**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

**Identificação e Análise Funcional de Interações
Proteína-Proteína do Sistema de Secreção do
Tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Paola Alejandra Cappelletti

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo

16 de abril de 2010

PAOLA ALEJANDRA CAPPELLETTI

**Identificação e Análise Funcional de Interações
Proteína-Proteína do Sistema de Secreção do
Tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo

2010

Nome do(a) Pós-Graduando(a): Paola Alejandra Cappelletti

Título da Tese de Doutorado: Identificação e Análise Funcional de Interações Proteína-Proteína do Sistema de Secreção do Tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em
Ciências Biológicas (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

*“A cada dia que vivo, mais me convenço
de que o desperdício da vida está no
amor que não damos, nas forças que não usamos,
na prudência egoísta que nada arrisca e que,
esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade”.*

Carlos Drummond de Andrade.

Ao Diogo, minha eterna companhia...

Agradecimentos

A essa alma, que sempre busca estar em frequência com a minha e que desperta as mais profundas saudades quando está longe... ao meu marido, Diogo.

A minha família, especialmente a meus pais, Alejandra e Julio por terem se empenhado intensamente na minha educação e formação como pessoa.

A meus irmãos, Gabriela e Ariel, por serem pessoas maravilhosas que fazem parte insubstituível da minha vida. A Lucila, meu sol, minha luz...

Ao Prof. Dr. Chuck, por ter me brindado a oportunidade de trabalhar no seu laboratório, por ter sido paciente, compreensivo e amigo ao longo destes anos. A sua família, Lourdes e Sara, por sua amizade e hospitalidade.

A Ilda, por ser essa amiga maravilhosa, por sempre me incentivar a crescer como pessoa. Agradeço infinitamente tua companhia e tua alegria que serão parte da minha vida para sempre.

A Camila, por sua amizade e companhia, sempre brindando sua ajuda incondicionalmente.

Aos meus amigos e colegas do laboratório: Maxuel, Claudia, Diorge, Ângela, Fernando, Cássia, Miryam, Luci, Lucas, Clarissa, Alessandra, Eric, Thais, Rafael, Júlio, Raphael, Maycon, Cristiane e Roberto, pelo apoio, paciência, amizade e por terem tornado meu dia a dia muito prazeroso.

À FAPESP pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

1-Introdução	1
1.1- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac): agente causador do cancro cítrico	1
1.1.1-Variantes de <i>Xanthomonas axonopodis</i> e taxonomia das cepas	3
1.1.2-O cancro cítrico e seus hospedeiros	4
1.1.3-Programas de erradicação	7
1.2-Sistema imune da planta	8
1.3-Interação patógeno-não hospedeiro: resposta de hipersensibilidade (HR)	11
1.3.1-Papel da goma xanthana na patogenicidade de Xac e habilidade para induzir HR em plantas não hospedeiras	12
1.4-Interações patógeno-hospedeiro	13
1.4.1-Sistema de secreção do tipo III (T3SS)	14
1.4.1.1-Morfologia e arquitetura do T3SS	16
1.4.1.2-Regulação da expressão dos genes <i>hrp</i> em fitopatógenos	21
1.4.1.3-Hrp pilus: O canal para a célula hospedeira	22
1.4.1.4-Proteínas efetoras do T3SS e sua função na interação com o hospedeiro	24
1.4.1.4.1-O determinante do cancro cítrico: PthA	26
1.4.1.5-Proteínas chaperonas do T3SS	28
1.5-Proteínas do T3SS de Xac	30
2-Objetivos	32
3-Materiais e Métodos	33
3.1-Expressão e purificação de proteínas recombinantes	33
3.1.1-Clonagem dos genes de interesse em vetores de expressão	33
3.1.2-Confirmação de clones obtidos	35
3.1.3-Sistemas de expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	35
3.1.4-Mutação sítio dirigida	38
3.1.4.1-Mutação sítio dirigida dos aminoácidos NPTH (264-267) na proteína HrcU ₂₀₇₋₃₅₇	39
3.1.5-Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	39
3.1.5.1- Produção de proteínas marcadas isotopicamente com ¹⁵ N	40
3.1.6-Purificação de proteínas recombinantes	41
3.1.7-Re-enovelamento de proteínas recombinantes	45

3.1.8-Espectrometria de massas de proteínas recombinantes purificadas.....	45
3.1.9-Análise de estrutura secundária e sequência primária de proteínas recombinantes.....	46
3.1.9.1-Ensaio de Dicroísmo Circular (CD).....	46
3.1.9.10-Sequenciamento de proteínas por degradação de Edman.....	46
3.2- Produções de soros policlonais específicos contra proteínas recombinantes purificadas.....	47
3.2.1-Limpeza de soros policlonais.....	48
3.2.2-Especificidade de soros policlonais analisados por “Western blot”.....	48
3.3-Interações proteína-proteína “in vitro” a partir de proteínas recombinantes purificadas.....	49
3.3.1-Ensaio de “Far-Western blot” ou “Overlay”.....	49
3.3.2-Ensaio de “Pull down”.....	50
3.3.3-Ensaio de fluorescência.....	51
3.3.4-Experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN).....	51
3.3.5-Interações proteína-proteína monitoradas por dicroísmo circular (CD).....	51
3.4-Produção de nocautes “não polares” de genes do T3SS de <i>Xac</i>	52
3.4.1-Amplificações de ORFs flanqueadas por 1000 pb.....	52
3.4.2-Clonagem de genes no plasmídeo suicida pNPTS138.....	54
3.4.3-Preparação e transformação de células competentes de <i>Xac</i>	56
3.4.4-Seleção de mutantes nocautes “não polares” no genoma de <i>Xac</i>	56
3.4.5-Confirmação de genes deletados no genoma de <i>Xac</i> por PCR.....	57
3.5-Complementação dos nocautes não polares em <i>Xac</i>	58
3.5.1-Complementação com os genes tipo selvagem.....	58
3.5.1.1-Mutação sítio dirigida na construção pUFR047_hrcU.....	60
3.5.1.2-Mutações sítio dirigidas na construção pUFR047_hrpB2.....	61
3.5.2- Transformação de cepas mutantes de <i>Xac</i> com construções de complementação.....	63
3.6-Teste de patogenicidade em planta.....	66
3.6.1-Curvas de crescimento “in vivo”.....	66
3.7-Ensaio de secreção das proteínas HrpB2 e HpaA em <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	67
4-Resultados	68
4.1-Análise estrutura-função do complexo HrcU-HrpB2.....	68

4.1.1- <i>HrcU</i> ₂₀₇₋₃₅₇ recombinante sofre auto-clivagem no sítio NPTH	69
4.1.1.1-Sequenciamento da proteína <i>HrcU</i> ₂₀₇₋₃₅₇ por Degradação de Edman.....	70
4.1.2-Mutação sitio dirigida dos aminoácidos NPTH (264-267) da proteína <i>HrcU</i> ₂₀₇₋₃₅₇	71
4.1.3-Expressão e purificação da proteína <i>HrcU</i> _{207-357AAAH}	71
4.1.4-Expressão e purificação da proteína <i>HrcU</i> _{277-3576xHis}	72
4.1.5-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína <i>HrcU</i> _{207-357AAAH}	73
4.1.6-Re enovelção da proteína <i>HrcU</i> _{207-357AAAH} pura monitorada por fluorescência.....	75
4.1.7-Analise por CD da estrutura secundária das proteínas <i>HrcU</i> ₂₀₇₋₂₆₄ , <i>HrcU</i> _{207-357AAAH} e <i>HrcU</i> _{277-3576xHis} puras.....	75
4.1.8-Expressão e purificação da proteína <i>HrpB2</i>	76
4.1.9-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína <i>HrpB2</i>	77
4.1.10-Analise por CD da estrutura secundária da proteína <i>HrpB2</i>	78
4.1.11-Interação proteína-proteína, domínio C-terminal <i>HrcU</i> - <i>HrpB2</i>	79
4.1.11.1-Interação dos fragmentos: <i>HrcU</i> ₂₀₇₋₂₆₄ , <i>HrcU</i> _{207-357AAAH} e <i>HrcU</i> _{277-3576xHis} com <i>HrpB2</i> , utilizando ensaios de “Far-Western blot”	79
4.1.11.2-Interação dos fragmentos: <i>HrcU</i> ₂₀₇₋₂₆₄ , <i>HrcU</i> _{207-357AAAH} e <i>HrcU</i> _{277-3576xHis} com <i>HrpB2</i> , utilizando ensaios de fluorescência.....	81
4.1.11.3-Interação <i>HrpB2</i> - <i>HrcU</i> ₂₇₇₋₃₅₇ por ensaios de “Pull down” e confirmação por “Western blot”.....	82
4.1.12- <i>HrcU</i> e <i>HrpB2</i> são essências para a patogenicidade de <i>Xac</i>	84
4.1.13-Complementação dos genes <i>hrcU</i> e <i>hrpB2</i> revertem sintomas e desenvolvimento do cancro cístico no hospedeiro.....	86
4.1.13.1- Complementação com mutantes de <i>HrpB2</i> _x mostram importância nos últimos sete aminoácidos.....	87
4.1.13.2-T125 de <i>Xac</i> <i>HrpB2</i> é essencial para a patogenicidade da bactéria....	89
4.1.14- <i>HrcU</i> não é necessária para sobrevivência e multiplicação da bactéria no hospedeiro.....	91
4.1.15- <i>HrpB2</i> é secretada por <i>Xac</i>	92
4.1.16-A sequência NPTH contribui na secreção de <i>HrpB2</i> via T3SS.....	93

4.1.17-A secreção de HrpB2 não é afetada por deleções no extremo C-terminal.....	94
4.1.18-Xac Δ hrpB2+pUFR047_hrpB2 _{T125A} secreta HrpB2 _{T125A} ao espaço exterior, mas não desenvolve doença no hospedeiro.....	95
4.2-O complexo: HpaA-HpaB-HrcV.....	95
4.2.1-Expressão e purificação das proteínas HpaA _{6xHis} , HpaB e o domínio C-terminal HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	96
4.2.2-HpaB forma complexos oligoméricos após re-enovelamento.....	98
4.2.3-Complexos oligoméricos da proteína HpaB são confirmados por espectrometria de massas	99
4.2.4-Enovelamento de HpaB após retirada do agente desnaturante.....	99
4.2.5-Peso molecular de HpaA _{6xHis} confirmado por espectrometria de massas.....	100
4.2.6-HrcV ₃₂₃₋₆₄₅ forma agregados em solução, após purificação.....	101
4.2.7-Produção e teste de especificidade de soro policlonal anti-HpaB.....	102
4.2.8-Detecção das interações HpaA _{6xHis} -HpaB-HrcV ₃₂₃₋₆₄₅ in vitro.....	103
4.2.8.1-Interação das proteínas HpaA _{6xHis} -HpaB mediante ensaios de “Far-Western blot”	104
4.2.8.2-Interação das proteínas HpaA _{6xHis} -HpaB mediante ensaios de “Pull down”	105
4.2.8.3-Interação das proteínas HpaB-domínio C-terminal HrcV ₃₂₃₋₆₄₅ mediante ensaios de “Far-Western blot”	106
4.2.8.4-“Far-Western blot” para detectar a existência do complexo ternário HpaA _{6xHis} -HpaB-domínio C-terminal HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	107
4.2.9-HpaB e HpaA contribuem na patogenicidade de Xac, diminuindo sintomas da doença.....	108
4.2.10-O crescimento da cepa Δ hpaB no hospedeiro é comprometido.....	109
4.2.11-HpaB é necessária para a secreção das proteínas HpaA e HrpB2.....	111
4.3-O complexo HrpD6 _{6xHis} -HrpB1-HrpW.....	112
4.3.1-Expressão e purificação da proteína HrpD6 _{6xHis}	113
4.3.2-Expressão e purificação da proteína HrpW.....	114
4.3.3-Expressão e purificação da proteína HrpB1.....	115
4.3.4-Análise por CD das proteínas HrpD6 _{6xHis} -HrpB1-HrpW.....	116

4.3.5-Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) para a proteína	
<i>HrpD6_{6xHis}</i>	117
4.3.6-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína	
<i>HrpD6_{6xHis}</i>	118
4.3.7-Interação proteína-proteína, <i>HrpD6_{6xHis}-HrpB1-HrpW</i>	119
4.3.7.1-Interação das proteínas <i>HrpB1-HrpD6_{6xHis}</i> mediante ensaios de “ <i>Far Western blot</i> ”.....	119
4.3.7.2-Interação das proteínas <i>HrpB1-HrpW</i> mediante ensaios de “ <i>Far-Western blot</i> ”.....	120
4.3.7.3-Interação das proteínas <i>HrpD6_{6xHis}-HrpB1</i> mediante ensaios de “ <i>Pull down</i> ”	121
4.3.7.4-Mudanças conformacionais na formação dos complexos <i>HrpB1-HrpD6_{6xHis}</i> e <i>HrpB1-HrpW</i>	123
4.3.7.5-Mudanças no espectro- ¹⁵ N-HSQC de <i>HrpD6_{6xHis}</i> induzidas pela ligação de <i>HrpB1</i>	124
4.3.7- <i>HrpB1</i> contribui para a patogenicidade de <i>Xac</i>	125
4.4- <i>HrpG</i> é essencial para desenvolver doença no hospedeiro.....	126
4.5- <i>HrpE</i> : principal componente do canal externo do T3SS de <i>Xac</i>	127
4.5.1-Produção e purificação da proteína <i>HrpE_{6xHis}</i>	127
4.5.2-Espectrometria de massas de <i>HrpE_{6xHis}</i>	128
4.5.3-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína	
<i>HrpE_{6xHis}</i>	129
5-Discussão	131
5.1-Interações entre as proteínas <i>HrcU</i> e <i>HrpB2</i>	131
5.2-Interações entre as proteínas <i>HpaA-HpaB-HrcV</i>	144
5.3-Interações entre as proteínas <i>HrpD6-HrpB1-HrpW</i>	150
6-Conclusões	152
7-Referências bibliográficas	154
8-Anexos	

RESUMO

O cancro cítrico é considerado na atualidade uma das doenças mais perigosas e prejudiciais à citricultura brasileira e mundial, devido aos danos causados na produção e qualidade dos frutos, sendo a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) a bactéria fitopatogênica responsável por tais prejuízos.

Nosso laboratório iniciou estudos de identificação e análise funcional das interações proteína-proteína de *Xac* envolvendo sistemas importantes para sua patogenicidade (Alegria *et. al.*, 2004). Nosso objetivo principal foi o estudo funcional e fisiológico de interações já identificadas entre proteínas do sistema de secreção do tipo III (T3SS) da *Xac*. O foco de nossa pesquisa foi tentar desvendar a importância biológica, na patogenicidade de *Xac*, das interações proteína-proteína: HrpB2-HrcU; HpaA-HpaB-HrcV; HrpD6-HrpB1- HrpW. Com este intuito clonamos, expressamos e purificamos as proteínas recombinantes. Produzimos soros policlonais específicos contra cada uma das proteínas citadas acima. Estudamos a interação entre as proteínas *in vitro* por meio de técnicas como *Far-Western Blot*, *Pull Down*, fluorescência e dicroísmo circular.

Outro enfoque do nosso trabalho foi monitorar a contribuição individual destas proteínas no desenvolvimento da doença *in planta*. Para isso produzimos cepas de *Xac* mutantes para os genes *hrpB2*, *hrcU*, *hpaA*, *hpaB*, *hrpB1* e *hrpG*. Os nocautes não polares foram infiltrados em plantas de laranja pêra, assim como também as cepas de complementação correspondentes, e assim foi testada a habilidade de desenvolver o cancro cítrico e/ou reverter os sintomas da doença. Também foi monitorada a capacidade de multiplicação e sobrevivência *in planta* das cepas *Xac* Δ *hrpB2*, Δ *hrcU* e Δ *hpaB*, assim como a secreção das proteínas HrpB2 e HpaA pelo T3SS de *Xac*.

Estudamos com mais detalhe a possível função de HrpB2 no T3SS de *Xac*, desenvolvendo experimentos para determinar a região da proteína imprescindível para sua função permanecer inalterada. Realizamos mutações sítio dirigidas, a fim de introduzir códons de terminação em diferentes regiões da proteína e testar a habilidade desses fragmentos de reverter os sintomas da doença na planta. Monitoramos a capacidade de proteínas mutantes de reverter fenótipos de patogenicidade em citrus, ausentes na cepa *Xac* Δ *hrpB2* e revertidos na cepa de complementação *Xac* Δ *hrpB2*+pUFR047_*hrpB2*. Desta maneira, determinamos que os últimos seis aminoácidos de HrpB2 estão envolvidos no desenvolvimento da/s função/ões em *Xac*.

ABSTRACT

Citrus canker, caused by the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*), is a disease with significant economic consequences for the Brazilian and global citrus industry due to reductions in production and fruit quality.

Our laboratory has initiated studies for the identification and functional analysis of protein-protein interactions involving *Xac* systems involved in pathogenicity (Alegria *et. al.*, 2004). One objective has been to study functional and physiological interactions between proteins that make up the *Xac* Type III secretion system (T3SS). The focus of the present study is to unravel the biological significance in *Xac* pathogenicity of the following previously identified protein-protein interactions: HrpB2-HrcU; HpaA-HpaB-HrcV; HrpD6-HrpB1-HrpW. We therefore cloned, expressed and purified the above-mentioned recombinant proteins. Specific polyclonal serum were produced and interactions between the proteins were studied *in vitro* using a variety of methods, including Far-Western Blot, Pull Down, fluorescence and circular dichroism.

To monitor the individual contribution of these proteins in disease development in planta, we produced mutant *Xac* strains in which the *hrpB2*, *hrcU*, *hpaA*, *hpaB*, *hrpB1* and *hrpG* genes were disrupted. The nonpolar knockouts as well as the corresponding complementation strains were infiltrated into *Citrus sensensis* plants and the development of citrus canker symptoms and bacterial proliferation *in planta* was evaluated. We also evaluated the T3SS-dependent secretion of proteins HpaA and HrpB2 by these *Xac* mutant strains.

Structure-function relationships of the HrpB2 protein were studied in more detail. We developed experiments to determine the region of the protein essential for its function. We produced a series of *hrpB2* mutants which were used to complement the *hrpB2* knockout strain and evaluated their abilities to reverse the symptoms of the disease in the plant. The results demonstrate that the last six amino acids HrpB2 are important for its function in the development of disease symptoms by *Xac*.

Lista de Abreviações

Aa	Aminoácido
B-CIP	5-bromo 4-cloro 3-indofosfato
CD	Dicroísmo Circular
CFU	Unidades formadoras de colônias
HR	Resposta de hipersensibilidade
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranocídio
M	Concentração molar
NBT	Cloreto nitro azul de tetrazólio
ND	Não detectado
OD	Densidade ótica
ORF	Open reading frame
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de SDS-poliacrilamida
T3SS	Sistema de secreção do tipo III
TBS	Tampão Tris base salino
TBS-TT	Tampão Tris base salino, 0,1% Triton, 0,1% Tween 20
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
WT	Cepa selvagem
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>

Lista de Tabelas		Pagina
Tabela 1	Espécies e variedades de citros suscetíveis ao cancro cítrico	7
Tabela 2	Putativos genes efetores de <i>Xac</i> , <i>Xoo</i> e <i>Xcc</i>	26
Tabela 3	Genes do T3SS escolhidos para estudo funcional dos mesmos na patogenicidade de <i>Xac</i> .	33
Tabela 4	Detalhes dos genes e/ou fragmentos do T3SS de <i>Xac</i> clonados em seus respectivos vetores de expressão em <i>E. coli</i> .	37
Tabela 5	Oligonucleotídeos utilizados para amplificar genes do T3SS de <i>Xac</i> , para serem utilizados em sistemas de expressão em <i>E. coli</i>	38
Tabela 6	Expressão das proteínas recombinantes do T3SS de <i>Xac</i>	40
Tabela 7	Protocolos de purificação das proteínas recombinantes do T3SS de <i>Xac</i>	42
Tabela 8	Oligonucleotídeos utilizados nas construções a serem clonadas no vetor pNPTS138	55
Tabela 9	Construções no vetor pNPTS138 para obter a deleção de genes específicos do T3SS de <i>Xac</i> .	58
Tabela 10	Oligonucleotídeos utilizados para gerar as construções de complementação no vetor pUFR047	60
Tabela 11	Construções de complementação para cepas mutantes de <i>Xac</i>	62
Tabela 12	Oligonucleotídeos utilizados para as mutações sítio dirigidas realizadas na construção de complementação pUFR047_ <i>hrpB2</i>	63
Tabela 13	Cepas de complementação: <i>Xac</i> Δ “ <i>gene</i> ”+vetor_ “ <i>gene</i> ” das cepas mutantes <i>Xac</i> Δ “ <i>gene</i> ”	64

	Lista de Figuras	Pagina
Figura 1	Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Xac</i>	2
Figura 2	Lesão de cancro cítrico em tecido infectado	3
Figura 3	Sintomas de cancro cítrico dos grupos: asiático (cancro A) e o grupo da América do Sul, (cancro B)	4
Figura 4	Microscopia eletrônica de varredura em infecções de <i>Xac</i> em folhas de <i>Citrus paradisi</i>	5
Figura 5	Ciclo do desenvolvimento da doença do cancro cítrico	6
Figura 6	Modelo “zigzague” ilustrando as etapas de desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante infecção	10
Figura 7	Esquema das interações entre fitopatogenos e plantas	15
Figura 8	Crio-microscopia eletrônica para visualizar a organização estrutural do “complexo da agulha”	17
Figura 9	Representação esquemática do flagelo bacteriano e o T3SSs em <i>Yersinia</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas syringae</i>	19
Figura 10	Estrutura do locus gênico <i>hrp</i> em <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	21
Figura 11	Comparações de sintomas de cancro cítrico na superfície das folhas de citros	27
Figura 12	Mapas e seqüências dos vetores de expressão da série pET	36
Figura 13	Mapa do vetor suicida pNPTS138	53
Figura 14	Esquema mostrando a construção para geração de mutantes não polares para as proteínas HpaA, HrpB2, HrcU, HrpD6, HrpB1 e HrpG em <i>Xac</i>	54
Figura 15	Mapas de vetores para complementação em cepas mutantes de <i>Xac</i>	59
Figura 16	Esquema mostrando a construção utilizada para complementação das mutações não polares para os genes: <i>hrpB1</i> , <i>hrpB2</i> , <i>hrcU</i> e <i>hpaA</i> , em <i>Xac</i>	60
Figura 17	Indução e purificação da proteína recombinante HrcU ₂₀₇₋₃₅₇	69
Figura 18	Seqüência primária do fragmento HrcU ₂₀₇₋₃₅₇	70
Figura 19	Indução e purificação da proteína recombinante HrcU _{207-357AAAAH}	72
Figura 20	Indução e purificação da proteína recombinante HrcU _{277-3576xHis}	73
Figura 21	Western blot confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrcU _{207-357AAAAH}	74
Figura 22	Espectro de fluorescência para a proteína HrcU _{207-357AAAAH}	75
Figura 23	Dicroísmo circular (CD) da proteína HrcU e fragmentos derivados.	76
Figura 24	Indução e purificação da proteína recombinante HrpB2	77
Figura 25	Western blot confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrpB2	78
Figura 26	Dicroísmo circular (CD) da proteína HrpB2	78
Figura 27	Interação de HrpB2 com HrcU _{207-357AAAAH} e HrcU _{277-3576xHis}	80
Figura 28	Seqüência primaria da proteína HrpB2 de <i>Xac</i> de 130 aminoácidos	81
Figura 29	Espectros de emissão de fluorescência para HrcU ₂₀₇₋₂₆₄ , HrcU _{207-357AAAAH} e HrcU _{277-3576xHis} na ausência e na presença de HrpB2	82
Figura 30	Ensaio de “Pull down” demonstrando a interação da proteína HrpB2 com HrcU _{277-3576xHis} imobilizada numa resina de Ni ²⁺ .	84
Figura 31	PCR de colônia para <i>Xac</i> WT (cepa selvagem), <i>Xac</i> Δ <i>hrcU</i> e <i>Xac</i> Δ <i>hrpB2</i>	85
Figura 32	HrcU e HrpB2 contribuem na patogenicidade de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	86
Figura 33	Seqüências nucleotídica e protéica do gene <i>hrpB2</i>	88
Figura 34	Teste de patogenicidade de diversas cepas de complementação para o gene <i>hrpB2</i> em plantas hospedeiras de laranja pêra	88
Figura 35	Representação do alinhamento de 37 seqüências protéicas da família de proteínas do Pfam de HrpB2 (PF09487)	90

Figura 36	Teste de patogenicidade de diversas cepas de complementação para o gene <i>hrpB2</i> em plantas hospedeiras de laranja pêra	91
Figura 37	Unidades formadoras de colônia (CFU) de diversas cepas de <i>Xac</i> por cm ² de tecido de folha de laranja	92
Figura 38	HrpB2 é secretada via T3SS de <i>Xac</i>	94
Figura 39	Esquema da interação observada pelo sistema de duplo híbrido envolvendo as proteínas HpaA, HpaB e o domínio citosólico de HrcV	96
Figura 40	Indução e purificação das proteínas recombinantes HpaA _{6xHis} , HpaB e HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	97
Figura 41	Seqüência primária da proteína HpaB	98
Figura 42	Tratamento da proteína HpaB à altas temperaturas	98
Figura 43	Espectro de massas obtido para a proteína HpaB pura	99
Figura 44	Dicroísmo circular da proteína HpaB	100
Figura 45	Espectro de massas obtido para a proteína HpaA _{6xHis} pura	101
Figura 46	Cromatografia de exclusão molecular de purificação da proteína HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	102
Figura 47	“Western blot” determinando a especificidade do soro policlonal obtido contra a proteína HpaB	103
Figura 48	“Far-Western blot” das proteínas HpaA _{6xHis} -HpaB	105
Figura 49	“Pull down” das proteínas HpaA-HpaB	106
Figura 50	Interação entre as proteínas HpaB-HrcV ₃₂₃₋₆₄₅ por ensaio de “Far-Western blot”	107
Figura 51	“Far-Western Blot” para detectar a existência de um complexo ternário entre as proteínas HpaA _{6xHis} -HpaB-HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	108
Figura 52	Teste de patogenicidade para as proteínas HpaB e HpaA em plantas hospedeiras de laranja pêra	109
Figura 53	Monitoramento do crescimento da cepa $\Delta hpaB$ no hospedeiro e “in vitro”	110
Figura 54	HpaB é necessária para a secreção das proteínas HpaA e HrpB2	112
Figura 55	Indução e purificação da proteína recombinante HrpD6 _{6xHis}	114
Figura 56	Indução e purificação da proteína recombinante HrpW	115
Figura 57	Purificação de HrpB1 analisadas por SDS-PAGE 18% e espectrometria de massa	116
Figura 58	Dicroísmo circular para as proteínas HrpB1, HrpD6 _{6xHis} e HrpW	117
Figura 59	Espectros de ¹⁵ N-HSQC para a proteína ¹⁵ NHrpD6 _{6xHis}	118
Figura 60	Seqüência primária da proteína HrpD6 _{6xHis}	118
Figura 61	“Western blot” confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrpD6 _{6xHis}	119
Figura 62	“Far-Western blot” das proteínas HrpB1-HrpD6 _{6xHis}	120
Figura 63	“Far-Western blot” das proteínas HrpB1-HrpW	121
Figura 64	Ensaio de “Pull down” para determinar interação entre as proteínas HrpD6 _{6xHis} -HrpB1	122
Figura 65	Dicroísmo circular para os complexos HrpW-HrpB1 e HrpD6 _{6xHis} -HrpB1	123
Figura 66	Espectro de ¹⁵ N-HSQC para a proteína HrpD6 _{6xHis} marcada isotopicamente com ¹⁵ N e para a interação entre ¹⁵ NHrpD6 _{6xHis} e HrpB1	125
Figura 67	Avaliação da patogênica de <i>Xac</i> $\Delta hrpB1$ em plantas de laranja pêra	126
Figura 68	Avaliação da patogênica de <i>Xac</i> $\Delta hrpG$ em plantas de laranja pêra	127
Figura 69	Produção e purificação da proteína HrpE _{6xHis}	128
Figura 70	Espectro de massas obtido para a proteína HrpE _{6xHis}	129
Figura 71	“Western blot” confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrpE _{6xHis}	130

Figura 72	Esquema representando a estrutura da proteína <i>Xac</i> HrcU	133
Figura 73	Alinhamento das seqüências da família de proteínas de HrpB2	141
Figura 74	Esquema representando o modelo de interação HrcU-HrpB2 em comparação com a interação do sistema flagelar FlhB-FliK	143
Figura 75	Modelo de interação das proteínas <i>Xac</i> HpaA-HpaB-HrcV	149

1- Introdução

As plantas oferecem um atrativo reservatório de nutrientes para os fitopatógenos, e, quando são colonizadas por eles, apresentam com frequência severas doenças. Os fitopatógenos desenvolvem sofisticadas estratégias para colonizar seus hospedeiros, entrando neles através do estroma ou feridas e se multiplicando no espaço intracelular dos tecidos do hospedeiro (Büttner e Bonas 2002).

Bactérias gram-negativas fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* e outras, utilizam estratégias moleculares que funcionam em conjunto, para acessar, colonizar, multiplicar e invadir o tecido hospedeiro. Esta invasão modifica e, em muitos casos compromete a homeostase da planta no nível celular, tecidual e, às vezes, de forma generalizada. Como resultado, o patógeno adquire capacidade de infectar e causar doenças (ou de estabelecer uma parceria simbiótica) com o hospedeiro (ou grupo) específico (Brunings e Gabriel, 2003).

Uma destas doenças ocasionadas por fitopatógenos é o cancro cítrico, o qual é considerado na atualidade uma das doenças mais perigosas e prejudiciais à citricultura brasileira e mundial devido aos danos causados na produção e na qualidade dos frutos e por não existirem medidas de controle eficazes. A *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é a bactéria fitopatogênica responsável por tais prejuízos.

***1.1- Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*): agente causador do cancro cítrico.**

A citricultura brasileira movimentou, em 2003, quase 10 bilhões de reais. O Sistema Agroindustrial Citrícola representa 4,47% das exportações brasileiras de produtos do *agribusiness*. 72% do valor das exportações brasileiras vêm do suco de laranja concentrado congelado. O Estado de São Paulo concentra 79% da produção brasileira de laranja, sendo responsável por 95% das exportações de suco de laranja. O suco de laranja concentrado congelado ocupou a segunda posição nas exportações paulistas em 2003 (Neves *et al.*, 2004). As indústrias agrícolas têm sido prejudicadas por um número sem precedentes de pragas, principalmente patógenos de plantas. Uma das mais notáveis é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*).

Xac é uma bactéria Gram negativa, aeróbica, que se apresenta em forma de bacilo possuindo um único flagelo polar e pigmento xanthomonadina. Este pigmento é típico do gênero da espécie *Xanthomonas*, o qual possui coloração amarela (Rajagopal, *et al.*, 1997) (Figura 1). Em 2002, o genoma inteiro de *Xac* foi sequenciado, contendo um cromossomo de 5,17 Mpb e dois plasmídeos (da Silva *et al.*, 2002).

Figura 1. **A)** Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a forma de bacilo adotada por *Xac*, (medindo 0,2 a 0,6 μm de diâmetro e 0,8 a 2,9 μm de comprimento), e o seu único flagelo polar. Fonte: Elliot Watanabe Kitajima-NAP-NEPA-Esalq-USP. **B)** Colônias isoladas de *Xac*, mostrando o pigmento xanthomonadina, presente no gênero da espécie *Xanthomonas*. Fonte: Laboratório do Dr. Shaker Chuck Farah, IQ-USP.

Xac é o agente causal do cancro cítrico, uma doença caracterizada pela formação de aftas ou lesões, as quais apresentam o fenótipo de encharcamento (“water-soaking”) no tecido infectado, (Gabriel, 2001; Figura 2A). As lesões apresentam necroses, e geralmente encontram-se cercadas por halos cloróticos (Figura 2B), causando desfolhação, queda prematura dos frutos e hiperplasia dos tecidos vegetais. A bactéria pode sobreviver e se multiplicar fora do hospedeiro, mas em contato com estômatos, poros ou lesões de tecidos vegetais, podendo colonizar o tecido e produzir os sintomas clássicos da doença em anfítrioes compatíveis (Graham *et al.*, 2004). Esta doença é uma das que produzem no mundo a maior perda econômica em plantações de cítricos. O desenvolvimento da doença é dependente de inúmeros fatores, um dos quais é a secreção de fatores patogênicos protéicos (às vezes chamados fatores de virulência) pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS) (Brunings e Gabriel, 2003).

Figura 2. Típica lesão de cancro cítrico apresentando o fenótipo de encharcamento (“water-soaking”) no tecido infectado (A). B) Folha de toranja com lesões de cancro cítrico cercadas por halos cloróticos. Fonte: www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/.

1.1.1-Variantes de *Xanthomonas axonopodis* e taxonomia das cepas

Diversos patovares e variantes da bactéria *X. axonopodis* são capazes de causar diferentes tipos distintos de cancro cítrico. A separação dessas variantes, principalmente, baseia-se na gama de hospedeiros e outras características fenotípicas e genotípicas das cepas, já que os sintomas próprios da doença são geralmente muito semelhantes (Graham *et al.*, 2004). Diferentes estudos levaram à conclusão de que o cancro nos cítricos é causado, fundamentalmente, por dois grupos filogeneticamente diferentes de *Xanthomonas*. Ambos provocam sintomas iguais utilizando um comum mecanismo de patogenicidade (Brunings e Gabriel, 2003). O primeiro grupo é o grupo asiático (cancro A), chamado *Xanthomonas citri* ex Hasse (sinónimos: *X. campestris* pv. *citri* e *X. axonopodis* pv. *citri*), sendo a forma mais grave da doença (Figura 3A). Esta é a cepa que provoca a doença mais frequentemente referida como "cancro cítrico" (Brunings e Gabriel, 2003, Graham *et al.*, 2004). O segundo grupo é da América do Sul, causados pela estirpe B (cancro B) e é chamado *X. campestris* pv. *aurantifolii* (sinónimos: *X. campestris* pv. *citri* e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*) (Gabriel *et al.*, 1989, Brunings e Gabriel, 2003), Figura 3B. O cancro B é uma doença de menor importância, a qual afeta a qualidade dos limões na Argentina, Paraguai e Uruguai. A laranja azeda e toranja (citro híbrido resultante do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a laranja (*Citrus x sinensis*)), também são suscetíveis. Existe um terceiro grupo, cancro C, também causado por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, que foi isolado em 1970 a partir da lima no estado de São Paulo, Brasil, mas raramente tem sido

encontrada. O outro hospedeiro natural conhecido por esta bactéria é a laranja azeda (Graham *et al.*, 2004).

Figura 3. Sintomas de cancro cítrico causados pelos grupos: asiático (cancro A) e o grupo da América do Sul, (cancro B). **A)** Frutos de toranja (*Citrus paradisi* Macf.) e folhas expressando sintomas de cancro A. Foto: Tim R. Gottwald, Horticultural Research Laboratory, USDA, ARS, U. S. **B)** Frutos de limão infectados com cancro B na Argentina. Fonte: <http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker>.

1.1.2- O cancro cítrico e seus hospedeiros

O cancro cítrico, causado pelo fitopatogeno *Xac*, foi registrado pela primeira vez na Índia e em Java, em meados do século 19. Na América do Sul foi descoberto pela primeira vez no Brasil e, em seguida, encontrado em muitos outros países, incluindo Argentina, país onde é considerada uma doença endêmica desde 1990 (Graham *et al.*, 2004). O cancro cítrico é conhecido no mundo inteiro, apresentando preocupação significativa na maioria das áreas de produção comercial de citros (Gottwald *et al.*, 1997; Gottwald *et al.*, 2002). A doença é uma das mais prejudiciais, a nível econômico, que afetam citros em todo o mundo e, por esta razão, devem ser aplicadas rigorosamente as leis de erradicação e a quarentena em muitos países, incluindo o Brasil (Brunings e Gabriel, 2003).

A doença é caracterizada por lesões salientes sobre as frutas, folhagens e troncos. Quando a doença é grave, e encontra-se em estado avançado, ocorre desfolhação, deterioração, e queda prematura dos frutos. Os frutos infectados que permanecem, apresentam menor valor comercial ou não são comercializáveis, ocorrendo perdas econômicas significativas para a citricultura. Uma das razões das

perdas, é que na tentativa de proibir a introdução da doença, muitas áreas de cultivo de citros restringem a importação de citros em áreas ou países que se conhece estarem infestados (Brunings e Gabriel, 2003).

Como muitas outras doenças bacterianas, o patógeno entra no tecido da planta hospedeira através de estômatos e ferimentos (Gottwald e Graham, 1992). A temperatura ótima para infecção encontra-se entre 20 e 30° C. As bactérias se multiplicam nas condições ótimas de crescimento, surgindo das aberturas dos estômatos em menos de 5 dias para fornecer o inoculo para o desenvolvimento da doença (Graham *et al.*, 2004, Figura 4A). Os primeiros sintomas nas folhas aparecem aproximadamente aos 9 dias após a infecção e apresentam-se como minúsculas bolhas ligeiramente levantadas, formando pústulas desenvolvidas aos 30 dias após infecção, Figura 4B. À medida que a doença avança, as lesões vão adquirindo uma tonalidade marrom claro, que se torna mais escura com o desenvolvimento da doença (Figura 3). As margens das lesões apresentam o efeito de encharcamento e muitas vezes encontram-se rodeadas por halos cloróticos (Figura 2A e B, respectivamente). O centro das lesões torna-se levantado e esponjoso (Figura 2A). Estas lesões geralmente são visíveis em ambos os lados da folha. Nos galhos e nos frutos, os sintomas do cancro cítrico são semelhantes aos descritos. A bactéria se multiplica nas lesões das folhas, galhos e frutos e são espalhadas mediante uma matriz de polissacarídeos extracelulares (EPS) e dispersam-se para um novo crescimento (Graham *et al.*, 2004, Figura 4C).

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura em infecções da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* na superfície abaxial da folha de toranja (*Citrus paradisi*). **A)** Saída bacteriana pelo estômato aos 5 dias após a infiltração na folha com 10^5 UFC/mL. **B)** Erupção de tecidos infectados através da epiderme do mesófilo formando uma pústula aos 30 dias após a inoculação. **C)** Bactérias incorporadas na matriz de polissacarídeos extracelular (EPS) na superfície da lesão. Fonte: Graham *et al.*, 2004.

Na Figura 5, encontram-se detalhados os passos do ciclo do desenvolvimento da doença do cancro cítrico, a partir do momento em que a bactéria coloniza o hospedeiro, propaga-se nas lesões das folhas, ramos e frutos, e se dispersa para fora das lesões para começar um novo ciclo de colonização no hospedeiro.

Figura 5. Ciclo do desenvolvimento da doença do cancro cítrico. Fonte: <http://www.apsnet.org/online/Feature/citruscanker/>.

Todos os citros são suscetíveis ao cancro. Toranja, lima e limão são altamente suscetíveis. Laranja azeda e laranja doce são moderadamente suscetíveis e tangerinas, são chamadas de moderadamente resistentes (Gottwald *et al.*, 2002). Cabe destacar que as informações obtidas na literatura sobre a possível resistência de algumas variedades de citros, não parece ser devida à resistência de princípios fisiológicos ativos. Foram submetidas à comparação 54 espécies de citros, cultivares e parentes, e nenhum nível significativo de resistência foi detectado quando os citros foram inoculados com *Xac*. A resistência mínima observada foi correlacionada com o tamanho e o número de

estômatos disponíveis para permitir a entrada da bactéria na planta, pelo vento e/ou chuva (Gottwald *et al.*, 1993). Na Tabela 1, encontram-se detalhadas as espécies e variedades de citros, e seus graus de suscetibilidade ou resistência à bactéria, segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus).

Tabela 1. Espécies e variedades de citros suscetíveis ao cancro cítrico. Fonte: www.fundecitrus.com.br.

Variedades e espécies mais resistentes (em ordem decrescente)		
1. Poncan	6. Laranja Natal	10. Laranja Baianinha
2. Mexerica do Rio	7. Tangor Murcote	11. Limão Siciliano
3. Limão Taiti	8. Limão Cravo	12. Limão Galego
4. Laranja Pêra	9. Laranja Hamlin	13. Pomelo
5. Laranja Valência		

1.1.3-Programas de erradicação

Países onde o cancro cítrico não é detectado ou tem sido erradicado, basearam-se em medidas de quarentena extrema, para evitar a introdução de *Xac*. Historicamente, em países como, os Estados Unidos, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália, foram detectados focos iniciais de cancro cítrico, e imediatamente foram iniciados programas de erradicação da doença, sendo bem sucedidos, mas só depois de um grande número de pomares serem destruídos (Koizumi, 1985). Apesar de que muitos países produtores de citros proíbem a importação de material vegetal proveniente de áreas endêmicas de cancro cítrico, os surtos ocorrem continuamente em novas áreas da Flórida, América do Sul e Austrália (Schubert *et al.*, 1996). Em alguns casos, os esforços de erradicação tiveram sucesso limitado na contenção da propagação da doença, como por exemplo, na Flórida, Brasil, Argentina e Uruguai (Hogg, 1985; Stall *et al.*, 1987; Schubert *et al.*, 2001).

Xac é uma ótima candidata para a erradicação do patógeno, já que a doença possui características fundamentais que tornam o conceito de erradicação viável e altamente desejável: i-A bactéria é incapaz de sobreviver fora da lesão, onde encontra-se acolhida, por períodos prolongados; ii-A bactéria não tem um vetor de propagação eficiente (com exceção dos humanos); iii-As lesões fenotípicas da doença são

facilmente identificáveis, o que permite o diagnóstico relativamente rápido e preciso, iv-O hospedeiro se restringe a um intervalo perene de árvores frutíferas, v-Muitas variedades comerciais de citros são moderadamente a altamente suscetíveis, em comparação com as medidas de controle da doença que são modestamente eficazes e relativamente caras, vi-A doença tem sido erradicada anteriormente durante as campanhas na Flórida, Austrália, África do Sul (Graham *et al.*, 2004).

Estes itens estão de acordo com as características atuais do cancro cítrico e especificamente com o conhecimento focado às tentativas em curso de erradicar e controlar a doença na Flórida e na América do Sul (Gottwald *et al.*, 2002; Brunings e Gabriel, 2003; Graham *et al.*, 2004).

Em um programa de erradicação, é importante determinar por quanto tempo a doença tem sido ativa em um determinado lugar, com o objetivo de desenvolver técnicas de erradicação com o grau exato de precisão, a fim de minimizar danos ambientais. Por exemplo, o processo de infecção em plantas perenes de citros é bem compreendido e ocorre em tecidos de um determinado estágio de desenvolvimento. Sendo assim, a idade aproximada das lesões pode ser estimada (Gottwald *et al.*, 2002). Se os sintomas só são detectados em folhas mais novas (os tecidos mais susceptíveis de serem infectados), a doença deve ter se iniciado apenas algumas semanas ou meses antes, mas se observamos lesões nos galhos ou ramos, podemos estimar o tempo de desenvolvimento da doença, já que estas lesões são geralmente iniciadas após que as folhas e os frutos passam por um ou mais ciclos de infecção (Graham *et al.*, 2004).

Tendo em conta que o cancro cítrico é uma das doenças que mais perdas econômicas ocasiona na citricultura brasileira e mundial, deve-se investir na formulação de leis, programas de erradicação da doença e avaliação do impacto ambiental que os programas vão ocasionar. Fundamentalmente, deve-se investir na educação e na conscientização do cumprimento de ditas leis, de esta maneira o investimento realizado, vai ter um preço mínimo em comparação com o crescimento da agroindústria mundial.

1.2-Sistema imune da planta

Muitas bactérias associadas às plantas são patógenos que prejudicam o crescimento e reprodução das mesmas. As plantas, por sua vez, respondem à infecção

utilizando seus sistemas de defesa ou imunidade inatos, dois conhecidos até o momento. O primeiro reconhece e responde às moléculas comuns de muitas classes de micróbios, incluindo os não-patogênicos. Utiliza a expressão de receptores transmembranais (PRRs) que respondem a lenta evolução microbiana, que residem na superfície das plantas e reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (MAMPs ou PAMPs), tais como a flagelina (Jones e Dangl, 2006; Bittel e Robatzek, 2007). As respostas da planta estimuladas por PAMPs têm sido estudadas por um longo tempo. Recentemente uma série de relatórios estabeleceu que os PAMPs contribuem para a resistência basal da imunidade da planta, pré-invasiva e pós-invasiva (Bittel e Robatzek, 2007). O segundo padrão de defesa responde a fatores de virulência do patógeno, diretamente ou através de seus efeitos de acolhimento (Jones e Dangl, 2006) e atua em grande parte no interior da célula, utilizando as proteínas NB-LRR. Elas possuem domínio de ligação de nucleotídeos (NB “*nucleotide binding*”) e repetições ricas em leucina (LRR “*leucine rich repeat*”). Patógenos efetores de diversos reinos são reconhecidos pelas proteínas NB-LRR, ativando respostas de defesa semelhantes. A resistência à doença mediada por NB-LRR só é eficaz contra patógenos que podem crescer apenas em tecidos vivos (biotróficos), ou patógenos hemibiotróficos, mas não contra os agentes patogênicos que matam o tecido hospedeiro durante a colonização (necrotróficos) (Glazebrook, 2005).

