTT 5'TTACCCGGGGTGAATGAAATGGTTGCCATGACG	XhoI SmaI	3082455 3084385	1930
39	XAC2618R XAC2620F	5'ATTCTCGAGTATTAGCCGCCGCGCAGGG 5'CCCATGCCATGGCCAAACCCATCATCATCGCA	XhoI NcoI	3083348 3086333	2985
40	XAC2618R XAC2622F	5'ATTCTCGAGTATTAGCCGCCGCGCAGGG 5'GGAATTCATATGAATCCGATGTATGTGTCCAAGC	XhoI NcoI	3083348 3087905	4557
41	XAC2622R XAC2623F	5'GGAATTCATATGAATCCGATGTATGTGTCCAAGC 5'GCCATGCCATGGCCAAACCCAAAATCATCGCAAT	XhoI NcoI	3087489 3089903	2414
42	XAC2623R XAC2625F	5'TATAAGCTTCTCGAGTATTACATTCTGATGGTAAGCGTCTTCAC 5'ACCATGCCATGGCCAAACCCAAAATCATCGCCAG	XhoI NcoI	3088233 3093096	4863
43	XAC2625F XAC2625R	5'ACCATGCCATGGCCAAACCCAAAATCATCGCCAG 5'AATAAGCTTCTCGAGTATTACCCGCTGATGGTAAGCC	NcoI XhoI	3091078 3093096	2018

3.5.2- Sonicação, reparo do DNA e purificação em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram analisados em um gel de agarose 1% (Figura 28, item Resultados). A concentração de DNA foi medida por espectrofotometria através da leitura da absorbância a 260 nm. Deste modo, reunimos em um “pool” quantidades de DNA equivalentes de cada produto de PCR.

Ao “pool” de produtos de PCR, adicionamos glicerol, numa concentração final de 30% e dividimos o conteúdo em seis microtubos. Utilizamos o sonicador “Fisher Sonic Dismembrator, Model 500”, com amplitude de 70%, variando somente o tempo de sonicação para cada tubo (entre 1 a 3 min). As amostras foram aplicadas em um gel de agarose para verificar a distribuição de tamanho dos fragmentos. O DNA de cada tubo foi precipitado com etanol/acetato e 5 µg de cada foram reparados em 40 µL de reação com 6U T4 DNA polimerase, 5U Klenow, 10U polinucleotídeo quinase, 2 mM ATP e 1x tampão 2 (New England Biolabs). A mistura foi incubada a 15°C por 20 min e adicionada de 10 µL de tampão TAE 1x quando foi aplicada em gel de agarose “low-melting point” 0,8% contendo brometo de etídio (1 µg/mL). Após a eletroforese (80 V), foram selecionados três blocos de gel, correspondentes aos fragmentos de DNA compreendidos entre 250 a 500 pares de bases, 500 a 1000 pb e 1000 a 2000 pb (Figura 27, item Resultados). Cada bloco de gel foi purificado para a extração do DNA pelo método descrito em SAMBROOK & RUSSELL (2001). O DNA purificado foi precipitado com etanol/acetato e dissolvido em 15 µL de água ultrapura.

3.5.3- Transformação de células competentes DH10B em larga escala

Considerando que o tamanho total dos dois “clusters” do Sistema de Secreção IV é de 45.030 pares de bases, calculamos que para obtermos uma boa representatividade da biblioteca, necessitaríamos de pelo menos 180.000 clones independentes. Após a análise prévia das transformações em pequena escala procedemos à larga escala, totalizando 60 transformações por dia (20 µL de reação de ligação para cada “pool”), em um total de 6 dias. A cada 20 eletroporações, as células ressuspensas em 800 µL de meio SOC, eram coletadas em um tubo estéril de 50 mL, incubadas por 45 min/37°C, sob agitação e estocadas a – 80°C após a adição de 1V de glicerol a 50%. Antes do congelamento, alíquotas de 100 µL de cada tubo contendo o “pool” das 20 transformações, adicionado de glicerol, eram retiradas e congeladas, mimetizando as condições das bactérias nos tubos. Após este procedimento, essas alíquotas eram descongeladas, plaqueadas e incubadas para obtermos uma estimativa do número total de transformantes a cada dia de transformação.

Para cada reação de ligação, procedíamos também às transformações dos controles: Vetor (reação sem ligase e inserto) e Vetor+ligase (reação sem inserto) para estimarmos o número de clones sem inserto, os quais eram descontados do número total de clones obtidos (vide as Tabelas 6 e 7, Resultados).

3.5.4- Amplificação das bibliotecas genômicas

As bactérias transformadas e estocadas a -80°C foram descongeladas e submetidas à amplificação. Para isso, grupos de 200.000 clones positivos foram combinados e inoculados em 500 mL de meio 2YT em um total de 6 frascos (2 para cada “pool”). Após 20 min da inoculação a 37°C , uma alíquota de 500 μL foi retirada de cada frasco e plaqueada. Adicionou-se carbenicilina (200 $\mu\text{g/mL}$) às culturas que permaneceram a 37°C sob agitação até atingir uma $\text{OD}_{600\text{nm}}=1,2$. Estas foram então transferidas para o gelo por 30 min, coletadas por centrifugação e congeladas a -20°C . Amostras de 10 mL de cada frasco de cultura foram coletadas e estocadas a -80°C após adição de 1 volume de glicerol 50%, com o intuito de preservarmos a biblioteca. O DNA foi purificado a partir das células congeladas utilizando o procedimento descrito por SAMBROOK e RUSSELL (2001) incluindo lise alcalina e purificação do DNA através de passagem por coluna QIAGEN (tip 500). Esta biblioteca foi então testada para ensaios de duplo-híbrido conforme descrito no item 3.4.

3.6- Biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*

3.6.1- Extração do RNA total

Folhas de *Citrus sinensis* foram infectadas com uma suspensão de *Xac*, coletadas após 2 dias da inoculação e congeladas em nitrogênio líquido. As áreas não infectadas da superfície foliar foram coletadas conjuntamente com as áreas infectadas e foram consideradas como tempo zero de infecção.

Com o auxílio de um pistilo o material foi macerado individualmente em um almofariz até a obtenção de um pó fino, o qual foi transferido para um tubo de 50 mL, contendo reagente de Trizol (para cada grama de pó, utilizamos 8 mL de Trizol). O conteúdo foi agitado em vórtex por 5 min e centrifugado por 15 min, a 4°C , 4.000 rpm. Transferimos o sobrenadante para novo tubo de 15 mL e acrescentamos 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol. O tubo foi agitado gentilmente por 15 s e incubado

à temperatura ambiente por 3 min, sendo então centrifugado a 4.000 rpm, por 10 min, à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 mL. Para a precipitação do RNA alíquotamos 1 mL do sobrenadante em microtubos e adicionamos 500 µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos por 20 vezes e deixados 10 min à temperatura ambiente sendo então centrifugados a 13.000 rpm por 30 min a 4°C. O precipitado foi lavado com 1 mL etanol 70% e seco em “speed vac” por 5 min. O precipitado de RNA foi ressuspensionado em 50 µL de água DEPC e quantificado em espectrofotômetro por medida de Abs_{260/280 nm}.

3.6.2- Isolamento de mRNA

Para o isolamento do mRNA utilizou-se o “kit” Oligotex mRNA Batch Protocol (QIAGEN, para isolamento do poliA⁺ mRNA a partir do RNA total). Após a quantificação do RNA total de cada amostra, procedeu-se ao isolamento dos mRNAs adicionando em microtubos os seguintes reagentes: 1 µg RNA total, 500 µL água DEPC, 500 µL tampão OBB e 55 µL Suspensão Oligotex. Os tubos foram incubados a 70°C por 3 min e centrifugados por 15 min a 14.000 rpm e os sobrenadantes foram removidos com o auxílio de uma pipeta. Ressuspendeu-se os precipitados em 500 µL de água DEPC, vagarosamente. Adicionou-se 500 µL de tampão OBB e repetiu-se a incubação a 70°C, o repouso e a centrifugação. Os precipitados foram ressuspensionados em 1 mL de tampão OW2 e centrifugados por 15 min. Os sobrenadantes foram removidos com auxílio de pipeta. Repetiu-se o passo anterior mais uma vez e adicionou-se 100 µL de tampão OEB (aquecido a 70°C). Pipetou-se de 3 a 4 vezes para ressuspender a resina. Centrifugamos a 14.000 rpm, por 5 min e transferiu-se os sobrenadantes, contendo os poliA⁺ mRNA eluídos, para microtubos novos. Procedeu-se então a precipitação dos mRNAs com isopropanol e lavagem com etanol 70%.

3.6.3- Construção da biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*

Para a elaboração da biblioteca de cDNA foi utilizado o “kit” “SuperScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning”, da Invitrogen. Todos os procedimentos de síntese das fitas de cDNA foram realizados segundo informações contidas no manual (catálogo série 18248) exceto que as ligações foram realizadas usando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs). Os cDNAs foram marcados com α -³²dCTP e continham os adaptadores Sall e NotI nas extremidades 5’ e 3’ respectivamente,

para a clonagem direcional dos fragmentos em vetor pOAD2 previamente digerido com *SalI*/*NotI*. Este novo vetor foi modificado a partir do vetor pOAD onde o sítio múltiplo de clonagem foi modificado pela inserção de um sítio para a enzima *NotI* (Figura 22). Seguiu-se então, o fracionamento dos fragmentos de cDNA em coluna de cromatografia fornecida juntamente com o próprio “kit”.

TAT CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CCA AAA AAA GAG ATC GAA TTC
EcoRI

Pv.uII NcoI SalI NdeI SmaI NotI PstI

CAG CTG ACC ACC ATG GTCGA CAT ATG CCC GGG CGG CCG CTG CAG

AGA TCT ATG AAT CGT AGA TAC TGA AAA ACC CCG CAA GTT CAC TTC AAC TGT GCA

TCG TGC ACC ATC TCA ATT TCT TTC ATT TAT ACA TCG TTT TGC CTT CTT TTA TGT AAC

Figura 22: Novo sítio Múltiplo de Clonagem do vetor pOAD2. Este vetor foi modificado em colaboração com o Dr. Marcos Castanheira Alegria (IQ-USP).

Determinação do tamanho dos fragmentos de cDNA

Em gel de agarose 1%, realizou-se eletroforese das amostras de cada tubo contendo os fragmentos fracionados. Após a secagem por 2 h em um secador de gel (Bio-Rad), este foi exposto a um filme autoradiográfico e revelado.

Ligação dos fragmentos de cDNA ao vetor pOAD e transformação de *E. coli* DH5α

O vetor pOAD utilizado previamente na clonagem da biblioteca de *Xac* foi utilizado também na clonagem da biblioteca de cDNA. Para isto, o vetor foi digerido com as enzimas *SalI* e *NotI* e purificado de um gel de agarose, de onde procedeu-se a separação do vetor digerido, através de extração com fenol/clorofórmio. Células de *E. coli* DH5α foram transformadas com o produto da ligação de cDNA e vetor por eletroporação e plaqueadas em meio contendo carbenicilina (100 mg/L). Aproximadamente 600 mil colônias foram obtidas após inúmeras transformações. Os clones foram raspados das placas para compor a biblioteca, que foi aliquoteada em “pools” contendo glicerol (15% final) para estocagem a -80°C.

3.7- Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes

3.7.1- Clonagem em Vetores de Expressão

Com o intuito de se confirmar “*in vitro*” as interações observadas nas triagens de duplo-híbrido, preparou-se dois vetores de expressão para a clonagem dos genes *XAC1669*, *XAC1670* e *XAC1284*. O vetor pET-28a (+) (Novagen) foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI para a inserção dos genes *XAC1670* e *XAC1284*. Este vetor codifica duas caudas de 6xHis, uma N-terminal e outra C-terminal (Figura 23). A cauda C-terminal foi inativada por inserção de um códon de terminação. Assim as proteínas expressas com este vetor contém uma “His-tag” na região N-terminal da proteína. O vetor pAE (RAMOS *et al.*, 2004), foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI, para inserção do gene *XAC1669*, o que também retira a cauda “His-tag” (Figura 24). Assim, a proteína expressa não contém cauda “His-tag”.

O gene *XAC1669* foi amplificado por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos: 1669F-NdeI 5'CGGCATCCATATGCAGGGTCTGGACATCA e 1669R-BamHI 5'ATCCGG GATCCTTAGTGGGCGCGACGC. O gene *XAC1282* foi amplificado por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos: 1282F-NdeI 5' TGAGCCATGG GTCATATGCCCAGCGTTCC e 1282R-BamHI 5' CATCACTCGAGGAGGAT CCTTAGTCATGCTCGG, o gene *XAC1270* foi amplificado por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos 1270F-NdeI 5' CGAGGACCCATATGGCTTACGCATTACCCA e 1270R-BamHI 5' GGTTG CGGA TCCTTAGAGCGCCGTCTGT, o gene *XAC2555* foi amplificado por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos 2555F-NcoI/NdeI 5'GCGCCATGGATCATATGAACGATCCCGGTC e 2555R-XhoI/BamHI 5'AGTG CTCGAGTGGGATCCTTAACCAACCCG e finalmente, o gene *XAC3273* foi amplificado por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos 3273F-NdeI 5'CCTCTGAC CATATGAAAAATACTCTGATGTCGC e 3273R-EcoRI 5' CACATGACTGA ATTCTTAAGGGCAAGGCATGC.

Após a ligação dos fragmentos com os vetores digeridos, 1-2 µL das misturas de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa DH10B. Estas foram plaqueadas em meio LB agar contendo o antibiótico adequado para a seleção dos transformantes (30 µg/mL de kanamicina para pET-28a e 100 µg/mL de ampicilina para pAE). Plasmídeos foram isolados dos clones obtidos, analisando-se em seguida o perfil de restrição desses vetores. Os plasmídeos com padrão compatível de

Figura 23: Mapa do vetor pET-28a(+) mostrando, em vermelho, os sítios de clonagem.

[illegible]

Figura 24: Mapa de restrição e seqüência na região dos sítios múltiplos de clonagem do vetor pAE (RAMOS *et al.*, 2004).

3.7.2- Expressão de Proteínas Recombinantes em *E. coli*

Testes em pequena escala foram realizados para uma avaliação da expressão das proteínas em diferentes linhagens de *E. coli*: BL21(DE3), BL21(DE3)RP, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)Star e Cy(DE3)pLysS (STUDIER *et al.*, 1990). Uma alçada de uma única colônia foi inoculada em 4 mL de meio 2YT com os antibióticos necessários. As culturas foram incubadas a 37°C com agitação de 200 rpm até atingir uma OD_{600nm} de 0,8. Neste momento foram retiradas alíquotas de 1 mL para o controle das amostras não induzidas, sendo então adicionado 0,4 mM de isopropil-β-tiogalactosídeo (IPTG) para indução da expressão. Após 4 h, foram retiradas novas alíquotas de 1 mL para o controle induzido. As amostras induzidas e não-induzidas foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente e as células foram ressuspendidas em tampão de amostra (50% glicerol, 260 mM de Tris-Cl pH 6,8, 10% SDS a 0,5% azul de bromofenol e 2-mercaptoetanol), sendo em seguida fervidas durante 5 min. Os níveis de indução foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Uma vez escolhida a melhor cepa para expressão de cada proteína, esta era utilizada para expressões em larga escala (1 L em meio 2YT). A indução da expressão foi realizada em OD_{600nm} de 0,8-1,2, por adição de 0,4 mM de IPTG (ROSENBERG *et al.*, 1987), por 3 h, a 25°C (no

caso de XAC1669) ou a 37°C (no caso de XAC1670 e 1282) sob agitação de 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 15 min a 4°C e estocadas à – 20°C. As amostras não induzida e induzida foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de amostra, lisadas e analisadas novamente por SDS-PAGE.

3.7.3- Purificação das Proteínas Recombinantes

As purificações foram realizadas utilizando cromatografia de troca iônica, filtração em gel e de afinidade, em condições específicas definidas por meio de testes de solubilidade considerando o ponto isoelétrico teórico de cada proteína. As purificações foram feitas utilizando FPLC (modelo Akta, GE Healthcare).

Após a indução da expressão das proteínas recombinantes, as células de *E. coli* foram centrifugadas (15 min, 4.000 rpm) e ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (50 mM Tris-Cl pH 8 para XAC1669 e pH 7 para XAC1670 e XAC1284; 1 mM EDTA) por litro de indução. As células foram congeladas a -80°C e submetidas quatro ciclos de congelamento/descongelamento. Em seguida, adicionou-se 1 mg/mL de lisozima e incubou-se 30 min em gelo. Após este procedimento adicionou-se 10 µg/mL de DNase e 1 mM de MgCl₂ e incubou-se por mais 30 min em gelo. As células foram então lisadas utilizando *French Press* (SLM Instruments). Após a lise, adicionou-se 14 mM de β-mercaptoetanol e centrifugou-se por 1 h a 37.000 rpm. Através de SDS-PAGE, determinou-se em que fração se localizava a proteína. Nos casos em que as proteínas estivessem em corpos de inclusão, estes eram ressuspensos em tampão de lise com 8 M de uréia. Nestes casos, todos os tampões posteriores para a purificação continham uréia na mesma concentração.

Como primeira etapa de purificação, XAC1669, que não contém His-tag foi aplicada em uma coluna de troca aniônica (Q-sepharose, GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A (50 mM Tris-Cl pH 8; 1 mM EDTA; 14 mM 2-mercaptoetanol). Proteínas não ligadas à resina foram lavadas com 5 volumes de coluna (CV) do tampão A. A eluição era realizada com uma mistura linear de tampão A e tampão B (tampão A com 0,5 M NaCl), gerando um gradiente de 0-0,5 M de NaCl. Após a passagem pela Q-sepharose, as frações de interesse eram concentradas com concentrador AMICON até um máximo de 4 mL para aplicação em uma coluna de filtração em gel (Superdex 200, GE Healthcare). A coluna era equilibrada com tampão A, acrescido de 100 mM de NaCl e este mesmo tampão era utilizado durante a corrida.

Para a purificação das proteínas com cauda de histidina N-terminal (XAC1670_{6xHis} e XAC1282_{6xHis}) foi utilizada uma coluna de afinidade carregada com Ni²⁺ (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare). A coluna foi primeiramente equilibrada com 10 volumes do Tampão C (50 mM de Tris-HCl pH 8, 20 mM de imidazol, 100 mM NaCl, 14 mM 2-mercaptoetanol e 8 M de Uréia). Um volume de 20 mL das frações insolúveis da lise celular ressuspendido em Tampão C foi aplicado na coluna. Em seguida a coluna foi lavada com 10 volumes do Tampão C. As proteínas com “His-tag” retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 30-500 mM de imidazol em tampão D (50 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 14 mM 2-mercaptoetanol e 8 M de uréia). As frações eluídas (2 mL) foram coletadas em tubos de ensaio para posterior verificação da fração em que se encontravam purificadas. Ao final das purificações, as proteínas insolúveis eram dialisadas pela remoção gradual de uréia até permanecerem solúveis em um tampão 5 mM Tris-HCl pH 7,0-7,5.

3.8- Validação das interações “in vitro” a partir de proteínas purificadas

3.8.1- Ensaio de “Overlay”

A proteína XAC1669 purificada foi aplicada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. Após a eletroforese, a proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em sistema semi-seco (“Trans-Blot semi-dry transfer cell”, Bio-Rad) à 10 V, por 30 min. Ao término da transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,2% Ponceau em 1% ácido acético) para confirmar a transferência e marcar o padrão de massa molecular. O excesso de corante foi removido por meio de lavagens com água. A membrana foi bloqueada com 3% de leite desnatado em TBS-TT (50 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0.03% Tween-20, 0.05% Triton X-100) com agitação por 2 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio da membrana, esta era incubada durante a noite com 50 µg/mL de uma proteína (XAC1670_{6xHis} ou XAC1284_{6xHis}) cuja interação se desejava testar. Após 3 lavagens de 10 min com o tampão TBS-TT, a membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti-His (Sigma cat. No. 27471001) por 2 h à temperatura ambiente. Depois da lavagem com TBS-TT, o segundo anticorpo (proteína A-peroxidase em solução de bloqueio, 1:20.000, Sigma cat. No. P-8651) foi incubado por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente como descrito acima. A

detecção foi realizada por quimio-luminescência com o kit comercial “ECL” (GE Healthcare/Amersham Biosciences) conforme instruções do fabricante.

3.8.3- Ensaio de “Pull Down”

As proteínas recombinantes (50-100 µg de cada) XAC1669 e XAC1670_{6xHis} e XAC1669 e XAC1282_{6xHis} foram incubadas juntas em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 5mM imidazol por 2 h a 4°C. Para cada ensaio foram adicionados 80 µl de resina “Chelating Sepharose Fast Flow” (GE Healthcare) carregada com Ni²⁺ e previamente equilibrada com o tampão acima, e incubou-se mais 1 h, a 4°C, sob agitação. A mistura foi centrifugada a 2.000 rpm por 2 min, a 4°C. A resina foi então lavada duas vezes com 500 µL de tampão contendo 10 mM Tris-Cl pH 8,0; 100 mM NaCl; 40 mM imidazol. O complexo XAC1669/XAC1670_{6xHis} e XAC1669/XAC1282_{6xHis} ligado na resina foi eluído com 40 µL de 10 mM Tris-Cl pH 8,0; 100 mM NaCl; 500 mM imidazol. Frações de 20 µL da solução eluída foram analisadas por SDS-PAGE.

3.9- Nocaute de genes do T4SS plasmidial e cromossômico

3.9.1- Preparo de células competentes de Xanthomonas

Células de *Xac* competentes foram preparadas seguindo o método de KAMOUN, (1990). As bactérias foram crescidas em meio CIRCLEGROW (40 g/L- BIO 101 Systems-Q Biogene) a 28°C com agitação durante a noite até uma DO₆₀₀ de 0,5. Depois de centrifugadas, o “pellet” foi lavado 2 vezes com água estéril gelada. As células foram concentradas por centrifugação e aliquotadas, sendo imediatamente eletroporadas com o DNA plasmidial. Efetou-se a eletroporação usando o “GenePulser” (BIO-RAD) a 2,0 kV, 25 µF, 200 Ω, em cubetas de 0,2 cm. Após a transformação, incubamos em meio LB a 30°C por 2 h e plaqueamos em meio seletivo apropriado.

3.9.2- Obtenção do Mutante T4SS do plasmídeo pXAC64

A proteína VirB4 (XACb0045) foi escolhida para a realização da disrupção gênica, pois dentre as proteínas do T4SS plasmidial apresenta um tamanho maior que 1.000 pares de bases (2.684 pb), o que facilita a inserção do transposão. O gene de XACb0045 foi clonado no vetor pOBD (ampicilina-resistente). Para a mutação utilizamos o “kit” “transposon EZ::Tn5<Kan2>” (Figura 25) (Epicentre). Após as reações *in vitro* com a

transposase, segundo recomendação do fabricante, células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B foram transformadas e plaqueadas. Isolamos diversos clones, dos quais foram extraídos os plasmídeos através de “minipreps”. Utilizamos os “primers” KAN2-FP1 5’ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC e KAN2-RP1 5’ GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG para sequenciamento e selecionamos um clone onde o transposão encontrava-se inserido aproximadamente no meio do gene (para facilitar a ocorrência da dupla recombinação). Células eletrocompetentes de *Xac* foram transformadas com esta construção e plaqueadas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de kanamicina para selecionar os recombinantes. As colônias que cresceram nesse meio foram repicadas em meio LB contendo 50 µg/mL de kanamicina para a seleção do segundo evento de recombinação. Os mutantes foram confirmados por PCR utilizando os “primers” 146-F 5’ ccatgccatggcgctgtcgatgccggt e 146-R 5’ cataagcttcgcgagtattatgctccttctgcttgagggtgt e Southern-blot (SAMBROOK, 2001).

Figura 25: Mapa do Transposão EZ-Tn5<Kan-2> (Epicentre).

3.9.2.1- Southern Blot

O protocolo utilizado seguiu as instruções de SAMBROOK e RUSSEL (2001). O DNA genômico de bactérias selvagem e mutante foi extraído com o reagente DNAzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as concentrações de DNA foram quantificadas para cada amostra e 8 µg de cada foram digeridas com a enzima EcoRI por 16 h a 37°C. A sonda para hibridação foi obtida pela amplificação do gene XACb0045, por PCR com os “primers” descritos no item 3.9.2, seguida por digestão com a enzima EcoRI que libera fragmentos de 1.725 pb, 583 pb, 250 pb e 72 pb. Após a separação dos fragmentos em gel de agarose 1%, selecionamos o fragmento de 1.725 pb

para a marcação. Utilizamos o “kit” Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen cat. 18187-013) e [α - 32 P]dCTP para marcação de 25 ng de DNA do fragmento selecionado.

3.9.3- Obtenção do mutante não polar do T4SS cromossomal

3.9.3.1- Deleção do gene *virD4*, codificado pelo locus *vir* do cromossomo de *Xac*

O gene *virD4* (XAC2623) foi amplificado utilizando PCR com os seguintes “primers”:

D4NDEI/SPEI: 5' ACACTGTCATATGACTAGTACCGTGTTGTGGCGATTAC

D4HINDIII: 5'CAGCAAGCTTAGATCCGTCACCGTGAG

Após a amplificação, o gene foi clonado no vetor pUC19 nos sítios NdeI/HindIII. A mistura de produtos de reação de ligação foi usada para transformar *E. coli* DH10B. O DNA obtido foi digerido com SacI, que possui 3 sítios de restrição no gene *virD4*. Deste modo, 2 fragmentos foram liberados: 340 pb e 410 pb. Após a separação dos fragmentos em gel de agarose 1%, a banda referente ao vetor pUC19 digerido com SacI foi recortada e purificada. Procedeu-se então à ligação das extremidades do vetor utilizando o protocolo de ligação descrito no item 3.2.4. Criou-se assim, uma deleção no gene *virD4*, de 750 pb.

O vetor pUC19 contendo o fragmento do gene deletado, foi posteriormente digerido com SpeI/HindIII. O fragmento referente ao gene *virD4* deletado foi purificado e clonado no vetor pNTPS138 (Figura 26) digerido nos mesmos sítios de restrição.

3.9.3.2- Transformação e isolamento de *Xac* com o gene *virD4* deletado

O vetor pNTPS138 foi utilizado para o nocaute da proteína VirD4 do cromossomo. pNTPS138 é um vetor suicida que contém o gene de resistência a kanamicina e o gene levansucrase, *sacB* (DICKON ALLEY, Anacor Pharmaceuticals, Palo Alto, CA; Figura 26).

Figura 26: Mapa do vetor suicida pNPTS138 (JENAL e FUCHS, 1998).

O gene *virD4* parcialmente deletado foi sub-clonado no vetor pNPTS138, obtendo-se a construção pNPTS138- Δ virD4. O DNA resultante desta construção foi usado para eletroporar células de *Xac*. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio LB (1% de Bacto Triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio, pH 7,5) contendo carbenicilina (100 μ g/ml) e kanamicina (20 μ g/ml). As colônias positivas foram propagadas isoladamente em meio líquido 2YT (Triptona 1,6%, extrato de levedura 0,2%, cloreto de sódio 0,5%) contendo carbenecilina por 16 h para a obtenção da segunda etapa de recombinação. Aliquotas de 300 μ L da cultura foram semeadas em duas placas contendo meios diferentes: 2YT + carbenecilina + kanamicina e 2YT + carbenecilina + sacarose 5%. Colônias que cresceram no meio com sacarose foram então repicadas em três placas: 2YT + carbenicilina + kanamicina, 2YT + carbenicilina + sacarose 5% e 2YT + carbenicilina + kanamicina + sacarose 5%. Somente as colônias que apresentaram crescimento somente em 2YT + carbenicilina + sacarose 5% foram consideradas positivas.

3.9.3.3- Confirmação das deleções através de PCR

Como mencionado no item anterior, as colônias que cresceram somente em meio 2YT + carbenicilina + sucrose 5% foram consideradas positivas. Para a confirmação da deleção, realizamos PCR das colônias utilizando os “primers” descritos no item 3.9.3.1. Colônias de *Xac* com a suposta mutação Δ virD4 foram repicadas em 20 μ L de água ultrapura e 5 μ L desta diluição foram usados na reação de PCR. Nesta, foi incluso um passo a mais, onde as amostras eram aquecidas por 2 min a 94°C antes do início dos ciclos de amplificação. As reações de PCR foram feitas num volume total de 50 μ l contendo: 20

mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 10 pmol/50 µl de cada “primer” e 1 U/50 µl de Taq DNA polimerase (Life Technologies).

3.9.4- Ensaio de patogenicidade dos mutantes em plantas de *Citrus spp*

As células mutantes foram avaliadas *in vivo* quanto à capacidade de induzirem os sintomas do cancro cítrico em folhas jovens de limão cravo e laranja doce. Estes experimentos foram realizados na casa de vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias (FCAV- UNESP-Jaboticabal) com a colaboração do Prof. Dr. Júlio César de Oliveira.

Após o crescimento das bactérias em meio LB, as bactérias foram ressuspendidas em uma solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. A concentração bacteriana foi ajustada para uma OD_{600nm} de 0,3. As suspensões (200 µL) foram inoculadas no lado abaxial das folhas: primeiramente, com o auxílio de uma agulha de insulina foi feita uma injúria na cutícula da folha e posteriormente as células foram inoculadas neste local através de compressão, usando uma seringa de 1 mL, até que fosse observada uma região úmida ao redor da injúria. Em cada folha foram aplicadas células mutantes e selvagens. As plantas foram mantidas no local, com fotoperíodo artificial, à temperatura de 28°C.

4- Resultados

4.1- Obtenção da biblioteca genômica de *Xac* no vetor pOAD

4.1.1- Fragmentação do DNA genômico e transformação de *E. coli* DH10B

Fragmentos de 500-1.500 e 1.500-3.000 pb foram escolhidos para o preparo das bibliotecas pelo fato de 95% dos genes anotados em *Xac* estarem compreendidos entre 500 e 3.000 pb. Considerando que, na prática, a eficiência de clonagem de fragmentos menores é maior, decidimos por construir duas bibliotecas (Bibliotecas 1 e 2) separadamente a fim de obtermos uma melhor representatividade dos fragmentos superiores a 1.500 pb (Figura 27).

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. A) Análise do vetor pOAD após tratamento com CIP. 1- Marcador de peso molecular: DNA do fago λ digerido com *Bst*EII (NEB); 2- Vetor pOAD após linearização com *Pvu*II, tratamento com CIP e purificação. B) DNA genômico de *Xac* após nebulização e reparo. 1- Marcador de peso molecular 250 bp (Gibco BRL); 2- Amostras do DNA genômico fragmentado. A Figura mostra uma boa distribuição dos tamanhos dos fragmentos de 500-3.000 bp. C) Análise dos DNA genômico de *Xac* após purificação. 1- Marcador de peso molecular 250 bp (Gibco BRL); 2- Fragmentos de 500-1.500 bp; 3 Fragmentos de 1.500-3.000 bp. Adaptado de ALEGRIA, 2004.

O número de clones positivos, pré-determinado para cada biblioteca foi de pelo menos 10^6 UFC totais. Considerando que *Xac* contém um genoma de aproximadamente 5 Mb, uma biblioteca contendo 2×10^6 clones teria, em média, 1 clone a cada 2,5 bases do genoma. Como no sistema duplo-híbrido, os clones precisam estar em fase +1, apenas 1/6 desses clones satisfazia esse critério; ou seja, esse grau de cobertura representava a existência de um clone gerado por “shotgun”, em fase de leitura correta, para cada 15 pb do genoma. Mais de 10^6 clones independentes foram obtidos para cada biblioteca através de 100 transformações por dia (realizadas em conjunto com o Dr. Marcos Castanheira Alegria). Depois de cada dia de transformações, um conjunto de clones foi seqüenciado para a verificação da fração de clones contendo o inserto de DNA genômico de *Xac*.

Inicialmente foram feitas as transformações envolvendo os fragmentos de 500-1.500 pb. Esta primeira etapa foi feita em 16 dias de transformação sendo que o número de transformantes variou de $1,3 \times 10^4$ a $2,3 \times 10^5$ clones por dia. O seqüenciamento mostrou que a proporção de clones positivos contendo o inserto variou de 64 a 96%, sendo que, em média, obtivemos 76% de clones contendo fragmentos, totalizando $1,3 \times 10^6$ clones positivos (Tabela 10)

Posteriormente, no decorrer de 7 dias, obtivemos os transformantes da Biblioteca 2 (fragmentos 1.500-3.000 pb). Em média, $1,7 \times 10^5$ clones foram obtidos por dia sendo, 81% positivos (Tabela 11). A diferença temporal entre as bibliotecas, deve-se ao fato de que inicialmente obtínhamos um número de transformantes mais baixo, pois a metodologia foi sendo melhorada no decorrer do tempo.

Tabela 10: Biblioteca 1. Fragmentos de 500-1.500 pares de bases. A coluna “Clones (+)” indica o número de clones com inserto após seqüenciamento (ALEGRIA, 2004).

Sub-biblioteca	Nº Transformações	Nº Total de Clones	Eficiência (%)	Clones (+)
1.1	100	52.800	64	33.796
1.2	100	145.600	78	113.568
1.3	100	113.600	77	87.472
1.4	100	30.400	65	19.760
1.5	50	13.600	77	10.472
1.6	80	161.920	58	93.913
1.7	80	227.200	67	152.224
1.8	82	217.792	80	174.233
1.9	82	129.888	82,2	106.793
1.10	85	88.400	93,5	82.627
1.11	96	142.096	85	120.782
1.12	98	162.448	90,5	147.015
1.13	96	49.920	96,5	48.173
1.14	91	86.632	90,6	78.489
1.15	81	95.256	88,9	84.683
Total=1.354.000				

Tabela 11: Biblioteca 2. Fragmentos 1.500-3.000 pares de bases. A coluna “Clones (+)” indica o número de clones com inserto após seqüenciamento (ALEGRIA, 2004).

Sub-biblioteca	Nº Transformações	Nº Total de Clones	Eficiência (%)	Clones (+)
2.1	79	204.308	70	143.015
2.2	102	239.088	80	191.270
2.3	88	187.264	73,6	137.751
2.4	93	194.184	89,2	173.173
2.5	100	328.000	77,3	202.360
2.6	66	261.888	77,3	202.360
2.7	30	21.600	90,7	19.440
Total=1.069.369				

4.1.2- Amplificação das bibliotecas genômicas

O procedimento de amplificação foi realizado no decorrer de 11 dias. Diferentes transformações foram combinadas, de modo que obtivéssemos valores totais do número de clones para cada inóculo em torno de 100.000 a 200.000 UFC. Para cada inóculo descongelado, um plaqueamento em meio 2YT + ampicilina foi realizado com o intuito de confirmarmos o número de clones totais inoculados e determinarmos possíveis perdas no processo de descongelamento das amostras. Cerca de 20 a 30% dos clones totais foram perdidos pelo processo de descongelamento.

No processo de extração de DNA das amplificações, consideramos cada 10 L de amplificação como uma amostra independente. Isto permitiu que calculássemos a quantidade de DNA obtida em cada dia de amplificação levando-se em conta o número de clones iniciais (já considerando as perdas de 20-30%) e a faixa de tamanho de fragmento a que correspondia. Os valores obtidos variaram de 7-140 mg de DNA por amostra. Aliquotas das amostras foram digeridas com *Hind III* para a verificação da distribuição aleatória dos fragmentos. No vetor pOAD existem dois sítios de restrição para *HindIII*, um de cada lado do sítio de clonagem da biblioteca, com aproximadamente 700 pb de distância entre si (Figura 28). Para o ensaio de duplo-híbrido, as amostras de DNA obtidas em cada extração foram misturadas numa concentração final de 1 µg DNA/µL, representando ambas as bibliotecas. Aliquotas de DNA de cada preparação foram misturadas em quantidades proporcionais ao número de clones independentes representados. Obtivemos uma quantidade de DNA suficiente para aproximadamente 1.000 transformações em escala 30 x.

Figura 28: Digestão com *HindIII* das bibliotecas genômicas amplificadas. O vetor sem inserto libera um fragmento de 717 pb. (L): marcador de peso molecular, (1-9): bibliotecas de pOAD + fragmentos de 500-1.500bp; 1.217-2217bp, (10-13): bibliotecas de pOAD + fragmentos de 1.500-3.000bp; 2.217-3717bp. Bandas (nítidas) inferiores (717 pb) e superiores (7.483 pb) são derivadas do vetor pOAD (ALEGRIA, 2004).

4.1.3- Transformação em larga-escala de células de levedura com a biblioteca genômica.

Para uma cobertura ideal da biblioteca em ensaios de duplo-híbrido, é necessária a ocorrência de um grande número de transformantes. Antecedendo este tipo de transformação, é aconselhável que experimentos para a determinação das concentrações de DNA plasmidial “versus” eficiência da transformação sejam realizados, bem como, a escala específica de transformação. GIETZ *et al.* (1998) mostraram que a transformação de 1 µg de DNA por 10 vezes foi mais eficiente que a transformação de 10 µg de DNA em uma vez. Seus dados apontam que em uma escala de 30x, utilizando-se 30 µg de DNA, foi possível a obtenção de $3,0 \times 10^7$ transformantes, o que representa uma boa cobertura para uma biblioteca com complexidade de $1-2 \times 10^6$ clones independentes. A partir dessas indicações, testamos as melhores condições de transformação da levedura PJ694-a, utilizando 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 µg de DNA em cada transformação realizada. Nossos resultados mostram que a eficiência de transformação para 5 x 1 µg de DNA foi superior a 1 x 5 µg (Tabela 8). Além disso, valores superiores a 1 µg podem aumentar o número de clones contendo mais de um vetor da biblioteca (GIETZ *et al.*, 1998). Para o ensaio do duplo-híbrido, optamos por uma transformação na escala de 30 x 1 µg o que representa aproximadamente 20 milhões de clones (10 x o número de clones independentes da biblioteca).

A análise da eficiência de transformação mostrou que as duas bibliotecas transformaram a levedura com eficiências similares (Tabela 12). Desta forma, os vetores contendo fragmentos de 500-1.500 e 1.500-3.000 pb puderam ser usados na mesma proporção.

Tabela 12: Transformação em larga-escala—análise prévia das condições de transformação.

Linhagem: PJ694a Vetor: pOAD (8,4 kB) Fragmentos: 500-1.500 pb Biblioteca: 8,9-9,9 kB			Linhagem: PJ694a Vetor: pOAD (8,4 kB) Fragmentos: 1.500-3.000 pb Biblioteca: 9,9-11,4 kB		
Vetor (µg)	Nº transformantes	Transformantes/µg	Vetor (µg)	Nº transformantes	Transformantes/µg
0,5	$2,82 \times 10^5$	$5,64 \times 10^5$	0,5	$3,65 \times 10^5$	$7,30 \times 10^5$
1,0	$7,47 \times 10^5$	$7,47 \times 10^5$	1,0	$6,93 \times 10^5$	$6,93 \times 10^5$
2,0	$7,07 \times 10^5$	$3,53 \times 10^5$	2,0	$1,02 \times 10^6$	$5,11 \times 10^5$
5,0	$1,12 \times 10^6$	$2,23 \times 10^5$	5,0	$1,06 \times 10^6$	$5,32 \times 10^5$

4.1.4- Identificação de falsos-positivos

Para que pudéssemos determinar se existiam fragmentos clonados na biblioteca genômica de *Xac* capazes de auto-ativar os genes repórteres (*HIS3* e *ADE2*) na levedura, independentemente de interações com a proteína de interesse (“isca”), foram realizados 2 controles negativos distintos: (i) auto-ativação dos genes repórteres por clones da biblioteca clonados no vetor pOAD e (ii) co-transformação da levedura PJ69-4a com a biblioteca e o vetor pOBD vazio.

No primeiro caso, a cepa de levedura PJ69-4a foi submetida à transformação, em larga-escala, apenas com a biblioteca genômica, e plaqueada nos meios seletivos SC-Leu-His e SC-Leu-His-Ade. Após 14 dias de incubação a 30°C não foram observados clones capazes de crescer em meio restritivo indicando que nenhum componente da biblioteca foi capaz de auto-ativar os genes repórteres na ausência do vetor contendo o domínio de ligação ao DNA.

No segundo caso, transformamos em larga-escala, a cepa de levedura contendo previamente o vetor pOBD sem iscas clonadas com a biblioteca genômica de *Xac*. O número de transformantes totais foi da ordem de 10^7 clones. Após incubação, isolamos cerca de 400 clones em meio SC-trp-leu-his-ade e sequenciamos os plasmídeos derivados de pOAD de cerca de 100 clones positivos. Dos clones analisados, 89% tratavam-se de segmentos que codificavam fragmentos de *tolC* (XAC3463), gene que codifica um dos componentes associado ao sistema de secreção tipo I e localizado no espaço periplasmático e na membrana externa de bactérias Gram-negativas, outros 7% correspondiam a segmentos de um gene envolvido na biossíntese de riboflavina (XAC3792, *ribA*) e os restantes correspondiam a fragmentos de *phoQ* (XAC4022), *glnA* (XAC0204) e *piuB* (XAC4036). Contudo, no decorrer dos “screenings” observamos que outros fragmentos também apareciam em interações com diferentes “iscas”, em frequências altas o suficiente para justificar suspeitas de que se tratavam de falsos positivos. Dentre estes, encontramos diversas cópias dos genes que codificam para a proteína receptora de sideróforos dependente de TonB; fragmentos do gene *wapA* (XAC1866 XAC1305), o qual codifica para uma proteína associada à membrana externa; *bcsC*, o qual codifica a subunidade C da celulose sintase (XAC3515); *kfrA* (XACa0042), que codifica uma proteína ligante de DNA, envolvida na partição do plasmídeo; fragmentos da ORF XAC0426, que codifica para a enzima de ramificação de *alpha*-glucano; YapH, homóloga de uma proteína de virulência de *Yersinia pestis*; fragmentos em fase negativa ou em fase “+2” de XACa0022, XACa0039, XACb0015 e XACb0065, as quais codificam a proteína PthA, que é secretada por *Xac* pelo T3SS; fragmentos de XAC4273, a qual codifica a proteína OmpA;

fragmentos de XAC1024, a qual codifica uma fosfolipase não-hemolítica e fragmentos de XAC2810, uma proteína conservada hipotética com localização predita na membrana externa. Também observamos fragmentos diferentes que estão anotados como proteínas flagelares (XACs 1935, 1936 e 1989) e fragmentos do gene XAC3207, o qual codifica para um receptor de ferro (Tabela 13).

Tabela 13: Identificação de “Presas” consideradas possíveis falsos positivos por ALEGRIA (2004), nesta tese e pela aluna de doutorado Maria Cláudia Pereda Rosa. Os números entre parênteses indicam a frequência das interações entre “iscas” e “presas”.

Presas	Iscas
TolC (XAC3463)	XAC0135 (7), XAC0608 (2), XAC1273 (6), XAC1279 (1), XAC1284 (3), XAC1669 (6), XAC1670 (1), XAC2158 (2), XAC2555 (9), XAC3273 (13), XAC3292 (2), XAC0279 (23), XAC0340 (25), XAC0501 (1), XAC0674 (26), XAC1093 (14), XAC1171 (9), XAC1201 (42), XAC1671 (37), XAC2053 (27), XAC3294 (4), XAC3984 (2), XAC4019 (2), XAC4263 (4), XAC1991 (5), XAC3989 (6), XAC1989 (2), XAC1271 (4), XAC0541 (2), XAC1132 (2), XAC0784 (2), XAC1568 (2), XAC0405 (10), XAC0408 (1), XAC0394 (12), XAC0397 (22), XAC0398 (15), XAC0401 (12), XAC0419 (50), XAC0424 (14), XAC1706 (31), XAC3224 (5), XAC0466 (46), XAC2609 (33), XAC2618 (3), XAC2605 (23), XAC2614 (33), XAC1878 (23), XAC3673 (15), XAC2493 (27), XAC1881 (13), XAC2973 (56), XAC1495 (2), XAC0536 (12), XAC2956 (16), XAC2573 (17), XAC1343 (4), XAC0862 (42), XAC1242 (24), Xacb0042 (7), Xacb0032 (10), Xacb0034 (6), Xacb0049 (3), Xacb0037 (38), Xacb0048 (7), Xacb0058 (8)
TonB	XAC0135 (2), XAC0610 (1), XAC0621 (5), XAC0760 (7), XAC1279 (2), XAC1672 (4), XAC2555 (2), XAC3273 (11), XAC3292 (11), XAC3975 (5), XAC3993 (3), XAC0501 (9), XAC1088 (1), XAC1171 (3), XAC2053 (1), XAC3112 (4), XAC3294 (3), XAC3852 (3), XAC3839 (2), XAC3984 (2), XAC4263 (1), XAC2504 (1), XAC1864 (2), XAC3673 (3), XAC2617 (4), XAC0404 (7), XAC0403 (2), XAC0399 (1), XAC0410 (1), XAC0408 (2), XAC0396 (1), XAC1132 (1), Xacb0049 (1)
WapA (XAC1866- XAC1305)	XAC0135 (1), XAC0610 (2), XAC0621 (2), XAC1284 (4), XAC1672 (1), XAC1991 (1), XAC2555 (1), XAC3273 (8), XAC3112 (4), XAC4263 (2), XAC1279 (4), XAC1368 (1), XAC3224 (6)
XAC2810	XAC3112 (11), XAC3285 (3), XAC3294 (5), XAC3984 (2), XAC4263 (6), XAC3852 (1), XAC1088 (1), XAC2617 (1), XAC3224 (6), XAC1266 (3), XAC0407 (1), Xacb0030 (1)
Oar (XAC0291)	XAC1273 (5), XAC1279 (4), XAC1284 (4), XAC3273 (1), XAC3292 (20), XAC3993 (2), XAC3673 (1)
BesC (XAC3515)	XAC1991 (1), XAC3292 (1), XAC3852 (8), XAC1672 (1), XAC3112 (15), XAC1132 (2), XAC0410 (12), XAC0393 (2), XAC4301 (1), XAC0330 (1)
RshD (XAC3245- XAC2529)	XAC1279 (2), XAC1991 (1), XAC3273 (1), XAC3292 (1), XAC1319 (3), XAC0410 (1), XAC0404 (1), XAC3224 (2)
XAC1024	XAC3673 (1), XAC3112 (1), XAC1201 (5), XAC3852 (4)
KfrA (XACa0042)	XAC0621 (2), XAC1888 (6), XAC3112 (12), XAC3285 (20), XAC2463 (4), XAC1672 (2), XAC3292 (1), XAC0399 (2), Xacb0030 (1)
YapH (XAC2151)	XAC1672 (2), XAC0501 (3), XAC3839 (1), XAC2617 (1), XAC0330 (3)
XAC0426	XAC1088 (2), XAC1866 (3), XAC2236 (3), XAC3112 (1)
PthA (fase +2)	XAC3112 (1), XAC1991 (22), XAC1672 (1), XAC2236 (12), XAC0608 (2), XAC1274 (2), XAC0610 (25)

4.1.5- Controles positivos

Inicialmente testamos a qualidade de nossa biblioteca utilizando iscas derivadas de proteínas que possuem interações já descritas na literatura como: HolB (XAC1132), que codifica a subunidade delta da DNA polimerase III; GroES (XAC0541), que codifica uma chaperona e que juntamente com GroEL participam do enovelamento de proteínas citoplasmáticas; e FtsZ (XAC0784) que codifica uma proteína semelhante à tubulina e é

capaz de formar filamentos durante o processo de divisão celular. A Tabela 14 indica as interações observadas (análise dos controles positivos realizada pela Dra. Letícia Kather).

Tabela 14: Interações dos controles positivos. Somente as presas em fase (+1) são descritas.

Isca	Gene	Presas	Genes	Frequência
XAC0541	<i>groES</i>	XAC0541	<i>groES</i>	22
		XAC3463	<i>tolC</i>	2
XAC1132	<i>holB</i>	XAC1109	<i>dnaX</i>	1
		XAC3515	<i>bcsC</i>	2
		XAC1023	<i>fecA</i>	1
		XAC3598	<i>xadA</i>	1
		XAC4273	<i>ompA</i>	1
		XAC2506	hipotética	1
		XAC3463	<i>tolC</i>	3
XAC0784	<i>ftsZ</i>	XAC0784	<i>ftsZ</i>	11
		XAC3463	<i>tolC</i>	2
		XAC1696	metiltransferase	1

GroES mostrou interações homotrópicas caracterizando a formação do complexo heptamérico no enovelamento de proteínas. HolB interagiu com diversas proteínas, dentre elas, fragmentos do produto do gene *dnaX* que codifica as subunidades *tau* e *gama* da DNA polimerase III. Finalmente, FtsZ também mostrou interações homotrópicas, demonstrando sua capacidade de formação de polímeros. Estes testes iniciais indicaram que o ensaio foi capaz de identificar interações entre proteínas fisiologicamente relevantes.

4.1.6. Ensaios de auto-ativação e análise do repórter *Gal7-LacZ*

Os testes de auto-ativação utilizando o gene repórter GAL7-LACZ, não foram satisfatórios. Mesmo os controles negativos desenvolveram coloração azul (Figura 29). Dessa forma, este gene repórter não foi utilizado, sendo utilizados apenas os genes marcadores de auxotrofia (*ade2* e *his3*).

Figura 29. Auto-ativação do gene GAL7:LACZ da PJ69-4a antes de ser transformada com pOBD. (A) Placa em que foi colocada a membrana de nitrocelulose. (B). A coloração azulada da membrana indica auto-ativação da levedura PJ69-4a. (Fonte: Tese de doutorado de Letícia Khater, 2006).

4.2- Produção da biblioteca de presas derivadas dos dois loci virB

4.2.1- Amplificação e clonagem de fragmentos dos loci virB

O sequenciamento do genoma de *Xac* revelou que este fitopatógeno contém dois *loci virB*, que codificam dois Sistemas de Secreção Tipo IV (T4SS): um *locus* está localizado no cromossomo (21.079 pb) e o outro no plasmídeo pXAC64 (23.951 pb, Figura 17 da Introdução; da SILVA *et al.*, 2002). Amplificações do DNA dessas regiões foram obtidas por PCR utilizando-se oligonucleotídeos descritos na Tabela 4 (Material e Métodos).

Fragmentos de 250-500 pb, 500-1.000 pb e 1.000-2.000 pb (Figura 30) foram escolhidos para o preparo da biblioteca. Considerando que, teoricamente, a probabilidade de clonagem de fragmentos menores seja maior, decidimos por construir três bibliotecas (Bl.1, Bl.2 Bl.3) independentes a fim de obtermos uma melhor representatividade dos fragmentos superiores a 500 pb.

Figura 30: A) Gel de agarose mostrando algumas amplificações dos fragmentos. B) Gel de agarose após extração e purificação de DNA do gel “Low Melting”. Biblioteca 1 (Bl.1): fragmentos de 250-500 pb; biblioteca 2 (Bl.2): fragmentos de 250-1000 pb; biblioteca 3 (Bl.3): fragmentos de 1000-2000 pb.

O número de clones positivos, isto é, que continham os insertos de *Xac*, pré-determinado, para cada biblioteca foi da ordem de 10^5 UFC totais. Sendo assim, 180.120 clones independentes (aproximadamente 60.000 clones para cada biblioteca) foram gerados através de 60 eletroporações por dia, em um total de 6 dias (Tabela 15).

Tabela 15: Número de clones obtidos após cada dia de transformação e após descongelamento

Dias de transformação	Número de transformantes		
	Bl.1 250-500 pb	Bl.2 250-1000 pb	Bl.3 1000-2000 pb
1	$5,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$
2	$1,9 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
3	$3,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
4	$8,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$
5	$2,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
6	$4,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
Total	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$9,1 \times 10^4$
Total após descongelamento	$5,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$

4.2.2- Amplificação da biblioteca

O procedimento de amplificação foi realizado no decorrer de 2 dias. Diferentes transformações foram combinadas, de modo que obtivéssemos valores totais do número de clones para cada inóculo em torno de 200.000 o que resultou em um total de 3 L de cultura (500 mL para cada “pool” de 200.000 clones). Para cada inóculo descongelado, um plaqueamento em meio 2YT+ampicilina foi realizado com o intuito de confirmarmos o número de clones totais inoculados e determinarmos possíveis perdas no processo de descongelamento das amostras (de 25 a 30%). Obtivemos um total de $5,0 \times 10^4$ clones, representados pela biblioteca 1; $7,0 \times 10^4$, representados pela biblioteca 2 e $7,0 \times 10^4$, representados pela biblioteca 3 (Tabela 10).

Os valores obtidos na extração de DNA variaram de 1,25 a 4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por amostra, que foram digeridos com *Hind III*, para a verificação da distribuição aleatória dos fragmentos (corte nos dois lados da inserção, Figura 31). Para o ensaio de duplo-híbrido, as amostras de DNA obtidas em cada extração foram misturadas numa concentração final de 1 μg DNA/ μL .

Figura 31: Digestão com *HindIII* das bibliotecas genômicas amplificadas. Vetor sem inserto: fragmento de 717 pb (ALEGRIA, 2004).
Pista1: marcador de peso molecular
Pista 2: bibliotecas de pOAD + fragmentos de 500-1.000pb (1.217-1.717pb)
Pista 3: bibliotecas de pOAD+ fragmentos de 1000-2.000bp (1.717-2.717pb)
Pista 4: bibliotecas de pOAD + fragmentos de 250-500pb (967-1.217pb)
Bandas (nítidas) inferiores (717 bp) e superiores (7.483 bp) são derivadas do vetor pOAD

Para confirmarmos a porcentagem de clones sem insertos e qual a distribuição dos clones amplificados dos dois *locus virB*, sequenciamos previamente alguns clones obtidos nas transformações provenientes de reações de ligação que antecederam a larga-escala, assim como clones obtidos dos “pools” de transformações em larga-escala, após o descongelamento. Bactérias DH10B foram transformadas com os DNAs dos vetores extraídos dos “pools” de amplificação, de modo a garantir que a distribuição dos clones permanecesse aleatória.

4.2.3- Transformação em Larga-Escala

Testamos as melhores condições de transformação, utilizando concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 µg de DNA em cada transformação realizada. A Tabela 16 mostra que valores superiores a 1 µg aumentaram o número de clones transformantes. A análise da eficiência de transformação “versus” tamanho da biblioteca mostrou valores muito próximos. Desta forma, os vetores contendo fragmentos de 250-500 pb, 500-1.000 pb e 1000-2.000 pb poderão ser usados na mesma proporção. Para o ensaio do duplo-híbrido, optamos por uma transformação na escala de 30 x 3 µg o que representa aproximadamente 10^7 transformantes.

Tabela 16: Transformação em larga-escala: análise prévia das condições de transformação

Linhagem: PJ694a Vetor: pOAD (8,4 kB) Fragmentos: 250-500 pb			Linhagem: PJ694a Vetor: pOAD (8,4 kB) Fragmentos: 500-1.000 pb			Linhagem: PJ694a Vetor: pOAD (8,4 kB) Fragmentos: 1000-2.000 pb		
Vetor (µg)	Nº transformantes	Transformantes /µg	Vetor (µg)	No. transformantes	Transformantes /µg	Vetor (µg)	No. transformantes	Transformantes/ µg
1,0	$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	1,0	$8,6 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	1,0	$4,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$
2,0	$9,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	2,0	$1,4 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$	2,0	$7,4 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$
3,0	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	3,0	$3,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	3,0	$2,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$

4.2.4- Ensaio de Falsos-positivos

Não observamos crescimento de nenhum clone quando testamos a biblioteca do *loci vir* na presença do vetor pOBD vazio em células PJ69-4a, crescidas em meio SC-trp-leu-his-ade. Este resultado significa que não obtivemos crescimento de nenhum clone positivo que ativasse os dois genes reporteres simultaneamente, ou seja, não há indícios de haver nenhum clone falso-positivo que interaja com o vetor pOBD vazio.

4.3- Biblioteca de cDNA de folhas de *Citrus sinensis*

4.3.1- Síntese do cDNA

Utilizamos o kit SuperScript Plasmid System (Invitrogen) para a construção de uma biblioteca de cDNA de folhas de laranja Pêra (*Citrus sinensis*). cDNAs foram sintetizados a partir de mRNAs isolados de folhas de laranja infiltrada com *Xac*, para serem clonados no vetor pOAD2, que contém um novo sítio de restrição para NotI, como descrito no item 3.6.3 (Materiais e Métodos) (Figura 32A). Procedemos a separação dos fragmentos por tamanho, em uma coluna cromatográfica fornecida pelo fabricante (cDNA Size Fractionation Columns Cat. Nº 18092-015, Invitrogen). A partir da auto-radiografia e do

padrão de eluição da coluna do “kit”, definido pela somatória de volumes de eluição das frações, selecionamos dois “pools” de insertos de acordo com seus tamanhos. Assim, selecionamos os “pools”: 6+7 e 8+9, mostrados na auto-radiografia a seguir (Figura 32B):

Figura 32A: Gel de agarose mostrando a síntese da primeira e segunda fitas de cDNA. (1), marcador de peso molecular; (2), síntese da segunda fita; e (3), síntese da primeira fita.

Figura 32B: Auto-radiografia. (1-11) indicam os fragmentos de cDNA separados por cromatografia. Fragmentos selecionados dos “pools” 6+7 e 8+9. Tamanhos esperados de 3.000 a 1.000 pares de bases.

4.3.2- Transformação de *DH5α* e amplificação da Biblioteca de cDNA

Células de *E. coli* DH5α foram transformadas com o produto da ligação entre cDNA e o vetor pOAD2 por eletroporação. Os produtos das transformações foram plaqueados em meio LB sólido contendo carbenicilina (100 mg/L). Aproximadamente 20 mil colônias foram obtidas em cada placa semeada. Observamos que cerca de 70% de clones eram recombinantes e que os tamanhos dos insertos, na maioria dos clones digeridos, variaram entre ~800 bp e 3 kb (Figura 33). Após muitas transformações, obtivemos um total de 600 mil clones positivos, isto é, que continham inserto. Estes clones foram raspados das placas para compor a biblioteca, que foi aliquoteada em “pools” contendo glicerol (15% de concentração final) para estocagem a -80°C.

Figura 33. Clones da Biblioteca de cDNA de folhas de laranja digeridos com *Pst*I e *Eco*RI. Mais de 70 % dos clones possuem inserto (Lanes 1-9). M: 1 kb ladder, 10: pOAD linearizado.

As bactérias transformadas e estocadas a -80°C foram descongeladas e submetidas à amplificação. Aliquotas da cultura de larga-escala foram plaqueadas e o DNA extraído das bactérias plaqueadas foi submetido ao sequenciamento para a verificação da distribuição dos clones na biblioteca e a porcentagem efetiva de inserto.

Observamos que cerca de 30% do total de clones foi perdido após o descongelamento das bactérias, o que significa que obtivemos cerca de 420.000 clones positivos após o descongelamento da biblioteca. O sequenciamento do DNA após a amplificação da biblioteca revelou que o número de clones que não continham insertos aumentou para cerca de 40%, o que significa uma redução de cerca de 40.000 clones positivos do número verificado anteriormente, ou seja, o número de clones positivos após a amplificação da biblioteca permanece em torno de 380.000, com distribuição aleatória, pois não observamos duplicidade dos clones sequenciados (Tabela 17).

Tabela 17: Distribuição dos clones sequenciados após amplificação da Biblioteca de cDNA. Homologias baseadas no Banco de Dados do NCBI utilizando o programa Blastx.

Número de clones sequenciados	Porcentagem de vetor vazio	Distribuição dos clones Homólogo com maior identidade no Banco de dados do NCBI identificados através de BLAST (Blastx)
45	40%	Ferredoxina Desidroquinato sintase <i>Mus musculus</i> proteína hipotética clone 19 <i>Zea Mays</i> proteína hipotética <i>Lotus corniculatus</i> proteína hipotética <i>Homo sapiens</i> proteína hipotética <i>Arabidopsis thaliana</i> proteína hipotética clone 1715 Glicosil transferase <i>Mus musculus</i> proteína hipotética <i>Citrus limon</i> ribossomo 26S <i>Xenopus laevis</i> proteína hipotética <i>Cicer arietinum</i> proteína rica em prolina <i>A. thaliana</i> fator de transcrição <i>Citrus reticulata</i> "light-harvesting chlorophyll binding protein" <i>A. officinalis</i> 56S ribossomo <i>H. sapiens</i> proteína hipotética <i>Mus musculus</i> copQ <i>Lactococcus lactilis</i> proteína hipotética , seção 131 <i>Quercus suber</i> cDNA 17c proteína de choque-térmico <i>Nicotiana benthamiana</i> proteína dedo de zinco

4.3.3- Transformação de leveduras com a biblioteca em larga-escala e experimentos controle

Para o ensaio do duplo-híbrido, optamos por uma transformação na escala de $30 \times 2 \mu\text{g}$ o que representa aproximadamente 10^7 transformantes. Verificamos que as leveduras transformadas somente com a biblioteca não auto-ativam em meio seletivo sem Leu, His e Ade. Portanto, optamos pela utilização de 2 mM de 3-aminotriazol no meio de cultura, nos

casos em que as “iscas” também não apresentam auto-ativação. Também não observamos transformantes positivos em meio SC-trp-leu-his-ade quando a levedura era transformada com o vetor pOBD vazio e co-transformada com a biblioteca. Este resultado significa que não obtivemos crescimento de nenhum clone positivo que ativava os dois genes repórteres simultaneamente, ou seja, não há indícios de haver nenhum clone falso-positivo que interaja com o domínio de ligação ao DNA codificado pelo vetor pOBD vazio.

4.4- Sistema de dois Componentes

4.4.1- Interações entre proteínas identificadas por ensaios de duplo-híbrido

As Tabelas 18 e 19 relacionam todas as interações observadas com as “iscas” dos sistemas de dois-componentes e proteínas hipotéticas que foram testadas. A Tabela 18 relaciona as proteínas pertencentes ao sistema de 2-componentes, que foram escolhidas para os ensaios do duplo-híbrido desde o início do projeto. Nestas tabelas possíveis falsos positivos (baseados na Tabela 13, item Resultados) estão relacionados em *itálico e sublinhados*. A seguir, serão apresentadas as principais interações envolvendo as proteínas pertencentes aos sistemas de 2-componentes e proteínas conservadas hipotéticas. Os domínios protéicos de cada proteína foram identificados através do Pfam (<http://pfam.jouy.inra.fr/index.shtml>), e muitas vezes contradizem a anotação original da proteína. Para muitas das proteínas utilizadas como iscas, geramos um diagrama que contém a identificação dos seus domínios protéicos e a localização de seus respectivos genes no genoma de *Xac* (da SILVA *et al.*, 2000). A Tabela 20 apresenta o significado de todas as siglas/abreviaturas que serão encontradas nesses diagramas.

Tabela 20: Relação das abreviaturas adotadas nos diagramas que representam as proteínas utilizadas como iscas em ensaios de duplo-híbrido.

Domínio	Nome
GAF	Domínio comum em cGMP fosfodiesterases, adenilato ciclases e Proteína FhlA
PAS	Domínio comum nas proteínas de período circadiano (Per), “Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator” (ARNT) e “Single-minded protein” (Sim)
CHASE	Domínio sensor envolvido na ligação de ligantes de baixos pesos moleculares.
TM	Domínio transmembrânico
HK	Sinônimo de HisKA. Domínio de dimerização presente nas histidinas quinases
HATPase	Domínio de ligação ao ATP presente nas histidinas quinases.
RR	Domínio regulador de resposta presente nas proteínas reguladoras de resposta
LytTR	Domínio efetor presente nas proteínas reguladoras de resposta. O grupo Lyt foi nomeado pela descoberta das proteínas LytS/T envolvidas na biossíntese de amidas.
GerE	Domínio efetor presente nas proteínas reguladoras de resposta da família NarL/LuxR
Trans_reg_c	Domínio efetor presente nas proteínas reguladoras de resposta da família OmpR

Tabela 18: Interações envolvendo Iscas do Sistema de 2-Componentes. A coluna da esquerda indica a isca e as figuras, seus domínios analisados por homologia à proteínas do banco de dados do Pfam. As presas em itálico e sublinhadas representam os possíveis falsos positivos.

ISCA XAC0135	Presas	Frequência	Produto
XAC0136	7	Proteína regulatória: RR-GerE
	XAC1229	2	Proteína regulatória: RR-GerE
	XAC2168	1	Proteína regulatória: RR-GerE
	<u>XAC3463</u>	<u>7</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<u>XACa0039</u>	<u>1</u>	<u>PthA2</u>
	<u>XAC3121</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FecA</u>
	<u>XAC1866</u>	<u>1</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	<u>XAC0031</u>	<u>1</u>	<u>Álcool desidrogenase</u>
	<u>XAC2600</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	Total	22	
ISCA XAC0608	Presas	Frequência	Produto
XAC4019	40	Proteína Conservada Hipotética
	XAC0806	4	fosfoenolpiruvato carboxilase
	XAC3272	3	Proteína Conservada Hipotética
	XAC2317	3	Proteína Conservada Hipotética
	XAC3218	1	Lipoproteína de competência
	XAC0386	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1289	1	Proteína de reconhecimento do sinal partícula
	<u>XAC1935</u>	<u>3</u>	<u>Proteína flagelar</u>
	<u>XAC3463</u>	<u>2</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<u>XACa0022</u>	<u>1</u>	<u>PthA1</u>
	<u>XACa0039</u>	<u>1</u>	<u>PthA2</u>
	Total	60	
ISCA XAC0610	Presas	Frequência	Produto
XAC3901	1	transdutor de sinal, ampG
	<u>XACa0022</u>	<u>10</u>	<u>PthA1</u>
	<u>XACb0065</u>	<u>6</u>	<u>PthA4</u>
	<u>XACb0015</u>	<u>5</u>	<u>PthA3</u>
	<u>XACa0039</u>	<u>4</u>	<u>PthA2</u>
	<u>XAC1305</u>	<u>2</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	<u>XAC4048</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
	XAC0465	1	metaloproteinase
	Total	30	

Tabela 18: Continuação

ISCA XAC0621	Presas	Frequência	Produto
XAC2670	3	Histidina quinase: HK-HATPase
	XAC0620	3	Histidina quinase: SP-TM-HK-HATPase
	<u>XACa0042</u>	<u>2</u>	<u>Proteína KrfA</u>
	XAC2142	2	Histidina quinase: TM-HK-HATPase
	<u>XAC3194</u>	<u>5</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	<u>XAC1866</u>	<u>2</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	<i>Total</i>	17	

ISCA XAC0684	Presas	Frequência	Produto
XAC0683	4	Histidina quinase: TM-CHASE3-PAS-HK-HATPase
	XAC1273	2	Histidina quinase: HK-HATPase
	XAC4019	2	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1340	1	Proteína helicase-relacionada: Lhr2
	<u>pOAD</u>	<u>2</u>	<u>Vetor vazio</u>
	<i>total</i>	11	
ISCA XAC0760	Presas	Frequência	Produto
XAC0759	9	Histidina quinase: KdpD-USP-TM-HK-HATPase
	<u>XAC1146</u>	<u>4</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FecA</u>
	<u>XAC3444</u>	<u>3</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	<i>total</i>	16	
ISCA XAC1273	Presas	Frequência	Produto
XAC0896	4	Proteína regulatória: RR
	XAC1271	2	Efector negativo de SigmaB: RsbT
	<u>XAC3463</u>	<u>6</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<u>XAC0291</u>	<u>5</u>	<u>Proteína Oar</u>
	<u>XAC3101</u>	<u>6</u>	<u>Proteína PilH</u>
	<i>total</i>	23	

Tabela 18: Continuação

ISCA XAC1274	Presas	Frequência	Produto
XAC4263	2	Proteína Hipotética
	XAC1168	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC0287	1	Quinona oxido-redutase
	XAC3637	1	glucosamina--frutose-6-fosfato aminotransferase
	XAC2863	1	Proteína Hipotética
	XAC1480	1	Regulador de transcrição
	XAC1405	1	acetil-coenzima A carboxilase carboxil transferase
	XACb0030	1	TrwB
	XAC2530	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC0129	1	Cloro acetaldeído desidrogenase
	<i>pOAD</i>	<i>4</i>	<i>vetor</i>
	XAC2902	1	Integrase/recombinase
	XAC3901	1	metalopectidase
	<i>XACa0039</i>	<i>1</i>	<i>PthA2</i>
	<i>XACa0022</i>	<i>1</i>	<i>PthA1</i>
	<i>total</i>	19	

ISCA XAC1279	Presas	Frequência	Produto
XAC1670	3	Regulador de Resposta: RR
	XAC1281	3	Proteína de Quimiotaxia CheR
	XAC1284	2	Regulador de Resposta: RR
	<i>XAC1866</i>	<i>4</i>	<i>Proteína associada à membrana: WapA</i>
	<i>XAC0291</i>	<i>4</i>	<i>Proteína Oar</i>
	<i>XAC1146</i>	<i>2</i>	<i>Receptor-dependente TonB: FecA</i>
	<i>XAC3245</i>	<i>2</i>	<i>Proteína RshD</i>
	<i>XAC3463</i>	<i>1</i>	<i>Proteína TolC</i>
	<i>total</i>	21	
ISCA XAC1284	Presas	Frequência	Produto
XAC1282	3	Histidina quinase: PAS-HK-HATPase
	XAC0207	1	Histidina quinase, NtrB: PAS3-HK-HATPase
	<i>XAC3463</i>	<i>3</i>	<i>Proteína TolC</i>
	<i>XAC1866</i>	<i>4</i>	<i>Proteína associada à membrana: WapA</i>
	<i>XAC0291</i>	<i>4</i>	<i>Proteína Oar</i>
	<i>total</i>	15	
ISCA XAC1669	Presas	Frequência	Produto
	XAC1669	9	Proteína Híbrida: PAS2-HK-HATPase-RR
	XAC3984	5	Proteína Hipotética
	XAC1282	2	Histidina quinase: PAS-HK-HATPase

XAC1710	2	Proteína Conservada Hipotética
	XAC4359	2	Regulador açúcar diacídico
	XAC4313	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1672	1	Proteína Híbrida: PAS2-HK-HATPase-RR
	XAC3237	1	Histidina quinase: TM-PAS-HK-HATPase
	XAC2466	1	Transportador de aminoácidos polares
	XAC1074	1	Histidina quinase: HK-HATPase
	XAC0805	1	Proteína Conservada Hipotética
	<u>pOAD</u>	<u>15</u>	<u>Vetor</u>
	<u>XAC3463</u>	<u>6</u>	<u>Proteína TolC</u>
	XAC1204	4	Alanil dipeptidil peptidase
	XAC0031	1	Álcool desidrogenase
	XAC0037	1	penicilina acilase
	XAC2523	1	gama-glutamyltranspeptidase
	XAC1936	1	Proteína flagelar: FlhA
	<i>total</i>	55	
	ISCA XAC1670	Presas	Frequência
Produto
	XAC1282	7	Histidina quinase: PAS-HK
	XAC1669	4	Proteína híbrida: PAS- HK-HATPase-RR
	XAC1279	2	Proteína híbrida: RR-HK
	<u>XAC3463</u>	<u>1</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<i>total</i>	14	

ISCA XAC1672	Presas	Frequência	Produto
XAC1671	2	Proteína Conservada Hipotética
	XAC3611	1	Peptidase
	XAC4131	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC3300	1	lipase/esterase
	XAC4346	1	glutathione peroxidase
	XAC3528	1	Proteína Conservada Hipotética
	<u>XAC2151</u>	<u>2</u>	<u>Proteína YapH</u>
	<u>XACb0065</u>	<u>1</u>	<u>PthA4</u>
	XAC3207	2	Receptor ferro enterobactina
	<u>XAC1866</u>	<u>1</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	XAC0037	1	penicilina acilase
	<u>XAC3071</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FhuA</u>
	<u>XAC3448</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	XAC4306	1	“outer membrane efflux protein”
	<u>XAC2941</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FhuA</u>
	<u>XAC1769</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: CirA</u>
	<u>XAC3515</u>	<u>1</u>	<u>Celulose sintase: BcsC</u>

	<u>Xacb0042</u>	<u>2</u>	<u>Proteína KfrA</u>
	<i>total</i>	22	
ISCA XAC1991	Presas	Frequência	Produto
XAC3112	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1414	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1992	1	c-di-GMP fosfodiesterase A: GGDEF-EAL-RR
	XAC1774	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC0922	2	Fator sigma ECF
	XAC2158	1	Regulador de Resposta: RR
	XAC4016	1	Proteína Conservada Hipotética
	<u>XACa0022</u>	<u>8</u>	<u>PthA1</u>
	<u>XACb0065</u>	<u>7</u>	<u>PthA4</u>
	<u>XAC3463</u>	<u>5</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<u>XACb0015</u>	<u>5</u>	<u>PthA3</u>
	<u>XACa0039</u>	<u>2</u>	<u>PthA2</u>
	<u>XAC3515</u>	<u>1</u>	<u>celulose sintase, subunidade C</u>
	<u>XAC3245</u>	<u>1</u>	<u>Proteína RhsD</u>
	<u>XAC1866</u>	<u>1</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	<i>total</i>	38	
ISCA XAC2158	Presas	Frequência	Produto
XAC4019	12	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1283	5	Proteína Híbrida: TM-GAF-HK-HATPase-RR3
	XAC4204	1	Proteína Conservada Hipotética
	<u>pOAD</u>	<u>2</u>	<u>Vetor vazio</u>
	<u>XAC3463</u>	<u>2</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<u>XAC1254</u>	<u>2</u>	<u>Isoleucil tRNA sintetase: ileS</u>
	<i>total</i>	24	

ISCA XAC2555	Presas	Frequência	Produto
XAC2902	1	Proteína Conservada Hipotética
	<u>XAC3121</u>	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FepA</u>
	<u>XAC3463</u>	<u>9</u>	<u>Proteína TolC</u>
	<u>XAC1305</u>	<u>1</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	<i>total</i>	13	
ISCA XAC3273	Presas	Frequência	Produto
	XAC3730	19	CheR metiltransferase: CheR-PAS3-HK
	XAC2555	11	Proteína Híbrida: PAS-HK-HATPase-RR
	XAC1274	9	Proteína Híbrida: RR- PAS-HK-HATPase-RR
	XAC1074	6	Histidina quinase: HK-HATPase

<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">XAC3273</div> </div>	XAC0115	5	Proteína Conservada Hipotética
	XAC3622	4	DNA polimerase IV
	XAC3559	3	valil-tRNA sintetase
	XAC3548	3	Proteína externa de membrana
	XAC2776	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC3273	2	Histidina quinase: PAS-HK-HATPase
	XAC0448	2	triptofano 2,3-dioxigenase
	XAC0787	2	Peptidase
	XAC2412	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC1120	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC2515	1	regulador de transcrição: Família asnC/lrp
	XAC3463	<u>13</u>	<u>Proteína TolC</u>
	XAC1305	<u>8</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	XAC3311	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB: Iron</u>
	XAC1023	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FecA</u>
	XAC1866	<u>2</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
	XAC2600	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	XAC1254	<u>1</u>	<u>Isoleucil tRNA sintetase: ileS</u>
	XAC0291	<u>1</u>	<u>Proteína Oar</u>
	XAC3071	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: Iron</u>
	XAC4273	<u>1</u>	<u>Proteína relacionada a OmpA</u>
	XAC2529	<u>1</u>	<u>Proteína RhsD</u>
	XAC0716	<u>3</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FyuA</u>
	XAC2193	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: CirA</u>
	XAC2941	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FhuA</u>
	total	108	

Tabela 18: Continuação

ISCA XAC3292	Presas	Frequência	Produto
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">XAC3292</div> </div>	XAC3956	15	Lipoproteína de membrana externa, Blc
	XAC1274	7	Proteína Híbrida: RR-PAS-HK-HATPase-RR
	XAC0544	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC3630	1	“Copper resistant protein A precursor”
	XAC0823	1	outer membrane hemin receptor
	XAC3753	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC0110	1	Transportador de prolina/betaina
	XAC2769	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC0999	1	colicina I, receptor
	XAC2312	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC4273	<u>2</u>	<u>Proteína relacionada a OmpA</u>
	XAC1146	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FecA</u>
	XAC3463	<u>2</u>	<u>Proteína TolC</u>
	XAC3980	2	Protease DO

	<u>XAC0291</u>	<u>2</u>	<u>Proteína Oar</u>
	<u>XAC3121</u>	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FepA</u>
	<u>XAC0074</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: CirA</u>
	<u>XAC3168</u>	<u>1</u>	<u>Receptor ferro enterobactina</u>
	<u>XAC3560</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	<u>XAC3166</u>	<u>1</u>	<u>Receptor ferro enterobactina</u>
	<u>XAC2941</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FhuA</u>
	<u>XAC3245</u>	<u>1</u>	<u>Proteína RhsD</u>
	<u>XAC0811</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: CirA</u>
	<u>XAC3444</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	<u>XAC3515</u>	<u>1</u>	<u>celulose sintase, subunidade C</u>
	<u>XAC3427</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FhuA</u>
	<u>pOAD</u>	<u>9</u>	<u>Vetor vazio</u>
	<u>XAC2998</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FecA</u>
	<u>pOAD</u>	<u>9</u>	<u>Vetor vazio</u>
	<u>total</u>	<u>62</u>	

ISCA XAC3673	Presas	Frequência	Produto
XAC0570	3	Proteína antagonista do fator anti-sigma F
	XAC3956	2	Lipoproteína de membrana externa: Blc
	XAC1271	2	Efector negativo de sigma-B
	XACb0021	2	Proteína hipotética
	XAC3602	1	Proteína cistationina gama-liase-like
	XAC2980	1	Transportador de Mg ⁺⁺
	XAC2616	1	Proteína cromossomal VirB2
	XAC0215	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC2317	1	Proteína Conservada Hipotética
	XAC2053	1	Proteína relacionada à transcrição
	XAC1682	1	RNA polimerase fator sigma-E
	XAC1152	1	“curved DNA binding protein”
	XAC1936	2	Proteína flagelar
	<u>XAC1024</u>	<u>1</u>	<u>fosfolipase C não-hemolítica</u>
	XAC2430	1	Tn5044 transposase
	XAC1989	1	Proteína flagelar
	total		

Tabela 18: Continuação

ISCA XAC3975	Presas	Frequência	Produto
XAC3980	5	Protease DO: HtrA
	XAC3967	2	Hidrolase ou peptidase
	XAC3483	2	Regulador de Resposta, TctD: RR
	XAC1221	2	Regulador de Resposta, ColR: RR-Trans_Reg_c
	<u>XAC3444</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	<u>XAC2600</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: BtuB</u>
	<u>XAC3311</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: IroN</u>
	<u>XAC2193</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: CirA</u>
	<u>XAC0716</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FyuA</u>
ISCA XAC3993	Presas	Frequência	Produto
XAC0964	3	Proteína ribossomal 50 S, L7/L12: rplL
	XAC1228	2	Histidina quinase: TM-HK-HATPase
	XAC0224	1	Piruvato desidrogenase
	XAC3101	1	Regulador de Resposta: RR
	XAC3993	1	Regulador de Resposta: RR-GerE
	<u>XAC2941</u>	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FhuA</u>
	<u>XAC0291</u>	<u>2</u>	<u>Proteína Oar</u>
	<u>XAC2998</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB: FecA</u>

Tabela 19: Interações envolvendo Iscas Hipotéticas e outras. A coluna da esquerda indica a isca. As presas em itálico e sublinhadas representam os possíveis falsos positivos.

XAC0279	Freqüência	Produto
XAC2202	1	Proteína B, secreção de hemolisina
XAC0255	1	Regulador de Transcrição
<u>XAC3463</u>	<u>23</u>	<u>Proteína TolC</u>
<i>total</i>	25	
XAC0340	Freqüência	Produto
XAC0340	5	Proteína Conservada Hipotética
<u>XAC3463</u>	<u>25</u>	<u>Proteína TolC</u>
<i>total</i>	30	
XAC0501	Freqüência	Produto
XAC3549	2	fosforibosilformilglicinamidina sintetase
XAC4273	1	Proteína relacionada à OmpA
XAC1290	1	2-o dioxigenase
XAC4184	1	Oxidoredutase
XAC3212	1	glicose desidrogenase
XAC0702	1	Sistema de Secreção Tipo II: Proteína K
XAC4195	1	Proteína NdvB
XAC1435	1	receptor de ferro
XAC0653	1	Receptor-dependente TonB
XAC0544	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3312	1	glicosil hidrolase
XAC4258	1	Xilosidase/arabinosidase
XAC0639	1	citosina desaminase
XAC3789	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3652	1	ATP sintase, subunidade delta
XAC1892	1	Proteína de quimiotaxia
XAC3631	1	Copper resistance protein B precursor
<u>XAC4113</u>	<u>1</u>	<u>Proteína YapH</u>
<u>XAC0716</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC2998</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC3463</u>	<u>1</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>XAC4256</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC3366</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC1146</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC3448</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC2151</u>	<u>3</u>	<u>Proteína YapH</u>
<u>XAC1023</u>	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>pOAD</u>	<u>22</u>	
<i>total</i>	53	
XAC0674	Freqüência	Produto
<u>XAC3463</u>	<u>26</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>pOAD</u>	<u>3</u>	<u>Vetor vazio</u>
<u>XAC1024</u>	<u>1</u>	<u>Fosfolipase C, não hemolítica</u>
XAC0305	1	gama-glutamyltranspeptidase
<i>total</i>	31	

Tabela 19: Continuação

XAC1088	Freqüência	Produto
XAC2810	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC1949	1	Proteína flagelar
<u>XACa0042</u>	<u>6</u>	<u>Proteína KfrA</u>
<u>XAC0426</u>	<u>2</u>	<u>Enzima de ramificação de 1,4-alfa-glucano</u>
<u>XAC3366</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<i>Total</i>	11	
XAC1093	Freqüência	Produto
XAC1093	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC0611	1	Proteína de quimiotaxia
XAC4154	1	Regulador de Transcrição
XAC1935	1	Proteína flagelar
XAC3234	1	Proteína Hipotética
<u>XAC3463</u>	<u>14</u>	<u>Proteína TolC</u>
<i>Total</i>	20	
XAC1171	Freqüência	Produto
XAC1186	1	excinuclease ABC, subunidade A
<u>XAC3121</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC2600</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>pOAD</u>	<u>1</u>	
<u>XAC3463</u>	<u>9</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>XAC3560</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<i>Total</i>	14	
XAC1201	Freqüência	Produto
XAC4178	1	<i>Xanthomonas</i> Proteína Conservada Hipotética
XAC1138	1	citrato sintase 2
XAC1273	1	HK/HATPase_c
XAC3195	1	Subunidade da Clp protease dependente de ATP
XAC2523	1	gama-glutamyltranspeptidase
<u>XAC3463</u>	<u>42</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>XAC1024</u>	<u>5</u>	<u>Fosfolipase C, não hemolítica</u>
<i>Total</i>	52	
XAC1495	Freqüência	Produto
XAC1495	4	regulador de virulência: xrvA
<i>Total</i>	4	
XAC1671	Freqüência	Produto
<u>XAC3463</u>	<u>37</u>	<u>Proteína TolC</u>
XAC3013	1	uroporfirinogênio descarboxilase
<i>Total</i>	38	
XAC1866	Freqüência	Produto
<u>XAC0426</u>	<u>3</u>	<u>Enzima de ramificação de 1,4-alfa-glucano</u>
<i>Total</i>	3	

Tabela 19: Continuação

XAC2053	Freqüência	Produto
XAC4019	8	Proteína Conservada Hipotética
XAC1208	2	<i>Xanthomonas</i> Proteína Conservada Hipotética
XAC3923	1	Arginina descarboxilase biossintética
<u>XAC3463</u>	<u>27</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>XAC0852</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<i>Total</i>	39	
XAC2072	Freqüência	Produto
XAC3368	13	Proteína Conservada Hipotética
XAC2308	3	ABC transportador, açúcar permease
XAC3213	1	Proteína de quimiotaxia
XAC0093	1	ISxac1 transposase
XAC1212	1	Oxidoredutase
XAC1623	1	Proteína de segregação do cromossomo
<i>Total</i>	20	
XAC2118	Freqüência	Produto
	0	Nenhum clone positivo em SC-WLHA
<i>Total</i>	0	
XAC2126	Freqüência	Produto
XAC3229	5	“Cointegrate resolution protein”
<u>pOAD</u>	<u>1</u>	<u>Vetor vazio</u>
<i>Total</i>	6	
XAC2236	Freqüência	Produto
XAC1282	2	PAS/His_KA/HATPase_c
XAC3065	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC3847	1	N-acil-L-aminoácido amidohidrolase
XAC4301	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC1369	1	Proteína Conservada Hipotética
<u>XACb0015</u>	<u>10</u>	<u>PthA</u>
<u>XAC0426</u>	<u>3</u>	<u>Enzima de ramificação do 1,4-alfa-glucano</u>
<u>XACb0065</u>	<u>2</u>	<u>PthA</u>
<i>Total</i>	22	
XAC2657	Freqüência	Produto
XAC0970	22	Fator de elongação Tu
XAC0957	2	Fator de elongação Tu
XAC0240	1	D-alanina—D-alanina ligase
XAC2519	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC4019	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3556	1	aminopeptidase A/I
XAC2336	1	citocromo D ubiquinol oxidase subunidade I
XAC3705	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC0608	1	Proteína híbrida HK-RR
XAC3909	1	dolicol-fosfato manosiltransferase
XAC2605	1	Proteína Conservada Hipotética
XACb0047	1	Proteína VirB2 plasmídeo
<i>Total</i>	34	

Tabela 19: Continuação

XAC3112	Frequência	Produto
XAC3515	15	celulose sintase subunidade C
XAC2810	11	Proteína Conservada Hipotética
XAC2865	5	Histidina cinase relacionada à quimiotaxia: CheA
XAC1903	3	Proteína de quimiotaxia
XAC3234	3	Proteína hipotética
XAC1045	3	Proteína Conservada Hipotética
XAC4326	3	uréia amidolase
XAC4162	3	Proteína do Sistema de efluxo de cátion
XAC3229	4	“cointegrate resolution protein T”
XAC2506	2	Proteína hipotética
XAC2158	2	Regulador de Resposta (RR)
XAC3756	2	“ferrichrome-iron receptor 3”
XAC3733	2	Regulador de Transcrição, família NtrC
XAC2802	2	Proteína do canal externo de membrana
XAC3546	2	Proteína externa de membrana
XAC3195	2	subunidade ATP-dependente Clp protease
XAC0513	2	Proteína bifuncional da biossíntese de purina
XAC3393	2	pentafofato guanosina-3’-pirofosfohidrolase
XAC1379	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC3136	1	PAS/HWE_HK/motivo_WXE
XAC1217	1	dipeptidil carboxipeptidase
XAC3455	1	2-isopropilmalato sintase
XAC3207	1	Receptor ferro enterobactina
XAC3194	1	Receptor de membrana externa para o transporte de Vitamina B
XAC4299	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3754	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC4337	1	exodesoxirribonuclease V cadeia gama
XAC1882	1	Aconitase
XAC3449	1	Receptor de quimiotaxia: Tar
XAC0610	1	GAF/PAS/PAS/PAS/PAS/GGDEF
XAC3581	1	UDP-glicose desidrogenase
XAC4211	1	Glicil tRNA sintetase, cadeia alfa
XAC3065	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC0145	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC0528	1	<i>Xanthomonas</i> Proteína Conservada Hipotética
XAC1669	1	PAS2/HK/HATPase_c/RR
XAC2009	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC2829	1	Receptor de membrana externa para hemina
<u>XAC0426</u>	<u>1</u>	<u>Proteína de ramificação do 1,4-alfa-glucano</u>
<u>XAC3366</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC2742</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC0706</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XACa0022</u>	<u>1</u>	<u>PthA1</u>
<u>XAC3121</u>	<u>5</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XACa0042</u>	<u>12</u>	<u>Proteína KfrA</u>
<u>XAC1866</u>	<u>4</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
<u>XAC1024</u>	<u>1</u>	<u>Fosfolipase C não-hemolítica</u>
<u>XAC3098</u>	<u>3</u>	<u>Proteína PilL</u>
<i>Total</i>	119	