A visão atual da evolução da interação entre o patógeno e o sistema imunitário da planta pode ser representada em quatro fases do modelo de “ziguezague” (Figura 6, Jones e Dangl, 2006). Na primeira fase, os PAMPs são reconhecidos desencadeando uma imunidade mediada por PAMPs (PTI “*PAMP-triggered immunity*”), a qual pode deter a colonização por parte do patógeno. Na segunda fase, os patógenos conseguem introduzir efetores que contribuem para a virulência do patógeno, interferindo com PTI. Isso resulta numa susceptibilidade mediada pelas proteínas efetoras (ETS “*effector-triggered susceptibility*”). Na terceira fase, um efector específico é expressamente reconhecido pelas proteínas NB-LRR, resultando numa imunidade desencadeada por efetores (ETI “*effector-triggered immunity*”). ETI promove uma nova resposta PTI acelerada e amplificada, ocasionando a resistência a doenças e, geralmente, desencadeando uma morte celular no local da infecção, a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, a seleção natural dos patógenos para evitar a ETI e priorizar sua sobrevivência no hospedeiro, desencadeia a aquisição de efetores adicionais que conseguem suprimir a ETI. Uma nova seleção natural por parte da planta contra esses

adicionais efetores provenientes do patógeno permite o re-desenvolvimento da ETI (Jones e Dangl, 2006).

Figura 6. Modelo “zigzag” ilustrando as etapas de desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante a infecção. Neste esquema, a amplitude final da resistência da doença ou susceptibilidade é proporcional à [PTI-ETS+ETI]. Na primeira fase, as plantas detectam a população microbiana (PAMPs, diamantes vermelhos), desencadeando uma resposta de imunidade (PTI). Na segunda fase, patógenos entregam com sucesso efetores que interferem com a PTI, desencadeando a susceptibilidade por efetores (ETS). Na terceira fase, um efector (indicado na figura em vermelho, Avr) é reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão ampliada de PTI que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores surgem através do fluxo horizontal de genes (em azul ajudando aos patógenos a suprimir a ETI). A seleção por parte das plantas de novos alelos de proteínas NB-LRR que podem reconhecer um dos efetores recém adquiridos, disparando novamente a ETI. Fonte: Jones e Dangl, 2006.

Para entender melhor as interações patógeno-hospedeiro precisamos definir o repertório e os modos de ação dos efetores dos patógenos, definir os processos biológicos e moleculares de acolhimento por parte do hospedeiro, assim como também as pressões evolutivas agindo em ambos: hospedeiros e patógenos. Com o sequenciamento dos genomas nos últimos tempos, torna-se viável identificar os genes expressos pelo patógeno e hospedeiro, diferenciando a expressão de ditos genes com o curso do tempo

da infecção a fim de obter dados importantes para o esclarecimento das complexas vias desencadeadas no momento do contato entre patógeno e o hospedeiro e no transcurso pós-infecção (Jones e Dangl, 2006).

1.3-Interação patógeno-não hospedeiro: resposta de hipersensibilidade (HR)

A resposta de defesa de plantas resistentes contra patógenos está associada em parte a uma resposta de hipersensibilidade (HR) (Dangl e Morel, 1997). HR é também produzida como uma consequência da resistência em plantas não hospedeiras. Similarmente aos animais, as plantas têm a habilidade de se defenderem mediante o reconhecimento de patógenos, causando uma morte programada e imediata das células vegetais no sítio da infecção, limitando o crescimento bacteriano. A HR é caracterizada pela necrose localizada dos tecidos vegetais, através de muitos sinais ainda não completamente elucidados, como a formação de radicais livres, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o reconhecimento de proteínas efetoras secretadas pelo patógeno (Dunger *et al.*, 2005). Tem sido relatado que *X. axonopodis* pv. *citri* induz HR em diferentes plantas não hospedeiras, como o algodão, tabaco e feijão (Swarup *et al.*, 1992; Duan *et al.*, 1999), e tem sido proposto que o gene de patogenicidade bacteriano, *pthA*, o qual foi o primeiro gene identificado como o responsável dos sintomas do cancro cítrico (Swarup *et al.*, 1991; item 1.4.1.4.1), pode ser também responsável por esta resposta induzida na planta (Dunger *et al.*, 2005).

Dunger *et al.*, 2005, detalharam as interações de *Xac* com diferentes plantas não hospedeiras. Ditas interações foram estudadas e analisadas bioquimicamente. *Xac* induziu HR em todas as plantas resistentes testadas (tomate, algodão, feijão, pimenta, tabaco e *Nicotiana Benthamiana*). HR foi visualizada entre 18-24 h pós-inoculação e foi caracterizada por lesões necróticas, de coloração marrom, no local da infecção. O crescimento da bactéria nas plantas não hospedeiras foi monitorado e não foi observado crescimento bacteriano durante os 4 dias pós-infecção monitorados, demonstrando que a HR gera uma barreira física composta de células vegetais mortas que limitam a disponibilidade de nutrientes para o patógeno, restringindo a propagação da bactéria (Dunger *et al.*, 2005). O sistema de secreção do tipo III de *Xac* (T3SS, veja à frente, item 1.4.1) é essencial para induzir HR em plantas não hospedeiras. Folhas de algodão foram infiltradas com culturas de *Xac* selvagem e mutantes de *Xac* para os genes *hrp*

(*hypersensitive response and pathogenicity*, item 1.4.1), sendo que não foi detectada HR nas cepas mutantes e a mesma foi restaurada com cepas de complementação (Dunger *et al.*, 2005). Estes resultados somam-se à literatura que aponta para o fato de que genes *hrp*, pertencentes aos operons *hrpB-hrpD* e o gene *hrpF* são essenciais para a indução de HR em *Xcv*, e que o T3SS é fundamental para a patogenicidade e indução de HR pelos fitopatógenos dos gêneros *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* (Huguet *et al.*, 1998; Rossier *et al.*, 2000; Büttner *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

1.3.1-Papel da goma xanthana na patogenicidade de *Xac* e habilidade para induzir HR em plantas não hospedeiras

Uma característica do gênero *Xanthomonas* é a síntese e secreção de um exopolissacarídeo (EPS), a goma xanthana, principalmente no final da fase logarítmica de crescimento e estacionária (Harding *et al.*, 1995). A produção da goma xanthana é regulada pelos genes *rpf* (regulação de fatores de patogenicidade). A estrutura do EPS de *Xac* é composta por β -1,4-glicose com cadeias de trissacarídeo contendo manosa-(β -1,4)-ácido glucurônico-(β -1,2)-manosa ligado aos resíduos de glicose por ligações α -1,3 (Jansson *et al.*, 1975).

Vários estudos têm-se centrado sobre o papel do EPS na patogenicidade e virulência das bactérias. Mutantes de *Erwinia stewartii*, deficientes na produção de EPS, não ocasionam a murcha sistêmica no milho, mas conservam a capacidade de produzir o efeito de “encharcamento”, (Dolph *et al.*, 1988). Mutantes de *Ralstonia solanacearum*, deficientes em EPS, apresentaram redução na virulência em berinjelas e tabaco (Kao *et al.*, 1992), enquanto mutantes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* são prejudicados na capacidade de colonizar folhas de tomate e apresentam sintomas da doença atenuados (Yu *et al.*, 1999). Por último, mutantes do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Dharmapuri e Sonti 1999), *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Kemp *et al.*, 2004) e *X. campestris* pv. *campestris* (Katzen *et al.*, 1998) apresentam virulência significativamente diminuída, quando comparada à cepa selvagem.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* é capaz de induzir HR em plantas não hospedeiras (Dunger *et al.*, 2005; item 1.3). A deleção do gene *gumD* em *Xac* (*Xac_ΔgumD*) impede a produção de goma xanthana em todas as fases do crescimento

bacteriano (Dunger *et al.*, 2007). O mutante *Xac_ΔgumD* foi utilizado para testar a capacidade de induzir HR em algodão, tomate e tabaco. HR foi observada no local da infecção entre 18-24 hs pós-inoculação, fato análogo ao observado com a cepa selvagem (Dunger *et al.*, 2005; Dunger *et al.*, 2007). Ambas as cepas bacterianas (*Xac* selvagem e *Xac_ΔgumD*) causam cancro cítrico em folhas de citros após inoculação, não sendo observada nenhuma divergência com relação ao tempo de aparecimento das lesões e à magnitude das mesmas entre as cepas testadas (Dunger *et al.*, 2007). Estes resultados levam à conclusão de que a goma xantana, em *Xac*, não desempenha um papel essencial no cancro cítrico nas fases iniciais da infecção ou na interação com plantas não hospedeiras, mas facilita a manutenção da bactéria no hospedeiro, possivelmente melhorando a eficiência na colonização de tecidos distantes e aumentando a aderência bacteriana (Dunger *et al.*, 2007).

1.4-Interações patógeno-hospedeiro

Ao longo dos tempos, bactérias patogênicas Gram-negativas, evoluíram diversas estratégias para explorar e usufruir os menus nutricionais, fornecidos através das plantas e os animais. Na maioria, os patógenos bacterianos são altamente especializados para um número limitado de hospedeiros. No entanto, algumas estirpes bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa* PA14, são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros, que incluem plantas e animais (Tan, 2002). A colonização e invasão bacteriana dos tecidos eucarióticos envolvem uma variedade de fatores extracelulares, tais como polissacarídeos, adesinas, toxinas e enzimas de degradação.

Um dos primeiros eventos na interação patógeno-hospedeiro é o contato físico entre a bactéria e a célula hospedeira. A fixação bacteriana à superfície da célula hospedeira é mediada por proteínas de adesão, denominadas adesinas. As adesinas fimbriais são montados em estruturas semelhantes a pilus e as adesinas afimbriais encontram-se ancoradas na membrana externa (Soto e Hultgren, 1999). Uma vez que as bactérias estão em contato com a célula hospedeira, elas começam a injetar proteínas efetoras no citosol das células eucariotas (Hueck, 1998) com o objetivo de interferir nas respostas celulares do hospedeiro em seu benefício (Büttner e Bonas, 2003; Jones e Dangl, 2006).

A entrega das proteínas efetoras é mediada pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS), o qual se expande ao longo de ambas as membranas bacterianas e ao espaço extracelular (Hueck, 1998; Büttner e Bonas, 2003; Jones e Dangl, 2006).

1.4.1-Sistema de secreção do tipo III (T3SS)

A comunicação, em nível molecular, entre a bactéria e a célula hospedeira durante interações simbióticas ou parasitas geralmente é desenvolvida por proteínas secretadas pela bactéria. A chave para a maioria das interações patógeno-hospedeiro é o sistema de secreção do tipo III (T3SS) presente na maioria das bactérias Gram-negativas, fitopatogênicas, como também em patógenos de animais (He *et al.*, 2004).

Análises genéticas dos fatores de virulência bacterianos mostraram que as bactérias patogênicas, muitas vezes são distinguidas das não-patogênicas pela presença de genes específicos de patogenicidade que estão organizados em “ilhas”/grupos/“clusters” de genes que tem sido adquiridos no curso da evolução pela transferência genética horizontal. O cluster *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) é um grupo de aproximadamente 20-25 genes que codificam uma máquina supramolecular, o chamado, T3SS (“Type Three Secretion System”, Sistema de secreção do tipo III) (Hueck, 1998; Tampakaki *et al.*, 2004). Em fitopatógenos, os genes *hrp* são importantes determinantes da patogenicidade. Eles são necessários para a habilidade de multiplicar-se em susceptíveis plantas e causar doença, como também são os responsáveis de induzir a resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas não hospedeiras que apresentem resistência (Büttner e Bonas, 2002). T3SS permite a bactérias gram-negativas secretar e injetar proteínas efetoras ao citoplasma das células eucarióticas hospedeiras (Figura 7), estando presente em patógenos animais, como *Yersinia* spp., *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), *Pseudomonas aeruginosa* e *Chlamydia* spp. e em patógenos de plantas, como *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Erwinia* spp., *Rhizobium* spp (Hueck, 1998), e é formado por aproximadamente 20-25 proteínas, a maioria localizada na membrana interna da bactéria, sendo, muitas delas homólogas com componentes do sistema flagelar de bactérias (Blocker *et al.*, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004).

T3SS sempre foi estudado a pertencer restritamente a bactérias patogênicas. A identificação de genes do T3SS em bactérias simbióticas, como os rizóbios do gênero

Rhizobium, *Bradyrhizobium japonicum* e *Mesorhizobium loti* foi, portanto, inesperado (Marie *et al.*, 2001). Os rizóbios captam o nitrogênio do ar fixando-o nas plantas leguminosas em forma de nódulos. Na espécie *Rhizobium* NGR234, a indução da formação de nódulos é co-regulada com a expressão dos genes T3SS, sugerindo que as proteínas secretadas via T3SS, Nops (proteínas secretadas de nodulação), contribuem na simbiose (Viprey, *et al.*, 1998). Dependendo da planta hospedeira, a inativação dos genes do T3SS, pode causar um aumento ou uma diminuição no número de nódulos. Curiosamente, o T3SS também está envolvido na determinação da gama de hospedeiros de rizóbios (Marie *et al.*, 2001; Fouts *et al.*, 2003).

A descoberta dos mecanismos subjacentes da patogênese bacteriana é o grande foco da investigação, tanto para o desenvolvimento de aplicações práticas (novos diagnósticos e antibióticos) como também, para elucidar as interações, em nível molecular, entre as bactérias e as células hospedeiras.

Figura 7. Esquema das interações entre fitopatógenos e plantas. Modelo do T3SS durante as interações planta-patógeno. Os fitopatógenos ingressam nas plantas através de aberturas naturais como estômatos e multiplicam-se nos espaços intercelulares. A planta deriva um sinal desconhecido e induz a expressão dos genes do T3SS, o qual injeta proteínas efectoras na célula vegetal. A visão ampliada mostra a interação planta-patógeno e a projeção do T3SS através de ambas as membranas bacterianas, estando ligado a um pilus extracelular (Hrp pilus) e ao canal T3SS penetrando a parede celular (CW) e membrana plasmática (PM) da planta. O T3SS e as proteínas efectoras são representados em vermelho e os flagelos bacterianos em cinza escura. Fonte: Büttner e Bonas, 2002.

1.4.1.1-Morfologia e arquitetura do T3SS

O T3SS de patógenos é visto como um dispositivo único de transferência de proteínas, por possuir características valiosas: i-é capaz de injetar estruturalmente diversos substratos e proteínas através das duas membranas bacterianas e da célula eucariótica, diretamente no citosol hospedeiro, ii-é acionado quando o patógeno inicia um estreito contacto com as células do hospedeiro, e iii-é capaz de funcionar “*in vitro*”, sempre que se avalie em condições que imitam estritamente os principais parâmetros do ambiente hospedeiro (Tampakaki *et al.*, 2004).

O T3SS é conservado em quatro dos maiores gêneros de fitobactérias, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* e *Erwinia*. O grupo de genes *hrp* que codifica o sistema secretório do tipo III contém seis operons (*hrpA* ao *hrpF*). Nove dos 20-25 genes *hrp* são conservados em patógenos de animais e plantas e seus genes são chamados *hrc* (“*hrp-conserved*”), os quais codificam para as proteínas que formam o cerne estrutural do T3SS. Todos os genes *hrp* e *hrc* são necessários para transportar e translocar proteínas efetoras às células e causar patogenicidade em plantas susceptíveis (Büttner e Bonas, 2002; Brunings e Gabriel, 2003). O controle da expressão dos *hrp* genes, em *Xcv* é feito por fatores de transcrição codificadas pelos genes *hrpG* e *hrpX*, localizados fora do cluster *hrp* (Noël *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2002).

O arsenal de proteínas efetoras translocadas para as células hospedeiras varia extensamente entre as diferentes bactérias, sendo que existe uma adaptação especial para cada bactéria dentro de um determinado hospedeiro. Em contraste, muitos componentes do aparelho do T3SS usado para o transporte de efetores, são altamente conservados entre as bactérias, considerando seqüências, e alguns desses componentes também são funcionalmente intercambiáveis (Ghosh, 2004). Por exemplo, a proteína efetora YopE de *Yersinia* é secretada ao meio extracelular pelo T3SS de *S. entérica typhimurium*, *Xanthomonas campestris*, e *Erwinia chrysanthemi* (Rosqvist *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999). Da mesma forma, o T3SS de *Yersinia* é capaz de secretar os efetores AvrB e AvrPto de *P. syringae* com uma eficiência da secreção semelhante ao do próprio substrato de *Yersinia*, YopE (Anderson *et al.*, 1999). Estudos de microscopia eletrônica de baixa resolução revelaram a morfologia do aparelho do T3SS de patógenos animais: *Salmonella*, *Shilella*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Para os patógenos de plantas apenas a parte extracelular do aparelho foi visualizado (Sekiya *et al.*, 2001; He e Jin, 2003; Marlovits *et al.*, 2004).

(Figura 8). Esses estudos mostraram uma estrutura comum, a qual é surpreendentemente semelhante ao corpo flagelar. Ela é composta de duas partes distintas: i-uma estrutura alongada, oca, extracelular, chamada de "complexo da agulha" em patógenos animais e "Hrp pilus" em fitopatógenos; ii-uma base cilíndrica, semelhante ao corpo basal flagelar, o qual atravessa as duas membranas bacterianas e garante a estabilização de toda a estrutura acima desenvolvida (Tampakaki *et al.*, 2004). Na Figura 9 encontram-se comparados o sistema flagelar (A), o T3SS de patógenos animais como *Yersinia* e *E.coli* (B e C, respectivamente), e o T3SS do fitopatógeno *Pseudomonas syringae* (D).

Figura 8. A) Crio-microscopia eletrônica para visualizar a organização estrutural detalhada do “complexo da agulha” de *S. typhimurium*. Fonte: Marlovits *et. al.*, 2004. **B)** Organização filamentosa dada pelo T3SS de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Em meio mínimo, indutor dos genes *hrps*, *Pst* DC3000 produz dois tipos diferentes de filamentos: flagelo (azul), de aproximadamente 15 nm de diâmetro e estão localizados em uma extremidade da bactéria; Hrp pilus (vermelho), de aproximadamente 8 nm de diâmetro e estão localizados randomicamente pela superfície da bactéria. Fonte: He e Jin, 2003.

Estudos de divergência na sequência flagelar e do T3SS, não conduz com a idéia de que o T3SS evoluiu a partir do sistema flagelar, mas sim que ambos os sistemas são antigos e derivados de um único ancestral comum (Gophna *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2005).

O cerne do sistema flagelar é constituído por uma tripla de proteínas de membrana altamente conservadas: FliP/Q/R (homólogos a HrcR/S/T no T3SS de fitopatógenos e a família YscR/S/T em patógenos de animais, Figura 9A e D). As proteínas de membrana FlhA (HrcV), FlhB (HrcU) e FliY (FliN + FliM) (HrcQ)

também são conservados na maioria dos T3SS de fitopatógenos, apesar de que em *P. syringae* HrcQ é representada por duas proteínas (HrcQa e HrcQb), ao invés de uma única proteína como na maioria dos outros T3SSs (Preston *et al.*, 2005) (Figura 9, A-D). FliI, é uma ATPase responsável pelo início do transporte de proteínas pela membrana interna da bactéria (homólogos de FliI: YscN, EscN e HrcN, Figura 9A-D). A exportação através da membrana externa da bactéria é realizada por uma porina, HrcC (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003). O homólogo de HrcC (FlgI do flagelo, veja na frente), YscC de *Yersinia* forma uma estrutura multimérica, contendo um poro central, em forma de anel, de 20 nm de diâmetro (Koster *et al.*, 1997). O poro formado por HrcC, provavelmente é fechado quando não existem proteínas em trânsito, com o objetivo de evitar comprometer a membrana externa embora não seja conhecido o mecanismo de abertura e fechamento do poro. HrcJ é homóloga à FliF, componente do complexo protéico de FlgI. FlgI forma um anel no corpo basal do flagelo (P-ring, Figura 9A). Possivelmente a função de FliF seja a de “ponte” entre os componentes internos e externos da membrana em *P. syringae*, onde ele estabilizaria o canal entre as duas membranas (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2005), Figura 9.

Figura 9. Representação esquemática do flagelo bacteriano (A) e sistemas de secreção do tipo III (T3SSs) em *Yersinia* (B), *Escherichia coli* (C) e *Pseudomonas syringae* (D). O corpo basal do flagelo consiste em proteínas organizadas em forma de anéis: C-ring, MS-ring, P-e L-rings. Somente as proteínas conservadas nos T3SSs (e os seus homólogos flagelares) foram desenhadas e indicadas com coloração semelhante. Sobre a membrana interna (IM) flagelar, a região designada como P-rod é constituída pelas proteínas FlgB, FlgC, FlgF e FliE e não possuem proteínas homólogas nos T3SSs. O ponto de interrogação, situado na mesma posição que o P-rod, indica que esta estrutura do canal na IM dos T3SSs não foi ainda identificada. O principal constituinte da agulha em *Yersinia* é YscF, *E. coli* EspA, e em *P. syringae* HrpA. Proteínas que formam poros são representadas com a mesma cor: na membrana da célula eucariótica (EM): LcrV, YopB e YopD em *Yersinia*, EspB e EspD em *E. coli*; em fitopatógenos os possíveis translocadores de proteínas são HrpZ de *P. syringae* e HrpF em *X. campestris*. Na membrana externa bacteriana (OM): YscC em *Yersinia*, EscC em *E. coli* e HrcC em *P. syringae*. PL: camada de peptidoglicano; CW: parede celular das células vegetais. Fonte: Tampakaki *et al.*, 2004.

HrpI (*E. amylovora*) e as lipoproteínas YscJ (*Yersinia*) e MxiJ (*Shigella*) estão envolvidas na secreção via T3SS e compartilham homologia em sequência com partes do domínio central de FliF, que é responsável pela formação do M-anel (Figura 9A). YscU e YscP regulam coordenadamente a secreção dos efetores Yops e a do maior componente protéico da “agulha” de *Yersinia*, YscF. YscU, semelhante ao seu homólogo FlhB do flagelo e HrcU (*Xac* e *Xcv*), é proteoliticamente clivada num sítio

estritamente conservado, NPTH, localizado no seu domínio C-terminal citosólico. Ferris *et al.*, 2005, demonstrou na proteína FlhB o mecanismo de clivagem na sequência conservada NPTH, concluindo ser uma auto-clivagem protéica entre N e P. Embora esta clivagem não parece afetar a função da proteína, de constituir a maquinaria do T3SS, ela poderia assegurar uma conformação protéica não tóxica para a célula bacteriana (Edqvist *et al.*, 2003; Lavander *et al.*, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004). YscP e YscU, estão envolvidas na especificidade pelo substrato a ser secretado via T3SS, estabelecendo uma primeira secreção (proteínas e substratos não efetores) e uma secreção tardia (proteínas efetoras) (Agrian *et al.*, 2005a; Agrian *et al.*, 2005b). Mutantes carregando substituições na sequência NPTH de YscU, tanto N ou P por A, não apresentaram auto-clivagem e não foram capazes de efetuar a secreção primária (proteínas e substratos não efetores, ex. YopB, YopD e LcrV), enquanto a exportação de proteínas efetoras não foi afetada. Este resultado estaria indicando uma função de YscU onde sua auto-clivagem pareceria participar na seleção entre as proteínas translocadas e as proteínas efetoras (Sorg *et al.*, 2007). O mutante YscU_{N263A}, secreta menos YscP e com isto as “agulhas” apresentam cumprimentos superiores aos descritos para a cepa selvagem (Sorg *et al.*, 2007). Recentemente, informações estruturais do domínio citosólico de YscU e mutantes, pretendem elucidar os mecanismos de auto-cleavage “*in vitro*” para entender a natureza dos fenótipos observados “*in vivo*” (Wiesand *et al.*, 2009).

O cluster *hrp* em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* contém as seguintes características: i) aproximadamente tem 23 kb; ii) codifica o sistema que secreta fatores patogénicos dentro da célula hospedeira; iii) tem regiões com diferentes conteúdos de G+C que o resto do genoma; iv) é flanqueado por elementos génicos móveis (transposases) (da Silva *et al.*, 2002; Brunings e Gabriel, 2003), Figura 10.

Figura 10. Estrutura do locus gênico *hrp* em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. O locus *hrp* tem tamanho de 23 kb. Flechas horizontais em rosa representam genes *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”), *hrc* (“*hrp* conserved”) e *hpa* (“*hrp*-associated”). Acima e em baixo símbolos indicam proteínas cujas interações foram descobertos em nosso laboratório (Alegria *et al.*, 2004), flechas verticais: verde, interações HpaA-HpaB e HpaB-HrcV; círculos amarelos: interações HrpD6-HrpB1; flechas azuis: HrpB2-HrcU; flecha vermelha: interações HrcN-HrcN.

1.4.1.2-Regulação da expressão dos genes *hrp* em fitopatógenos

O controle da regulação da cascata de expressão dos genes *hrp* varia nos diferentes fitopatógenos. Baseado-se nas semelhanças na organização e regulação de genes, as regiões *hrp* de diferentes patógenos foram classificados em dois grupos: Grupo I compreende espécies de *Erwinia*, *Pantoea* e *P. syringae*, enquanto que *R. solanacearum* e *Xanthomonas spp.* pertencem ao grupo II (Alfano e Collmer, 1996). A expressão dos genes *hrp* do grupo I dependem do ativador HrpL, um membro da família de fatores sigma alternativos, que se ligam a uma sequência promotora conservada denominada caixa *hrp*. A expressão do gene *hrpL* é controlada pelas proteínas HrpR e HrpS em *P. syringae* e por HrpS, HrpX e HrpY em *Erwinia* e *Pantoea* (Gürlebeck *et al.*, 2006).

A expressão dos “clusters” de genes *hrp* do grupo II é muito bem estudado em *R. solanacearum*. Aqui, o sinal de indução é detectado pelo receptor da membrana externa PrhA e transmitido à proteína transmembranar PrhR e ao fator sigma PrhI. A ativação de PrhI leva à expressão dos reguladores PrhJ, HrpG e HrpB, que é homólogo a HrpX de *Xcv* (Brito *et al.*, 2002). As chave da regulação em *Xanthomonas* são as proteínas HrpG e HrpX, que são codificados fora do “cluster” *hrp*. HrpG pertence à família de reguladores de resposta do sistema de dois componentes e controla a expressão da proteína reguladora HrpX (Wengelnik *et al.*, 1996). HrpX, é um ativador transcripcional, e regula a expressão da maioria dos genes *hrp* incluindo os “operons” *hrpB* a *hrpF*. Muitos dos genes regulados por HrpX contem em sua região promotora o

chamado “PIP-box” (Plant-inducible promoter; sequência consenso TTTCGC_{-N15}-TTTCGC), o qual acredita-se de servir como um elemento regulador e sítio de ligação para HrpX (Wengelnik *et al.*, 1996; Gürlebeck *et al.*, 2006).

1.4.1.3- *Hrp pilus: O canal para a célula hospedeira*

Uma característica importante do T3SS é a similaridade de sequências entre os genes T3SS e os genes envolvidos na biogênese flagelar, sugerindo mecanismos similares na construção do flagelo e o T3SS (He *et al.*, 2004). Outra característica interessante é a montagem de filamentos na superfície bacteriana, com diversos comprimentos e diâmetros, dependendo da bactéria. Um exemplo é a montagem do Hrp pilus, existente em todos os fitopatógenos que possuem T3SS, como também o “complexo da agulha” em patógenos animais. A função destas extensões na superfície das bactérias tem despertado o interesse nas investigações nos últimos anos (He e Jin, 2003).

Apenas dois componentes extracelulares do T3SS de fitopatógenos foram identificadas: o Hrp pilus e as harpinas. O Hrp pilus são estruturas filamentosas que se estendem a partir da superfície bacteriana, em condições onde os genes *hrp* estão sendo induzidos. Servem para translocar e secretar substratos e proteínas efetoras ao interior da célula hospedeira. As harpinas são proteínas produzidas pela bactéria em resposta de defesa e auxiliam no processo de infecção. São capazes de desencadear a HR em plantas não hospedeiras. Em *P. syringae*, *E. amylovora*, *R. solanacearum* e *X. campestris*, foi mostrados que o Hrp pilus parece ter um papel essencial na secreção e translocação de proteínas efetoras (Jin *et al.*, 2001; Preston *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005). Hrp pilus e harpinas geralmente são secretados na cultura em níveis mais elevados do que proteínas efetoras, o que é coerente com sua função proposta de componentes do aparelho de secreção e translocação, em vez de proteínas translocadas (He *et al.*, 1993; Preston *et al.*, 2005). Harpinas não são altamente conservadas em termos de sequência primária, mas são geralmente ricas em glicina e pobres em cisteína. Em *P. syringae* a harpina HrpW é secretada via T3SS e contém um domínio de pectato liase (Charkowski *et al.*, 1998). Homólogos de HrpW estão presentes em *Xanthomonas* spp., *R. solanacearum*, e *E. carotovora* (Kim *et al.*, 2004; Preston *et al.*, 2005).

A expressão e montagem do Hrp pilus depende dos genes *hrp*. A indicação que o pili era *hrp*-dependente foi inicialmente observada em *P. syringae* (He e Jin, 2003), e desde então essa dependência foi comprovada em outros fitopatogenos portadores do T3SS: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora* e *Xanthomonas campestris* (He e Jin, 2003). O componente majoritário dos pili *hrp*-dependentes são pequenas proteínas (6-11 kDa), mas com seqüências hiper variáveis, mesmo dentro de um mesmo patovar (He e Jin, 2003). Em analogia com o filamento do flagelo, o qual é construído por muitas cópias da proteína flagelina, as extensões do T3SS são montados através da polimerização gradual de um componente protéico principal, por exemplo: HrpA em *P. syringae* e *E. amylovora*, HrpY em *R. solanacearum*, MxiH em *Shigella*, PrgI em *Salmonella*, YscF em *Yersinia*, PscF em *P. aeruginosa*, EscF e EspA em *E. coli* e HrpE em *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Xac* (Aizawa, 2001; Koebnik, 2001; He e Jin, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2002).

Os mecanismos que controlam o alongamento das “agulhas” ou Hrp pilus, não são bem compreendidos. Journet *et al.*, 2003, mostrou que o comprimento da “agulha” de *Yersinia* depende do tamanho da proteína YscP. Os autores propõem que YscP controla o comprimento da “agulha” agindo como uma “régua molecular” durante passo a passo da montagem do injectisoma. As duas extremidades de YscP atuam como âncoras conectando o corpo basal e a ponta crescente da agulha. Através deste arranjo YscP pode sinalizar ao aparelho de exportação o momento propício para deter a exportação de YscF, quando o comprimento maduro da agulha é alcançado.

As extensões extracelulares do T3SS têm diferentes características. O Hrp pilus é uma estrutura flexível, fina e cumprida, enquanto que a “agulha” aparenta ser mais rígida e menos cumprida (Tampakaki *et al.*, 2004). O Hrp pilus tem 8 nm de diâmetro externo, semelhante ao diâmetro das “agulhas”, mas o seu comprimento de ~ 2 µm é maior do que as das “agulhas” de patógenos animais (Van Gijsegem *et al.*, 2000). O comprimento maior do Hrp pilus provavelmente é um atributo importante para atravessar a espessa parede celular de células vegetais (>100 nm) e alcançar a membrana citoplasmática. As “agulhas” ficam dispersas ao longo da superfície bacteriana, o Hrp pilus de *R. solanacearum* é encontrado somente em um pólo (Van Gijsegem *et al.*, 2000; Ghosh, 2004).

Tanto o Hrp pilus e a “agulha” estão fisicamente ligadas ao corpo basal e cumprem funções análogas. Acredita-se que através destas estruturas o contacto e ligação à membrana da célula hospedeira é estabelecida e funcionam como condutos

para a translocação e secreção de proteínas efetoras. Embora a função do contato com a célula hospedeira, ainda espera de evidências, a translocação de substratos é comprovada: experimentos de imunolocalização mostram que a secreção de proteínas pelo Hrp pilus é efetuada por uma região específica do pilus, sua extremidade ou ponta (Jin *et al.*, 2001). Em *Ralstonia solanacearum* estudos com mutantes demonstraram que o Hrp pili não é necessário para a adesão da bactéria à célula hospedeira durante a infecção em tomates (Van Gijsegem *et al.*, 2000). Experimentos de microscopia imunoelectronica em *Xcv* revelaram que as proteínas secretadas via T3SS encontram-se em estreito contacto com o Hrp pilus durante e/ou após a sua secreção. Este resultado fortalece a função proposta para o Hrp pilus de servir como conduto para a translocação de proteínas efetoras via T3SS (Weber *et al.*, 2005).

1.4.1.4-Proteínas efetoras do T3SS e sua função na interação com o hospedeiro

Enquanto o T3SS é conservado em patógenos de planta e animais, as proteínas secretadas via T3SS diferem consideravelmente e as doenças ocasionadas variam de peste bubônica e septicemia em seres humanos a lesões localizadas, necroses e doenças sistêmicas nas plantas (Tampakaki *et al.*, 2004).

As proteínas efetoras do T3SS parecem ter uma estrutura modular na região N-terminal (resíduos 1-50), contendo informações de direcionamento (sinal de secreção e translocação). Embora os efetores do T3SS não possuam um sinal clássico de secreção, no mínimo os 15 primeiros resíduos N-terminais são necessários para a sua secreção. A falta na similaridade de sequência nesta região entre as proteínas secretadas via T3SS, tem despertado um interesse nas investigações, a fim de determinar a natureza do sinal de secreção (Tampakaki *et al.*, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006). Estudos apontam para algumas características em comum entre as sequências N-terminais de proteínas secretadas do T3SS. Por exemplo, a presença de aminoácidos hidrofílicos, a ausência de resíduos acídicos nos 12 primeiros resíduos, anfipaticidade e riqueza de serinas e glutaminas nos primeiros 50 aminoácidos (Lloyd *et al.*, 2002; Tampakaki *et al.*, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006). Um modelo alternativo, que é discutido de forma controversa, propõe de que os sinais de controle da secreção poderiam residir no mRNA, ao invés de estarem contidos na sequência protéica (Mudgett *et al.*, 2000; Sorg *et al.*, 2005; Gürlebeck *et al.*, 2006). Para o caso do efector SopE de *Salmonella*, Karavolos *et al.*

(2005) demonstrou que o sinal de secreção reside nos aminoácidos da região N-terminal da proteína e não na sequência do mRNA.

Em 1984, avrA a primeira proteína efetora do T3SS de fitopatógenos foi isolada de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Ela foi caracterizada como uma proteína de avirulência (avr) (Staskawicz *et al.*, 1984). Desde então, mais de 40 proteínas avr e outros tipos de efetores foram identificados em fitopatógenos portadores do T3SS, por exemplo, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Pantoea* (Gürlebeck *et al.*, 2006).

A função das proteínas efetoras reside em modificar os processos do hospedeiro para otimizar o ambiente inter-e intracelular para o crescimento do patógeno, enquanto promovem o desenvolvimento da doença através da supressão das respostas de defesa do hospedeiro. Os mecanismos precisos pelos quais os efetores do T3SS conseguem estes benefícios são profundamente desconhecidos. Após a translocação das proteínas para a célula vegetal, estas proteínas podem ser reconhecidas por proteínas de resistência (R) próprias da planta, em plantas resistentes, disparando uma série de respostas de defesa, incluindo a resposta de hipersensibilidade (HR), uma rápida morte celular programada e localizada das células vegetais, restringindo o crescimento bacteriano (Staskawicz, 2001). Embora a função primária dos efetores do T3SS seja a de promover a suscetibilidade da planta, existe uma maior complexidade enquanto as vias empregadas, ainda desconhecidas. Recentemente, obteve-se resultados sobre o efector de *Xcv* XopJ, acreditando-se que o mesmo está envolvido na inibição das respostas de defesa da parede celular da planta (Bartetzko *et al.*, 2009). Este fato já tinha sido observado com o efector AvrPto de *Pseudomonas syringae*. A expressão transgênica de AvrPto em *Arabidopsis* reprimiu um conjunto de genes do hospedeiro, comprometendo a deposição de calos e suprimindo a defesa da parede celular (Hauck *et al.*, 2003). As proteínas efetoras HrpZ do fitopatógeno *P. syringae* e HrpF de *X. campestris vesicatoria* se ligam à membrana plasmática da planta e são capazes de formar condutos iônicos, como poros, em bicamadas lipídicas artificiais (Lee *et al.* 2001; Buttner *et al.*, 2002), demonstrando uma outra via capaz de interagir com a homeostases da planta e transformá-la em benefício ao patógeno. *Xvc* HrpF efetivamente forma um canal através do qual outras proteínas efetoras conseguem entrar dentro da célula hospedeira (Buttner *et al.*, 2002).

Devido à quantidade crescente de genomas bacterianos disponíveis, a possibilidade de análise de proteínas efetoras de fitopatógenos e patógenos de animais, aumenta constantemente. O grande desafio para o futuro consiste em atribuir funções

moleculares para as proteínas efetoras de forma individual. A geração de mutantes, por meio de nocautes individuais ou múltiplos, deve ajudar a eliminar a redundância e revelar a contribuição funcional das proteínas efetores do T3SS no desenvolvimento da doença (Gürlebeck *et al.*, 2006).

Na Tabela 2 apresentamos um resumo dos putativos genes efetores e/ou de avirulência em *Xoo*, *Xac* e *Xcc* (da Silva *et al.*, 2002; Byoung-Moo *et al.*, 2005).

Tabela 2. Putativos genes efetores de *Xac*, *Xoo* e *Xcc* (da Silva *et al.*, 2002; Byoung-Moo *et al.*, 2005).
* Presença no genoma de *Xac*, *Xoo* ou *Xcc*: S, sim; N, não.

Gene ID	Nome	Família	<i>Xac/Xoo/Xcc</i> *
XAC0076/XOO0168/XCC0052	<i>avrBs2</i>	<i>avrBs2</i>	S/S/S
XAC0286/XCC1629	<i>avrXacE1/avrXccE1</i>	<i>avrPphE</i>	S/N/S
XAC3224	<i>avrXacE2</i>	<i>avrPphE</i>	S/N/N
XACb0011	<i>avrXacE3</i>	<i>avrPphE</i>	S/N/N
XACa0022/XOO2131	<i>pthA1</i>	<i>avrBs3</i>	S/S/N
XACa0039/XOO3013	<i>pthA2</i>	<i>avrBs3</i>	S/S/N
XACb0015/XOO3015	<i>pthA3</i>	<i>avrBs3</i>	S/S/N
XACb0065/XOO2275	<i>pthA4</i>	<i>avrBs3</i>	S/S/N
XCC2100	<i>avrBs1</i>	<i>avrBs1</i>	N/N/S
XCC2099	<i>avrBs1.1</i>	<i>avrBs1</i>	N/N/S
XCC2109	<i>avrXccC</i>	<i>avrC</i>	N/N/S
XCC3731	<i>avrXccB</i>	<i>yopJ</i>	N/N/S
XCC4229	<i>avrXccA1</i>	<i>avrXca</i>	N/N/S
XCC2396	<i>avrXccA2</i>	<i>avrXca</i>	N/N/S
XAC3090/XOO1762/XCC4186	Proteína rica em leucina	<i>popC</i>	S/S/S
XAC0393/XOO0065	<i>hpaF</i>	<i>popC</i>	S/S/N
XCC2565	Proteína rica em leucina	<i>popC</i>	N/N/S
XAC0571/ XOO1239,XOO4256	Proteína conservada hipotética	<i>avrBs3</i>	S/S/N
XOO4255	<i>avrXa7</i>	<i>avrBs3</i>	N/S/N

1.4.1.4.1-O determinante do cancro cítrico: *PthA*

Talvez o mais conhecido fator de virulência secretado pelo T3SS de *Xac* é *PthA*. O gene *pthA* é necessário para *X. axonopodis* pv. *citri* para causar a doença do cancro cítrico. A inserção do gene *pthA* em outras espécies de *Xanthomonas* confere a capacidade de provocar cancro em citros (Swarup *et al.*, 1991). *pthA* é necessário para a produção de feridas necróticas por qualquer cepa de *Xanthomonas* que causa cancro em citros, mesmo que sejam filogeneticamente e taxonomicamente diferentes (item 1.1.1). Três homólogos do gene *pthA*, funcionais, foram clonados a partir de *X. citri* pv. *aurantifoli*: *pthB*, *pthC* e *pthW* (Al-Saadi e Gabriel, 2002). Os genes *pthA*, *pthB*, *pthC* e *pthW* são totalmente iso-funcionais, sendo absolutamente necessários para as

Xanthomonas que os transportam causar sintomas de cancro e hiperplasia. Embora *pthC* e *pthW* provenham de cepas diferentes de *Xanthomonas*, cujos hospedeiros é restritamente à lima, quando utilizou-se uma cepa de *X. citri* pv. *citri*, deficiente para *pthA*, e foi complementada tanto com o gene *pthC* como com o gene *pthW*, a cepa mutante desenvolveu patogenicidade em todos os citros testados, demonstrando que os genes *pthC* e *pthW* não são os responsáveis em determinar os hospedeiros de suas respectivas cepas (Brunings e Gabriel, 2003).

Não só o gene *pthA* é essencial para causar a doença do cancro cítrico, mas quando ele é expresso nas células hospedeiras, pode se observar os típicos sintomas do cancro cítrico: hipertrofia, hiperplasia e necroses (Duan *et al.*, 1999; Brunings e Gabriel, 2003; Figura 11A). A expressão de *pthA* em folhas de citros ocasiona pequenas úlceras induzidas sobre a superfície das folhas, (Figura 11B-C; Duan *et al.*, 1999; Brunings e Gabriel, 2003).

Figura 11. Comparações de sintomas de cancro cítrico na superfície das folhas de citros. **A)** Superfície da folha de citros sem infecção. **B)** Superfície da folha de citros expressando o gene *pthA* sob o controle do promotor da planta. **C)** Superfície da folha de citros após inoculação com *X. citri*, apresentando as lesões típicas do cancro cítrico. Fonte: Duan *et al.*, 1999; Brunings e Gabriel, 2003.

pthA é um membro da família de genes *avrBs3/pthA*, o qual foi demonstrado a função de patogenicidade (Swarup *et al.*, 1991; 1992). Os membros desta família de genes apresentam uma identidade na sequência da proteína entre 90-97% e todos os membros codificam 5,5-28,5 repetições de 34 aminoácidos quase idênticos (Gürlebeck *et al.*, 2006). A região N-terminal anterior das repetições parece ser importante para a secreção da proteína via T3SS (Szurek *et al.*, 2002), enquanto a região C-terminal posterior das repetições parece ser importante para a importação da proteína para o núcleo das células hospedeiras (Szurek *et al.*, 2001), intervindo na ativação da

transcrição eucariótica (Szurek *et al.*, 2002; Al-Saadi *et al.*, 2007). O gene *apII*, homólogo do gene *pthA* de *X. citri* pv. *citri*, tem apresentado evidências de atuar como um supressor da resposta de defesa do tabaco (Ponciano *et al.*, 2003), indicando um potencial papel para alguns homólogos de *pthA*.

A cepa, *Xac* 306, foi totalmente seqüenciada e quatro homólogos de *pthA* foram identificados (da Silva *et al.*, 2002), como membros da família de proteínas AvrBs3/PthA, sendo: PthA1, PthA2, PthA3 e PthA4. Os quatro genes *pthA* estão localizados em dois plasmídeos nativos de *Xac*: pXAC33 e pXAC64; onde cada um deles codifica dois membros *pthAs* (pXAC33, *pthA1* e *pthA2*; e pXAC64, *pthA3* e *pthA4*=*pthA*). Apenas a proteína *Xac* PthA4 possui o mesmo número de repetições que *Xac* PthA, sendo também do mesmo tamanho e 99,7% idêntica em seqüência proteica. *Xac* PthA1 tem uma região de repetição inferior a *Xac* PthA, enquanto *Xacs* PthA2 e PthA3 tem duas repetições a menos. Estas observações indicariam que o gene *pthA4* da cepa *Xac* 306 é provavelmente um equivalente funcional ao gene *Xac pthA* (Brunings e Gabriel, 2003). Nenhuma informação funcional a respeito destes quatro genes homólogos ao gene *pthA* tem sido publicada até à data (Al-Saadi *et al.*, 2007).