Tabela 19: Continuação

XAC3245	Freqüência	Produto
XAC3028	1	Reg_propeller/YYY/HK/HATPase_c/RR
XAC2009	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3190	1	Proteína de biossíntese de cobalamina
XAC0358	1	Glicerol cinase: GlpK
<u>pOAD</u>	<u>3</u>	
XAC0031	1	Álcool desidrogenase
<i>Total</i>	8	
XAC3263	Freqüência	Produto
XAC2288	1	inosina-5'-monofosfato desidrogenase
XAC1816	1	Proteína relacionada à hemaglutinina/hemolisina
XAC3446	1	<i>Xanthomonas</i> Proteína Conservada Hipotética
XAC4046	1	dipeptidil peptidase IV
XAC0314	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC2940	1	benzeno 1,2-dioxigenase, proteína ferredoxina
<i>Total</i>	6	
XAC3285	Freqüência	Produto
XAC2810	3	Proteína Conservada Hipotética
XAC1420	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC4326	2	Uréia amidolase
<u>XACa0042</u>	<u>20</u>	<u>KfrA</u>
<i>Total</i>	27	
XAC3294	Freqüência	Produto
XAC2810	5	Proteína Conservada Hipotética
XAC0304	2	Proteína GvpU
XAC1269	1	regulador positivo desigma-B
XAC0122	1	proteína TldD
XAC3368	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3212	1	glicose desidrogenase
XAC1304	1	Proteína hipotética
XAC3113	1	ATP:GTP 3'-pirofosfotranferase
XAC3548	1	Proteína de membrana externa
XAC3294	1	Proteína hipotética
XAC3549	1	fosforibosilformilglicinamidina sintetase
XAC2831	1	serina protease extracelular
XAC0610	1	GAF/PAS/PAS/PAS/PAS/GGDEF
XAC3756	3	Receptor de ferro
XAC3581	1	UDP-glucose desidrogenase
XAC3076	2	glucano 1,4-beta-glucosidase
<u>XAC3463</u>	<u>4</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>XAC3366</u>	<u>3</u>	<u>receptor TonB-dependente</u>
<u>XAC2529</u>	<u>1</u>	<u>proteína RhsD</u>
<u>XAC0426</u>	<u>1</u>	<u>Enzima de ramificação de 1,4-alfa-glucano</u>
<u>XAC1305</u>	<u>1</u>	<u>WapA: proteína associada à membrana</u>
<i>Total</i>	35	
XAC3852	Freqüência	Produto
<u>XAC3515</u>	<u>8</u>	<u>celulose sintase, subunitade C</u>
<u>XAC1024</u>	<u>4</u>	<u>Fosfolipase C, não-hemolítica</u>
XAC1772	3	Proteína Conservada Hipotética
XAC2412	2	Proteína Conservada Hipotética

XAC1525	2	corismato mutase/prefenato desidrogenase
XAC1812	2	Proteína Hms
XAC2810	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3836	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC1217	1	dipeptidil carboxipeptidase
XAC2589	1	Fenilalanil tRNA sintetase, subunidade beta: PheT
<u>XAC3444</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
XAC4326	1	uréia amidoliase
<u>XAC3560</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC3448</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<i>Total</i>	29	

Tabela 19: Continuação

XAC3873	Freqüência	Produto
0	0	Nenhum clone positivo em meio SC-WLHA
<i>Total</i>	0	
XAC3839	Freqüência	Produto
XAC3528	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC1179	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC4195	1	NdvB protein
XAC3207	1	Receptor ferro enterobactina
<u>XAC3448</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC2151</u>	<u>1</u>	<u>Proteína Yaph</u>
<u>XAC1146</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>pOAD</u>	<u>1</u>	
<i>Total</i>	8	
XAC3956	Freqüência	Produto
<u>XAC3463</u>	<u>38</u>	<u>Proteína TolC</u>
XAC3292	3	PAS/HK/HATPase_c
<i>Total</i>	41	
XAC3980	Freqüência	Produto
0	0	Nenhum clone positivo em meio SC-WLHA. Repetição de 2 testes
<i>Total</i>	0	
XAC3984	Freqüência	Produto
XAC1151	3	Proteína de choque térmico de baixo peso molecular
XAC2810	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC0722	1	‘tiol:disulfide interchange protein’
XAC0869	1	Proteína da família de utilização de acetoína
XAC3098	1	Proteína PilL
XAC3631	1	Copper resistance protein B precursor
XAC4326	1	uréia amidoliase
<u>XACb0065</u>	<u>1</u>	<u>PthA4</u>
<u>XAC0716</u>	<u>2</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC3463</u>	<u>2</u>	<u>Proteína TolC</u>
<i>Total</i>	15	
XAC4019	Freqüência	Produto
XAC1267	1	Proteína Hsp90xo
XAC0905	1	Regulador de transcrição do estresse oxidativo: OxyR
<u>XAC3463</u>	<u>2</u>	<u>Proteína TolC</u>

<i>pOAD</i>	<u>4</u>	<i>Vetor vazio</i>
<i>Total</i>	8	
XAC4160	Frequência	Produto
XACb0021	6	Proteína Hipotética
XAC2859	1	Proteína Hipotética
XAC2638	1	Proteína Hipotética
XAC3829	1	RNA helicase dependente de ATP
XAC4160	1	Proteína do sistema de efluxo de cátion
<i>Total</i>	10	

Tabela 19: Continuação

XAC4263	Frequência	Produto
XAC2463	6	<i>Xanthomonas</i> Proteína Conservada Hipotética
XAC2810	6	Proteína Conservada Hipotética
XAC1441	3	topoisomerase IV subunidade A
XAC3980	3	protease DO
XAC4049	2	Proteína SapC
XAC2496	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC0759	2	HK/HATPase_c
XAC0145	2	Proteína Conservada Hipotética
XAC2412	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC3890	1	Proteína bifuncional PutA
XAC3173	1	<i>Xanthomonas</i> Proteína Conservada Hipotética
XAC4250	1	Beta galactosidase
XAC1304	1	Proteína hipotética
XAC3753	1	Proteína Conservada Hipotética
XAC0610	1	GAF/PAS/PAS/PAS/PAS/GGDEF
XAC4211	1	Glicil tRNA sintetase, cadeia alfa: GlyQ
<u>XAC0716</u>	<u>1</u>	<u>Receptor-dependente TonB</u>
<u>XAC1936</u>	<u>1</u>	<u>Proteína flagelar</u>
<i>pOAD</i>	<u>1</u>	
<u>XAC1305</u>	<u>2</u>	<u>Proteína associada à membrana: WapA</u>
XAC1254	3	Isoleucil tRNA sintetase: ileS
<u>XAC3463</u>	<u>4</u>	<u>Proteína TolC</u>
<u>XACa0042</u>	<u>4</u>	<u>Proteína KfrA</u>
XAC1815	1	“Filamentous hemaglutinina”
<i>Total</i>	51	

a) XAC0135

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
<p>169-191 TM</p> <p>TM 45-67</p> <p>HK 223-288</p> <p>HATPase 320-408</p>	200-409	<p>0132 beta lactamase</p> <p>0131 0133 0134 0135 0136 0137 0138 0139</p> <p>0132 CHP</p> <p>0133 L-lactato desidrogenase</p> <p>0135 HK</p> <p>0136 RR</p> <p>0137 CHP</p> <p>0138 HP</p> <p>0139 CHP</p> <p>0140 regulador de transcrição</p>

XAC0135 apresenta-se como uma proteína histidina quinase completa, pois possui os domínios de dimerização (neste caso, denominado de HK) e de ligação ao ATP. Está acompanhada no genoma de XAC0136, uma proteína com domínio de regulador de resposta da família NarL (GALPERIN *et al.*, 2001). Utilizando os resíduos 200-409 de XAC0135 como isca, identificamos 2 presas em fase +1, sendo 5 presas consideradas falsos-positivos. Dentre as proteínas restantes, observamos 7 interações com o regulador de resposta XAC0136, provavelmente seu regulador cognato. Outras 2 interações foram observadas com XAC1229, outro regulador de resposta da família NarL.

b) XAC0608 e XAC0610

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
<p>GAF 51-184</p> <p>XAC0608</p>	1-336	<p>endonuclease</p> <p>0606 0607 0608 0609</p> <p>0607 CHP</p> <p>0608 GAF</p> <p>0609 protease</p>
<p>GAF 52-184</p> <p>PAS_4 204-320</p> <p>PAS_4 336-457</p> <p>PAS_3 489-582</p> <p>PAS_4 600-707</p> <p>GGDEF 712-874</p> <p>XAC0610</p>	1-881	<p>sensor quimiotaxia</p> <p>0610 0611 0612</p> <p>0610 GAF/PAS/GGDEF</p> <p>0611 sensor quimiotaxia</p> <p>0612 celulase</p>

XAC0608 possui um domínio GAF presente na posição 51-184. A região C-terminal desta proteína não possui similaridade a nenhuma proteína constante neste banco.

Como mostrado na Tabela 18, identificamos 60 presas em fase +1, com as quais XAC0608 interagiu. Dessas, 40 eram derivadas da proteína conservada hipotética XAC4019 e 6 eram derivadas das proteínas hipotéticas XAC3272 e XAC2317. Além disso, observamos interações únicas com XAC3218, XAC0386 e XAC1289.

A análise de localização celular de XAC4019, através do programa P-sort (NAKAI e HORTON, 1999) prevê localização no citoplasma. XAC4019 possui um domínio DUF980 (domínio conservado sem função definida), caracterizado através de análise no banco de dados do Pfam. Dentre outras proteínas que interagiram com XAC4019 quando esta foi utilizada como isca, identificamos: XAC2158 e XAC0684, dois reguladores de resposta; XAC2657, uma proteína hipotética e XAC2053, uma proteína relacionada à transcrição, com domínio S1 de ligação ao RNA.

XAC0610 apresenta os domínios PAS, GAF e GGDEF. A Tabela I relaciona os fragmentos de proteínas com as quais XAC0610 interagiu: com exceção de XAC3901, um transdutor de sinal da família MFS-1 (“major facilitator”), com o qual obteve 1 interação, as demais presas constituem falsos-positivos.

c) XAC0621

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
	1-246	736179 a 736913 (738 pb, 246 aa)

XAC621 possui 45% de identidade com a proteína AlgR de *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Identificamos um total de 17 presas em fase +1, sendo que 3 eram derivadas de XAC0620, uma proteína (HK) com 38% de identidade à AlgZ de *P. aeruginosa*. Outras 3 interações foram identificadas com XAC2670 e 2 com XAC2142, ambas histidina quinases.

Em *P. aeruginosa*, a maioria dos genes requeridos para a produção de alginatos está localizada em um grande operon. Alginatos são exopolissacarídeos compostos de copolímeros lineares de ácido beta-D-manurônico e alfa-L-gulurônico. Sua produção evita que a bactéria seja fagocitada por macrófagos. A ativação de *algD*, o primeiro gene deste operon é absolutamente necessária para a produção deste exopolissacarídeo e sua expressão é controlada por AlgU (subunidade σ^E da RNA polimerase) que também é

responsável pela expressão de fatores regulatórios que atuam positivamente na transcrição do operon. Estes fatores incluem os reguladores de transcrição AlgR e AlgB. Em *P. aeruginosa*, *algZ* está imediatamente localizado a montante de *algR*.

Em *Xac*, os genes *algZ* e *algR* encontram-se próximos do gene XAC0618 que codifica uma proteína da via de biossíntese de glucano. Como detalhado no diagrama, AlgR possui um domínio LytTR na região C-terminal. O domínio LytTR liga-se ao DNA e está presente em uma variedade de fatores de transcrição da família AlgR/LytR. A maioria dos reguladores de transcrição dessa família está envolvida na biossíntese de polissacarídeos extracelulares, fímbrias, expressão de exoproteínas, toxinas e *quorum sensing* (NIKOLSKAYA e GALPERIN, 2002).

d) XAC0684

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
5-130 RR	1-147	6-fosfogluconato desidrogenase oxidoreductase CHP 0683 HK 0684 RR 0685 HK/RR 0686 FolK 0687 pteridena redutase

XAC0684 é constituído essencialmente de um domínio regulador de resposta na região N-terminal. Identificamos um total de 11 presas positivas, sendo 3 com XAC0683, uma histidina quinase com domínios transmenbrânicos, CHASE e PAS. Outras 2 interações foram observadas com XAC1273 (HK) e com a proteína hipotética XAC4019, a qual também interagiu com XAC0608, dentre outras, como mencionado no item b. É importante salientar que não observamos interações com XAC0685, possivelmente devido ao baixo número de clones positivos nesta análise.

e) XAC0760

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
RR 11-122 Trans_reg_c 157-233		ATPases Transportadores de K+ KdpABC 0759 HK KdpD 0760 RR KdpE HP

XAC0760 é um regulador de resposta cujo domínio efetor o classifica como membro da família OmpR. Em *E. coli*, o sistema de dois-componentes OmpR/EnvZ regulam os genes das porinas OmpF e OmpC em resposta a mudanças de osmolaridade (KENNEY, 2002). XAC0760 possui 54% de identidade com a proteína KdpE de *P. syringae* pv. *tomato*. Encontra-se ao lado da histidina quinase KdpD (XAC0759) e de 3 genes que codificam 3 subunidades da Potássio-ATPase (homólogos de KdpABC, de *E. coli*). Isolamos 16 presas em fase +1, uma delas derivada de XAC0759 (KdpD). Em *E. coli*, a regulação da concentração de K⁺ intracelular é regulada pelos produtos dos genes *kdpD* e *kdpE* que situam-se imediatamente a jusante do operon KdpABC. KdpABC são proteínas estruturais que formarão o poro por onde K⁺ será transportado. KdpE, um regulador de resposta, se liga ao DNA imediatamente a montante do promotor. Em concentrações não limitantes de K⁺ os genes *kdpABC* são reprimidos (JUNG e ALTENDORF, 2002; BRANDON *et al.*, 2000).

f) XAC1273 e XAC1274

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
		XAC1273: 1455033 a 1456436 (1407 pb, 469 aa)
		XAC1274: 1456429 a 1458381 (1956 pb, 652 aa)
XAC1273

XAC1274

XAC1273 e XAC1274 são proteínas que contêm múltiplos domínios: XAC1273 é uma HK que possui um grande domínio N-terminal sem função conhecida enquanto XAC1274 possui um domínio HK, 2 domínios RR e um domínio PAS. Os genes *XAC1273* e *XAC1274* localizam-se imediatamente ao lado de um grupo de genes reguladores designados *rsb* (“reguladores de sigma B”). Em bactérias Gram-positivas, o fator sigma B funciona como o centro regulador de resposta ao estresse. A ativação do regulon do fator sigma B é mais bem conhecida em *Bacillus subtilis* onde é governada por dois módulos “partner-switching” sequencialmente ligados (KANG *et al.*, 1996). Nesta bactéria os componentes regulatórios estão codificados em um complexo operon que contém o gene

codificador do sigma B e dois módulos de sete genes *rb*s reguladores de sigmaB. Cada módulo é composto por uma serina fosfatase (RsbX ou RsbU), uma proteína antagonista (RsbS ou RsbV) e um fator anti-sigma (RsbT ou RsbW). O primeiro módulo (RsbX, RsbS e RsbT) é requerido na transmissão de estresses ambientais. O segundo módulo (RsbU, RsbV e RsbW) é ativado em resposta aos sinais enviados pelo primeiro módulo (FOUET *et al.*, 2000). Em XAC foram encontrados homólogos de RsbT (XAC1271), RsbS (XAC1270) e RsbR (XAC1269). Contudo, não há homólogos para proteínas do segundo módulo e para o fator sigma B.

Análises de duplo-híbrido com XAC1273 revelaram 4 interações com a proteína regulatória XAC0896 e 2 interações com XAC1271 (RsbT), o efetor negativo de sigma B. Maria Cláudia Pereda Rosa, aluna de doutorado do nosso laboratório, também identificou interações entre XAC1271 e XAC1273, além de interações entre XAC1269 (RsbR) e XAC1270 (RsbS), entre XAC1270 e XAC1271 e entre XAC1269 e XAC1271. Entretanto, não observamos interações de XAC1274 com nenhuma proteína deste “cluster” em um total de 19 interações identificadas. Dentre estas, identificamos interações de XAC1274 e XAC4263 (uma proteína hipotética) e XAC1480, um regulador de transcrição com domínio “helix-turn-helix” de ligação ao DNA da família LysR (Tabela 18).

g) XAC4263: Proteína Hipotética presa de XAC1274

XAC4263 foi observada em interações com XAC1274, como descrito acima. É uma proteína hipotética e não apresenta domínios identificáveis através de análise de domínios protéicos no banco de dados Pfam. Isolamos um total de 51 presas em fase +1. Duas proteínas conservadas hipotéticas interagiram num maior número de vezes com XAC4263 em uma frequência de 6 interações cada: XAC2810 (possível falso-positivo) e XAC2463. Além disso, identificamos interações com XAC3980 (protease DO), com XAC4049 (uma proteína homóloga à SapC de *Salmonella*) e com XAC0759 (KdpD).

h) XAC1279 e XAC1284

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
<p>RR 18-133</p> <p>HK 158-224</p> <p>HATPase 267-372</p> <p>XAC1279</p>	1-377	<p>XAC1279: 1465410 a 1464283 (1131 pb, 377 aa)</p> <p>XAC1284: 1471299 a 1471664 (369 pb, 123 aa)</p> <p>CHP</p> <p>1280 CheB</p> <p>1283 GAF/HK/RR</p> <p>1284 RR</p> <p>1279 RR/HK</p> <p>1281 CheR</p> <p>1282 PAS/HK</p> <p>CHP</p>
<p>RR 5-116</p> <p>XAC1284</p>	1-123	

Os genes de XAC1279, XAC1283 e XAC1284 estão localizadas ao lado dos genes de quimiotaxia *cheB* e *cheR*. Utilizando XAC1279 como isca, identificamos 21 interações sendo 3 com XAC1281 (CheR), 2 com XAC1284 (RR) e 3 com XAC1670 (RR). Quando XAC1284 foi utilizada como isca, 15 presas foram identificadas sendo 3 derivadas de XAC1282 (PAS-HK) e 1 de XAC0207 (PAS-HK), uma proteína com similaridade à NtrB (34% identidade com NtrB de *P. aeruginosa* PA01). Além disso, veremos adiante (item i) que XAC1670 também apresentou interações com XAC1279 e com XAC1282.

i) XAC1669, XAC1670 e XAC1672

<p><i>Domínios identificados pelo P-fam</i></p> <p>PAS 21-134</p> <p>PAS 149-260</p> <p>HK 300-368</p> <p>HATPase 409-530</p> <p>RR 554-668</p>	<p><i>Fragmento utilizado como isca</i></p> <p>1-677</p>	<p><i>Localização no genoma de Xac</i></p> <p>XAC1669: 1925794 a 1927821 (2031 pb, 677 aa)</p> <p>XAC1670: 1928314 a 1927943 (375 pb, 125 aa)</p> <p>XAC1671: 1928584 a 1930098 (1518 pb, 506 aa)</p> <p>XAC1672: 1930088 a 1932157 (2073 pb, 691 aa)</p>
<p>XAC1669</p> <p>RR 10-116</p>	<p>1-125</p>
<p>XAC1670</p> <p>PAS_4 162-271</p> <p>HK 316-384</p> <p>HATPase 425-549</p> <p>RR 570-683</p>	<p>1-691</p>	<p>XAC1672</p>

XAC1669 é uma proteína híbrida (histidina quinase/ regulador de resposta) que se situa ao lado de um fator de transcrição (XAC1668) e a um grupo, a jusante que

compreende um regulador de resposta (XAC1670), uma proteína hipotética (XAC1671) e uma proteína híbrida com domínios PAS-HK-RR (XAC1672).

Das 55 presas em fase +1 com as quais a XAC1669 mostrou interações, 9 eram derivadas da própria XAC1669, provavelmente indicativo da formação de um dímero; 5 interações com XAC3984, uma proteína hipotética; 3 com XAC3273; 4 com XAC1204; 2 com XAC1282, uma proteína sensora e uma interação com XAC1672 (Tabela 18). Algumas proteínas com as quais XAC1669 interagiu apresentam as seguintes características: XAC3273 é uma histidina quinase que interagiu com XAC3730 (CheR) e está relacionada à via de sinalização de quimiotaxia; XAC1282 localiza-se em um “cluster” de quimiotaxia o qual compreende os genes *XAC1279*, *XAC1280* (cheB), *XAC1281* (cheR) e *XAC1283* (sistema de dois-componentes).

A análise do duplo-híbrido mostrou que mais de 25% das presas de XAC1670 (RR) eram derivadas de XAC1669 (HK/RR). XAC1670 também interagiu com outras duas proteínas: 13% das presas eram derivadas de XAC1279 (HK/RR) e 47% eram derivadas de XAC1282 (HK). As proteínas XAC1279 e XAC1282 foram citadas anteriormente e localizando-se em um “cluster” que compreende algumas proteínas de quimiotaxia: XAC1280 (CheB) e XAC1281 (CheR). Quando utilizamos XAC1672 como isca, identificamos um total de 19 presas em fase +1, duas das quais eram derivadas da proteína hipotética XAC1671.

j) XAC1991

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
1-409

XAC1991 é uma histidina quinase com domínio N-terminal com baixa similaridade a proteínas de função conhecida dos bancos de dados do Pfam e NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). A região C-terminal possui os domínios de dimerização e de ligação ao ATP característicos das histidina quinases. Utilizando XAC1991 como isca, verificamos um total de 38 interações em fase +1, sendo quase a totalidade das interações protéicas ocorreram com uma das quatro cópias do gene plasmidial *pthA*, considerado um

falso-positivo. Além disso, identificamos 1 interação com um fragmento derivado de XAC1992 e 2 interações com um fragmento derivado de XAC0922.

XAC0922 é um fator sigma da família ECF (“extracytoplasmic function”) e XAC1992 (574 aa) codifica uma proteína a qual possui um domínio GGDEF (resíduos 2 a 114), na região C-terminal seguido de um domínio EAL (diguanylate fosfodiesterase, resíduos 128 a 369) e de um regulador de resposta (resíduos 396 a 516). O gene de XAC1992 se encontra ao lado do gene de XAC1991, a qual se apresenta entre uma proteína conservada hipotética a montante, que a separa do “cluster” de biossíntese do flagelo (operons *fli* e *flg*), como mostra a figura abaixo:

Os fatores sigma da família ECF, são responsáveis pela expressão de genes envolvidos na quimiotaxia e genes que participam na biossíntese flagelar, genes envolvidos na indução de fatores de virulência, entre outros (HELMANN, 2002). Logo, sugerimos que as proteínas XAC1991 e XAC1922 estejam envolvidas na regulação da biossíntese do flagelo de *Xac*.

k) XAC2158

Domínio identificado pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
	1-510	2529335 a 2527809 (1530 pb, 510 aa)

A proteína XAC2158 possui um domínio RR N-terminal. Quando utilizamos XAC2158 como isca, identificamos interações com fragmentos de XAC4019 em 50% dos casos (Tabela 18). XAC2158 também interagiu com XAC1283, cujo gene localiza-se proximalmente a dois genes envolvidos em quimiotaxia, *cheR* (XAC1281) e *cheB* (XAC1280) e outros genes que codificam proteínas dos sistemas de 2-componentes (XAC1281 e XAC1282).

l) XAC3273

Domínios identificados pelo P-fam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
1-422	3855936 a 3854674 (1266 pb, 422 aa)

XAC3273 possui homologia a uma HK e contém um domínio PAS na região N-terminal. Seu gene correspondente localiza-se entre um gene hipotético (XAC3272) e a um gene que codifica um regulador de resposta (XAC3274). Quando utilizamos XAC3273 como isca, obtivemos um total de 108 interações em fase +1. Dessas, podemos destacar 19 interações com XAC3730, uma metiltransferase (CheR) um regulador de quimiotaxia, 11 interações com XAC2555 (PAS-HK-RR), 9 interações com XAC1274 (HK-RR), 6 interações com XAC1074 (HK) e 5 interações com XAC0115 (proteína conservada hipotética).

m) XAC3292

Domínios identificados pelo Pfam	Fragmento utilizado como isca	Localização no genoma de XAC
1-419	3871150 a 3869897 (1257 bp, 419 aa)

XAC3292 é uma histidina quinase com domínio PAS localizado na região N-terminal. Utilizando XAC3292 como isca observamos 62 interações em fase +1. A análise das interações mais significativas demonstra que XAC3292 interagiu com duas proteínas distintas (Tabela 18). Quinze interações ocorreram com fragmentos de XAC3956, uma lipocalina e 7 interações ocorreram com fragmentos de XAC1274 (vide item f). Notamos também 2 interações com XAC3980 (protease DO) que já havia sido identificada em interações com XAC4263 (que, por sua vez, interagiu com XAC1274). Interessantemente XAC3292 possui a mesma arquitetura de XAC3273 e ambas apresentaram interações com XAC1274.

n) XAC3956: Lipocalina, presa de XAC3292

XAC3956 está anotada como uma lipoproteína de membrana externa com similaridade ao gene *blc* de *E. coli*, que codifica a primeira lipocalina bacteriana descoberta (BISHOP, 2000). XAC3956 foi testada com o objetivo de confirmar a interação com a isca XAC3292 (vide item m). Quando utilizamos XAC3956 como isca detectamos somente uma presa derivada de XAC3292 (Tabela 18). Observamos também que esta lipocalina foi “presa” de XAC3673, uma proteína híbrida (HK/RR), porém, não identificamos interações com XAC3673 nas análises de XAC3956 utilizada como isca.

o) XAC3673

<i>Domínios identificados pelo Pfam</i>	<i>Fragmento utilizado como isca</i>	<i>Localização no genoma de Xac</i> (4350149 4351882) (1737 bp) (579 aa)
<p>TM 36-58 TM 169-191 HK 205-270 HATPase 317-432 RR 457-570</p>	195-579	<p>HP 3672 CHP 3675 3671 3673 CHP HK Mut.Pat 3674 CHP</p>

O gene de XAC3673 situa-se entre dois genes que codificam proteínas hipotéticas. XAC3673 é uma proteína de membrana que possui os domínios HK e RR. Utilizando XAC3673 como isca (resíduos 195-579), identificamos um total de 22 interações em fase +1. Dentre as mais relevantes estão 3 interações com XAC0570 (proteína antagonista do fator anti-sigma F), 2 interações com XAC3956 (lipocalina) e 2 interações com XAC1271 (efetor negativo de sigma B). Essas interações enfatizam a probabilidade da lipocalina XAC3956 estar envolvida com proteínas ligadas ao “cluster” *rsb*. Além das interações descritas, identificamos também uma presa derivada de XAC1682, um fator sigma E.

4.4.2- Purificação das Proteínas recombinantes XAC1669, XAC1670 e XAC1282

a) Expressão de XAC1669, XAC1282_{6xHis} e XAC1670_{6xHis}

O gene *XAC1669* foi amplificado por PCR e foi clonado no vetor pAE digerido com *NdeI* e *BamHI*, como descrito em Materiais e Métodos. XAC1669 possui 677 aminoácidos e um peso molecular estimado de 74131 Da. Após ensaios de mini-indução com diferentes cepas de *E. coli* escolhemos Cy(DE3)pLysS para a indução da proteína em larga-escala. Testes de expressão em temperaturas de 25°C e 37°C foram realizados com o

objetivo de se obter uma proteína solúvel. Como podemos observar na Figura 34, XAC1669 foi induzida à 25°C e à 37°C. Após a lise das células e centrifugação, verificamos que a proteína produzida à 25°C se mantinha solúvel, enquanto a proteína produzida 37°C era insolúvel. Deste modo, optamos pela indução em larga-escala à 25°C, mesmo observando que a expressão nessa temperatura foi menor que à 37°C (Figura 34).

Figura 34: SDS-PAGE mostrando a expressão heteróloga de XAC1669 em diferentes cepas de *E. coli*. (A) Ensaio de mini-indução à 25°C utilizando as cepas BL21(DE3) (poços 1 e 2), BL21(DE3)RIL (poços 3 e 4), BL21(DE3)Star (poços 5 e 6) e Cy(DE3)pLysS (poços 7 e 8). Poços ímpares: amostras não induzidas, poços pares: amostras induzidas (B) Ensaio de mini-indução à 37°C. As amostras foram aplicadas respeitando a sequência de (A). M: marcador de peso molecular (kDa).

Os genes *XAC1282* e *XAC1670* foram amplificados por PCR e clonados no vetor pET28a, entre os sítios de NdeI e BamHI como descrito em Materiais e Métodos. Deste modo, às proteínas recombinantes foi adicionada uma cauda de poli-histidina na região N-terminal. *XAC1282*_{6xHis} e *XAC1670*_{6xHis} foram produzidas em larga-escala na cepa Cy(DE3)pLysS e à 37°C. *XAC1282* possui 467 aminoácidos com peso molecular estimado de 50713 Da. *XAC1670* possui 124 aminoácidos com peso molecular estimado de 13525 Da. A inserção da cauda de poli-histidina às proteínas confere novo peso molecular estimado para *XAC1282*_{6xHis} de 52948 Da e para *XAC1670*_{6xHis} de 15760 Da.

b) Purificação das proteínas recombinantes

Após a expressão heteróloga, as células foram lisadas e as proteínas solúveis foram separadas das insolúveis mediante centrifugação, para posterior purificação. Enquanto *XAC1669* era solúvel, *XAC1282*_{6xHis} e *XAC1670*_{6xHis} foram encontradas em corpos de inclusão. Deste modo, para *XAC1282*_{6xHis} e *XAC1670*_{6xHis}, utilizamos uréia 8M para solubilizar as proteínas durante todo o processo de purificação.

Como descrito em Materiais e Métodos, XAC1669 foi purificada do lisado utilizando cromatografia de troca iônica (Q-sepharose), concentrada e purificada por passagem por uma coluna de gel filtração (Superdex-200). XAC1282_{6xHis} e XAC1670_{6xHis} foram purificadas em coluna de afinidade (Ni²⁺-Sepharose). Os graus de pureza obtidos para as proteínas podem ser avaliados na Figura 35.

Figura 35: SDS-PAGE mostrando as proteínas XAC1669 (74 kDa), XAC1670 (16 kDa) e XAC1282 (53 kDa) purificadas. (M) marcador de peso molecular (kDa). Poços 1, 4 e 7: cepas de *E. coli* Cy(DE3)pLysS antes da indução dos genes *XAC1669*, *XAC1670* e *XAC1282*, respectivamente. Poços 2, 5 e 8: cepas induzidas com 500 μ M de IPTG. Poços 3, 6 e 9: proteínas XAC1669, XAC1670_{6xHis} e XAC1282_{6xHis} após purificação.

c) Expressão das proteínas XAC2555 e XAC3273

O gene *XAC2555* foi amplificado por PCR e clonado no vetor pET28a digerido com *NdeI* e *BamHI*, como descrito em Materiais e Métodos. XAC2555 possui 541 aminoácidos e um peso molecular estimado de 58918 Da. A inserção da cauda de polihistidina à proteína confere novo peso molecular estimado para XAC2555_{6xHis} de 61153 Da. O gene *XAC3273* foi amplificado por PCR e clonado no vetor pAE. XAC3273 possui 422 aminoácidos e um peso molecular estimado de 45201 Da. Os ensaios de mini-indução foram realizados com diferentes cepas de *E. coli*, como mencionado no item Materiais e Métodos. A Figura 36 mostra que XAC2555 expressou na cepa BL21(DE3)RIL e que XAC3273 expressou na cepa BL21(DE3)Star à 37°C.

Figura 36: Ensaio de mini-indução. SDS-PAGE mostrando a expressão heteróloga de XAC2555 e XAC3273 nas cepas de *E. coli* BL21(DE3)RIL e BL21(DE3)Star, respectivamente. (1) amostra não induzida de XAC2555, (2) amostra induzida de XAC2555, (3) amostra não induzida de XAC3273, (4) amostra induzida de XAC3273. M: marcador de peso molecular (kDa).

4.4.3- Análise de interações entre as proteínas XAC1669/XAC1282_{6xHis} e XAC1669/XAC1670_{6xHis} por “pull down”

Efetuamos ensaios de “pull down” utilizando as proteínas XAC1282_{6xHis} e XAC1670_{6xHis} imobilizadas em resina “Ni²⁺-Chelating sepharose” para testar se estas conseguiam reter a proteína XAC1669. As proteínas XAC1282_{6xHis} e XAC1670_{6xHis} foram eluídas da resina de Ni²⁺ com 500 mM de imidazol demonstrando que interagem com a resina. Entretanto, observamos que a proteína XAC1669 também interagiu com a resina utilizando o tampão de lavagem com 20 mM de imidazol. Sendo assim, realizamos ensaios com concentrações crescentes de imidazol até que não verificássemos mais a interação desta com a resina. A concentração de imidazol utilizada para que XAC1669 fosse lavada da resina foi de 40 mM.

Após a incubação de XAC1282_{6xHis}/XAC1669 e XAC1670_{6xHis}/XAC1669 por 2 horas com tampão acrescido de 40 mM de imidazol e lavagens com 50 mM de imidazol, verificamos que, após a eluição com 500 mM de imidazol, XAC1669 foi coeluída com XAC1282_{6xHis} e com XAC1670_{6xHis} (Figura 37A).

Além disso, testamos como controle negativo um lisado de *E.coli* incubado com XAC1282_{6xHis} e com XAC1670_{6xHis} independentemente, para mostrar que as interações observadas com XAC1669 não eram inespecíficas. Incluímos também como controle negativo uma mistura da proteína XAC1669 com a proteína HrpD6_{6xHis} (10 kDa). HrpD6 é um componente do sistema de secreção do tipo III de *Xac*. Os resultados demonstraram que HrpD6_{6xHis} não foi capaz de reter XAC1669 na coluna de Ni²⁺ na presença de 40 mM de imidazol (Figura 37B).

Figura 37: Ensaio de “pull down” mostrando interações de XAC1669/XAC1282_{6xHis} e XAC1669/XAC1670_{6xHis}. Todas as amostras foram lavadas com 50 mM de imidazol e eluídas com 500 mM de imidazol, exceto quando indicado. (A) SDS-PAGE 18% das frações eluídas de: (1) XAC1282_{6xHis}, (2) XAC1670_{6xHis}, (3) XAC1669 incubada e lavada com 20mM de imidazol, após eluição com 500 mM de imidazol, (4) XAC1669 lavada com 40mM imidazol, (5) XAC1669/XAC1282_{6xHis} (6) XAC1669/XAC1670_{6xHis}. (B) SDS-PAGE 18% das frações eluídas de: (1) XAC1282_{6xHis}/Lisado de *E. coli*, (2) XAC1670_{6xHis}/Lisado de *E. coli*, (3) lisado de *E. coli*, (4) HrpD6_{6xHis}, (5) HrpD6_{6xHis}/XAC1669. (+) XAC1669, (*) XAC1282_{6xHis}, (#) XAC1670_{6xHis}, (§)HrpD6_{6xHis}.

4.4.4- Análise da interação de XAC1669/XAC1670_{6xHis} por “overlay”

Para confirmar as interações entre XAC1669 e XAC1670_{6xHis} observadas através dos ensaios de “pull down” realizamos um ensaio de “overlay”. Em SDS-PAGE 18% aplicamos aproximadamente 15 µg de cada proteína, utilizando como controle negativo, lisado de *E. coli*. Proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose como descrito em Materiais e Métodos. XAC1669 e o lisado foram incubados por 16 h com 50 µg/mL de XAC1670_{6xHis}, seguido de anticorpo anti-His-tag (1/5.000) e de proteína A conjugada à peroxidase (1/10.000). XAC1670_{6xHis} foi incubada com anticorpo anti-His-tag e proteína A conjugada à peroxidase. A Figura 38 mostra que XAC1670_{6xHis} foi reconhecida pelo anticorpo anti-His-tag e que XAC1669 interagiu com XAC1670_{6xHis}.

Contudo, salientamos que não obtivemos resultados de “overlay” satisfatórios para XAC1669/XAC1282_{6xHis}. Neste caso, não conseguimos verificar interações entre essas proteínas.

Figura 38: (A) SDS-PAGE corado com “Ponceau”. (A) membrana de nitrocelulose mostrando marcador de peso molecular (kDa), XAC1670_{6xHis} (poço 1) e XAC1669 (poço 2). (B) “Overlay” após incubação das proteínas XAC1670_{6xHis} com anticorpo anti-His-tag e posteriormente com proteínaA-peroxidase (poço 1) e XAC1669 incubada com XAC1670_{6xHis} e posteriormente com anticorpo anti-His e proteínaA-peroxidase (poço 2). (C e D) lisado incubado com XAC1670_{6xHis} e posteriormente com anticorpo anti-His e proteínaA-peroxidase.

4.5- Sistemas de Secreção do Tipo IV

4.5.1- Interações envolvendo os loci *vir* e *tra* e genes vizinhos do plasmídeo pXAC64

A Figura 17 (Introdução) esquematiza o mapa gênico do *locus vir* e do *locus tra* adjacente no plasmídeo pXAC64. Este segmento do DNA é provavelmente responsável pela mobilização dos dois plasmídeos, pXAC33 e pXAC64 entre membros de colônias de *Xac* por meio de conjugação (ALEGRIA *et al.*, 2005). Como mencionado na Introdução, a maioria dos genes *vir* encontrados no pXAC64 possui similaridade aos genes *mpf* (“mating pair formation”) correspondentes do plasmídeo pWW0 de *P. putida*, o qual é requerido para conjugação e são ordenados da mesma maneira (Figura 17A). Neste processo, um complexo proteína-ácido nucléico é transferido de uma bactéria para outra através de uma estrutura codificada pelos produtos dos genes *mpf* que formam um canal secretório e uma ponte (*pilus*) entre as duas células (doadora e receptora).

Adjacente ao “cluster” *vir* do plasmídeo, existem quatro genes (XACb0024, XACb0025, XACb0030 e XACb0031), cujos produtos possuem similaridade aos genes *traD*, *A*, *B*, e *C* do plasmídeo pWW0 respectivamente. As proteínas TraA-D são necessárias para a clivagem e preparação do DNA simples fita durante o processo de conjugação. A Tabela 21 apresenta todos os resultados obtidos nas análises de duplo-

híbrido envolvendo o T4SS do plasmídeo pXAC64. A Figura 39A mostra as principais interações identificadas entre algumas das proteínas codificadas por estes genes.

a) Interações envolvendo os produtos do *locus vir*

O T4SS de *Agrobacterium tumefaciens*, é formado por 11 proteínas VirB, e pela proteína acopladora VirD4 (“Type Four Coupling Protein”; T4CP) (CASCALES *et al.*, 2005). Três ATPases (VirB4, VirB11 e VirD4) possivelmente provêm energia para a secreção dos componentes do complexo e do T-DNA, onde VirD4 é a proteína determinante no reconhecimento inicial do substrato (SCHRÖDER *et al.*, 2005). XACb0045 é um homólogo da VirB4 ATPase. VirB4 é um homodímero e está associada à membrana interna. Em *A. tumefaciens* interage com VirB1, VirB3, VirB4, VirB8, VirB10, VirB11 e VirD4 (SCHRÖDER e LANKA, 2005; WARD *et al.*, 2002). No entanto, quando testamos VirB4 como “isca” identificamos apenas interações com XACb0035, proteína hipotética localizada ao lado de VirB1. Utilizando XACb0037 (VirB11) como isca, observamos 1 interação com ela mesma, corroborando observações de que esta proteína forma hexâmeros na membrana interna. MALEK *et al.* (2004) e WARD *et al.* (2002) ainda descrevem interações de VirB11 com VirB1, VirB4, VirB8 e VirB10, o que não foi indentificado em nossos ensaios.

ALEGRIA *et al.* (2005) demonstraram que XACb0036 (VirB1) interage com a proteína periplasmática VirB9 (XACb0039). Quando utilizamos VirB1 como isca também identificamos interações com VirB9. A princípio, VirB1 possui duas localizações diferentes na maquinaria de secreção: primeiramente localiza-se na região periplasmática onde, após clivagem, é exportada para a superfície (CHRISTIE e VOGEL, 2000). WARD *et al.* (2002) mostraram, utilizando a técnica de duplo-híbrido, que VirB1 interagiu com VirB4, VirB8, VirB9, VirB10 e VirB11 em *A. tumefaciens*.

A análise do *locus vir* do plasmídeo revela que existem duas proteínas hipotéticas (XACb0042 e XACb0043) entre VirB6 e VirB5, que são candidatos a suprir o papel de VirB7, uma lipoproteína que possui alta variabilidade na sua sequência em diferentes T4SS e que não foi identificada em *Xac*. Entretanto, XACb0042 e XACb0043 exibem similaridade apenas com proteínas hipotéticas do plasmídeo pWW0 (ORFs 199 e 200, respectivamente). XACb0042 possui 142 aminoácidos. Quando utilizada como isca apresentou interações exclusivas com XACb0041 (VirB6). XACb0043 possui 83 aminoácidos. Quando utilizada como isca mostrou interações com XACb0021 em fase +2. Como anteriormente proposto por ALEGRIA *et al.* (2005), a análise desta região mostra

que ao invés do gene XACb0021 pode existir um novo gene, denominado de XACb0021b, cujo produto interage com XACb0043.

b) Interações envolvendo os produtos do locus *tra/trw*

Adjacente ao *locus vir* encontramos em *Xac* genes que codificam as proteínas (XACb0024 e XACb0025) juntamente com *trwB* (XACb0030) e *trwC* (XACb0031) cujos produtos possuem similaridade às proteínas TraD, TraA, TraB e TraC, respectivamente, do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida* (GEATED *et al.*, 2002; ALEGRIA *et al.*, 2005).

A análise de XACb0024 (149 aminoácidos), a qual possui similaridade à TraD do plasmídeo pWW0 e à TraK do plasmídeo Inc-P1 de *Pseudomonas aeruginosa*, com a biblioteca de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* mostrou 2 interações com fragmentos da proteína hipotética XACb0020 e com fragmentos de proteínas codificadas pelo cromossomo: XAC2621 (VirB8) e XAC2623 (Vir D4). A proteína XAC2623 apresenta 39% de identidade com TrwB do plasmídeo de *Xac*.

XACb0025 possui similaridade com TraA do plasmídeo pWW0 e com TrwA do plasmídeo R388 de *E. coli*. MONCALIAN *et al.* (1997) mostraram que TrwA é uma proteína tetramérica capaz de ligar-se especificamente à região *oriT* do plasmídeo R388. Nossos resultados confirmam, como demonstrado previamente por ALEGRIA *et al.* (2005), interações homotrópicas de XACb0025 o que condiz com a sua natureza tetramérica.

XACb0030 possui homologia às proteínas TraB, TrwB e VirD4, ATPases que juntamente com homólogos de VirB4 e VirB11 provêm energia para o mecanismo de secreção. O complexo TrwB é formado pela associação de seis monômeros equivalentes de forma que resulta em uma estrutura quaternária quase esférica (GOMIS-RUTH *et al.*, 2001). Quando XACb0030 foi testada com a biblioteca genômica de *Xac* (ALEGRIA, 2005), esta apresentou interações com muitas presas distintas incluindo falsos-positivos. Ensaio realizado com a biblioteca de alta-resolução não revelaram o crescimento de clones em meio seletivo.

XACb0031 possui 66% de similaridade com a proteína TraC do plasmídeo pWW0 e com TrwC do plasmídeo R388. TraC é uma enzima bifuncional capaz de clivar uma das fitas do DNA em um sítio específico (a região *oriT*). Além desta atividade TrwC atua como uma helicase e como uma relaxase (GOMIS-RUTH *et al.*, 2001). A utilização de XACb0031 como isca resultou em interações homotrópicas.

c) Interações envolvendo proteínas hipotéticas codificadas nas vizinhanças dos *loci vir* e *tra/trw*

i- XACb0018, XACb0019 e XACb0020

XACb0018 é uma proteína de 108 aminoácidos localizada proximalmente ao *locus tra/trw*. A utilização desta proteína como isca mostrou somente 1 interação homotrópica e 1 interação com XACb0019, sua vizinha. XACb0019 (209 aa) possui similaridade à proteína ParA. ParA juntamente com ParC (XACb0017) e RepA (XACb0016) estão envolvidas no processo de partição do plasmídeo. Quando XACb0019 foi utilizada como “isca” na triagem da biblioteca de presas dos T4SSs de *Xac* identificamos 2 interações derivadas de fragmentos da própria XACb0019 e 1 interação com um fragmento de XACb0018 (ParB). É importante salientar que esta biblioteca foi produzida a partir da sonicação de fragmentos de produtos de PCR derivado apenas de proteínas próximas ao T4SS a partir de XACb0018 (como descrito em materiais e métodos, item 3.5) e que fragmentos contendo produtos da amplificação gênica de XACb0017 (ParC) e XACb0016 (RepA) não foram incluídos na biblioteca.

XACb0020 é uma proteína hipotética de 151 aminoácidos localizada próxima ao *locus tra/trw*. Ensaios preliminares (ALEGRIA *et al.*, 2005) classificaram a fusão com o vetor pOBD como sendo auto-ativadora. Entretanto, quando este gene foi re-clonado, os ensaios de auto-ativação demonstraram que em 10 mM de 3-aminotriazol, esta proteína não se comportou como auto-ativadora. A utilização desta proteína como isca mostrou 1 interação homotrópica, 1 interação com XACb0024 (TraD do plasmídeo pWW0 de *P. putida*) e 1 interação com XAC2605, uma proteína hipotética localizada no *locus vir* do cromossomo.

ii- XACb0021b, XACb0022 e XACb0023

XACb0021b é uma proteína hipotética. ALEGRIA *et al.* (2005) identificaram interações envolvendo XACb0021 em fase +2 com o produto de XACb0043 (proteína hipotética). Esta região provavelmente codifica um polipeptídeo de um trecho não anotado a jusante do gene XACb0022 e que foi denominada de XACb0021b. Uma outra cópia do gene XACb0021b também pode ser encontrada no plasmídeo pXAC33 de *Xac*, onde deve ser nomeado de XACa0021b.

Os únicos homólogos a XACb0021b encontrado nos bancos de dados públicos são produtos da ORF176 (70% de similaridade) do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida*

(GREATED *et al.*, 2002) e uma proteína hipotética do plasmídeo pXcB de *X. citri* pv. *aurantifolli* (BRUNINGS *et al.*, 2001). A ORF176 de *P. putida* possui uma localização gênica (próximo ao *locus tra*) semelhante ao gene XACb0021b de *Xac*. Como verificado por ALEGRIA *et al.* (2005), a fusão XACb0021b com o domínio de ligação ao DNA do vetor pOBD comporta-se como auto-ativadora dos genes repórteres de PJ694a.

XACb0022 é uma proteína conservada hipotética de 166 aminoácidos. Possui homologia ao produto da ORF177 de plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida*. A utilização de XACb0022 como isca mostrou 6 interações com fragmentos de XAC2620 (VirB9) do cromossomo.

XACb0023 é uma proteína conservada hipotética de 112 aminoácidos. Está localizada em uma região com homologia ao plasmídeo pXAC33 e à região N-terminal do produto da ORF 177 do plasmídeo pWW0 de *P. putida*. Ensaios preliminares (ALEGRIA *et al.*, 2005) classificaram a fusão com o vetor pOAD como sendo auto-ativadora. Entretanto, quando este gene foi re-clonado, os ensaios de auto-ativação demonstraram que em 5 mM de 3-aminotriazol, esta proteína não se comportou como auto-ativadora. A análise de XACb0023 com a biblioteca de alta-resolução não mostrou, todavia, interações com fragmentos de proteínas em fase +1.

iii- XACb0026, XACb0027, XACb0028 e XACb0029

Estes 4 genes estão inseridos entre *traA* e *traB* (Figura 39A). As funções das proteínas codificadas por esses genes são, no entanto, desconhecidas. ALEGRIA (2004) em sua tese de doutorado reporta que não foi possível a realização dos ensaios de duplo-híbrido com essas proteínas por se tratarem de proteínas auto-ativadoras. No entanto, ao re-clonarmos XACb0026, XACb0027, XACb0028 e XACb0029, verificamos que XACb0026 não se comportou como auto-ativadora em 25 mM de 3-aminotriazol. Todavia, observamos interações de XACb0026, quando utilizado como isca, somente com fragmentos fora de fase e com o vetor pOAD vazio.

iv- XACb0032, XACb0033, XACb0034 e XACb0035

Entre *trwC* e *virB1* existem quatro genes cujos produtos são proteínas hipotéticas (XACb0032, XACb0033, XACb0034 e XACb0035). Como anteriormente demonstrado por ALEGRIA *et al.* (2005) XACb0032 mostrou interações com fragmentos de XACb0033. Quando XACb0033 foi utilizada como isca apresentou interações com fragmentos das proteínas cromossomais: XAC2614, XAC2623 e XAC2611, as quais possuem homologia à VirB4, VirD4 e a uma proteína hipotética, respectivamente.

XACb0033 também interagiu com XACb0040 (VirB8). A utilização de XACb0034 como isca resultou na interação desta com diversos fragmentos, todos fora de fase. Quando XACb0035 foi utilizada como isca, apresentou interações homotrópicas.

v- XACb0048 e XACb0049

A jusante do gene que codifica a proteína VirB2 existem dois genes que codificam proteínas hipotéticas: XACb0048 e XACb0049. XACb0049 é uma proteína hipotética de 125 aminoácidos. Quando utilizada como isca apresentou 2 interações com fragmentos da proteína VirB6 (XACb0041). Todavia, ensaios com XACb0048 não foram realizados.

4.5.2- Interações envolvendo o T4SS codificado pelo locus *virB* do cromossomo

A Tabela 22 representa todos os resultados obtidos nas análises de duplo-híbrido envolvendo o T4SS codificado pelo *locus virB* do cromossomo. A Figura 17 (Introdução) esquematiza o mapa gênico deste *locus*. Um esquema das principais interações identificadas entre proteínas desse sistema está mostrado na Figura 40B. A Figura 41 apresenta as interações identificadas entre proteínas do T4SS plasmidial e cromossomal.

i- VirB11, XAC2609 e XAC2610

A montante do “cluster” vir do T4SS do cromossomo existe uma sequência de proteína hipotéticas (XAC2605 a XAC2611) sem homologia a proteínas de outros T4SS. A análise de XAC2609 utilizada como isca na triagem da biblioteca de presas dos T4SSs identificou interações com fragmentos da proteína XAC2610. XAC2610 possui um possível sinal de localização nuclear (NLS) PKKK na porção C-terminal entre os resíduos 249-252 (NAKAI e KANEHISA, 1991).

Utilizando XAC2610 como isca foram encontradas 3 diferentes presas sendo que duas delas, apesar de serem identificadas apenas uma vez cada, merecem destaque: (i) interação com XAC2609, a qual confirma a interação observada quando XAC2609 foi utilizada como isca e (ii) interação com VirB11. Além disso, verificamos 7 interações de XAC2610 com XAC2620 (VirB9). Esta interação não foi verificada anteriormente nos estudos de ALEGRIA *et al.* (2005). Análises de “overlay” utilizando XAC2610 e VirB9 confirmaram a interação dessas duas proteínas observadas pelo duplo-híbrido (Diorge de Souza, aluno de doutorado, IQ-USP, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos indicam uma nova rede de interações que podem ser importantes no funcionamento desse T4SS. A proteína VirB11 (XAC2618), por ser um possível acoplador do T4SS, é uma das responsáveis pela secreção de componentes a serem secretados por este sistema. Quando utilizamos VirB11 como isca identificamos interações homotrópicas, confirmando as observações de ALEGRIA *et al.* (2005).

Ainda neste contexto, é importante salientar que, quando a proteína VirD4, outra ATPase do T4SS, foi utilizada como isca por ALEGRIA *et al.* (2005) contra a biblioteca genômica de *Xac*, foram identificadas 68 interações em fase +1. Dentre os fragmentos identificados nesse ensaio, 8 delas eram derivados do produto do gene XAC2609. Em nossas análises verificamos também que a totalidade das presas que interagiram com VirD4 são derivadas de fragmentos de XAC2609.

ii- XAC2616 (VirB2)

O *pilus* de secreção é formado por pequenas subunidades protéicas, chamadas de pilinas que se juntam para formar uma estrutura filamentosa na superfície celular. VirB2 é a principal proteína constituinte do *pilus* do T4SS e é um componente essencial do canal de secreção. Antes de ser secretada, proteínas precursoras do *pilus* (100-150 aa) passam por diversos passos de processamento que se inicia com a quebra de um peptídeo sinal na região N-terminal. Em *Agrobacterium tumefaciens* (VirB2) e no plasmídeo RP4 (TrbC) as proteínas precursoras do *pilus* passam por um processo de ciclização onde a região N e C-terminal dos precursores formam uma ligação peptídica resultando em proteínas cíclicas compostas de 74 a 78 aminoácidos, respectivamente (SAGULENKO *et al.*, 2001) (Figura 39). Experimentos de fracionamento celular mostraram que VirB2 localiza-se extracelularmente, mas também nas membranas interna e externa. A elongação do *pilus* é provavelmente dependente da presença das proteínas VirB5 e VirB7 e sua elongação parece ser controlada por VirB6 e VirB11 (SCHRÖDER *et al.*, 2005).

Figura 39: Processamento dos monômeros de pilina. O processamento de monômeros de pilina requer fatores presentes no cromossomo ou no plasmídeo (LepB, TraX, TraF). A polimerização do pilus requer a presença de proteínas do T4SS.

HWANG e GELVIN (2004) reportam análises de duplo-híbrido utilizando a porção C-terminal processada de VirB2 (48-121) como isca contra uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*. Em nossas análises, empregamos XAC2616 inteira (137 aminoácidos). Utilizando a biblioteca genômica de *Xac* observamos diversas interações inespecíficas com maior frequência com a proteína de partição ParA do plasmídeo pXAC33 (XACa0041), considerada um falso-positivo. Quando utilizamos a biblioteca de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir*, não houve transformantes positivos. O fato de não observarmos interações de VirB2 com VirB5 e VirB7 do T4SS provavelmente se deve a utilização da proteína inteira. Por esse motivo, infelizmente, não realizamos ensaios de VirB2 com a biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*.

iii-XAC2622

Em *Xac*, não foram identificados genes que codificam VirB7 no cromossomo ou nos plasmídeos. Entretanto, na posição correspondente a VirB7 do cromossomo é observado um gene que codifica uma proteína pequena (139 resíduos) e hipotética (XAC2622) cujo único homólogo é encontrado em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Quando XAC2622 foi utilizada como isca observamos 7 interações com VirB9, localizado entre VirB8 e VirB10 confirmando os resultados descritos por ALEGRIA *et al.* (2005). VirB9 é um dos principais componentes do poro de transporte do TFSS. A interação entre XAC2622 e VirB9 detectada sugere que XAC2622 pode estar desempenhando em *Xac* e *X. campestris*, o mesmo papel que VirB7 desempenha em sistemas TFSS de outras bactérias.

Tabela 21: Relação de proteínas próximas ou associadas ao *loci tra/vir* do plasmídeo pXAC64 usadas na triagem da biblioteca de *Xac* e de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* utilizando o sistema duplo-híbrido. Para fins didáticos, as presas do plasmídeo e cromossomo foram catalogadas em colunas distintas. Nas colunas 3 e 4 representamos entre parênteses a fase de leitura das presas identificadas e o número de interações.

Gene	Descrição	Presas do plasmídeo	Presas do cromossomo	Proteína foi “presa” de	Resultados ALEGRIA <i>et al.</i> , 2005
XACb0018	Proteína ParB	XACb0018 (+1) (1x) XACb0019 (+1) (1x) XACb0026 (-1) (2x) XACb0028 (-2, -3) (2x) XACb0037 (-1) (1x)	XAC2625 (-3) (2x) XAC2607 (-2) (1x) XAC2622 (-2, -3) (2x) XAC2610 (-3) (1x)	XACb0018	Não realizado
XACb0019	Proteína de partição ParA	XACb0019 (+1) (2x) XACb0035 (-2) (1x) XACb0041 (-3) (1x)	XAC2616 (+1) (2x) XAC2620 (-2) (1x) XAC2607 (-1, -3) (2x) XAC2608 (-1, -2) (2x)	XACb0018 XACb0019	Auto-ativador
XACb0020	Proteína Hipotética	XACb0020 (+1) (1x) XACb0024 (+1) (1x) XACb0018 (-1) (2x) XACb0029 (-3) (1x) XACb0043 (-2) (1x) XACb0028 (-3) (1x)	XAC2605 (+1) (2x) XAC2611 (-1, -3) (2x) XAC2619 (-2) (1x) XAC2621 (-1) (1x)	XACb0020 XACb0024 XACb0033	Não realizado
XACb0021b	Proteína Hipotética Utilizada na fase (+2)	Auto-ativador		XACb0043	Auto-ativador
XACb0022	Proteína conservada hipotética.	XACb0020 (-1) (1x) XACb0026 (-2, -3) (2x) XACb0028 (-1) (1x) XACb0035 (-2) (1x)	XAC2620 (+1) (6x) XAC2613 (+2) (1x) XAC2624 (-1) (1x) XAC2605 (-2) (1x)		Não realizado
XACb0023	Proteína conservada hipotética.	XACb0035 (-1) (2x) XACb0041 (-1, -3) (2x) XACb0020 (-1) (1x)	XAC2605 (+2) (1x) XAC2610 (-1) (1x) XAC2615 (-2) (1x) XAC2621 (+3) (1x) XAC2625 (+2) (1x)		Auto-ativador
XACb0024	TraD do plasmídeo pWW0	XACb0020 (+1) (2x) XACa0011 (+2) (2x) XACb0020 (-1) (1x)	XAC2611 (+1) (3x) XAC2623 (+1) (1x) XAC2619 (+2) (1x)	XACb0020	Não realizado

			XAC2614 (-1, -3) (2x) XAC2617 (-2) (3x)		
XACb0025	TraA do plasmídeo pWW0	XACb0025 (+1) (9x) XACb0023 (-1) (1x) XACb0040 (-1) (1x)		XACb0025	XACb0025 (+1) (9x)
XACb0026	Proteína hipotética	XACb0034 (-3) (4x) XACb0045 (+3) (1x) XACb0031 (-2) (1x)	Vetor pOAD vazio (3x) XAC2619 (-2) (1x)		Auto-ativador
XACb0027	Proteína hipotética	Auto-ativador			Auto-ativador
XACb0028	Proteína hipotética	Auto-ativador			Auto-ativador
XACb0029	Proteína hipotética	Auto-ativador			Auto-ativador
XACb0030	TrwB/TraB, ATPase	Não houveram transformantes positivos			Falsos positivos
XACb0031	TraC do plasmídeo pWW0 e com TrwC do plasmídeo R388 de <i>E. coli</i>	XACb0031 (+1) (1x) XACb0035 (+2) (1x) XACb0026 (-1) (1x)	XAC2620 (+2) (3x) XAC2622 (+2) (2x) XAC2624 (-3) (1x)	XACb0031	Não realizado
XACb0032	Proteína hipotética	XACb0033 (+1) (8x)			XACb0033 (+1) (10x)
XACb0033	Proteína hipotética	XACb0020 (+1) (1x) XACb0020(-1) (2x) XACb0040 (+1) (1x) XACb0040 (-2) (1x) XACb0035 (-3) (1x) XACb0045 (-3) (1x)	XAC2614 (+1) (2x) XAC2623 (+1) (3x) XAC2622 (+1) (1x) XAC2611 (+1) (3x) XAC2619 (+2) (2x) XAC2620 (-3) (3x) XAC2617 (-2) (1x) XAC2614 (-1, -2) (2x)	XACb0032	Auto-ativador
XACb0034	Proteína hipotética	XACb0030 (+2) (1x) XACb0037 (+3) (1x) XACb0041 (-2) (2x) XACb0044 (-3) (1x)	XAC2624 (+2) (1x) XAC2610 (-1) (1x) XAC2621 (-2) (1x)		XAC3601
XACb0035	Proteína hipotética	XACb0035 (+1) (9x) XACb0042 (-1) (1x)	XAC2618 (+3) (1x)	XACb0035 XACb0045	XACb0035 (+1) (27x)
XACb0036	VirB1 Transglicosilase lítica Proteína MfpJ do plasmídeo pWW0	XACb0039 (+1) (7x) XACb0026 (-1) (1x)			XACb0039 (+1) (6x)
XACb0037	VirB11 ATPase MpfI do plasmídeo pWW0	XACb0037 (+1) (1x) XACb0034 (+3) (1x) XACb0031 (+2, -3) (2x)	XAC2618 (+3) (1x) XAC2623 (+3) (1x) XAC2617 (-1) (2x)	XACb0037	TolC

		XACb0044 (+2) (1x)			
XACb0038	VirB10	Não realizado			Não realizado
XACb0039	VirB9	Não realizado		XACb0036 XAC2609	Não realizado
XACb0040	VirB8	Não realizado		XACb0033	Não realizado
XACb0041	VirB6	Não realizado		XACb0042 XACb0049 XAC2606	Não realizado
XACb0042	Proteína hipotética	XACb0041 (+1) (10x)			XACb0041 (+1) (13x)
XACb0043	Proteína hipotética	XACb0021 (+2) (7x)			XACb0021 (+2) (8x)
XACb0044	VirB5	Não realizado			Não realizado
XACb0045	VirB4 ATPase	XACb0035 (+1) (3x)			XAC1952
XACb0046	VirB3	Não realizado			Não realizado
XACb0047	VirB2	Não realizado			Não realizado
XACb0048	Proteína hipotética. Homologia a MobD de <i>Xanthomonas citri</i>	Não realizado			Não realizado
XACb0049	Proteína hipotética	XACa008 (+1) (1x) XACb0041 (+1) (2x)			XACa008 (1x)

Tabela 22: Relação de proteínas próximas ou associadas ao *loci vir* do T4SS codificado pelo cromossomo usadas na triagem da biblioteca de *Xac* e de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* utilizando o sistema duplo-híbrido. Para fins didáticos, as presas do plasmídeo e cromossomo foram catalogadas em colunas distintas. Nas colunas 3 e 4 representamos entre parênteses a fase de leitura das presas identificadas e o número de interações.

Gene	Descrição	Presas do plasmídeo	Presas do cromossomo	Proteína foi “presa de”	Resultados ALEGRIA <i>et al.</i> , 2005
XAC2605	Proteína hipotética conservada	Não realizado		XACb0020	TolC
XAC2606	Proteína hipotética conservada	XACb0041 (+1) (3x) XACb0020 (-2) (1x) XACb0023 (-2) (1x) XACb0035 (-3) (2x)	XAC2616 (-2) (1x) XAC2620 (-1) (1x)		TetA
XAC2607	Proteína hipotética conservada	Não realizado			
XAC2608	Proteína hipotética conservada	Não realizado			
XAC2609	Proteína hipotética conservada	XACb0039 (+1) (2x)	XAC2610 (+1) (5x) XAC2615 (-2) (1x)	XAC2610 XAC2623	
XAC2610	Proteína hipotética conservada	XACa0028 (+1) (1x)	XAC2620 (+1) (7x) XAC2609 (+1) (6x) XAC2618 (+1) (1x) XAC2614 (-2) (1x)	XAC2609	XAC2609 (9x)
XAC2611	Proteína hipotética conservada. Apresenta similaridade com XAC2606		XAC2833 (-2) (1x) XAC2614 (-2) (1x)	XACb0024 XACb0033	XAC3269
XAC2612	VirB6	Não realizado			
XAC2613	Proteína hipotética	Não realizado			Região do cromossomo sem anotação
XAC2614	VirB4	XACb0022 (+2) (1x)	XAC2617 (+2) (2x) XAC2621 (+3) (1x) XAC2620 (-1) (1x)	XACb0033	TolC
XAC2615	VirB3	Não realizado			
XAC2616	VirB2	Teste realizado com biblioteca de <i>XAC</i> . Resultados em fase (+1): XACa0041 (5x) proteína de partiçãoA (ParA)		XACb0019	

		pOAD (8x) Vetor vazio XAC4232 (2x) manitol desidrogenase XAC2078 (2x) ucinato desidrogenase XAC4259 (2x) lipocalina de membrana externa XAC2125 (1x) glicosil transferase, proteína relacionada XAC0666 (1x) proteína conservada hipotética XAC4154 (1x) regulador de transcrição XAC1354 (1x) <i>Xanthomonas</i> proteína conservada hipotética XAC0078 (1x) ATP-dependente RNA helicase XAC0029 (1x) celulase XAC0809 (1x) <i>Xanthomonas</i> proteína conservada hipotética XAC3169 (1x) receptor ferro-enterobactina XAC4355 (1x) proteína conservada hipotética XAC3266 (1x) proteína hipotética XAC3328 (1x) ATP sulfúrilase/adenilil sulfato cinase			
XAC2617	VirB1	Não realizado	Não realizado		Falsos positivos
XAC2618	VirB11		XAC2618 (+1) (11x) XAC2614 (-2) (2x)	XAC2610 XAC2618	XAC2618 (+1) (55x)
XAC2619	VirB10	Não realizado	Não realizado		
XAC2620	VirB9	Não realizado	Não realizado	XACb0022 XAC2610 XAC2621 XAC2622	
XAC2621	VirB8	Não realizado	XAC2620 (+1) (3x) XAC2620 (-3) (1x) XAC2617 (-3) (1x)		
XAC2622	Proteína hipotética conservada		XAC2620 (+1) (7x) XAC2614 (-3) (1x)	XACb0033	XAC2620 (6x)
XAC2623	VirD4		XAC2609 (+1) (7x) XAC2614 (-2) (2x) XAC2833 (-3) (1x)	XACb0024 XACb0033	XAC2609 (8x) VIPs
XAC2624	t-RNA	Não realizado	Não realizado		
XAC2625	excinuclease ABC subunit B	Não realizado	Não realizado		

Figura 40: (A) Mapa gênico dos *loci vir* e *tra/trw* localizados no plasmídeo pXAC64 de *XAC*. A Figura esquematiza as interações observadas entre os produtos dos genes localizados nessa região. (B) Mapa gênico do *locus vir* localizado no cromossomo de *XAC*. A Figura esquematiza as interações observadas entre os produtos dos genes localizados no mesmo *locus*.

A

B

Figura 41: (A) Mapa gênico dos *loci vir* e *tra/trw* localizados no plasmídeo pXAC64 e do *locus vir* localizado no cromossomo. A Figura esquematiza as interações observadas entre os produtos dos genes localizados entre os *loci*.

4.5.3- Nocaute de *XACb0045* do T4SS codificado pelo plasmídeo pXAC64

a) Produção do nocaute “polar”

A proteína XACb0045 possui homologia à ATPase VirB4. VirB4, juntamente com VirB11 e VirD4, provêem energia para a montagem do T4SS e transporte de substratos. O gene *XACb0045* (2634 pb, posição 39.870 a 42.500 no plasmídeo pXAC64) foi amplificado e clonado no vetor pOBD (resistência à ampicilina). Como descrito no item Materiais e Métodos, utilizamos o “kit transposon EZ::Tn5<Kan2>” (Epicentre) para a reação de inserção do transposão. Após as reações *in vitro* com a transposase, células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes foram transformadas e plaqueadas em meio 2YT com ampicilina e kanamicina. Isolamos diversos clones, dos quais foram extraímos os plasmídeos. Após seqüenciamento destes clones, selecionamos um deles onde o transposão encontrava-se inserido na posição 40.615, relativa ao plasmídeo pXAC64. Esta posição corresponde ao nucleotídeo 745 do gene e ao códon 249 (Figura 42).

Figura 42: Esquema representando o gene *XACb0045* (posição relativa no plasmídeo: 39870 a 42500). A seta indica que o gene está orientado inversamente ao sentido adotado 5' 3' a partir da origem de replicação. Os sítios de EcoRI estão representados segundo as posições relativas ao plasmídeo (caixas amarelas) e no gene. A bandeirinha verde representa o ponto de inserção do transposão.

Células eletrocompetentes de *Xac* foram transformadas com esta construção e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina e kanamicina para selecionar os recombinantes. As colônias que cresceram nesse meio foram repicadas em meio LB contendo 50 µg/mL de kanamicina para a seleção do segundo evento de recombinação.

Após o plaqueamento e crescimento dos clones, selecionamos 5 colônias das quais amplificamos o gene *XACb0045* para verificarmos se o transposão (1200 pb) havia sido inserido no gene. Deste modo, fragmentos de 3834 pares de bases indicariam a inserção do transposão no gene (Figura 43A). Verificamos, entretanto, que somente após 3 passagens pelo meio LB + kanamicina, conseguimos isolar colônias que apresentavam 3834 pb sem contaminação do gene selvagem (clones 2 e 7, Figura 43B).

Figura 43: (A) Amplificações do gene *XACb0045* dos transformantes de *Xac* após primeira passagem pelo meio LB+ kanamicina. Os poços 1 e 2 identificam os mutantes onde ocorreu o primeiro evento de recombinação. (B) Amplificações do gene *XACb0045* após 3 passagens de *XACb0045::TN5* pelo meio LB+ kanamicina que seleciona para o segundo evento de recombinação. Os clones 2 e 7 foram isolados para a análise de “southern blot”. WT: gene *XACb0045* amplificado de *Xac* selvagem.

Após a verificação do tamanho do fragmento por PCR, o DNA total dos clones 2 e 7 (Figura 43B) e de *Xac* selvagem foi extraído e digerido com a enzima *EcoRI*. Também digerimos DNA do vetor pOBD contendo *XACb0045* clonado. Os sítios de *EcoRI* no gene *XACb0045* estão representados na Figura 41. Deste modo, após a digestão com *EcoRI*, obtivemos um fragmento de 1725 pb correspondente ao gene *XACb0045* selvagem, o qual foi utilizado como sonda para a hibridação. A Figura 44 demonstra a análise realizada por “Southern blot”.

Figura 44: “Southern blot” das colônias 2 e 7 com o gene *XACb0045* nocauteado. (A) Gel de agarose após digestão do DNA total dos mutantes e de *Xac* selvagem. M: marcador de peso molecular. (B) O DNA digerido foi transferido para uma membrana de “nylon” e o fragmento de 1725 pb foi usado como sonda.

b) Ensaio de patogenicidade em *Citrus* spp

A capacidade do mutante *XACb0045::TN5* de induzir os sintomas do cancro cítrico foi avaliada através da inoculação das cepas selvagem e mutantes em folhas jovens de limão cravo e laranja pêra. Os resultados demonstraram que a patogenicidade dos mutantes não foi alterada. Após 6 dias da inoculação, as cepas selvagem e mutantes apresentaram fenótipos característicos de encharcamento, seguidos de hiperplasia e posterior necrose (Figura 45). Esses resultados demonstram que o T4SS do plasmídeo não está envolvido no processo de infecção, confirmando a hipótese de ALEGRIA *et al.* (2005). Esse resultado, em conjunto com a análise do mutante Δ VirD4 do T4SS do cromossomo, será discutido em maiores detalhes no item Discussão.

Figura 45: Inoculações de *Xacb0045::TN5* e *Xac* selvagem em folhas de laranja pêra e limão cravo (fotos após 6, 10 e 14 dias após a inoculação, respectivamente).

4.5.4- Nocaute de *VirD4* do *T4SS* do cromossomo

a) Produção do nocaute “não-polar”

O gene *XAC2623* (1674 pb) do cromossomo codifica uma proteína com homologia à proteína acopladora *VirD4* do *T4SS*. *VirD4* provavelmente contribui para energizar o aparato secretor juntamente com *VirB4* e *VirB11* (CHRISTIE *et al.*, 2005). *VirD4* e seus homólogos também participam no reconhecimento de substratos destinados à secreção pelo

T4SS e de complexos núcleo-protéicos transferidos durante o processo de conjugação (CHRISTIE *et al.*, 2005; SCHRÖDER *et al.*, 2005). Os “primers” utilizados para a amplificação do gene foram desenhados de maneira que flanqueassem uma região de aproximadamente 550 pb em cada lado do gene. Deste modo, o produto de PCR esperado corresponderia a 2770 pb (Figura 46A). Após amplificação, o gene foi clonado no vetor pUC19 nos sítios NdeI/HindIII. Como descrito em Materiais e Métodos, o vetor contendo o inserto foi digerido com SacI, que possui 3 sítios de restrição no gene *virD4*. Deste modo, 2 fragmentos foram liberados: 342 pb e 411 pb. Após a separação dos fragmentos em gel de agarose, purificamos a banda referente ao vetor pUC19 com extremidades coesivas, obtido pela digestão com SacI. Procedeu-se então à ligação das extremidades do vetor, criando-se assim uma deleção no gene *virD4*, de 753 pb (Figura 46B).

Figura 46: Esquema dos passos envolvidos na clonagem e deleção de um fragmento de *VirD4*. (A) Representação do fragmento clonado no vetor pUC19, mostrando as posições dos sítios *SacI*. (B) Após a digestão com *SacI*, o fragmento foi religado e clonado no vetor pNTPS138.

O vetor pUC19 contendo o fragmento do gene deletado, foi posteriormente digerido com *SpeI*/*HindIII*. O fragmento referente ao gene *virD4* deletado foi purificado e clonado no vetor pNTPS138 digerido nos mesmos sítios de restrição. O DNA contendo a deleção de parte do gene *virD4* foi sub-clonado no vetor pNTPS138 (JENAL e FUCHS, 1998), obtendo a construção pNTPS138-*virD4*_{Δ256–507}. O DNA desta construção foi usado para transformar células eletrocompetentes de *Xac*. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio LB contendo carbenicilina e kanamicina. As colônias positivas foram

propagadas isoladamente em meio líquido 2YT contendo carbenicilina para a obtenção da segunda etapa de recombinação. Aliquotas de 300 µL da cultura foram semeadas em dois meios: 2YT/carbenicilina + kanamicina (controle positivo) e 2YT/carbenicilina + sacarose 5%. Colônias que cresceram no meio com sacarose foram então repicadas em três placas: 2TY/carbenicilina + kanamicina, 2TY/carbenicilina + sacarose e 2TY/carbenicilina + kanamicina + sacarose. Somente as colônias que apresentaram crescimento em 2TY/carbenicilina +sacarose foram consideradas positivas (Figura 47).

Figura 47: seleção de clones após segundo evento de recombinação. (A) meio 2YT/carbenicilina + sacarose, (B) 2YT/carbenicilina + kanamicina, (C) 2YT/carbenicilina + kanamicina + sacarose.

A Figura 47 demonstra que mesmo após o segundo evento de recombinação, alguns clones (7 e 19) conseguiram crescer no meio 2YT/carbenicilina + kanamicina. Estes clones foram descartados e os clones Kan^S-Suc^R foram analisados por PCR de colônia usando os pares de oligonucleotídeos descritos no item 3.9.3.1 para amplificar uma região de aproximadamente 2050 pb e oligonucleotídeos para a amplificação do próprio gene (1674 pb) (Figura 48).

Figura 48: Gel de agarose mostrando fragmentos de: A) (1) gene *virD4* (1674 pb), (2) gene *virD4* flanqueado por 550 pb de cada lado (2800 pb), (3-5) amplificação do gene *hpaB* (471 pb, controle +), (6) mutante *virD4*_{Δ256-507}. (7-13) colônias de 2YT/carbenicilina + sacarose não mutantes. B) Propagação do mutante do poço 6 de *virD4*_{Δ256-507}. PCR realizado com “primers” flanqueando o gene por 550 pb de cada lado (poços 1-4) *Xac* selvagem (2770 pb), (poços 5-13) clones derivados do clone 6 (2770-753= 2017 pb).

b) Ensaio de patogenicidade em *Citrus spp*

A capacidade do mutante *virD4*_{Δ256-507} de induzir os sintomas do cancro cítrico foi avaliada através da inoculação das cepas selvagem e mutantes em folhas jovens de limão cravo e laranja. Três experimentos foram realizados: (i) no primeiro experimento 5 mutantes foram inoculados em folhas de laranja, onde os sintomas foram acompanhados por 10 dias. Entretanto, a cepa 306 de *Xac* selvagem não foi inoculada e, portanto não pudemos comparar o os fenótipos dos mutantes com o fenótipo que seria observado com a cepa selvagem (Figura 49, experimento 1); (ii) no segundo experimento os mesmos 5 mutantes e *Xac* selvagem foram inoculados em folhas de laranja e os sintomas acompanhados por 8 dias (Figura 49, experimento 2) e (iii) no terceiro experimento os mesmos 5 mutantes e *Xac* selvagem foram inoculados cada um em folhas independentes de limão cravo e os sintomas acompanhados por 8 dias.

Os resultados demonstram que em limão cravo, o mutante 4 não foi patogênico em nenhum dos experimentos realizados. O mutante 5 não apresentou patogenicidade em limão cravo, mas em laranja comportou-se como patogênico no experimento 2. Contudo,

os mutantes 3, 4 e 5 apresentaram patogenicidade em limão cravo e laranja em todos os experimentos realizados (Figura 49).

Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3

Figura 49: Inoculações de *virD4* _{Δ 256-507} e *Xac* selvagem em folhas de laranja pêra e limão cravo. Experimento 1: inoculação dos mutantes em folhas de laranja pêra (fotos após 1, 5 e 10 dias após a inoculação). Experimento 2: inoculação dos mutantes e *Xac* (WT) em folhas de laranja pêra (fotos após 3, 5 e 8 dias após a inoculação). Experimento 3: inoculação dos mutantes e *Xac* (WT) em folhas de limão cravo (fotos 8 dias após a inoculação).

4.6 Ensaios de duplo-híbrido utilizando a biblioteca de presas derivadas de cDNA de *Citrus sinensis* infectada com *Xac*

4.6.1 Interações envolvendo as proteínas *PthA2* e *PthA4*

Com o objetivo de identificar proteínas de *Citrus* que interagem com a proteína PthA, nosso laboratório iniciou um projeto em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas. Para tanto, foi construída uma biblioteca de cDNA em vetor pOAD com um “pool” de mRNAs extraídos de folha de laranja não infiltrada e infiltrada com *Xac* (vide Materiais e Métodos item 3.6).

Os genes *pthAs* de *Xac* possuem 97% de homologia com os genes de avirulência *avrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (BONAS *et al.*, 1989). Uma característica importante desta família de genes é a presença de 17 repetições em tandem praticamente idênticas, cada uma com 102 pares de bases (codificando 34 aa), na região central dos genes, as quais, definem precisamente os limites de homologia entre os componentes do grupo. Além deste domínio central, PthA contém uma região N-terminal e um domínio C-terminal ácido (AAD), característico de fatores de transcrição (SWARUP *et al.*, 1991).

Há quatro isoformas de PthA em *Xac*, as quais variam essencialmente no número de repetições do domínio central: PthA1 contém 1127 aminoácidos e 15,5 repetições, PthA2 e PthA3 contêm 1097 aminoácidos e 14,5 repetições e PthA4 contém 1164 aminoácidos e 16,5 repetições. Para os ensaios de duplo-híbrido PthA2 e PthA4 foram clonados no sítio NotI do vetor pOBD2 de maneira a remover a porção N-terminal (1-128) de PthA2 e PthA4, mas mantendo-se a fase de leitura. Assim, obtivemos os clones PthA2_{Δ1-128} e PthA4_{Δ1-128}. Além disso, a porção C-terminal (795 pb) de *pthA2*, também foi clonada no vetor pOBD2 (PthA2₇₉₆₋₁₀₉₇). Contudo, ensaios de auto-ativação demonstraram que o vetor pOBD2 contendo a construção do C-terminal, auto-ativou em concentrações de até 80 mM de 3-aminotriazol, o que nos fez descartá-la dos ensaios de duplo-híbrido.

PthA2_{Δ1-128} e PthA4_{Δ1-128} foram utilizadas como iscas contra as bibliotecas de presas derivadas de *Xac* e de cDNAs de *Citrus sinensis*. A Tabela 23, indica as presas encontradas nos testes realizados com a biblioteca genômica de *Xac* e a Tabela 24 indica as presas encontradas nos testes realizados com a biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*.

Tabela 23: Presas de PthA2_{Δ1-128} e PthA4_{Δ1-128} identificadas com a biblioteca genômica de presas derivadas de DNA de *Xac*. As presas em *itálico* e sublinhadas correspondem a falsos-positivos conhecidos.

Presas de PthA2 _{Δ1-128}	Frequência	Fase de Leitura	Descrição
XACb0065	4	+1	PthA4
XACa0039	3	+1	PthA2
XACa0022	1	+1	PthA1
<u>XAC1820</u>	<u>2</u>	<u>+1</u>	<u>Proteína bifuncional aspartoquinase/homoserina desidrogenase 1 (metL)</u>
Presas de PthA2 _{Δ1-128}	Frequência	Fase de Leitura	Descrição
XACa0039	5	+1	PthA2
XACa0022	3	+1	PthA1
<u>XAC0291</u>	<u>1</u>	<u>+1</u>	<u>Proteína Oar</u>
<u>XAC0669</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	<u>“Tail-specific” protease</u>
<u>XAC2193</u>	<u>5</u>	<u>+1</u>	<u>Receptor TonB</u>
<u>XAC2906</u>	<u>1</u>	<u>+1</u>	<u>octaprenil-difosfato sintase</u>
<u>XAC2450</u>	<u>2</u>	<u>+1</u>	<u>DNA helicase dependente deATP</u>
<u>XAC2185</u>	<u>1</u>	<u>+1</u>	<u>“ferrichrome-iron receptor”</u>

Tabela 24: Presas de PthA2_{Δ1-128} e PthA4_{Δ1-128} identificadas com a biblioteca de presas derivadas de cDNA de *Citrus sinsensis* (as fases de leitura foram identificadas pelo Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti). As presas em *itálico* e sublinhadas correspondem a falsos-positivos conhecidos.

Presas PthA2 _{Δ1-128}	Frequência	Fase de leitura	Organismo
“Hsp70 interacting protein”	1	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<u>Vetor pOAD</u>	<u>2</u>		
Presas PthA4 _{Δ1-128}	Frequência		Organismo
Proteína de conjugação à ubiquitina	1	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Ciclofilina	1	+1	<i>Ricinus communis</i>
Alfa-importina	1	+1	<i>Capsicum anuum</i>
Dihidropicolinato redutase	1	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Proteína do fotossistema II	1	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Proteína rica em glicina	1	Indefinido	<i>Citrus unshiu</i>
<u>1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	<u>Elais guineensis</u>
<u>Fator de resposta a auxina</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	<u>Mangifera indica</u>
<u>Aquaporina PIP-1 (“plasma membrane intrinsic protein”)</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	<u>Vitis berlandieri (2 “stops” antes da met)</u>
<u>Cisteína protease</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	
<u>“high mobility group”</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	
<u>Prm3</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	
<u>Glicosil transferase</u>	<u>1</u>	<u>+2</u>	
<u>Proteína de superfície</u>	<u>1</u>	<u>+3</u>	
<u>Vetor pOAD</u>	<u>24</u>		

4.6.2 Interações envolvendo a proteína HpaA

HpaA de *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria* é, possivelmente, uma proteína efetora, pois contém dois sinais funcionais de localização nuclear eucariótico (Nuclear Localization Site, NLS) que são importantes para a patogenicidade (HUGUET *et al.*, 1998). HpaA de *Xac* interage com HpaB, uma possível chaperona do T3SS (ALEGRIA *et al.*, 2004) sendo provavelmente transportada por esse sistema para a célula da planta. Através de ensaios de duplo-híbrido usando HpaA como isca contra a biblioteca de *Citrus sinensis*, identificamos 5 proteínas que interagiram com HpaA (Tabela 25).