1.4.1.5-Proteínas chaperonas do T3SS

Em adição ao sinal de secreção e translocação das proteínas secretadas do T3SS (item 1.4.1.4), muitas destas proteínas possuem um sítio de ligação à proteínas (Tampakaki *et al.*, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006). Este sítio é denominado o sítio de ligação a proteínas chaperonas (ou “proteínas acompanhantes”) e está localizado nos 50-150 resíduos da proteína efetora, permitindo a formação de complexos protéicos entre as chaperonas e as proteínas secretadas via T3SS (Tampakaki *et al.*, 2004). As proteínas chaperonas do T3SS são pequenas, ácidas (pI<5), e ricas em leucina, compartilhando apenas pequenas seqüências semelhantes (Alfano e Collmer, 2004). Normalmente, a função das chaperonas do T3SS é de interagir com seus substratos para estabilizá-los, conduzi-los ao T3SS e mantê-los parcialmente desdobrados para o seu transporte através do Hrp Pilus ou agulha (Alfano e Collmer, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006).

Chaperonas do T3SS podem ser divididas em dois grupos de acordo a sua interação com uma proteína efetora específica (grupo IA) ou com múltiplas proteínas

efetoras, grupo IB (Parsot *et al.*, 2003). Em *Pseudomonas*, os genes que codificam proteínas chaperonas pertencentes ao grupo IA, são freqüentemente encontrados ao lado do gene da proteína efetora correspondente (Wattiau *et al.*, 1996). Em *Xcv*, até agora apenas HpaB mostra características de chaperona (Büttner *et al.*, 2004), ao igual que em *Xac*, HpaB aparentaria ser chaperona da proteína HpaA (Alegria *et al.*, 2004). *Xac* HpaB é codificada dentro do “cluster” *hrp*. Em *Xoo* e *Xcc* HpaB está envolvida com a secreção de mais de uma proteína efetora, razão pela qual pareceria ser uma chaperona IB (Furutani *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009). Mutantes para o gene *Xcv hpaB*, mostraram uma redução significativa na secreção “*in vitro*” de proteínas efetoras, mas a secreção de componentes presumivelmente extracelulares do T3SS, não foi afetada, indicando que a proteína HpaB não é apenas uma chaperona, mas que também poderia estar desempenhando um papel essencial no controle da saída via T3SS (Büttner *et al.*, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006).

Apesar da ausência de similaridade na seqüência das chaperonas, todas as chaperonas conhecidas do grupo IA apresentam estruturas muito semelhantes (Parsot *et al.*, 2003), embora, não só as proteínas chaperonas mostram similaridades estruturais, mas os complexos protéicos chaperona-efetor também. Os complexos, SicP-SptP de *Salmonella* (Stebbins e Galan, 2001) e SycE-YopE de *Yersinia* (Birtalan *et al.*, 2002), são complexos protéicos chaperona-efetor onde sua estrutura foi determinada por cristalografia de raios x e demonstraram ser muito semelhantes estruturalmente. No entanto, a chaperona de *S. flexneri*, Spa15 (grupo IB) possui conformação típica de chaperona, similar às do grupo IA, mas a presença de sítios hidrofóbicos na superfície de Spa15 sugere que os diferentes efetores de Spa15 possuem elementos estruturais similares que podem se vincular a esses sítios. Além disso, a estrutura da proteína Spa15 revela diferenças estruturais entre as chaperonas do grupo IA maiores do que o anteriormente previsto, fatos que não suportariam a hipótese que os complexos chaperona-efetor/es são estruturalmente conservados (Van Eerde *et al.*, 2004).

As proteínas chaperonas do sistema flagelar constituem um grupo diferente do IA/IB, o grupo III. Elas se ligam ao substrato na região C-terminal (Parsot *et al.*, 2003). A estrutura cristalina da chaperona FliS de *Aquifex aeolicus* é um pacote de quatro-hélice antiparalelas, estrutura que não se relaciona com as outras estruturas de chaperonas do T3SS conhecidas (Evdokimov *et al.*, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004).

1.5-Proteínas do T3SS de *Xac*

O T3SS de *Xac* é necessário para o desenvolvimento de sintomas da doença em plantas suscetíveis, bem como para desencadear a resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas resistentes (Dunger *et al.*, 2005).

Em nosso laboratório, foram identificadas previamente interações proteína-proteína envolvendo componentes, substratos e reguladores do T3SS de *Xac* cepa 306 (Alegria *et al.*, 2004), cujo genoma encontra-se seqüenciado desde o ano 2002 (da Silva *et al.*, 2002). Algumas de essas interações identificadas são as que envolvem as proteínas: HrcU-HrpB2, HrcV-HpaB-HpaA e HrpW-HrpB1-HrpD6, escolhidas para serem estudadas neste projeto de doutorado. A proteína HrpG também foi motivo de nosso trabalho, já que o controle da expressão dos genes *hrp*, em *Xcv*, é feito por fatores de transcrição codificados pelos genes *hrpG* e *hrpX*, localizados fora do cluster *hrp* (Noël *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2002) e a proteína HrpE, responsável por ser o maior componente do pilus do sistema de secreção do tipo III, o qual serve como conduto para transferir proteínas da bactéria para o interior do citosol da célula da planta (Weber e Koebnik, 2006).

HrpB2 é uma pequena proteína associada com o T3SS, encontrada em apenas algumas bactérias fitopatogênicas (*Xanthomonas spp.*, *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae*) e em patógenos animais como: *Burkholderia spp.* Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), HrpB2 é secretada ao espaço extra celular via T3SS (Rossier *et al.*, 2000). *Xac* HrpB2 interagiu com o domínio C-terminal citosólico de *Xac* HrcU (Alegria *et al.*, 2004), cujos homólogos são encontrados em todos T3SSs conhecidos e no sistema flagelar e são constituídos por um domínio N-terminal contendo várias hélices transmembranares e um domínio C-terminal citoplasmático.

Homólogos de HpaB foram encontrados apenas nas espécies *Xanthomonas spp.* *R. Solanacearum*, e *B. pseudomallei*. *Xac* HpaB é uma proteína pequena (17 kDa) de natureza ácida (pI 4) e possui características típicas de proteínas chaperonas (Seção Introdução, item 1.4.1.5). Ela interage com *Xac* HpaA, cujos homólogos são encontrados somente em *Xanthomonas spp.* e *R. solanacearum* e com o domínio C-terminal citosólico de HrcV, componente conservado da maquinaria do T3SS.

HrpB1 e HrpD6 são proteínas pequenas (130 e 80 resíduos, respectivamente), citoplasmáticas e cujos homólogos em *Xcv* são essenciais para a da bactéria (Rossier *et*

al., 2000). Até agora homólogos de HrpD6 foram identificados, só em *Xanthomonas spp.*, enquanto homólogos de HrpB1 foram encontrados em *Xanthomonas spp.*, *R. Solanacearum* e *Burkholderia pseudomallei*. HrpB1 interage também com a proteína HrpW (Alegria *et al.*, 2004), cujo gene em *Xac* não está situado no locus *hrp*. No entanto, em *Xcv* o gene *hrpW* está localizado dentro do locus *hrp*, adjacente ao gene *hpaB* (da Silva *et al.*, 2002).

Nossos trabalhos se centralizaram no estudo destas proteínas, com o objetivo de tentar elucidar qual é ou são suas funções dentro do T3SS de *Xac* e qual é o significado biológico das interações proteína-proteína detectadas previamente em *Xac*, nas quais estas proteínas encontram-se envolvidas (Alegria *et al.*, 2004).

2- Objetivos

O presente trabalho de investigação teve como objetivos:

- i. A clonagem, expressão e purificação das proteínas: HrpB2, HrcU, HpaB, HpaA, HrcV, HrpD6, HrpB1, HrpW e HrpE do “Sistema de secreção do tipo III” (T3SS) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), assim como a produção de soros policlonais capazes de reconhecer e interagir especificamente com as proteínas em questão.
- ii. A investigação de interações proteína-proteína “*in vitro*”, envolvendo as proteínas selecionadas, fragmentos delas e a determinação de regiões específicas de interação e reconhecimento.
- iii. Estudar a secreção de proteínas pertencentes ao T3SS de *Xac* e a função que as mesmas desenvolvem no meio externo.
- iv. Verificar a contribuição individual na patogenicidade de *Xac* de cada proteína selecionada. Para este fim, geramos nocautes não polares nos genes de interesse. Estudamos os efeitos ocasionados pela deleção desses genes, tendo em conta o desenvolvimento da doença, a sobrevivência da bactéria no hospedeiro e possíveis fenótipos variados apresentados.
- v. A realização de testes de patogenicidade “*in vivo*”, em plantas hospedeiras, mediante a infiltração de cepas mutantes de *Xac*, carregando as deleções de interesse. Também analisou-se o efeito “*in vivo*” com cepas de complementação, monitorando a capacidade de reversão dos fenótipos no hospedeiro, ocasionados pela cepa mutante e, desta maneira, determinando a contribuição individual do gene de interesse na patogenicidade de *Xac*.

3-Materiais e Métodos

3.1-Expressão e purificação de proteínas recombinantes

Nosso principal interesse, como mencionado no item “Objetivos”, foi estudar proteínas do T3SS de *Xac*, tanto proteínas secretadas ao espaço exterior como também aquelas proteínas de membrana que formam parte da maquinaria do “complexo da agulha”, o mesmo relacionado evolutivamente com o corpo flagelar (Blocker *et al.*, 2003). Inicialmente, optamos por escolher uma série de proteínas do T3SS de *Xac*, as quais, nosso laboratório tinha detectado interações proteína-proteína entre elas pelo sistema de duplo híbrido (Bartel e Fields, 1995; Alegria *et. al.*, 2004), fato que despertou um grande interesse por estudar a profundidade e significância biológica destas interações. Na Tabela 3, encontram-se detalhadas as proteínas escolhidas para o estudo, tanto como suas características e nomenclatura das mesmas no genoma de *Xac*.

3.1.1-Clonagem dos genes de interesse em vetores de expressão

Com o intuito de testar “*in vitro*”, as interações previamente observadas (Alegria *et al.*, 2004), os DNAs dos genes das proteínas de interesse e/ou fragmentos derivados, foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *Xac*. Os fragmentos amplificados foram digeridos com enzimas de restrição detalhadas na Tabela 4, purificados com o QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) e posteriormente clonados nos vetores de expressão escolhidos (Tabela 4), os quais foram previamente tratados com as mesmas enzimas. Todas as digestões se realizaram à temperatura de 37°C, em tempos que variaram de 4 hs até 12 hs. As reações de ligação se realizaram com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), a 16°C, durante 12hs e T4 DNA ligase (Biolabs), a 25°C, durante 30 min-60 min. Na Tabela 5, detalhamos os oligonucleotídeos utilizados para amplificar os genes e/ou fragmentos dos genes escolhidos, assim como também os sítios de clonagem incorporados nos mesmos para a produção das construções de expressão.

Tabela 3. Genes do T3SS escolhidos para o desenvolvimento do estudo funcional dos mesmos na patogenicidade de *Xac*. ND: não detectado.

GENES ESCOLHIDOS DO T3SS DE <i>XAC</i>					
Gene	Nome	(pb)	(aa)	Características	Interações detectadas (Alegria <i>et al.</i> , 2004)
XAC0400	HpaA	816	271	Proteína secretada ao espaço exterior via T3SS. Possui dois sinais de localização nuclear e a localização de <i>Xcv</i> HpaA foi comprovada no núcleo (Huguet <i>et al.</i> , 1998). Possível função: molécula efetora.	HpaA<--->HpaB
XAC0396	HpaB	471	156	Possível localização na membrana interna da bactéria (Nakai and Kanehisa, 1991) e possível função de chaperona.	HrcV(C-terminal)<---> HpaB <--->HpaA
XAC0405	HrcV	1938	645	Componente conservado da maquinaria do T3SS. Possui domínio C-terminal citosólico e domínio N-terminal integrado na membrana interna.	HrcV(C-terminal)<--->HpaB
XAC0408	HrpB2	393	130	Substrato do T3SS secretado ao espaço exterior. HrpB2 é necessária para secreção de outros substratos via <i>Xcv</i> T3SS (Rossier <i>et al.</i> , 2000).	HrpB2<--->HrcU (C-terminal)
XAC0406	HrcU	1074	357	Membro conservado da super família do T3SS associada à membrana interna da bactéria. Possui domínio N-terminal integrado na membrana interna e sítio específico conservado de autoclivagem (NPTH, resíduos 264-267).	HrcU(C-terminal)<--->HrpB2
XAC0407	HrpB1	456	151	Proteína pequena, citosólica, homólogos essenciais para patogenicidade em <i>Xcv</i> (Rossier <i>et al.</i> , 2000)	HrpW<--->HrpB1<--->HrpD6
XAC2922	HrpW	1017	339	Gene <i>hrpW</i> não é situado no locus <i>hrp</i> de <i>Xac</i> . Possível função: pectato liase.	HrpW<--->HrpB1
XAC0398	HrpD6	243	80	Proteína pequena, citosólica, homólogos essenciais para patogenicidade em <i>Xcv</i> (Rossier <i>et al.</i> , 2000)	HrpD6<--->HrpB1
XAC0397	HrpE	282	93	Componente majoritário da agulha extracelular do T3SS por onde são transportados e translocados substratos e proteínas efetoras do T3SS (Veenendaal <i>et al.</i> , 2007)	ND

3.1.2-Confirmação de clones obtidos

Os clones obtidos foram confirmados por seqüenciamento, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, IQ-USP. O instrumento utilizado foi o seqüenciador automático ABI PRISM 3700 DNA Analyzer. As reações foram feitas usando-se o kit de seqüenciamento Big DyeTM Terminator (ABI PRISM).

3.1.3-Sistemas de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

No presente projeto de doutorado utilizamos cinco vetores para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*:

1-pET-28a (+) (Novagen)

2-pET11d (Novagen)

3-pAE (Ramos *et. al.*, 2004)

4-pET-3a (Novagen)

5-pET3-His (Ramos *et. al.*, 2004)

Estes vetores, escolhidos no nosso laboratório, são da série pET (plasmid for expression by T7 RNA polimerase). A expressão da proteína de interesse está sob o controle do promotor de transcrição *f10* e dos sinais de iniciação de tradução *s10* da proteína do gene 10 (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem destes vetores é que eles são transcritos pela T7 RNA polimerase, a qual é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeias de RNA aproximadamente cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. Os vetores da série pET escolhidos, apresentam o promotor T7-*lac*, colocando a expressão da proteína recombinante sob o controle do promotor *lac* e reduzindo portanto o “background” de expressão da proteína alvo na ausência de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranocídio) ou lactose. Na Figura 12, encontram-se os mapas dos vetores e seqüências relevantes. Na Tabela 4, encontram-se detalhados os genes e/ou fragmentos dos genes clonados, sítios de clonagem e vetores de expressão em *E. coli* utilizados neste projeto de doutorado.

Tabela 4. Detalhes dos genes e/ou fragmentos do T3SS de *Xac* clonados em seus respectivos vetores de expressão em *E. coli*

Gene	Resíduos codificados pelo fragmento clonado (aa)	Sítios de clonagem	Vetor de expressão	Marcador de seleção	Nome do produto expresso	Tamanho esperado (kDa). Proteínas produzidas com His tag são indicadas
<i>hpaA</i>	1-271	<i>NdeI/HindIII</i>	pET-28a (+) (Novagem)	Kanamicina	HpaA _{6xHis}	31,5 (6xHis)
<i>hpaB</i>	1-157	<i>NcoI/Blunt</i>	pET11d (Novagem)	Ampicilina	HpaB	17,7
<i>hrcV</i>	323-645	<i>NcoI/EcoRI</i>	pET-28a (+) (Novagem)	Kanamicina	HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	36
<i>hrpB2</i>	1-130	<i>NdeI/Blunt</i>	pET-3a (Novagem)	Ampicilina	HrpB2	13,8
<i>hrcU</i>	207-357	<i>NcoI/HindIII</i>	pET11d (Novagem)	Ampicilina	HrcU ₂₀₇₋₃₅₇	16,9
	277-357	<i>NdeI/HindIII</i>	pET-28a (+) (Novagem)	Kanamicina	HrcU ₂₇₇₋₃₅₇ 6xHis	10,7 (6xHis)
	207-357 _{AAAH}	<i>NcoI/HindIII</i>	pET11d (+) (Novagem)	Ampicilina	HrcU ₂₀₇₋₃₅₇ AAAH	16,9
<i>hrpB1</i>	1-151	<i>NcoI/HindIII</i>	pET-28a (+) (Novagem)	Kanamicina	HrpB1	16,1
<i>hrpW</i>	1-339	<i>NdeI/HindIII</i>	pAE (Ramos <i>et. al.</i> , 2004)	Ampicilina	HrpW	35,9
<i>hrpD6</i>	1-81	<i>NcoI/EcoRI</i>	pET3-His (+) (Ramos <i>et. al.</i> , 2004)	Ampicilina	HrpD6 _{6xHis}	9,9 (6xHis)
<i>hrpE</i>	1-94	<i>NcoI/EcoRI</i>	pET3-His (+) (Ramos <i>et. al.</i> , 2004)	Ampicilina	HrpE _{6xHis}	11 (6xHis)

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar genes inteiros do T3SS de *Xac*, ou fragmentos dos mesmos, para serem utilizados em sistemas de expressão em *E. coli*. Sublineado encontram-se sinalados os sítios de restrição incorporados nos oligonucleotídeos.

Gene	Região amplificada (pb)	Primers	Seqüência	Sítios de restrição
<i>hpaA</i>	1-816	F-A R-A	5'AAAATTTTTCATATGATGATCCGTCGCATTCTCCC3' 5'TTTAAGCTTTCATGGGCGAACC'TCCTGAGCC3'	<i>NdeI</i> <i>HindIII</i>
<i>hpaB</i>	1-471	F-B R-B	5'CATGCCATGGACAGCGCGCATTC3' 5'ACGCTCGACTATTAGGCGCGCAACCAACAGATAG3'	<i>NcoI</i> <i>Blunt</i>
<i>hrcV</i>	969-1938	F-V R-V	5'CATGCCATGGACAAGCAACGCGATATCAGC3' 5'TGAATTCCTCGAGTACACCACCACCCTGC3'	<i>NcoI</i> <i>EcoRI</i>
<i>hrpB2</i>	1-393	F-B2 R-B2	5'CGGAATTCCATATGACGCTCATTCCTCCTGTC3' 5'CCGCTCGAGCTATTGGTTCTTGACCAGTGTCTG3'	<i>NdeI</i> <i>Blunt</i>
<i>hrcU</i>	621-1074	F-U R-U	5'CATCCCATGGACTGGCTGTTTCATCCGGGAC3' 5'CCCAAGCTTCTCGAGGCTCGCACGCGATCTCCTAG3'	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>
	831-1074	F-U ₂₇₇₋₃₅₇ R-U	5'TAAATTGCTCATATGGATGACTTCGGCCTA3' 5'CCCAAGCTTCTCGAGGCTCGCACGCGATCTCCTAG3'	<i>NdeI</i> <i>HindIII</i>
	621-1074	F-U _{AAAH} R-U _{AAAH}	5'GTGATGGTGGTCGCCGCGGCCATTACGCGGTGGCAC3' 5'GTGCCACCGCGTAATGGGCCGCGGCGACCACCATCAC3'	----- -----
<i>hrpB1</i>	1-456	F-B1 R-B1	CCTCAAGCATATGGAGAAGATTCAATGTCCCGG AGAATTCCTCGAGTCAGGCACGCAGGTATTGCG	<i>NdeI</i> <i>EcoRI/XhoI</i>
<i>hrpW</i>	1-1017	F-W R-W	5'CCGAATTCCATATGGGAGAGCCTCAGATGATTTTC3' 5'TATAAGCTTCTCGAGTCAACCTGTATATTCCTTTTCGGCTG 3'	<i>NdeI</i> <i>HindIII/XhoI</i>
<i>hrpD6</i>	1-243	F-D6 R-D6	5'CATGCCATGGACGATGCCATGACCGATAC3' 5'TGAATTCGTCGACTTACGACATGCCGGCGA3'	<i>NcoI</i> <i>EcoRI</i>
<i>hrpE</i>	1-282	F-E R-E	5'GCCGTGCCATGGAATTATTACCGCAAATCAGTTCAATC3' 5'GGAATTCCTCGAGTATTACTGGCCAACGAGCTGCTTG3'	<i>NcoI</i> <i>EcoRI</i>

3.1.4-Mutação sítio dirigida

Para realizar os experimentos de mutação sítio dirigida foi utilizado o kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), segundo as instruções dadas pelo manual do fabricante.

3.1.4.1- Mutação sitio dirigida dos aminoácidos NPTH (264-267) na proteína HrcU₂₀₇₋

357

A proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ foi clonada no vetor de expressão pET11d (Novagen), nos sítios *NcoI* e *HindIII* (Tabela 4) (clonagem realizada pela aluna de iniciação científica Thais dos Santos Souza). Utilizando este clone já produzido, construímos oligonucleotídeos específicos para mutar a sequência aminoacídica NPTH (sequência conservada de clivagem) para AAAH, nas posições 264-267, seguindo as instruções dadas pelo manual do kit empregado (QuikChange^R Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, *item 3.1.4*). Os oligonucleotídeos desenhados, F-U_{AAAH} e R-U_{AAAH}, estão detalhados na Tabela 5. Por seqüenciamento (*item 3.1.2*) foi certificado o resultado positivo das mutações, gerando um novo DNA que daria lugar à proteína chamada HrcU_{207-357AAAH} (Tabela 4).

3.1.5-Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Testes de expressão em pequena escala foram realizados a fim de determinar as melhores condições de expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de *E. coli*. As diferentes linhagens de *E. coli* utilizadas foram: BL21(DE3), BL21(DE3)RP BL21(DE3)RIL e BL21(DE3)Star (Studier and Moffatt, 1986, Studier *et. al.*, 1990). O crescimento das bactérias realizou-se a 37°C com agitação constante de 200 rpm, em meio de cultura 2xTY (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) com os antibióticos necessários para cada cepa e vetor de expressão utilizados (Tabela 6). Uma alçada de uma única colônia foi utilizada para inocular 4-5 mL do meio de cultura e o crescimento das bactérias foi monitorado até atingirem uma OD_{600nm} de 0,8, onde foi retirada uma alíquota de 1 mL para o controle das amostras não induzidas (NI), e imediatamente foi adicionado no meio IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopirancidio) 0,4 mM, com a finalidade de induzir a expressão das proteínas de interesse (Rosenberg *et. al.*, 1987). Após 4h, foram retiradas novas alíquotas de 1 mL para o controle das amostras induzidas (I). Tanto as amostras induzidas como as não induzidas foram centrifugadas, em micro centrífuga, a 16.000 x g por 5 minutos e temperatura ambiente. As células pelletadas foram coletadas e ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE (50% glicerol, 260 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 0,5% azul de

bromofenol e 2- β -mercaptoetanol 14 mM) e fervidas por 10 min., afim de obter a lise celular. Posteriormente o nível de indução de cada proteína em particular e em cada diferente cepa de *E. coli* testada, foi analisado por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes). Uma vez escolhida a cepa bacteriana que apresentava maior produtividade para cada proteína recombinante, o processo de produção das mesmas foi realizado em larga escala (4-8 L em meio 2xTY dividido em alíquotas de 500 mL em erlenmeyers de 2L). As células foram coletadas por centrifugação a 4.500 $\times$ g por 15 min., a 4° C e estocadas a -20°C.

Tabela 6. Expressão das proteínas recombinantes do T3SS de *Xac*. Linhagens de *E. coli* utilizadas para a produção em larga escala das proteínas recombinantes e antibióticos requeridos para crescimento de cultura das mesmas.

Proteínas expressas	Linhagem de expressão	Antibiótico/s requerido/s	
		Resistência bacteriana	Seleção do vetor de expressão
HpaA _{6xHis}	BL21(DE3) RIL	Cloranfenicol	Kanamicina
HpaB	BL21(DE3)	Ampicilina	Ampicilina
HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	BL21 (DE3) RP	Cloranfenicol	Kanamicina
HrpB2	BL21(DE3)	Ampicilina	Ampicilina
HrcU ₂₀₇₋₃₅₇	BL21(DE3)	Ampicilina	Ampicilina
HrcU ₂₇₇₋₃₅₇ 6xHis	BL21(DE3) RIL	Cloranfenicol	Kanamicina
HrcU ₂₀₇₋₃₅₇ AAAH	BL21(DE3)	Ampicilina	Ampicilina
HrpB1	BL21 (DE3) RP	Cloranfenicol	Kanamicina
HrpW	BL21(DE3) RP	Cloranfenicol	Ampicilina
HrpD6 _{6xHis}	BL21(DE3) RP	Cloranfenicol	Ampicilina
HrpE _{6xHis}	BL21(DE3) RP	Cloranfenicol	Ampicilina

3.1.5.1- Produção de proteínas marcadas isotopicamente com ¹⁵N

O crescimento das bactérias contendo o plasmídeo com a proteína HrpD6_{6xHis} (Tabela 4) realizou-se a 37°C com agitação constante de 200 rpm, em meio mínimo (0,16 mM NaH₂PO₄, 0,32 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, 20% glicose, 0,1 mM CaCl₂, 0,5 gr/L ¹⁵NH₄Cl, 1 mM FeSO₄, 20 mM NaCl e tiamina 10 gr/L). Quando o crescimento das bactérias atingiu uma OD_{600nm} de 0,8 foi adicionado no meio IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranoctidio) 0,4 mM, com a finalidade de induzir a expressão das proteínas de interesse (Rosenberg *et. al.*, 1987).

3.1.6-Purificação de proteínas recombinantes

Para a purificação das proteínas, padronizou-se protocolos diferenciados para cada proteína, utilizando-se colunas de troca iônica (Q-Sepharose e SP-Sepharose), filtração em gel (Superdex 75 e 200), de afinidade (níquel) e precipitação com sulfato de amônio. Todas as purificações foram realizadas utilizando FPLC (modelo Akta GE Healthcare). As etapas de purificação para cada proteína encontram-se detalhadas na Tabela 7.

Uma vez induzidas as proteínas recombinantes, as células foram coletadas por centrifugação a $4.500 \times g$ por 15 min. a 4°C e estocadas a -20°C . Células derivadas de 1 L de cultura foram ressuspensas em 15-20 mL de tampão de lise (25 mM Tris-HCl pH 7-8 ou 5 mM Acetato de Sódio pH 5-6, dependendo do ponto isoelétrico de cada proteína, 1 mM EDTA e 20% Sacarose). As células ressuspensas, foram reservadas em gelo e submetidas à lise mecânica utilizando prensa French (*“French Press”*) SLM Instruments. Após a lise, adicionou-se 2-β-mercaptoetanol para uma concentração final de 14 mM e centrifugou-se a $37.000 \times g$ 1 h a 4°C . Obteve-se a fração solúvel e a fração precipitada. Ambas as frações foram analisadas por SDS-PAGE a fim de determinar se a proteína de interesse se encontra na fração solúvel ou dentro de corpos de inclusão. Caso a proteína encontrara-se em corpos de inclusão, a mesma iria a ser extraída deles por adição do agente desnaturante uréia numa concentração 8 M. Nestes casos, todos os tampões posteriores para a purificação dessas proteínas, continham uréia 8 M.

Cada proteína possui seu protocolo de purificação, o qual foi desenvolvido neste projeto de doutorado e detalhado na Tabela 7.

Tabela 7. Protocolos de purificação de proteínas recombinantes do T3SS de *Xac*

Proteína	Fração solúvel	Corpos de inclusão	Tampão 1 (Tampão de lise)	Cromatografia de afinidade	Cromatografia de troca iônica		Tampão 2 (Tampão de cromatografia)	Cromatografia de exclusão molecular
					Troca aniônica	Troca catiônica		
HrcU ₂₀₇₋₂₆₄	Sim		25 mM Tris-HCl (pH 8)/14 mM β-mercaptoethanol/1 mM EDTA e 20% sacarose		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de NaCl 0-300 mM		25 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol.	Coluna Superdex G-75 (Amersham Bioscience)
HrcU ₂₀₇₋₃₅₇ AAAH		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8), 14 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 20% sacarose e 8 M uréia		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de NaCl 0-300 mM		25 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol, 8 M uréia	Coluna Superdex G-75 (Amersham Bioscience)
HrcU ₂₇₇₋₃₅₇ 6xHis		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM imidazol, 100 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 20% sacarose e 8 M uréia.	Coluna Ni ²⁺ -chelating Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de imidazol 25-500 mM.				
HrpB2		Sim	5 mM acetato de sódio (pH 6), 1 mM EDTA, uréia 8 M		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), proteína não retida na coluna, contaminantes sim.	coluna SP-Sepharose (Amersham Bioscience), proteína não retida na coluna, contaminantes sim.	5 mM acetato de sódio (pH 6), 100 mM NaCl, 8 M uréia	Coluna Superdex G-75 (Amersham Bioscience)

HpaA _{6xHis}		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM imidazol, 100 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 8 M uréia.	Coluna Ni ²⁺ -chelating Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de imidazol 25-500 mM.				
HpaB		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8)/14 mM β-mercaptoethanol/1 mM EDTA, 8 M uréia.		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de NaCl 0-300 mM		25 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol 8 M uréia	Coluna Superdex G-75 (Amersham Bioscience)
HrcV ₃₂₃₋₆₄₅	Sim		25 mM Tris-HCl (pH 8)/14 mM β-mercaptoethanol/1 mM EDTA		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de NaCl 0-300 mM		25 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol.	Coluna Superdex G-200 (Amersham Bioscience) Coluna Superdex G-75 (Amersham Bioscience)
HrpD6 _{6xHis}		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM imidazol, 100 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 8 M uréia.	Coluna Ni ²⁺ -chelating Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de imidazol 25-500 mM.				
HrpB1		Sim	20mM Tris-HCl (pH 8), 8 M uréia, 14 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de NaCl 0-300 mM		20mM Tris-HCl (pH 8), 8 M uréia, 100 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA	Coluna Superdex G-200 (Amersham Bioscience)

HrpW		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8), 14 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA e 8 M uréia		coluna Q-Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de NaCl 0-300 mM		25 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 14 mM β -mercaptoethanol , 8 M uréia	Coluna Superdex G-200 (Amersham Bioscience) Coluna Superdex G-75 (Amersham Bioscience)
HrpE _{6xHis}		Sim	25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM imidazol, 100 mM NaCl, 2 mM β -	Coluna Ni ²⁺ -chelating Sepharose (Amersham Bioscience), eluição com gradiente de imidazol 25-500 mM.				

3.1.7-Re-enovelamento de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes expressas em corpos de inclusão são extraídas dos mesmos por meio de agentes caotrópicos e desnaturantes como uréia e o hidrócloro de guanidina, em diversas concentrações. As proteínas purificadas na presença destes agentes desnaturantes encontram-se sem sua conformação nativa, não conservando nenhum motivo (folhas β/α hélices) de estrutura secundária nem estrutura terciária ou quaternária. A função da proteína está totalmente ligada a sua estrutura tridimensional. Por esse motivo não só pretendemos obter as proteínas puras, elas devem também possuir conformação e estrutura tridimensional correta. A uréia, em altas concentrações (6 M/8 M) permite solubilizar as proteínas expressas em corpos de inclusão, sendo que as proteínas encontram-se totalmente desnaturadas. Ao mesmo tempo, a uréia nos permite tentar re-enovelar estas proteínas mediante sucessivas diálises onde a concentração de uréia é diminuída gradualmente até chegar a concentrações próximas de zero.

As proteínas recombinantes estudadas neste projeto de doutorado foram expressas, quase na sua totalidade, em corpos de inclusão, com exceção de HrcU₂₀₇₋₃₅₇ e HrcV₃₂₃₋₆₄₅ (Tabela 7), as quais encontravam-se na fração solúvel. Cada uma das proteínas purificadas com uréia foram re-enoveladas. Após este procedimento, elas se encontram solúveis e a sua conformação secundária foi avaliada por Dicroísmo circular (CD) (item 3.1.9.1). Informações de cada uma das proteínas re-enoveladas serão detalhadas na seção “Resultados”.

3.1.8-Espectrometria de massas de proteínas recombinantes purificadas

As proteínas purificadas foram analisadas por espectrometria de massa, MALDI-TOF (no laboratório do Prof. Paolo di Mascio, IQ-USP). Experimentos foram feitos em triplicatas com concentrações de proteína de 5 μ M, 10 μ M, e 50 μ M. A matriz utilizada foi 5mg/ml de trans 3,5 dimetoxi-4hydrocinnmic acid, 10 mg/ml de acetonitrila e 0,5% de trifluoroacético. Prepararam-se todas as amostras da seguinte maneira: uma mistura proteína/matriz (v/v) 1:1, 1:10 e 1:100, foi montada sobre uma placa de vidro umedecida com isopropanol para posteriormente se recolher 0,5 μ l desta mistura e

aplicar no slide adequado. O equipamento de espectrometria de massa Maldi-Tof (Amersham Biosciences) e o programa utilizado Ettan Maldi-Tof Pro Version 2.0 foi configurado com os seguintes parâmetros: Coleta para proteína linear, limite de detecção de 1000m/z, oito pulsos de laser por segundo, potencial de aceleração de 20 KV, pressão do vácuo inferior a $1,5 \cdot 10^6$ bar e acumulação de 200 espectros por varredura. O filtro utilizado foi ABC, sinal de ruído mínimo de 10 e monoisotopic cut-off de 10.

3.1.9-Analise de estrutura secundária e seqüência primaria de proteínas recombinantes

3.1.9.1-Ensaio de Dicroísmo Circular (CD)

O estado de enovelamento das proteínas recombinantes puras foi avaliado por dicroísmo circular no intervalo de 190 a 260 nm (UV distante), onde as ligações peptídicas absorvem a luz circularmente polarizada gerando espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária (alfa, beta, random coil). O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro J-720 de Jasco e o caminho ótico da cubeta 0,1 mm. Os espectros foram coletados em intervalos de 0,5 nm, tempo de resposta de 0,25 s, velocidade de 100 nm/min, e temperatura de 25° C. Oito varreduras para cada ponto da curva foi realizado e as concentrações das proteínas variaram entre 20-50 µM, segundo as necessidades observadas. Tampão 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7, foi utilizado em todos os experimentos.

3.1.9.10-Seqüenciamento de proteínas por degradação de Edman

O seqüenciamento dos 10 primeiros aminoácidos da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ pura, foi realizado utilizando a técnica de degradação de Edman. O experimento foi concluído na Universidade Federal de São Paulo, na Escola Paulista de Medicina pela Dra. Izaura Yoshico Hirata. Foi utilizado um seqüenciador PPSQ/23 da Shimadzu Corporation

(Tokyo, Japan). O reagente empregado para a derivatização dos aminoácidos foi Phenyl thioisocyanate (PITC).

3.2- Produções de soros policlonais específicos contra proteínas recombinantes purificadas

Para a produção de soros policlonais específicos contra as proteínas HpaA_{6xHis} (realizado pela pós-doutoranda Miriam Marroquim), HpaB e HrpB2, utilizamos camundongos Swiss Webster, fêmeas. Realizaram-se quatro imunizações, de 10 µg de proteína pura cada uma, com um intervalo de uma semana entre cada inoculação, sendo a primeira imunização na presença do adjuvante de Freud completo e as três seguintes com o adjuvante de Freud incompleto. Os soros policlonais contra as proteínas HrpE_{6xHis} (realizado em colaboração com a técnica de laboratório Ilda de Souza Costa), HrpB1 (realizado pelo doutorando Diorge Souza), HrcU_{207-357AAAH}, HrpD6_{6xHis} e HrpW, foram obtidos a partir de coelhos NZB, fêmeas. Utilizamos 200 µg de proteína pura para realizar cada imunização, sendo no total quatro imunizações com um intervalo de uma semana entre cada inoculação. Utilizamos para a primeira imunização o adjuvante de Freud completo e nas três seguintes o adjuvante de Freud incompleto.

A obtenção do soro proveniente tanto de camundongos como de coelhos, foi realizado seguindo as etapas detalhadas a continuação:

- i. O sangue obtido foi incubado por 30-60 minutos a 37° C, com a finalidade de o sangue coagular.
- ii. O coágulo foi separado da fração solúvel utilizando uma pipeta Pasteur e incubado a 4° C por 12-16 horas.
- iii. O soro foi separado do coágulo e de partículas insolúveis por centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4° C.
- iv. Finalizada a preparação do soro, este foi aliquotado e estocado a -20° C.

3.2.1-Limpeza de soros policlonais

Para bloquear os anticorpos específicos para antígenos derivados de *E.coli*, onde as proteínas foram expressas, realizou-se o protocolo detalhado no manual de Sambrook and Russel com as seguintes modificações:

- i. Crescimento de 100 mL de cultura da cepa *E.coli* BL21(D3) em meio 2xTY até saturação.
- ii. Centrifugação das células bacterianas em centrífuga Sorval 5.500 x g por 10 min a 4° C.
- iii. Ressuspensão das células em 3 mL de tampão (50mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).
- iv. Lise celular em sonicador (Fisher Scientific, modelo 500) na máxima potência (amplitude 100%) por períodos de 20 segundos, a 0° C.
- v. Centrifugação das células em microcentrífuga a 16.000 x g, 4° C, por 10 min. Conservar o sobrenadante.
- vi. Diluir a preparação de anticorpos 1:10 com tampão de bloqueio TBS-TT (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,1% Triton), 5% leite em pó desnatado.
- vii. Adicionar 0,5 mL do lisado bacteriano por cada mL da preparação de anticorpos do item vi. Incubar por 4hs a temperatura ambiente com leve agitação.
- viii. Guardar o soro a -20° C.

3.2.2-Especificidade de soros policlonais analisados por “Western blot”

A especificidade dos soros policlonais obtidos contra as proteínas de interesse, foi avaliado por “Western blot”. Amostras de proteínas induzidas (I) e não induzidas (NI) (item 3.1.5) foram separadas por SDS-PAGE 18%, e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) em sistema semi-seco (“Trans Blot semi-dry transfer cells”, Bio-Rad) a 10V, por 30-35 min. Ao término da transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em tampão de bloqueio: TBS-TT-leite (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,1% Triton e 5% leite pó desnatado), com agitação constante e temperatura ambiente. Posteriormente, os soros policlonais obtidos de

coelhos/camundongos (anticorpos primários) contra as proteínas específicas, foram incubados em diferentes diluições em tampão de bloqueio e nas mesmas condições do bloqueio. Logo após realizaram-se 4 lavagens com TBS-TT, de 15 minutos de duração cada uma, a fim de eliminar as ligações inespecíficas. A membrana foi incubada por 1 hora em TBS-TT-leite contendo o anticorpo secundário (que reconhece o primário): Proteína A conjugada com peroxidase (SIGMA) (diluição 1:30000) ou anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (SIGMA) (diluição 1:6000), dependendo se o soro policlonal foi gerado a partir de coelho ou camundongo, respectivamente. Realizaram-se 5 lavagens de 15 minutos de duração cada uma, as 4 primeiras com TBS-TT e a última com H₂O milliQ estéril, a fim de remover o detergente residual. A membrana foi revelada utilizando kit de detecção ECL Amersham LIFE SCIENCE, de acordo com as instruções do fabricante, ou utilizando a técnica da fosfatase alcalina com anti-IgG mouse conjugado com fosfatase alcalina (1:10000) e revelado com os reagentes B-CIP (substrato, 5-bromo 4-cloro 3-indofosfato) e NBT (oxidante, cloreto nitro azul de tetrazólio).

3.3-Interações proteína-proteína “in vitro” a partir de proteínas recombinantes purificadas

3.3.1-Ensaios de “Far-Western blot” ou “Overlay”

Para estudar as interações proteína-proteína, umas das técnicas utilizadas foi “Far-Western blot” ou “Overlay”. Esta técnica é baseada no ensaio de “Western blot”, por tanto o protocolo seguido é exatamente o descrito no item 3.2.2, com um passo adicional no começo do experimento: Após as proteínas serem separadas por SDS-PAGE (18%) e transferidas para membranas de nitrocelulose onde foram bloqueadas por 2 horas em tampão de bloqueio, as mesmas foram incubadas com a proteína de interesse em uma concentração de 50 µg/mL durante 12 horas com agitação constante e a temperatura ambiente. A finalidade é estudar as possíveis interações entre as proteínas imobilizadas na membrana e a proteína em solução. Logo após realizaram-se 4 lavagens com TBS-TT, de 15 minutos de duração cada uma, as membranas foram incubadas com o antisoro específico contra a proteína em solução (anti-HrpB2 1:20000,

anti-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH 1:3000, anti-HpaB 1:10000, anti-HrpD_{6xHis} 1:5000, anti-HrpB1 1:500 e anti-HrpE_{6xHis} 1:3000), ou com anticorpo anti-6xHis (diluição 1:6000) (SIGMA), para aquelas proteínas em solução que foram expressas com uma calda adicional de histidinas (Tabela 7). Após este passo todos os demais são os descritos para o ensaio de “*Western blot*” (item 3.2.2).

3.3.2-Ensaios de “*Pull down*”

A técnica de “*Pull down*” é utilizada para avaliar interações entre proteínas. Uma das proteínas deve possuir calda de histidina na sua sequência primária. Esta propriedade permite imobilizar a proteína numa coluna contendo resina “Chelating Sepharose Fast Flow” (GE Helathcare), carregada com Ni²⁺. Logo a proteína que não possui calda de histidinas na sua sequência primária não deve interagir com a resina, a não ser que seja retida pela presença da proteína imobilizada, formando complexos proteína-proteína e refletindo a interação entre as mesmas.

As proteínas recombinantes (50-100 µg) foram incubadas em tampão contendo 10 mM Tris-Cl pH 8, 100 mM NaCl, 5mM imidazol e 2 mM 2-β-mercaptoetanol, durante 2 horas, com agitação constante a temperatura ambiente. Logo foi adicionado 80 µl de resina Ni²⁺-Chelating Sepharose Fast Flow (previamente equilibrada no tampão detalhado acima). Incubou-se durante 1 hora com agitação constante. A mistura foi centrifugada em microcentrífuga a 11.000 x g/10 min./temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada 2 vezes com 500 µl de tampão contendo 10 mM Tris-Cl pH 8, 100 mM NaCl, 40 mM imidazol e 2 mM 2-β-mercaptoetanol, a fim de eliminar interações inespecíficas. O complexo das proteínas ligado na resina foi eluído com 40 µl de tampão contendo 10 mM Tris-Cl pH 8, 100 mM NaCl, 500 mM imidazol e 2 mM 2-β-mercaptoetanol. Frações de 20µL da solução eluída foram analisadas por SDS-PAGE (18%) e/ou “*Western blot*” (item 3.2.2).

3.3.3-Ensaios de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro AVIV Automated Titrating Differential/Ratio ATF 105. As proteínas HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU₂₀₇₋₃₅₇(AAAH), HrcU₂₇₇₋₃₅₇_{6xHis} e HrpB2 foram medidas em tampão 5 mM acetato de sódio pH 6 /1mM EDTA a 25°C. As concentrações protéicas (2 µM) foram determinadas pelo método modificado de Lowry (Waterborg and Matthews, 1994), no caso da proteína HrpB2, e por espectrofotometria no caso das proteínas restantes. Os espectros foram obtidos utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 280 nm e a leitura da emissão foi feita no intervalo 320-400 nm, com aberturas de fendas de excitação de 2 nm e emissão de 5 nm.

3.3.4- Experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN)

Experimentos de ressonância magnética nuclear foram realizados para avaliar a interação entre as proteína ¹⁵N-HrpD6_{6xHis} e HrpB1, em colaboração com o Pós-doutor Roberto K. Salinas. Os experimentos de RMN foram adquiridos na Central Analítica do IQ-USP em um espectrômetro BRUKER operando a 500 MHz e equipado com um probe TXI de 5 mm e três canais para ¹H, ¹⁵N e ¹³C e gradiente na direção do eixo z. Os espectros foram processados com NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995), e analisados com NMRView (Johnson *and* Blevins, 1994).

3.3.5-Interações proteína-proteína monitoradas por dicroísmo circular (CD)

Experimentos de CD foram realizados para monitorar mudanças nas estruturas secundárias de proteínas, devido a sua interação com outra/as proteína/as, formando um complexo protéico. Os detalhes e as condições do experimento encontram-se detalhadas no item 3.1.9.1.