Tabela 25: Presas de HpaA identificadas em ensaios de duplo-híbrido com a biblioteca de *Citrus sinensis*

Presas HpaA	Frequência	Fase de leitura	Organismo	Número de acesso no Gene bank
E3 ubiquitina proteína-ligase, domínio RING C3HC4	12	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 42568081 ref NP_197938.2
hipotética	2	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 21537192 gb AAM61533.1
hipotética	4	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 18404322 ref NP_565858.1
“electron transporter/heat shock protein binding / unfolded protein”	3	+1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 18406052 ref NP_565982.1
Proteína conservada hipotética	1	+1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	gi 71415835 ref XP_809970.1

A maioria das interações identificadas quando utilizamos HpaA como isca era derivada de uma única proteína de *Citrus*, a qual possui homologia à proteína E3 ubiquitina ligase com domínio RING C3HC4 (Tabela 25). O domínio RING (“Really Interesting New Gene”) é caracterizado pela presença de um conjunto de cisteínas que coordenam 2 átomos de zinco (STONE *et al.*, 2005). O domínio mínimo desta proteína observado nas interações com HpaA foi a partir do resíduo 103, conforme mostrado em negrito na sequência da proteína de *Arabidopsis thaliana* (Figura 50).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

cDNAcitrus      -----
gi_42568081      MGDVYFNHFAQQQLQMSDQEKGEMSRHSHPHS INEESSESTLERVA AESLTNKVLD RGLME 60

cDNAcitrus      -----RHCHNEAMNNINVDQKLRHDIPRHEVNQVICS LCGTE 37
gi_42568081      YGCPHYRRCCIRAPCCNEIFGCHHCHYEAKNNINVDQKQRHDI PRHQVEQVICLLCGTE 120
                  :*** ** ***** *****:****
cDNAcitrus      QKVQQVCVNCVCMGEYFCESCKLFDDDT SXKQYHCDGCGICRIGGCDNFFHCNKRC CCY 97
gi_42568081      QEVGQICIHCGVCMGKYFCKVKCLYDDDT SKKQYHCDGCGICRIGGRENFHFCYKCGCCY 180
                  *: * *:*****:***: ***:***** *****:***** ** **
cDNAcitrus      SMLLKNSHPCVEGAMHHDCPV.CCEYLFETRQDVIVLPCGHTXHKNC LKEMREHHQYACPI 157

```