3.4-Produção de nocautes “não polares” de genes do T3SS de *Xac*

Neste projeto de doutorado pretendíamos estudar e entender a importância de várias proteínas do T3SS na patogenicidade de *Xac*. Para elucidar a contribuição individual de cada uma delas no processo de infecção, colonização e desenvolvimento de doença, decidimos nos focar em algumas proteínas do T3SS importantes e com funções e características diversas: HpaA e HrpB2 são proteínas secretadas pelo T3SS, HrcU forma parte da maquinaria protéica do T3SS, HrpG é a proteína reguladora da expressão do cluster do T3SS, HpaB é uma possível chaperona da proteína HpaA e HrpB1 é uma proteína citoplasmática, solúvel e apresenta interações proteína-proteína com duas proteínas do T3SS de *Xac*: HrpW e HrpD6 (Alegria *et al.*, 2004). Para estas proteínas desenvolvemos experimentos a fim de conseguir deletar o gene que codifica as mesmas dentro do genoma de *Xac*, sem alterar a expressão das demais proteínas da ilha de patogenicidade. Conseguimos resultados positivos para todas as proteínas, exceto com a proteína HrpD6 onde não tivemos sucesso em realizar sua recombinação genômica. O nocaute polar de HrpW foi cedido em colaboração pelo Dr. Alexandre Moraes do Amaral do Laboratório de Biotecnologia, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC. O nocaute não polar da proteína HpaB foi produzido pela pos-doutora Miriam Marroquin.

3.4.1-Amplificações de ORFs flanqueadas por 1000pb

Para produzir os mutantes de *Xac* que contenham a deleção de específicos genes, utilizamos o vetor suicida pNPTS138 (Figura 13) (Dickon Alley M.R.K., trabalho não publicado), capaz de se transferir por conjugação num amplo rango de bactérias. Ele é derivado do vetor Litmus 38 que contém o marcador de resistência a kanamicina e o gene levansucrase *SacB* (Pelicic *et al.*, 1996).

Figura 13. Mapa do vetor suicida pNPTS138 (Dickon Alley M.R.K., trabalho não publicado).

Para a construção dos mutantes levou-se a cabo uma série de amplificações por PCR das ORFs em questão, flanqueadas por aproximadamente 1000 pb de DNA em cada lado, como se encontra ilustrado na Figura 14 (os nomes dados aos oligos são meramente um exemplo). Primeiramente foram amplificados os fragmentos de aproximadamente 1000 pb gerados pelos pares de oligos F1-R1 e F2-R2, logo cada um deles foi digerido com a enzima *NdeI* (Biolabs), durante 12 hs a 37° C. O sítio de restrição para a enzima *NdeI*, encontra-se só nos primers R1 e F2 (Figura 14). Os pares de fragmentos digeridos foram ligados entre eles utilizando a enzima T4 ligase (Biolabs) por 12 hs, numa temperatura que variou desde 4°C a 16°C. Um fragmento único de aproximadamente 2000 pb foi gerado, onde a ORF específica encontra-se deletada (só conserva 10-12 códonos do domínio N-terminal e 10-12 códonos da porção C-terminal, ficando perfeitamente no marco de leitura). Este fragmento de aproximadamente 2000 pb* corresponde ao inserto a ser clonado no vetor suicida pNPTS138 (Figura 13), e foi novamente amplificado por reação de PCR utilizando os oligos F1 e R2 com o objetivo de gerar uma quantidade apreciável de inserto. *(Notar que o produto de ligação também produz dímeros dos fragmentos F1-R1 e dímeros dos fragmentos F2-R2, mas que estes não são amplificados na subsequente reação empregando os oligos F1 e R2).

Tabela 8. Oligonucleotídeos utilizados nas construções a serem clonadas no vetor pNPTS138 (Figura 13), para gerar mutantes não polares em *Xac*. Sublineados encontram-se os sítios de restrição indicados entre parênteses no nome de cada oligonucleotídeo.

ORFs	Oligonucleotídeos
<i>hpaA</i>	F1-A (EcoRI-HindIII) 5'CCAAGAATTCAGCTTCTGGTCGTTTACGGCCA3'
	R1-A (NdeI) 5'GGAAAATTCATATGCGAAACCGAGGGCGGCAA 3'
	F2-A (NdeI) 5'AAAATTTTCATATGCTGATTGAGCTACCACAACAG 3'
	R2-A (BamHI-SalI) 5' ATTTGGATCCGTCGACTGCAAAATCTTGCTCATATCT 3'
<i>hrpB2</i>	F1-B2 (HindIII) 5'CACTACAAGCTT AAGCAACCAGCAAGGGGA 3'
	R1-B2 (NdeI) 5'GGAATTACCATATGAATCGCTTGGACAGGAGGAAT 3'
	F2-B2 (NdeI) 5'GGAATTACCATATGAAGAACGCCGTGCAGACACTG 3'
	R2-B2 (SalI) 5'AACATTAAATCTAGAGTCGACTGGTTCGCATGCAGGCCGAGC 3'
<i>hrcU</i>	F1-U (HindIII) 5' TCGGGACTAAAGCTTGCATCAACT TGATCT 3'
	R1-U (NdeI) 5'GGAATTACCATATGCAGTTTCTTCTCGGTCGGCTTCTC 3'
	F2-U (NdeI) 5' GGAATTACCATATGCACAGCGACGGCGATGGAGCT 3'
	R2-U (NheI) 5' TTTGAACTTGCTAGCTGATCGGTGCCGCTG 3'
<i>hrpD6</i>	F1-D6(EcoRI-HindIII) 5' TTTAGAATTCAAGCTTTGAACACACTACTGATTGAGC 3'
	R1-D6 (NdeI) 5' TCAATTTTCATATGGGCATCGAACATAGTGGACTC 3'
	F2-D6 (NdeI) 5' CCTTAATTCCATATGGGCATGTCGTAAATCGATTCTT 3'
	R2-D6 (XhoI-SalI) 5'AAAACTCGAGGTGACGCTATTCGTGAGATCGTCCAG 3'
<i>hrpB1</i>	F1-B1 (HindIII) 5'AATTTAAGCTTCCACCATCACCTTGGCCTTGG 3'
	R1-B1 (NdeI) 5'GAAAATTTTCATATGCGACCCGGGACATTGAATCTT 3'
	F2-B1 (NdeI) 5'AAAATTTTCATATGCAATACCTGCGTGCCTGA 3'
	R2-B1 (SalI) 5' AAATTTGTGACGCTGACGTTCGTAGGTGAGTCC 3'
<i>hrpG</i>	F1-G (EcoRI-HindIII) 5'AAAGAATTCAAGCTTCCGAACAACTGACCTCATCATC3'
	R1-G (NdeI) 5' ATTGATTTTCATATGCAACAGGAACACCGATCCGGCGT 3'
	F2-G (NdeI) 5'AAATCAATCATATGCTGCACGATACGGAGGCAACGACA 3'
	R2-G (XhoI) 5' TAAGGTCTCGAGGCGTTTTCAGAAAGAGTGAGG 3'

3.4.3-Preparação e transformação de células competentes de *Xac*

Células de *Xac* competentes foram preparadas utilizando as bactérias crescidas a 28° C, em meio de cultura CIRCLEGROW (40 gr/L, Bio 101 Systems-Q Biogene), com agitação constante de 180 rpm durante 12-14 hs, até atingirem uma DO₆₀₀ de 0,5. Após o crescimento as células foram centrifugadas a 4° C e o “pellet” coletado foi lavado com água estéril gelada (duas-três vezes). As células foram colecionadas e concentradas por centrifugação, para serem aliquotadas e imediatamente eletroporadas com o DNA plasmidial. Para a eletroporação foi utilizado o instrumento “GenePulser” (BIO-RAD) a uma voltagem de 2,0 kV, 25 µF, 200 Ω, em cubetas de 0,2 cm. Após a eletroporação incubamos as células em meio 2xTY (item 3.1.5) por 2-4 hs a 28° C e plaqueamos em meio seletivo apropriado.

3.4.4-Seleção de mutantes nocautes “não polares” no genoma de *Xac*

As construções pNPTS138-Δ“gene” (item 3.4.2, Tabela 9) foram confirmadas por seqüenciamento e eletroporadas em células de *Xac* competentes (item 3.4.3). As células eletroporadas foram plaqueadas em placas de petri com meio de cultura LB-agar (1 % de Bacto Triptona (SIGMA), 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de Cloreto de Sódio e 1,5 % Agar) suplementado com os antibióticos: 200 µg/mL de ampicilina (resistência natural de *Xac*) e 100 µg/mL de kanamicina como marcador de seleção do vetor pNPTS138 (Figura 13). As colônias resistentes a kanamicina foram crescidas durante 12 hs, a 28° C e agitação constante em duas condições diferentes: a) meio 2xTY (item 3.1.5) suplementado com 200 µg/mL de ampicilina e na ausência de kanamicina para estimular o primeiro evento de recombinação (integração do vetor suicida no genoma bacteriano) e b) meio 2xTY (item 3.1.5) + 5 % de sacarose e suplementado com 200 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de kanamicina, como controle onde as células de *Xac* não devem crescer por possuir ainda o gene *SacB* presente no vetor pNPTS138 (Figura 13). Com as células crescidas na condição (a), realizaram-se diversas diluições que foram plaqueadas em placas de petri com meio LB-agar. O pH do meio é acertado para 7,5 com 2N NaOH e suplementado com 200 µg/mL de ampicilina, com o objetivo

de obter colônias isoladas para logo, cada uma delas, serem replicadas em três condições diferentes:

- i. Meio 1: LB-agar +200 µg/mL de ampicilina +5% sacarose
- ii. Meio 2: LB-agar +200 µg/mL de ampicilina +100 µg/mL de kanamicina + 5% sacarose
- iii. Meio 3: LB-agar +200 µg/mL de ampicilina +100 µg/mL de kanamicina

O objetivo de replicar cada colonia individual nestas três condições é selecionar para o segundo evento de recombinação (eliminação de uma das cópias do gene de interesse). As colônias resistentes à sacarose (cresceram no Meio 1) e sensíveis a kanamicina (não cresceram nos Meios 2 e 3) foram selecionadas como possíveis candidatas a possuir a deleção do gene de interesse no genoma de *Xac*.

3.4.5-Confirmação de genes deletados no genoma de *Xac* por PCR

As colônias que cresceram em Meio 1 (i) (LB-agar +200 µg/mL de ampicilina +5% sacarose, *item anterior 3.4.4*), e não cresceram nos Meios 2 e 3 (ii; iii), foram selecionadas como mutantes positivos para o segundo evento de recombinação e candidatos de possuir a deleção do gene de interesse no genoma de *Xac*. Para confirmar a deleção utilizamos reação de PCR onde foram empregados os oligonucleotídeos F1 (Figura 14) e um segundo cujo sítio de ligação encontra-se no lado 3' do gene de interesse, com o objetivo de comparar o tamanho do fragmento amplificado, estando o gene inteiro presente ou deletado. Colônias de *Xac* carregando a suposta deleção foram repicadas em 20 µL de água milliQ estéril e aquecidas a 96° C por 15 minutos, a fim de obter um lisado homogêneo da diluição; 5 µL desta diluição foi utilizada na reação de PCR. As reações de PCR foram realizadas num volume total de 50 µL. Todas as cepas de *Xac* onde foi confirmada a deleção de determinados genes, encontram-se detalhadas na Tabela 9.

Tabela 9. Construções no vetor pNPTS138 (Dickon Alley M.R.K., trabalho não publicado), para obter a deleção de genes específicos do T3SS de *Xac* e as correspondentes cepas de *Xac* mutantes para determinados genes geradas neste projeto de doutorado.

Construções pNPTS138-Δ“gene”	Cepas <i>Xac</i> Δ“gene”
pNPTS138-Δ <i>hrpG</i>	<i>Xac</i> Δ <i>hrpG</i>
pNPTS138-Δ <i>hpaB</i> (realizado pela pos doutorando Miriam Marroquim)	<i>Xac</i> Δ <i>hpaB</i> (realizado pela pos-doutoranda Miriam Marroquim)
pNPTS138-Δ <i>hpaA</i>	<i>Xac</i> Δ <i>hpaA</i>
pNPTS138-Δ <i>hrcU</i>	<i>Xac</i> Δ <i>hrcU</i>
pNPTS138-Δ <i>hrpB2</i>	<i>Xac</i> Δ <i>hrpB2</i>
pNPTS138-Δ <i>hrpB1</i>	<i>Xac</i> Δ <i>hrpB1</i>
pNPTS138-Δ <i>hrpD6</i>	Não obteve-se recombinação genômica
pNPTS138-Δ <i>hrpW</i>	Não obteve-se recombinação genômica

3.5-Complementação dos nocautes não polares em *Xac*

3.5.1-Complementação com os genes tipo selvagem

Para realizar a complementação dos genes *hrpB1*; *hrpB2*; *hrcU* e *hpaA* em *Xac*, utilizamos o vetor pUFRO47 (De Feyter *et. al.*, 1993) o qual possui os genes de resistência contra os antibióticos ampicilina e gentamicina (Figura 15B). Os genes foram clonados sob o controle dos promotores nativos. A estratégia utilizada encontra-se esquematizada na Figura 16, onde mostramos em círculos azuis a localização das regiões promotoras. Para cada gene, foi utilizado um oligonucleotideo capaz de reconhecer uma região de aproximadamente 1000 pb “*up stream*” do códon de iniciação do gene em questão, e um outro oligonucleotideo que reconhece a região terminal do gene. Desta maneira garantimos estar amplificando o gene inteiro com o agregado de uma região “*up stream*”, de tamanho considerável, capaz de conter o promotor nativo do gene (Figura 16). Na Tabela 10 encontram-se detalhadas as

seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para gerar as construções de complementação no vetor pUFR047 (Figura 15B). As construções de complementação geradas encontram-se detalhadas na Tabela 11.

Figura 15. Mapas de vetores para complementação em cepas mutantes de *Xac*. **A)** Mapa do plasmídeo pKX33-*hpaB*, usado nos experimentos de complementação da cepa mutante para o gene *hpaB*, realizado pela pós doutoranda Miriam Marroquin, **B)** Mapa do vetor pUFR047, (De Feyter *et al.*, 1993), **C)** mapa do vetor pBBRMCS-5, (Kovach *et al.* 1995).

Assim como a deleção do gene *hpaB*, a complementação do mesmo foi realizado pela pós doutoranda Miriam Marroquin. Foi utilizado o plasmídeo pKX33-GFP, gentilmente cedido pelo Dr. Celso Benedetti (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron). O pKX33 é um plasmídeo multicópia não-conjugativo de *Xanthomonas campestris* pv *glycines* que possui os genes de resistência a kanamicina e ampicilina (Baldini *et al.*, 1999). Neste plasmídeo, no Laboratório do Dr. C. Benedetti, foi clonado o gene repórter EGFP sob controle do promotor constitutivo “P_{fur}”, de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. Este promotor garante que o gene seja expresso em *Xac* sem precisar de indutor. A pós doutora Miriam Marroquin, sub-clonou a ORF de *hpaB* substituindo o gene repórter EGFP, obtendo a construção que denominamos pKX33-*hpaB* (Figura 15A). Não conseguimos complementações para os genes *hrpW*, *hrpD6* e *hrpG*.

Figura 16. Esquema mostrando a construção utilizada para complementação das mutações não polares para os genes: *hrpB1*, *hrpB2*, *hrcU* e *hpaA*, em *Xac*. Todas as construções possuem a própria região promotora, circulada em azul. Em laranja mostramos os pares de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene *hpaA* contendo o promotor nativo, em azul para o gene *hrcU* e em preto para os genes *hrpB1* e *hrpB2*. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados estão detalhados na Tabela 10.

Tabela 10. Oligonucleotídeos utilizados para gerar as construções de complementação no vetor pUFR047 (Figura 15B, De Feyter *et al.*, 1993). Sublineados encontram-se os sítios de restrição indicados entre parêntesis no nome de cada oligonucleotídeo.

ORFs	Oligonucleotídeos
<i>hrpB1</i> e <i>hrpB2</i>	F1-B2 (HindIII) 5'CACTACA <u>AAGCTT</u> AAGCAACCAGCAAGGGGA 3'
	R-compB2(HindIII-SalI) 5'AATTTA <u>AAGCTT</u> GTGCGACCTATTGGTTCTTGACCAGTGTCT3'
<i>hrcU</i>	F1-U (HindIII) 5'TCGGGACTAA <u>AAGCTT</u> GCATCAACT TGATCT3'
	R-compU (HindIII-SalI) 5'ATTTTA <u>AAGCTT</u> GTGCGACCTAGCATGGCAGAGCTCC3'
<i>hpaA</i>	F-prom-HrcQ (HindIII) 5'CAATTTATAA <u>AAGCTT</u> TCTCCAGATCAGCATCGAGGTTGTCTAA3'
	R-compA (HindIII) 5'TTTTTA <u>AAGCTT</u> TTCATGGGCGAACCTCCTGAG3'

3.5.1.1-Mutação sítio dirigida na construção pUFR047_*hrcU*

Experimentos de mutação sítio dirigida foram realizados na construção de complementação pUFR047_*hrcU* (Tabela 11), com a finalidade de mutar os codons que codificam os aminoácidos NPTH (264-267) para AAH. Inicialmente sub-clonamos o fragmento *hrcU* +1000 pb “*up stream*” (item 3.5, Figura 16), no vetor pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995, Figura 15C), pois o vetor pUFR047 (Feyter *et al.*, 1993, Figura 15B), possui tamanho de 8,6 Kb e o inserto aproximadamente 1,9 Kb. Realizamos, para

isso, uma digestão sequencial com as enzimas de restrição HindIII e SalI liberando um inserto de aproximadamente 1,9 Kb (1000 pb “*up stream*” + *hrcU*). Digerimos também o vetor pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.* 1995, Figura 15C) de 4768 pb com as mesmas enzimas. Ligamos o inserto obtido com o vetor pBBR1MCS-5 (digerido), utilizando T4 ligase (Biolabs), por 12 hs a 16° C. Procedemos o experimento de mutação sítio dirigida na construção pBBR1MCS-5_*hrcU* (4768 pb + 1900 pb) utilizando os oligonucleotídeos F-U_{AAAH} e R-U_{AAAH} (Tabela 5). O experimento foi desenvolvido seguindo as instruções dadas pelo manual do kit empregado (QuikChange^R Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene), como detalhado no item 3.1.4.1. Por sequenciamento foi certificado o resultado positivo da mutação. Transferimos o inserto de 1900 pb, carregando as mutações desejadas, do vetor pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.* 1995, Figura 15C) para o vetor pUFR047 (Feyter *et al.*, 1993, Figura 15B), gerando a nova construção de complementação pUFR047_*hrcU*_{AAAH} (Tabela 11).

3.5.1.2-Mutações sítio dirigidas na construção pUFR047_*hrpB2*

Para realizar as mutações sítio dirigidas necessárias partimos da construção pUFR047_*hrpB2* (Tabela 11), na qual o promotor nativo do gene *hrpB2* esta contido. Tal construção foi digerida sequencialmente com as enzimas de restrição HindIII e SalI sendo o inserto purificado e sub clonado no sítio HindIII-SalI do vetor pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.* 1995, Figura 15C), previamente digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi realizada com a enzima T4 ligase (Biolabs) a 16 °C por 12 hs. A sub clonagem foi confirmada por sequenciamento. O plasmídeo foi então submetido à mutação sítio dirigida utilizando o kit QuikChange^R Site-Directed Mutagenesis-Stratagene, como detalhado no item 3.1.4.1, e seguindo as instruções dadas pelo fabricante. As mutações foram confirmadas por sequenciamento e os fragmentos mutados e contidos dentro dos sítios HindIII e SalI foram novamente digeridos e clonados dentro do vetor pUFR047 (De Feyter *et. al.*, 1993, Figura 15B). Os oligonucleotídeos utilizados encontram-se listados na Tabela 12. As construções de complementação estão detalhadas na Tabela 11.

Tabela 11. Construções de complementação para cepas mutantes de *Xac* (Tabela 9).

Construções de complementação	Vetor utilizado
pKX33- <i>hpaB</i>	pKX33 (Baldini <i>et al.</i> , 1999)
pUFR047- <i>hpaA</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pUFR047- <i>hrpB1</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrcU</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pBBR- <i>hrcU_{AAAH}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrcU</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pUFR047- <i>hrcU_{AAAH}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pUFR047- <i>hrpB2</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pBBR- <i>hrpB2₁₋₅₆</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2₁₋₅₆</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2₁₋₁₂₃</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2₁₋₁₂₃</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{FQALM35LQGPR}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{FQALM35LQGPR}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{T125A}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{T125A}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{L126A}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{L126A}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{V127A}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{V127A}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{K128A}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{K128A}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{N129A}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{N129A}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)
pBBR- <i>hrpB2_{Q130A}</i>	pBBRMCS-5 (Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUFR047- <i>hrpB2_{Q130A}</i>	pUFR047 (De Feyter <i>et al.</i> , 1993)

Tabela 12. Oligonucleotídeos utilizados para as mutações sítio dirigidas realizadas na construção de complementação pUFR047_ *hrpB2*.

Oligonucleotídeos	Seqüência
F-M57	5'GCAGCGAGTGGGCAACCCGAGCTAGATGAGCCGCGTGGTCGATGTGC3'
R-M57	5'GCACATCGACCACGCGGCTCATCTAGCTCGGGTTGCCCACTCGCTGC3'
F-Q124	5'GCAATCGGGAAAGAACGCAGTGTAAGACACTGGTCAAGAATCAATAG3'
R-Q124	5'CTATTGATTCTTGACCAGTGTCTACACTGCGTTCTTTCCCGATTGC3'
F-FQALM	5'CGCTAGTGAATCGCTTACAAGGGCCGAGGCAGTCCTCTAGC3'
R-FQALM	5'GCTAGAGGACTGCCTCGGCCCTTGTAAGCGATTCACTAGCG3'
F-T125A	5'GGAAAGAACGCAGTGCAGGCACTGGTCAAGAATCAATAG3'
R-T125A	5'CTATTGATTCTTGACCAGTGCCTGCACTGCGTTCTTTCC3'
F-L126A	5'GAAAGAATGCAGTGCAGACAGCGGTCAAGAACCAATAGGT3'
R-L126A	5'ACCTATTGGTTCTTGACCGCTGTCTGCACTGCATTCTTTC3'
F-V127A	5'AGAACGCAGTGCAGACACTGGCCAAGAATCAATAGGTCGAC3'
R-V127A	5'GTCGACCTATTGATTCTTGCCAGTGTCTGCACTGCGTTCT3'
F-K128A	5'GCCGTGCAGACACTGGTAGCAAACCAATAGGTCGACCTCGA3'
R-K128A	5'TCGAGGTCGACCTATTGGTTTGCTACCAAGTGTCTGCACGGC3'
F-N129A	5'CCGTGCAGACACTAGTCAAGCGCCAATAGGTCGACCTCGAGGG3'
R-N129A	5'CCCTCGAGGTCGACCTATTGGCGCTTGACTAGTGTCTGCACGG3'
F-Q130A	5'TGCAGACACTGGTCAAGAACGCATAGGTCGACCTCGAGGGGGG3'
R-Q130A	5'CCCCCTCGAGGTCGACCTATGCGTTCTTGACCAGTGTCTGCA3'

3.5.2-Transformação de cepas mutantes de *Xac* com construções de complementação

Cepas mutantes de *Xac*, onde foi confirmada a deleção dos genes de interesse (item 3.4.5), foram crescidas em meio CIRCLEGROW (40 gr/L, Bio 101 Systems-Q Biogene), com a finalidade de gerar células competentes a serem transformadas com as construções de complementação geradas (item 3.5). Para o crescimento e transformação

das células mutantes foi seguido o protocolo detalhado no item 3.4.3. Na Tabela 13 encontram-se detalhadas todas as cepas de complementação geradas neste projeto de doutorado.

Tabela 13. Cepas de complementação: *Xac* Δ “gene” + vetor_ “gene” das cepas mutantes *Xac* Δ “gene”. A nomenclatura “gene” representa os diversos genes e/ou fragmentos dos mesmos estudados.

Cepas <i>Xac</i> Δ “gene” + vetor_ “gene” (item 3.5)	Características
$\Delta hpaB$ +pKX33_ <i>hpaB</i>	Cepa mutante para <i>hpaB</i> complementada com a construção pKX33_ <i>hpaB</i> expressando HpaB, baixo o controle do promotor “Pfur” de <i>Xac</i> (Figura 15A).
$\Delta hpaA$ +pUFR047_ <i>hpaA</i>	Cepa mutante para <i>hpaA</i> complementada com a construção pUFR047+1956pb_ <i>hpaA</i> expressando HrcQ, HrcR, HrsS e HpaA, baixo o controle do promotor nativo (Figura 16).
$\Delta hrcU$ +pUFR047_ <i>hrcU</i>	Cepa mutante para <i>hrcU</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrcU</i> expressando HrcU, baixo o controle do promotor nativo (Figura 16).
$\Delta hrcU$ +pUFR047_ <i>hrcU</i> _{AAAH}	Cepa mutante para <i>hrcU</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrcU</i> carregando mutações nos códons 792, 795 e 798 expressando HrcU _{AAAH} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB1$ +pUFR047_ <i>hrpB1</i>	Cepa mutante para <i>hrpB1</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> expressando HrpB1 e HrpB2, baixo o controle do promotor nativo (Figura 16).
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i>	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> expressando HrpB1 e HrpB2, baixo o controle do promotor nativo (Figura 16).
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> ₁₋₅₆	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 169 gerando um códon de terminação, expressando HrpB2 ₁₋₅₆ , baixo o controle do promotor nativo.

$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{I-123}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 369 gerando um códon de terminação, expressando HrpB2 _{I-123} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{FQALM35LQGPR}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no motivo FQALM gerando LQGPR expressando HrpB2 _{LQGPR} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{T125A}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 375 expressando HrpB2 _{T125A} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{L126A}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 378 expressando HrpB2 _{L126A} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{V127A}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 381 expressando HrpB2 _{V127A} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{K128A}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 384 expressando HrpB2 _{K128A} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{N129A}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 387 expressando HrpB2 _{N129A} , baixo o controle do promotor nativo.
$\Delta hrpB2$ +pUFR047_ <i>hrpB2</i> _{Q130A}	Cepa mutante para <i>hrpB2</i> complementada com a construção pUFR047+1000pb_ <i>hrpB2</i> carregando a mutação no codon 390 expressando HrpB2 _{Q130A} , baixo o controle do promotor nativo.

3.6-Teste de patogenicidade em planta

Plantas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram inoculadas com diversas culturas de *Xac*: WT, cepas mutantes e cepas mutantes complementadas. As culturas foram crescidas em meio 2xYT (item 3.1.5), com agitação constante, a 30° C, até atingirem OD₆₀₀ de 0,3. As suspensões foram infiltradas dentro da superfície abaxial das folhas, utilizando seringas de 1 mL. Para monitorar o desenvolvimento das inoculações, fotografias foram obtidas em tempos que variaram entre 2 a 25 dias após infecção, segundo as necessidades observadas. Todos os testes de patogenicidade foram realizados em colaboração com o Dr. Alexandre Morais do Amaral do Laboratório de Biotecnologia Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC.

3.6.1-Curvas de crescimento “in vivo”

Para monitorar o crescimento da cepa mutante para o gene *hrcU* na planta, *Xac* WT, *Xac* Δ *hrcU*, *Xac* Δ *hrcU* + pUFR047_*hrcU* e *Xac* Δ *hrcU* + pUFR047_*hrcU*_{AAAH} (Tabela 13), foram crescidas em meio NB (8 gr de caldo nutriente (nutrient broth), 5 gr NaCl, pH 7), até atingirem OD₆₀₀ de 0,5. Folhas novas de laranja pêra foram inoculadas por meio de diversas “picadas”, utilizando ponteiras de agulhas previamente submersas nas suspensões de bactéria. Para monitorar o crescimento de *Xac* Δ *hrpB2* e *Xac* Δ *hpaB*, e de suas complementações: *Xac* Δ *hrpB2*+pUFR047_*hrpB2*, *hpaB*+pKX33_*hpaB*, respectivamente (Tabela 13) em planta, suspensões de bactérias (10⁶ CFU mL⁻¹) foram infiltradas com seringa de 1 mL, dentro da superfície abaxial das folhas. Em ambos os casos, discos de 0,8-cm² foram removidos da área infectada nas folhas, em tempos que variaram entre 0, 1, 2, 4, 6, e 12 dias após inoculação. Os discos foram macerados em 0,85% NaCl ou tampão TBS (140 mM NaCl, 20 mM Tris) e submetidos a diversas diluições para serem plaqueados em placas com meio LB-agar, suplementado com os antibióticos necessários. As placas foram incubadas por 2 dias a 28°-30° C, para determinar a população bacteriana. Os experimentos foram realizados em triplicatas. A curva de crescimento para as cepas mutantes e de complementação para o gene *hrcU*, foi realizada em colaboração com o Dr. Alexandre Morais do Amaral do Laboratório de Biotecnologia Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"-IAC, e para a cepa mutante para o

gene *hpaB* e sua complementação com o Dr. Julio Cezar Oliveira da UNESP em Jaboticabal.

3.7-Ensaio de secreção das proteínas HrpB2 e HpaA em Xanthomonas axonopodis pv. citri

Para detectar a secreção das proteínas pela *Xac*, inicialmente preparamos um extrato de folha de laranja seguindo as instruções detalhadas na referência Tahara *et. al.*, 2003. Para crescer a bactéria utilizamos sais M9 (10 mM NH₄Cl, 5 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,16 mM NaH₂PO₄, 0,32 mM Na₂HPO₄) suplementado com 10 mM Sucrose, 1 mg/mL de extrato de folha de laranja ou 10 µM de ácido cinâmico (Yang *et. al.*, 2008), e 2 µg/mL metionina, durante 24hs OD₆₀₀ 0,3, 28°C e 180 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas. A fração extracelular da cultura foi recuperada por centrifugação. Após isso o meio foi passado por filtros de 0,45 µm e 0,22 µm (Millipore). As proteínas presentes no meio filtrado foram precipitadas com 10% de TCA (ácido tricloroacético), o pellet foi lavado duas vezes com acetona gelada e finalmente ressuspensionado em uréia 8 M e tampão de amostra para SDS-PAGE (item 3.1.5). A fração de “proteínas secretadas” foi separada por eletroforese SDS-PAGE 18% e transferida a membrana de nitrocelulose. A detecção das proteínas nos extratos de bactéria foi realizada por ensaios de “Western blot” (item 3.2.2) utilizando anticorpos policlonais específicos contra as proteínas de interesse.

4-Resultados

Neste projeto de doutorado, tivemos como objetivo a caracterização das interações proteína-proteína dentro do T3SS de *Xac* já identificadas por nosso grupo (Alegria *et al.*, 2004). Focalizamos as seguintes interações: HrcU-HrpB2, HpaA-HpaB-HrcV e HrpD6-HrpB1-HrpW. No estágio final do trabalho de doutorado, selecionamos também a proteína *Xac* HrpE, por ser a proteína majoritária na composição do canal do T3SS, formado na superfície das bactérias, o qual se estende para o espaço exterior transportando e translocando diversas proteínas e substâncias durante o processo de infecção de bactérias Gram (-) (Veenendaal *et al.*, 2007). Iniciamos o trabalho de pesquisa com a produção destas proteínas recombinantes para serem purificadas e testadas em ensaios de interação “*in vitro*”. Posteriormente, partimos para identificar a contribuição individual destas proteínas na patogenicidade de *Xac* no hospedeiro, realizando ensaios “*in vivo*” e testes de secreção de proteínas via o T3SS de *Xac*.

4.1-Analise estrutura-função do complexo HrcU-HrpB2

O nosso laboratório demonstrou que a subunidade HrcU do T3SS, associada à membrana interna da bactéria, interage com a proteína HrpB2 (Alegria *et al.*, 2004). *Xcv* HrpB2 é secretada para o espaço exterior e necessária para a secreção de outras proteínas pelo T3SS (Rossier *et al.*, 2000). Homólogos de HrpB2 são encontrados só em *Xanthomonas* spp. e *R. solanacearum* (Rossier *et al.*, 2000). Parálogos de *Xac* HrcU, FlhB e YscU (flagella e *Yersinia*, respectivamente), possuem funções relacionadas com a hierarquia da secreção de substratos e proteínas, via T3SS (Williams *et al.*, 1996; Lavander *et al.*, 2002). Nosso grupo identificou a interação entre HrpB2 e o domínio C-terminal citosólico de HrcU (Alegria *et al.*, 2004). Esta interação detectada despertou nosso interesse de investigar profundamente o significado biológico da mesma, assim como também, sua função na patogenicidade de *Xac*.

4.1.1- *HrcU*₂₀₇₋₃₅₇ recombinante sofre auto-clivagem no sítio NPTH

O fragmento C-terminal do gene *hrcU*, que codifica os aminoácidos 207-357 (456 pb) foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *Xac*, e clonado no vetor de expressão pET11d (Novagen, Figura 12), nos sítios NcoI/HindIII (Tabelas 4 e 5, seção “Materiais e Métodos”). Esta clonagem foi realizada pela aluna de iniciação científica Thais dos Santos Souza. Após ensaios de mini-indução com diferentes cepas de *E. coli*, escolhemos BL21(DE3) (Tabela 6) para indução da proteína em larga escala, como descrito no item 3.1.5. Na Figura 17A (amostra 1) podemos observar a indução de uma proteína com tamanho aparente de 6,5 kDa, sendo que o produto esperado é de 16,9 kDa (Tabela 4). Procedemos com a purificação desta proteína para posterior identificação, já que migrações anômalas em eletroforese/SDS-PAGE não são incomuns. Após a lise celular e centrifugação verificamos que a proteína produzida encontrava-se na fração solúvel (item 3.1.6). *HrcU*₂₀₇₋₃₅₇ foi purificada (detalhes na Tabela 7, Figura 17A). Decidimos confirmar se o peso molecular apresentado se devia a uma migração anômala do SDS-PAGE, ou se realmente o peso molecular correspondia à proteína purificada. Para isto realizamos espectrometria de massas com a proteína pura, e foi revelado que o peso molecular era de 6,9 kDa (Figura 17B), valor inconsistente com aquele esperado para *HrcU*₂₀₇₋₃₅₇.

Figura 17. Indução e purificação da proteína recombinante *HrcU*₂₀₇₋₃₅₇. **A)** SDS-PAGE 18% acrilamida, PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3-*HrcU*₂₀₇₋₃₅₇ pura. **B)** Espectrometria de massas de *HrcU*₂₀₇₋₃₅₇ pura, o círculo azul indica o pico da massa molecular da proteína: 6,9 kDa.

4.1.1.1-Sequenciamento da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ por Degradação de Edman

A sequência primária da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ apresenta uma sequência NPTH, (Figura 18) na posição dos resíduos 264-267. Esta sequência é um sítio de proteólise conservado em ortólogos de HrcU: a proteína flagelar FlhB de bactérias Gram-negativas e a proteína YscU do T3SS de *Yersinia pestis* (Lavander *et al.*, 2002; Lavander *et al.*, 2003; Riordan e Schneewind, 2008; Wiesand *et al.*, 2009). Foi comprovado que a proteólise é uma auto-clivagem *in vivo*, e que a mesma é produzida entre Asn e Pro da sequência conservada NPTH (Ferris *et al.*, 2005). Se este sítio na proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ fosse clivado (entre Asn e Pro da sequência NPTH) depois de ser expressa em *E.coli* seria gerado dois fragmentos: um com peso molecular de 7062 Da (Figura 18, fragmento destacado em verde) e outro de 9931 Da (Figura 18, fragmento destacado em preto). Com estes dados chegamos à hipótese de que HrcU₂₀₇₋₃₅₇ poderia estar sendo clivada e apresentando um dos fragmentos (7 kDa), e o restante de 9,9 kDa, poderia estar sendo degradado e não detectado em nossos experimentos. Para certificarmos com precisão que estaríamos purificando o fragmento de 7 kDa, proveniente da clivagem de HrcU₂₀₇₋₃₅₇, e não estaria se tratando de um contaminante, decidimos sequenciar por “Degradação de Edman” nossa proteína pura (item 3.1.9.10). O resultado foi consistente com a sequência N-terminal começando na posição 207 (XXXLFIRDKR, Figura 18), indicando a retenção da metionina inicial. Com este dado conseguimos confirmar que HrcU₂₀₇₋₃₅₇ estava sendo clivada em *E. coli* na sequência proteolítica NPTH (entre N e P), e que estaríamos purificando o fragmento N-terminal anterior à sequência NPTH, dando origem ao fragmento HrcU₂₀₇₋₂₆₄.

(207)QH(W)FIRDKRMSKDEQKREVKESGDP EIKGKRKEFANQMVFGDPRERV
AKAKVMVVN*P~~TH~~Y AVALAYEPDDFGLPQVVAKGVDDGALELRAFAHNO
GIPIVANPPLARALYQVELGDAVPEPLFETVAVVLR(W)VDELGRDHSDGDG
ALPC (357)

Figura 18. Sequência primária do fragmento HrcU₂₀₇₋₃₅₇. Marcado em azul localização da sequência NPTH onde a cadeia sofre auto-clivagem (* entre N e P). Destacado em verde fragmento de aproximadamente de 7 kDa (HrcU₂₀₇₋₂₆₄) e em preto de 9,9 kDa, produtos da clivagem. O menor fragmento observado por Alegria *et al.*, 2004 da proteína HrcU que interagiu com a proteína HrpB2 corresponde aos resíduos 256-357, encontra-se sublinhado. Em negrito destaca-se a sequência primária do fragmento HrcU₂₇₇₋₃₅₇ e circulados em vermelhos a posição dos W presentes na sequência de HrcU₂₀₇₋₃₅₇.

4.1.2-Mutação sítio dirigida dos aminoácidos NPTH (264-267) da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇.

357

Com o objetivo de esclarecer e confirmar se a proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ estava sendo clivada em *E. coli* na sequência NPTH, mutamos a sequência NPTH para AAAH nas posições 264-267 (Figura 18, destaque em azul) produzindo a proteína chamada HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH (Tabela 4). Após indução de HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH, se nossa hipótese fosse correta, a sequência AAAH não sofreria auto-clivagem e deste modo observariamos a proteína de aproximadamente 16,9 kDa.

4.1.3-Expressão e purificação da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH

Realizou-se a expressão em larga escala de HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH (peso molecular teórico 16,876 kDa), como descrito no item 3.1.5. Após indução da cultura, obtivemos a expressão de uma proteína de aproximadamente 16 kDa (Figura 19A, amostra 1). HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH recombinante se encontrou em corpos de inclusão, dos quais foi solubilizada utilizando 8 M uréia. HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH foi purificada seguindo as etapas detalhadas na Tabela 7. O grau de pureza obtido mostra-se na Figura 19A, amostra 3. HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH foi re-enovelada com sucessivas diálises onde foi reduzida gradualmente a concentração de uréia: 6 M, 4 M, 2 M, até conseguir uma concentração final aproximada de 0 M uréia. Foi confirmado por espectrometria de massas que o peso molecular de HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH purificada era de 16,9 kDa (Figura 19B).

Figura 19. Indução e purificação da proteína recombinante HrcU_{207-357AAAH}. **A)** SDS-PAGE 18% acrilamida, PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3-HrcU_{207-357AAAH} pura. **B)** Espectrometria de massas de HrcU_{207-357AAAH} pura, circulado em azul pico da massa molecular da proteína: 16,9 kDa.

4.1.4-Expressão e purificação da proteína HrcU_{277-3576xHis}

Observamos que a expressão de HrcU₂₀₇₋₃₅₇, produz o fragmento de auto-clivagem N-terminal, HrcU₂₀₇₋₂₆₄. Por mutação do sítio de clivagem NPTH para AAAH (posições 264-267, Figura 18), conseguimos obter o domínio C-terminal inteiro da proteína HrcU (Figura 18), HrcU_{207-357AAAH}. Com isto, partimos para produzir o fragmento após o sítio de clivagem NPTH, de aproximadamente 9,9 kDa, o qual, por motivos desconhecidos, possivelmente degradação protéica, não era detectado em nossos experimentos. Para tal objetivo, clonamos e expressamos a proteína HrcU_{277-3576xHis} (Figura 18, fragmento destacado em negrito, Tabela 4), com a adição de uma calda de histidinas no domínio N-terminal. A mesma foi expressa a partir de corpos de inclusão e solubilizada a partir dos mesmos com 8 M uréia. A mobilidade em SDS-PAGE corresponde a uma proteína de aproximadamente 10 kDa (Figura 20, amostra 1, Tabela 4). A proteína foi purificada (Figura 20, amostra 3) utilizando o protocolo descrito na Tabela 7. Foi confirmado por espectrometria de massas, o peso molecular da proteína HrcU_{277-3576xHis} purificada em 10,7 kDa consistente com a adição da calda de histidinas, (Figura 20B e Tabela 4). O re-enovelamento da proteína foi realizado com

sucessivas diálises onde foi reduzida gradualmente a concentração de uréia: 6 M, 4 M, 2 M, até atingir uma concentração final aproximada de 0 M uréia.

Figura 20. Indução e purificação da proteína recombinante HrcU_{277-3576xHis}. **A)** SDS-PAGE 18% acrilamida, PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3-HrcU_{277-3576xHis} pura. **B)** Espectrometria de massas de HrcU_{277-3576xHis} pura, indicando em círculo azul o pico da massa molecular da proteína: 10,7 kDa.

4.1.5-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína HrcU_{207-357AAAH}

Decidimos obter um soro policlonal que seja capaz de reconhecer e interagir especificamente com a proteína HrcU. Escolhemos produzir o soro a partir da proteína HrcU_{207-357AAAH}, de esta maneira teríamos reconhecimento por parte do anticorpo para o domínio inteiro C-terminal de HrcU, e também, para ambos os fragmentos provenientes da proteólise em *E. coli* da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇ (Figura 18, fragmentos destacados em verde e negrito, em azul sítio NPTH reconhecido para clivagem). Para a produção do soro policlonal contra a proteína HrcU_{207-357AAAH} utilizamos coelhos NZB, machos. Realizaram-se quatro imunizações, de 200 µg de proteína cada uma, com um

intervalo de uma semana entre cada inoculação, como detalhado no item 3.2. O soro foi limpo segundo protocolo descrito no item 3.2.1. Realizamos ensaios de “Western blot” (item 3.2.2), testando a especificidade do nosso soro policlonal anti-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH, contra todos os nossos fragmentos da proteína HrcU: HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH e HrcU₂₇₇₋₃₅₇6xHis. Utilizamos amostras de culturas de *E. coli* I (induzidas) e NI (não induzidas) para expressão destes fragmentos recombinantes (item 3.1.5). Na Figura 21A mostramos a migração de todos os fragmentos purificados de HrcU por SDS-PAGE. Na Figura 21B, podemos observar que nosso soro policlonal é capaz de reconhecer especificamente as proteínas HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH e HrcU₂₇₇₋₃₅₇6xHis (amostras 3, 6 e 9), não só no estado puro, como também nas amostras induzidas (I), no meio de inúmeras proteínas de *E. coli* (amostras 1, 4 e 7). Como esperávamos em amostras não induzidas (NI), as proteínas não foram detectadas por nosso anticorpo anti-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH, demonstrando uma ótima especificidade do soro policlonal para o domínio C-terminal da proteína HrcU (amostras 2, 5 e 8). Com este resultado, adquirimos um anticorpo de qualidade e confiável para detectar a proteína HrcU, e/ou fragmentos derivados, em posteriores experimentos. Também confirmamos, novamente, que o fragmento de 7 kDa (HrcU₂₀₇₋₂₆₄) purificado após indução da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇, corresponde a um dos fragmento de proteólise de HrcU₂₀₇₋₃₅₇ e não trata-se de um contaminante, já que o mesmo é reconhecido pelo anticorpo anti-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH.

Figura 21. Western blot confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH. **A)** SDS-PAGE 18% mostrando a separação dos fragmentos recombinantes de HrcU. PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-HrcU₂₀₇₋₂₆₄ pura, 2-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH pura, 3-HrcU₂₇₇₋₃₅₇6xHis pura. **B)** Western blot dos fragmentos purificados de HrcU (amostras 3-HrcU₂₀₇₋₂₆₄, 6-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH e 9-HrcU₂₇₇₋₃₅₇6xHis). Lisados de *E. coli* antes (amostras 2, 5 e 8) e depois (amostras 1, 4 e 7) da indução dos fragmentos de HrcU: HrcU₂₀₇₋₃₅₇ (amostras 1-3), HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH (amostras 4-6), HrcU₂₇₇₋₃₅₇6xHis (amostras 7-9). Foi utilizado soro policlonal anti-HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAAH (diluição 1:3000).

4.1.6-Re-enovelamento da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAA_H monitorada por fluorescência

Foi coletado o espectro de emissão de fluorescência para a proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAA_H na presença e ausência de uréia. Na Figura 22 podemos observar a proteína solubilizada em uréia 8 M e, por tanto, desenovelada (curva rosa), o pico máximo de emissão é 355 nm, ou seja os triptofanos estão completamente expostos ao solvente. Quando a uréia foi removida, o máximo de fluorescência deslocou-se para o azul (350 nm, curva azul) demonstrando que os triptofanos foram para um micro-ambiente menos expostos. Este resultado indica que a proteína, após ser retirado o agente desnaturante, adquiriu algum tipo de conformação secundária ou terciária.

Figura 22. Espectro de fluorescência para a proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAA_H. Concentração da proteína 2 μ M, tampão 25 mM Tris-HCl, pH 8, 25° C, comprimento de onda de excitação 280 nm.

4.1.7-Analise por CD da estrutura secundária das proteínas HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAA_H e HrcU₂₇₇₋₃₅₇ puras

Experimentos de CD foram realizados para as proteínas HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAA_H e HrcU₂₇₇₋₃₅₇His puras. HrcU₂₀₇₋₂₆₄ e HrcU₂₇₇₋₃₅₇His apresentam espectros típicos de proteína não estruturada (Fasman ,1996, Figura 23A e C) ao contrário de HrcU₂₀₇₋₃₅₇AAA_H, cujo espectro apresenta mínimos em 222 nm e 208 nm, indicativos de um teor significativo de α -hélice (Fasman ,1996, Figura 23B).

Figura 23. Dicroísmo circular (CD) da proteína HrcU e fragmentos derivados. **A)** CD da proteína HrcU₂₀₇₋₂₆₄, concentração 5 μ M, tampão 25 mM Tris-HCl pH 8, temperatura utilizada 25° C, caminho ótico de 0,1 cm. **B)** CD da proteína HrcU_{207-357AAAH}, concentração 20 μ M, tampão 25 mM Tris-HCl pH 8, temperatura de 25° C, caminho ótico de 0,1 mm. **C)** CD da proteína HrcU_{277-3576xHis}, concentração 6 μ M, tampão 5 mM Tris-HCl pH 7, temperatura de 25° C, caminho ótico de 0,1 cm.

4.1.8-Expressão e purificação da proteína HrpB2

Realizou-se produção em larga escala da proteína HrpB2 (13,799 kDa), como descrito no item 3.1.5. Após indução da cultura, obtivemos a expressão de uma proteína de aproximadamente 14 kDa (Figura 24A, amostra 1). Esta observação é consistente com o peso molecular esperado para HrpB2 (Tabela 4). Após lise celular, foi verificada a expressão de HrpB2 em corpos de inclusão. Utilizamos uréia 8 M para solubilizar a proteína e durante todo o processo de purificação, como detalhado na Tabela 7.

HrpB2 foi purificada, como observamos na Figura 24A, amostra 3. O re-enovelamento da proteína foi realizado com sucessivas diálises onde foi reduzida gradualmente a concentração de uréia: 6 M, 4 M, 2 M, até atingir 0 M uréia. Nestas condições HrpB2 continua solúvel. Por espectrometria de massas foi confirmado o peso molecular de HrpB2 pura em 13 652 Da (Figura 24B).

Figura 24. Indução e purificação da proteína recombinante HrpB2. **A)** SDS-PAGE 18% acrilamida, PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3-HrpB2 pura. **B)** Espectrometria de massas de HrpB2 pura, circulado em azul pico da massa molecular da proteína: 13,7 kDa.

4.1.9-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína HrpB2

Produzimos anticorpos específicos contra a proteína HrpB2 utilizando camundongos Swiss Webster, fêmeas. Realizaram-se quatro imunizações, de 10 µg de proteína pura cada uma, com um intervalo de uma semana entre cada inoculação, como detalhado no item 3.2. O soro policlonal anti-HrpB2 foi posteriormente limpo utilizando o protocolo descrito no item 3.2.1. Realizamos ensaios de “Western Blot” (item 3.2.2) para analisar a especificidade do soro policlonal pela proteína HrpB2, (Figura 25). Utilizamos amostras de lisados de *E. coli* induzida (I) e não induzida (NI) (item 3.1.5) para expressão da proteína. Na Figura 25, amostra 3, mostramos a interação específica do anticorpo anti-HrpB2 pela proteína pura, e na amostra 1 (induzida), podemos observar como a proteína HrpB2 é reconhecida especificamente entre muitas proteínas provenientes de *E. coli*. Como esperado, na amostra 2 (não induzida), o anticorpo anti-HrpB2 não interagiu nem reconheceu outra proteína. A diluição do anticorpo utilizada foi 1:10000. Podemos apreciar um ótimo grau de especificidade do anticorpo produzido contra a proteína HrpB2.

Figura 25. Western blot confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrpB2. Diluição do soro anti-HrpB2 utilizado, 1:10000. Lisados de *E. coli* antes (amostra 2) e depois (amostra 1) da indução da proteína HrpB2, amostra 3: HrpB2 pura.

4.1.10-Análise por CD da estrutura secundária da proteína HrpB2

Analizando os resultados obtidos por CD, podemos observar que a proteína HrpB2 apresenta um pico a 208 nm mais intenso, o que indica contribuições tanto de α -hélice como folha- β (Fasman 1996, Figura 26).

Figura 26. Dicroísmo circular (CD) da proteína HrpB2, concentração utilizada 5 μ M, tampão 5 mM acetato de sódio, pH 6. Temperatura 25° C, caminho ótico de 0,1 cm.

4.1.11-Interação proteína-proteína, domínio C-terminal HrcU-HrpB2

A interação entre o domínio citosólico C-terminal de HrcU e a proteína HrpB2, foi detectada em ensaios de duplo híbrido, por nosso laboratório (Alegria *et al.*, 2004). Decidimos investigar em mais detalhe a interação entre as duas proteínas, e fragmentos derivados. Com este objetivo, empregamos ensaios de “*Overlay*” (item 3.3.1), “*Pull down*” (item 3.3.2) e fluorescência (item 3.3.3).

4.1.11.1-Interação dos fragmentos: HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU_{207-357AAAH} e HrcU_{277-3576xHis} com HrpB2, utilizando ensaios de “Far-Western blot”

Uma vez purificadas as proteínas recombinantes (HrcU₂₀₇₋₂₆₄, HrcU_{207-357AAAH}, HrcU_{277-3576xHis} e HrpB2) e confirmada a identidade de HrcU₂₀₇₋₂₆₄ (item 4.1.1.1), procedemos a realizar ensaios de “*Far-Western blot*” (item 3.3.1), avaliando a capacidade da proteína imobilizada numa membrana de nitrocelulose, reter, por meio de interação proteína-proteína, outra proteína presente em solução. Neste ensaio observamos que a proteína HrpB2 não interage com HrcU₂₀₇₋₂₆₄ (resultado não mostrado). A ausência desta interação é um resultado esperado, já que em ensaios de duplo híbrido os resíduos 255-357 foram suficientes para a interação com HrpB2, (Alegria *et al.*, 2004). Realizamos experimentos de interação HrpB2- HrcU_{207-357AAAH}, ou seja com o domínio C-terminal inteiro da proteína HrcU₂₀₇₋₃₅₇, só contendo a mutação na sequência de clivagem NPTH para AAAH, e por tanto não ocorrendo proteólise em *E. coli*. Na Figura 27A (amostra 2, 4 e 5) a proteína HrcU_{207-357AAAH} foi transferida e imobilizada na membrana de nitrocelulose, para posteriormente ser incubada com a proteína HrpB2 em solução e anticorpo policlonal anti-HrpB2 (item 3.3.1 e 3.2.2). A interação entre HrcU_{207-357AAAH} e HrpB2 foi positiva. Esta interação foi novamente confirmada utilizando a proteína HrpB2 imobilizada na membrana de nitrocelulose, incubada com a proteína HrcU_{207-357AAAH} em solução e soro policlonal anti-HrcU_{207-357AAAH} (item 3.3.1 e 3.2.2), Figura 27B. Em ambos experimentos a interação foi detectada e confirmada, demonstrando que a sequência NPTH não é imprescindível para a interação entre as proteínas e, é altamente provável que a estrutura reconhecida pela proteína HrpB2 para interagir com o domínio C-terminal de HrcU,

localiza-se na sequência após o sítio de clivagem NPTH (aminoácidos 264-267, Figura 18).

Para corroborar nossas hipóteses sobre a região reconhecida por HrpB2 para interagir com HrcU, imobilizamos numa membrana de nitrocelulose a proteína HrcU_{277-3576xHis} (seqüência primaria destacada em negrito na Figura 18) e incubamos com a proteína HrpB2 em solução. Utilizando anti-HrpB2 conseguimos detectar a interação positiva entre HrcU_{277-3576xHis} e HrpB2 (Figura 27C), confirmando que HrpB2 reconhece em HrcU, o fragmento localizado após o sítio de clivagem NPTH (Figura 18) cujo sítio não é necessário para interação com a proteína HrpB2.

Figura 27. Interação de HrpB2 com HrcU_{207-357AAAH} e HrcU_{277-3576xHis}. **A)** Experimento de “*Far western blot*” demonstrando a interação de HrpB2 com HrcU_{207-357AAAH} imobilizada. As proteínas purificadas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose: Amostra 1: HrpB2, Amostras 2, 4 e 5: HrcU_{207-357AAAH}. Amostra 3: tropomiosina (fragmento Tm₁₄₃₋₂₈₄) proveniente de músculo de frango (Paulucci *et al.*, 2002). As faixas 2 e 3 foram incubadas com HrpB2 seguido de lavagens para remover proteínas não ligadas. As faixas correspondentes 1-5, foram então incubadas com soro policlonal anti-HrpB2, para posterior incubação das faixas 1-4 com anti-mouse IgG conjugado com peroxidase. **B)** “*Far western blot*” demonstrando a interação de HrcU_{207-357AAAH} com HrpB2 imobilizada. As seguintes amostras foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose: Extratos lisados de células *E. coli* após (faixa 1) e antes (faixa 2) da indução da expressão de HrpB2 e HrpB2 purificada (faixa 3). Amostras 1-3, foram incubada com HrcU_{207-357AAAH} pura, soro policlonal anti-HrcU_{207-357AAAH} e proteína A conjugada com peroxidase. **C)** “*Far western blot*” demonstrando a interação de HrpB2 com HrcU_{277-3576xHis} imobilizada. As seguintes amostras foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose: extratos lisados de células de *E. coli* após (faixa 1) e antes (faixa 2) expressão de HrcU_{277-3576xHis} e HrcU_{277-3576xHis} purificada (faixa 3). A membrana de nitrocelulose foi incubada com HrpB2 seguida da incubação com soro policlonal anti-HrpB2 e anti-mouse IgG conjugado com peroxidase. A revelação de todos os experimentos foi realizada utilizando kit de detecção ECL Amersham LIFE SCIENCE, de acordo com as instruções do fabricante. Setas e números à esquerda das figuras mostram pesos moleculares em kDa.

4.1.11.2-Interação dos fragmentos: *HrcU*₂₀₇₋₂₆₄, *HrcU*_{207-357AAAH} e *HrcU*_{277-3576xHis} com *HrpB2*, utilizando ensaios de fluorescência

Tendo em conta as seqüências primárias das proteínas *HrpB2* (Figura 28) e *HrcU*_{207-357AAAH} (Figura 18), observamos que só *HrcU*_{207-357AAAH} possui aminoácidos triptofano (posição 209 e 340 na Figura 18, sinalados por círculos vermelhos). Desenvolvemos um ensaio de interação entre as proteínas utilizando fluorescência, a fim de monitorar o ambiente destes triptofanos, na presença e na ausência de *HrpB2*. Supomos que no caso de uma interação com *HrpB2* (já observada por experimentos de “*Far western blot*”, item 4.1.11.1), o ambiente desses triptofanos poderia mudar, sendo observada no espectro de emissão. Primeiramente obtivemos o espectro de emissão da proteína *HrcU*₂₀₇₋₂₆₄ (Figura 29A, linha pontilhada), note-se que a mesma possui um triptofano na posição 209 (Figura 18). Em seguida realizamos o espectro de emissão com a mistura *HrcU*₂₀₇₋₂₆₄-*HrpB2* (Figura 29A, linha contínua) não observando mudanças no espectro anterior, consistente com a ausência de interação com a proteína *HrpB2*, já observado em ensaios de “*Far western blot*” (não mostrado). Procedemos a obter o espectro de emissão de fluorescência para a proteína *HrcU*_{207-357AAAH} (Figura 29B, linha pontilhada), observando o máximo de emissão em 340 nm, o que significa que os triptofanos estão num ambiente polar que pode-se entender como uma maior exposição ao solvente, o que no espectro de emissão da mistura *HrcU*_{207-357AAAH}-*HrpB2* (Figura 29B, linha contínua) observa-se uma perturbação no espectro: um aumento de intensidade e um leve deslocamento para o azul. O mesmo efeito de perturbação pode-se observar no espectro de emissão de *HrcU*_{277-3576xHis} (Figura 29C, linha pontilhada) e sua mistura com a proteína *HrpB2* (Figura 29C, linha contínua), comprovando uma vez mais a interação entre as proteínas *HrcU*_{207-357AAAH}-*HrpB2* e *HrcU*_{277-3576xHis}-*HrpB2*.

**(1)MTLIPPVQAIAGTSITSTQALSPVAAPNQALVNRFQALMQSSSPLPPAMQ
RVGNPSMMSRVVDVQNDGVRTIAEHIDAFSMQAPTMGLQEMAAQQIKLM
HELT MVGFNLNVSVGVAQSGKNAVQTLVKNQ(130)**

Figura 28. Seqüência primaria da proteína *HrpB2* de *Xac* de 130 aminoácidos.

Figura 29. Espectros de emissão de fluorescência para HrcU₂₀₇₋₂₆₄ (A), HrcU_{207-357AAAH} (B) e HrcU_{277-3576xHis} (C) na ausência (linhas pontilhadas) e na presença (linhas contínuas) de HrpB2. Todas as proteínas (2 μ M) foram dissolvidas em tampão 5 mM acetato de sódio, pH 6. Os espectros foram obtidos a 25° C utilizando um comprimento de onda de excitação de 280 nm.

4.1.11.3-Interação HrpB2-HrcU_{277-3576xHis} por ensaios de “Pull down” e confirmação por “Western blot”

A interação entre as proteínas HrpB2-HrcU_{277-3576xHis} foi confirmada por ensaios de “Overlay” (item 4.1.11.1, Figura 27C) e fluorescência (item 4.1.11.2, Figura 29C). Tendo em conta que a proteína HrcU₂₇₇₋₃₅₇ foi clonada em fusão com uma calda de histidinas no N-terminal (Tabela 4), isso nos permitiu imobilizar a proteína numa coluna

de afinidade de Ni^{2+} , e testar a capacidade da mesma reter a proteína HrpB2, num ensaio de “*Pull down*” (item 3.3.2).

Para o ensaio, incubamos a proteína HrcU_{277-3576xHis} com a resina de Ni^{2+} , realizamos diversas lavagens e eluímos com 500 mM de imidazol (Figura 30A, amostra 2, controle positivo da interação da proteína HrcU_{277-3576xHis} com a resina), podendo afirmar que HrcU_{277-3576xHis} fica imobilizada na resina. O mesmo procedimento foi realizado com a proteína HrpB2, observando que a mesma não interage com a resina e foi descartada completamente nas lavagens (Figura 30A, amostra 3). Na amostra 4 da Figura 30A, foi testada a mistura entre as proteínas (HrcU_{277-3576xHis} e HrpB2) com a resina de Ni^{2+} , podendo observar que uma banda larga foi eluída da resina, já que as duas proteínas apresentam pesos moleculares muito próximos (10kDa e 14kDa, respectivamente), e a migração no SDS-PAGE fica muito similar. Uma amostra de lisado de bactéria *E.coli* (Figura 30A, amostra 1), foi misturado com a proteína HrcU_{277-3576xHis}, e a mistura foi incubada com a resina de Ni^{2+} , com a finalidade de confirmar a ausência de interações inespecíficas com a proteína HrcU_{277-3576xHis} (Figura 30A, amostra 5), concluindo também que proteínas do extrato de *E. coli* não interagiram significativamente com a resina. Tomando em conta que a análise por SDS PAGE não permitiu separar HrpB2 e HrcU_{277-3576xHis}, decidimos analisar a amostra 4 da Figura 30A por “*Western blot*” (item 3.2.2), utilizando anticorpos específicos anti-HrpB2 e anti-HrcU_{277-357AAAH}. Na Figura 30B podemos ver claramente a presença das duas proteínas no eluído (amostra 4 da Figura 30A) do ensaio de “*Pull down*”, confirmando a interação entre as proteínas HrpB2 e HrcU_{277-3576xHis}.

Figura 30. Ensaio de “Pull down” demonstrando a interação da proteína HrpB2 com HrcU_{277-3576xHis} imobilizada numa resina de Ni²⁺. **A)** HrcU_{277-3576xHis} (amostra 2), HrpB2 (amostra 3), mistura das proteínas HrpB2-HrcU_{277-3576xHis} (amostra 4) e mistura de HrcU_{277-3576xHis} com extrato de lisado de *E. coli* BL21(DE3) (amostra 5) foram incubadas com resina Ni²⁺-chelating Sepharose (Amersham Bioscience). Lavagens foram realizadas com tampão contendo 25 mM imidazol e as proteínas ligadas na resina foram eluídas com tampão contendo 500 mM imidazol. As proteínas eluídas foram separadas por SDS-PAGE 18% e visualizadas com corante Coomassie brilliant blue (SIGMA). Amostra 1 mostra o conteúdo de proteínas no extrato de *E. coli* utilizado na amostra 5. Setas e números à esquerda das Figuras mostram pesos moleculares (PM) em kDa. **B)** Devido a que HrpB2 e HrcU_{277-3576xHis} não são claramente separadas por SDS-PAGE, a presença das proteínas HrpB2 e HrcU_{277-3576xHis} na fração ligada à resina (amostra 4 da Figura 30A) foi demonstrada por “Western blot” utilizando anti-HrcU_{207-357AAAH} (amostra 1) e anti-HrpB2 (amostra 2). Setas e números à esquerda das Figuras mostram pesos moleculares (PM) em kDa.

4.1.12-HrcU e HrpB2 são essências para a patogenicidade de *Xac*

Para avaliar a importância de HrcU e HrpB2 na patogenicidade de *Xac* decidimos gerar mutantes não polares para estas proteínas. Para as deleções dos genes *hrpB2* e *hrcU* do genoma de *Xac*, as construções pNPTS138- Δ *hrpB2* e pNPTS138- Δ *hrcU* (Tabela 9, item 3.4.2) foram electroporadas em células de *Xac* competentes (item 3.4.3) e submetidas a recombinação genômica, como detalhado no item 3.4.4. A deleção dos genes do genoma de *Xac* foi confirmado por PCR (item 3.4.5). Na Figura 31 podemos observar, em géis de agarose corados com brometo de etídeo, os tamanhos de amplificações realizadas para colônias de *Xac* selvagem (WT) e para colônias de *Xac* mutantes, onde os genes foram deletados em quase sua totalidade, mantendo uma mínima porção N-terminal e C-terminal, a fim de não afetar o marco de leitura (item 3.4.1).

Figura 31. PCR de colônia para *Xac* WT (cepa selvagem), *Xac ΔhrcU* (superior) e *Xac ΔhrpB2* (centro inferior). Tamanhos esperados para *Xac* WT utilizando os oligonucleotídeos (Tabela 8): F1-U/R2-U: 3070 pb, F1-B2/R2-B2: 2375 pb, para *Xac ΔhrcU* utilizando o par de oligonucleotídeos F1-U/R2-U: 2078 pb e para *Xac ΔhrpB2* utilizando o par de oligonucleotídeos F1-B2/R2-B2: 2048 pb. PM: marcador de peso molecular de DNA.

As cepas mutantes *Xac ΔhrcU* e *Xac ΔhrpB2* foram utilizadas para inocular plantas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) onde as suspensões foram infiltradas dentro da superfície abaxial das folhas (item 3.6). Todos os testes de patogênicidade foram realizados em colaboração com o Dr. Alexandre Morais do Amaral do Laboratório de Biotecnologia Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC. Na Figura 32 podemos observar, do lado esquerdo das folhas, a inoculação das cepas mutantes, onde é visível a ausência total de sintomas e desenvolvimento da doença, comparando com a inoculação da cepa selvagem (WT, canto superior direito).

Figura 32. HrcU e HrpB2 contribuem na patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Teste de patogenicidade de *Xac* $\Delta hrcU$ (1) e $\Delta hrpB2$ (2) “in vivo”. As cepas *Xac* selvagem (WT), $\Delta hrcU$, $\Delta hrcU$ +pUFR047_ *hrcU* ($\Delta hrcU$ +*hrcU*), $\Delta hrcU$ +pUFR047_ *hrcU*_{AAAH} ($\Delta hrcU$ +*hrcU*_{AAAH}), foram infiltradas dentro da superfície abaxial das folhas. Fotos foram tiradas 15 dias após a infecção.

4.1.13- Complementação dos genes *hrcU* e *hrpB2* revertem sintomas e desenvolvimento do cancro cítrico no hospedeiro

A complementação dos genes *hrcU* e *hrpB2* foi realizada seguindo o protocolo detalhado no item 3.5. Com o objetivo de confirmar se a ausência total de patogenicidade observada nas cepas *Xac* $\Delta hrcU$ e *Xac* $\Delta hrpB2$, quando infiltradas no hospedeiro, deve-se exclusivamente à deleção destes genes, realizamos testes de patogenicidade, utilizando plantas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, item 3.6), inoculando nelas as cepas de complementação *Xac*: $\Delta hrcU$ +pUFR047_ *hrcU*, $\Delta hrcU$ +pUFR047_ *hrcU*_{AAAH} e $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2* (Tabela 13), onde os genes deletados são reincorporados às cepas mutantes. *In vitro*, observamos que a proteína HrcU era clivada em *E. coli* na sequência NPTH (posição 264-267, Figura 18) e que esta sequência não é imprescindível para a sua interação com a proteína HrpB2 (item 4.1.11, e sub itens). Por tanto, decidimos estudar quanto a auto-clivagem de HrcU é importante no desenvolvimento da sua função protéica, e na patogenicidade de *Xac*. Para isto realizamos mutação sitio dirigida na construção de complementação pUFR047_ *hrcU* (Tabela 11) com a finalidade de mutar os codons que codificam os aminoácidos NPTH (264-267, Figura 18) para AAAH.

Os fenótipos de patogenicidade em citrus foram revertidos totalmente nas cepas de complementação testadas, e pudemos observar que a ausência de auto-clivagem de HrcU não afetou significativamente o desenvolvimento da doença (Figura 32).

4.1.13.1-Complementação com mutantes de HrpB2_x mostram importância nos últimos sete aminoácidos

Com o objetivo de determinar as regiões de HrpB2 importantes para sua função observamos a capacidade de mutantes de reverter os fenótipos de patogenicidade em citros, ausentes na cepa *Xac ΔhrpB2* (Figura 32-2). Inicialmente produzimos uma série de fragmentos de HrpB2. Utilizamos a construção de complementação pUFR047_*hrpB2* (item 3.5) e realizamos mutações sítio dirigidas (item 3.5.1.2), a fim de introduzir códons de terminação em diferentes regiões da proteína e testar a habilidades desses fragmentos de reverter os sintomas do cancro cítrico em planta, podendo dessa maneira determinar qual região é indispensável para HrpB2 desenvolver sua função em *Xac*. Inicialmente mutamos para códons de terminação os códons 57 e 124 para gerar as cepas *Xac ΔhrpB2*+pUFR047_*hrpB2*₁₋₅₆ e *Xac ΔhrpB2*+pUFR047_*hrpB2*₁₋₁₂₃ (Tabela 13), que expressariam a proteína HrpB2 até o aminoácido 56 e 123, respectivamente (Figura 33A e 33B). Na Figura 34 (folha 1 e 2), podemos observar que as cepas de complementação para o gene *hrpB2*: *Xac ΔhrpB2*+pUFR047_*hrpB2*₁₋₅₆ e *Xac ΔhrpB2*+pUFR047_*hrpB2*₁₋₁₂₃ (Tabela 13), não são capazes de reverter os sintomas da doença em planta, comparando com *Xac* selvagem e *Xac ΔhrpB2*+pUFR047_*hrpB2*.

A

1

atgacgctcattcctcctgtccaagcgattgccggcaccagtatta
cctccactcaagcgctgtcgccggtggcagcgcccaaccaagcgct
tgtgaatcgctttcaagcgctgatgcagtcctctagcccttgccg
cccgccatgcagcgggtgggcaacccgagcatgatgagccgcgtgg

57

tcgatgtgcagaacgatggcggtgcggaccatcgccgagcatatcga
tgccttcagcatgcaggcaccgaccatggggctgcaggaaatggca
gcgagcagatcaagttgatgcacgagctgaccatggtcggcttca
acctcaatgtcagcgtcggcggtggcgcaatcgggaaagaacgcctg

124

gcagacactgggtcaagaaccaatag

B

MTLIPPVQAIAGTSITSTQALSPVAAPNQALVNRFQALMQSSSPLP
PAMQRVGNPSMMSRVVDVQNDGVRTIAEHIDAFSMQAPTMGLQEMA
AQQIKLMHELTMVGFNLNVSVGVAQSGKNAVQTLVKNQ

Figura 33. Sequências nucleotídica e protéica do gene *hrpB2*. **A)** Gene *Xac hrpB2*. Em negrito destacam-se os códons 1, 57 e 124. Utilizando a técnica de mutação sítio dirigida (item 3.5.1.2) foram gerados nos códons 57 e 124 códons de terminação. As mutações foram confirmadas por seqüenciamento (item 3.1.2). **B)** Sequência primária da proteína HrpB2. Sublinhado estão indicados os aminoácidos 1-56, fragmento expresso gerando a proteína HrpB2₁₋₅₆ e em negrito os aminoácidos 1-123, dando origem a proteína HrpB2₁₋₁₂₃.

Figura 34. Teste de patogenicidade de diversas cepas de complementação para o gene *hrpB2* em plantas hospedeiras de laranja pêra. As fotos foram obtidas aos 15 dias após infecção. Amostras: *Xac* selvagem (WT), *Xac ΔhrpB2*, *Xac ΔhrpB2+pUFR047_hrpB2* (*ΔhrpB2+hrpB2*), *Xac ΔhrpB2+pUFR047_hrpB2₁₋₅₆* (*ΔhrpB2+hrpB2₁₋₅₆*), *Xac ΔhrpB2+pUFR047_hrpB2₁₋₁₂₃* (*ΔhrpB2+hrpB2₁₋₁₂₃*), *Xac ΔhrpB2+pUFR047_hrpB2_{FQALM35LQGPR}* (*ΔhrpB2+hrpB2_{LQGPR}*).

4.1.13.2-T125 de *Xac* HrpB2 é essencial para a patogenicidade da bactéria

Após termos observado o fato de que a proteína HrpB2, aparentemente, desenvolve patogenicidade no hospedeiro quando encontra-se com sua sequência primária íntegra (item 4.1.13.1, Figura 34), deixou em aberto as seguintes hipóteses no nosso laboratório: Uma delas poderia ser que HrpB2 precisa de seus sete últimos aminoácidos para ser funcional, pois algum ou os sete aminoácidos estão envolvidos direta ou indiretamente com a sua função. Outra possibilidade é que a função de HrpB2 é essencialmente desenvolvida com o correto enovelamento da proteína, e a ausência dos últimos sete aminoácidos não estaria permitindo adquirir a estrutura adequada, portanto a proteína estaria sendo inativa. Uma terceira possibilidade a testar é que essas inserções de códons de terminação no gene *hrpB2* estavam produzindo as proteínas mutantes desejadas (Figura 33), mas as mesmas não estariam sendo exportadas ao espaço exterior, por essa razão não estaríamos observando os fenótipos de complementação já descrito para a cepa complementar do gene *hrpB2* (item 4.1.13, Figura 32, folha 2).

Na Figura 35 podemos observar que os seis últimos aminoácidos (TLMKNQ) são altamente conservados na família de homólogos de HrpB2. Também observamos um segundo motivo com um grau significativo de conservação, FQALM. O domínio FQALM, encontra-se contido nas cepas de complementação *Xac* Δ *hrpB2*+pUFR047_*hrpB2*₁₋₅₆ e *Xac* Δ *hrpB2*+pUFR047_*hrpB2*₁₋₁₂₃, as quais não conseguem reverter os sintomas típicos de cancro cítrico em citros (Figura 34, folha 1 e 2), fato que estaria nos dizendo que talvez este motivo não apresentaria características importantes dentro da proteína e na patogenicidade de *Xac*, mas, tendo em conta a conservação dos aminoácidos, produzimos mediante mutação sítio dirigida a cepa de complementação *Xac* Δ *hrpB2*+pUFR047_*hrpB2*_{FQALM35LQGPR} (Tabela 13) para o gene *hrpB2*, na qual mutamos radicalmente os aminoácidos do motivo FQALM para LQGPR, a fim de nos demonstrar-se a importância deste domínio na função de HrpB2. Na Figura 34, folha 3, observamos que a mutação do domínio FQALM não afeta a capacidade da proteína HrpB2 de desenvolver sua função na patogenicidade de *Xac*.

Figura 36. Teste de patogenicidade de diversas cepas de complementação para o gene *hrpB2* em plantas hospedeiras de laranja pêra. As fotos foram obtidas aos 15 dias após infecção. Amostras: *Xac* selvagem (WT), *Xac* $\Delta hrpB2$, *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2$), *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2_{T125A}$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2_{T125A}$), *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2_{L126A}$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2_{L126A}$), *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2_{V127A}$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2_{V127A}$), *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2_{K128A}$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2_{K128A}$), *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2_{N129A}$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2_{N129A}$) e *Xac* $\Delta hrpB2 + pUFR047_hrpB2_{L130A}$ ($\Delta hrpB2 + hrpB2_{L130A}$).

4.1.14-*HrcU* não é necessária para sobrevivência e multiplicação da bactéria no hospedeiro

A fim de determinar quanto *HrcU* e o sítio NPTH são necessários para a sobrevivência de *Xac* no hospedeiro, monitoramos o crescimento das cepas: *Xac* WT, *Xac* $\Delta hrcU$, *Xac* $\Delta hrcU + pUFR047_hrcU$ e *Xac* $\Delta hrcU + pUFR047_hrcU_{AAAH}$ (Tabela 13), na planta. Acompanhamos o crescimento durante 12 dias após infecção. Na Figura 37A, podemos observar que todas as cepas apresentam crescimento similar, comparando com *Xac* selvagem, sugerindo que *HrcU* e o sítio de clivagem NPTH não são imprescindíveis para a sobrevivência da bactéria em planta. Em contrapartida, a proteína *HrpB2* é essencial para a multiplicação, colonização e sobrevivência de *Xac* em planta (Figura 37B). Em ambos os casos, típicas lesões de cancro cítrico foram observadas nas folhas de laranja 4-7 dias após infecção nas cepas selvagem e complementações.

Figura 37. Unidades formadoras de colônia (CFU) de diversas cepas de *Xac* por cm² de tecido de folha de laranja, durante os primeiros doze dias após inoculação (dias de coleta: 0, 1, 2, 4, 6, 9 e 12). O ensaio foi realizado em triplicatas e as barras de erro representam o desvio padrão. Cepas de *Xac*: WT (diamantes), $\Delta hrcU$ (quadrados), $\Delta hrcU+pUFR047_hrcU$ (triangulos), $\Delta hrcU+pUFR047_hrcU_{AAA}$ (cruzes) (A), e WT (diamantes), $\Delta hrpB2$ (quadrados), $\Delta hrpB2+pUFR047_hrpB2$ (triangulos) (B).

4.1.15-HrpB2 é secretada por *Xac*

Rossier *et al.*, 2000, mostrou que *Xcv* HrpB2 é secretada via T3SS. Em nosso trabalho, decidimos testar se *Xac* HrpB2 era em princípio secretada ao espaço exterior e, se de fato isso acontecia, se a sua secreção dependia do T3SS de *Xac*. Para isso crescemos culturas de *Xac* selvagem, *Xac* $\Delta hrpB2$ e $\Delta hrpB2+pUFR047_hrpB2$, recuperando a fração das proteínas secretadas, como descrito no item 3.7. As proteínas da fração secretada foram separadas por SDS-PAGE 18% e submetidas a ensaios de “Western blot” (item 3.2.2), utilizando anti-HrpB2 para detectar a proteína HrpB2. Na Figura 38A, podemos observar que HrpB2 é secretada ao espaço exterior por *Xac* selvagem (amostra 1), mas na ausência do gene *hrpB2*, como esperado, a proteína não foi detectada pelo anticorpo anti-HrpB2 (amostra 2), sendo sua secreção restaurada na

cepa de complementação (amostra 3). Com este resultado podemos confirmar a secreção de HrpB2 por *Xac*.

4.1.16-A seqüência NPTH contribui na secreção de HrpB2 via T3SS

Para confirmar se HrpB2 era secretada via T3SS de *Xac*, crescemos culturas de *Xac* selvagem (WT), *Xac* $\Delta hrcU$, $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU* e $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU*_{AAAH} (Tabela 13), recuperando a fração de proteínas secretadas (item 3.7), para serem analisadas por “Western blot” (item 3.2.2), utilizando anticorpo anti-HrpB2 a fim de detectar a proteína HrpB2. Na Figura 38B, podemos observar a secreção de HrpB2 por *Xac* selvagem (amostra 1), a ausência da proteína HrpB2 quando o gene *hrcU* é deletado do genoma de *Xac* (amostra 2), e a secreção de HrpB2 restaurada quando o gene *hrcU* é complementado na forma selvagem e na forma mutada, onde o sitio de clivagem NPTH é mutado para AAAH, amostras 3 e 4, respectivamente. Note-se que a quantidade de HrpB2 secretada na cepa $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU*_{AAAH} (amostra 4), é notoriamente inferior à quantidade observada nas cepas *Xac* selvagem e *Xac* $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU*, demonstrando: 1-A auto-clivagem de HrcU *in vivo* facilita a secreção de HrpB2 pelo T3SS e 2-A função de HrpB2 parece ser desenvolvida em ínfimas concentrações, já que por mais que diminua notoriamente a quantidade da proteína secretada, essa quantidade é suficiente para desenvolver sintomas, sobrevivência da bactéria e cancro cítrico, no hospedeiro (Figura 38A e Figura 32, folha 1).

Figura 38. HrpB2 é secretada via T3SS de *Xac*. Culturas de *Xac* foram crescidas e a fração das proteínas secretadas foi recuperada, para serem concentradas, separadas por SDS-PAGE 18% e transferidas a membranas de nitrocelulosa. HrpB2 foi detectada utilizando anti-HrpB2 e anti-mouse IgG conjugada com peroxidase. **A)** Amostras 1: *Xac* selvagem, 2: *Xac* $\Delta hrpB2$, 3: *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*, 4: *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*₁₋₅₆, 5: *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*₁₋₁₂₃, 6: *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*_{LQGPR}. **B)** Amostras 1: *Xac* selvagem, 2: *Xac* $\Delta hrcU$, 3: *Xac* $\Delta hrcU$ +pUFR047_ *hrcU* e 4: *Xac* $\Delta hrcU$ +pUFR047_ *hrcU*_{AAAH}. **C)** Amostras 1: *Xac* selvagem, 2: *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*_{T125A}, 3: *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*_{Q130A}, 4: *Xac* $\Delta hrpB2$.

4.1.17-A secreção de HrpB2 não é afetada por deleções no extremo C-terminal

Na Figura 34, folhas 1 e 2, observamos que as cepas *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*₁₋₅₆ e $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*₁₋₁₂₃ (Tabela 13), não conseguem reverter os fenótipos típicos de cancro cítrico. Restou para nós, determinar se as proteínas HrpB2₁₋₅₆ e HrpB2₁₋₁₂₃ são secretadas ou não ao espaço exterior. Para isto, crescemos culturas de *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*₁₋₅₆ e $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*₁₋₁₂₃ (Tabela 13), recuperando a fração de proteínas secretadas (item 3.7), para serem analisadas por “Western blot” (item 3.2.2), utilizando anticorpo anti-HrpB2 a fim de detectar a proteína HrpB2. Na Figura 38A, pudemos

detectar a secreção das proteínas HrpB2₁₋₅₆ (6,2 kDa aproximadamente) e HrpB2₁₋₁₂₃ (13,5 kDa aproximadamente), amostras 4 e 5, respectivamente. Na Figura 38A, amostra 6, comprovamos a secreção da proteína HrpB2_{LQGPR} pela cepa *Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_*hrpB2*_{LQGPR} (Tabela 13), na qual mutamos radicalmente os aminoácidos do motivo FQALM (Figura 35) para LQGPR, item 4.1.13.2.

4.1.18-*Xac* $\Delta hrpB2$ +pUFR047_*hrpB2*_{T125A} secreta HrpB2_{T125A} ao espaço exterior, mas não desenvolve doença no hospedeiro

Na Figura 36, folha 1, observamos que os sintomas do cancro cítrico não são revertidos pela cepa $\Delta hrpB2$ +pUFR047_*hrpB2*_{T125A}, no hospedeiro. Crescemos culturas de *Xac*: selvagem (WT), $\Delta hrpB2$, $\Delta hrpB2$ + pUFR047_*hrpB2*_{T125A} e $\Delta hrpB2$ + pUFR047_*hrpB2*_{Q130A} (Tabela 13), a qual desenvolve todos os fenótipos de patogenicidade em citros (Figura 36, folha 6). Na Figura 38C, amostra 1, confirmamos a secreção de HrpB2 pela cepa selvagem e na amostra 2 e 3 a secreção de HrpB2_{T125A} e HrpB2_{Q130A} pelas cepas $\Delta hrpB2$ + pUFR047_*hrpB2*_{T125A} e $\Delta hrpB2$ + pUFR047_*hrpB2*_{Q130A}, respectivamente. A ausência da proteína HrpB2 na amostra 4 é esperado, já que o gene *hrpB2* encontra-se deletado na cepa *Xac* $\Delta hrpB2$.

4.2-O complexo: HpaA-HpaB-HrcV

HpaA e HpaB são proteínas codificadas pelo locus *hrp* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, (Figura 10). Em *Xcv*, HpaA possivelmente desenvolve funções de molécula efetora, onde é secretada e localizada no núcleo das células do hospedeiro, por possuir duas seqüências de localização nuclear em sua seqüência primaria, uma no N-terminal e a outra no C-terminal (Huguet *et al.*, 1998). HpaB em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, é importante para a secreção de proteínas efetoras mas não é essencial para a secreção de proteínas não efetoras, demonstrando que HpaB cumpre um papel essencial no controle do T3SS de *Xcv* (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). HrcV é uma proteína conservada de 645 aminoácidos com um domínio N-terminal integrado na membrana interna e um domínio C-terminal citosólico. Alegria *et al.* 2004, observou interações proteína-proteína “*in vivo*”, utilizando HpaA como isca em ensaios

de duplo híbrido (Bartel e Fields, 1995), onde 100% de 40 presas seqüenciadas corresponderam à proteína HpaB e quando HpaB foi utilizada como isca, de 49 clones 37 presas derivaram do gene *hpaA* e os 12 restantes do gene *hrcV* (resíduos 360 ao 645) (Figura 39).

Figura 39. Esquema da interação observada pelo sistema de duplo híbrido (Bartel e Fields, 1995), envolvendo as proteínas HpaA, HpaB e o domínio citosólico de HrcV, Alegria *et al.*, 2004.

Em base a estes resultados obtidos em nosso laboratório decidimos estudar estas proteínas em mais detalhe e tentar elucidar o significado biológico da mesma, assim como também, sua função na patogenicidade de *Xac*.

4.2.1-Expressão e purificação das proteínas HpaA_{6xHis}, HpaB e o domínio C-terminal HrcV₃₂₃₋₆₄₅

Realizou-se produção em larga escala das proteínas HpaA_{6xHis} (31,5 kDa), HpaB (17,7 kDa) e HrcV₃₂₃₋₆₄₅ (36 kDa), como descrito no item 3.1.5. Após indução das culturas, obtivemos expressão das proteínas HpaA_{6xHis}, HpaB e HrcV₃₂₃₋₆₄₅ (Figura 40A, amostra 1, 40B amostra 1 e 40C, amostra, respectivamente). Os pesos moleculares observados para as proteínas em SDS-PAGE são consistentes com os pesos moleculares esperados (Tabela 4). Após lise celular, foi verificado a expressão de HpaA_{6xHis} e HpaB em corpos de inclusão. Utilizamos uréia 8 M para solubilizar as proteínas e durante todo

o processo de purificação, como detalhado na Tabela 7. A maior parte da proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ (80% aproximadamente), foi expressa na fração solúvel e uma pequena parte em corpos de inclusão. Utilizou-se para o processo de purificação a proteína expressa na fração solúvel, como detalhado na Tabela 7. Na Figura 40A e 40B, podemos observar o grau de pureza obtido nos processos de purificação para as proteínas HpaA_{6xHis} e HpaB, as quais, foram re-enoveladas com sucessivas diálises onde foi reduzida gradualmente a concentração de uréia: 6 M, 4 M, 2 M, até atingir uma concentração final aproximada de 0 M uréia. HrcV₃₂₃₋₆₄₅ foi purificada da fração solúvel, obtendo-se um ótimo grau de pureza (Figura 40C, amostra 3). A clonagem, expressão e purificação da proteína HpaA_{6xHis} foi realizada pela pós doutora Miryam Marroquin Quelopana.

Figura 40. Indução e purificação das proteínas recombinantes HpaA_{6xHis}, HpaB e HrcV₃₂₃₋₆₄₅. SDS-PAGE 18% acrilamida **A)** PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra HpaA_{6xHis} induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3-HpaA_{6xHis} pura. **B)** PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra HpaB induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3-HpaB pura. **C)** PM-marcador de peso molecular em kDa, 1-I (amostra HrcV₃₂₃₋₆₄₅ induzida), 2-NI (amostra não induzida), 3- HrcV₃₂₃₋₆₄₅ pura. Setas e números à esquerda das figuras indicam posição e pesos moleculares.

4.2.2-HpaB forma complexos oligoméricos após re-enovelamento

Observando o grau de purificação que obteve-se da proteína HpaB (Figura 40B, amostra 3) e fazendo todos os esforços para obter um processo de purificação satisfatório, sem resultados positivos, teve-se em conta a possibilidade da proteína estar se apresentando em forma de monômero, dímero, trímero, etc..., devido à oxidação e formação de pontes dissulfeto. HpaB possui, na seqüência primária (Figura 41), duas cisteínas nas posições 14 e 118, as quais, poderiam estar formando pontes dissulfetos intermoleculares e/ou intramoleculares, apesar que em as etapas de purificação a proteína HpaB foi tratada com agente redutor (2- β -mercaptoetanol). Para testar esta hipótese preparamos duas amostras da proteína pura, para serem separadas por SDS-PAGE 18%. Ambas as amostras foram tratadas com agente redutor 2- β -mercaptoetanol. Uma delas foi submetida a banho de Maria a 100° C por 15 minutos. Na Figura 42, amostra 2, podemos observar a diminuição de bandas de pesos moleculares acima de 20 kDa e o aumento da banda monomérica de HpaB (17 kDa), após a amostra ter sido submetida a altas temperaturas, comparando com a amostra 1. HpaB estava formando complexos como dímeros, trímeros e/ou tetrâmeros a traves de pontes dissulfetos.

(1)MSSARFETIVRQM**CE**ALDLPDVQSVLSRRVLWVEGFVYLHEPTQP
DDEVQEALYLRI SYGLPPAGRTLTVYRLLEANLSVYAQDQAQLGLN
DAGVIVLIVRVPLDDDDVDGAWIC**CD**LLAHYAEHGRYWNNNIFVAHDEMF
EGIATGNYLWLRA (156)

Figura 41. Seqüência primaria da proteína HpaB. Em azul destacam-se os aminoácidos cisteína presentes na seqüência nativa.

Figura 42. Tratamento da proteína HpaB à altas temperaturas. PM: marcador de peso molecular em kDa, 1-HpaB, 2-HpaB fervida. Setas e números à esquerda das figuras indicam posição e pesos moleculares.

4.2.3-Complexos oligoméricos da proteína HpaB são confirmados por espectrometria de massas

Realizamos espectrometria de massas para a proteína HpaB pura, a qual, possui um peso molecular de 17750 Da, o que no espectro de massas (Figura 43) corresponde ao pico destacado em verde de 17567,92 Da $(M+1/1)^{1+}$. O pico de 8746,60 Da, corresponde à proteína HpaB ionizada por dois prótons, $(M+2/2)^{2+}$. Os picos de 35299,85 e 52799,9 Da (destacados em laranja e amarelo, respectivamente), correspondem ao dímero e trímero da proteína, estruturas já observadas em ensaios por SDS-PAGE (item 4.2.2). O pico de 26510,3 Da poderia corresponder a um contaminante não detectado por SDS-PAGE ou o trímero da proteína duplamente carregado $(3M+2/2)^{2+}$.