```

gi_42568081      SILLKNGHPCVEGAMHHDCPICFEFLFESRNDVTVLPCGHTIHQKCLEEMRDHYQYACPL 240
                  *:****.*****:* *:***:*:* ***** *:***:***:*****:
cDNAcitrus       CSKSVXDMSXVWKKYDXXXAXYSAXXLPK-XGLDXLQ--XGXXPXXPXXWXXXKXPKXX 214
gi_42568081      CSKSVCDMSKVWEKFDMEIAATPMPEPYQN-RMVQILCNDGKKAQVQYHVVAQKCPNCK 299
                  ***** ** ** *: * . . : : * * . * *:
cDNAcitrus       XXKTXXXXG-XRXKXLXXXXGRXXXXFXWEXXXX-LX 249
gi_42568081      SYNTRQTRG----- 308
                  : * *

```

Figura 50: Alinhamento da maior presa de HpaA (cDNA de *Citrus*) com a proteína gi_42568081 (E3 ubiquitina ligase com domínio “RING C3HC4”) de *A. thaliana*. Em negrito, identificamos o domínio mínimo observado em todas as interações. (*) aminoácidos idênticos, (:) aminoácidos conservados e (.) menos conservados.

Além das interações identificadas com a proteína E3 ubiquitina-ligase, verificamos interações com outras presas derivadas de fragmentos de proteínas hipotéticas de *Citrus* com similaridade a proteínas de *Arabidopsis Thaliana*. No entanto, nenhuma das proteínas possui domínios identificáveis no banco de dados de domínios protéicos Pfam.

Uma vez que existem evidências de que a proteína HpaA é dirigida para o núcleo da célula hospedeira (HUGUET *et al.*, 1998), tentamos investigar se algumas das proteínas hipotéticas, com as quais HpaA interagiu, poderiam conter algum domínio característico de um fator de transcrição. NARLIKAR e HARTEMINK (2005) classificam os fatores de transcrição em 6 classes, de acordo com suas estruturas tridimensionais e das seqüências de DNA que por estes são reconhecidas: proteínas com domínios dedos de zinco “Cys₂His₂”, proteínas com domínios dedos de zinco “Cys₄”, proteínas com domínios hélice-volta-hélice (HTH), proteínas com domínios de zíperes de leucina (LZ), “fork-heads”, e homeodomínios (estas duas últimas incluídas na superclasse HTH). As proteínas com domínio de zíperes de leucina se caracterizam por possuírem um resíduo de leucina a cada 7 posições ao longo da α -hélice (NARLIKAR e HARTEMINK, 2005).

Uma das presas de *Citrus*, com homologia à proteína hipotética (gi|71415835|ref|XP_809970.1|), com a qual HpaA interagiu, foi analisada pelo programa Radar (“Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in protein”, (<http://www.ebi.ac.uk/Radar/>) para procurar regiões repetitivas que pudessem sugerir sua atuação como fator de transcrição. A Figura 51 indica as repetições encontradas, que são indicativas de hepta repetições (*abcdefg*) onde as posições a e d são, na maioria das vezes ocupadas por leucinas ou resíduos hidrofóbicos. Este tipo de repetição está relacionado com interações laterais hidrofóbicas entre α -hélices anfipáticas em proteínas “coiled-coil” e oligomerização. No entanto, esta característica não é suficiente para afirmar que esta proteína é um fator de transcrição.

A
 >cDNA de *Citrus*
 LAAKLDDAVQKSRHDQ**QEK**KDLVAKLDDAVETLRLYQ**QEK**DDLAAKLNDTIETLRQC**QRE**
KKDLAVKLDDNVETLRLHYQRLVQDYHFNDRRKWEKEKQNLSELDAFSSSPLQYAANPSS
 DXYNPSGSNAAAVQNVSAANAANYQSDVDGAYTSPXXSQXVLLQLMPNIQVTGRESWXL
 LXESLXLXQG*

B

1-	13	LAAKLDDAVQKSRHDQ
17-	34	QEKKDLVAKLDDAVETLRLYQ
38-	55	QEKDDLAAKLNDTIETLRQCQ
59-	76	REKKDLAVKLDDNVETLRHYQ
		<u>fgabcde</u> fgabcde <u>fgabcde</u>

Figura 50: Repetições encontradas na proteína hipotética de *Citrus* com similaridade à [gi|71415835|refXP_809970.1](http://www.ebi.ac.uk/Radar/) analisada pelo programa Radar (<http://www.ebi.ac.uk/Radar/>). (A) tradução do cDNA de *Citrus* e as repetições encontradas. (B) Alinhamento das repetições e indicação das repetições heptapeptídicas (*abcde*fg). As posições a e d indicam a presença de resíduos hidrofóbicos (em vermelho).

4.6.3 Interações envolvendo as proteínas XAC2609 e XAC2610 do T4SS do cromossomo

Como mencionado anteriormente no item 4.5.2, XAC2609 e XAC2610 são proteínas hipotéticas do T4SS do cromossomo. XAC2609 interagiu com XAC2610 e com a proteína acopladora VirD4. XAC2610 interagiu com XAC2609 com a proteína VirB11 e com VirB9, o principal componente do canal periplasmático. Além disso, XAC2610 possui um sinal de localização nuclear. Os resultados obtidos (vide também ALEGRIA *et al.*, 2005) levantam a possibilidade de que tanto XAC2609 quanto XAC2610 possam ser secretadas pelo T4SS embora não haja evidência experimental que confirme esta hipótese. Neste caso, utilizamos essas proteínas como iscas contra a biblioteca de cDNA de *Citrus sinensis*. As interações identificadas estão relacionadas na Tabela 26.

Tabela 26: Presas de XAC2609 e XAC2610 identificadas em ensaios de duplo-híbrido com a biblioteca de *Citrus sinensis*.

Presas 2609	Frequência	Fase de leitura	Códon inicial com o qual obteve interação	Organismo	Número de acesso no Gene bank
ubiquitina	4	+1	156	<i>Oryza sativa</i>	gi 31433330 gb AAP54859.1
ubiquitina	1	+1	159	<i>Oryza sativa</i>	gi 50919629 ref XP_470175.1
ubiquitina	2	+1	149	<i>Medicago trunculata</i>	gi 92867325 gb ABE77657.1
ubiquitina	1	+1	11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 14334546 gb AAK59681.1
ubiquitina	1	+1	29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 18398343 ref NP_565407.1
hipotética	1	+1		<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 30694012 ref NP_199037.2
Presas 2610	Frequência	Fase de leitura		Organismo	Número de acesso no Gene bank
ubiquitina	15	+1	156	<i>Oryza sativa</i>	gi 31433330 gb AAP54859.1
ubiquitina	4	+1	11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 14334546 gb AAK59681.1
hipotética	1	+1		<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 30694012 ref NP_1990037.2
hipotética	1	+1		<i>Ipomea trifida</i>	Gi 45935140 gb AAS79598.1

Observamos interações com proteínas de *Citrus* as quais possuem similaridade a diversas ubiquitinas de diferentes organismos sendo a mais freqüente a ubiquitina de *O. sativa* (gi_31433330 gb_AAP54859.1) a partir do resíduo 156. A via de ubiquitinação/proteossoma é um dos sistemas de degradação de proteínas mais utilizados em eucariotos e desta forma, a ubiquitina é uma das proteínas mais conservadas entre os organismos. A ubiquitina é codificada por dois tipos de genes (IGLESIAS *et al.*, 1999). Os genes poliubiquitinas (em inglês, “polyubiquitin genes”) e os genes de extensão da ubiquitina (“ubiquitin extension genes”). Os genes poliubiquitinas caracterizam-se pela presença de repetições em tandem que variam em número em diferentes genes e em diferentes organismos. O processamento pós-tradução dessas poliubiquitinas resulta em unidades monoméricas da proteína. Isso explicaria porque identificamos diferentes ubiquitinas nas interações com XAC2609 e XAC2610. Em plantas, a ubiquitinação de proteínas é responsável por múltiplos processos celulares como a fotomorfogênese, regulação da sinalização hormonal e defesa contra patógenos (ZENG *et al.*, 2004).

5- Discussão

Nesta discussão serão analisados nossos os resultados obtidos, no contexto do que é conhecido sobre Sistemas de Dois-componentes, Sistema de Secreção Tipo IV e das proteínas PthA e HpaA secretadas pelo Sistema de Secreção Tipo III de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e sistemas homólogos.

5.1. Os Sistemas de Dois-componentes de Xac

5.1.1- Análise genômica dos Sistemas de Dois-Componentes em Xac

O monitoramento de parâmetros ambientais e intracelulares em bactérias depende de vias de sinalização celular que envolvem inúmeras proteínas. Sistemas que utilizam a fosforilação de proteínas em resíduos de histidina e aspartato, conhecidos como sistema de dois-componentes são necessários para a maioria dos procariotos para sentir e responder a essas variações ambientais. Indubitavelmente esses sistemas são os mais utilizados na transmissão de sinais celulares e regulam uma série de respostas onde se incluem a osmorregulação, quimiotaxia, esporulação, produção de antibióticos e patogenicidade (FALKE *et al.*, 1997; STOCK *et al.*, 2000; WEST e STOCK, 2001; BEIER e GROSS, 2006).

Os sistemas de dois-componentes são geralmente constituídos de duas proteínas: uma histidina quinase (HK) e um regulador de resposta cognato (RR). Estes domínios podem se encontrar no mesmo polipeptídeo ou em polipeptídeos diferentes. Uma HK típica é uma proteína receptora de membrana com um domínio sensor N-terminal extracelular e um domínio C-terminal citossólico. Este último é formado pelos domínios de dimerização (HisKA) e de ligação ao ATP (HATPase), necessários para a autofosforilação no resíduo de histidina e transferência do grupo fosfato para o resíduo de aspartato na proteína reguladora de resposta (RR). Uma versão mais complexa desse sistema envolve passos adicionais de fosfotransferência entre mais de duas proteínas. A maioria das proteínas envolvidas nessa fosforilação múltipla são proteínas híbridas que reúnem as funções de histidina quinase e regulador de resposta na mesma proteína. O grupo fosfato pode também ser transferido de um domínio RR de uma proteína híbrida para um outro domínio, denominado de domínio de fosfotransferência (Hpt) que por sua vez o transfere para um outro domínio RR (WEST e STOCK 2001). Esses sistemas expandidos (em

inglês, chamados de “multiple-steps phosphorelays”) proporcionam um número maior de passos para regulação dessas proteínas (ZHANG *et al.*, 2006).

A análise dos domínios protéicos das HKs de *Xac* indicou que eles se encontram em combinações com diferentes domínios sensores, entre eles os domínios PAS e GAF. As Figuras 51 e 52 e as Tabelas 27 e 28 apresentam as topologias das proteínas de *Xac* que contêm um domínio HK. As proteínas apresentadas na figura 51 não possuem domínios RR. As proteínas listadas na figura 52 são chamadas híbridas devido à presença de um domínio RR na mesma cadeia polipeptídica.

Figura 51: Representação esquemática da organização dos domínios encontrados nos vários grupos de histidina quinases de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (vide texto e Tabela 27 para definições dos domínios)

Figura 52: Representação esquemática da organização dos domínios encontrados em histidinas quinases híbridas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (vide texto e Tabela 28 para definições dos domínios)

O domínio PAS, que atua como sensor de fatores ambientais, como oxigênio, luz ou potencial redox (TAYLOR e ZHULIN, 1999), é o mais abundante domínio sensor neste grupo de proteínas, tendo sido encontrado em 8 proteínas quinases típicas e em 9 HKs híbridas (Tabelas 27 e 28). Domínios PAS estão envolvidos na ligação a cofatores como heme e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), necessários à sua função como sensores. A transdução de sinal para a região C-terminal (intracelular) da proteína parece ocorrer através de uma alteração conformacional induzida por oxigênio ou luz, por exemplo. O domínio GAF, envolvido na ligação a nucleotídeos cíclicos como cAMP e cGMP, que constituem segundos mensageiros importantes em transdução de sinal, bem como em fitocromos (ARAVIND e PONTING, 1997; HO *et al.*, 2000), foi encontrado em 4 histidina quinases, híbridas ou não.

Também encontramos histidina quinases contendo o domínio de dimerização HAMP, normalmente localizado entre um domínio intermembrânico e o domínio sinalizador citossólico de receptores de membrana (WILLIAMS e STEWART, 1999), em 10 HKs típicas e em 1 proteína híbrida. O mecanismo de transdução de sinal através deste

domínio ainda não é bem compreendido, mas acredita-se que uma mudança conformacional transmitida através da membrana para o domínio sinalizador esteja envolvida neste processo. O domínio HAMP é importante no processo de sinalização de histidina quinases, adenilato ciclases, proteínas de quimiotaxia aceptoras de grupos metil (MCPs) e proteínas fosfatases (BORDIGNON *et al.*, 2005).

O domínio CHASE (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular) foi encontrado em apenas 3 histidina quinases de *Xac*, híbridas ou não. Este domínio é constituído de 200-230 aminoácidos e está presente na porção extracelular (N-terminal) de receptores com atividade enzimática, como serina/treonina quinases e adenilato ciclases. Acredita-se que esteja envolvido na ligação a uma grande diversidade de ligantes de baixo peso molecular como derivados de adenina ou peptídeos, o que resulta em ativação dos respectivos receptores (MOUGEL e ZHULIN, 2001; ANANTHARAMAN e ARAVIND, 2001).

O domínio Hpt (“histidine phosphotransfer domain”), que atua como intermediário na transferência de grupos fosfato entre módulos de histidina quinases e seus respectivos reguladores de resposta (WEST e STOCK, 2001), foi encontrado na proteína de quimiotaxia CheW e em 5 HKs híbridas. Outros domínios, menos comuns em sistemas de dois-componentes, também foram encontrados. Quatro histidina quinases, híbridas ou não, apresentam o domínio “beta-propeller” (Reg_Prop). Este domínio pode estar presente em proteínas de sistemas de dois-componentes em outras bactérias e é caracterizado por 14 repetições em tandem na região N-terminal. Os “beta-propellers” se enovelam na forma de 4 cadeias de folha beta com disposição circular. Membros deste grupo são numerosos e, embora os blocos modulares sejam preservados em uma mesma conformação, não possuem similaridade nas seqüências primárias de aminoácidos. Essas proteínas têm funções extremamente diversas e são filogeneticamente distintas (PAOLI, 2001). Encontramos também associado a uma histidina quinase um domínio 2CSK_N cuja função é desconhecida (PFAM: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>, 2006). Finalmente, o domínio KdpD foi encontrado em uma histidina quinase. Este domínio regula a atividade do regulador de resposta cognato KdpE em *Escherichia coli*, envolvido na regulação da concentração de potássio intracelular (ROTHENBUCHER *et al.*, 2006). A exemplo da proteína KdpD de *Escherichia coli*, a proteína de *Xac* contendo este domínio apresenta também um domínio USP (“universal stress protein”). Este domínio foi inicialmente descrito na proteína UspA de *Escherichia coli*, ativada transcricionalmente em resposta a uma grande diversidade de condições de estresse (KVINT *et al.*, 2003; SIEGELE, 2005). Assim, proteínas desta classe estão associadas à resistência a estresse, mas sua função em

outras atividades celulares como adesão celular, mobilidade e controle dos níveis intracelulares de ferro também foi recentemente descrita em *Escherichia coli* (NACHIN *et al.*, 2005).

Tabela 27: Domínios associados as histidina quinases de *Xac*. Os domínios foram analisados através da busca no banco de dados do Pfam. (TM): domínio transmembrana; (HK): nesta tabela, refere-se ao domínio de dimerização HisKA; (HATPase): domínio de ligação ao ATP; (PAS): domínio sensor de luz e oxigênio; (CHASE) domínio sensor de ligantes de baixo peso molecular; (Hamp): domínio intermembrânico; (CheW): envolvido em quimiotexia; (Hpt): domínio de fosfotransferência; (KDPD): sensor da concentração de potássio; (USP): sensor de estresse.

Genes	Descrição	Genes	Descrição
XAC0135	TM-HK-HATPase	XAC1994	PAS-PAS-PAS-HK-HATPase
XAC0207	PAS-PAS-PAS-HK-HATPase	XAC2142	TM-HK-HATPase
XAC0225	TM-Hamp-HK-HATPase	XAC2149	TM-HK-HATPase
XAC0326	Hamp-HK-HATPase	XAC2167	TM-Reg_Prop-YYY-HK-HATPase
XAC0620	TM-HK-HATPase	XAC2670	TM-HK-HATPase
XAC0683	TM-CHASE3-PAS-HK-HATPase	XAC2804	TM-Hamp-HK-HATPase
XAC0729	Hamp-HK-HATPase	XAC2854	TM-Hamp-HK-HATPase
XAC0759	KDPD-USP-TM-HK-HATPase	XAC3237	TM-PAS-HK-HATPase
XAC0835	TM-HK-HATPase	XAC3249	Hamp-HK-HATPase
XAC1041	TM-PAS-HK-HATPase	XAC3273	PAS-HK-HATPase
XAC1074	HK-HATPase	XAC3292	PAS-HK-HATPase
XAC1222	TM-Hamp-HK-HATPase	XAC3335	GAF-HK-HATPase
XAC1228	TM-HK-HATPase	XAC3482	2CSK_N-Hamp-HK-HATPase
XAC1273	HK-HATPase	XAC3720	HK-HATPase
XAC1282	PAS-HK-HATPase	XAC3975	TM-Hamp-HK-HATPase
XAC1798	TM-HK-HATPase	XAC3994	TM-TM-HK-HATPase
XAC1903	Hpt-HK-HATPase-CheW	XAC4022	Hamp-HK-HATPase
XAC1930	Hpt-HK-HATPase-CheW	XAC4283	GAF-HK-HATPase
XAC1991	HK-HATPase		
Total: 37			

Tabela 28: Domínios associados as histidina quinases híbridas de *Xac*. Os domínios foram analisados através da busca no banco de dados do Pfam. (TM): domínio transmembrana; (HK): nesta tabela, refere-se ao domínio de dimerização HisKA; (HATPase): domínio de ligação ao ATP; (PAS): domínio sensor de luz e oxigênio; (CHASE) domínio sensor de ligantes de baixo peso molecular; (Hamp): domínio intermembrânico; (CheW): envolvido em quimiotaxia; (Hpt): domínio de fosfotransferência; (GAF): domínio sensor de ligação a cGMP; cAMP e fotopigmento; (Reg prop e YYY) domínios associados aos “beta-propellers”; (RR): domínio regulador de resposta; (sigma54act): domínio efetor da família NtrC.

Genes	Descrição
<i>XAC0494</i>	TM-HK-HATPase-RR-Hpt
<i>XAC0685</i>	RR-HK-HATPase-RR
<i>XAC0897</i>	CHASE3-Hamp-HK-HATPase-RR
<i>XAC1274</i>	RR-PAS-HK-HATPase-RR
<i>XAC1279</i>	RR-HK-HATPase
<i>XAC1283</i>	TM-GAF-HK-HATPase-RR-RR-RR
<i>XAC1669</i>	PAS-PAS-HK-HATPase-RR
<i>XAC1672</i>	PAS-PAS-HK-HATPase-RR
<i>XAC1878</i>	TM-HK-HATPase-RR-Hpt
<i>XAC2054</i>	GAF-PAS-PAS-GAF-HK-HATPase-RR
<i>XAC2492</i>	TM-CHASE-PAS-PAS-HK-HATPase-RR-RR-Hpt
<i>XAC2555</i>	PAS-HK-HATPase-RR
<i>XAC3028</i>	TM-Reg_prop-YYY-TM-HK-HATPase-RR
<i>XAC3029</i>	Reg_prop-YYY-TM-HK-HATPase-RR
<i>XAC3031</i>	Reg_prop-YYY-TM-HK-HATPase-RR
<i>XAC3098</i>	Hpt-Hpt-Hpt-HK-HATPase-CheW-RR
<i>XAC3473</i>	PAS-HK-HATPase-RR
<i>XAC3643</i>	RR-Sigma54act-TM-HK-HATPase
<i>XAC3673</i>	TM-HK-HATPase-RR
<i>XAC3683</i>	PAS-HK-HATPase-RR
<i>XAC4193</i>	TM-TM-TM-PAS-HK-HATPase-RR
Total: 21	

Os reguladores de resposta (RR) constituem, na maior parte dos casos, fatores de transcrição que respondem aos sinais recebidos pelas histidina quinases de forma a alterar a transcrição de genes necessários à resposta da bactéria. Em alguns casos, estes reguladores podem também conter domínios com atividade enzimática (por exemplo diguanilato ciclase ou fosfodiesterase). Os RRs encontrados em *Xac* estão sumarizados na Tabela 29. Os domínios encontrados nestes reguladores de resposta estão esquematizados na Figura 53. De acordo com suas estruturas modulares, os 60 RRs de *Xac* (listados na Tabela 29) foram classificados em 15 grupos. Dezesete RRs possuem somente o domínio regulador de resposta (domínio receptor) isoladamente. Cinquenta e oito RRs encontrados em *Xac* contêm domínios efetores de ligação ao DNA podendo ser divididos em 5 grupos principais de fatores de transcrição: **i)** Treze RRs da família OmpR (domínio “transcriptional regulatory protein”, na região C-terminal); **ii)** Dez RRs da família NarL/LuxR (domínio GerE) envolvida em mecanismos de “quorum-sensing” onde a ligação ao DNA ocorre através de motivos “helix-turn-helix” (HTH). Esta família é dividida em sub-famílias de acordo com a similaridade de sequência entre os genes, sendo composta por domínios de tamanhos variados, de 74 (GerE) a 901 aminoácidos (MalT).

Outros membros desta família incluem FimZ, FixJ e NarL, entre outros (PFAM: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>, 2006, LAZDUNSKI *et al.*, 2004, MILLER e BASSLER, 2001); **iii)** Foram encontrados 4 RRs pertencentes à família NtrC, os quais ativam a transcrição de promotores reconhecidos pela RNA polimerase associada ao fator alternativo sigma54 (MORETT E SEGOVIA, 1993); **iv)** Outros 3 reguladores de resposta pertencem à família LytR. Fazem parte deste grupo as proteínas LytS e LytT, envolvidas na biossíntese de N-acetil-muramoil-L-alanina amidase em *Bacillus subtilis* (LAZAREVIC *et al.*, 1992). A denominação LytR advém da participação de RRs com este domínio na regulação do processo de autólise bacteriana (NIKOLSKAYA e GALPERIN, 2002); **v)** Um único regulador com domínio PrrA (HTH_8) foi encontrado. PrrA é um regulador de transcrição que é ativado pela HK cognata PrrB em resposta a baixas concentrações de oxigênio em *Rhodobacter sphaeroides* (LAGURI *et al.*, 2006).

Além disso, associados aos demais RRs foram encontrados alguns domínios efetores com atividade enzimática: **i)** O domínio HD-GYP está presente em 2 reguladores de resposta. Este domínio confere atividade fosfodiesterásica às proteínas das quais faz parte (RYAN *et al.*, 2006). Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, RpfC e RpfG (RpfG contém domínios RR e HD-GYP) funcionam como um sistema de 2-componentes controlando a expressão de proteases, endoglucanases e genes relacionados à biossíntese de goma xantana. Este domínio é encontrado em muitas bactérias, archaea e eucariotos; **ii)** 30 proteínas de *Xac* possuem domínios GGDEF, das quais 4 possuem domínios RR (ANDRADE *et al.*, 2006). O domínio GGDEF possui os resíduos Gly-Gly-Asp-Glu-Phe conservados no seu sítio ativo (além de outros) e atua como uma diguanilato ciclase sintetizando a molécula bis-3'→5' diGMP cíclico (c-di-GMP) a partir de duas moléculas de GTP. Em bactérias, o c-di-GMP atua como um segundo mensageiro e a alteração de sua concentração intracelular está relacionada com diversas vias de sinalização como controle do comportamento agregativo, produção de celulose, formação de biofilme, resistência a antibióticos e ativação de fatores de virulência (ROMLING *et al.*, 2005); **iii)** 4 proteínas de *Xac* com domínio RR também possuem um domínio EAL. O domínio EAL apresenta os resíduos Glu-Ala-Leu conservados no seu sítio ativo (além de outros) e, analogamente ao domínio HD-GYP, atua como uma fosfodiesterase promovendo a diminuição da concentração do c-di-GMP na célula. Esta diminuição promove o aumento da resistência a antibióticos, mobilidade, virulência e tolerância a agentes oxidantes do hospedeiro (CAMILLI e BASSLER, 2006).

Tabela 29: Reguladores de resposta e os domínios associados à região C-terminal. Na coluna à esquerda estão relacionados os reguladores de resposta que não apresentam domínios associados à região C-terminal. A descrição da função dos domínios listados se encontra no texto correspondente.

RR	OmpR Transreg_c	NarL (GerE)	NtrC (Sigma54act)	LytR	GGDEF- EAL	PAS GGDEF EAL	GGDEF	EAL	HD-GYP	HDOD	PrrA (HTH_8)	CheB	Hpt	CheY
XAC0684	XAC0325	XAC0136	XAC0208	XAC0621	XAC0495	XAC2398	XAC2482	XAC2868	XAC1877	XAC3443	XAC1797	XAC1888	XAC1328	XAC1987
XAC0896	XAC0730	XAC1229	XAC0226	XAC2141	XAC1992				XAC2493			XAC2870		
XAC1154	XAC0760	XAC1612	XAC3238	XAC3719										
XAC1284	XAC0834	XAC1970	XAC3733											
XAC1670	XAC1042	XAC2110												
XAC1904	XAC1221	XAC2150												
XAC1932	XAC1265	XAC2168												
XAC1968	XAC2803	XAC3480												
XAC2055	XAC2855	XAC3993												
XAC2158	XAC3250	XAC4180												
XAC3101	XAC3483													
XAC3102	XAC3974													
XAC3126	XAC4023													
XAC3135														
XAC3274														
XAC3731														
XAC3826														
17	13	10	4	3	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1
Total: 60														

Além das proteínas HKs típicas e híbridas e dos RRs mencionados, *Xac* também codifica 4 serina/treonina quinases (Tabela 30). Em eucariotos, as principais proteínas transdutoras de sinal, são fosforiladas em resíduos de serina/treonina/tirosina ao invés de histidina, como é o caso dos procariotos. Entretanto, a descoberta da ocorrência de HKs em eucariotos e de Serina/treonina quinases (PSTKs) em procariotos fez com que esse paradigma fosse derrubado. Através da técnica de duplo-híbrido NARIYA e INOUE (2005) identificaram interações de diversas PSTKs de *Myxococcus xanthus* com ativadores de transcrição que regulam o desenvolvimento dos corpos de frutificação (mixoesporos), em condições de estresse ambientais. Infelizmente, quando testamos a proteína XAC1171 (PSTK) como isca contra a biblioteca genômica de *Xac* (Tabela 19, item Resultados) identificamos somente 14 interações em fase +1, sendo 13 com falsos positivos e 1 interação com a subunidade A da exonuclease ABC, codificada pelo gene *uvrA*. A exonuclease ABC é um complexo protéico, formado pelas proteínas UvrA, B e C, envolvido na excisão de nucleotídeos no processo de reparo de danos ao DNA em procariotos. Este mecanismo de reparo foi inicialmente descoberto para lesões causadas por radiação UV, mas também reconhece outras lesões que causam grandes distorções na dupla hélice, como as geradas por benzopireno ou *cis*-platina. UvrA de *Escherichia coli* é uma ATPase que possui alta afinidade pelo DNA danificado (TRUGLIO *et al.*, 2006).

Organização dos domínios funcionais **Nº de proteínas**

Figura 53: Representação esquemática da organização dos domínios encontrados nos reguladores de resposta de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (vide texto para definições dos domínios)

Tabela 30: Proteínas que não se enquadram na descrição de HKs nem RRs. Também são listadas proteínas com domínios Ser/Thr quinase (PSTKs).

Gene	Descrição
XAC0004	HATPase (DNA girase)
XAC2405	HATPase- DNA_mis_repair
XAC2528	HATPase-HSP90
XAC2865	Hpt
XAC3030	HATPase
XAC3136	PAS-HWE_HK
XAC1171	PKinase (Ser/Thr quinase)
XAC1912	PKinase (Ser/Thr quinase)
XAC4116	PKinase-DUF (Ser/Thr quinase)
XAC4127	PKinase-TM (Ser/Thr quinase)

KORETKE *et al.* (2000) demonstraram que muitos pares cognatos HK/RR, ou seja, pares para os quais interações foram identificadas experimentalmente, *e.g.* em *E. coli* e *B. subtilis*, encontram-se codificados lado a lado no cromossomo. Além disso, as relações de parentesco observadas na filogenia das HKs são semelhantes às dos RRs cognatos para mais de 80% dos pares, evidenciando que esses pares de genes têm uma história evolutiva comum. Trinta e quatro pares HK-RR adjacentes foram encontrados no cromossomo de *Xac*. Além de 4 trios de proteínas vizinhas (XAC0683/0684/0685, XAC1282/1283/1284, XAC1669/1670/1672 e XAC3480/3482/3483), compostos de proteínas com domínios HK, RR ou híbridas. Dos 34 pares encontrados, muitos possuem códons de iniciação e de terminação que se sobrepõem indicando que são traduzidos conjuntamente. Outros possuem regiões intergênicas menores que 20 pb, sugerindo que esses pares adjacentes no cromossomo possam ser pares cognatos. De fato, através de ensaios de duplo-híbrido com algumas HKs e RRs, identificamos interações com pares cognatos adjacentes (Tabela 31).

Tabela 31: Interações identificadas por duplo-híbrido envolvendo pares de proteínas adjacentes no cromossomo

Isca	Posição no cromossomo	Presa	Posição no cromossomo	Região Intergênica
0135	158735 a 159958	0136	159958 a 160587	Códons se sobrepõem
0621	736179 a 736913	0620	735096 a 736145	34 pb
0684	810583 a 811020	0683	808727 a 810583	Códons se sobrepõem
0760	903904 a 904617	0759	901254 a 903911	7 pb
1670	1928314 a 1927943	1669	1925794 a 1927821	122 pb

Analisando a informação de 145 genomas procarióticos, ULRICH *et al.* (2005) verificaram que a maioria dos sistemas de transdução de sinal nesses organismos consiste de uma única proteína que contém os domínios sensores e efetores, mas carecem dos domínios de fosfotransferência encontrados nos sistemas de dois-componentes. Denominaram essas proteínas de Sistema de um componente. Esse sistema, além de evolutivamente mais antigo, é distribuído mais amplamente entre bactérias e *Archaea* e mostra uma grande diversidade de domínios assim como os sistemas de dois-componentes (Figura 54).

Figura 54: Esquema mostrando a transdução de sinal pelos sistemas de 2-componentes e 1-componente. (A) Típicos sistemas de 2-componentes contêm uma HK com domínio sensor (vermelho, INPUT) e um RR com domínio efetor (amarelo, OUTPUT) que se comunicam via fosforilação em resíduos His-Asp (cinza e branco, respectivamente). (B) O sistema de 1-componente contém o domínio sensor (vermelho, INPUT) e efetor (amarelo, OUTPUT) em uma só proteína. Adaptado de ULRICH *et al.*, 2005.

Em *Xac*, encontramos 23 proteínas com domínios sensores acoplados a domínios efetores (Figura 55). A maioria dessas proteínas possui o domínio efetor GGDEF associado ou não ao domínio EAL. Apenas uma proteína possui o domínio efetor pertencente à família NtrC, os quais ativam a transcrição de promotores reconhecidos pela RNA polimerase associada ao fator alternativo sigma54 (MORETT E SEGOVIA, 1993). Verificamos também a ocorrência de proteínas com domínios sensores ou efetores isolados. Entretanto, somente algumas estão localizadas ao lado de HKs ou RRs isoladamente (Tabela 32).

Figura 55: Sistemas de 1-componente encontrados em *Xac*. A descrição da função dos domínios ilustrados na figura encontra-se ao longo do texto. A relação das proteínas com esses domínios encontra-se em ANDRADE *et al.*, 2005. n= nº de repetições do domínio variável. HDOD=função desconhecida. c_NMP binding=ligação à nucleotídeos cíclicos.

Tabela 32: Proteínas com domínios sensores ou efetores isolados.

Gene	Domínio	HK ou RR codificado em gene adjacente
<i>XAC0608</i>	GAF	Não há
<i>XAC3272</i>	GAF	<i>XAC3273</i> (HK) e <i>XAC3274</i> (RR)
<i>XAC3617</i>	GAF	Não há
<i>XAC4293</i>	PAS-GAF-PAS	Não há
<i>XAC1075</i>	PAS	<i>XAC1074</i> (HK)
<i>XAC1207</i>	PAS	Não há
<i>XAC1184</i>	EAL	Não há
<i>XAC3958</i>	EAL	Não há

5.1.2- Principais interações envolvendo proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes

a) Interações envolvendo o sistema de dois-componentes XAC1273/XAC1274 e o “estressomo” RsbRST

O início da transcrição é o passo mais importante para a regulação gênica em bactérias. Para iniciar a transcrição, a RNA polimerase se associa a um fator sigma que é o principal responsável pelo direcionamento da RNA polimerase a uma classe específica de seqüências promotoras. A grande variedade de fatores sigma presentes nas espécies bacterianas proporcionam a oportunidade de manutenção basal de sua expressão gênica e de sua regulação em resposta a alterações ambientais e a sinais durante o desenvolvimento bacteriano. Esta regulação torna possível a adaptação rápida da bactéria em resposta a mudanças ambientais.

Em bactérias Gram-positivas a atividade do fator sigma B alternativo é desencadeada pela exposição a condições ambientais estressantes ou carência nutricional. Em *Bacillus subtilis*, mais de 60 genes são ativados em resposta a diversas condições estressantes. A atividade do sigma B é controlada pós transcricionalmente por uma via de transdução de sinal multicomponente. Os componentes regulatórios estão codificados em um complexo operon denominado de regulon *sigB*, e os genes pertencentes a esse operon são denominados *rsb* (“regulators of sigma B”) (KANG *et al.*, 1996). A ativação do regulon de sigma B é governada por 2 módulos “partner switching” seqüencialmente ligados. Cada módulo é composto por uma serina fosfatase (RsbX, no primeiro módulo e RsbU, no segundo), uma proteína antagonista (RsbS e RsbV) e um fator anti-sigma (RsbT e RsbW, respectivamente). O primeiro módulo (RsbX-RsbS-RsbT) é ativado em condições de estresses ambientais (concentração de sais, choque térmico, álcool) e o segundo módulo (RsbU-RsbV-RsbW) é ativado em resposta aos sinais enviados pelo primeiro módulo (Figura 56, FOUET *et al.*, 2000).

Na ausência de condições estressantes, a proteína RsbW (um fator anti-sigma) se liga diretamente ao sigma B e previne sua associação com o “core” da RNA polimerase. Entretanto, em condições estressantes RsbW se liga a RsbV (um fator anti-anti sigma) deixando sigma B livre para associar-se a RNA polimerase e direcionar a transcrição de genes alvo. A determinação da formação de um complexo RsbW-sigma B ou RsbW-RsbV depende do estado fosforilado de RsbV, o qual, por sua vez depende da atividade da serina fosfatase RsbU. A atividade de RsbU é controlada por 3 proteínas RsbR, RsbS e RsbT, as quais formam

um complexo supramolecular denominado de “stressomo” (PANE-FARRE *et al.*, 2005). A proteína RsbT (resposta a sinais ambientais de estresse do primeiro módulo) liga-se à RsbU para ativar sua atividade de fosfatase que proporciona um elo entre o primeiro e segundo módulos (Figura 56).

Figura 56: Esquema do operon *sigB* em *Bacillus subtilis*. (A) P_A é o promotor do operon. P_B é um promotor interno dependente de sigma B. (B) diagrama representando as interações entre os módulos “partner-switching”. Setas indicam ativação e Ts indicam repressão. P e K são fosfatases e quinases. (FOUET *et al.*, 2000).

PANE-FARRE *et al.* (2005) identificaram a ocorrência de genes que codificam o “stressomo” em uma grande variedade de bactérias. Enquanto este módulo está ligado ao fator sigma B e seus reguladores em *B. subtilis* e outras bactérias Gram-positivas, genes que codificam sistemas de 2-componentes e sistemas mais complexos de “phosphorelays” encontram-se agrupados ao módulo RsbRST em outras bactérias como cianobactérias, bacteroidetes, proteobactérias e *deinococci*. A conservação do módulo RsbRST e seu agrupamento com diferentes tipos de sistemas regulatórios sugere que as proteínas do “stressomo” formam uma unidade sensora e transdutora de sinal que envia informação a módulos efetores (em inglês, “output modules”) muito diferentes.

Em *Xac*, foram encontrados homólogos de RsbR (XAC1269), RsbS (XAC1270) e RsbT (XAC1271). Contudo, não há homólogos das proteínas do segundo módulo (RsbUVW) e nem de sigma B, pois se trata de uma bactéria Gram-negativa. Entretanto, a jusante de XAC1271 identificamos uma proteína (XAC1272) de 337 aminoácidos, a qual possui um domínio HATPase (domínio de ligação ao ATP) na região N-terminal (resíduos 15 a 140) com similaridade à RsbW (160 aa em *B. subtilis*) e um domínio com similaridade a SpoIIE

(proteína fosfatase) de *B. subtilis*. Logo existe a possibilidade de que XAC1272 desempenhe funções similares às de RsbU, em *Xac*. Além disso, existem duas proteínas (XAC1273 e XAC1274) pertencentes aos sistemas de 2-componentes associadas a esse módulo (vide item F, Resultados).

As Figuras 57 e 59 apresentam as interações envolvendo XAC1273 e XAC1274. Através de análises de duplo-híbrido utilizando XAC1273 (HK) como isca, identificamos interações com XAC1271, o efector negativo de sigma B em *Bacillus*. Utilizando XAC1269, XAC1270 e XAC1271 como iscas, Maria Cláudia Pereda Rosa, aluna de doutorado de nosso laboratório, identificou interações entre XAC1271 e XAC1273, entre XAC1269 e XAC1270 e entre XAC1270 e XAC1271 e entre XAC1270 e XAC1269 (setor azul da Figura 59). XAC1273 também interagiu com XAC0896, uma proteína que possui somente o domínio regulador de resposta. Utilizando XAC1274 (RR-PAS-HK-RR) como isca, identificamos interações com a proteína conservada hipotética (XAC4263) e com XAC1480, um regulador de transcrição com domínio hélice-volta-hélice (HTH) da família LysR (GALPERIN, 2004). Os reguladores de transcrição dessa família estão presentes em diversos gêneros de bactérias e constituem uma grande família de proteínas que se ligam ao DNA. Essas proteínas possuem em torno de 300-350 resíduos e estão envolvidas em funções celulares bastante diversas incluindo fixação de nitrogênio, resposta ao estresse oxidativo e virulência. Uma característica típica desses reguladores de transcrição é que podem atuar como ativadores ou repressores de genes pelo uso de diferentes promotores (ZAIM e KIERZEK, 2003).

XAC1274 também foi identificada em interações envolvendo XAC3273, uma HK (não representada na Figura 59) e XAC3292, uma HK com domínio PAS (Figura 59). Além disso, também identificamos interações da histidina quinase híbrida XAC3673 com XAC1271, o efector negativo de sigma B. XAC3673 também interagiu com XAC0570, uma proteína antagonista de um fator anti-sigma (domínio STAS) e com XAC1682, um fator sigma E (*rpoE*). De fato, o gene de XAC0570 (anotado como SpoIIAA) se encontra num aparente operon que inclui *XAC0571*, um homólogo de RsbW e RsbT, e *XAC0572*. Este último, codifica uma proteína de 693 aa cujo domínio C-terminal possui alta similaridade ao domínio C-terminal serina fosfatase (SpoIIE) de *Bacillus* (Figura 57). Logo, do mesmo modo que as proteínas do regulon *sigB* (RsbRSTUVWX) interagem para controlar a atividade de sigma B em *Bacillus*, é possível que XAC1269/1270/1271/0570/0571/0572 interajam para controlar, através de XAC3673, a atividade do fator sigma E (XAC1682). Esta hipótese é ilustrada nas Figuras 57 e 59.

Interações observadas em *Xac*

Interações conhecidas em *Bacillus subtilis*

Figura 57: Esquema mostrando as interações observadas em *Xac* e comparação com as interações conhecidas em *B. subtilis*. As cores das setas representam as regiões homólogas. Código de cores indicativo de domínios presentes nas proteínas Rsb de *B. subtilis* e de *Xac*:

STAS = fator anti-anti-sigma, substrato para fosforilação, liga anti-sigma e nucleotídeos

SpoIIE = domínio proteína fosfatase PP2C

HATPase_C = proteína quinase

HK = histidina quinase

C/H = domínios Cache e HAMP

PAS = domínio PAS, RR = regulador de resposta

SigB = fator sigma B, SigE = fator sigma E

Utilizando a proteína hipotética XAC4263 como isca, identificamos interações com XAC3980, uma proteína com similaridade à protease DO de *Xanthomonas campestris*. Esta proteína, pertencente à família das proteases HtrA (“high temperature requirement”), é uma serina protease periplasmática requerida em altas temperaturas e envolvida na degradação de proteínas danificadas (CLAUSEN *et al.*, 2002).

Em *E. coli*, HtrA foi inicialmente identificada em dois mutantes espontâneos que não cresciam em altas temperaturas e eram deficientes na digestão de proteínas desnaturadas localizadas no periplasma. Subseqüentemente, a tolerância à varias condições estressantes que podem levar à desnaturação de proteínas do periplasma, foi atribuída à HtrA, também denominada de DegP. A expressão de HtrA/DegP é controlada por duas vias de transdução de sinal, em *E. coli* (CLAUSEN *et al.*, 2002): a via Cpx, que compreende as proteínas CpxA (HK) e CpxR (RR) e a via do fator sigma E. Esta última é composta do fator sigma alternativo RpoE (XAC1682) e de 3 proteínas, RseABC, que regulam a atividade de RpoE (Figura 58).

Figura 58: Na ausência de proteínas (OMPs) desnaturadas (painel à esquerda), o fator sigma E está ligado ao fator anti-sigma RseA. Esta interação é estabilizada pela proteína RseB (retângulo). A desnaturação das OMPs, leva ao desligamento da interação RseA/RseB e posterior degradação de RseA por DegS e conseqüente liberação de sigma E. Sigma E livre pode interagir com a RNA polimerase e facilitar a transcrição de fatores envolvidos no enovelamento de proteínas e degradação. Adaptado de RAIVIO e SILHAVY (2001).

Interessante é o fato de termos identificado um elo entre a lipocalina (XAC3956) e duas proteínas quinases (XAC3673 e XAC3292), as quais interagiram respectivamente com a protease DO (HtrA ou DegP) e o fator sigma E (Figura 59). Em *E. coli*, a transcrição de *blc*, o gene que codifica uma lipocalina situada na membrana externa, é ativada pelo fator σ^S em condições de carência nutricional ou alta osmolaridade. Esta família de proteínas consiste de pequenas moléculas que participam de uma série de funções biológicas, em bacilos Gram-negativos, incluindo transporte, percepção e transdução de sinais extracelulares, reparo e biogênese de membrana externa e homeostase celular (BISHOP, 2000). Neste contexto, nossos resultados sugerem que as histidina quinases XAC3292 e XAC3673, estejam envolvidas na regulação da atividade dos fatores sigma E (XAC1682) e anti-anti sigma (XAC0570) e conseqüentemente de genes responsáveis pela homeostase celular em condições de estresse térmico e que a lipocalina XAC3956 também estaria envolvida nesta via.

Além dessas interações observadas com XAC4263 também devemos destacar XAC4049, uma proteína homóloga à SapC de *Salmonella* que é secretada pelo T3SS para causar invasão do tecido epitelial em hospedeiros animais (JOHNSTON *et al.*, 1996).

Figura 59: Rede de interações envolvendo XAC1273 e XAC1274. As proteínas pertencentes aos sistemas de 2-componentes estão representadas por seus domínios (cilindros): HK (verde), RR (marrom), PAS (rosa). As respectivas “presas” estão representadas em azul. As setas indicam o sentido “isca” → “presa”. CHP= proteína conservada hipotética.

b) Interações envolvendo os agrupamentos XAC1279/1283/1282/1284 e XAC1669/1670/1672: uma possível via envolvida na regulação de quimiotaxia

Entre muitos processos regulados por sistemas de dois-componentes a quimiotaxia é, provavelmente, o mais investigado. Este processo envolve o movimento da célula em resposta a concentrações de substâncias químicas extracelulares, que podem ser tanto atraentes, quanto repelentes. A quimiotaxia é controlada, em *E. coli*, por mais de 40 genes em 14 operons que produzem proteínas para componentes estruturais do flagelo, motor flagelar, receptores transmembrânicos e transdução de sinal (AIZAWA *et al.*, 2000; ALEX *et al.*, 1994). A organização dos genes de *Xac* que codificam homólogos de proteínas envolvidas diretamente em quimiotaxia em outros organismos, está representada na Figura 60.

Figura 60: representação esquemática dos genes envolvidos com o mecanismo de quimiotaxia de *Xac*. As setas em vermelho indicam proteínas pertencentes ao sistema de 2-componentes que foram analisadas por ensaios de duplo-híbrido.

Legenda: CheY=RR

CheA=HK

CheB=RR/metilesterase

CheR=metiltransferase

CheZ=proteína fosfatase

CheW=proteína de acoplamento

MCP="metil carrier protein"/ receptor quimiotático

O movimento natatório de células bacterianas pode ser descrita por dois eventos que se intercalam. Na ausência de um gradiente químico, as células executam movimentos intercalados de natação e cambalhotas onde a célula pára brevemente e se re-orienta em uma nova direção arbitrária. Quando um gradiente de substâncias atraentes ou repelentes é imposto, uma via sensora direcionará o movimento bacteriano. Quando a célula encontra um gradiente de substâncias atraentes, um sinal é enviado ao motor de propulsão, o qual diminui a probabilidade de um evento de cambalhota permitindo assim, que a bactéria continue nadando na mesma direção (em sentido do gradiente). Do mesmo modo, se um gradiente de substâncias repelentes é imposto ao meio, os eventos de cambalhotas aumentam, numa tentativa da bactéria deixar de nadar no sentido do gradiente (FALKE *et al.*, 1997).

No processo de quimiotaxia, a auto-fosforilação da histidina quinase CheA é controlada por proteínas ligantes, solúveis em água e localizadas no compartimento periplasmático, as quais reconhecem diferentes estímulos químicos (Figura 61A; PARKINSON, 2003; FALKE *et al.*, 1997). Uma vez associada a uma molécula ligante cognata, estas proteínas ligam-se a um dos receptores transmembrânicos homólogos às proteínas aceptoras de grupos metila (MCPs). Alternativamente, alguns receptores transmembrânicos, em particular os receptores de aspartato (Tar), serina (Tsr) e citrato (Tcp), podem ser regulados diretamente pela ligação à molécula ligante, sem a assistência da proteína ligante solúvel (PARKINSON, 2003). Tsr, Tar, Trg (ribose e galactose) e Tap (dipeptídeos) são receptores que sofrem uma alteração conformacional quando associados aos ligantes e transmitem o sinal à proteína CheA, uma histidina quinase, localizada no citoplasma (FALKE *et al.*, 1997). Essa transmissão de sinal se faz com a assistência da proteína de acoplamento CheW. Quando CheA se auto-fosforila, transfere o grupo fosfato para um resíduo de aspartato de um dos reguladores de resposta, CheY ou CheB (Figura 61B).

Fosfo-CheY difunde-se para o motor flagelar onde se liga à FliM. Esta interação favorece a rotação do flagelo no sentido horário, o que ocasiona movimentos de cambalhotas, os quais re-orientam o sentido do movimento bacteriano (PARKINSON, 2003/ FALKE *et al.*, 1997). No entanto, quando a proteína metilesterase CheB é fosforilada, aumenta sua atividade removedora de grupos metila em resíduos de glutamato nos domínios citoplasmáticos dos quimiorreceptores. Esses resíduos são constitutivamente metilados pela proteína metiltransferase CheR. Assim, níveis variados de metilação modulam a capacidade do receptor de estimular a auto-fosforilação de CheA. A ligação de uma molécula atraente ao receptor, resulta em uma série de eventos que inibem a atividade

da quinase CheA e portanto, níveis de fosfo-CheY, o que leva a um movimento rotacional flagelar no sentido anti-horário, favorecendo um comportamento natatório para frente. Nesta situação, a concentração de fosfo-CheB também é diminuída, e o receptor torna-se mais metilado, o que aumenta a capacidade deste em ativar CheA. Outras proteínas participam do processo: CheZ interage com fosfo-CheY para a remoção do fosfato, favorecendo também, o movimento natatório para frente (ALEX *et al*, 1994).

Figura 61: (A) Ilustração do receptor de aspartato. A maioria dos componentes da via de quimiotaxia está associada a esse complexo, mesmo que transientemente. O complexo ternário é composto pelo receptor (dímero), a proteína acopladora CheW e o dímero CheA (HK). (B) Circuito de regulação do motor flagelar. (Verde): via que leva a rotação do flagelo no sentido horário. (vermelho): via que leva a rotação do flagelo no sentido anti-horário. Fonte: FALKE *et al.*, 1997 e PARKINSON, 2003.

Em *Xac*, existem múltiplas cópias de homólogos de CheA, CheY, CheW, CheB, CheR, CheZ e receptores quimiotáticos: 3 cópias de CheA (XAC2865, XAC1930 e XAC1903), CheY (XAC1904, XAC1932 e XAC3274), e CheW (XAC2867, XAC2447 e XAC1906); 4 cópias de CheB (XAC2870, XAC1888, XAC1889 e XAC1280) e CheR (XAC1281, XAC1890, XAC2869 e XAC3730) e uma de CheZ (XAC1931). Outros 10 genes estão reunidos em um “cluster” e codificam proteínas homólogas às proteínas aceptoras de metila (MCPs): *XACs 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1896, 1897, 1899, 1900 e 1902*, além dos genes localizados em outras regiões do genoma: *XACs 0611, 1666, 3132 e 3213* (Figura 60).

Embora, em *E. coli* (PARKINSON, 2003; ALEX *et al*, 1994), o circuito de sinalização de quimiotaxia esteja bem definido através dos genes *cheA*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*, *cheR* e *cheB*, com os diferentes receptores regulando a auto-fosforilação da quinase CheA

e esta, por sua vez, interagindo com dois substratos (CheY ou CheB), nossos resultados apontam uma possível nova interação da proteína codificada pelo gene *XAC3112* (proteína conservada hipotética) com duas histidina quinases CheA, codificadas pelos genes *XAC2865* e *XAC1903*. Além dessas interações *XAC3112* também interagiu com a proteína MCP *XAC3449* (Tar, receptor de aspartato) e com as histidina quinases *XAC2158*, *XAC3136* e *XAC1669*.

Verificamos também que *XAC3273* (PAS-HK), localizada ao lado de CheY (*XAC3274*), interagiu com a metiltransferase CheR (*XAC3730*). Níveis variados de metilação modulam a capacidade do receptor de estimular a autofosforilação de CheA. A metilação é, por si, um mecanismo de “feedback” que permite o receptor a adaptar-se a modificações ambientais em diferentes estímulos. *XAC3273* também interagiu com *XAC2555*, uma proteína anotada como FixL. Em *Rhizobium melioli*, FixL é uma proteína sensora de níveis de oxigênio que, juntamente com FixJ, seu regulador de resposta cognato, regulam a transcrição de genes requeridos na fixação de nitrogênio (CROSSON *et al.*, 2005; ALEX *et al.*, 1994). *Xac* não possui homólogos ao gene *fixJ*, e não fixa nitrogênio. A análise da sequência de *XAC2555*, contra o banco de dados de domínios conservados COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>), identificou o domínio COG4191 (resíduos 146 a 394). Este domínio está relacionado a histidinas quinases que regulam o transporte de C₄-dicarboxilatos.

C₄-dicarboxilatos assim como succinato, fumarato, malato e aspartato são metabolizados pela bactéria em condições aeróbias onde são oxidados a CO₂ pelo ciclo do ácido cítrico. C₄-dicarboxilatos também servem como fonte de energia em condições anaeróbias. Os carreadores de C₄-dicarboxilatos são classificados pelas suas similaridades de seqüências: (i) o grupo com similaridade à proteína DctA; (ii) o grupo com similaridade às proteínas DcuA, DcuB, DcuC e CitT; e (iii) os transportadores periplasmáticos dependentes de ATP (JANAUSCH *et al.*, 2002). A resposta da bactéria à concentração de C₄-dicarboxilatos depende de um sistema de 2-componentes composto por HKs e RRs cognatos. As HKs DcuS, DctB, DctS estão divididas em 3 famílias: DcuS é membro da família CitA, DctB é membro da família NtrB e DctS é membro da família FixL. Além disso, o sensor MCP Tar, controla a quimiotaxia, em resposta a aspartato em, *E. coli* (JANAUSCH *et al.*, 2002). Acreditamos que *XAC2555* pertença a família de sensores DctS. O sensor DctS possui similaridade ao sensor de oxigênio FixL, daí a anotação de *XAC2555* como FixL. Assim, somando-se as interações identificadas entre *XAC2555* e *XAC3273* e desta última com *XAC1669*, e de *XAC3112* com o receptor Tar e também com *XAC1669* nossas observações levam à hipótese de que dependendo da variação dos

5.2. Interações Envolvendo o Sistema de Secreção do Tipo IV

O Sistema de Secreção do Tipo IV está relacionado ancestralmente a sistemas de conjugação bacterianos. Além de mediar a transferência de DNA entre bactérias, esses sistemas transferem substratos protéicos e, às vezes, núcleo-protéicos às células-alvo eucarióticas durante a infecção (CASCALES e CHRISTIE, 2003).

O Sistema de secreção do tipo IV (T4SS) mais estudado é o utilizado pelo fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens* para a transferência do plasmídeo Ti e de proteínas para plantas. Componentes do tipo IV são usados por *Bordetella pertussis*, causador da coqueluche, para a secreção da toxina pertussis, por *Helicobacter pylori*, para a secreção de CagA e potencialmente outros efetores em células epiteliais, e por vários outros patógenos (NAGAI e ROY, 2003).

Diversos T4SS possuem 12 proteínas que são homólogos as proteínas VirB1-11 e VirD4 do sistema de transferência do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (CHRISTIE e VOGEL, 2000). Em *A. tumefaciens*, todas essas proteínas são fundamentais para o funcionamento do T4SS, com exceção de VirB1 (BERGER e CHRISTIE, 1994). Muitos estudos têm sido realizados envolvendo componentes desse sistema, desde a interação entre as proteínas que o compõe até o reconhecimento de interações DNA-proteína (SCHRÖDER e LANKA, 2005).

Como mencionado na Introdução, o genoma de *Xac* codifica dois T4SS, um localizado no cromossomo e outro no plasmídeo pXAC64 (ALEGRIA *et al.*, 2005; Van SLUYS *et al.*, 2002; da SILVA *et al.*, 2002). O *locus vir* de pXAC64 é mais similar (em sintenia e identidade dos produtos) ao agrupamento *mpfA-J* do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida*, requerido para formação do aparato conjugativo (GREATER *et al.*, 2002). O T4SS cromossomal tem uma organização diferente do encontrado no plasmídeo e os produtos gênicos correspondentes possuem baixo grau de identidade de sequência. As proteínas codificadas pelo agrupamento cromossomal possuem maior similaridade às proteínas codificadas pelos genes encontrados nos plasmídeos pSB105 e pIPO2, isolados de comunidades microbianas residentes em rizosferas de alfafa e trigo, respectivamente (ALEGRIA *et al.*, 2005; SCHENEIKER *et al.*, 2001; TAUCH *et al.*, 2002).

5.2.1. Interações envolvendo o T4SS cromossômico

a) Rede de Interações envolvendo as proteínas XAC2609, XAC2610, VirB9, VirB11 e VirD4

A proteína “acopladora” VirD4 (XAC2623) e seus homólogos são ATPases envolvidas no reconhecimento e processamento de substratos a serem transferidos pelo T4SS. Estes substratos podem ser complexos proteína-DNA como o complexo T-DNA-VirD2-VirE2 de *A. tumefaciens* ou simplesmente proteínas como CagA de *Helicobacter pylori* e a toxina pertussis de *Bordetella pertusis*. Os substratos podem ser destinados ao meio extracelular ou ainda serem translocados para a célula hospedeira ou outras células bacterianas. No processo de conjugação, homólogos de VirD4 (i.e., TrwB, do plasmídeo R388, de *E. coli*) são necessários na transferência do DNA conjugativo, mas não na produção do *pilus* (SCHRÖDER e LANKA, 2005; MONCALIAN *et al.*, 1997).

Como mostrado por ALEGRIA *et al.* (2005), todas as presas de VirD4, utilizando a biblioteca genômica, foram derivadas de 12 proteínas que possuem um domínio C-terminal conservado de aproximadamente 100 aminoácidos. Pelo fato dessas proteínas terem interagido com VirD4, foram chamadas de “VIPs” (“Vir interacting proteins”). Outros grupos identificaram interações de VirD4 com as proteínas VirB4, VirB10 e VirB11 (ATMAKURI *et al.*, 2004; GILMOUR *et al.*, 2003). VirD4 é uma proteína citoplasmática cuja região N-terminal se ancora e atravessa a membrana interna atingindo a região periplasmática, local provável de interação com VirB10 (GILMOUR *et al.*, 2003; LLOSA *et al.*, 2003). Estudos cristalográficos e de microscopia eletrônica mostraram que homólogos de VirD4 formam anéis hexaméricos, de forma que resultam em uma estrutura quaternária quase esférica e similar a ATPase-F1 (GOMIS-RUTH *et al.*, 2001). No entanto, interações entre fragmentos da própria VirD4 não foram identificados nas análises de ALEGRIA *et al.* (2005) bem como em nossas análises. De um total de 68 interações encontradas envolvendo as 12 VIPs, 8 delas eram derivadas do produto do gene XAC2609 codificado pelo *locus vir* do cromossomo. Quando XAC2609 foi utilizada como isca na triagem com a biblioteca genômica, foi encontrada uma interação específica com a proteína XAC2610. As análises com a biblioteca de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* confirmam os resultados obtidos anteriormente (Figura 40).

Estudos recentes têm trazido grandes avanços sobre os mecanismos de reconhecimento entre a maquinaria do T4SS e seus substratos. Em *A. tumefaciens* substratos secretados carregam um motivo consensual que contém arginina. Mutações

nesses resíduos, suprimem a transferência do substrato VirF pelo T4SS (CASCALES e CHRISTIE, 2003). A estrutura de RalF, substrato do sistema conjugativo Dot/Icm de *Legionella pneumophila* revelou um domínio C-terminal composto por resíduos hidrofóbicos que supostamente são necessários nas interações com proteínas do sistema Dot/Icm (AMOR *et al.*, 2005). XAC2610 possui um sinal de localização nuclear (NLS) PKKK na porção C-terminal entre os resíduos 249-252 (NAKAI e KANEHISA, 1991). Utilizando XAC2610 como isca foram encontradas três diferentes presas: a proteína VirB11 do cromossomo, XAC2609 e a proteína periplasmática VirB9 (XAC2620). Esta última merece especial atenção por ter sido identificada apenas nos ensaios de iscas derivadas somente dos *loci tra/vir*.

VirB11 é membro de uma família de ATPases associadas a sistemas de secreção de macromoléculas. Assim como VirD4 e VirB4, é um dos responsáveis pelo transporte de substratos através do T4SS (BURNS, 2003; e CHRISTIE, 2004). Homólogos de VirB11 (TrcW do plasmídeo R388, TrbB do plasmídeo RP4 e HP0525 de *H. pylori*), formam anéis hexaméricos com uma cavidade central de aproximadamente 50 Å (CHRISTIE *et al.*, 2005; YEO *et al.*, 2004). VirB11 pertence à família “PulE-like” de NTPases e é responsável pela energização da maquinaria de secreção do T4SS tanto para a montagem do complexo como para a produção do *pilus* e para a secreção de substrato. MALEK *et al.* (2004) e WARD *et al.* (2002), utilizando a técnica de duplo-híbrido, identificaram interações de VirB11 com VirB1, VirB4, VirB8, VirB9 e VirB10. Entretanto, ensaios de co-imunoprecipitação confirmaram interações apenas entre VirB11 e VirB4 e VirB11 e VirD4 (ATMAKURI *et al.*, 2004). ALEGRIA *et al.* (2005) utilizando a biblioteca genômica observaram 1 presa derivada da própria VirB11 quando esta foi testada como isca. Em nossos ensaios, identificamos interações de VirB11 com fragmentos dela mesma, corroborando as observações de que esta comporta-se como um oligômero *in vitro* (CHRISTIE *et al.*, 2005).

b) Interações envolvendo VirB9, VirB8 e VirB7 (XAC2622)

O poro periplasmático do T4SS é composto principalmente por subunidades de VirB9 (BURNS, 2003; e CHRISTIE, 2004). Esta proteína pode estar presente tanto no periplasma associada a VirB8 e VirB10 como discretamente na membrana externa formando pontes de dissulfeto com a proteína VirB7 (FERNANDEZ *et al.*, 1996; BEAUPRÉ *et al.*, 1997). VirB9 possui 3 domínios funcionais: os domínios N-terminal e C-terminal conservados e requeridos para a montagem e atividade do canal e a biogênese do

pilus e um domínio central, que é pouco conservado, mas que possui fitas- β potenciais, sugerindo a formação de um barril- β associado à membrana externa (JAKUBOWSKI *et al.*, 2005; CAO e SAIER, 2001). Em *A. tumefaciens*, interações entre VirB9 e as subunidades de VirB7, VirB8 e VirB10 foram detectadas previamente em diversos ensaios, incluindo duplo-híbrido (DAS *et al.*, 1997; DAS e XIE, 200; WARD *et al.*, 2002). Ensaios de duplo-híbrido com a biblioteca de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* identificaram interações de VirB8 (XAC2621) com VirB9. Este resultado não havia sido demonstrado anteriormente por ALEGRIA *et al.* (2005).

Em *Xac*, não foram identificados genes que codificam VirB7 no cromossomo ou nos plasmídeos. As proteínas VirB7 são normalmente pequenas lipoproteínas com alta variabilidade em sua sequência primária e são consideradas importantes para a funcionalidade do T4SS (ANDERSON *et al.*, 1996; COVACCI *et al.*, 1999). Entretanto, na posição correspondente a VirB7 no “cluster” *virB* do cromossomo é observado um gene que codifica uma proteína pequena hipotética (XAC2622, 139 resíduos) cujo único homólogo é encontrado em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Quando XAC2622 foi utilizada como isca usando a biblioteca de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* observamos 7 interações com VirB9, localizado entre VirB8 e VirB10 confirmando os resultados descritos por ALEGRIA *et al.* (2005).

A interação entre XAC2622 e VirB9 detectada sugere que XAC2622 possa estar desempenhando em *Xac* e *X. campestris*, o mesmo papel que VirB7 desempenha em sistemas T4SS de outras bactérias. A análise da estrutura primária de XAC2622 (ALEGRIA *et al.*, 2005) utilizando o programa PSORT (NAKAI e KANEHISA, 1991) mostra uma possível localização na membrana devido à presença da sequência CATK (resíduos 21-24) onde o resíduo de cisteína é modificado em lipoproteínas e ancorado na membrana (BRUNINGS e GABRIEL, 2003).

A Figura 63 resume os resultados obtidos através das análises de duplo-híbrido utilizando iscas do T4SS codificado por genes do cromossomo e os compara com os dados da literatura. Os resultados por nós identificados confirmam as interações anteriormente identificadas por ALEGRIA *et al.* (2004) e somando-se às novas interações identificadas sugerem uma rede de interações que pode ser importante no processo de patogenicidade de *Xac*. Embora ensaios de secreção de XAC2609 e XAC2610 não tenham sido realizados, as interações observadas entre XAC2609 e XAC2610 e entre XAC2609 e VirD4 e VirB11, os principais responsáveis pela secreção/seleção de componentes desse sistema, e a nova interação identificada entre XAC2610 e a proteína periplasmática VirB9, levanta a possibilidade de que XAC2610 e XAC2609 possam estar sendo secretadas pelo T4SS

codificado pelos genes do cromossomo e assim seriam importantes na patogenicidade de *Xac*.

Figura 63: Arquitetura do T4SS. (A): Modelo representando os energizadores (vermelho), o complexo do canal (azul), exceto VirB1 que é uma peptidoglicanase e proteínas do *pilus* (roxo). As interações já descritas na literatura estão representadas por traços simples entre as proteínas. Interações entre VirB9 e VirB8, VirB7 e VirB9, e interações homotrópicas de VirB11 também foram descritas e confirmadas por nós (traços duplos, em verde). Interações entre XAC2610 e XAC2609 com proteínas do T4SS estão representadas também por setas duplas (verdes). (B): modelo representando as proteínas de acordo com seus tamanhos e interações descritas na literatura. As interações por nós identificadas estão representadas por cores. XAC2609/VirD4 (Verde), complexo VirB8/VirB9/VirB7 (XAC2622) em vermelho, interações homotrópicas de VirB11 (rosa) e XAC2610/VirB11, XAC2610/VirB9 e XAC2609/XAC2610 representadas pelas localizações das proteínas no aparato. Adaptação de SCHRÖDER e LANKA, 2005.

5.2.2. Interações envolvendo o T4SS do plasmídeo pXAC64

a) Interações envolvendo os produtos do locus *tra*

Durante a conjugação, as duas fitas de DNA do plasmídeo se separam em um processo semelhante à replicação pelo círculo rolante onde uma fita de DNA se move a partir da bactéria que contém o plasmídeo (doadora) para uma bactéria receptora. As duas fitas simples de DNA, em cada célula, servirão então como moldes para a replicação completa do DNA dupla-fita.

A maioria dos plasmídeos que ocorrem naturalmente são auto-transmissíveis ou mobilizáveis. Um plasmídeo auto-transmissível codifica todas as funções que precisa para ser conjugado muitas vezes ajudando na transferência de plasmídeos mobilizáveis e até mesmo de DNA cromossômico (SNYDER e CHAMPNESS, 2003).

No plasmídeo pXAC64 foram encontrados genes requeridos no processo conjugativo, denominados de genes *tra/trw* (ALEGRIA *et al.*, 2005). As proteínas por esses genes traduzidas (TraA, TrwB, TrwC e TraD) são necessárias para a clivagem e preparação do DNA durante o processo de conjugação. Os produtos dos genes *tra/trw* atuam em *trans* e podem, portanto atuar em outro plasmídeo de uma mesma célula. Um sítio hipotético (*oriT*, 5' GGTGCGTGATGTGTATTGA 3') entre os resíduos 24202 e 24182 do plasmídeo pXAC64, com grande similaridade (19/20 bases) com o sítio *oriT* do plasmídeo pWW0 de *P. putida* (vide Figura 17B, Introdução) também foi encontrado. Apesar do plasmídeo pXAC33 não apresentar os genes *vir* ou *mpf* (“mating pair formation”), é possível constatar que a região *oriT*, assim como *traA* e *traD* estão presentes também neste plasmídeo. Por essa razão, acredita-se que o sistema de secreção do tipo IV encontrado no plasmídeo pXAC64 possa funcionar como um sistema de transferência conjugativo, e a presença de *oriT* nos 2 plasmídeos poderia possibilitar a mobilização de ambos.

A proteína TrwA de *E. coli* é uma proteína tetramérica capaz de ligar-se especificamente à região *oriT* do plasmídeo R388 de *E. coli* (MONCALIAN *et al.* 1997). A ligação desta proteína à *oriT* proporciona um maior relaxamento do DNA nessa região para que a relaxase TrwC possa clivá-la. XACb0025 possui similaridade à TraA do plasmídeo pWW0. Nossos resultados confirmam, como demonstrado previamente por ALEGRIA *et al.* (2005), interações homotrópicas de XACb0025 o que condiz com a sua natureza tetramérica.

TrwB de *E. coli* é uma proteína integral de membrana, homóloga à VirD4 que contém um domínio citoplasmático com atividade ATPásica e é conhecida como a proteína acopladora do processo de conjugação devido à capacidade de ligar-se a complexos núcleo-protéicos (TrwC-DNA) e encaminhá-los para a secreção/conjugação (HORMAECHE *et al.*, 2004). O complexo TrwB é formado pela associação de seis monômeros equivalentes associados de forma que resultam em uma estrutura quaternária quase esférica e similar a ATPase-F1 (GOMIS-RUTH *et al.*, 2001, LLOSA *et al.*, 2002, Figura 64). Quando TrwB (XACb0030) foi testada com a biblioteca genômica de *Xac* (ALEGRIA *et al.*, 2005), esta apresentou interações com muitas presas distintas incluindo

falsos-positivos. Ensaios realizados com a biblioteca de alta-resolução não revelaram o crescimento de clones em meio seletivo.

TrwC é uma enzima bifuncional capaz de clivar uma das fitas do DNA em um sítio específico do plasmídeo, a região *oriT*. TrwC liga-se a *oriT* como um dímero clivando uma das fitas de DNA e se dissociando. Uma das moléculas de TrwC permanece ligada covalentemente a extremidade 5' da fita simples de DNA (ssDNA). Esse complexo TrwC-ssDNA interage com a proteína TrwB do canal de conjugação do T4SS e é secretado. O outro monômero de TrwC permanece ligado à outra fita de DNA relaxando-a para que todo o plasmídeo possa ser conjugado. A ssDNA é, desta forma, bombeada de uma maneira contínua através do canal de conjugação pela ação da ATPase TrwB. A utilização de XACb0031 (TrwC) como isca resultou na interação desta com ela mesma (interação observada 1 vez).

TraD/TraK (XACb0024) é uma proteína que altera a topologia da região *oriT* e facilita a formação do relaxossomo (ZIEGELIN *et al.*, 1992). TraK é um determinante específico na transferência de plasmídeos com *oriT* recombinantes, pois reconhece somente o DNA que possui sua origem de transferência e não pode ser trocada entre membros de diferentes grupos de incompatibilidade. TraK interage somente com uma das fitas, especificamente com uma região da *oriT*, cobrindo aproximadamente 200 nucleotídeos (ZIEGELIN *et al.*, 1992). A análise de XACb0024 com a biblioteca de alta-resolução mostrou 2 interações com fragmentos da proteína hipotética XACb0020. É importante salientar que quando XACb0020 foi testada como “isca” também identificamos interações com TraD do plasmídeo.

Verificamos que ao utilizarmos a biblioteca de fragmentos exclusivos dos *loci tra/vir* observamos interações entre proteínas dos dois *loci*, principalmente quando utilizamos iscas de proteínas hipotéticas, enquanto que a utilização de proteínas dos T4SSs, resultam em interações já identificadas com proteínas do mesmo *loci* (com exceção de TraD). A Figura 41 (item Resultados) esquematiza essas interações. FIELDS (2005) já reportou que interações evolutivamente conservadas têm uma maior confiabilidade de serem verdadeiras do que interações detectadas apenas em um organismo. O fato de que ao utilizarmos, em uma biblioteca, fragmentos exclusivos de genes que pertencem a “clusters” homólogos e a verificação de que observamos interações cruzadas entre proteínas codificadas por esses dois “clusters”, diminuem nossa confiança quanto a significância fisiológica dessas interações.

Figura 64: Modelo do mecanismo de conjugação. (A) Após a clivagem do DNA pelo dímero TrwC, este se dissocia e somente uma molécula permanece covalentemente ligada à extremidade 5' de uma das fitas de DNA. (B) O complexo TrwC-DNA interage com TrwB que o bombeia para o interior do T4SS por onde será secretado. LLOSA *et al.*, 2002.

5.2.3- Nocautes de *VirD4* e *VirB4*

Em *Xac*, a patogenicidade e virulência estão associadas a atividade da proteína PthA e pouco se conhece a respeito de outras proteínas envolvidas neste processo (ASTUA-MONGE *et al.*, 2005). Até 2005, não existiam dados que mostrassem a funcionalidade e importância dos T4SSs no processo de patogenicidade de *Xac* e outras *Xanthomonas*. QIAN *et al.* (2005) utilizando o método de nocaute gênico por elementos de transposição (EZ::TN transposon) identificaram que a mutação do gene *VirB8*, que codifica uma das proteínas formadoras do canal periplasmático do T4SS, suprimiu os sintomas de podridão negra em repolho (*Brassica oleraceae* cv Jingfeng) causada por *Xanthomonas campestris*. ASTUA-MONGE *et al.* (2004) utilizando o meio XVM2, que supostamente mimetiza as condições ambientais do espaço intercelular na planta (ASTUA-MONGE *et al.*, 2000), identificaram, por análises de expressão gênica através de microarranjos de DNA, a expressão de genes do T3SS (*hrcJ*, *hrcR*, *hrcU*, *hrcV*, *hrpB2* e *hrpB4*) e do gene *virB11*, localizado no T4SS codificado pelo cromossomo, dentre outros. Somando-se às observações de ALEGRIA *et al.* (2005) de que o T4SS codificado por genes presentes no plasmídeo pXAC64 de *Xac* provavelmente codifica um sistema conjugativo “tradicional”, e de que o T4SS codificado por genes do cromossomo possa possuir papel na patogenicidade de *Xac*, realizamos ensaios de patogenicidade em laranja pêra e limão-cravo com mutantes em cada um dos T4SS (vide item Resultados).

A mutação do gene XACb0045 (*virB4*) presente no plasmídeo, não resultou em um fenótipo de patogenicidade alterado, tanto em laranja quanto em limão-cravo, como era

esperado. Entre os cinco clones analisados de mutantes para a proteína acopladora VirD4 codificada pelo *locus* cromossomal, apenas um apresentou alteração fenotípica visível, tanto em folhas de laranja quanto em limão-cravo. Outro clone apresentou diferenças visíveis somente quando inoculado em limão-cravo (experimento realizado em colaboração com Prof. Dr. Júlio Cesar de Oliveira -UNESP-Jaboticabal). Homólogos de VirD4 são necessários na transferência do DNA conjugativo ou outros substratos pelo T4SS, mas não na produção do *pilus* (SCHRÖDER e LANKA, 2005; MONCALIAN *et al.*, 1997). Sendo assim, sugerimos que mutações em proteínas constituintes do *pilus*, como VirB8 possam futuramente evidenciar melhor a função deste sistema em *Xac*.

5.4. Interações de proteínas do T3SS e do T4SS com proteínas de *Citrus sinensis*

a) Interações envolvendo as proteínas PthA2 e PthA4

Um importante mecanismo na patogenicidade de muitas bactérias é a transferência de proteínas de virulência através do Sistema Secretório do Tipo III (T3SS) às células vegetais ou animais. Este sistema atua sobre uma grande variedade de proteínas efetoras de virulência, transferindo-as diretamente para o apoplasto ou citoplasma da célula vegetal. Essas proteínas são classificadas de acordo com a similaridade de suas seqüências e podem assumir funções das mais diversas desde atividades enzimáticas, e. g., cisteína proteases, “ubiquitin-like” proteases, E3 ubiquitina ligases e fosfatases, até a ativação da transcrição de genes-alvo (GÜRLEBECK *et al.*, 2006, GRANT *et al.*, 2006).

A família AvrBs3 de fatores de virulência inclui mais de 40 proteínas de diferentes patovares de *Xanthomonas* e *Ralstonia*, embora nem todas as *Xanthomonas* possuam membros dessa família (SCHORNACK *et al.*, 2006). A característica mais marcante desses homólogos de AvrBs3 é a presença de domínios ricos em leucina repetidos em tandem.

O gene *pthA* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi um dos primeiros genes *avrBs3* para o qual se demonstrou uma função no desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro (BRUNINGS e GABRIEL, 2003). *PthAs* possuem 97% de homologia com os genes de avirulência *avrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (BONAS *et al.*, 1989). A inserção de *pthA* em outras *Xanthomonas* confere a essas bactérias a habilidade de desencadear sintomas do cancro em *Citrus* (BRUNINGS e GABRIEL, 2003). Além disso, quando *pthA* é expresso constitutivamente em folhas de *Citrus* é suficiente para causar lesões cancrosas, além da ruptura da epiderme, indicando que a proteína PthA é o

fator principal de indução de hipertrofia celular e hiperplasia (DUAN *et al.*, 1999; SWARUP *et al.*, 1991). Os sintomas diretamente desencadeados pela expressão de *pthA* em *Citrus* são *Citrus*-específicos. Deste modo, a expressão de *pthA* em plantas não hospedeiras como tabaco, feijão, *populos* e algodão levam ao desencadeamento da resposta de hipersensibilidade (HR) (DUAN *et al.*, 1999). A expressão de *AvrBs3* em plantas hospedeiras também causa hipertrofia e hiperplasia das células do mesófilo, um fenótipo que lembra a formação de pústulas e lesões tipo cancro causadas por *X. campestris* pv. *vesicatoria* (MAROIS *et al.*, 2002).

Embora muitos genes homólogos à *AvrBs3* tenham sido isolados, ainda não estão disponíveis informações estruturais de alta resolução. A análise *in silico* de *AvrBs3*, (GINALSKI *et al.*, 2003; SCHRONACK *et al.*, 2006) sugere que o domínio repetitivo (de 15,5 a 17,5 repetições de 34 aminoácidos em *PthA1-4* de *Xac*) assemelha-se estruturalmente ao domínio tetratricopeptídico (TPR) (D'ANDREA e REGAN, 2003). TPR é um motivo estrutural que consiste de 3-16 repetições em tandem de 34 aminoácidos que media interações proteína-proteína e a montagem de complexos multiprotéicos (BLATCH e LASSLE, 1999). Baseado na homologia ao domínio TPR, cada unidade repetitiva de *AvrBs3* forma, supostamente, uma estrutura secundária com 2 α -hélices. A soma das unidades repetitivas gera, supostamente, uma estrutura terciária com 2 α -hélices entrelaçadas que se orientam no sentido “right-handed”, indicando a dimerização de duas cadeias polipeptídicas (Figura 65). De fato, GÜRLEBECK *et al.* (2005) demonstraram que a proteína *AvrBs3* de *Xcv* dimeriza-se na célula da planta antes de ser importada para o núcleo. Além disso, o domínio repetitivo é responsável pela dimerização e está associado à indução de sintomas em hospedeiros ou resposta de hipersensibilidade em não hospedeiros e deve interagir com proteínas da planta. Ensaios de “GST pull-down”, demonstraram que interações *AvrBs3-AvrBs3* ocorrem independentemente da presença de proteínas auxiliares (GÜRLEBECK *et al.*, 2005; SZUREK *et al.*, 2001).

SZUREK *et al.*, 2001, demonstraram que a porção N-terminal de *AvrBs3* é importante para a secreção e translocação da proteína pelo sistema secretório tipo III, mas não é essencial para a atividade da proteína na célula da planta. Quando os resíduos 2-152 de *AvrBs3* foram deletados, não houve secreção desta proteína pelo T3SS em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (GÜRLEBECK *et al.*, 2005). Isto explicaria o motivo pelo qual não observamos interações das proteínas *PthA2* _{Δ 1-128} e *PthA4* _{Δ 1-128} com proteínas relacionadas a esse sistema de secreção, quando estas foram testadas contra a biblioteca genômica de *Xac*. Nestes ensaios, verificamos que tanto *PthA2* _{Δ 1-128} quanto

PthA4 Δ 1-128 interagiram com outras isoformas de PthA o que está de acordo com a dimerização da proteína demonstrada por GÜRLEBECK *et al.* (2005).

Figura 65: Proteínas da família AvrBs3 supostamente formam uma superestrutura helicoidal que se assemelha a uma repetição tetratricopeptídica (TPR). Os resíduos variáveis estão representados em cores: (amarelo) resíduo 4, (vermelho) resíduos 12 e 13, (azul) resíduo 24. (A) modelagem utilizando o programa 3D Jury/MODELLER baseando-se na estrutura do domínio TPR. (B) ilustração esquemática da alfa-alfa super-hélice.

Num ensaio de duplo-híbrido realizado por SZUREK *et al.* (2001) utilizando o gene de avirulência *avrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) como isca, contra uma biblioteca de cDNA de pimenta (*Capsicum annuum*), foi identificada uma interação entre *avrBs3* e a α -importina. A α -importina juntamente com a β -importina, possibilita a passagem do complexo através do poro nuclear (Figura 66, ULLMAN *et al.*, 1997; GOLDFARB *et al.*, 2004; GÜRLEBECK *et al.*, 2005). A deleção da região NLS presente em todos os membros da família AvrBs3 impossibilita, na maioria dos casos, o reconhecimento da Avr pela planta, sugerindo que o reconhecimento dessas proteínas Avr pode ocorrer no núcleo (SZUREK *et al.*, 2001). Além disso, a ativação do sistema de defesa do hospedeiro depende da presença da região C-terminal, a qual contém resíduos ácidos (AAD) (LAHAYE e BONAS, 2001). Observamos interação entre PthA4 $_{129-1164}$ de *Xac* e importina α -1 de *Citrus*, o que é consistente com os resultados mencionados acima. Nossos dados reforçam a hipótese de que membros da família AvrBS3/PthA atuam no núcleo da célula hospedeira. Somando-se a observação de que a dimerização é uma característica comum em muitos reguladores de transcrição, SZUREK *et al.* (2001) sugerem que AvrBs3 controla a expressão de genes da planta envolvidos no estabelecimento de interações compatíveis e incompatíveis. Considerando a grande semelhança entre as respostas induzidas por AvrBs3 e PthAs nas células hospedeiras e a

identidade de sequência entre as duas proteínas, é possível que PthA também funcione como fator de transcrição em *Citrus* ativando a transcrição de genes relacionados ao desenvolvimento dos sintomas do cancro.

Figura 66. Modelo de translocação e interação entre a proteína AvrBs3 de *Xcv* com alvos da célula hospedeira. (1) AvrBs3 é secretado pela célula bacteriana pelo T3SS (2) dimerizando-se no citoplasma da célula vegetal (3) e associando-se à α -importina (4) para ser transportada para o núcleo (5). Sugere-se que, no núcleo, AvrBs3 ative a expressão de genes da planta ligando-se diretamente ao DNA ou através de interações com outros fatores de transcrição do hospedeiro. (GÜRLEBECK *et al.*, 2005).

Além da interação identificada com a α -importina, verificamos (em colaboração com o Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti) uma interação com o produto de um cDNA de *Citrus* que possui 94% de identidade com a ciclofilina de *Ricinus communis* e de outras plantas.

As ciclofilinas, ou proteínas de ligação a ciclosporinas, pertencem à classe de proteínas conhecidas como imunofilinas. Originalmente descobertas como alvos de drogas imunossupressoras, estão presentes em uma grande variedade de organismos, desde bactérias, a plantas e animais. Além da atividade imunossupressora, as ciclofilinas possuem atividade enzimática de peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase), não relacionada ao mecanismo de imunossupressão. A busca por domínios no banco de dados do Pfam, identificou na sequência traduzida da presa do cDNA de *Citrus* um domínio majoritário de PPIase. Um pequeno domínio C-terminal não tem função conhecida.

A isomerização das ligações peptídicas que precedem resíduos de prolina em uma proteína, conhecida como ligação peptidil-prolil, constitui uma etapa limitante na velocidade de enovelamento de uma proteína. Isto ocorre devido a limitações estéricas intrínsecas das ligações com resíduos de prolina, que resultam em barreiras energéticas rotacionais elevadas. As ciclofilinas têm justamente o papel de acelerar a reação de isomerização da ligação *cis* para a ligação *trans* e facilitar o processo de enovelamento (ROMANO *et al.*, 2004b).

Em plantas, as ciclofilinas estão presentes em diferentes organelas celulares e em diferentes tecidos, mas sua função em cloroplastos parece ser particularmente importante. Muitas ciclofilinas apresentam de 3-4 resíduos conservados de cisteína, sugerindo sua importância em reações redox nestas organelas. Estudos *in vitro* sugerem a participação da tioredoxina na regulação da atividade das ciclofilinas. A ciclofilina, na sua forma oxidada, mostrou ser cataliticamente inativa, sendo sua atividade PPIásica restabelecida por incubação e redução com a tioredoxina de cloroplasto (MOTOHASHI *et al.*, 2001). A família de ciclofilinas de *Arabidopsis* constitui uma das maiores já descritas, consistindo de 29 proteínas diferentes (ROMANO *et al.*, 2004b).

Tem sido demonstrado que a expressão de ciclofilinas em plantas é induzida em várias situações de estresse como exposição a HgCl₂, etileno, ácido siálico, temperaturas altas ou baixas, luz, infecções virais, dentre outros (ROMANO *et al.*, 2004a) e seu papel no enovelamento de proteínas e sua modulação redox parecem ser essenciais para impedir os efeitos deletérios advindos destas situações de estresse.

Através de ensaios de duplo-híbrido utilizando a proteína VirD2 de *A. tumefaciens* DENG *et al.* (1998) identificaram interações com 2 isoformas de ciclofilinas de *Arabidopsis thaliana*. VirD2, é uma endonuclease que cliva o T-DNA gerando uma fita simples de DNA na qual se liga covalentemente na extremidade 5'. Juntamente com o T-DNA, VirD2 é secretada pelo T4SS para a célula hospedeira. Além do domínio de endonuclease, VirD2 possui uma região de sinalização nuclear (NLS) que guia o T-DNA para o núcleo da célula da planta. Entretanto, as análises de duplo-híbrido demonstraram que a região necessária para a interação entre VirD2 e as ciclofilinas (resíduos 147-337) é distinta da endonuclease e do NLS (DENG *et al.*, 1998).

A natureza ubíqua das ciclofilinas torna difícil a atribuição de funções exatas para essas proteínas. Evidências sugerem que essas proteínas podem ajudar no dobramento de proteínas e servir como chaperones (MARKS, 1996; BAKER *et al.*, 1994). Como então explicar a natureza da interação com PthA por nós descrita? DENG *et al.* (1998) sugerem que, como as ciclofilinas participam na resposta a uma variedade de infecções parasíticas como leishmaniose, malária, toxoplasmose e até mesmo na infecção por HIV, os patógenos freqüentemente explorariam as vias ligadas às ciclofilinas. No caso de VirD2, foi sugerido que ao entrar no citoplasma da célula hospedeira, VirD2 mudaria sua conformação para realizar sua função no novo ambiente. Essa mudança conformacional permitiria que VirD2 ocultasse o domínio de endonuclease que seria somente necessário na célula bacteriana e expusesse o domínio de sinalização nuclear, requerido para o transporte do T-DNA para o núcleo (DENG *et al.* 1998). Nesse contexto, a atividade PPIásica poderia ajudar a própria

VirD2 a se dobrar em uma conformação diferente. Essa hipótese, pode ser também aplicada à proteína PthA, já que esta também possui um NLS que é necessário para que a proteína se localize no núcleo e exerça sua função. Também é possível que a ligação das ciclofilinas seja requerida na manutenção de um estado funcional competente de PthA, devido à atividade que exercem como chaperonas. Estudos demonstraram que, em resposta a condições de estresse, algumas ciclofilinas possuem atividade de chaperonas e que os níveis de mRNA destas proteínas é aumentado em plantas submetidas a estresses abióticos, como ferimentos (MARIVET *et al.*, 1994). Interessantemente, uma das principais vias de acesso de *Xac* ao espaço intercelular é através de danos teciduais na planta. Além disso, DENG *et al.* (1998) supõem que a interação de VirD2 com ciclofilinas pode ser importante tanto no citoplasma como no núcleo, uma vez que algumas ciclofilinas citossólicas estão distribuídas em ambos compartimentos. Somando-se às funções já descritas, as ciclofilinas também funcionam como proteínas de ligação ao DNA e podem estar associadas ao processo de apoptose (MONTAGUE *et al.*, 1997).

Finalmente, identificamos uma interação com uma proteína que apresenta 69% de identidade com AtTDX de *Arabidopsis thaliana*. AtTDX possui similaridade a várias “Hsp70-interacting protein-thioredoxin” (HIP-TRX) de plantas. Tioiredoxinas são proteínas pequenas (aprox. 12 kDa), presentes em todos os organismos, que fazem parte de um sistema importante na manutenção de um ambiente intracelular redutor, do qual também fazem parte a tioiredoxina redutase e um doador de elétrons como NADPH ou a ferredoxina. A manutenção de um estado redutor dentro da célula é necessária para a atividade de proteínas das mais diversas, bem como para evitar danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos. Na manutenção deste ambiente redutor, outro sistema redutor de grupos tióis, glutathione/glutathione redutase/NADPH também é de extrema importância. Pelo fato de mediar alterações redox, as tioiredoxinas estão envolvidas em muitos processos metabólicos, na sinalização celular, na regulação da atividade de muitos fatores de transcrição, no enovelamento de proteínas e na proteção antioxidante celular (ARNÉR e HOLMGREN, 2000; BAUMANN e JUTTNER, 2002). Muitas destas funções dependem da capacidade das tioiredoxinas de reduzir pontes dissulfeto em proteínas alvo. As tioiredoxinas exercem esta função por meio de cisteínas presentes no seu sítio catalítico Cys-X-X-Cys. Na reação de redução, as tioiredoxinas são oxidadas, tornando-se inativas. A ação de tioiredoxinas redutases reconverte as tioiredoxinas na forma reduzida ativa. Em plantas, o sistema tioiredoxina é particularmente complexo, sendo encontradas pelo menos 20 isoformas de tioiredoxina em *Arabidopsis thaliana* (GELHAYE *et al.*, 2005).

Além do domínio de tioredoxina na região C-terminal, o domínio N-terminal HIP da proteína de *Citrus* com a qual PthA interage (HIP-TRX) é formado por três repetições do motivo TPR (Figura 67). O motivo TPR (“tetratricopeptide repeat”) está presente em uma grande diversidade de proteínas de diferentes organismos, de bactérias a humanos. Como anteriormente mencionado para a proteína PthA, os domínios TPR consistem de 3–16 repetições em tandem de 34 amino ácidos, embora motivos individuais também possam ser encontrados. O motivo TPR está envolvido em interações proteína–proteína e na montagem de complexos protéicos. Proteínas contendo motivos TPRs estão envolvidas em uma grande variedade de processos biológicos, como regulação de ciclo celular, controle transcricional, transporte de proteínas para mitocôndrias e enovelamento de proteínas (D’ANDREA e REGAN, 2003). Em diferentes organismos, a proteína HIP atua como co-chaperonina, ligando-se ao domínio ATPásico da chaperonina HSP70 e estabilizando a conformação com ADP ligado, o que favorece a ligação a polipeptídeos alvo. Em células de mamífero, HIP participa de um complexo multi-chaperonina, que contém tanto HSP70 quanto HSP90 e regula vias de transdução de sinal através da interação com receptores hormonais, como o receptor para glicocorticóides, e com proteína quinases (VIGNOLS *et al.*, 2003). A proteína AtTDX de *Arabidopsis*, semelhantemente à HIP, também interage com uma HSP70 de levedura. Verificou-se que estresse oxidativo elimina a interação de AtTDX com HSP70, sugerindo que esta regula a atividade de HSP70 de acordo com o estado redox da célula (VIGNOLS *et al.*, 2003).

Figura 67: Domínios presentes na proteína de *Citrus* pertencente à família das HIP-TRX “AtTDX-like”, apresentando três motivos TPRs (verde) e um domínio tioredoxina carboxi-terminal (vermelho). O domínio central da proteína não tem função conhecida. (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/).

Interessantemente, a ciclofilina Cyp40 também contém motivos TPR e interage com HSP90 (PRATT e TOFT, 2003). Apesar de a ciclofilina encontrada em *Citrus* não possuir domínios TPR, é possível que esta participe juntamente com HIP-TRX de um complexo multi-chaperonina envolvendo HSP70 e HSP90. Em células animais, o complexo HSP90-ciclofilina auxilia o enovelamento de fatores nucleares como os receptores de glicocorticóides (PRATT e TOFT, 2003). O fato de tioredoxinas também interagirem com fatores de transcrição e com receptores para glicocorticóides (ARNÉR e HOLMGREN, 2000), e sendo PthA um provável fator de transcrição, sugere a

possibilidade da formação de um complexo HSP70-HSP90-HIP-TRX, que seria necessário para enovelar, estabilizar e/ou transportar PthA para o núcleo da célula hospedeira (Figura 68) (Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti, comunicação pessoal).

Figura 68: Esquema representando as interações com a proteína PthA. O complexo HSP70-HSP90-HIP-TRX e ciclofilina seria necessário para enovelar ou estabilizar PthA (proteína inativa), desse modo expondo seus sítios de localização nuclear (NLS) (proteína ativa). A alfa-importina reconheceria PthA e o levaria para o núcleo da célula hospedeira onde PthA atuaria como um fator de transcrição (Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti, comunicação pessoal). Adaptado de SCHORNACK *et al.*, 2006.

b) Interações envolvendo HpaA

O T3SS de *Xac* é composto por 25 genes *hrp* que mapeiam uma região de aproximadamente 23 kb no cromossomo, e estão compreendidos entre *hpaF* e *hpa2* (Figura 14, Introdução). Embora se suponha que a proteína HpaA de *Xac* é uma possível candidata a ser secretada, uma vez que a deleção do gene *hpaB*, uma possível chaperona do T3SS, com a qual HpaA interage i) eliminou a secreção de HpaA em cultura líquida utilizando o meio XVM2 e ii) diminuiu a virulência de *Xac* em hospedeiros sensíveis (Dra. Miryam Quelopana Marroqin, e Paola A. Cappelletti, comunicação pessoal), nada se sabe sobre os possíveis alvos dessas proteínas em seus respectivos hospedeiros.

Estudos de mutações sítio-dirigidas nos NLSs de HpaA de *Xcv* identificaram que quando esta proteína é expressa como fusão heteróloga em célula de cebola (não hospedeiro), localiza-se no núcleo (HUGUET *et al.*, 1998). Além disso, esses mutantes possuem um fenótipo intermediário quando inoculados em plantas susceptíveis indicando que HpaA é um fator essencial no desenvolvimento da doença. HpaA, juntamente com

PthA (secretadas pelo T3SS de *Xanthomonas*), VirD2 e VirE2 (secretadas pelo T4SS de *A. tumefaciens*) estão entre poucas proteínas de virulência que contêm pelo menos um sítio NLS e que são dirigidas para o núcleo da célula hospedeira (BÜTTNER, 2006).

O reconhecimento de proteínas efetoras pelo sistema de defesa basal, mediado pelas proteínas R, apresenta-se como um grande desafio aos patógenos na invasão de plantas. Como uma estratégia de contra-ataque ao mecanismo de defesa, acredita-se que muitas bactérias desenvolveram um grupo de efetores para suprimir a imunidade baseada em HR. Estes efetores frequentemente mimetizam proteínas eucarióticas para sutilmente modular processos celulares do hospedeiro de modo que promovam a invasão, multiplicação e disseminação bacteriana (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b). Um exemplo, é a proteína AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*), que é patogênica em algumas linhagens de tomate.

P. syringae secreta, através do T3SS, proteínas de avirulência, dentre elas, AvrPto e AvrPtoB que são reconhecidas pela proteína Pto de tomate. O reconhecimento de AvrPto e AvrPtoB mediado por Pto também depende da proteína Prf para causar a morte celular programada (PCD) baseada na resposta de hipersensibilidade (HR). Na ausência de Pto, entretanto, ambos AvrPto e AvrPtoB suprimem a PCD baseada em HR (HAUCK *et al.*, 2003; ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b). Além disso, a super-expressão de AvrPtoB em folhas de *Nicotiana benthamiana* suprime a resposta de morte celular programada que, de outra maneira, seria desencadeada por outros indutores de PCD de *P. syringae*, indicando que o alvo de AvrPtoB não é a proteína R de *N. benthamiana* (GRANT *et al.*, 2006; ABRAMOVITCH *et al.*, 2006a). AvrPtoB também suprime PCD em levedura indicando que esta proteína atue como um supressor de morte celular em eucariotos (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b).

A atividade enzimática de muitas proteínas que suprimem HR indicam que estas estão modificando ou degradando alvos que estariam envolvidos nesta resposta. No caso de AvrPtoB, mutações na região C-terminal suprimem a atividade anti-PCD indicando que esta região é responsável por esta atividade (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b). AvrPtoB é uma proteína de 59 kDa com uma arquitetura modular, onde o sítio de reconhecimento da proteína Pto está localizado na região N-terminal (1-387) e a atividade anti-PCD está localizada na região C-terminal (308-553) (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b). Recentemente, a determinação da estrutura do domínio C-terminal (resíduos 434-553) de AvrPtoB mostrou que a região possui homologia ao domínio “U-box” e “RING FINGER C3HC4” de E3 ubiquitina proteína-ligases eucarióticas (Figura 69, JANJUSEVIC *et al.*, 2006). Análises de duplo-híbrido identificaram que AvrPtoB interage com a ubiquitina e

que o domínio C-terminal possui atividade de E3 ubiquitina-ligase *in vitro* (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b). A ubiquitina também interagiu com outros efetores homólogos à AvrPtoB, como as proteínas B728a (de *P. syringae* pv. *syringae*) e T1 (de *P. s. pv. tomato*) e VirPphA (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) que possui 51% de identidade com AvrPtoB (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006a).

O mecanismo de ubiquitinação resulta na ligação covalente da proteína ubiquitina ao substrato protéico destinado à degradação. Outros três componentes participam do processo: a enzima ativadora da ubiquitina (E1), a enzima de conjugação da ubiquitina (E2), e a ubiquitina proteína-ligase (E3). A proteína E1, utiliza a clivagem do ATP para formar uma ligação tioéster de alta energia entre um resíduo de cisteína de sua própria cadeia e o resíduo C-terminal (glicina) da ubiquitina. A ubiquitina é então transferida para a enzima E2, liberando a enzima E1. E3 liga-se à proteína-alvo e o complexo E2-ubiquitina é ligado à E3 de modo que a ubiquitina seja transferida de E2 para o alvo. A proteína E3 então libera a enzima E2 e a proteína ubiquitinada. Este processo pode ocorrer sucessivamente até que a proteína seja poli-ubiquitinada e então degradada pelo complexo do proteossomo (NANDI *et al.*, 2006). Sendo o processo de ubiquitinação altamente conservado em eucariotos, com um importante papel em morte celular e imunidade em plantas, esta via é, por consequência, uma excelente candidata a ser o alvo de proteínas que poderiam interferir no mecanismo de PCD.

Nossos resultados de duplo-híbrido utilizando a proteína HpaA como isca identificaram presas, na maioria dos casos, derivadas de uma única proteína de *Citrus* com dois domínios “zinc finger”. O domínio C-terminal dedo de zinco (presente em todas as presas) pertence à família “RING C3HC4” de E3 ubiquitina-ligases (vide item Resultados). O domínio RING (“Really New Interesting Gene”) é caracterizado pela presença de uma região rica em cisteína que coordena 2 átomos de zinco (Figura 70, STONE *et al.*, 2005). Todavia, em contraste com os domínios dedos de zinco que se ligam ao DNA, o domínio RING é essencial na atividade catalítica da E3 ubiquitina-ligase (LORICK *et al.*, 1999).

Além das observações acima, constatamos com o alinhamento de HpaA (271 aa) com AvrPtoB (553 aa), que HpaA possui 21% de similaridade à região N-terminal de AvrPtoB (dado não mostrado). Outros membros da sub-família HopAB, como HopPmaL e HopPmaN também possuem similaridade à AvrPtoB (HopAB2), mas contêm uma região C-terminal truncada que carece do RING (Figura 71). GRANT *et al.* (2006) sugerem que patógenos bacterianos possuem mecanismos genéticos que misturam e combinam domínios que seletivamente ampliariam a extensão de alvos do hospedeiro. Assim, membros da família HopAB dividiriam o mesmo domínio N-terminal para se ligar à uma

proteína-alvo particular do hospedeiro e, uma vez ligados, esses alvos estariam sujeitos a diferentes destinos dependendo do domínio C-terminal presente em cada proteína, por exemplo, a via de sinalização de PCD. Nossas observações de que (i) HpaA possui similaridade com a região amino terminal de AvrPtoB e que (ii) HpaA interage com uma proteína de *Citrus* com homologia ao domínio C-terminal de AvrPtoB, levantam a hipótese que a ligação de HpaA à proteína “RING C3HC4” E3 ubiquitina-ligase de *Citrus* estaria mimetizando o papel de AvrPtoB.

Figura 69: Estrutura do complexo SCF da E3 ubiquitina-ligase. O complexo SCF é formado pelas proteínas Cul1, Skp1 e Skp2 (F-box). O domínio Rbx1 da proteína Cul1 é homólogo ao domínio RING (vermelho) e se liga à E2 proteína ligase. (A) representação esquemática. (B) estrutura quaternária (JANJSEVIC *et al.*, 2006).

Figura 70: Alinhamento das estruturas de AvrPtoB com o domínio “RING-finger” e “U-box” de Rbx1, Rag1, PRP19 e AtPUB de *A. thaliana* (JANJSEVIC *et al.*, 2006).

ClustalW

```

XcvHpaA      ---MIRRISP-GTLRPSVSIIEHGSSHHHGDHHDASGTSAGSPTDIAARAPRLRP----A 52
XooHpaA      ---MIRRISP-GPLQPSVSTEHGDSHHNADHADAAGTSAGSPANIAARATRLRP----A 52
XacHpaA      ---MIRRISP-GTLPPSVSTEHGTSHH----HANSAGTAAASPTDAATHIPRLRP----A 48
XagHpaA      ---MIRRISP-GTLPPSVSTEHGTSHH----HANSAGTGAASPTDAATHIPRLRP----A 48
AvrPtoB      MAGIN-RAGPSPGAY-FVGHTD-PEPV.SGQAHGSGSGASSNSPQVQPRPSNTPPSNAPAP 57
hopPmaL      MVGISGRAGPSGSYNYSGHTDNPPEPV.SGRARDSNSEANSNSPQVPP-PLNAPAS----P 55
              :  *  .  *  *  .  :  .  :  .  .  .  :  *  *  .  .  .  .

XcvHpaA      PPRRRRRGIRSLDGQEDEFDANEQ-EEIEAKRECALRGRVSVAITPAQSREHGQGDQHGG 111
XooHpaA      PPRRRRRGIRSLDGQEDEFDANEQ-EEIEAKRECALRGRVSVAITPAQSREHGQGDQHGG 111
XacHpaA      PPRRRRRGVRSLDGQEDELDATEQ-EENEAKRECILRGRVSVAVAAQGREQGQGDQHGS 107
XagHpaA      PPRRRRRGVRSLDGQEDELDATEQ-EENEAKRECILRGRVSVAVAAQGREQGQGDQHGS 107
AvrPtoB      PPTGRERLSRSTALSRTREWLEQMPMTAEASVRRRPQVTADAATPRAEARRTPPEATAD 117
hopPmaL      MPAGPRFLRSMALSSQTREWLEKMPTEAEAGVPIRLQERAANTAPQARAEERTQPAD 115
              *  *  *  *  *  .  :  :  *  *  .  .  :  .  :  .  .  .  .

XcvHpaA      DRSTHTDDPQ-----AGPWSAAPAQLSDSIRTCIDAIVDRYVTRRDADPV.AKRHA 162
XooHpaA      DRNTHTDTPQ-----AGPWRGAAPQVTDSTIRTCIDAIDRYVARRDADPV.AKRNA 162
XacHpaA      GRNAHADDPQ-----TGPWQAGAPAAALSDGVDAIDGILDRYVMTRDADPMVRRHA 158
XagHpaA      GRDAHADDPQ-----TGPWQAGAPAAALSDGVDAIDGILDRYVMTRDADPMVRRHA 158
AvrPtoB      ASAPRR-----GAVAHANSIVQQLVSEGADISHTRNMLRNAMNGDA 158
hopPmaL      AAAPHARAERGRTLQAPASTSPLYTGAVPRANRIVQQLVEAGADLANIRTMFRNMLRGE 175
              .  :  .  .  .  .  .  .  :  .  .  .  .  .  .  .  .

XcvHpaA      LAAALVELRAVGVSHP-----AVAPLTATIWRMLREHLR----- 196
XooHpaA      LAAALVELRAIGVSHP-----AVAPLTETVWRMLREHLS----- 196
XacHpaA      LAAALVELRAIGVSHP-----AIASLT'TTVWRMLREHFR----- 192
XagHpaA      LAAALVELRAIGVSHP-----AIASLT'TTVWRMLREHFR----- 192
AvrPtoB      VAFSRVEQNIIFRQHFPNMPMHGISRDSELAIELRGALRRVHQQAASAPV.RSP----- 211
hopPmaL      MILSRAEQNVFLQHFDPMLPCGIDRNSLAIALREALRRADSQQAARAPARTPPRSSVRT 235
              :  :  .  *  .  .  .  *  .  .  .  .  .  .  *  :  :  *  :  :

XcvHpaA      -----AYDKATAAENLLALRTRLLELMPS-----ELEPV.PALRNFHLLLPLILLN 241
XooHpaA      -----SYDRATAAENLQALRTRLLELMPS-----ELEPV.PALRNFHLLLPLILLN 241
XacHpaA      -----SSGSATPTENLQALRKRLMELMPS-----ELEPV.PALRNFHLLLPLILLN 237
XagHpaA      -----SSGSATTENLQALRKRLMELMPS-----ELEPV.PALRNFHLLLPLILLN 237
AvrPtoB      ---TPTPASPAASSSGSSQRSLFGRFARLMAPNQGR---SSNTAASQTPV.DRSPPRVNQR 265
hopPmaL      PERSPAPTATESSSGSNQRLGRFAGLMTSNQRRPSSASNASTSQRPV.DRNPPRINLM 295
              :  :  .  .  .  :  *  *  *  .  .  .  .  .  .  .  *  :

XcvHpaA      AEKPRRRVDRTHAITRLNTLLIEPQQ--AAQEVPR----- 275
XooHpaA      AEKPRRQVDRRHAIITRLNTLLIEPQQ--AAQEVPR----- 275
XacHpaA      AEKPRRQVDRTHAVTRLNTLLIEPQQ--AAQEVPR----- 271
XagHpaA      AEKPRRQVDRTHAVTRLNTLLIEPQQ--AAQEVPR----- 271
AvrPtoB      PIRVDRAAMNRNGNDEADAALRGLVQGGVNLLEHLRTALERHVMQRLPIPLDIGSALQNVG 325
hopPmaL      PTGANRVAMNRNGNNEADAALQALQNGINMEDLRAALEAYIVWLRPIPLDIANALEGVG 355
              .  .  *  .  *  .  .  :  :  *  *  .  .  .  .  .  .

AvrPtoB      INPSIDLG-ESLVQHPLLNLNVALNRMLGLRPSAERAPRPAPV.V.PATASRRPDGTRATR 384
hopPmaL      ITPRFDNPPEAKVDNPLMNLSSALKRRLDA----- 385