Figura 43. Espectro de massas obtido para a proteína HpaB pura.

4.2.4-Enovelamento de HpaB após retirada do agente desnaturante

Experimentos de CD (item 3.1.9.1) foram realizados para a proteína HpaB em concentração 26,47 μ M em tampão 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7. O espectro obtido (Figura 44), apresenta mínimos em 222 nm e 212 nm, exibindo a presença de α -hélice. O mínimo em 212 nm é mais intenso do que o de 222 nm, indicando a presença

de folha- β . Entre 212 nm e 220 nm aparece um mínimo, o qual é indicativo de uma mistura de estruturas α -hélice e folha- β (Fasman, 1996).

Figura 44. Dicroísmo circular da proteína HpaB 26,47 μ M. Tampão 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7 e temperatura de 25° C, caminho ótico de 0,1 mm.

4.2.5-Peso molecular de *HpaA*_{6xHis} confirmado por espectrometria de massas

Na Figura 40A, amostra 3, observamos que a proteína *HpaA*_{6xHis} apresenta uma migração em SDS-PAGE correspondente à uma proteína de aproximadamente 36 kDa. Isso é consistente com o peso teórico esperado para a proteína com uma fusão N-terminal com His tag (31,5 kDa, Tabela 4). Realizamos espectrometria de massas com *HpaA*_{6xHis} purificada, a fim de determinar exatamente seu peso molecular, o qual revelou 31,7 kDa (Figura 45, destacado em laranja), valor consistente com o peso teórico observado. O pico de 15,8 kDa observado no espectro (Figura 45), corresponde à proteína *HpaA* ionizada por dois prótons, $(M+2/2)^{2+}$.

Figura 45. Espectro de massas obtido para a proteína HpaA_{6xHis} pura.

4.2.6-HrcV₃₂₃₋₆₄₅ forma agregados em solução, após purificação

A proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ (36 kDa, Tabela 4) ao ser submetida a separação por cromatografia de exclusão molecular, utilizando colunas com resina Superdex G-75 e G-200 (Amersham Bioscience, Tabela 7), previamente calibradas, apresentou um peso molecular não correspondente a sua conformação monomérica. Este resultado indicou que a proteína estaria eluindo no volume de exclusão das colunas, onde o peso molecular aparente corresponderia ≥ 200 kDa. Quando a proteína foi tratada com uréia 8M e submetida a gel filtração Superdex G-75 e G-200, obtivemos o mesmo resultado. A natureza da agregação da proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ não foi investigada em mais detalhes. A Figura 46 mostra o cromatograma obtido para a proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅.

Figura 46. Cromatografia de exclusão molecular de purificação da proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅. Cromatograma obtido na coluna com resina Superdex G-75 (Amersham Bioscience). Sinalado em azul pico onde foi identificada HrcV₃₂₃₋₆₄₅, correspondente ao volume de eluição (Ve) 115 mL. As flechas indicam os Ve dos marcadores de peso molecular utilizados para calibrar a coluna, em idênticas condições (tampão, pH, concentração salina, temperatura, presença de agente redutor e/ou desnaturante, Tabela 7) da purificação de HrcV₃₂₃₋₆₄₅. 1, Blue Dextran 2000 kDa/Ve 120 mL; 2, Albumina sérica bovina 66 kDa/Ve 187 mL; 3, Ovoalbumina 43 kDa/Ve 205 mL; 4, Quimiotripsina A 25 kDa/Ve 230 mL; 5, Ribonuclease A 13,7 kDa/Ve 246 mL. *Peso monomérico de HrcV₃₂₃₋₆₄₅ 36 kDa.

4.2.7-Produção e teste de especificidade de soro policlonal anti-HpaB

Produzimos anticorpos específicos contra a proteína HpaB utilizando camundongos Swiss Webster, fêmeas. Realizaram-se quatro imunizações, de 10 µg de proteína pura cada uma, com um intervalo de uma semana entre cada inoculação, como detalhado no item 3.2. O soro policlonal anti-HpaB foi posteriormente limpo utilizando o protocolo descrito no item 3.2.1. Realizamos ensaios de “Western Blot” (item 3.2.2) para analisar a especificidade do soro policlonal pela proteína HpaB, (Figura 47B). Utilizamos amostra I (induzida) e NI (não induzida) (item 3.1.5) da proteína, como controle negativo e de especificidade. Na Figura 47B, amostra 3 e 4, mostramos a interação específica do anticorpo anti-HpaB pela proteína pura e pura submetida a

fervura por 15 minutos, respectivamente, podendo afirmar, mediante o reconhecimento do soro policlonal anti-HpaB, a presença de complexos diméricos, trímeros e quaternários já observados em ensaios de espectrometria de massas (item 4.2.3). Na Figura 47B, amostra 1 (induzida), podemos observar como a proteína HpaB é reconhecida especificamente entre muitas proteínas provenientes de *E. coli*. Como esperado, na amostra 2 (não induzida), o anticorpo anti-HpaB não interagiu nem reconheceu outra proteína. Podemos apreciar um ótimo grau de especificidade do anticorpo produzido contra a proteína HpaB.

Figura 47. “Western blot” determinando a especificidade do soro policlonal obtido contra a proteína HpaB. Massa teórica 17 kDa. **A)** SDS-PAGE 18% corado com coomassie blue. **B)** placa auto-radiográfica revelada com kit ECL (Amersham). Amostras: PM-marcador de peso molecular em kDa, lisados de *E. coli* antes (amostras 2) e depois (amostras 1) da indução da proteína HpaB, proteína HpaB pura (amostras 3), proteína HpaB pura após fervura e na presença de β -mercaptoetanol (amostras 4). Diluição do soro anti-HpaB utilizado, 1:10000.

4.2.8-Detecção das interações HpaA-HpaB-HrcV₃₂₃₋₆₄₅ *in vitro*

Como já detalhado no item 4.2, nosso laboratório detectou interações específicas entre as proteínas HpaA-HpaB e HpaB-HrcV em ensaios de duplo híbrido (Alegria *et al.*, 2004, Figura 39). Para comprovar estas interações “*in vitro*”, produzimos, purificamos as proteínas recombinantes e desenvolvemos, com elas, ensaios de interações proteína-proteína “*in vitro*”. Também produzimos nocautes dos genes e realizamos ensaios “*in vivo*”, no hospedeiro, para determinar a contribuição individual das proteínas na patogenicidade de *Xac* (item 4.2.9).

4.2.8.1-Interação das proteínas HpaA_{6xHis}-HpaB mediante ensaios de “Far-Western blot”

(Este experimento foi realizado em colaboração com a pós doutora Miryam Marroquin Quelopana)

Para testar a interação entre as proteínas HpaA_{6xHis}-HpaB por “Far-Western blot”(item 3.3.1), a proteína HpaB foi submetida a eletroforese SDS-PAGE 18% e transferida para membrana de nitrocelulose, para posterior incubação com 20 µg/ml da proteína HpaA_{6xHis} (amostra 1, Figura 48) e outra com 20 µg/ml da proteína Hpt_{6xHis} (domínio C-terminal da proteína RpfC, cedida pelo doutorando Maxuel Andrade, como controle negativo, amostra 4, Figura 48). Para detectar a proteína HpaA_{6xHis} neste ensaio, utilizamos anticorpo específico contra calda de histidinas, anti-6xHis (SIGMA, diluição 1:6000) (Tabela 4 e item 4.2.5). A proteína HpaB não é reconhecida pelos anticorpos anti-6xHis (amostra 2, Figura 48) nem pelo anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (amostra 3, Figura 48). Como controle positivo da especificidade dos anticorpos usados no experimento se utilizou a HpaA_{6xHis} (amostra 5, Figura 48). Com os resultados obtidos neste ensaio podemos concluir que a proteína HpaA_{6xHis} interage com a proteína HpaB de modo específico. Para demonstrar que HpaB não interage inespecificamente com a calda de histidinas presente na proteína recombinante HpaA_{6xHis}, utilizamos como controle negativo a proteína Xac Hpt_{6xHis} pura, obtendo ausência de interação inespecífica.

Figura 48. “Far-Western blot” das proteínas HpaA_{6xHis}-HpaB. A proteína HpaB foi submetida a eletroforese e transferida a membrana de nitrocelulose. Amostras: 1-HpaB pura imobilizada e incubada com a proteína HpaA_{6xHis} em solução, 2-HpaB pura imobilizada e incubada com os anticorpos anti-6xHis e anti-IgG mouse conjugado com peroxidase, 3-HpaB pura imobilizada e incubada com o anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase, 4-HpaB pura imobilizada incubada com a proteína Hpt_{6xHis}, controle negativo, 5-HpaA_{6xHis} pura imobilizada e incubada com os anticorpos anti-6xHis e anti-IgG mouse conjugado com peroxidase, controle positivo da reação.

4.2.8.2-Interação das proteínas HpaA_{6xHis}-HpaB mediante ensaios de “Pull down”

(Este experimento foi realizado em colaboração com a pós doutora Miryam Marroquin Quelopana)

Utilizamos o ensaio de “Pull down” para detectar a interação HpaA_{6xHis}-HpaB. HpaA_{6xHis} foi imobilizada numa coluna de afinidade de Ni²⁺ para testar a capacidade de reter a proteína HpaB. A proteína HpaA_{6xHis} foi eluída da resina de Ni²⁺ em complexo com HpaB (Eluído1, Figura 49B). Podemos observar que HpaB sozinha não interage significativamente com a resina (Eluído 2, Figura 49B) e saiu quase completamente nas lavagens, (FT 2, Figura 49B). BSA (albumina sérica bovina) foi usada como controle negativo e não interagiu com a proteína HpaA_{6xHis} (Eluido 3, Figura 49B) e saiu completamente nas lavagens (FT 3, Figura 49B).

Figura 49. “Pull down” das proteínas HpaA_{6xHis}-HpaB. **A)** SDS-PAGE 18% das proteínas utilizadas no experimento. Amostras: M: marcador de peso molecular, HpaB: proteína HpaB pura, HpaA_{6xHis}: proteínas HpaA_{6xHis} e BSA (albumina sérica bovina). **B)** “Pull down” das misturas. FT, material não aderido na resina Ni²⁺-chelating Sepharose (Amersham Bioscience): FT1: HpaA_{6xHis} e HpaB puras, FT2: HpaB pura, FT3: HpaA_{6xHis} e BSA (controle negativo:). Eluído, material eluído com 500 mM de imidazol (após lavagem com 40 mM de imidazol). Eluído 1: HpaA_{6xHis} em complexo com a proteína HpaB, Eluído 2: proteína HpaB não retida na resina, Eluído 3: HpaA_{6xHis} sem reter BSA.

4.2.8.3-Interação das proteínas HpaB-domínio C-terminal HrcV₃₂₃₋₆₄₅ mediante ensaios de “Far-Western blot”

A interação entre as proteínas HpaB e HrcV₃₂₃₋₆₄₅ de *Xac* foi analisada em experimentos de “Far-Western blot” (item 3.3.1). A proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ foi submetida a eletroforese SDS-PAGE (18%) e transferida para uma membrana de nitrocelulose (Figura 50A, amostras 2-4). Uma membrana, contendo a proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅, foi incubada com a proteína HpaB em solução e HpaB ligada foi detectada com antisoro anti-HpaB, demonstrando a interação positiva entre as proteínas (Figura 50B, amostra 2). Como controle negativo outras amostras da proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅, foram incubadas com o anticorpo anti-HpaB (1:10000), e com anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase. A proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅, como esperado, não foi reconhecida pelos anticorpos (Figura 50B, amostras 3 e 4, respectivamente). Um controle de detecção da proteína HpaB pelos anticorpos usados no experimento, como controle positivo da reação, também foi incluído (Figura 50B, amostra 1). Com os resultados obtidos neste ensaio podemos dizer que a proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ interage com a proteína HpaB de maneira específica.

Figura 50. Interação entre as proteínas HpaB-HrcV₃₂₃₋₆₄₅ por ensaio de “Far-Western blot”. **A)** Membrana de nitrocelulose corada com corante Ponceau após a transferência das proteínas. PM: marcador de peso molecular em kDa, 1: Proteína HpaB pura, 2-4: Proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ pura. **B)** Placa auto-radiográfica revelado com kit ECL (Amersham). 1: Proteína HpaB pura, incubada com os anticorpos anti-HpaB e anti-IgG mouse conjugado com peroxidase, 2: Proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ incubada com a proteína HpaB em solução e os anticorpos anti-HpaB e anti-IgG mouse conjugado com peroxidase, 3-Proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ incubada com os anticorpos anti-HpaB e anti-IgG mouse conjugado com peroxidase, 4-Proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅ incubada com o anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase.

4.2.8.4- “Far-Western blot” para detectar a existência do complexo ternário HpaA_{6xHis}-HpaB-domínio C-terminal HrcV₃₂₃₋₆₄₅

As interações específicas observadas entre HpaA_{6xHis}-HpaB e HpaB-HrcV₃₂₃₋₆₄₅ levaram à hipótese de um possível complexo ternário das proteínas durante a interação das mesmas. Ou seja, sabemos que HpaB interage com HrcV₃₂₃₋₆₄₅ e com HpaA_{6xHis}, mas não sabemos se as duas interações HpaB-HpaA_{6xHis} e HpaB-HrcV₃₂₃₋₆₄₅ podem ocorrer simultaneamente formando um complexo ternário. Para testar esta hipótese decidimos realizar um experimento de “Far-western blot” (item 3.3.1) entre as três proteínas, onde imobilizamos HrcV₃₂₃₋₆₄₅ na membrana de nitrocelulose, incubamos com uma mistura de HpaA_{6xHis} e HpaB equimolar e logo detectamos a possível interação, utilizando tanto soro policlonal anti-HpaB como anti-HpaA_{6xHis} (produzido pela pós doutora Miryam Marroquin Quelopana). Na Figura 51B podemos observar que neste experimento não tivemos indícios da existência do complexo ternário (pistas 11 e 13 da Figura 51B). Observamos uma interação entre HpaB e HrcV (pista 7 da Figura 51B) mas não observamos uma interação direta entre HpaA_{6xHis} e HrcV₃₂₃₋₆₄₅ (pista 9 da Figura 51B). Estes resultados aparentemente indicam, que nestas condições

experimentais, a interação de HpaB com HrcV₃₂₃₋₆₄₅ é incompatível com sua interação com a proteína HpaA_{6xHis} (comparar pistas 11 e 13 da Figura 51B).

Figura 51. “Far-Western Blot” para detectar a existência de um complexo ternário entre as proteínas HpaA_{6xHis}-HpaB-HrcV₃₂₃₋₆₄₅. **A)** Migração em SDS-PAGE 18% das amostras submetidas à transferência numa membrana de nitrocelulose. **B)** Placa auto-radiográfica revelado com kit ECL (Amersham). Amostras: PM: marcador de peso molecular em kDa, lisados de *E. coli* antes (amostras 2, 5, 8, 10, 12 e 14) e depois (amostras 1, 4, 7, 9, 11 e 13) da indução da proteína HrcV₃₂₃₋₆₄₅, proteína HpaB pura (amostras 3), proteína HpaA_{6xHis} pura (amostras 6). Diluição dos anticorpos utilizados: anti-HpaB 1:10000, anti-HpaA_{6xHis} 1:5000 e anti-IgG conjugado com peroxidase 1:6000.

4.2.9-HpaB e HpaA contribuem na patogenicidade de *Xac*, diminuindo sintomas da doença

Testes de patogenicidade em planta de laranjeira pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram realizados, para testar a contribuição individual das proteínas HpaB e HpaA na patogenicidade de *Xac*. Culturas das cepas *Xac* WT, $\Delta hpaB$, $\Delta hpaA$, $\Delta hpaB$ +pKX33_ *hpaB* e $\Delta hpaA$ +pUFR047_ *hpaA*, foram crescidas e infiltradas dentro da superfície abaxial das folhas, como detalhado no item 3.6. Na Figura 52A podemos observar que *Xac* $\Delta hpaB$, apresentou fenótipos da doença significativamente atenuados, causando necroses durante a infecção, mas com perda da hiperplasia nas folhas, sintoma recuperado na cepa que carrega a complementação de HpaB. *Xac* $\Delta hpaA$, não demonstrou afetar notoriamente a doença, percebe-se uma leve diminuição dos sintomas

de hiperplasia e pouco desenvolvimento de necrosis, enfatizados de maneira mais clara na cepa selvagem e na cepa de complementação, carregando o gene *hpaA* (Figura 52B). As cepas mutantes para o gene *hpaB* e sua respectiva complementação, foram produzidas pela pós doutora Miryam Marroquin Quelopana.

Figura 52. Teste de patogenicidade para as proteínas HpaB (A) e HpaA (B) em plantas hospedeiras de laranja pêra. As fotos foram obtidas aos 25 dias após infecção. Amostras: *Xac* selvagem (WT), $\Delta hpaB$, $\Delta hpaB$ +pKX33_ *hpaB* ($\Delta hpaB$ +*hpaB*), $\Delta hpaA$, $\Delta hpaA$ +pUFR047_ *hpaA* ($\Delta hpaA$ +*hpaA*).

4.2.10-O crescimento da cepa $\Delta hpaB$ no hospedeiro é comprometido

A Figura 52A mostra que a cepa $\Delta hpaB$ não foi capaz de extinguir a patogenicidade de *Xac*, apesar de alterar notoriamente os sintomas do desenvolvimento da doença. Realizou-se então, com a colaboração do Dr. Julio Cezar Oliveira da UNESP em Jaboticabal, uma curva de crescimento “*in vivo*” para *Xac* WT, *Xac* $\Delta hpaB$ e $\Delta hpaB$ +pKX33_ *hpaB*, com o objetivo de monitorar o crescimento da cepa mutante no hospedeiro, comparado com *Xac* WT. Na Figura 53A vemos que realmente o crescimento de *Xac* $\Delta hpaB$ na planta está comprometido.

Em seguida monitoramos o crescimento do mutante *Xac* $\Delta hpaB$ em meio líquido, para estabelecer se o retardo no crescimento em planta não está se devendo a uma deficiência da cepa para se multiplicar. Realizamos uma curva de crescimento em meio M9 (item 3.7), suplementado com extrato de levedura. Coletamos pontos de DO₆₀₀

a cada duas horas. Na Figura 53B podemos observar que estas três cepas crescem muito similares, não apresentando nenhuma diferencia notória entre elas. Podemos afirmar então que a cepa que carrega a deleção para a proteína HpaB está involucrada na patogenicidade de *Xac*, causando levemente necrose mas não hiperplasia e apresentando um crescimento diminuído no hospedeiro, quando comparada com a cepa selvagem.

Figura 53. Monitoramento do crescimento da cepa $\Delta hpaB$ no hospedeiro e “in vitro”. **A)** Unidades formadoras de colônia (CFU) de cepas de *Xac* por cm^2 de tecido de folha de laranja, durante os primeiros quatorze dias após inoculação. **B)** Curva de crescimento em meio líquido M9 (item 3.7). Amostras: WT: *Xac* selvagem, $\Delta hpaB$: mutante para *hpaB* e $\Delta hpaB + pKX33_hpaB$: mutante para *hpaB* carregando a carregando o gene *hpaB*. O ensaio foi realizado em triplicatas e as barras de erro representam a desviação estandar.

4.2.11-HpaB é necessária para a secreção das proteínas HpaA e HrpB2

Após termos obtido os mutantes para os genes *hpaB* e *hpaA* e analisado suas contribuições na patogenicidade de *Xac*, desejávamos estabelecer se HpaA era secretada na ausência de HpaB, detectando HpaA em culturas de *Xac*, utilizando anticorpos específicos para HpaA (produzido pela pós doutora Miryam Marroquin Quelopana). Crescemos culturas de *Xac* (cepa selvagem, $\Delta hpaB$ e $\Delta hpaB$ +pKX33_*hpaB*), como descrito no item 3.7. A fração das proteínas secretadas foi submetida a SDS-PAGE 18%, transferida a membrana de nitrocelulose e incubadas com anti-HpaA (1:300), logo anti-IgG mouse conjugado com fosfatase alcalina (1:10000) e revelado com os reagentes B-CIP e NBT (item 3.2.2). Na Figura 54A podemos observar a presença de HpaA na amostra de proteínas secretadas nas cepas de *Xac* WT (amostra 1) e complementação do mutante *hpaB* (amostra 3) mas não observamos HpaA extracelular na cepa *Xac* $\Delta hpaB$ (amostra 2), demonstrando a proteína HpaB é necessária para a secreção de HpaA.

Decidimos testar se HpaB era fundamental para a secreção de outras proteínas do T3SS de *Xac*. HrpB2 é uma proteína secretada pelo T3SS de *Xac* (item 4.1.15). Então escolhemos ela para avaliar a sua secreção na ausência do gene *hpaB*. Na Figura 54B, observamos que HrpB2 não é secretada na cepa mutante para o gene *hpaB* (amostra 2), sendo sua secreção restaurada na cepa $\Delta hpaB$ +pKX33_*hpaB* (Tabela 13), (amostra 3). A secreção de HrpB2 não é afetada na cepa onde o gene *hpaA* encontra-se deletado (amostra 4).

Figura 54. HpaB é necessária para a secreção das proteínas HpaA e HrpB2. Culturas de *Xac* foram crescidas e a fração das proteínas secretadas foi recuperada, para serem concentradas, separadas por SDS-PAGE 18% e transferidas a membranas de nitrocelulosa. **A)** A proteína HpaA foi detectada utilizando anti-HpaA e anti-IgG mouse conjugado com fosfatase alcalina. Amostras 1: *Xac* selvagem, 2: *Xac* $\Delta hpaB$, 3: $\Delta hpaB$ +pKX33_ *hpaB*. **B)** A proteína HrpB2 foi detectada utilizando anti-HrpB2 e anti-IgG mouse conjugado com peroxidase. Amostras 1: *Xac* selvagem, 2: *Xac* $\Delta hpaB$, 3: $\Delta hpaB$ +pKX33_ *hpaB* e 4: *Xac* $\Delta hpaA$.

4.3-O complexo: HrpD6-HrpB1-HrpW

Nosso laboratório, pelo sistema de duplo híbrido detectou as interações entre as proteínas HrpD6-HrpB1 e HrpB1-HrpW (Alegria *et al.*, 2004). HrpB1 e HrpD6 são proteínas pequenas de 130 e 80 aminoácidos, respectivamente, citosólicas e que possuem proteínas homólogas em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (Rossier *et al.*, 2000). Além da interação HrpB1-HrpD6 também foi observada a interação de HrpB1 com a proteína HrpW (Alegria *et al.*, 2004). O gene *hrpW*, que codifica uma harpina com domínio de pectato liase, é secretada pela T3SS de *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae* e contribui para o desenvolvimento das doenças fogo bacteriano das pomáceas e mancha aureolada, causadas respectivamente pelos patógenos citados acima (Charkowski *et al.*, 1998; Kim e Beer, 1998). “Knock-outs” do gene *hrpW* em *Erwinia amylovora* demonstrou reter a habilidade da bactéria para elicitar HR em

plantas resistentes e causar doença em plantas susceptíveis (Gaudriault *et al.*, 1998). O gene *hrpW* não está localizado no locus *hrp* de *Xac*.

Para estudar estas interações, produzimos as proteínas recombinantes, purificamos e desenvolvemos, com elas, ensaios de interações proteína-proteína “*in vitro*”. Também produzimos nocautes dos genes e realizamos ensaios *in planta*, no hospedeiro, para determinar a contribuição individual das proteínas na patogenicidade de *Xac*.

4.3.1-Expressão e purificação da proteína HrpD6_{6xHis}

Realizou-se produção em larga escala da proteína HrpD6_{6xHis} (9,925 kDa), como descrito no item 3.1.5. Após indução da cultura, obtivemos a expressão de uma proteína com peso molecular aparente 6,5 kDa em SDS-PAGE (Figura 55A, amostra 2 e 4). Este peso molecular não é consistente com o peso molecular esperado para HrpD6_{6xHis} (Tabela 4). Após lise celular, foi verificada a expressão de HrpD6_{6xHis} em corpos de inclusão. Utilizamos uréia 8 M para solubilizar a proteína e durante todo o processo de purificação, como detalhado na Tabela 7. HrpD6_{6xHis} foi purificada, como observamos na Figura 55B, amostra 1 e 2. O re-enovelamento da proteína foi realizado com sucessivas diálises, onde a concentração de uréia foi reduzida gradualmente: 6 M, 4 M, 2 M, até atingir uma concentração final de 0 M uréia.

Por espectrometria de massas foi confirmado o correto peso molecular de HrpD6_{6xHis} pura em 10013 Da (Figura 55C).

Figura 55. Indução e purificação da proteína recombinante HrpD6_{6xHis}. **A)** Migração em SDS-PAGE 18% dos lisados de *E. coli* antes (amostras 1 e 3) e depois (amostras 2 e 4) da indução da proteína HrpD6_{6xHis}. **B)** Migração em SDS-PAGE 18% da proteína HrpD6_{6xHis} pura (amostras 1 e 2). **C)** Espectrometria de massas de HrpD6_{6xHis} pura, destacado em laranja pico de 10013 Da, correspondente ao peso molecular da proteína, pico de 5021 Da corresponde à proteína HrpD6_{6xHis} ionizada por dois prótons, $(M+2/2)^{2+}$. PM: marcador de peso molecular em kDa.

4.3.2-Expressão e purificação da proteína HrpW

Realizou-se produção em larga escala da proteína HrpW (peso molecular teórico de 35,902 kDa), como descrito no item 3.1.5. Após indução da cultura, obtivemos a expressão de uma proteína de aproximadamente 36 kDa (Figura 56A, amostra 2 e 4). Esta observação é consistente com o peso molecular esperado para HrpW (Tabela 4). Após lise celular, foi verificada a expressão de HrpW em corpos de inclusão. Utilizamos uréia 8 M para solubilizar a proteína e durante todo o processo de purificação, como detalhado na Tabela 7. HrpW foi purificada, como observamos na Figura 56B, amostras eluídas da cromatografia por exclusão molecular, utilizando resina Superdex G-200: HrpW G-200. O re-enovelamento da proteína foi realizado com sucessivas diálises, onde a concentração de uréia foi reduzida gradualmente: 6 M, 4 M, 2 M, até atingir uma concentração final aproximada de 0 M uréia. Por espectrometria de massas foi confirmado o molecular de HrpW pura em 36004 Da (Figura 56C).

Figura 56. Indução e purificação da proteína recombinante HrpW. **A)** Migração em SDS-PAGE 18% dos lisados de *E. coli* antes (amostras 1 e 3) e depois (amostras 2 e 4) da indução da proteína HrpW. **B)** Migração em SDS-PAGE 18% das frações da proteína HrpW eluídas após cromatografia por exclusão molecular, utilizando resina Superdex G-200 (Amersham Bioscience) (amostras HrpW G-200). Lisado de *E. coli* antes (amostra 1) e depois (amostra 2) da indução da proteína HrpW **C)** Espectrometria de massas de HrpW pura, destacado em laranja pico de 36004 Da, correspondente ao peso molecular da proteína. PM: marcador de peso molecular em kDa.

4.3.3-Expressão e purificação da proteína HrpB1

A clonagem, expressão e purificação da proteína HrpB1 (peso molecular teórico de 16,1 kDa, Tabela 4), assim como também ensaios de caracterização da proteína, foram realizados pelo doutorando Diorge Paulo de Souza, quem cedeu a informação e Figuras para a descrição deste item.

HrpB1 foi expressa em corpos de inclusão, fato pelo qual utilizou-se uréia 8 M para solubilizar a proteína e durante todo o processo de purificação, como detalhado na Tabela 7. Na Figura 57A mostra-se as frações eluídas da cromatografia por exclusão molecular, utilizando resina Superdex G-200, onde HrpB1 foi purificada. O re-novelamento da proteína foi realizado com sucessivas diálises, onde a concentração de uréia foi reduzida gradualmente: 6 M, 4 M, 2 M, até atingir uma concentração final de 0 M uréia. Por espectrometria de massas foi confirmado o correto peso molecular de HrpB1 pura em 16171 Da (Figura 57B).

Figura 57. Purificação de HrpB1 analisadas por SDS-PAGE 18% e espectrometria de massa. **A)** Migração em SDS-PAGE 18% das frações da proteína HrpB1 eluídas após cromatografia por exclusão molecular, utilizando resina Superdex G-200 (Amersham Bioscience) (amostras HrpB1 G-200). Frações de HrpB1 puras (amostras 1 e 2). **B)** Espectrometria de massas de HrpB1 pura, destacado em laranja pico de 16171 Da, correspondente ao peso molecular da proteína. Pico destacado em azul, possível dímero da proteína HrpB1, 32219 Da. Setas e números à esquerda da figura, indicam o marcador de peso molecular em kDa.

4.3.4-Análise por CD das proteínas *HrpD6_{6xHis}*, *HrpB1* e *HrpW*

Experimentos de CD foram realizados (em conjunto com o doutorando Diorge Paulo de Souza) para as proteínas HrpB1, HrpW e HrpD6_{6xHis}, em concentrações de 10 μ M, tampão 5 mM Tris-HCl, pH 8 e temperatura de 20° C. Os espectros obtidos apresentam-se na Figura 58. Analisando os resultados obtidos e utilizando o programa disponível na web K2d (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>) (Andrade *et al.*, 1993), obtivemos estimativas do conteúdo de estruturas secundárias nestas proteínas, dando como resultado os seguintes valores: HrpB1, α -hélice 29%, folha- β 15% e estrutura randômica 56%, HrpD6_{6xHis}, α -hélice 24%, folha- β 26% e estrutura randômica 51%. HrpW, α -hélice 8%, folha- β 45% e estrutura randômica 48%, demonstrando a existência de estruturas secundárias nas enovelações adotadas após a retirada do agente desnaturante, uréia.

Figura 58. Dicroísmo circular para as proteínas HrpB1, HrpD6_{6xHis} e HrpW. Todas as proteínas foram utilizadas em concentração de 10 μ M, temperatura 20° C e tampão 5 mM Tris-HCl, pH 8, caminho ótico de 0,1 mm. Em azul mostra-se os espectros de elipticidade molar para a proteína HrpB1, em rosa para a proteína HrpD6_{6xHis} e em laranja para a proteína HrpW.

4.3.5-Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) para a proteína HrpD6_{6xHis}

Para a proteína HrpD6_{6xHis} decidimos realizar estudos estruturais por RMN já que a mesma possui as características desejadas: pequena (90 aminoácidos), peso molecular baixo suficiente para ser estudada por esta técnica (10 kDa, aproximadamente) e encontra-se em solução após a purificação e a retirada do agente desnaturante, uréia. Em conjunto com o pós-doutor Roberto Kopke Salinas, produzimos a proteína marcada isotopicamente com ^{15}N , como já foi descrito no item 3.1.5.1.

Concentrações de amostras ideais para trabalhar em RMN de proteínas compreendem entre 0,5 mM e 1 mM, entretanto HrpD6_{6xHis} apresentou problemas de precipitação ao aumentar sua concentração e conseguimos uma solução de concentração máxima 0,3 mM. O primeiro espectro de ^{15}N -HSQC (heteronuclear single quantum correlation; Bodenhausen e Ruben, 1980) (Figura 59A) foi obtido nas seguintes condições: ^{15}N HrpD6_{6xHis} 0,3 mM, 10 mM Fosfato de Sódio pH 7, 25° C.

O espectro de (^1H - ^{15}N) HSQC mostra um pico para cada ligação NH presente na proteína, de modo que deveríamos observar um pico para cada aminoácido exceto prolina e dois picos extras para as cadeias laterais de Asn, Gln e, eventualmente, His. No entanto, conseguimos detectar 59 picos dos 89 esperados (HrpD6_{6xHis} possui 90

aminoácidos, considerando os aminoácidos em fusão provenientes do vetor de expressão (Tabela 4) (Figura 60) contendo uma prolina na posição 34. Obtivemos um segundo espectro mudando as condições para: $^{15}\text{NHrpD6}_{6\text{xHis}}$ 0,3 mM, 25° C, 5 mM Acetato de Sódio pH 5, onde conseguimos detectar 79 picos dos 89 esperados (Figura 59B). Porém, observamos baixa dispersão dos sinais na dimensão correspondente a 1H. Esta baixa dispersão pode ser devido a presença de regiões desestruturadas ou a um alto conteúdo de α -hélice (ou ambos).

Figura 59. Espectros de ^{15}N -HSQC para a proteína $^{15}\text{NHrpD6}_{6\text{xHis}}$. **A)** $^{15}\text{NHrpD6}_{6\text{xHis}}$ 0,3 mM, 25° C, 10 mM Fosfato de sódio, pH 7. **B)** $^{15}\text{NHrpD6}_{6\text{xHis}}$ 0,3 mM, 25° C, 5 mM Acetato de sódio, pH 5.

(1)MHHHHHHLETFMFDAMTDTVTQDMSKILQTKAADPSGERLRNLEAALDATA
QQIRVRWSAASDQTSRNDFNVAHDGITAARNIVAHAGMS (90)

Figura 60. Sequência primária da proteína HrpD6_{6xHis}. Marcado em azul sequência dos aminoácidos em fusão provenientes do vetor de expressão do vetor (Tabela 4). Destacado em verde posição 34, ocupada por a prolina indetectável em experimentos de RMN.

4.3.6-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína HrpD6_{6xHis}

Decidimos obter um soro policlonal que seja capaz de reconhecer e interagir especificamente com a proteína HrpD6_{6xHis}. Para a produção do soro policlonal anti-

HrpD6_{6xHis}, utilizamos coelhos NZB, machos. Realizaram-se quatro imunizações, de 200 µg de proteína cada uma, com um intervalo de uma semana entre cada inoculação, como detalhado no item 3.2. O soro foi limpo segundo protocolo descrito no item 3.2.1. Realizamos ensaios de “*Western blot*” (item 3.2.2), testando a especificidade do nosso soro policlonal anti-HrpD6_{6xHis}, utilizando culturas de *E. coli* induzidas e não induzidas (item 3.1.5) da proteína, assim também como a proteína pura. Na Figura 61 podemos observar que nosso soro policlonal é capaz de reconhecer especificamente a proteína HrpD6_{6xHis} (amostra 3), não só no estado puro, como também na amostra induzida (amostra 1), onde nossa proteína encontra-se no meio de inúmeras proteínas de *E. coli*. Como esperávamos, na amostra não induzida (NI), HrpD6_{6xHis} não foi detectada por nosso anticorpo anti-HrpD6_{6xHis}, demonstrando uma ótima especificidade do soro policlonal.

Figura 61. “*Western blot*” confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrpD6_{6xHis}. Amostras: Lisado de *E. coli* antes (amostras 1) e depois (amostras 2) da indução de HrpD6_{6xHis}, 3-HrpD6_{6xHis} pura. O soro policlonal anti-HrpD6_{6xHis} foi utilizado numa diluição 1:5000. A seta e numero à esquerda da figura, mostra o peso molecular em kDa.

4.3.7-Interação proteína-proteína, HrpD6_{6xHis}-HrpB1-HrpW

4.3.7.1-Interação das proteínas HrpB1-HrpD6_{6xHis} mediante ensaios de “*Far Western blot*”

Para testar a interação entre as proteínas HrpD6_{6xHis} e HrpB1 por “*Far-Western blot*”(item 3.3.1), a proteína HrpB1 foi submetida a eletroforese SDS-PAGE 18% e transferida a membrana de nitrocelulose para ser incubada com a proteína HrpD6_{6xHis} em solução (50 µg/mL, item 3.3.1). Para detectar a interação entre as proteínas, foi utilizado soro policlonal anti-HrpD6_{6xHis} (1:5000) e anti-IgG de coelho conjugado com

fosfatase alcalina (1:10000) e revelado com os reagentes B-CIP e NBT (item 3.2.2). A Figura 62 mostra o resultado positivo da interação HrpD6_{6xHis}-HrpB1 detectada (amostra 4), previamente identificada em nosso laboratório (Alegria *et al.*, 2004). Este experimento foi realizado em colaboração com o doutorando Diorge Paulo de Souza.

Figura 62. “Far-Western blot” das proteínas HrpB1-HrpD6_{6xHis}. A proteína HrpB1 foi submetida a eletroforese e transferida a membrana de nitrocelulose. Amostras: 1-HrpD6_{6xHis} pura, imobilizada e incubada com os anticorpos anti-HrpD6_{6xHis} e anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina, 2-HrpB1 pura, imobilizada e incubada com os anticorpos anti-HrpD6_{6xHis} e anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina, 3-HrpB1 pura, imobilizada e incubada com o anticorpo anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina, 4-HrpB1 pura, imobilizada e incubada com a proteína HrpD6_{6xHis} em solução e com os anticorpos anti-HrpD6_{6xHis} e anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina. O ensaio foi revelado com os reagentes B-CIP e NBT.

4.3.7.2-Interação das proteínas HrpB1-HrpW mediante ensaios de “Far-Western blot”

Para testar a interação entre as proteínas HrpW e HrpB1 por “Far-Western blot”(item 3.3.1), a proteína HrpW foi submetida a eletroforese SDS-PAGE 18% e transferida a membrana de nitrocelulose para ser incubada com a proteína HrpB1 em solução (50 µg/mL, item 3.3.1). Para detectar a interação entre as proteínas, foi utilizado soro policlonal anti-HrpB1 (1:500, produzido pelo doutorando Diorge Paulo de Souza) e anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:10000) e revelado com os reagentes B-CIP e NBT (item 3.2.2). A Figura 63 mostra o resultado positivo da interação HrpW-HrpB1 detectada (amostra 1), previamente identificada em nosso laboratório (Alegria *et al.*, 2004). Este experimento foi realizado em colaboração com o doutorando Diorge Paulo de Souza.

Figura 63. “Far-Western blot” das proteínas HrpB1-HrpW. A proteína HrpW foi submetida a eletroforese e transferida a membrana de nitrocelulose. Amostras: 1-HrpW pura, imobilizada e incubada com a proteína HrpB1 em solução e com os anticorpos anti-HrpB1 e anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina, 2-HrpW pura, imobilizada e incubada com o anticorpo anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina, 3-HrpB1 pura, imobilizada e incubada com os anticorpos anti-HrpB1 e anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina, 4-HrpW pura, imobilizada e incubada com os anticorpos anti-HrpB1 e anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina. O ensaio foi revelado com os reagentes B-CIP e NBT.

4.3.7.3-Interação das proteínas HrpD6_{6xHis}-HrpB1 mediante ensaios de “Pull down”

A interação “*in vitro*” entre as proteínas HrpB1-HrpD6_{6xHis} foi confirmada por ensaios de “Far western blot” (item 4.3.7.1, Figura 62). Tendo em conta que a proteína HrpD6_{6xHis} foi clonada em fusão com uma calda de histidinas no N-terminal (Tabela 4, Figura 60), podemos imobilizar a proteína numa coluna de afinidade de Ni²⁺, e testar a capacidade da mesma reter a proteína HrpB1, num ensaio de “Pull down” (item 3.3.2).

Para o ensaio, incubamos a proteína HrpD6_{6xHis} com a resina de Ni²⁺, realizamos diversas lavagens e eluímos com 500 mM de imidazol (Figura 64, amostra E1, controle positivo da interação da proteína HrpD6_{6xHis} com a resina), podendo afirmar que HrpD6_{6xHis} fica imobilizada na resina. O mesmo procedimento foi realizado com a proteína HrpB1, observando que a mesma não interage com a resina e foi descartada completamente nas lavagens (Figura 64, amostra E2). Na amostra E4 da Figura 64, foi testada a mistura equimolar entre as proteínas (HrpD6_{6xHis} e HrpB1) com a resina de Ni²⁺, podendo observar que a proteína HrpD6_{6xHis} foi eluída da resina em complexo com HrpB1 (amostra E4).

Uma amostra de lisado de bactéria *E.coli* (Figura 64, amostra 4), foi incubado com a resina de Ni^{2+} , demonstrando que não existem interações significantes entre o lisado e a resina (amostra E3), de maneira que, o mesmo lisado de *E.coli* foi misturado com proteína HrpD6_{6xHis}, e a mistura foi incubada com a resina de Ni^{2+} , com a finalidade de confirmar a ausência de interações inespecíficas com a proteína HrpD6_{6xHis} (amostra E5). Foi usado como um segundo controle negativo a proteína pertencente ao sistema IV de secreção de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, VirB7_{6xHis} (produzida por Diorge Paulo Souza) para comprovar que a interação HrpD6_{6xHis}-HrpB1 é genuína, e que a proteína HrpB1 não esteja simplesmente interagindo com a cauda de histidina da proteína HrpD6_{6xHis}. Podemos observar na amostra E6, a interação positiva da proteína VirB7_{6xHis} com a resina. Na amostra E7, foram incubadas as proteínas HrpB1 e VirB7_{6xHis}, em concentrações iguais, podemos notar que a proteína VirB7_{6xHis} não conseguiu reter HrpB1. Tendo em conta nossos dados experimentais podemos afirmar a interação “*in vitro*” específica entre as proteínas HrpD6_{6xHis}-HrpB1.

Figura 64. Ensaio de “Pull down” para determinar interação entre as proteínas HrpD6_{6xHis}-HrpB1. Migração em SDS-PAGE 18%. Amostras: PM (peso molecular em kDa), 1: proteína HrpD6_{6xHis} pura, 2: proteína HrpB1 pura, 3: mostra da migração das proteínas HrpD6_{6xHis} e HrpB1 juntas, 4: lisado de bactéria *E. coli*, 5: proteína VirB7_{6xHis}, E1: eluído do controle positivo da interação HrpD6_{6xHis}-resina Ni^{2+} com 500mM de imidazol, E2: eluído do controle negativo HrpB1-resina Ni^{2+} , a proteína não interagiu com a resina, E3 e E5 eluídos dos controles negativos de interações inespecíficas entre proteínas diversas procedentes de lisado de bactéria de *E. coli* com a resina e com a proteína HrpD6_{6xHis}, respectivamente, E4: eluído da interação entre as proteínas HrpD6_{6xHis}-HrpB1, E6: eluído do controle positivo da interação VirB7_{6xHis}-resina Ni^{2+} , E7: eluído do controle negativo para uma possível interação inespecífica entre HrpB1-cauda de histidina, utilizando a proteína VirB7_{6xHis}.

4.3.7.4-Mudanças conformacionais na formação dos complexos HrpB1-HrpD6_{6xHis} e HrpB1-HrpW

No item 4.3.7.2, observamos a interação “*in vitro*” entre as proteínas HrpB1-HrpW, e decidimos estudar, se esta interação estava associada a alguma mudança conformacional. Em conjunto com o doutorando Diorge Paulo de Souza, obtivemos espectros de dicroísmo circular para a mistura das proteínas. Para isso, coletamos inicialmente espectros de cada uma das proteínas sozinhas e somamos os mesmos, para ter uma referencia de como seria a soma das curvas teóricas, para ser comparada com o espectro coletado do complexo HrpB1-HrpW. Na Figura 65A podemos observar que não existe mudança significativa entre a curva teórica e a do complexo. Por tanto podemos afirmar que não há mudanças conformacionais significativas, no conteúdo da estrutura secundária gerada na formação do complexo protéico HrpB1-HrpW.

O mesmo conjunto de experimentos foi realizado para estudar o complexo HrpB1-HrpD6_{6xHis}. Em colaboração com o doutorando Diorge Paulo Souza coletamos espectros de cada uma das proteínas por separado e logo somamos os dados para ter uma referência de como seria o espectro da soma das curvas teóricas, para ser comparada com o espectro coletado para o complexo HrpB1-HrpD6_{6xHis}. Na Figura 65B podemos ver que existe mudanças significativas entre a curva teórica e a do complexo HrpB1-HrpD6_{6xHis}. Por tanto, podemos afirmar que a interação das proteínas HrpB1-HrpD6_{6xHis} gera um complexo protéico que possui estrutura secundária definida.

Figura 65. Dicroísmo circular para os complexos HrpW-HrpB1 (A) e HrpD6_{6xHis}-HrpB1 (B). As proteínas foram utilizadas em concentrações 10 μ M, 20 $^{\circ}$ C e tampão 5 mM Tris-HCl pH 8. Cada espectro foi obtido por triplicata. As curvas azuis representam as somas teóricas dos espectros de cada uma das proteínas, obtidos em foram individual, e as curvas rosa representam o espectro observado quando misturas equimolares das proteínas foram submetidas a dicroísmo circular.