AvrPtoB      LRVMPEREDYENNVAAGVRLNLNLPVGVVRQAVAAFVTDRAERPAAVVAIRAAALDPIASQ 444

AvrPtoB      FSQRLRTISKADAEEELGFKDAADHHTDDVTHCLFGGELSLSNPDQQVIGLAGNPDTDSQ 504

AvrPtoB      PYSQEGNKDLAFMDMKKLAQFLAGKPEHPMTRETNAENIAKYAFRIVP 553

```

Figura 71: Alinhamento das seqüências de HpaA de *Xac* (*XacHpaA*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*XooHpaA*), *X.c.* pv. *vesicatoria* (*XcvHpaA*) e *X. axonopodis* pv. *glycines* (*XagHpaA*) e AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e seu homólogo HopPmaL de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. O alinhamento foram obtido através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Aminoácidos idênticos (*), bem conservados (:), e conservados (.). Predições de estruturas secundárias obtidas utilizando o servidor “PredictProtein” (<http://www.predictprotein.org/>): regiões de alfa hélice de *XacHpaA* e AvrPtoB estão grifados em vermelho e regiões de fita beta estão grifados em azul. A seqüência do domínio C-terminal de AvrPtoB (resíduos 436-553, vide Figura 61), cuja estrutura foi resolvida (pdb 2FD4), está em negrito (JANJVSEVIC *et al.*, 2006).

Em um modelo proposto por ABRAMOVITCH *et al.* (2006b), AvrPtoB poderia direcionar a ubiquitinação e subsequente degradação de componentes do hospedeiro que estão envolvidos no mecanismo de resistência baseado em PCD. De acordo com este modelo, a região N-terminal de AvrPtoB é reconhecida pelas proteínas Rsb e Prf do hospedeiro que sinalizaria para a via de transdução de sinal de HR. A região C-terminal de AvrPtoB, que possui atividade E3 ubiquitina-ligase, se ligaria a enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e serviria como um adaptador para a ligação da ubiquitina a um suposto regulador positivo da HR (que poderia ser um alvo do complexo Rbs-Prf ativado) (Figura 72). Embora a ubiquitina tenha sido identificada baseando-se em seu papel na degradação protéica, sabemos atualmente que a mono-ubiquitinação e a poli-ubiquitinação de proteínas estão envolvidas em mecanismos diversos como a regulação da transcrição e tradução, reparo de DNA, tráfego de proteínas e sinalização celular (SULLIVAN, 2003). Em nossa hipótese, se a ligação de HpaA à proteína “RING C3HC4” E3 ubiquitina proteína-ligase mimetizasse o papel de AvrPtoB, então, outros substratos de HpaA seriam marcados pela ubiquitina, o que poderia resultar na degradação destes pelo proteossomo ou em seu processamento.

Figura 72: Supressão da resposta de defesa, mediada por genes R, através de efetores do T3SS: plantas desenvolveram genes de resistência (R) para a detecção de proteínas de avirulência. Muitas proteínas conseguem suprimir as respostas de defesas baseadas em HR. (A) Em tomate, a região N-terminal de AvrPtoB (azul) é reconhecida pelas proteínas Rsb e Prf. A região C-terminal codifica uma E3 ubiquitina-ligase com domínio de ligação à proteína de conjugação da ubiquitina (E2). (B) um regulador positivo de HR seria alvo de ubiquitinação o que poderia levá-lo à degradação ou alteração de sua localização celular, interferindo na resposta hipersensível. PCD: “programmed cell death”. ABRAMOVITCH *et al.*, 2006b.

5.5- Avaliação da técnica de duplo-híbrido na identificação de interações entre proteínas em larga-escala

O estudo das redes de interações entre proteínas através de técnicas em larga-escala tem se tornado cada vez mais comum após o sequenciamento de muitos organismos (NOIROT e NOIROT-GROS, 2004). Até a atualidade, o “interactoma” (rede de interações entre proteínas) de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisadores que se utilizam de diferentes tecnologias (UETZ *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2001; HO *et al.*, 2002; GAVIN *et al.*, 2002; GAVIN *et al.*, 2006; PUIG *et al.*, 2006), proporcionando assim, meios para a comparação desses diferentes métodos.

Até o ano de 2002 foram identificadas aproximadamente 80.000 interações entre proteínas de levedura. Destas, somente um número extraordinariamente pequeno (2.400) era sustentado por mais de uma metodologia (Von MERING *et al.*, 2002). Algumas explicações são sugeridas para este fato: os métodos ainda não atingiram a saturação, muitos métodos produzem um número muito grande de falsos-positivos e muitos métodos têm dificuldade de identificar certos tipos de interações. Por exemplo, a metodologia do duplo-híbrido falharia na identificação de interações entre proteínas de membrana, comparativamente a outros métodos, visto que as interações ocorrem no núcleo da célula da levedura (Von MERING *et al.*, 2002). Além disso, outros problemas podem ser destacados: (i) somente um par de proteínas é testado por vez, (ii) não há a detecção de interações cooperativas, (iii) as interações acontecem no núcleo, onde muitas proteínas não se encontrariam em seu estado conformacional nativo, (iv) algumas proteínas poderiam ser tóxicas para a levedura e (v) poderiam ocorrer problemas relacionados à fusão dos domínios ativadores e de ligação ao DNA com as proteínas.

Entretanto, o problema maior enfrentado é a identificação de falsos-positivos. Von MERING *et al.* (2002) estimam que o número de falsos-positivos gerados em ensaios de duplo-híbrido é da ordem de 50%. As razões para a identificação de falsos-positivos incluem: interações entre proteínas de diferentes localizações celulares ou proteínas expressas em tempos distintos, proteínas que apresentam domínios comuns, proteínas auto-ativadoras dos genes repórteres, por exemplo, um fator de transcrição. Neste último caso, lembramos que a utilização de cepa PJ694a, que possui diferentes genes repórteres sob o controle de diferentes promotores, reduz significativamente o número de falsos-positivos (JAMES *et al.*, 1996, COATES e HALL, 2003).

Apesar dos problemas intrínsecos da técnica, devemos destacar alguns pontos relevantes sobre os resultados obtidos em nossos ensaios de duplo-híbrido com a biblioteca genômica de *Xac*.

- a) Muitos ensaios realizados em trabalhos anteriores (ALEGRIA *et al.*, 2004 e 2005, ANDRADE *et al.*, 2006) utilizaram componentes dos T3SS e T4SS e os sistema de *quorum sensing* e fatores sigma como iscas em triagens contra a mesma biblioteca de presas derivadas do DNA genômico total de *Xac*, obtendo resultados fisiologicamente relevantes e consistentes. Nestes casos, qualquer interação observada entre dois componentes de um mesmo sistema apresenta poucas chances de ser uma interação inespecífica. Por exemplo, se considerarmos que o *locus hrp* é constituído por 25 genes, isso representa apenas 0,5%, aproximadamente, dos quase 5.000 genes de *Xac*;
- b) Boa parte das nossas interações com proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes foi confirmada em triagens reversas (onde a presa foi posteriormente utilizada como isca) contra a mesma biblioteca genômica;
- c) Um grande número de clones independentes foi identificado quando utilizamos a mesma isca, isto é, diferentes segmentos das mesmas presas interagiram com a mesma isca específica.

Todavia, acrescentamos ressalvas quanto à utilização da biblioteca de fragmentos derivados somente dos *loci tra/vir* do T4SS. Neste caso, a identificação de falsos positivos fica muito prejudicada por se tratar de proteínas que participam de um mesmo sistema. Nossa experiência demonstrou também que a amplificação de fragmentos relativamente pequenos (vide item Resultados) de DNA dos *loci vir* e posterior sonicação pode ter prejudicado a clonagem de fragmentos distintos em fase correta, pois alguns pontos de quebra seriam fisicamente favorecidos em fragmentos pequenos. Esta observação poderia explicar em parte o fato de não termos identificado muitas interações entre proteínas desse sistema, previamente descritas na literatura.

Quanto à identificação de falsos positivos com a biblioteca de cDNA, nossa experiência demonstra que somente após a realização de ensaios com muitas iscas distintas será possível avaliar a frequência em que certas presas são identificadas em ensaios com diferentes iscas. Além disso, será necessária a confirmação posterior das interações identificadas entre proteínas de *Xac* e proteínas de *Citrus* por outros métodos bioquímicos e/ou genéticos.

6- Conclusões

Bactérias do gênero *Xanthomonas*, assim como outras bactérias Gram-negativas (*Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* e outros) utilizam um grande número de estratégias moleculares para colonizar e invadir o tecido hospedeiro. Com o objetivo de se estudar possíveis mecanismos de transdução de sinal que levariam à ativação de respostas relacionadas à patogenicidade de *Xac*, selecionamos proteínas hipotéticas e proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes que possuíam similaridade a proteínas de *Xylella fastidiosa*, pois poderiam estar envolvidos em mecanismos de colonização específicos de patógenos de *Citrus*. A complexidade desses sistemas tornou a análise genômica comparativa de grande valor para estudos das vias de sinalização que podem levar a bactéria a colonizar o hospedeiro. *Xac* possui 37 histidina quinases (HK) e 60 reguladores de resposta (RR) além de 21 proteínas híbridas contendo ambos os domínios. Apesar do grande número de proteínas pertencentes aos sistemas de dois-componentes, nossos resultados indicam interações específicas entre várias proteínas desses sistemas dentre as quais destacamos:

- a) XAC0135 e XAC0136, XAC0620 e XAC0621, XAC0683 e XAC0684, XAC0759 e XAC0760, XAC1669 e XAC1670, e XAC1282 e XAC1284, confirmando as observações feitas por KORETKE *et al.* (2000) que demonstraram que os pares cognatos HK/RR, ou seja, pares para os quais interações foram identificadas experimentalmente, por exemplo, em *E. coli* e *B. subtilis*, encontram-se lado a lado no cromossomo;
- b) Interações entre as proteínas XAC1273 e XAC1271, as quais fazem parte de um operon com homologia ao operon sigma B em *Bacillus subtilis*;
- c) Interações entre proteínas do “cluster” XAC1279-XAC1284 e proteínas do “cluster” XAC1669-XAC1672, algumas confirmadas por ensaios de “pull down” e “overlay”, além de interações entre as proteínas XAC3273 e XAC2555 que provavelmente conectam os dois “clusters” à via de quimiotaxia pela percepção da concentração externa de C4-dicarboxilatos.

Outro foco de nosso trabalho foi a identificação de interações entre proteínas com similaridade aos componentes do Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS), envolvido em processos de conjugação e secreção em bactérias. *Xac* possui dois *loci vir*, um localizado no plasmídeo e outro localizado no cromossomo, que codificam proteínas com similaridade aos componentes do T4SS (ALEGRIA *et al.*, 2005). Identificamos novas interações entre proteínas hipotéticas adjacentes a esse *locus* no plasmídeo: XACb0018 e XACb0019 e interações entre VirB8 e VirB9, e VirB9 e XAC2610, codificadas por genes

presentes no cromossomo, esta última confirmada em ensaios de “overlay” realizados pelo aluno de doutorado de nosso laboratório Diorge de Souza.

Apesar da importância de alguns T4SS na secreção de proteínas patogênicas em algumas bactérias, verificamos que o nocaute da proteína VirB4 do T4SS plasmidial não apresentou alteração na virulência de *Xac*, quando infiltrada em folhas de limão cravo e laranja. Entretanto, o nocaute da proteína VirD4, cujo gene localiza-se no cromossomo, apresentou resultados inconclusivos quanto à patogenicidade de *Xac*, uma vez que diferentes clones mutantes da mesma construção apresentaram sintomas diferentes em laranja e limão cravo quando inoculados em eventos independentes.

Além disso, identificamos possíveis alvos das proteínas PthA2 e PthA4 e da proteína HpaA, em *Citrus*:

- a) Interação de PthA4 Δ_{1-128} com a α -importina, corroborando dados da literatura que mostram que PthA é importada para o núcleo (SZUREK *et al.*, 2001);
- b) Interação de PthA2 Δ_{1-128} com a proteína “Hsp70-interacting protein-thioredoxin” (HIP-TRX) e sugerimos a possibilidade da formação de um complexo HSP70-HSP90-HIP-TRX, que seria necessário para enovelar, estabilizar e/ou transportar PthA para o núcleo da célula hospedeira (Prof. Dr. Celso Benedetti, comunicação pessoal);
- c) Interação de PthA4 Δ_{1-128} com uma ciclofilina, o que sugere que a atividade PPIásica desta proteína poderia ser necessária para o enovelamento correto de PthA na célula do hospedeiro, expondo o sítio de localização nuclear para que PthA pudesse ser importada para o núcleo com o auxílio da α -importina.
- d) Três proteínas interagiram com HpaA. Dentre elas, destacamos uma proteína com domínio “RING C3HC4” que atua como uma E3 ubiquitina-ligase. No nosso modelo, propomos que a ligação de HpaA à proteína “RING C3HC4” E3 ubiquitina proteína-ligase mimetize o papel de AvrPtoB, um fator de virulência de *Pseudomonas syringae*. Deste modo, outros substratos de HpaA seriam marcados pela ubiquitina, resultando na degradação destes pelo proteossomo.

Esperamos que o trabalho realizado tenha aberto possibilidades futuras de estudo das estratégias que bactérias adotam para colonizar eficientemente os hospedeiros. Além disso, esperamos ter contribuído para um melhor entendimento dos mecanismos de virulência em *Xac*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVITCH R.B., JANJUSEVIC, R., STEBBINS, C.E., MARTIN, G.B. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.103, p.2851-2856, 2006a.
- ABRAMOVITCH R.B., ANDERSON J.C., MARTIN G.B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* v.7, p.601-611, 2006b.
- AIZAWA, S.I., HARWOOD, C.S., KADNER, R.J. Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *J Bacteriol*. v.182, p.1459-1471, 2000.
- ALEGRIA, M.C. Identificação de interações proteína-proteína envolvendo os produtos dos *loci hrp, vir e rpf* do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese de doutorado, IQ-USP, 2004.
- ALEGRIA, M.C., DOCENA, C., KHATER, L., RAMOS, C.H., DA SILVA, A.C., FARAH, C.S.. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. *J Bacteriol* v.186, p.6186-6197, 2004.
- ALEGRIA, M.C., SOUZA, D.P., ANDRADE, M.O., DOCENA, C., KHATER, L., RAMOS, C.H., DA SILVA, A.C., FARAH, C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*. v.187, p.2315-2325, 2005.
- ALEX, L.A., SIMON, M.I. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet*. v.10, p.133-138, 1994.
- ALFANO, J.R., COLLMER, A. Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell*. v.8, p.1683-1698, 1996.
- ALFANO, J.R., COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*. v.179, p.5655-5662, 1997.
- ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L. The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci*. v.26, p.579-582, 2001.
- ANDERSON, L.B., HERTZEL, A.V., DAS, A. *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.93, p.8889-8894, 1996.
- ANDERSSON, S.G., ZOMORODIPOUR, A., ANDERSSON, J.O., SICHERITZ-PONTEN, T., ALSMARK, U.C., PODOWSKI, R.M., NASLUND, A.K., ERIKSSON, A.S., WINKLER, H.H., KURLAND, C.G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. v.396, p.133-140, 1998.
- ANDRADE, M.O., ALEGRIA, M.C., DOCENA, C., GUZZO, C.R., ROSA, M.R.P., RAMOS, C.H.I., FARAH, C.S., The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, submetido ao *Mol. Microbiology*, 2006.
- APPLEBY, J.L., PARKINSON, J.S., BOURRET, R.B. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*. v.86, p.845-848, 1996.
- ARAVIND, L., ANANTHARAMAN, V., BALAJI, S., BABU, M.M., IYER, L.M. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. v.29, p.231-262, 2005.
- ARAVIND, L., KOONIN, E.V. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci*. v.23, p.469-472, 1998.
- ARAVIND, L., PONTING, C.P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signaling proteins. *FEMS Microbiol Lett*. v.176, p.111-116, 1999.
- ARAVIND, L., PONTING, C.P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*. v.22, p.458-9, 1997.
- ARIFUZZAMAN, M., MAEDA, M., ITOH, A., NISHIKATA, K., TAKITA, C., SAITO, R., ARA, T., NAKAHIGASHI, K., HUANG, H.C., HIRAI, A., TSUZUKI, K., NAKAMURA, S., ALTAF-UL-AMIN, M., OSHIMA, T., BABA, T., YAMAMOTO, N., KAWAMURA, T., IOKA-NAKAMICHI, T., KITAGAWA, M., TOMITA, M., KANAYA, S., WADA, C., MORI,

- H. Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res.* v.16, p.686-691, 2006.
- ARNÉR, E.S.J., HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase *Eur. J. Biochem.* v.267, p.6102-6109, 2000.
- ASTUA-MONGE, G., FREITAS-ASTUA, J., BACOCINA, G., RONCOLETTA, J., CARVALHO, S.A., MACHADO, M.A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv.. *citri*. *J Bacteriol.* v.187, p.1201-1205, 2005.
- ASTUA-MONGE, G., MINSAVAGE, G.V., STALL, R.E., DAVIS, M.J., BONAS, U., JONES, J.B. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv.. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact.* v.13, p.911-921, 2000.
- ATMAKURI, K., CASCALES, E., CHRISTIE, P.J. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol.* v.54, p.1199-1211, 2004.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science.* v.276, p.726-733, 1997.
- BAKER, E.K., COLLEY, N.J., ZUKER, C.S. The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* v.13, p.4886-4895, 1994.
- BAKER, M.D., WOLANIN, P.M., STOCK, J.B. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays.* v.28, p.9-22, 2006.
- BARTEL, P.L., FIELDS, S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* v.254, p.241-263, 1995.
- 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. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* v.32, p.D138-141, 2004.
- BAUMANN, U., JUTTNER, J. Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. *Cell. Mol. Life Sci.* v.59, p.1042-1057, 2002.
- BEAUPRE, C.E., BOHNE, J., DALE, E.M., BINNS, A.N. Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol.* v.79, p.78-89, 1997.
- BEHR, M.A., WILSON, M.A., GILL, W.P., SALAMON, H., SCHOOLNIK, G.K., RANE, S., SMALL, P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* v.284, p.1520-1523, 1999.
- BEIER, D., GROSS, R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol.* v.9, p.143-152, 2006.
- BENNETT, J.C., HUGHES, C. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* v.8, p.202-204, 2000.
- BERGER, B.R., CHRISTIE, P.J. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *J Bacteriol.* v.176, p.3646-3660, 1994.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* v.7, p.1513-1523, 1979.
- BISHOP, R.E. The bacterial lipocalins. *Biochim Biophys Acta.* v.1482, p.73-83, 2000.
- BLATCH, G.L., LASSLE, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays.* v.21, p.932-939, 1999.
- BOGDANOVE, A.J. Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. *Plant Mol Biol.* v.50, p.981-989, 2002.
- BOLETIM FUNDECITRUS [online]. Available: www.fundecitrus.com.br [Agosto, 2005]
- BONAS, U., STALL, R.E., STASKAWICZ, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene avrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv.. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet.* v.218, p.127-136, 1989.
- BORDIGNON, E., KLARE, J.P., DOEBBER, M., WEGENER, A.A., MARTELL, S., ENGELHARD, M., STEINHOFF, H.J. Structural analysis of a HAMP domain: the linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II. *J Biol Chem.* v.280, p.38767-38775, 2005.

- BRUNINGS, A.M., EL YACOUBI, B., SHANKER, S., YUAN, Q., GABRIEL, D.W. A self-transmissible plasmid carries at least two non-*hrp* genes required to cause citrus canker disease. Abstracts of the American Society for Microbiology General Meeting. Orlando, Flórida, 20-24 Maio, 2001.
- BRUNINGS, A.M., GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.141-157, 2003.
- BURNS, D.L. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol.* v.6, p.29-34, 2003.
- BÜTTNER, D., BONAS, U. Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* v.21, p.5313-5322, 2002.
- BÜTTNER, D., GURLEBECK, D., NOEL, L.D., BONAS, U. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol.* v.54, p.755-768, 2004.
- CAMILLI, A., BASSLER, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* v.311, p.1113-1116, 2006.
- CAO, T.B., SAIER, M.H. Jr. Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology.* v.147, p.3201-3214, 2001.
- CASCALES, E., ATMAKURI, K., LIU, Z., BINNS, A.N., CHRISTIE, P.J. *Agrobacterium tumefaciens* oncogenic suppressors inhibit T-DNA and VirE2 protein substrate binding to the VirD4 coupling protein. *Mol Microbiol.* v.58, p.565-579, 2005.
- CASCALES, E., CHRISTIE, P.J. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* v.1, p.137-149, 2003.
- CATLETT, N.L., YODER, O.C., TURGEON, B.G. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell.* v.2, p.1151-1161, 2003.
- CHEN, J., DE FELIPE, K.S., CLARKE, M., LU, H., ANDERSON, O.R., SEGAL, G., SHUMAN, H.A. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science.* v.303, p.1358-1361, 2004.
- CHIEN, C.T., BARTEL, P.L., STERNGLANZ, R., FIELDS, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.88, p.9578-9582, 1991.
- CHRISTIANO, R.S.C., Componentes monocíclicos de Cancro Cítrico no sistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*-Limão tahiti-*Phyllocnistis citrella*, sob condições controladas. Dissertação de Mestrado-ESALQ-USP, 2003.
- CHRISTIE, P.J. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol.* v.179, p.3085-3094, 1997.
- CHRISTIE, P.J. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta.* v.1694, p.219-234, 2004.
- CHRISTIE, P.J., ATMAKURI, K., KRISHNAMOORTHY, V., JAKUBOWSKI, S., CASCALES E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol.* v.59, p.451-485, 2005.
- CHRISTIE, P.J., VOGEL, J.P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* v.8, p.354-360, 2000.
- CLAUSEN, T., SOUTHAN, C., EHRMANN, M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell.* v.10, p.443-455, 2002.
- COATES, P.J., HALL, P.A. The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions. *J Pathol.* v.199, p.4-7, 2003.
- COLLMER, A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol.* v.1, p.329-335, 1998.
- CONOVER, G.M., DERRE, I., VOGEL, J.P., ISBERG, R.R. The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol.* v.48, p.305-321, 2003.
- CORDEIRO, M.C.R., GROSSI DE SÁ, M.F. Biotecnologia e Resistência a Patógenos. *Biotecnologia*, v.10, p.34-39, 1999.
- COVACCI, A., TELFORD, J.L., DEL GIUDICE, G., PARSONNET, J., RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* v.284, p.1328-1333, 1999.

- CROSSON, S., MOFFAT, K. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.98, p.2995-3000, 2001.
- D'ANDREA, L.D., REGAN, L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*. v.28, p.655-662, 2003
- DA SILVA, A.C., FERRO, J.A., REINACH, F.C., FARAH, C.S., FURLAN, L.R., QUAGGIO, R.B., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., VAN SLUYS, M.A., ALMEIDA, N.F., ALVES, L.M., DO AMARAL, A.M., BERTOLINI, M.C., CAMARGO, L.E., CAMAROTTE, G., CANNAVAN, F., CARDOZO, J., CHAMBERGO, F., CIAPINA, L.P., CICARELLI, R.M., COUTINHO, L.L., CURSINO-SANTOS, J.R., EL-DORRY, H., FARIA, J.B., FERREIRA, A.J., FERREIRA, R.C., FERRO, M.I., FORMIGHIERI, E.F., FRANCO, M.C., GREGGIO, C.C., GRUBER, A., KATSUYAMA, A.M., KISHI, L.T., LEITE, R.P., LEMOS, E.G., LEMOS, M.V., LOCALI, E.C., MACHADO, M.A., MADEIRA, A.M., MARTINEZ-ROSSI, N.M., MARTINS, E.C., MEIDANIS, J., MENCK, C.F., MIYAKI, C.Y., MOON, D.H., MOREIRA, L.M., NOVO, M.T., OKURA, V.K., OLIVEIRA, M.C., OLIVEIRA, V.R., PEREIRA, H.A., ROSSI, A., SENA, J.A., SILVA, C., DE SOUZA R.F., SPINOLA, L.A., TAKITA, M.A., TAMURA, R.E., TEIXEIRA, E.C., TEZZA, R.I., TRINDADE DOS SANTOS, M., TRUFFI, D., TSAI, S.M., WHITE, F.F., SETUBAL, J.C., KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. v.417, p.459-463, 2002.
- DANGL, J.L., JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. v.411, p.826-833, 2001.
- DAS, A.K. Citrus canker – A review. *J. Appl. Hort*. v.5, p.52-60, 2003.
- DAVIS, T.N. Protein localization in proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. v.8, p.49-53, 2004.
- DEHIO, C. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. v.58, p.365-390, 2004.
- DENG, W.Y., CHEN, L.S., WOOD, D.W., METCALFE, T., LIANG, X.Y., GORDON, M.P., COMAI, L., NESTER, E.W. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.95, p.7040-7045, 1998.
- DESLANDES, L., OLIVIER, J., PEETERS, N., FENG, D.X., KHOUNLOTHAM, M., BOUCHER, C., SOMSSICH, I., GENIN, S., MARCO, Y. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.100, p.8024-8029, 2003.
- DUAN, Y.P., CASTANEDA, A.L., ZHAO, G., ERDOS, G., GABRIEL, D.W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact*. v.12, p.556-560, 1999.
- DUNCAN, L., LOSICK, R. SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein sigma F from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.90p.2325-2329, 1993.
- DUONG, F., WICKNER, W. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J*. v.16, p.4871-4879, 1997.
- DUTT, M.J., LEE, K.H. Proteomic analysis. *Curr Opin Biotechnol*. v.11, p.176-179, 2000.
- DUTTA, R., QIN, L., INOUE, M. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol*. v.34, p.633-640, 1999.
- EL YACOUBI, B., BRUNINGS, A., YUAN, Q., GABRIEL, D.W. A self transmissible plasmid isolated from *Xanthomonas campestris* carries a member of the avr/pth gene family and additional factor(s) required for pathogenicity. Abstracts of the 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Madison, p.650, 2001.
- ESTANISLAU, *et al.*, *Informe agropecuário*, v.22, p.8-20, 2001.
- EVANGELISTA, C., LOCKSHON, D., FIELDS, S. The yeast two-hybrid system: prospects for protein linkage maps. *Trends Cell Biol*. v.6, p.196-199, 1996.
- FALKE, J.J., BASS, R.B., BUTLER, S.L., CHERVITZ, S.A., DANIELSON, M.A. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. v.13, p.457-512, 1997.
- FAWCETT, H.S., JENKINS, A.E., Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. *Phytopathology*. v.23, p.820-824, 1933.
- FELDMAN, M.F., CORNELIS, G.R. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett*. v.219, p.151-158, 2003.

- FERNANDEZ, D., DANG, T.A., SPUDICH, G.M., ZHOU, X.R., BERGER, B.R., CHRISTIE, P.J. The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol.* v.178, p.3156-3167, 1996.
- FERREIRA, A.J.S. Seqüenciamento de parte do genoma de *Xylella fastidiosa* e análise do metabolismo de carboidratos no genoma anotado. São Paulo, 2000. 116p. (Dissertação de Mestrado-Instituto de Química-Universidade de São Paulo).
- FIELDS, S. High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. *FEBS J.* v.272, p.5391-5399, 2005.
- FIELDS, S., SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* v.340, p.245-246, 1989.
- FLOR, H.H., Current Status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* v.9, p.275-296, 1971.
- FLORES, A., BRIAND, J.F., GADAL, O., ANDRAU, J.C., RUBBI, L., VAN MULLEM, V., BOSCHIERO, C., GOUSSOT, M., MARCK, C., CARLES, C., THURIAUX, P., SENTENAC, A., WERNER, M. A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.96, p.7815-7820, 1999.
- FOUET, A., NAMY, O., LAMBERT, G. Characterization of the operon encoding the alternative sigma(B) factor from *Bacillus anthracis* and its role in virulence. *J Bacteriol.* v.182, p.5036-5045, 2000.
- GABRIEL, D.W. Citrus canker disease (2002).
<http://www.biotech.ufl.edu/PlantContainment/canker.htm>
- GALÁN, J.E., COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* v.284, p.1322-1328, 1999.
- GALPERIN, M.Y. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol.* v.6, p.552-567, 2004.
- GALPERIN, M.Y., GAIDENKO, T.A., MULKIDJANIAN, A.Y., NAKANO, M., PRICE, C.W. MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol Lett.* v.205, p.17-23, 2001.
- GALPERIN, M.Y., NATALE, D.A., ARAVIND, L., KOONIN, E.V. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* v.1, p.303-305, 1999.
- GAVIN, A.C., ALOY, P., GRANDI, P., KRAUSE, R., BOESCHE, M., MARZIOCH, M., RAU, C., JENSEN, L.J., BASTUCK, S., DUMPELFELD, B., EDELMANN, A., HEURTIER, M.A., HOFFMAN, V., HOEFERT, C., KLEIN, K., HUDAK, M., MICHON, A.M., SCHEIDER, M., SCHIRLE, M., REMOR, M., RUDI, T., HOOPER, S., BAUER, A., BOUWMEESTER, T., CASARI, G., DREWES, G., NEUBAUER, G., RICK, J.M., KUSTER, B., BORK, P., RUSSELL, R.B., SUPERTI-FURGA, G. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature.* v.440, p.631-636, 2006.
- GELHAYE, E., ROUHIER, N., NAVROT, N., JACQUOT, J.P. The plant thioredoxin system. *Cell. Mol. Life Sci.* v.62, p.24-35, 2005.
- GERHARZ, T., REINELT, S., KASPAR, S., SCAPOZZA, L., BOTT, M. Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA. *Biochemistry.* v.42, p.5917-5924, 2003.
- GIETZ, R.D., WOODS, R.A., MANIVASAKAM, P., SCHIESTL, R.H. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. Technical Tips Online, 1998. Available: <http://research.bmn.com/tto/search/results> [july, 2002].
- GINALSKI, K., ELOFSSON, A., FISCHER, D., RYCHLEWSKI, L. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics.* v.19, p.1015-1018, 2003.
- GOLDFARB, D.S., CORBETT, A.H., MASON, D.A., HARREMAN, M.T., ADAM, S.A. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* v.14, p.505-514, 2004.
- GOMELSKY, M., KLUG, G. BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci.* v.27, p.497-500, 2002.
- GOMIS-RUTH, F.X., COLL, M. Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int J Biochem Cell Biol.* v.33, p.839-843, 2001.

- GOTO, M. Citrus canker, In: **Plant Diseases of International Importance**. J. Kumar, H.S. Chaube, Singh, U.S., Mukhopadhyay, A.N. p.250-269, eds. Prentice Hall, Englewood Cliff, New Jersey, USA, 1992.
- GOTO, M., YAGUCHI, Y., HYODO, H. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. *Physiol. Plant Pathol.* v.16, p.343-350, 1979.
- GOTTWALD, T.R., GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*. v.82, p.930-935, 1992.
- GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., CIVEROLO, E.L., MCGUIRE, R.G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*. v.73, p.423-427, 1989.
- GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., CUBERO, J., ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker *Mol Plant Pathol.* v.5, p.1-15, 2004.
- GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., RILEY, T.D., BRUCE, M.A. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology*. v.82, p.452-457, 1992.
- GRANT, S.R., FISHER, E.J., CHANG, J.H., MOLE, B.M., DANGL, J.L. Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* v.60, p.425-449, 2006.
- GREATER, A., LAMBERTSEN, L., WILLIAMS, P.A., THOMAS, C.M. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol.* v.4, p.856-871, 2002.
- GREBE, T.W., STOCK, J.B. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol.* v.41, p.139-227, 1999.
- GÜRLEBECK, D., SZUREK, B., BONAS, U. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* v.42, p.175-187, 2005.
- GÜRLEBECK, D., THIEME, F., BONAS, U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol.* v.163, p.233-255, 2006.
- RAIVIO, T.L., SILHAVY, T.J. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol.* v.55, p.591-624, 2001.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Responses to Plant Pathogens, In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. eds. p.1102- 1156, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* v.14, p.177-193, 2003.
- HASE, C.C., FEDOROVA, N.D., GALPERIN, M.Y., DIBROV, P.A. Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol Mol Biol Rev.* v.65, p.353-370, 2001.
- HAUCK, P., THILMONY, R., HE, S.Y. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.100, p.8577-8582, 2003.
- HEERMANN, R., ALTENDORF, K., JUNG, K. The hydrophilic N-terminal domain complements the membrane-anchored C-terminal domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* v.275, p.17080-17085, 2000.
- HELMANN, J.D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol.* v.46, p.47-110, 2002.
- HISERT, K.B., MACCOSS, M., SHILOH, M.U., DARWIN, K.H., SINGH, S., JONES, R.A., EHRT, S., ZHANG, Z., GAFFNEY, B.L., GANDOTRA, S., HOLDEN, D.W., MURRAY, D., NATHAN, C. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol.* v.56, p.1234-1245, 2005.
- HO, Y.S., BURDEN, L.M., HURLEY, J.H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* v.19, p.5288-5299, 2000.
- HOLMES, D.S., QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* v.114, p.193-197, 1981.

- HORMAECHE, I., ILOORO, I., ARRONDO, J.L., GONI, F.M., DE LA CRUZ, F., ALKORTA, I. Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J Biol Chem.* v.279, p.10955-10961, 2004.
- HOTSON, A., CHOSD, R., SHU, H., ORTH, K., MUDGETT, M.B. *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in plants. *Mol Microbiol.* v.50, p.377-389, 2003.
- HUGUET, E., HAHN, K., WENGELNIK, K., BONAS, U. hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol.* v.29, p.1379-1390, 1998.
- HUTCHISON, C.A., PETERSON, S. N., GILL, S. R., CLINE, R. T., WHITE, O., FRASER, C. M., SMITH, H. O., VENTER, J. C. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, v. 286(5447), p.1-6, 1999.
- IGLESIAS R.G., NICOLÁS G., BABIANO M.J. Characterization of a cDNA encoding a ubiquitin-conjugating enzyme (E2) from *Pseudotsuga menziesii*, *Plant Physiol.* v.119, p.1148, 1999.
- INNES, R.W. Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiol.* v.135, p.695-701, 2004.
- IYER, L.M., ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics.* v.4, p.5, 2003.
- JAKUBOWSKI, S.J., CASCALES, E., KRISHNAMOORTHY, V., CHRISTIE, P.J. *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol.* v.187, p.3486-3495, 2005.
- JAMES, P., HALLADAY, J., CRAIG, E.A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, v.144, p.1425-1436, 1996.
- JANAUSCH, I.G., ZIENTZ, E., TRAN, Q.H., KROGER, A., UNDEN, G. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* v.1553, p.39-56, 2002.
- JANJUSEVIC, R., ABRAMOVITCH, R.B., MARTIN, G.B., STEBBINS, C.E. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science.* v.311, p.222-226, 2006.
- JENAL U, FUCHS T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.* 17(19):5658-69, 1998.
- JENKINS, C.L., STARR, M.P. Formation of halogenated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strains of *Xanthomonas maltophilia*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* v.136B, p.257-264, 1985.
- JIA, Y., MCADAMS, S.A., BRYAN, G.T., HERSHEY, H.P., VALENT, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* v.19, p.4004-4014, 2000.
- JIN, C., LAU, A.F., MARTYN, K.D. Identification of connexin-interacting proteins: application of the yeast two-hybrid screen. *Methods.* v.20, p.219-31, 2000.
- JOHNSTON, C., PEGUES, D.A., HUECK, C.J., LEE, A., MILLER, S.I. Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol.* v.22, p.715-727, 1996.
- KAMOUN, S., KADO, C.I. A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J Bacteriol.* v.172, p.5165-5172, 1990.
- KANAMORI, H., TSUYUMU, S. Comparison of nucleotide sequences of canker-forming and non-canker-forming *pthA* homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Annu. Phytopathol Soc Jpn*, v.64, p.462-470, 1998.
- KANG, C.M., BRODY, M.S., AKBAR, S., YANG, X., PRICE, C.W. Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma B in response to environmental stress. *J Bacteriol.* v.178, p.3846-3853, 1996.
- KATAYAMA, M., OHMORI, M. Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* v.179, p.3588-3593, 1997.
- KHATER, L. Identificação e caracterização de chaperones de secreção no genoma do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* patovar *citri*. Tese de doutorado, IB-UNICAMP, 2006.

- KENNEY, L.J. Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr Opin Microbiol.* v.5, p.135-141, 2002.
- KIM, J.G., JEON, E., OH, J., MOON, J.S., HWANG, I. Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in non-host plants. *J Bacteriol.* v.186, p.6239-6247, 2004.
- KIMURA, Y., MISHIMA, Y., NAKANO, H., TAKEGAWA, K.J. An adenylyl cyclase, CyaA, of *Myxococcus xanthus* functions in signal transduction during osmotic stress. *J Bacteriol.* v.184, p.3578-3585, 2002.
- KLEBANOW, E.R., WEIL, P.A. A rapid technique for the determination of unknown plasmid library insert DNA sequence directly from intact yeast cells. *Yeast.* v.15, p.527-531, 1999.
- KNUESEL, M., WAN, Y., XIAO, Z., HOLINGER, E., LOWE, N., WANG, W., LIU, X. Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol Cell Proteomics.* v.2, p.1225-1233, 2003.
- KOIZUMI, M. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. *Proc. Intern. Soc. Citric.* v.3, p.924-928, 1977.
- KOIZUMI, M., KUHARA, S. Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to lesion extension. *Bulletin Tree Fruit Research,* v.4, p.73-92, 1982.
- KOONIN, E.V., TATUSOV, R.L., GALPERIN, M.Y. Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr Opin Struct Biol.* v.8, p.355-363, 1998.
- KORETKE, K.K., LUPAS, A.N., WARREN, P.V., ROSENBERG, M., BROWN, J.R. Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol.* v.17, p.1956-1970, 2000.
- KUBORI, T., MATSUSHIMA, Y., NAKAMURA, D., URALIL, J., LARA-TEJERO, M., SUKHAN, A., GALAN, J.E., AIZAWA, S.I. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science.* v.280, p.602-605, 1998.
- KVINT, K., NACHIN, L., DIEZ, A., NYSTROM, T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol.* v.6, p.140-145, 2003.
- LAGURI C, STENZEL RA, DONOHUE TJ, PHILLIPS-JONES MK, WILLIAMSON MP. Activation of the global gene regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry.* v.45, p.7872-7881, 2006.
- LAHAYE, T., BONAS, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* v.6, p.479-485, 2001.
- LAZAREVIC, V., MARGOT, P., SOLDI, B., KARAMATA, D. Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* lytRABC divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J Gen Microbiol.* v.138, p.1949-1961, 1992.
- LAZDUNSKI, A.M., VENTRE, I., STURGIS, J.N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* v.2, p.581-592, 2004.
- LEE, H.A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. *J. Agr. Res.* v.15, p.661- 665, 1918.
- LEE, V.T., ANDERSON, D.M., SCHNEEWIND, O. Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol.* v.28, p.593-601, 1998.
- LEITE Jr, R.P., EGEL, D.S., STALL, R.E. Genetic analysis of hrp-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl Environ Microbiol.* v.60, p.1078-1086, 1994.
- LETUNIC, I., COPLEY, R.R., SCHMIDT, S., CICCARELLI, F.D., DOERKS, T., SCHULTZ, J., PONTING, C.P., BORK, P. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res.* v.32, p.D142-144, 2004.
- MALEK, J.A., WIERZBOWSKI, J.M., TAO, W., BOSAK, S.A., SARANGA, D.J., DOUCETTE-STAMM, L., SMITH, D.R., MCEWAN, P.J., MCKERNAN, K.J. Protein interaction mapping on a functional shotgun sequence of *Rickettsia sibirica*. *Nucleic Acids Res.* v.32, p.1059-1064, 2004.
- MARIVET, J., MARGIS-PINHEIRO, M., FRENDI, P., BURKARD, G. Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol Biol.* v.26, p.1181-1189, 1994.
- MARKS, A.R. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev.* v.76, p.631-649, 1996.

- MAROIS, E., VAN DEN ACKERVEKEN, G., BONAS, U. The *xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact.* v.15, p.637-646, 2002.
- MASUI, S., SASAKI, T., ISHIKAWA, H. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. *J Bacteriol.* v.182, p.6529-6531, 2000.
- MATSUSHIKA, A., MIZUNO, T. A dual-signaling mechanism mediated by the ArcB hybrid sensor kinase containing the histidine-containing phosphotransfer domain in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* v.180, p.3973-3977, 1998.
- MILLER MB, BASSLER BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* v.55, p.165-199, 2001.
- MONCALIAN, G., GRANDOSO, G., LLOSA, M., DE LA CRUZ, F. oriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol.* v.270, p.188-200, 1997.
- MONTAGUE, J.W., HUGHES, F.M. Jr, CIDLOWSKI, J.A. Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J Biol Chem.* v.272, p.6677-6684, 1997.
- MONTESANO, M., BRADER, G., PALVA, E.T. Pathogen-derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol.* v.4, p.73-79, 2003.
- MOREIRA, L.M., DE SOUZA, R.F., DIGIAMPIETRI, L.A., DA SILVA, A.C., SETUBAL, J.C. Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *OMICS.* v.9, p.43-76, 2005.
- MORETT, E., SEGOVIA, L. The sigma-54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol.* v.175, p.6067-6074, 1993.
- MOTOHASHI, K., KOYAMA, F., NAKANISHI, Y., UEOKA-NAKANISHI, H., HISABORI, T. Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin. *J Biol Chem.* v.278, p.31848-31852, 2003.
- MOUGEL, C., ZHULIN, I.B. CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci.* v.26, p.582-584, 2001.
- MOUNT, S.M., CHANG, C. Evidence for a plastid origin of plant ethylene receptor genes. *Plant Physiol.* v.130, p.10-14, 2002.
- MUDGETT, M.B., CHESNOKOVA, O., DAHLBECK, D., CLARK, E.T., ROSSIER, O., BONAS, U., STASKAWICZ, B.J. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.97, p.13324-13329, 2000.
- MUDGETT, M.B., STASKAWICZ, B.J. Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* v.32, p.927-941, 1999.
- NACHIN, L., NANNMARK, U., NYSTROM, T. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol.* v.187, p.6265-6272, 2005.
- NAGAI, H., ROY, C.R. Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol.* v.5, p.373-383, 2003.
- NAKAI, K., HORTON, P., PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* v.24, p.34-35, 1999.
- NAKAI, K., KANEHISA, M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics.* v.14, p.897-911, 1992.
- NANDI, D., TAHILIANI, P., KUMAR, A., CHANDU, D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* v.31, p.137-155, 2006.
- NARIYA, H., INOUE, S. Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* v.58, p.367-379, 2005.
- NARLIKAR, L., HARTEMINK, A.J. Sequence features of DNA binding sites reveal structural class of associated transcription factor. *Bioinformatics.* v.22, p.157-163, 2006.

- NASCIMENTO, J.F. RODRIGUES NETO, J., ALVES, J.M.A, REGO, M., ARAÚJO, A.E.S., Ocorrência de cancro cítrico no estado de Rondônia. *Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia*, 26, 2003.
- NEVES, E.M., DAYOUB, M., DRAGONE, D.S., NEVES, M.F. Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros, 1996-2000. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal*, v.23, p.432-436, 2001.
- NEVES, M.F., LOPES, F.F., ROSSI, R.M., MELO P.A.O. Agroindustry production chain analysis methods as applied to citriculture. *Rev. Bras. Frutic.* v.26, p.468-473, 2004.
- NIKOLSKAYA, A.N., GALPERIN, M.Y. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res.* v.30, p.2453-2459, 2002.
- NIKOLSKAYA, A.N., MULKIDJANIAN, A.Y., BEECH, I.B., GALPERIN, M.Y. MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol.* v.5, p.11-16, 2003.
- NOIROT, P., NOIROT-GROS, M.F. Protein interaction networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* v.7, p.505-512, 2004.
- O'CALLAGHAN, D., CAZEVIEILLE, C., ALLARDET-SERVENT, A., BOSCHIROLI, M.L., BOURG, G., FOULONGNE, V., FRUTOS, P., KULAKOV, Y., RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol.* v.33, p.1210-1220, 1999.
- O'HARA, B.P., NORMAN, R.A., WAN, P.T., ROE, S.M., BARRETT, T.E., DREW, R.E., PEARL, L.H. Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex. *EMBO J.* v.18, p.5175-5186, 1999.
- OHASHI, N., ZHI, N., LIN, Q., RIKIHISA, Y. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect Immun.* v.70, p.2128-2138, 2002.
- OKA, A., SAKAI, H., IWAKOSHI, S. His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst.* v.77, p.383-391, 2002.
- OLDROYD, G.E.D., STASKAWICZ, B.J. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.95, p.10300-10305, 1998.
- ORTH, K., XU, Z., MUDGETT, M.B., BAO, Z.Q., PALMER, L.E., BLISKA, J.B., MANGEL, W.F., STASKAWICZ, B., DIXON, J.E. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science.* v.290, p.1594-1597, 2000.
- PADMANABHAN, D., VIDHYASEKARAN, P., RAJAGOPALAN, C.K.S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. *Indian J. Phytopathol.* v.26, p.215-217, 1974.
- PANE-FARRE, J., LEWIS, R.J., STULKE, J. The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. *J Mol Microbiol Biotechnol.* v.9, p.65-76, 2005.
- PAOLI, M. Protein folds propelled by diversity. *Prog Biophys Mol Biol.* v.76, p.103-130, 2001.
- PARKINSON, J.S. Bacterial chemotaxis: a new player in response regulator dephosphorylation. *J Bacteriol.* v.185, p.1492-1494, 2003.
- PAUL, R., WEISER, S., AMIOT, N.C., CHAN, C., SCHIRMER, T., GIESE, B., JENAL, U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* v.18, p.715-727, 2004.
- POPHAM, P.L., PIKE, S.M., NOVACKY, A., PALLARDY, S.G. Water relation alterations observed during hypersensitive reaction induced by bacteria. *Plant Physiol.* v.103, p.1243-1247, 1993.
- PRATT, W.B., TOFT, D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood).* v.228, p.111-133, 2003.
- PUIG, O., CASPARY, F., RIGAUT, G., RUTZ, B., BOUVERET, E., BRAGADO-NILSSON, E., WILM, M., SERAPHIN, B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* v.24, p.218-229, 2001.
- QIAN, W., JIA, Y., REN, S.X., HE, Y.Q., FENG, J.X., LU, L.F., SUN, Q., YING, G., TANG, D.J., TANG, H., WU, W., HAO, P., WANG, L., JIANG, B.L., ZENG, S., GU, W.Y., LU, G., RONG, L., TIAN, Y., YAO, Z., FU, G., CHEN, B., FANG, R., QIANG, B., CHEN, Z., ZHAO,

- G.P., TANG, J.L., HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* v.15, p.757-767, 2005.
- RAIN, J.C., SELIG, L., DE REUSE, H., BATTAGLIA, V., REVERDY, C., SIMON, S., LENZEN, G., PETEL, F., WOJCIK, J., SCHACHTER, V., CHEMAMA, Y., LABIGNE, A., LEGRAIN, P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature.* v.409, p.211-215, 2001.
- RAMOS, C.R.R., ABREU, P.A.E., NASCIMENTO, A.L.T.O., HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*, v.37, p.1103-1109, 2004.
- RATNAKAR, P., RAO, S. P., CATANZARO, A. Isolation and characterization of a 70 kDa protein from *Mycobacterium avium*. *Microb. Pathog.* v.21, p.471-486, 1996.
- REMAUT, H., WAKSMAN, G. Structural biology of bacterial pathogenesis. *Curr Opin Struct Biol.* v.14, p.161-170, 2004.
- RIGAUT, G., SHEVCHENKO, A., RUTZ, B., WILM, M., MANN, M., SERAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* v.17, p.1030-1032, 1999.
- RODEN, J., EARDLEY, L., HOTSON, A., CAO, Y., MUDGETT, M.B. Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant Microbe Interact.* v.17, p.633-643, 2004.
- RODRIGUEZ, G.S., GARZA-LOPEZ, J.G., STAPLETON, J.J., CIVEROLO, D.E.L. Citrus bacteriosis in Mexico. *Plant Dis.*, v.69, p.808-810, 1985.
- ROMANO, P., HE, Z., LUAN, S. Introducing immunophilins. From organ transplantation to plant biology. *Plant Physiol.* v.134, p.1241-1243, 2004a.
- ROMANO, P.G., HORTON P., GRAY, J.E. The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol.* v.134, p.1268-1282, 2004b.
- ROMLING, U., GOMELSKY, M., GALPERIN, M.Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol.* v.57, p.629-639, 2005.
- ROSENBERG, A.H., LADE, B.N., CHUI, D.S., LIN, S.W., DUNN, J.J., STUDIER, F.W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene.* v.56, p.125-135, 1987.
- ROSSETTI, V. Citrus Canker in Latin América: a review. *Proc Inter Soc Citric.*, v.3, p.918-924, 1977.
- ROTHENBUCHER, M.C., FACEY, S.J., KIEFER, D., KOSSMANN, M., KUHN, A. The cytoplasmic C-terminal domain of the *Escherichia coli* KdpD protein functions as a K⁺ sensor. *J Bacteriol.* v.188, p.1950-1958, 2006.
- RYAN, R.P., FOUHY, Y., LUCEY, J.F., CROSSMAN, L.C., SPIRO, S., HE, Y.W., ZHANG, L.H., HEEB, S., CAMARA, M., WILLIAMS, P., DOW, J.M. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.103, p.6712-6717, 2006.
- SAGULENKO V, SAGULENKO E, JAKUBOWSKI S, SPUDICH E, CHRISTIE PJ. VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3642-51.
- SALMOND, G.P., REEVES, P.J. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci.* v.18, p.7-12, 1993.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W., Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHNEIKER S, KELLER M, DROGE M, LANKA E, PUHLER A, SELBITSCHKA W. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Res.* 2001 Dec 15;29(24):5169-5181.
- SCHORNACK, S., MEYER, A., ROMER, P., JORDAN, T., LAHAYE, T. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol.* v.163, p.256-272, 2006.
- SCHRÖDER, G., LANKA, E. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid.* v.54, p.1-25, 2005.
- SEXTON, J.A., VOGEL, J.P. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic.* v.3, p.178-185, 2002.

- SHAO, F., MERRITT, P.M., BAO, Z., INNES, R.W., DIXON, J.E. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*. v.109, p.575-588, 2002.
- SHI, L., POTTS, M., KENNELLY, P.J. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev*. v.22, p.229-253, 1998.
- SHU, C.J., ULRICH, L.E., ZHULIN, I.B. The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends Biochem Sci*. v.28, p.121-124, 2003.
- SIEGELE, D.A. Universal stress proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. v.187, p.6253-6254, 2005.
- SIMM, R., MORR, M., KADER, A., NIMTZ, M., ROMLING, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*. v.53, p.1123-1134, 2004.
- SIMPSON, A.J., REINACH, F.C., ARRUDA, P., ABREU, F.A., ACENCIO, M., ALVARENGA, R., ALVES, L.M., ARAYA, J.E., BAIA, G.S., BAPTISTA, C.S., BARROS, M.H., BONACCORSI, E.D., BORDIN, S., BOVE, J.M., BRIONES, M.R., BUENO, M.R., CAMARGO, A.A., CAMARGO, L.E., CARRARO, D.M., CARRER, H., COLAUTO, N.B., COLOMBO, C., COSTA, F.F., COSTA, M.C., COSTA-NETO, C.M., COUTINHO, L.L., CRISTOFANI, M., DIAS-NETO, E., DOCENA, C., EL-DORRY, H., FACINCANI, A.P., FERREIRA, A.J., FERREIRA, V.C., FERRO, J.A., FRAGA, J.S., FRANCA, S.C., FRANCO, M.C., FROHME, M., FURLAN, L.R., GARNIER, M., GOLDMAN, G.H., GOLDMAN, M.H., GOMES, S.L., GRUBER, A., HO, P.L., HOHEISEL, J.D., JUNQUEIRA, M.L., KEMPER, E.L., KITAJIMA, J.P., KRIEGER, J.E., KURAMAE, E.E., LAIGRET, F., LAMBAIS, M.R., LEITE, L.C., LEMOS, E.G., LEMOS, M.V., LOPES, S.A., LOPES, C.R., MACHADO, J.A., MACHADO, M.A., MADEIRA, A.M., MADEIRA, H.M., MARINO, C.L., MARQUES, M.V., MARTINS, E.A., MARTINS, E.M., MATSUKUMA, A.Y., MENCK, C.F., MIRACCA, E.C., MIYAKI, C.Y., MONTERIRO-VITORELLO, C.B., MOON, D.H., NAGAI, M.A., NASCIMENTO, A.L., NETTO, L.E., NHANI, A., J.R., NOBREGA, F.G., NUNES, L.R., OLIVEIRA, M.A., DE OLIVEIRA, M.C., DE OLIVEIRA, R.C., PALMIERI, D.A., PARIS, A., PEIXOTO, B.R., PEREIRA, G.A., PEREIRA, H.A. JR, PESQUERO, J.B., QUAGGIO, R.B., ROBERTO, P.G., RODRIGUES, V., DE M ROSA, A.J, DE ROSA, V.E. JR, DE SA, R.G., SANTELLI, R.V., SAWASAKI, H.E., DA SILVA, A.C., DA SILVA, A.M., DA SILVA, F.R., DA SILVA, W.A. JR, DA SILVEIRA, J.F., SILVESTRI, M.L., SIQUEIRA, W.J., DE SOUZA, A.A., DE SOUZA, A.P., TERENCE, M.F., TRUFFI, D., TSAI, S.M., TSUHAKO, M.H., VALLADA, H., VAN SLUYS, M.A., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., VETTORE, A.L., ZAGO, M.A., ZATZ, M., MEIDANIS, J., SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*. v.406, p.151-157, 2000.
- SNYDER, L., CHAMPNESS, W., **Molecular genetics of bacteria**. 2nd ed. ASM Press, Washington DC, 2003.
- STALL, R.E., SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. *Plant Dis*. 67:581-585, 1983.
- STEIN, M., RAPPUOLI, R., COVACCI, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.97, p.1263-1268, 2000.
- STOCK, A.M., ROBINSON, V.L., GOUDREAU, P.N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. v.69, p.183-215, 2000.
- STONE, S.L., HAUKSDOTTIR, H., TROY, A., HERSCHLEB, J., KRAFT, E., CALLIS, J. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. v.137, p.13-30, 2005.
- STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzimol*. v.185, p.60-89, 1990.
- SULLIVAN, J.A., SHIRASU, K., DENG, X.W. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet*. v.4, p.948-958, 2003.
- SWARUP, S., DE FEYTER, R., BRLANSKY, R.H., GABRIEL D.W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to form cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* v.81, p.802-809, 1991.
- SWINGS, J.G., CIVEROLO, E.L., *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, 1993.
- SZUREK, B., MAROIS, E., BONAS, U., VAN DEN ACKERVEKEN, G. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional

- activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.* v.26, p.523-534, 2001.
- SZUREK, B., ROSSIER, O., HAUSE, G., BONAS, U. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol.* v.46, p.13-23, 2002.
- TAL, R., WONG, H.C., CALHOON, R., GELFAND, D., FEAR, A.L., VOLMAN, G., MAYER, R., ROSS, P., AMIKAM, D., WEINHOUSE, H., COHEN, A., SAPIR, S., OHANA, P., BENZIMAN, M. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol.* v.180, p.4416-4425, 1998.
- TANG, X., FREDERICK, R.D., ZHOU, J., HALTERMAN, D.A., JIA, Y., MARTIN, G.B. Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase, *Science.* v.274, p.2060-2063, 1996.
- TAO, Y., YUAN, F., LEISTER, R.T., AUSUBEL, F.M., KATAGIRI, F. Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene *rps2*. *Plant Cell.* v.12, p.2541-2554, 2000.
- TATUSOV, R.L., GALPERIN, M.Y., NATALE, D.A., KOONIN, E.V. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* v.28, p.33-36, 2000.
- TAUCH, A., SCHNEIKER, S., SELBITSCHKA, W., PUHLER, A., VAN OVERBEEK, L.S., SMALLA, K., THOMAS, C.M., BAILEY, M.J., FORNEY, L.J., WEIGHTMAN A., CEGLOWSKI, P., PEMBROKE, T., TIETZE, E., SCHRODER, G., LANKA, E., VAN ELSAS, J.D. The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. *Microbiology.* v.148, p.1637-1653, 2002.
- TAYLOR, B.L., ZHULIN, I.B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* v.63, p.479-506, 1999.
- THANASSI, D.G., SAULINO, E.T., HULTGREN, S.J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol.* v.1, p.223-231, 1998.
- TISCHLER, A.D., CAMILLI, A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol.* v.53, p.857-869, 2004.
- TORNERO, P., MERRITT, P., SADANANDOM, A., SHIRASU, K., INNES, R.W., DANGL, J.L. RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell.* v.14, p.1005-1015, 2002.
- TRUGLIO, J.J., CROTEAU, D.L., VAN HOUTEN, B., KISKER, C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev.* v.106, p.233-252, 2006.
- UETZ, P., GIOT, L., CAGNEY, G., MANSFIELD, T.A., JUDSON, R.S., KNIGHT, J.R., LOCKSHON, D., NARAYAN, V., SRINIVASAN, M., POCHART, P., QURESHI-EMILI, A., LI, Y., GODWIN, B., CONOVER, D., KALBFLEISCH, T., VIJAYADAMODAR, G., YANG, M., JOHNSTON, M., FIELDS, S., ROTHBERG, J.M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* v.403, p.623-627, 2000.
- ULLMAN, K.S., POWERS, M.A., FORBES, D.J. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell.* v.90, p.967-970, 1997.
- ULRICH, L.E., KOONIN, E.V., ZHULIN, I.B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* v.13, p.52-56, 2005.
- VAUTERIN, L., RADEMAKER, J., SWINGS, J. Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. *Phytopathology.* v.90, p.677-682, 2000.
- VAN DER HOORN, R.A., DE WIT, P.J., JOOSTEN, M.H. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.* v.7, p.67-71, 2002.
- VAN SLUYS, M.A., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., CAMARGO, L.E., MENCK, C.F., DA SILVA, A.C., FERRO, J.A., OLIVEIRA, M.C., SETUBAL, J.C., KITAJIMA, J.P., SIMPSON, A.J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* v.40, p.169-189, 2002.
- VIGNOLS, F., MOUAHEB, N., THOMAS, D., MEYER, Y. Redox control of Hsp70-Co-chaperone interaction revealed by expression of a thioredoxin-like *Arabidopsis* protein. *J Biol Chem.* v.278, p.4516-4523, 2003.

- VOLZ, K. Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry*. v.32, p.11741-11753, 1993.
- VON MERING, C., KRAUSE, R., SNEL, B., CORNELL, M., OLIVER, S.G., FIELDS, S., BORK, P. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*. v.417, p.399-403, 2002.
- WALHOUT, A.J., BOULTON, S.J., VIDAL, M. Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast*. v.17, p.88-94, 2000.
- WANG, G.L., RUAN, D.L., SONG, W.Y., SIDERIS, S., CHEN, L., PI, L.Y., ZHANG, S., ZHANG, Z., FAUQUET, C., GAUT, B.S., WHALEN, M.C., RONALD, P.C. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell*. v.10, p.765-779, 1998.
- WARD, D.V., DRAPER, O., ZUPAN, J.R., ZAMBRYSKI, P.C. Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.99, p.11493-11500, 2002.
- WASHBURN, M.P., YATES, J.R. 3rd. Analysis of the microbial proteome. *Curr Opin Microbiol*. v.3, p.292-297, 2000.
- WEISS, A.A., JOHNSON, F.D., BURNS, D.L. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.90, p.2970-2974, 1993.
- WENGELNIK, K., BONAS, U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*. v.178, p.3462-3469, 1996.
- WEST, A.H., STOCK, A.M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*. v.26, p.369-376, 2001.
- WILLIAMS, S.B., STEWART, V. Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol Microbiol*. v.33, p.1093-1102, 1999.
- WOSTEN, M.M. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*. v.22, p.127-150, 1998.
- YANG, Y., GABRIEL, D.W. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *J Bacteriol*. v.177, p.4963-4968, 1995.
- YANG, Y.N., DEFEYTER, R., GABRIEL, D.W., Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102bp tandem repeats of *pthA* and *avrB6*, respectively *Mol. Plant-Microbe Interact*. v.7, p.345-355, 1994.
- YASHIRO, K., SAKAMOTO, T., OHMORI, M. Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Mol Biol*. v.31, p.175-181, 1996.
- YEATS, C., FINN, R.D., BATEMAN, A. The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci*. v.27, p.438-440, 2002.
- YEO, H.J., SAVVIDES, S.N., HERR, A.B., LANKA, E., WAKSMAN, G. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell*. v.6, p.1461-1472, 2000.
- ZAIM, J., KIERZEK, A.M. The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res*. v.31, p.1444-1454, 2003.
- ZENG, L.R., VEGA-SANCHEZ, M.E., ZHU, T., WANG, G.L. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res*. v.16, p.413-426, 2006.
- ZIEGELIN, G., PANSEGRAU, W., LURZ, R., LANKA, E. TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. *J Biol Chem*. v.267, p.17279-17286, 1992.
- ZHANG, W., CULLEY, D.E., WU, G., BROCKMAN, F.J. Two-component signal transduction systems of *Desulfovibrio vulgaris*: structural and phylogenetic analysis and deduction of putative cognate pairs. *J Mol Evol*. v.62, p.473-487, 2006.
- ZHULIN, I.B., NIKOLSKAYA, A.N., GALPERIN, M.Y. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol*. v.185, p.285-294, 2003.

8- ANEXOS

Tabela A: Relação dos oligonucleotídeos para clonagem dos genes no vetor pOBD.

Gene	Oligonucleotídeo	Clonagem pOBD
XACb0065	NcoI: tatgccccatggatccattcgttcgc XhoI: accgctcgagactcactgaggcaatagct	NcoI Sall
XAC4160	NcoI: cttgccatggtgaccaacgtcatccgg XhoI: gcgtctcgagtattactcaggcgctcca	NcoI Sall
XAC1495	NcoI: cctcccatggccaaatcaaccctagattcc XhoI: tcggctcgagttttatcctggaaactcgg	NcoI Sall
XAC2126	NcoI: cgggccatggacgaagcgtgcgc XhoI: aaccctcgagaatcactgccggcacgc	NcoI Sall
XAC3245	NcoI: aaggccatggacgcgatgcaggacgt XhoI: ggttctcgaggcctactccgggaaaa	NcoI Sall
XAC3285	NcoI: gtaacctggaacttctggaggacatcaagg XhoI: cgtctcgagcgttacggatagaacttactt	NcoI Sall
XAC3980	NcoI: cgttccatgggaccgctgcctacc XhoI: gtacctcgagcgtcaacgcacatcagtc	NcoI Sall
XAC3673	NcoI: acttccatggtagcactcccaatcgcg XhoI: ttagctcgaggctcagggcgctgcat	NcoI Sall
XAC3839	EcoRI: cacacgaattcatgggacaagaccagctac NcoI: tacgcatggtcatgtgggtctccttc	NcoI EcoRI
XAC2072	EcoRI: tgaggcgaattcatggcgaaagtgcagttgg XhoI: ttgacctcgaggcttacgcggcctcca	EcoRI Sall
XAC2053	NcoI: gcgccgcatggacgatagccagctt XhoI: ccgcaaacgcgagacttagctacgtttggca	NcoI Sall
XAC3263	EcoRI: gcggccaagaattcatgcatgtcgcagatc XhoI: aatccctcgaggcttagggcagtgataacgc	EcoRI Sall
XAC1282	NcoI: gtcaccagttccatggccagcgttccc XhoI: agcaggcctcgagatttagtcatgctcggc	NcoI Sall
XAC1671	EcoRI: cggtcagtcgaattcatgaagaacgtgacg XhoI: atggagcctcgagcgttacagatagtcacg	EcoRI Sall
XAC3956	NcoI: gacatgcattccatggcgcgacacgtacaac XhoI: aactagtctcgagccttacggaagcggttg	NcoI Sall
XAC4263	NcoI: cagagagaaccatggcaggtcgatcagcc XhoI: tcattgggcactcgagcgttatggtgaacgt	NcoI Sall
XAC2555	NcoI: gagaacatcccatggacgatcccggtcac XhoI: gcgactctcgagacttaaccaaccccggt	NcoI Sall
XAC4019	NcoI: tgatccagttccatggcgcgcccgt XhoI: ccgcgacctcgagtattaccgttgactgaa	NcoI Sall
XAC3984	NcoI: caaccgcatggcacgcatgttgccgc XhoI: gtattctcgagatttacggcgccagcgc	NcoI Sall
XAC1201	EcoRI: agcgatcgaattcatggaggcgttgctcg XhoI: gtcctctcgagggttagtcagcaactcg	EcoRI Sall
XAC0279	EcoRI: ggcccgaattcatgtccaatccctcattccc XhoI: aattctcgagaattagactgcggccggcaac	EcoRI Sall
XAC0340	EcoRI: gcgctagaattcatgaatgcgattgccctg XhoI: gcagctcgaggcttatgccatggcttcgt	EcoRI Sall
XAC2118	NcoI: gcatctccatgggcaaccgcaagcacg XhoI: atcgtgctcgaggcttaccgcggttatg	NcoI Sall
XAC3294	NcoI: gtgatccatggggcgtcacacgctct XhoI: agatactcgaggcttattggcgtaggccc	NcoI Sall
XAC0135	NcoI: accatggtcccgtgtgcgcacgcgctgc XhoI: acgggcttactaccggtatgtctcgg	NcoI Sall
XAC0608	NcoI: ccgctgtccccatggcgcatccaag SmaI: tcggttcgccgggtcaggccaggc	NcoI SmaI
XAC0610	NcoI: cgcacgctgcccattggtcgtcgcc SmaI: cgacacacccgggttacgatcagg	NcoI SmaI
XAC0621	NcoI: catggcgccacgcaagtgcgggtgc XhoI: gagtattacgaggcttacagttgccg	NcoI Sall

XAC0684	NcoI: gacctatggcgcgcatccgtaccatt XhoI: tactcgagtcagtcaccaactccgggtg	NcoI Sall
XAC0760	NcoI: gtccaccatggatgaagacgtttcgca XhoI: gacgaccgtccgccagcggact	NcoI Sall
XAC1273	NcoI: tatccatggggcgatggctggcatt XhoI: aggcttacgtgccacgtgtctcc	NcoI Sall
XAC1274	NcoI: cggaggagaccatgggcagtaagc Finishing: gcgagcgctggagcggca XhoI: gcagccgcctcgagccctacgccgc	NcoI Sall
XAC1279	NcoI: tgccatggacctaccgcgaccggcct XhoI: ctcgaggttaggctgccaggttggtg	NcoI Sall
XAC1672	NcoI: ggatcgccccatggctatctgtgacg XhoI: acatcgcggttcgagacggccgaag	NcoI Sall
XAC1991	NcoI: acgccgcctgccatggtgaccgccaagttt XhoI: attcccagcgctcgagtattaccgcgggt	NcoI Sall
XAC2158	EcoRI: gcctcgctggaattcatcgctgtttgctg XhoI: cctgccctgctcgagcgtcatcggtggt	EcoRI Sall
XAC3292	NcoI: tgaatgatcccatgggtccctctcaagac XhoI: gccgcaatacctcgatcaaggacaagg	NcoI Sall
XAC3975	EcoRI: gaattcatgctggcgctgagcgaca XhoI: atctcgagtcaggccgcgctggcgg	EcoRI Sall
XAC0501	NcoI: gcgcgcggcaccatgggtaccagcaatt XhoI: gagcaacgactcgagcgtcagcgctgcttg	NcoI Sall
XAC0674	NcoI: ggagcttcgccatggattacctcgataacct XhoI: gtccctgcgctcgagcgtcagcga	NcoI Sall
XAC1088	NcoI: atagaattgcatggctgcctgccccgc XhoI: agttgaacgctcgagggttagatcgtagccac	NcoI Sall
XAC1093	NcoI: gagatcctggccatggtgctgttggtgag XhoI: ttggtcaacctcgaggcttaagcgcggta	NcoI Sall
XAC1171	EcoRI: tccgaacgcgaattcatgatccagaagttat XhoI: gctaaaaatctcgagtattaaaaagaaggcaag	EcoRI Sall
XAC1866	NcoI: tgaccatggagcgctttgcgcgactgtacg XhoI: ttggtcgagtcaccgcgctccacgccacc	NcoI Sall
XAC2236	NcoI: tgtgcgcaacctgagtgggcgcaata XhoI: gagggggccctcgaggatcaatacgaatc	NcoI Sall
XAC2657	NcoI: ccgccacgaccatggtggccgggac Finishing: caggctcgtttgctggatcc XhoI: atgggtcggcctcgagggtcagtgagtgg	NcoI Sall
XAC3112	NcoI: tgcgtctgccccatggtcaccgtggtc XhoI: acatcaccactcgaggtcaccgctgttc	NcoI Sall
XAC3852	NcoI: accatggctggcgcccgagcggcg XhoI: ggcttagagcccgctgcgccgccgt	NcoI Sall
XAC3273	EcoRI: gcccccttgaaattcatgaaaatactctg XhoI: catgactcgagtattaagggaaggcatg	EcoRI Sall
XAC3873	NcoI: accatggccatgaagcagcagctcac XhoI: acctcgagtcagcctgccagctgctgctt	NcoI Sall
XAC1669	NcoI: tccggcatctccatggagggtctggac XhoI: gctggcaccctcgaggcttagtggcg	NcoI Sall
XAC2616	NcoI: ggcgccatggagtttgaatcgataacaag XhoI: ccgactcgagctttatgcatagtattgagc	NcoI Sall

CURRICULUM VITAE

Nome: **Cássia Docena**

Nascimento: São Paulo, 07 de abril de 1969

Educação

Ensino Médio

Escola Luís de Queiroz, Piracicaba-São Paulo, 1986.

Escola Estadual de Segundo Grau “Professor Manuel Ciridião Buarque”, 1984-1985.

Ensino Superior

Bacharelado em Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

Licenciatura Curta e Plena em Biologia

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

Pós-Graduação

Mestrado em Bioquímica

Instituto de Química-USP, São Paulo, 26 de outubro de 2000.

Bolsas de estudo

Bolsista de Mestrado da FAPESP de março de 1999 a agosto de 2000.

Bolsista de Doutorado da FAPESP de julho de 2001 a junho de 2005.

Prêmios Recebidos

Prêmio de Mérito Científico e Tecnológico

Governo do Estado de São Paulo, 2000

Publicações

Andrade, M.O., Alegria, M.C., Guzzo, C.R., Docena, C., Rosa, M.C., Ramos, C.H., Farah, C.S., The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Mol Microbiol.* Oct;62(2):537-51, 2006.

- Khater, L., Docena, C., Rasera, A.C., Alegria, M.C., Santos, T.M., Ramos, C.H.I. *In silico* identification of potential chaperone genes that belong to type III and type IV secretion systems in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Genetics and Molecular Biology*, v.28, p.321-327, 2005.
- Alegria, M.C., Souza, D.P., Andrade, M.O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C.H., da Silva, A.C., Farah, C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion *loci* of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol.* v.187, p.2315-2325, 2005.
- Alegria, M.C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C.H., da Silva, A.C., Farah, C.S.. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *J Bacteriol.* v.186, p.6186-6197, 2004.
- Simpson, A.J.G. *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v.406, p.151-159, 2000.