4.3.7.5-Mudanças no espectro- ^{15}N -HSQC de HrpD6_{6xHis} induzidas pela ligação de HrpB1

(Este experimento foi realizado em colaboração com o pós doutor Roberto Kopke Salinas)

A evidência de que a formação do complexo HrpD6_{6xHis}-HrpB1 envolve mudanças no conteúdo de estrutura secundária (item 4.3.7.4), despertou nosso interesse e decidimos realizar um ensaio de onde a proteína HrpD6_{6xHis} marcada isotopicamente com ^{15}N (item 3.1.5.1) é titulada com concentrações crescentes de HrpB1. Interações entre as duas proteínas devem perturbar o ambiente das ligações ^{15}N -H da proteína HrpD6_{6xHis}. Na Figura 66 podemos observar como é visível a interação entre estas duas proteínas, já que a maioria dos picos de ligações ^{15}N -H da proteína ^{15}N HrpD6_{6xHis} (picos de cor preta) desaparecem. Os picos de cor azul na Figura 66 são derivados de regiões da proteína HrpD6_{6xHis} no complexo de alta massa (massa teórica do complexo 26 kDa aproximadamente) que ainda estão móveis e portanto o tempo de relaxação T2 não foi diminuído. Outros sinais de ^{15}N -H, correspondendo principalmente às cadeias laterais de asparragina e glutamina (destacados em laranja, Figura 66) não desapareceram indicando que eles se encontram em um trecho flexível da proteína. Observamos que esses sinais mudaram de frequência demonstrando que o ambiente químico destes átomos foi modificado devido à interação entre HrpB1 e HrpD6_{6xHis}. Este resultado confirma uma vez mais nossos resultados prévios de interação “*in vitro*” entre as duas proteínas.

Figura 66. Espectro de ^{15}N -HSQC para a proteína HrpD6_{6xHis} marcada isotopicamente com ^{15}N (picos pretos) e para a interação entre ^{15}N HrpD6_{6xHis} e HrpB1 (picos azuis). Destacado em caixas de cor laranja sinais de ^{15}N -H correspondendo à grupos NH_2 das cadeias laterais de asparagina e glutamina. ^{15}N HrpD6_{6xHis} 0,3 mM, 25° C, 5 mM Acetato de sódio, pH 5.

4.3.7-HrpB1 contribui para a patogenicidade de *Xac*

Testes de patogenicidade em planta de laranjeira pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram realizados, para testar a contribuição de HrpB1 para a patogenicidade de *Xac*. Culturas das cepas *Xac* WT, ΔhrpB1 e $\Delta\text{hrpB1}+\text{pUFR047_hrpB1}$ (Tabela 13), foram crescidas e infiltradas na superfície abaxial das folhas, como detalhado no item 3.6. Na Figura 67 podemos observar que *Xac* ΔhrpB1 perdeu a capacidade de desenvolver doença, comparada com *Xac* selvagem, podendo inferir que HrpB1 é essencial para a patogenicidade da bactéria. A complementação da cepa mutante com o plasmídeo que expressa a proteína HrpB1 recuperou os sintomas de patogenicidade, com a mesma intensidade da cepa selvagem.

Experimentos para gerar os nocautes “apolares” dos genes *hrpD6* e *hrpW* foram desenvolvidos e repetidos por um número considerável de vezes (oito-dez), não obtendo recombinação genômica, de forma, que no final dos processos experimentais, sempre obteve-se a cepa selvagem, onde os genes *hrpD6* e *hrpW* não encontravam-se deletados.

Figura 67. Avaliação da patogênicidade de *Xac* $\Delta hrpB1$ em plantas de laranja pêra. WT: *Xac* selvagem, $\Delta hrpB1$: mutante para o gene *hrpB1*, $\Delta hrpB1+hrpB1$: mutante para o gene *hrpB1* carregando o gene *hrpB1*. Fotografia corresponde a 25 dias após infecção.

4.4-HrpG é essencial para desenvolver doença no hospedeiro

O controle da expressão dos genes *hrp* é feito por fatores de transcrição codificados pelos genes *hrpG* e *hrpX*, localizados fora do cluster *hrp* em *Xcv* (Noël *et al.*, 2002) e em *Xac* (da Silva *et al.*, 2002). HrpG é uma proteína capaz de ligar a DNA e regular a transcrição dos genes *hrpX* e *hrpA*. O produto de *hrpX*, ativa a transcrição de todos os outros operons do locus *hrp* em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Wengelnik *et al.*, 1996). Logo, HrpG é o principal regulador de todo o locus *hrp*. Esta proteína, de 263 aminoácidos, contém um domínio N-terminal do tipo regulador de resposta (RR) do sistema de dois componentes. Sistemas de dois componentes são normalmente envolvidos em vias de transdução de sinal de “phosphorelay” em bactéria (Varughese, 2002).

Decidimos testar, em conjunto com a doutoranda Maria Claudia Rosa Pereda, se *Xac* HrpG pudesse também desenvolver essas funções descritas em outros organismos. Um resultado inicial, seria deletar o gene *hrpG* do genoma de *Xac* e observar se os sintomas típicos de cancro cítrico eram desenvolvidos. Na Figura 68 podemos verificar que a cepa $\Delta hrpG$ não é capaz de causar doença no hospedeiro, comparada com *Xac*

selvagem. Este resultado inicial abre as portas, para futuros experimentos e estudos sobre o mecanismo de atuação de HrpG em *Xac*.

Figura 68. Avaliação da patogenicidade de *Xac* $\Delta hrpG$ em plantas de laranja pêra. WT: *Xac* selvagem, $\Delta hrpG$: mutante para o gene *hrpG*. Fotografia obtida aos 25 dias após infecção.

4.5-HrpE: principal componente do canal externo do T3SS de *Xac*

HrpE é o maior componente do pilus do sistema de secreção do tipo III que serve como conducto para transferir proteínas da bactéria ao interior do citosol da célula da planta (Weber e Koebnik, 2006). Razão pela qual, trabalhando em colaboração com nossa técnica Ilda de Souza Costa decidimos clonar, expressar e purificar a proteína HrpE, assim como também produzir soro policlonal específico contra a proteína, com o objetivo que em experimentos futuros, nosso laboratório consiga detectar por imunolocalização a estrutura do pilus de *Xac*, e poder entender em profundidade as mudanças que o mesmo sofre ao serem deletadas proteínas essenciais do T3SS, como por exemplo: HrpB2, HrcU, HrpB1, HpaB, HpaA, HrcV, HrpW, HrpD6, HrpG e outras. A maioria dos genes destas proteínas já foram deletadas e complementadas no transcurso deste projeto de doutorado.

4.5.1-Produção e purificação da proteína HrpE_{6xHis}

Com a finalidade de obter soro policlonal contra a proteína HrpE_{6xHis}, clonamos o fragmento de DNA que codifica para a proteína HrpE_{6xHis} (282 pb) (item 3.1.1, Tabela

3) e no extremo N-terminal foi adicionada uma calda de seis histidinas para posterior purificação da proteína utilizando coluna de afinidade com Ni^{2+} . Na Figura 69A, mostramos a digestão com *NcoI* e *EcoRI* (sítios escolhidos para a clonagem, Tabela 4), de clones obtidos, observando a presença de dois clones positivos: amostras 2 e 3. Estes clones foram posteriormente confirmados por seqüenciamento (item 3.1.2).

Realizou-se produção em larga escala da proteína HrpE_{6xHis} (peso molecular teórico 11,022 kDa), como descrito no item 3.1.5. Obtivemos a expressão de uma proteína com peso molecular aparente menor a 14 kDa, Figura 69B, amostras I.

A proteína foi purificada a partir de corpos de inclusão utilizando uréia numa concentração 8M, Tabela 7. Na Figura 69C podemos observar um ótimo grau de pureza da proteína HrpE_{6xHis}, amostra E.

Figura 69. Produção e purificação da proteína HrpE_{6xHis}. **A)** Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Digestão com as enzimas *NcoI/EcoRI* de possíveis clones contendo o DNA correspondente ao gene *hrpE* (282 pb) clonado no vetor de expressão pET3a-His (4,6 kb) (Tabela 4). Amostras, PM: marcador de peso molecular em pb, 1-6: Clones digeridos. **B)** SDS-PAGE 18%. Expressão da proteína HrpE_{6xHis}. Amostras: PM, marcador de peso molecular em kDa, NI: Lisado de *E. coli* antes da indução de HrpE_{6xHis} (item 3.1.5) e I: Lisado de *E. coli* depois da indução de HrpE_{6xHis} (item 3.1.5). **C)** SDS-PAGE 18%. Purificação da proteína HrpE_{6xHis} após eluição da coluna de Ni^{2+} . Amostras: PM, marcador de peso molecular em kDa, E: proteína HrpE_{6xHis} pura.

4.5.2-Espectrometria de massas de HrpE_{6xHis}

O espectro de massas para a proteína HrpE_{6xHis} foi obtido seguindo as indicações já detalhadas no item 3.1.8. Na Figura 70 podemos ver o espectro obtido, onde o pico

majoritário possui um peso molecular de 11103 Da $(M+1/1)^{1+}$, correspondente à proteína HrpE_{6xHis}, a qual possui um peso molecular teórico de 11022 Da. O pico de 5566,16 Da, corresponde a proteína HrpE_{6xHis} ionizada por dois prótons, $(M+2/2)^{2+}$.

Figura 70. Espectro de massas obtido para a proteína HrpE_{6xHis}. Pico de 11103 Da, destacado em laranja, correspondente à proteína HrpE_{6xHis} $(M+1/1)^{1+}$. O pico de 5566 Da, corresponde a proteína HrpE_{6xHis} ionizada por dois prótons, $(M+2/2)^{2+}$. Seta indica possível dímero da proteína HrpE_{6xHis}.

4.5.3-Produção e teste de especificidade do soro policlonal contra a proteína HrpE_{6xHis}

Decidimos obter um soro policlonal que seja capaz de reconhecer e interagir especificamente com a proteína HrpE_{6xHis}. Para a produção do soro policlonal anti-HrpE_{6xHis}, utilizamos coelhos NZB, machos. Realizaram-se quatro imunizações, de 200 µg de proteína cada uma, com um intervalo de uma semana entre cada inoculação, como detalhado no item 3.2. O soro foi limpo segundo protocolo descrito no item 3.2.1. Realizamos ensaios de “Western blot” (item 3.2.2), testando a especificidade do nosso soro policlonal anti-HrpE_{6xHis}, utilizando amostras I (induzidas) e NI (não induzidas)

(item 3.1.5) da proteína, como controle negativo e de especificidade, assim também como a proteína pura. Na Figura 71 podemos observar que nosso soro policlonal é capaz de reconhecer especificamente a proteína HrpE_{6xHis} (amostra 3), não só no estado puro, como também na amostra induzida (amostra 1), onde nossa proteína encontra-se no meio de inúmeras proteínas de *E. coli*. Como esperávamos, na amostra não induzida (NI), HrpE_{6xHis} não foi detectada pelo antisoro anti-HrpE_{6xHis}, demonstrando uma ótima especificidade do soro policlonal. Notamos uma segunda banda reconhecida por nosso anti-HrpE_{6xHis}, de aproximadamente 24 kDa, tanto na amostra induzida (1) como na proteína pura, sendo possível a formação de um dímero da proteína, de aproximadamente 22 kDa. Este dímero também foi observado por espectrometria de massas, Figura 70.

Figura 71. “Western blot” confirmando especificidade do soro policlonal anti-HrpE_{6xHis}. Amostras: Lisado de *E. coli* antes (amostras 2) e depois (amostras 1) da indução de HrpE_{6xHis}, 3: HrpE_{6xHis} pura. O soro policlonal anti-HrpE_{6xHis} foi utilizado numa diluição 1:3000. Setas e números à esquerda da figura, mostram pesos moleculares em kDa.

5-Discussão

Durante o processo infeccioso de muitos patógenos Gram-negativos, o sistema de secreção do tipo III (T3SS) é a peça fundamental que garante o sucesso no transporte, secreção e injeção de fatores patogênicos na célula hospedeira (Blocker *et al.*, 2003; Büttner e Bonas, 2002; Galan e Collmer, 1999; He *et al.*, 2004). O T3SS de *Xac* é necessário para o desenvolvimento de sintomas da doença em plantas suscetíveis, também como para desencadear a resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas resistentes (Dunger *et al.*, 2005). Experimentos de deleções nos operons *hrpB* e *hrpD* e do gene *hrpF* em *Xac* não conseguiram produzir cancro em plantas susceptíveis ou reação de hipersensibilidade (HR) em algodão (Dunger *et al.*, 2005).

Em nosso laboratório previamente foram identificadas interações proteína-proteína envolvendo componentes, substratos e reguladores do T3SS de *Xac* cepa 306 (Alegria *et al.*, 2004), cujo genoma encontra-se seqüenciado desde o ano 2002 (da Silva *et al.*, 2002). Algumas dessas interações identificadas são as que envolvem as proteínas: HrcU-HrpB2, HrcV-HpaB-HpaA e HrpW-HrpB1-HrpD6, escolhidas para serem estudadas neste projeto de doutorado. Decidimos estudar também a proteína HrpG, já que o controle da expressão dos genes *hrp*, em *Xcv*, é feito por fatores de transcrição codificadas pelos genes *hrpG* e *hrpX*, localizados fora do cluster *hrp* (Noël *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2002), e a proteína HrpE, por ser o maior componente do pilus do sistema de secreção do tipo III, o qual serve como conduto para transferir proteínas do interior para exterior da bactéria e talvez facilitar suas passagens pela parede celular da planta (Weber e Koebnik, 2006).

5.1-Interações entre as proteínas HrcU e HrpB2

Neste projeto de doutorado, focamos de uma maneira profunda nosso estudo na interação proteína-proteína HrcU-HrpB2.

HrpB2 é uma pequena proteína associada com o T3SS, encontrada apenas em algumas bactérias fitopatogênicas (*Xanthomonas spp.*, *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae*) e em patógenos animais como: *Burkholderia spp.* Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), HrpB2 é secretada no espaço extra celular via T3SS e é essencial para a secreção de proteínas de virulência como: AvrBs3

(Rossier *et al.*, 2000). Esta observação levou à sugestão de que HrpB2 pode desempenhar um papel no controle da hierarquia durante o processo de secreção via T3SS, ou seja, controlar a ordem pelo qual os substratos são secretados (Rossier *et al.*, 2000).

Homólogos de HrcU são encontrados em todos T3SSs conhecidos e também no sistema flagelar. Membros desta família de proteínas são constituídos por um domínio N-terminal contendo várias hélices transmembrana e um domínio C-terminal citoplasmático (Figura 72). Em *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra, o homólogo HrcU, não é necessária para a indução de HR em plantas resistentes como pimenta e tomate ou para a multiplicação da bactéria na planta hospedeira, mas é necessária para o desenvolvimento dos sintomas de patogenicidade na soja (Oh *et al.*, 1999). Por outro lado, mutagênese no operon *hrpC* de *Xcv*, que codifica para as proteínas HrcU e HrcV, resultou em mutantes não patogênicos que apresentaram uma redução significativa do crescimento da bactéria em folhas de plantas hospedeiras, como a pimenta, e perderam a capacidade de induzir HR em plantas resistentes (Bonas *et al.*, 1991). HrcU é um paralog da proteína FlhB flagelar. O domínio C-terminal de FlhB de *Salmonella* é especificamente clivado entre Asn-269 e Pro-270 localizadas dentro do motivo conservado de clivagem NPTH (Minamino e Macnab, 2000a) através de um processo auto-catalítico (Ferris *et al.*, 2005). O motivo NPTH é conservado em todos os homólogos de FlhB, incluindo aqueles encontrados em T3SS de patógenos animais e de plantas. Uma clivagem semelhante foi observada no homólogo YscU do T3SS de *Yersinia pseudotuberculosis* (Lavander *et al.*, 2002). No sistema flagelar, mutações que conseguem abolir a clivagem em FlhB também suprimem a secreção de flagelina e outros componentes de exportação extracelular tardia, mas não as proteínas de exportação inicial ou “precoc” como FlgD (Fraser *et al.*, 2003). A clivagem de YscU, contudo, não parece ser essencial para a secreção de fatores de virulência pelo T3SS de *Yersinia* (Lavander *et al.*, 2002), mas parece discriminar entre proteínas translocadoras e proteínas efetoras (Sorg *et al.*, 2007). Substituições de aminoácidos na sequência de clivagem NPTH de YscU produzem efeitos diferentes dependendo da natureza da substituição. A clivagem proteolítica foi abolida quando o aminoácido N263 foi trocado para A, D ou Q, enquanto as mutações P264A e H266A resultaram em clivagem parcial. Modificações no T265 não afetaram a clivagem. Por isso, conclui-se que o N263 era indispensável para a autoclivagem de YscU (Riordan e Schneewind, 2008). Além disso, recentemente, uma série de estruturas cristalinas dos domínios C-terminais de

homólogos de FlhB, EscU e SpaS dos T3SSs de *E. coli* e *Salmonella*, respectivamente (Zarivach *et al.*, 2008), de Spa40 de *Shigella flexneri* (Deane *et al.*, 2008) e de YscU de *Yersinia enterocolitica* (Wiesand *et al.*, 2009) forneceram informações sobre o mecanismo e as mudanças conformacionais associadas à auto-clivagem. A clivagem no sítio NPTH de homólogos de FlhB pertencentes a T3SS de fitopatógenos ainda não foi muito estudada.

Figura 72. Esquema representando a estrutura da proteína *Xac* HrcU. HrcU (representada em azul), forma parte do corpo basal do T3SS e é constituída por um domínio N-terminal contendo várias hélices transmembrana e um domínio C-terminal citoplasmático contendo a conservada seqüência de clivagem: NPTH (aa 264-267). Em laranja representação da proteína *Xac* HrpB2 interagindo com o fragmento citoplasmático de HrcU, localizado após o sítio de clivagem NPTH.

Neste projeto, caracterizamos a interação entre *Xac* HrpB2 e o domínio C-terminal de *Xac* HrcU utilizando as proteínas recombinantes purificadas. *Xac* HrcU expressa em *E. coli* sofre proteólise no sítio de clivagem altamente conservado NPTH, de forma semelhante ao já descrito para seu parálogo FlhB do sistema flagelar (Minamino e Macnab, 2000a) e seus ortólogos YscU, EscU e SpaS do T3SSs de *Yersina* (Lavander *et al.* 2002; Riordan e Schneewind, 2008), *E. coli* e *Salmonella* (Zarivach *et al.*, 2008), respectivamente. Mutações sítio dirigidas no sítio NPTH de *Xac* HrcU anulam a clivagem proteolítica (Seção *Resultados*, itens 4.1.1-4.1.7). Neste projeto conseguimos demonstrar uma clivagem proteolítica dependente do sítio NPTH, em um homólogo de FlhB proveniente de T3SS de um fitopatógeno, *Xac* HrcU. Nossos

resultados são consistentes com o observado pelo grupo de Ulla Bonas, onde demonstraram que *Xcv* HrcU é clivada em *E. coli* e em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Lorenz *et al.*, 2008a).

Nossos resultados mostraram que *Xac* HrpB2, cujos únicos homólogos conhecidos são encontrados nos fitopatógenos *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum* e *Acidovorax avenae*, e no patógeno animal *Burkholderia* spp, interage com o fragmento C-terminal de HrcU, o qual é liberado via auto-clivagem da proteína. Esta interação foi reportada recentemente em *Xcv* (Lorenz *et al.*, 2008a). Também observamos que HrpB2 não interage especificamente com o local de clivagem NPTH de HrcU, uma vez que interage *in vitro* com a proteína *HrcU*₂₀₇₋₃₅₇^{AAAH}, onde o sítio NPTH foi mutado para AAAH e não apresenta proteólise. *Xac* HrpB2 não é capaz de interagir com o fragmento citosólico *HrcU*₂₀₇₋₂₆₄, anterior ao sítio de clivagem NPTH, porém interage *in vitro* com o fragmento *HrcU*₂₇₇₋₃₅₇, o qual inicia-se 10 resíduos após o sítio NPTH, (Figura 72 e Seção *Resultados*, item 4.1.11). Com estes resultados, conseguimos determinar a região específica que HrpB2 reconhece em HrcU.

Construímos mutantes não-polares para as proteínas *Xac* HrcU e HrpB2 e mostramos que os mesmos conseguem abolir completamente a patogenicidade de *Xac* em laranja doce, concluindo que as proteínas são essenciais para causar sintomas e o desenvolvimento do cancro cítrico em plantas susceptíveis (Seção *Resultados*, item 4.1.12). A complementação da cepa *Xac* Δ *hrcU* com os plasmídeos pUFR047_*hrcU* e pUFR047_*hrcU*^{AAAH} recuperou a capacidade de induzir sintomas e ocasionar a doença. Aparentemente, os sintomas do cancro cítrico causados nas plantas de laranja pêra pela cepa Δ *hrcU*+pUFR047_*hrcU*^{AAAH} em relação aos causados pela cepa Δ *hrcU*+pUFR047_*hrcU*, onde o gene *hrcU* nativo está sendo expresso, foram semelhantes. Este resultado permite o desenvolvimento da hipótese de que o sítio de clivagem NPTH não interfere diretamente no processo de translocação e secreção de proteínas efetoras via o T3SS de *Xac*. A complementação da cepa Δ *hrpB2* reverteu totalmente os sintomas e o desenvolvimento da doença (Seção *Resultados*, item 4.1.13). Os fenótipos de patogenicidade em citros foram revertidos nas cepas de complementação testadas, concluindo que os ausentes sintomas de cancro cítrico observados nas cepas mutantes *Xac* Δ *hrcU* e *Xac* Δ *hrpB2*, são ocasionados exclusivamente pela deleção dos genes *hrcU* e *hrpB2*, do genoma de *Xac*. Demonstramos ainda que HrpB2 é secretada para o espaço extracelular em forma dependente de HrcU via *Xac* T3SS, fato também observado em *Xcv* (Rossier *et al.*,

2000). A secreção de HrpB2 foi abolida na cepa mutante *Xac* $\Delta hrcU$ e restaurada nas cepas de complementação $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU* e $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU*_{AAAH}, mas a quantidade de HrpB2 secretada pela cepa $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU*_{AAAH}, difere da do tipo selvagem visivelmente em quantidade menor (Seção *Resultados*, itens 4.1.15-4.1.16). Este resultado sugere que, embora a clivagem de HrcU pode não ser absolutamente necessária para o funcionamento do T3SS de *Xac*, pode contribuir para a eficiência com a qual desempenha suas funções. A diminuição significativa na secreção de HrpB2 e sua capacidade de continuar causando doença, faz pensar que HrpB2 é capaz de desenvolver sua/s função/ões até quando encontrada em concentrações reduzidas. Lorenz *et al.*, 2008a, demonstraram em *Xcv*, que a secreção *in vitro* de proteínas translocadoras e de pilus (HrpE) é abolida na cepa mutante onde o gene de *hrpB2* encontra-se deletado. Esse fato contribui para compreender por que uma pequena quantidade de HrpB2 secretada na cepa $\Delta hrcU$ +pUFR047_*hrcU*_{AAAH} *in vivo*, possivelmente é capaz de secretar pilus para o desenvolvimento das funções do T3SS, e em consequência, ocasionar doença no hospedeiro. Isto despertou um grande interesse em tentar elucidar a função de HrpB2 no T3SS de *Xac*.

Para determinar qual é a região da proteína imprescindível para reter sua função e permanecer inalterada desenvolvemos uma série de experimentos *in vivo* e *in vitro* pelos quais demonstramos que as cepas $\Delta hrpB2$ +pUFR047_*hrpB2*₁₋₅₆ e $\Delta hrpB2$ +pUFR047_*hrpB2*₁₋₁₂₃, não são capazes de causar cancro cítrico, embora as proteínas HrpB2₁₋₅₆ e HrpB2₁₋₁₂₃ são secretadas para o espaço extracelular. Este resultado nos permitiu concluir que os últimos sete aminoácidos de HrpB2 carregam a importância fisiológica para o desenvolvimento da função de HrpB2 no T3SS (Seção *Resultados*, itens 4.1.13.1 e 4.1.17). Após realizar um análise de conservação dos aminoácidos nas estruturas primárias da família de HrpB2 (Seção *Resultados*, item 4.1.13.2), foram escolhidos os últimos seis aminoácidos para serem mutados, um por um, para alaninas na cepa de complementação $\Delta hrpB2$ +pUFR047_*hrpB2*, para assim poder testar a capacidade de reverter a ausência de patogenicidade observada na planta com a cepa mutante $\Delta hrpB2$. Observamos que a mutação T125A, não é capaz de reverter os fenótipos de doença na planta e que L126A apresenta uma diminuição dos sintomas do cancro cítrico, atenuando a doença. Os mutantes V127A, K128A, N129A e Q130A são capazes de causar patogenicidade no hospedeiro (Seção *Resultados*, item 4.1.13.2).

Será que a mutação T125A inativa a função de HrpB2 no espaço extracelular, ou simplesmente não permite a translocação e secreção da mesma via T3SS? Confirmamos a secreção “*in vitro*” de HrpB2_{T125A} pela cepa $\Delta hrpB2$ +pUFR047_ *hrpB2*_{T125A}. Este resultado sugere que o aminoácido T125 é essencial para que a proteína HrpB2 consiga desenvolver sua função (Seção *Resultados*, item 4.1.18). A relação estrutura-função pela qual a mutação T125A exerce seu efeito, seja mudando a conformação e/ou estrutura da proteína HrpB2, inativando o sítio de interação com a proteína HrcU ou outra proteína/molécula do T3SS, ainda são desconhecidos. Mas com nossos resultados não só determinamos especificamente o fragmento reconhecido por HrpB2 para interagir com HrcU, também demonstramos que os 6 aminoácidos C-terminais de HrpB2, altamente conservados na família de HrpB2, são importantes para o desenvolvimento da sua função, sendo o aminoácido T125 essencial para a mesma.

Infelizmente, não fomos capazes de detectar HrcU na cepa selvagem ou cepas mutantes complementadas utilizando anticorpo policlonal específico para HrcU, por tanto não conseguimos determinar os níveis relativos de expressão de HrcU nas cepas de *Xac* utilizadas nos experimentos, nem, se é de fato, HrcU clivada no local NPTH “*in vivo*” em células de *Xac*. Lorenz *et al.* (2008a) demonstrou que *Xcv* HrcU é clivada “*in vivo*”.

Os únicos fitopatógenos em que ortólogos de HrcU e HrpB2 foram especificamente abordados são: *X. campestris* pv. *glycines 8ra* para HrcU e *Xcv* para HrpB2 e HrcU. HrcU é necessária para desenvolver a patogenicidade de *X. campestris* pv. *glycines 8ra* em seu hospedeiro natural, a soja (Oh *et al.*, 1999). Curiosamente, entretanto, este ortólogo de *hrcU* não é necessário para a multiplicação da bactéria na planta hospedeira nem é necessária para a indução de HR em plantas resistentes (Oh *et al.*, 1999). Isso é consistente com nossas observações, embora HrcU é necessária para o desenvolvimento de sintomas de cancro cítrico no hospedeiro, não é necessária para o crescimento bacteriano em plantas suscetíveis. Nós demonstramos que HrpB2 é necessária para o crescimento bacteriano e causar doença em plantas cítricas (Seção *Resultados*, item 4.1.14). HrpB2 é necessária para a patogenicidade *Xcv* e é secretada no meio de cultura em uma maneira dependente do T3SS (Rossier *et al.*, 2000). *Xcv* HrpB2 é necessária para a secreção do fator de patogenicidade AvrBs3 Rossier *et al.*, 2000, sugeriram que HrpB2 pode estar associada com o pilus do tipo III e pode desempenhar um papel na determinação na ordem em que outros substratos do T3SS são secretados. Recentemente, Lorenz *et al.*, 2008a, demonstrando que a secreção de subunidades do

pilus é abolida na cepa mutante para *hrpB2* em *Xcv*, dando força adicional à idéia de que HrpB2 pode ser uma das primeiras proteínas secretadas pelo T3SS (Rossier *et al.*, 2000).

Todas estas observações levantam a questão: Que papel cumpre a interação HrpB2-HrcU na montagem ou no funcionamento do T3SS de *Xac*, especificamente, no processo de especificidade pelo substrato? Embora não temos dados diretos a este respeito, algumas pistas podem ser encontradas nos estudos realizados sobre o funcionamento dos homólogos de HrcU. Mutantes que inibem a clivagem no sítio NPTH em homólogos de HrcU, apresentam defeitos na secreção de substratos específicos. Por exemplo, em FlhB, mutações neste sítio inibem a exportação “tardia” de proteínas flagelares, enquanto a secreção “precoce” de substratos permanece nos níveis normais, por exemplo a proteína gancho, FlgE (“hook protein”), é secretada normalmente (Fraser *et al.*, 2003). Além disso, a cepa de *Y. enterocolitica* Δ *yscU* expressando YscU_{N263A}, onde o resíduo Asn, conservado na sequência de clivagem NPTH, foi mutado para Ala, produziu pilus/agulhas cumpridos, exportou quantidades reduzidas da proteína YscP (um homólogo de FliK, veja abaixo) e não exportou as proteínas translocadoras: LcrV, YopB e YopD (Sorg *et al.*, 2007). YopB, YopD e LcrV são necessárias para a translocação de outras proteínas efetoras através da membrana da célula hospedeira (Viboud *et al.*, 2003). As proteínas YopB e YopD, de natureza hidrofóbicas, parecem ser centrais para a translocação dos efetores e para a formação de um canal ou poro na membrana lipídica. Presumivelmente, elas desempenham papéis diferentes na formação dos poros (Cornelis, 2000). A produção de ganchos longos (“polyhooks”) poderia ser revertida por super-expressão de YscP, enquanto a exportação de LcrV, YopB e YopD é absolutamente dependente do sítio de clivagem NPTH (Sorg *et al.*, 2007).

A montagem do flagelo ocorre em um número determinado de passos ou estágios, onde o “ponto de verificação e controle” é realizado pela proteína FliK, função que realiza detectando o ponto no qual a estrutura do gancho flagelar atingiu o seu comprimento ideal. Nesse estágio FliK, termina a exportação do gancho e a montagem do mesmo transmitindo um sinal para iniciar a exportação de subunidades do filamento (FliC ou flagelina), a última etapa na biossíntese dos flagelos (Waters *et al.*, 2007). Mutantes para *fliK* não secretam substratos “tardios”, mas secretam quantidades excessivas da proteína do gancho FlgE, resultando na produção de ganchos cumpridos (Williams *et al.*, 1996). Este fenótipo pode ser revertido por simples substituições de

aminoácidos na proteína FlhB, quase todos mapeados no fragmento C-terminal de auto-clivagem (Fraser *et al.*, 2003; Kutsukake *et al.*, 1994; Suzuki e Iino 1981, Williams *et al.*, 1996). Além disso, o produto do gene *fliK*, liga-se ao fragmento C-terminal de auto-clivagem de FlhB (Minimino e Macnab, 2000a) e durante a montagem flagelar FliK é secretada subsequente à secreção da subunidade do gancho flagelar (Macnab 2003; Minamino *et al.*, 1999). Assim, no sistema de flagelar, FlhB e FliK agem em conjunto para controlar a mudança na especificidade dos substratos a serem secretados de “substrato precoces” para “substratos tardios”, embora o mecanismo molecular pelo qual este objetivo é atingido não é totalmente compreendido (Macnab 1999; Macnab 2003; Waters *et al.*, 2007).

Nos patógenos animais como *Yersinia*, *Salmonella* e *Shigella*, a formação do “complexo de agulha” e a posterior secreção de fatores de virulência via T3SSs são controlados por uma interação entre homólogos de FlhB e FliK. Nestes sistemas, mutações nos homólogos de FliK: YscP (Edqvist *et al.*, 2003; Journet *et al.*, 2003), InvJ (Kubori *et al.*, 2000) ou Spa32 (Tamano *et al.*, 2002) resultam na formação de agulhas de comprimento variável e a secreção dos fatores de virulência fica comprometida. No caso de *Yersinia*, os fenótipos pode ser revertidos por mutações no domínio citosólico do homólogo de FlhB, YscU (Edqvist *et al.*, 2003). Além disso, YscP, InvJ e Spa32 são secretadas durante a montagem do T3SS (Collazo *et al.*, 1995; Payne e Straley 1999; Tamano *et al.*, 2002), de forma semelhante à secreção de FliK no sistema flagelar. Finalmente, em *Yersinia*, a secreção de YscP parece estar associada à secreção de uma outra proteína pequena (YscO) que se liga preferencialmente à forma não clivada de YscU (Riordan e Scheewind, 2008).

FliK e seus homólogos no T3SSs de patógenos animais variam muito em tamanho, entre 300 e 500 resíduos aminoácídicos e possuem entre elas, baixos níveis de identidade (aproximadamente 10%) (Agrain *et al.*, 2005). Uma região, chamada T3S4 (*type III secretion substrate specificity switch*), é composto por cerca de 90 resíduos aminoácídicos (resíduos 269-354 em FliK de *Salmonella typhimurium* e 403-492 em YscP de *Y. enterocolitica*) localizados no domínio C-terminal desta família de proteínas (Agrain *et al.*, 2005). O T3S4 é conservado entre as proteínas que se presume controlam o comprimento da agulha em muitos “injectosomos”, e também entre os membros da família FliK, que atuam como um interruptor controlando o comprimento do gancho flagelar (Agrain *et al.*, 2005). Nas proteínas homólogas de YscP de *Y. enterocolitica*, provenientes de fitopatógenos: HrpP de *Pseudomonas syringae*, RspP de *P. fluorescens*

e HpaP de *R. solanacearum*, foi identificado o domínio T3S4, embora estas proteínas possuem similaridades entre elas, a nível de sequência, muito baixa, menos de 20% (Agrain *et al.*, 2005). O cluster *hrp* de *Xanthomonas spp.* também codifica para homólogos desta família: HpaP de *Xac* e HpaC de *Xcv* (86% idênticos). HpaC de *Xcv* é necessária para a secreção de tanto proteínas efetoras como também de proteínas translocadoras via T3SS, mas não é essencial para a exportação da proteína HrpE, componente majoritário do pilus (Büttner *et al.*, 2006). Lorenz *et al.*, 2008a, demonstraram recentemente que a secreção de HrpB2 é controlada pela proteína *Xcv* HpaC. Estas evidências mostram que o fenótipo ocasionado pelo mutante *hpaC* de *Xcv* é semelhante ao observado para os mutantes de *yscP*, *invJ* e *spa32*. No entanto, HpaC não é secretada por *Xcv* e a formação do *hrp* pilus não é afetada em cepas mutantes para o gene *hpaC* (diferente do que é observado para mutantes de *yscP*, *invJ* e *spa32*, como descrito acima) (Büttner *et al.*, 2006).

Nossos resultados permitiram observar que *Xac* HrpB2 interage com *Xac* HrcU em uma maneira similar à descrita para FliK com FlhB, fato que levou-nos a perguntar se a sequência primária de HrpB2 teria algumas características em comum com os membros das famílias protéicas de FliK e YscP. As seguintes observações são consistentes com essa hipótese:

i) Em primeiro lugar, a família de proteínas de FliK e YscP é caracterizada por possuir um domínio C-terminal rico em glutamina e uma região central rica em prolina (Agrain *et al.*, 2005; Minamino *et al.*, 2006). As proteínas HrpB2, significativamente menores do que FliK e YscP, são ricas em glutamina em todo o seu comprimento e possuem uma região centro/N-terminal rica em prolina (Figura 73A). Por exemplo, ao longo de 130 resíduos aminoacídicos, a proteína *Xac* HrpB2 possui 14 glutaminas e um total de 9 resíduos de prolina, 8 dos quais estão nos primeiros 60 aminoácidos (Fig. 73C).

ii) Em segundo lugar, como já foi mencionado, FliK e as proteínas da família de YscP possuem um domínio chamado T3S4. A sequência do domínio é altamente variável, e pode ser identificado mediante análises de clusters hidrofóbicos (HCA ou “*hydrophobic cluster analysis*”; Agrain *et al.*, 2005; Gaboriaud *et al.*, 1987; Minamino *et al.*, 2006). Esta análise prevê que esse domínio é composto por uma mistura de alfa hélices e folhas beta (Agrain *et al.*, 2005). Realizamos a análise HCA em *Xac* HrpB2 utilizando o servidor web on-line (ver Fig. 73D, legenda) o qual identificou um domínio T3S4 putativo na região central/C-terminal da proteína (resíduos 55-130).

iii) Em terceiro lugar, o domínio T3S4 da família de proteínas de FliK é altamente conservado e carrega um motivo PxxLG (Agrain *et al.*, 2005; Minamino *et al.*, 2006). Esse motivo, na família de proteínas de YscP, é modificado para PxLG sendo significativamente menos conservado (Figura 73B), e não é conservado na família de proteínas HpaP/HpaC/HrpP/RspP (Pfam PF09483). Figura 73C mostra o alinhamento da sequência de *Xac* HrpB2 com os resíduos 200-355 de FliK de *S. typhimurium*. Embora o alinhamento revelasse apenas 15% de identidade, nós encontramos a sequência PTMG em *Xac* HrpB2 alinhada com o motivo T3S4 PxxLG de FliK. Esta sequência é absolutamente conservada em todas as proteínas HrpB2 de *Xanthomonas*, mas está ausente em homólogos de HrpB2 de outros patógenos bacterianos (Fig. 73A). Além disso, os motivos PTMG de *Xac* HrpB2 e PxxLG de FliK ocupam posições equivalentes nas regiões T3S4 das respectivas proteínas (Fig. 73D).

iv) Por último, os cinco resíduos C-terminais de FliK de *S. typhimurium* (aa 401-405), são importantes para o reconhecimento e troca do substrato flagelar, especialmente V401 altamente conservada (Minamino *et al.*, 2006). Curiosamente, os últimos seis resíduos C-terminais de HrpB2 encontram-se entre as regiões mais bem conservadas da família de proteínas de HrpB2- (T/S) L (M/V) (K/R) NQ- (Figura 73A); uma observação consistente com a nossa que os resíduos T125 e L126 de *Xac* HrpB2, quando mutado para Ala, abolem ou reduzem (respectivamente) o desenvolvimento de sintomas de câncer na planta.

As evidências acumuladas até agora sugerem que a interação proteína-proteína *Xac* HrpB2-HrcU e a secreção de HrpB2 podem ter semelhanças com os processos de secreção de FlhB-FliK e YscU-YscP, descritos (Figura 74). Uma possibilidade é que HrpB2 pode exercer um papel homólogo ao já descrito para as proteínas FliK, YscP, Spa32 e InvJ. As evidências apóiam as seguintes hipóteses:

i-HrpB2 interage com o domínio C-terminal citosólico de HrcU, de maneira semelhante aos seus homólogos YscU/FlhB (Figura 74),

ii-HrpB2 possui características semelhantes às encontradas nos domínios T3S4 de outras proteínas que interagem com homólogos de FlhB,

iii-HrpB2 é secretada via T3SS,

iv-a produção de HrpB2 é necessária para a exportação do fator de virulência AvrBs3, em *Xcv* (Rossier *et al.*, 2000) e para a secreção de proteínas translocadoras e efetoras (Lorenz *et al.*, 2008a),

v-os seis últimos resíduos aminoacídicos C-terminais de *Xac* HrpB2, são altamente conservados na família de proteínas de HrpB2, dentro deles T125 de *Xac* HrpB2 é essencial para a patogenicidade e L126 contribui no desenvolvimento da doença no hospedeiro.

A família de proteínas de HrpB2 é restrito a um pequeno conjunto de espécies bacterianas (Figura 73A) e não apresenta similaridade clara com a sequência da família de proteínas YscP ou YscO. O domínio citosólico de FlhB interage com outros substratos flagelares secretados (Minamino e Macnab, 2000a, 2000b). O domínio C-terminal de *Xcv* HrcU também interage com HrpB2, porém não foi observada interação com outros substratos do T3SS, incluindo a subunidade principal do *hrp* pilus HrpE, proteínas translocadoras e/ou efetoras (Lorenz *et al.*, 2008a). Se a proteína HrpB2 exerce um papel na especificidade e mudança no substrato a ser secretado via T3SS ou como um componente estrutural menor da agulha do T3SS ou outra função, ainda não contemplada, aguarda novos estudos.

Figura 74. Esquema representando o modelo de interação HrcU-HrpB2 (direita) em comparação com a interação do sistema flagelar FlhB-FlhK (esquerda). FlhB, é clivada na sequência proteolítica NPTH no domínio citosólico C-terminal (Fraser *et al.*, 2003). A auto-clivagem ocorre entre os aminoácidos N e P deste motivo (Ferris *et al.*, 2005). FlhK, liga-se ao fragmento C-terminal de auto-clivagem de FlhB (Minimino e Macnab, 2000a) e durante a montagem flagelar FlhK é secretada subsequente à secreção da subunidade do gancho flagelar, FlgE (Macnab 2003; Minamino *et al.*, 1999). Mutantes para *fliK* não secretam substratos “tardios” (Ex: FliC), mas secretam quantidades excessivas de FlgE, produzindo ganchos cumpridos (Williams *et al.*, 1996). Assim, no sistema de flagelar, FlhB e FlhK agem em conjunto para controlar a mudança na especificidade dos substratos a serem secretados, de “substrato precoces” para “substratos tardios” (Macnab 1999; Macnab 2003; Waters *et al.*, 2007). *Xac* HrpB2, interage com o fragmento C-terminal de HrcU, o qual é liberado via auto-clivagem na sequência NPTH, entre os aminoácidos N e P. Sua secreção ao espaço extracelular depende da proteína HrcU, mas não necessariamente da sua clivagem. Mutantes para *Xcv hrpB2* eliminam a secreção de proteínas translocadoras e do pilus *hrp* (HrpE), abolindo, em consequência, a secreção dos fatores de virulência, e permitindo a hipótese de que HrpB2 é uma das primeiras proteínas a serem secretadas via T3SS durante o processo de infecção (Lorenz *et al.*, 2008a). Estas observações permitem levantar a hipótese de que *Xac* HrcU e HrpB2 podem desenvolver funções em conjunto no controle da secreção dos substratos via T3SS, de maneira semelhante ao observado no sistema flagelar. Mais estudos são requeridos para elucidar dita hipótese. MI, membrana interna bacteriana; ME, membrana externa bacteriana; T3SS, sistema de secreção do tipo III.

5.2-Interações entre as proteínas HpaA-HpaB-HrcV

Neste projeto de doutorado, caracterizamos o papel de HpaA e HpaB na patogênese de *Xac*. Utilizamos ensaios *in vitro* para demonstrar que a proteína HpaB interage com a proteína HpaA_{6xHis} e o domínio citosólico C-terminal de HrcV (Seção *Resultados*, item 4.2.8). Estas interações foram identificadas pela primeira vez em ensaios de duplo híbrido, em nosso laboratório (Alegria *et al.*, 2004). Nós mostramos que HpaB é necessário para a secreção eficiente das proteínas HpaA e HrpB2 (Seção *Resultados*, item 4.2.11). Construímos a cepa mutante para o gene *hpaB*, *Xac* $\Delta hpaB$, a qual apresentou fenótipos da doença extremamente atenuados e sobrevivência significativamente reduzida em planta (Seção *Resultados*, itens 4.2.9 e 4.2.10, respectivamente). A cepa mutante para o gene *hpaA*, *Xac* $\Delta hpaA$, não demonstrou afetar notoriamente a doença, percebe-se uma leve diminuição dos sintomas de hiperplasia e pouco desenvolvimento de necroses (Seção *Resultados*, item 4.2.9).

Homólogos de HpaB foram encontrados apenas nas espécies *Xanthomonas spp.* *R. Solanacearum*, e *B. pseudomallei*. *Xac* HpaB é uma proteína pequena (17 kDa), de natureza ácida (pI=4), e possui características típicas de proteínas chaperonas (Seção *Introdução*, item 1.2.1.5), as quais se associam com substratos do T3SS mediando e outorgando assistência à associação dos substratos com a maquinaria de secreção (Wattiau *et al.*, 1996). Estudos em *Xcv* sugerem que HpaB é parte de um complexo protéico que contém um controle adicional de exportação, a proteína HpaC (Büttner *et al.*, 2004, 2006). *Xcv* HpaC promove a secreção de proteínas efetoras e translocadoras, mas não apresenta características típicas de proteínas chaperonas do T3SS. Ambas as proteínas *Xcv* HpaB e HpaC, interagem com substratos e componentes conservados da maquinaria do T3SS, como HrcV, proteína conservada da membrana interna, sugerindo que estas proteínas desempenham um papel central no recrutamento de substratos para o direcionamento ao T3SS (Büttner *et al.*, 2006).

Homólogos de HpaA são encontrados somente em *Xanthomonas spp.* e *R. solanacearum*. Em *Xcv*, a deleção do gene *hpaA* elimina os sintomas da doença em plantas de tomate e pimentão, sem afetar a capacidade de provocar HR (Huguet *et al.*, 1998). A sequência primária de HpaA contém dois sítios funcionais de localização nuclear (NLS), os quais, direcionaram a proteína HpaA expressa em células de cebola aos núcleos das mesmas (Huguet *et al.*, 1998). Neste sentido, HpaA juntamente com PthA (proteína efetora secretada pelo T3SS de *Xac*), VirD2 e VirE2 (secretadas pelo

T4SS de *Agrobacterium Agrobacterium*) estão entre as poucas proteínas de virulência de fitopatógenos que têm pelo menos um NLS e que são direcionadas para os núcleos das células do hospedeiro (Büttner *et al.*, 2006). As interações entre HpaB e o domínio HrcV foram observados em *Xac* e *Xcv*, de maneira similar as interações entre HpaA e HpaB (Alegria *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2008b), o que implica um avanço no conhecimento e no caminho para elucidar as verdadeiras funções destas proteínas no T3SS e os possíveis passos moleculares que executam para o desenvolvimento do processo infeccioso no hospedeiro.

T3SSs oferecem diversos meios para a translocação de fatores de virulência (efetores) dentro da célula hospedeira e, desta forma, desenvolver papéis definidos nas interações patógeno-hospedeiro. Alguns destes efetores são translocados com a participação das chamadas proteínas chaperonas do tipo III (TTCs) (Alfano *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2003; Parsot *et al.*, 2003), as quais foram classificadas nos grupos IA, IB, II e III (He *et al.*, 2004). As chaperonas IA interagem com efetores específicos ou com diferentes efetores que contêm um motivo de interação conservado. Chaperonas IB interagem com diferentes efetores, os quais não compartilham homologia (Parsot *et al.*, 2003). Ambas as classes, IA e IB, reconhecem um sinal presente na região N-terminal das proteínas efetoras. *Xcv* HpaB foi classificada como chaperona do tipo IB, devido à observação de que interage “*in vitro*” com cinco diferentes proteínas efetoras (entre elas AvrBs3 e AvrBs1) e participa de sua secreção (Büttner *et al.*, 2004). Em contraste com essa observação, *Xac* HpaB mostrou que interage com a região C-terminal da proteína *Xac* HpaA: os resíduos 126-271 foram suficientes para a interação (Alegria *et al.*, 2004). Neste sentido, a interação HpaA-HpaB é distinta daquela observada para as de classe IA ou IB, e se assemelha mais com chaperonas do tipo III (chaperonas do sistema flagelar), as quais ligam-se à região C-terminal de proteínas secretadas (Parsot *et al.*, 2003). Alegria *et al.*, 2004, demonstrou que quando a proteína *Xac* HpaA (271 aminoácidos) foi utilizado como isca, em ensaios de duplo híbrido, 100% das 40 presas sequenciadas foram HpaB. Curiosamente, todos estes clones codificaram para polipeptídeos contendo, no mínimo, todos exceto os seis primeiros aminoácidos de HpaB, sugerindo que a interação HpaA-HpaB exige quase a região N-terminal completa da cadeia polipeptídica de *Xac* HpaB. Por outro lado, a proteína HpaA difere de todos os outros efetores do T3SS, desde que foi observado que a mutação para o gene *hpaA* reduz a quantidade de *hrp* pilus detectado em células de *Xcv* (Weber *et al.*, 2005). Este efeito não é observado na secreção de *Xac* HrpB2 na cepa mutante para *hpaA*, a qual manteve

a habilidade de secretar a proteína e desenvolver doença (Seção *Resultados*, item 4.2.11).

Recentemente, Lorenz *et al.*, 2008b, mostrou mediante estudos de interação proteína-proteína e análises de mutagênese, que é a região C-terminal de HpaA, que contém um sítio de ligação a HpaB, é crucial para a secreção de *Xcv* HpaA no T3SS. A secreção de proteínas translocadoras e pilus não é afetada quando HpaA é expressa com uma deleção da região N-terminal, na qual perde seu sinal de secreção e translocação, sugerindo que sua própria secreção não é essencial para a montagem do T3SS nem para o seu funcionamento durante o processo infeccioso, mas sim sua produção. Estes resultados são consistentes com nossas observações a respeito da interação da região C-terminal de *Xac* HpaA com *Xac* HpaB (Alegria *et al.*, 2004). O fato da secreção de *Xac* HrpB2 ser eficiente mesmo na ausência do gene *hpaA* (Seção *Resultados*, item 4.2.11), e que *Xac* Δ *hpaA* de fato não afeta notoriamente o desenvolvimento do cancro cítrico na planta (Seção *Resultados*, item 4.2.9), sugere que, similarmente a *Xcv*, o *hrp* pilus, proteínas efetoras e translocadoras estão sendo secretadas durante o processo infeccioso, talvez em menor quantidade, mas conseguem desenvolver sintomas da doença. Estas observações indicam que as proteínas *Xac* HpaA e *Xac* HpaB podem ter funções especiais que os distinguem dos conhecidos efetores e chaperonas do T3SS, respectivamente.

Além de sua atividade como chaperona, *Xcv* HpaB pode regular a especificidade do T3SS por outras vias. A observação de que as proteínas não efetoras são secretadas pela cepa mutante para o gene *hpaB*, mas não são secretadas pela cepa selvagem, sugere que *Xcv* HpaB regula a translocação de proteínas não efetoras pelo T3SS (Büttner *et al.*, 2004). A supressão da secreção da proteína *Xac* HrpB2 pela cepa *Xac* Δ *hpaB*, nos leva a pensar sobre a natureza da proteína HrpB2: será uma proteína efetora ou a sua secreção é a chave para a interação com algum componente extracelular e, em consequência, a montagem da maquinaria do T3SS? Lorenz *et al.* (2008b) sugerem que a ligação de *Xcv* HpaA com *Xcv* HpaB dentro da célula bacteriana favorece a secreção dos componentes do aparelho de secreção extracelular, sendo que a secreção de HpaA presumivelmente liberta HpaB e, portanto, promove a secreção de proteínas efetoras após a montagem do aparelho do T3SS.

Os resultados apresentados neste trabalho destacam o papel fundamental de HpaB e HpaA na patogenicidade de *Xac*. Desde que HpaB é uma proteína intracelular e HrpB2 e HpaA são secretadas em uma forma dependente de HpaB, o fenótipo de

virulência atenuada em plantas de laranja pêra e as taxas reduzidas de sobrevivência apresentaram pelo mutante $\Delta hpaB$ no hospedeiro, são provavelmente o resultado da incapacidade de secretar HrpB2 e a incapacidade a translocação de HpaA para a célula vegetal. HpaB parece ser necessária para a secreção de um conjunto considerável de proteínas em *Xcv* (Büttner *et al.*, 2004); não podemos descartar a possibilidade de que HpaB seja responsável pela secreção de outras proteínas efetores em *Xac*.

Em *Xac*, a cepa $\Delta hpaB$ afeta significativamente a patogenicidade da bactéria e sua sobrevida no hospedeiro. *Xac* HrpB2 (que mostrou ser essencial para desenvolver doença no hospedeiro, *Seção Resultados*, item 4.1.12) não é secretada, além de suprimir a secreção de HpaA e possivelmente de outras proteínas efetoras e não efetoras. A cepa *Xac* $\Delta hpaA$ não afeta significativamente o desenvolvimento do cancro cítrico na planta nem a secreção de HrpB2, fato que a distingue da cepa *Xcv* $\Delta hpaA$, a qual elimina os sintomas da doença em plantas de tomate e pimentão, sem afetar a capacidade de provocar a HR (Huguet *et al.*, 1998).

A existência de um complexo protéico ternário (*Xac* HpaA-HpaB-HrcV) não foi confirmado em nossos experimentos “*in vitro*” (*Seção Resultados*, item 4.2.8.4). Este fato somado aos nossos resultados e às informações obtidas para a interação *Xcv* HpaA-HpaB e HpaB-HrcV, nos permite hipotetizar um modelo de interação das proteínas em *Xac* e um possível mecanismo molecular percorrido. Supondo que o complexo *Xac* HpaA-HpaB dentro da célula bacteriana inibe a interação de HpaB com o HrcV e que isso favoreça a secreção dos componentes do aparelho de secreção extracelular (HrpB2, *hrp* pilus, etc...) e mediante um estímulo desconhecido é promovida a secreção de HpaA, via T3SS já montado, libertando HpaB, a qual pode agora interagir com o domínio citosólico de HrcV e promover a secreção de proteínas efetoras após a montagem do aparelho do T3SS (Figura 75A). No caso do nocaute do gene *hpaB*, o complexo HpaA-HpaB não se forma o que compromete a secreção de componentes do T3SS, HrpB2 e substratos de secreção “tardia”, levando a uma deficiência na sobrevida bacteriana e na patogenicidade no hospedeiro, como observado em *Xac* (Figura 75B). Finalmente, na ausência de HpaA, HpaB ficaria livre para interação com o domínio citosólico de HrcV, estimulando a secreção de substratos “precoces” e a formação do complexo da agulha. Este fato promoveria também, a secreção de fatores de virulência para a célula vegetal, ocasionando o cancro cítrico na planta, podendo ou não, posteriormente, HpaB se libertar de HrcV (Figura 75C).

Existem inúmeros caminhos a serem descobertos e elucidados sobre os mecanismos moleculares que a interação HpaA-HpaB-HrcV envolvem no T3SS *Xac*. Neste trabalho conseguimos apontar para alguns possíveis mecanismos que precisarão ser testados futuramente para aumentar o entendimento sobre este importante mecanismo de patogenicidade bacteriana.

Figura 75. Modelo de interação das proteínas *Xac* HpaA-HpaB-HrcV. **A)** A interação HpaA-HpaB favorece a secreção dos componentes do T3SS (HrpB2, HrpE: *hrp* pilus, etc...). A secreção de HpaA é promovida, via T3SS, libertando HpaB, a qual pode interagir com o domínio citosólico de HrcV e promover a secreção de proteínas efetoras após a montagem do aparelho do T3SS (fatores de virulência, HpaA, etc...). **B)** Na ausência do gene *hpaB*, a secreção de componentes do T3SS, HrpB2, fatores de virulência e substratos de secreção “tardia”, encontra-se comprometida levando a uma deficiência na sobrevivência bacteriana e na patogenicidade no hospedeiro. **C)** Na ausência do gene *hpaA*, HpaB, provavelmente, interage com o domínio citosólico de HrcV, ocasionando eventos de secreção similares aos ocorridos na ligação com a proteína HpaA (A), estimulando a secreção de substratos “precoces” e a formação do complexo da agulha, promovendo também, a secreção de fatores de virulência para a célula vegetal, ocasionando o cancro cítrico na planta, podendo ou não, posteriormente, HpaB se libertar de HrcV.

5.3-Interações entre as proteínas HrpD6-HrpB1-HrpW

Neste projeto de doutorado, caracterizamos a interação proteína-proteína HrpD6-HrpB1-HrpW previamente identificadas pela primeira vez em ensaios de duplo híbrido, por nosso laboratório (Alegria *et al.*, 2004). Utilizamos ensaios “*in vitro*” para demonstrar que a proteína HrpB1 interage com a proteína HrpD6 e HrpW (Seção *Resultados*, item 4.3.7). Construímos a cepa mutante para o gene *hrpB1*, *Xac* Δ *hrpB1*, a qual não apresentou fenótipos da doença em planta, demonstrando ser uma proteína essencial na patogenicidade de *Xac* (Seção *Resultados*, item 4.3.8). Ditos fenótipos foram totalmente revertidos utilizando a cepa de complementação *Xac* Δ *hrpB1*+pUFR047_*hrpB1* (Seção *Resultados*, item 4.3.8).

HrpB1 e HrpD6 são proteínas pequenas (130 e 80 resíduos, respectivamente), citoplasmáticas e cujos homólogos em *Xcv* são essenciais para a da bactéria (Rossier *et al.*, 2000). No entanto, nenhuma delas possui homólogos no aparelho flagelar ou nos T3SSs de patógenos animais, e nenhuma análise funcional das proteínas está disponível na literatura. Homólogos de HrpD6 foram identificados, até agora, só em *Xanthomonas spp.*, enquanto homólogos de HrpB1 foram encontrados em *Xanthomonas spp.*, *R. Solanacearum* e *Burkholderia pseudomallei*. As interações entre estas duas proteínas, identificadas primeiramente por Alegria *et al.*, 2004 e posteriormente confirmadas neste projeto de doutorado, indicam que eles atuam juntas em uma/s função/ões em comum, para o correto funcionamento do T3SS de *Xac*.

HrpB1 interagiu com a proteína HrpW. *hrpW* não está situado no locus *hrp*, em *Xac*. No entanto, em *Xcc*, o gene *hrpW* está localizado dentro do locus *hrp*, adjacente ao gene *hpaB* (da Silva *et al.*, 2002). Em *P. syringae* e *Erwinia amylovora*, HrpW possui 41 kDa e liga-se a pectato, sendo sua secreção dependente do T3SS (Kim e Beer, 1998; Charkowski *et al.*, 1998). O domínio de harpina em HrpW de *P. syringae* está localizado entre os resíduos 119 e 188 e consta de sete repetições ricas em glicina. No entanto, *Xac* HrpW (33 kDa) e *Xcv* HrpW (36 kDa), compartilham 46% de identidade e 59% de similaridade e não possuem domínios completos de harpina e contem menor quantidade de repetições ricas em glicina. O domínio pectato liase em *Xac* e *Xcv* HrpW parece completo e no entanto mostra 30% de identidade com o correspondente domínio nas proteínas HrpW de *Pseudomonas* e *Erwinia*, bem como com o domínio pectato liase de *Bacillus spp.*

Mutantes para *Xac* HrpW não são capazes de desenvolver cancro cítrico em plantas susceptíveis. (Resultado obtido pelo Dr. Alexandre Morais do Amaral do Laboratório de Biotecnologia Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC. Comunicação pessoal). A interação entre HrpB1 e HrpW, uma proteína que possui homólogos conhecidos em outros T3SS, podem indicar que HrpB1 (e talvez HrpD6) estão envolvidas no direcionamento de HrpW e outros substratos para o aparelho do T3SS de *Xac*. Um teste direto para essa hipótese (ie detecção de secreção de HrpW em cepas *Xac* tipo selvagem mas não em $\Delta hrpB1$) aguarda por novas pesquisas e resultados.

6-Conclusões

Xac é o agente causal do cancro cítrico, uma doença caracterizada pela formação de aftas ou lesões no tecido infectado, (Gabriel, 2001; Figura 2A). Os frutos infectados apresentam menor valor comercial ou não são comercializáveis, ocorrendo perdas econômicas significativas para a citricultura brasileira que movimenta em torno de 10 bilhões de reais por ano. O Estado de São Paulo concentra 79% da produção brasileira de laranja, sendo responsável por 95% das exportações de suco de laranja (Neves *et al.*, 2004).

O sucesso, em nível molecular, do processo infeccioso da bactéria na célula hospedeira, geralmente é desenvolvida por proteínas secretadas pela bactéria. A chave para a translocação e secreção de substratos/fatores de virulência ao interior da célula vegetal é o sistema de secreção do tipo III (T3SS), presente na maioria das bactérias Gram-negativas, fitopatogênicas, como também em patógenos de animais (He *et al.*, 2004). Com o objetivo de elucidar e estudar os mecanismos moleculares desenvolvidos pelo T3SS de *Xac*, selecionamos proteínas pertencentes ao T3SS, cujas interações proteína-proteína já tinham sido reportadas por nós (Alegria *et al.*, 2004). Centralizamos nosso estudo fundamentalmente na interação HrpB2-HrcU, obtendo resultados inovadores e inéditos, que ajudaram, junto com a informação existente de outros homólogos, a hipotetizar o papel crucial desta interação no T3SS de *Xac*. A interação proteína-proteína HpaA-HpaB-HrcV também capturou nosso interesse e, conseguimos com nosso trabalho descobrir fatos importantes desta interação em *Xac*, como também a caracterização destas proteínas e os fenótipos ocasionados, individualmente, por HpaA e HpaB na planta. Iniciamos o estudo da interação HrpD6-HrpB1-HrpW, com a caracterização da mesma “*in vitro*”, analisando a contribuição de HrpB1 na patogenicidade de *Xac* “*in vivo*” e aportando dados estruturais de HrpD6. Estes resultados podem ser o início de um estudo futuro sobre os mecanismos moleculares e possíveis vias percorridas por estas proteínas até desenvolver suas funções no T3SS de *Xac*. A perda total da patogenicidade em plantas susceptíveis, ocasionada pela deleção do gene *hrpG* do genoma de *Xac*, apresenta um resultado promissor para eventuais estudos do regulamento da transcrição do cluster *hrp*, assim como também a produção de soro policlonal específico contra a proteína *Xac* HrpE, com a finalidade de futuros experimentos de localização do pilus “*in vivo*”.

Acreditamos que este trabalho de doutorado deixa novas portas abertas a serem pesquisadas e novas questões em aberto a serem estudadas e respondidas sobre o sucesso da colonização bacteriana nos hospedeiros. Esperamos ter contribuído com nossa pesquisa, neste mundo fascinante que é a ciência e o entendimento dos mecanismos moleculares de virulência em *Xac*.

7-Referências bibliográficas

- Agrain C., Callebaut I., Journet L., Sorg I., Paroz C., Mota L. J. and Cornelis GR.** (2005a). Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **56**: 54-67.
- Agrain C., Sorg I., Paroz C. and Cornelis GR.** (2005b). Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol. Microbiol.* **57**: 1415-1427.
- Aizawa SI.** Bacterial flagella and the type III secretion systems. (2001). *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**: 157-164.
- Alegria MC.; Docena C.; Khater L.; Ramos CHI.; Da Silva ACR.; and Farah CS.** (2004). New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates of the type III Secretion System for the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *Journal of Bacteriology*, **186**: 6186-6179.
- Alfano JR, Collmer A.** Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. (1996). *Plant Cell*, **8**: 1683–1698.
- Alfano JR, Collmer A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**: 385–414.
- Al-Saadi A, Reddy JD., Duan YP., Brunings AM., Yuan Q., and Gabriel DW.** (2007). All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *MPMI*, **20**: 934–943.
- Al-Saadi A. and Gabriel, DW.** (2002). Molecular characterization of a new *Xanthomonas citri* strain isolated in Florida. *Phytopathology*, **92**, S3.
- Anderson, DM., Fouts DE., Collmer A. and Schneewind O.** (1999). Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12839–12843.

- Andrade MA., Chacón P., Merelo JJ. and Morán F.** (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Prot. Eng.*, **6**: 383-390.
- Baldini RL, Tahara ST, Rosato YB.** (1999). A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. *Plasmid.*, **42**: 126-33.
- Bartel PL, Fields S.** (1995). Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.*, **254**: 241-263.
- Bartetzko V., Sonnewald S., Vogel F., Hartner K., Stadler R., Hammes UZ., and Börnke F.** (2009). The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *MPMI*, **22**: 655–664.
- Birtalan SC., and Ghosh P.** (2001) Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 974–978.
- Bittel P. and Robatzek S.** (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**: 335-341.
- Blocker A., Komoriya K. and Aizawa S.** (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities. *PNAS*, **100**: 3027-3030.
- Bonas U., Shulte R., Fenselau S., Minsavage GV., Staskawicz BJ. and Stall RE.** (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **4**, 81-88.
- Brito B., Aldon D., Barberis P., Boucher C., Genin S.** (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **15**: 109–119.
- Brunings AS. and Gabriel DW.** (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathology*, **4**: 141-157.
- Büttner D. and Bonas U.** (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 312–319.
- Büttner D. and Bonas U.** (2002). Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal*, **21**: 5313-5322.

- Büttner D., Gürlebeck D., Noël LD. and Bonas U.** (2004). HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular Microbiology*, **54**: 755-768.
- Büttner D.; Lorenz C.; Weber E.; Bonas U.** (2006). Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by HpaC-and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Mol. Microbiol.*, **59**: 513-527.
- Büttner D., Nennstiel D., Klusener B., and Bonas U.** (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*, **184**: 2389–2398.
- Charkowski A., Alfano JR., Preston GM., Yuan J., He SY. and Collmer A.** (1998) The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind pectate. *J. Bacteriol.*, **180**: 5211–5217.
- Collazo CM., Zierler MK. and Galan JE.** (1995). Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invl* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol. Microbiol.*, **15**: 25-38.
- Cornelis, G. R.** (2000). Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 8778–8783.
- da Silva AC., Ferro JA., Reinach FC., Farah CS., Furlan LR., Quaggio RB., Monteiro-Vitorello CB., Van Sluys MA., Almeida NF., Alves LM., do Amaral AM., Bertolini MC., Camargo LE., Camarotte G., Cannavan F., Cardozo J., Chamberg F., Ciapina LP., Cicarelli RM., Coutinho LL., Cursino-Santos JR., El-Dorry H., Faria JB., Ferreira AJ., Ferreira RC., Ferro ML., Formighieri EF., Franco MC., Greggio CC., Gruber A., Katsuyama AM., Kishi LT., Leite RP., Lemos EG., Lemos MV., Locali EC., Machado MA., Madeira AM., Martinez-Rossi NM., Martins EC., Meidanis J., Menck CF., Miyaki CY., Moon DH., Moreira LM., Novo MT., Okura VK., Oliveira MC., Oliveira VR., Pereira HA., Rossi A., Sena JA., Silva C., de Souza RF., Spinola LA., Takita MA., Tamura RE., Teixeira EC., Tezza RI., Trindade dos Santos M., Truffi D., Tsai SM., White FF., Setubal JC., Kitajima JP.** (2002). Comparison of the genomes of

- two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **41**: 459-463.
- Dangl JL and Morel JB.** (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, **4**: 671–683.
- De Feyter R.; Yang Y.; and Gabriel DW.** (1993). Gene-for-genes interactions between Cotton R Genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **6**: 225-237.
- Deane J., Graham SC., Mitchell EP., Flot D., Johnson S., and Lea SM.** (2008). Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol. Microbiol.*, **69**, 267-276.
- Delaglio F., Grzesiek S., Vuister GW., Zhu G., Pfeifer J., Bax A.** (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. RMN*, **6**: 277-293.
- Dharmapuri S. and Sonti RV.** (1999). A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**: 53–59.
- Dickon Alley MRK.,** trabalho não publicado.
- Dolph PJ., Majerczak DR., Coplin DL.** (1988). Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in *Erwinia stewartii*. *J. Bacteriol.*, **170**: 865–871.
- Duan YP., Castaneda AL., Zhao G., Erdos G. and Gabriel DW.** (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **12**: 556–560.
- Dunger G., Relling VM., Tondo ML., Ielpi MBL., Orellano EG., Ottado J.** (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.*, **188**: 127–135.
- Dunger G., Arabolaza AL., Gottig N., Orellano EG. and Ottado J.** (2005). Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *hrp* cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathology* **54**: 781–788.
- Edqvist PT., Olsson J., Lavander M., Sundberg L., Forsberg A., Wolf-Waltz H., and Lloyd SA.** (2003). YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J. Bacteriol.*, **185**: 2259-2266.

- Evdokimov AG., Phan J., Tropea JE., Routzahn KM., Peters HK., Pokross M., and Waugh DS.** (2003) Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in *flagellar* biosynthesis and type III secretion. *Nat. Struct. Biol.*, **10**: 789–793.
- Fasman GD.** (1996). Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, p. 71-75.
- Ferris HU., Furukawa Y., Minamino T., Kroetz MB., Kihara M., Namba K., and Macnab RM.** (2005). FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J. Biol. Chemistry*, **280**: 41236-41242.
- Fouts DE., Badel JL., Ramos AR., Rapp RA., Collmer A.** (2003). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Hrp (Type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16**: 43-52.
- Fraser GM., Hirano T., Ferris HU., Devgan LL., Kihara M., and Macnab RM.** (2003). Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol. Microbiol.*, **48**, 1043-1057.
- Gabriel DW.** (2001). Citrus canker. In *Encyclopedia of Plant Pathology* (Maloy O.C. and Murray T.D., eds) 215-217.
- Gabriel DW., Kingsley MT., Hunter JE. and Gottwald TR.** (1989). Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**: 14-22.
- Gaudriault S., Brisset MN. and Barny MA.** (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted proteins. *FEBS Lett.*, **428**: 224-228.
- Ghosh P.** (2004). Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**: 771–795.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**: 205–227.
- Gophna U., Ron EZ. and Graur D.** (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal transfer events. *Gene*, **312**: 151–163.

- Gottwald TR, Sun X, Riley T, Graham JH, Ferrandino F, Taylor EL.** (2002). Georeferenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, **92**: 361-377.
- Gottwald TR., Graham JH., and Schubert TS.** (1997). An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leafminer. *Fruits (Paris)* **52**:383-390.
- Gottwald TR. and Graham JH.** (1992). A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*, **82**: 930–935.
- Gottwald TR., Graham JH., Civerolo EL., Barrett HC. and Hearn CJ.** (1993) Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Dis.*, **77**: 1004–1009.
- Graham JH., Gottwald TR., Cubero J., Achor DS.** (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, **5**: 1-15.
- Gürlebeck D., Frank T., Bonas U.** (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 233-255.
- Harding NE., Cleary JM., Ielpi L.** (1995). Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: Hui YH, Khachatourians G (eds) *Food biotechnology microorganisms*. VCH Publishers, New York, 495–514.
- Hauck P., Roger T., and He SY.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *PNAS*, **100**: 8577–8582.
- He SY., and Jin Q.** (2003). The Hrp pilus: learning from *flagella*. *Curr Opin Microbiol.*, **6**: 15-19.
- He SY., Nomura K., Whittam TS.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**: 181-206.
- He SY., Huang HC. and Collmer A.** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**: 1255–1266.

- Hogg DR.** (1985). Citrus canker in Argentina: A case history. Pages 8-10 in: Citrus Canker: An International Perspective. L. W. Timmer, ed. Citrus Research & Education Center, University of Florida, Lake Alfred.
- Hueck CJ.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**: 379-433.
- Huguet E., Hahn C., Wengelnik K. and Bonas U.** (1998). *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. Mol. Microbiol., **29**: 1379-1390.
- Jansson PE., Kenne L., Lindberg B.** (1975). Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res. **45**: 275–282.
- Jin Q., Hu W., Brown I., McGhee G., Hart P., Jones AL., and He SY.** (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. Mol Microbiol., **40**: 1129–1139.
- Johnson BA and Blevins RA.** (1994). NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. J. Biomol. NMR, **4**: 603-614.
- Jones JDG. and Dangl JL.** (2006). The plant immune system. Nature, **444**: 323-329.
- Journet L., Agrain C., Broz P., and Cornelis GR.** (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. Science **302**: 1757–1760.
- Kao CC., Barlow E., Sequeira L.** (1992). Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol., **174**: 1068–1071.
- Karavolos MH., Wilson M., Henderson J., Lee JJ., Khan CM.** (2005). Type III secretion of the *Salmonella* effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. J Bacteriol., **187**: 1559-1567.
- Katzen F., Becker A., Ielmini MV., Oddo CG., Ielpi L.** (1999). New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. Appl. Environ. Microbiol., **65**: 278–282.
- Kemp BP., Horne J., Bryant A., Cooper RM.** (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and

- enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **64**: 209–218.
- Kim JF. and Beer S.** (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin protein that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol.*, **180**: 5203-5210.
- Kim JG., Park BK., Yoo CH., Jeon E., Oh J., Hwang I.** (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *Journal of Bacteriol.*, **185**: 3155–3166.
- Kim JG., Jeon E., Oh J., Moon JS. and Hwang I.** (2004) Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in non-host plants. *J. Bacteriol.*, **186**: 6239–6247.
- Koebnik R.** (2001). The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol.*, **9**: 586-590.
- Koizumi M.** (1985). Citrus canker: The world situation. Pages 2-7 in: *Citrus Canker: An International Perspective*. L. W. Timmer, ed. Citrus Research & Education Center, University of Florida, Lake Alfred.
- Koster M., Bitter W., de Cock H., Allaoui A., Cornelis GR. and Tommassen J.** (1997). The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.*, **26**: 789–797.
- Kovach ME., Elzer PH., Hill DS., Robertson GT., Farris AM., Roop RM., Peterson KM.** (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, **166**: 175-176.
- Kubori T., Sukhan A., Aizawa SI., and Galan JE.** (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10225-10230.
- Kutsukake K., Minamino T., and Yokoseki T.** (1994). Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 7625-7629.
- Lavander ML., Sundber PJ., Edqvist SA., Lloyd H., Wof-Watz and Forsberg A. .** (2002). Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia*

- pseudotuberculosis is essential for bacterial survival but not for type III secretion. J. Bacteriol, **184**: 4500-4509.
- Lavander ML., Sundberg PJ., Edqvist., Lloyd SA, Wolf-Watz H. and Forsberg A.** (2003). Characterisation of the type III secretion protein YscU in *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv. Exp. Med. Biol., **529**: 109–112.
- Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki AP., et al.** (2001). HrpZ (PspH) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**: 289–294.
- Lindgren PB.** (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Phytopathol., **35**: 129–152.
- Lloyd SA., Sjöström M., Andersson S., Wolf-Watz H.** (2002). Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. Mol. Microbiol., **43**: 51-59.
- Lorenz C., Kirchner O., Egler M., Stüttmann J., Bonas U., Büttner D.** (2008b). HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. Mol. Microbiol., **69**: 344-360.
- Lorenz C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U. and Büttner, D.** (2008a). HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. PLOS Pathogens **4**: e1000094.
- Macnab R.M.** (2003). How bacteria assemble flagella. Annu. Rev. Microbiol., **57**: 77-100.
- Marie C., Broughton WJ., Deakin WJ.** (2001). Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? Curr. Opin. Plant Biol., **4**: 336-342.
- Marlovits TC., Kubori T., Sukhan A., Thomas DR., Galán JE., Unger VM.** (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. Science., **306**: 1040-1042.
- Minamino T., and Macnab R.M.** (2000a). Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. J. Bacteriol., **182**, 4906-4914.
- Minamino T., González-Pedrajo B., Yamaguchi K., Aizawa S., and Macnab R.M.** (1999). FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. Mol. Microbiol, **34**, 295-304.

- Moreira LM., De Souza RF., Digiampietri LA., Da Silva ACR., Setubal JC.** (2005). Comparative Analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* Complete Genomes. OMICS: A Journal of Integrative Biology, **9**: 43-76.
- Mudgett MB., Chesnokova O., Dahleck D., Clark ET., Rossier O., Bonas U., and Staskawicz BJ.** (2000). Molecular signal required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. Proc Natl Acad Sci USA, **97**: 13324–13329.
- Nakai K., and Kanehisa M.** (1991). Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria proteins. Struct. Funct. Genet., **11**: 95–110.
- Noël L., Thieme F., Gäbler J., Büttner D., Bonas U.** (2003). XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. J. Bacteriol., **185**: 7092–7102.
- Noël L., Thieme F., Nennstiel D. and Bonas U.** (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. Journal of Bacteriol., **184**: 1340-1348.
- Oh C., Heu S., Yoo JY., and Cho Y.** (1999). An *hrcU*-homologous gene mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra that lost pathogenicity on the host plant but was able to elicit the hypersensitive response on nonhosts. Mol. Plant-Microbe Interact., **12**: 633-639.
- Parsot C., Hamiaux C., and Page AL.** (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. Curr. Opin. Microbiol., **6**: 7–14.
- Paulucci AP., Hicks L., Machado A., Miranda MTM., Kay CM. and Farah C.S.** (2002). Specific sequences determine the stability and cooperativity of folding of the C-terminal half of tropomyosin. J. Biol. Chemistry, **277**: 39574-39584.
- Payne PL. and Straley SC.** (1999). YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. J. Bacteriol., **181**, 2852-2862.
- Pelicic V., Reytrat JM., and Gicquel B.** (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* Gene Confers Sucrose Sensitivity on Mycobacteria. J. of Bacteriol., **178**: 1197–1199.
- Preston GM., Studholme DJ., Caldelari I.** (2005). Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. FEMS Microbiol. Rev., **29**: 331-360.

- Ramos CRR., Abreu PAE., Nascimento ALTO. and Ho PL.** (2004). A high copy-T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **37**: 1103-1109.
- Riordan KE. and Schneewind O.** (2008). YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol. Microbiol.*, **68**: 1485-501.
- Rosenberg AH., Lade BN., Chui DS., Lin WS., Dunn JJ., Studier FW.** (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**: 125-135.
- Rosqvist R., Hakansson S., Forsberg A., and Wolf-Watz H.** (1995). Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*. *EMBO J.*, **14**: 4187-4195.
- Rossier O., Van den Ackerveken G. and Bonas U.** (2000). HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.*, **38**: 828-838.
- Rossier O., Wengelnik K., Hahn K., and Bonas U.** (1999). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 9368-9373.
- Schubert TS., Miller JW., and Gabriel DW.** (1996). Another outbreak of bacterial canker on citrus in Florida. *Pl. Dis.*, **80**: 1208.
- Schubert TS., Rizvi SA., Sun X., Gottwald TR., Graham JH. and Dixon WN.** (2001). Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-Again. *Plant Dis.*, **85**: 340-356.
- Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C., Abe A.** (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **98**: 11638-11643.
- Sorg JA., Miller NC., Schneewind O.** (2005). Substrate recognition of type III secretion machines -testing the RNA signal hypothesis. *Cell Microbiol.*, **7**: 1217-1225.
- Sorg I., Wagner S., Amstutz M., Müller SA., Broz P., Lussi Y., Engel A., and Cornelis GR.** (2007). YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J.* **26**: 3015-3024.

- Soto GE. and Hultgren SJ.** (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol.*, **181**: 1059-1071.
- Stall RE., Civerolo EL., Ducharme EP., Krass CJ., Poe SR., Miller JW., and Schoulties CL.** (1987). Management of citrus canker by eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Pages 900-905 in: Plant Pathogenic Bacteria, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. E. L. Civerolo, A Collmer, R. E. Davis, and A. G. Gillaspie, eds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Staskawicz BJ., Dahlbeck D., Keen NT.** (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6024–6028.
- Staskawicz BJ.** (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol.*, **125**: 73-76.
- Stebbins CE., and Galan JE.** (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, **414**: 77–81.
- Studier and Moffatt.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**: 113-130.
- Studier FW., Rosenberg AH., Dunn JJ., Dubendorff JW.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**: 60-89.
- Suzuki T., and Iino T.** (1981). Role of the *flaR* gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp. *J. Bacteriol.*, **148**: 973-979.
- Swarup S., De Feyter R., Brlansky RH. and Gabriel DW.** (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. *Phytopathology*, **81**: 802–809.
- Szurek B., Marois E., Bones U., and Van den Ackerveken G.** (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: Protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, **26**: 523-534.
- Szurek B., Rossier O., Hause G., and Bonas U.** (2002). Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.*, **46**: 13-23.

- Tahara TS., Mehta A., and Rosato YB.** (2003). Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* with leaf extract of the host plant (*Passiflorae edulis*). *Proteomics*, **3**: 95-102.
- Tamano K., Katayama E., Toyotome T., and Sasakawa C.** (2002). *Shigella* Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. *J. Bacteriol.*, **184**: 1244-1252.
- Tampakaki AP., Fadouloglou VE., Gazi AD., Panopoulos NJ., Kokkinidis M.** (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.*, **6**: 805-816.
- Tan MW.** (2002). Cross-species infections and their analysis. *Annu Rev. Microbiol.*, **56**: 539-565.
- Byoung-Moo L., Young-Jin P., Dong-Suk P., Hee-Wan K., Jeong-Gu K., Eun-Sung S., In-Cheol P., Ung-Han Y., Jang-Ho H., Bon-Sung K., Gil-Bok L., Hyungtae K., Hyun-Seok P., Kyong-Oh Y., Jeong-Hyun K., Chol-hee J., Nae-Hyung K., Jeong-Sun S. and Seung-Joo G.** (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, **33**: 577–586.
- Furutani A, Takaoka M, Sanada H, Noguchi Y, Oku T, Tsuno K, Ochiai H, Tsuge S.** (2009). Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact.* **22** :96-106.
- Gaboriaud C., Bissery V., Benchetrit T., and Mornon JP.** (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.*, **224**: 149-155.
- Jiang W., Jiang BL., Xu RQ., Huang JD., Wei HY., Jiang GF., Cen WJ., Liu J., Ge YY., Li GH., Su LL., Hang XH., Tang DJ., Lu GT., Feng JX., He YQ., Tang JL.** (2009). Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact.*, **22**: 1401-1411.
- Minamino T., Ferris HU., Moriya N., Kihara M., and Namba K.** (2006). Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *J. Mol. Biol.*, **362**: 1148-1158.

- Rajagopal L., Sundari CS., Balasubramanian D., Sonti RV.** (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.*, **415**:125-128.
- Schneider TD., Stephens RM.** (1990). Sequence Logos: A new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6097-6100.
- Thompson JD., Higgins DG., Gibson TJ.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**:4673-80.
- Van Eerde A., Hamiaux C., Perez J., Parsot C., and Dijkstra BW.** (2004) Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. *EMBO Rep.*, **5**: 477–483.
- Van Gijsegem F., Vasse J., Camus JC., Marena M., and Boucher C.** (2000). *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.*, **36**: 249–260.
- Varughese KI.** (2002). Molecular recognition of bacterial phosphorelay proteins. *Curr Opin Microbiol. Review*, **5**: 142-148.
- Veenendaal AKJ., Hodgkinson JL., Schwarzer L., Stabat D., Zenk SF. and Blocker AJ.** (2007). The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing an translocon insertion. *Molecular Microbiology*, **63**: 1719–1730.
- Viboud GI., So SSK., Ryndak MB. and Bliska JB.** (2003). Proinflammatory signaling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol.*, **47**: 1305–1315.
- Viprey V., Del Greco A., Golinowski W., Broughton WJ., Perret X.** (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol.*, **28**: 1381-1389.
- Waterborg JH., Matthews HR.** (1994). The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.*, **32**: 1-4.
- Waters RC., O'Toole PW., Ryan KA.** (2007). The FliK protein and flagellar hook-length control. *Protein Sci.*, **16**: 769-780.

- Wattiau P., Woestyn S., Cornelis GR.** (1996). Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*, **20**: 255–262.
- Weber E., Koebnik R.** (2006). Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.*, **188**: 1405-1410.
- Wengelnik K. and Bonas U.** (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Journal of Bacteriol.*, **178**: 3462-3469.
- Wiesand U., Sorg I., Amstutz M., Wagner S., Van den Heuvel J., Lühns T., and Cornelli GR.** (2009). Structure of the type III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *J. Mol. Biol.*, **385**: 854-866.
- Williams AW., Yamaguchi S., Togashi F., Aizawa SI., Kawagishi I., Macnab RM.** (1996). Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **178**: 2960-2970.
- Williams AW., Yamaguchi S., Togashi F., Aizawa S., Kawagishi I., and Macnab RM.** (1996). Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **178**: 2960-2970.
- Yang S., Quan P., San Francisco M., Yongjun W., Quan Z., Ching-Hong Y.** (2008). Type III Secretion System Genes of *Dickeya dadantii* 3937 are induced by plant phenolic acids, *PLOS ONE*, **3**: 2973.
- Yu J., Penaloza-Vazquez A., Chakrabarty AM., Bender CL.** (1999). Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol. Microbiol.*, **33**: 712–720.
- Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H.B., Nguyen, H.V., Miller, S.I., Finlay, B.B. and Strynadka, N.C.J.** (2008). Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* **453**, 124-127.

Manuscrito em preparação

Functional analysis of HrpB2 and its interactions with an auto-cleavage fragment liberated from the cytosolic domain of HrcU of the *Xanthomonas* Type III Secretion System

Paola A. Cappelletti¹, Rafael Freitas dos Santos¹, Alexandre M. do Amaral^{2,3}, Rafael Augusto Homem³, Thaís dos Santos Souza¹, Marcos A. Machado³ and Chuck S. Farah^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;* ²*EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil;* ³*Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeiropolis, SP, Brazil.*

SUMMARY

Bacterial type III secretion systems deliver protein virulence factors to host cells. Here we characterize the interaction between HrpB2, a small protein secreted by the *Xanthomonas axonopodis* pv. citri type III secretion system, and the cytosolic domain of the inner membrane protein HrcU, a paralog of the flagellar protein FlhB. We show that a recombinant fragment corresponding to the C-terminal cytosolic domain of HrcU produced in *E. coli* suffers cleavage within a conserved Asn264-Pro265-Thr266-His267 sequence. A recombinant HrcU cytosolic domain with N264A, P265A, T266A mutations at the cleavage site (HrcU_{AAAH}) was not cleaved and interacted with HrpB2. Furthermore, a polypeptide corresponding to the sequence following the NPTH

cleavage site also interacted with HrpB2 indicating that the site for interaction is located after the NPTH site. Non-polar deletion mutants of the *hrcU* and *hrpB2* genes resulted in a total loss of pathogenicity in susceptible citrus plants and disease symptoms could be fully recovered by expression of HrpB2 and partially recovered by the expression of HrcU from extrachromosomal plasmids. Complementation of the $\Delta hrcU$ mutant with HrcU_{AAAH} produced the same canker lesions than observed when complemented with wild-type HrcU but not the same secretion of HrpB2, suggesting that pathogenicity may be dependent on an intact and cleavable NPTH site in HrcU for total functionality of T3SS in *Xac*. Site directed mutagenesis studies showed that the highly conserved C-terminus of HrpB2 is essential for the development of citrus canker symptoms in host tissue.

Keywords: citrus canker, *hrp* locus, phytopathogen, T3SS.

* to whom correspondence should be addressed:

Chuck S. Farah

Dept. de Bioquímica, Instituto de Química

Universidade de São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes 748

São Paulo, SP

Brazil 05508-000

Tel: (+55 11) 3091-8519

FAX: (+55 11) 3091-3312 ext 204;

e-mail: chsfarah@iq.usp.br

SÚMULA CURRICULAR

NOME: Paola Alejandra Cappelletti

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: Córdoba-Argentina, 26/04/1980.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Pós Graduação Universidade de São Paulo-SP/2004-2009. Doutorado em Bioquímica na área de bioquímica de microorganismos. Bolsista da FAPESP.
- Graduação Universidade Nacional de Córdoba-Faculdade de Ciências Químicas-Córdoba /Argentina/1998-2003. Licenciatura em Química.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

01/10/2009-atual Instituto Nacional de Câncer (INCA)-Laboratório de Biologia Molecular do CEMO (Centro de Transplante da Medula Óssea). Bolsista de nível superior desenvolvendo trabalhos de biologia molecular na área de Leucemia Mieloide Crônica (LMC), baixo a direção da Dra. Ilana Renault Zalcberg.

16/04/2004-01/03/2009 Universidade de São Paulo, Instituto de Química, departamento de Bioquímica. Desenvolvimento do projeto de doutorado: “Identificação e análise funcional e estrutural de interações proteína-proteína do Sistema de Secreção do tipo III de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*”.

1/07/2002-22/09/2003 Universidade Nacional de Córdoba, Faculdade de Ciências Químicas, Departamento de Química Biológica. Desenvolvimento do projeto de iniciação científica: "Interação de enterotoxinas da família da toxina da cólera em células epiteliais".

EXPERIÊNCIA DOCENTE

2º Semestre de 2007- Estagiária e bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina QBQ316-Bioquímica Experimental, ditada para o curso de Farmácia da Universidade de São Paulo, baixo a supervisão do Prof. Dr. Sandro Roberto Marana.

1ºSemestre de 2007- Estagiária e bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina QBQ3400-Bioquímica Metabólica, ditada para o curso de Química da Universidade de São Paulo, baixo a supervisão do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah.

2ºSemestre de 2006- Estagiária e bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina QBQ316-Bioquímica Experimental, ditada para o curso de Farmácia da Universidade de São Paulo, baixo a supervisão do Prof. Dr. Sandro Roberto Marana.

1ºSemestre de 2006- Estagiária e bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina QBQ3400-Bioquímica Metabólica, ditada para o curso de Química da Universidade de São Paulo, baixo a supervisão da Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros.

ATUALIZAÇÃO PROFISSIONAL

2005-2010 Cursos

- Seqüenciamento e análise de fragmentos através de eletroforese capilar 3130/3130XL, Centro de treinamento Applied Biosystems, São Paulo-SP.
- Avanços em engenharia de proteínas e síntese de peptídeos, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ.
- Investigação de estruturas de proteínas por RMN, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas-SP.
- Análise proteômica de fungos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

2006-2007 Participação em congressos

- XXXVI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts.
- XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

1999-2003 Participação em palestras

- Importância da biologia molecular na experimentação e luta contra doenças que afetam a população-Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina.
- As plantas medicinais como fonte de novas drogas/ Os antibióticos e os fatores de virulência-Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina.
- Novas estratégias na prevenção de doenças infecciosas/ Avanços na vacinação-Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina.
- Estudos computacionais em nano estruturação eletroquímica-Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina.

IDIOMAS

- Português: comunicação verbal, leitura e escrita.
- Espanhol: comunicação verbal, leitura e escrita.
- Inglês: habilidade de leitura e tradução.