BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
21034

recebido em
14/03/05
Kauê
A. Elias

S/SNE = 1446540

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

OK - dedalus
22/06/05
OK - terminae
23/06/05

**Identificação de interações proteína-proteína envolvendo os
produtos dos *loci hrp*, *vir* e *rpf* do fitopatógeno
Xanthomonas axonopodis pv. *citri***

MARCOS CASTANHEIRA ALEGRIA

Tese de doutorado submetida ao Departamento de Bioquímica
do Instituto de Química da Universidade de São paulo

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo

2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010526

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Alegria, Marcos Castanheira

A366i Identificação de interações proteína-proteína envolvendo
os produtos dos *loci hrp*, *vir* e *rpf* do fitopatógeno *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri* / Marcos Castanheira Alegria. - São
Paulo, 2004.
234p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador Farah, Shaker Chuck

I. Proteína-proteína : Interação : Bioquímica 2. Genoma :
Biologia molecular I. T. II. Farah, Shaker Chuck, orientador.

574.19245 CDD

**“Identificação de integrações proteína-proteína
envolvendo os produtos dos *Loci hrp, vir e rpf* de
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*”**

MARCOS CASTANHEIRA ALEGRIA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. SHÁKER CHUCK FARAH
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA
IQ – USP

Prof. Dr. FREDERICO JOSÉ GUEIROS FILHO
IQ – USP

Profa. Dra. MARIE ANNE VAN SLUYS
IB – USP

Profa. Dra. REGINA LÚCIA BALDINI
ICB – USP

SÃO PAULO
24 de SETEMBRO 2004

“Se eu pudesse deixar algum presente a vocês, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos...

Deixaria para vocês, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação...

E quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

(M. Gandhi)

*À minha querida Josélia pelo amor, cumplicidade
e momentos maravilhosos.*

*Aos meus amados pais, Joaquim e Emília, minha eterna
gratidão pelas oportunidades, carinho e apoio em todas as minhas decisões.*

Meu profundo respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Chuck Farah pela oportunidade, liberdade científica e, principalmente, pelos exemplos.

À Cássia Docena e Letícia Khater pela amizade e colaboração na execução deste trabalho.

À Dra. Izaura, Elisa, Ilda e Marcelo pelo auxílio constante.

Aos amigos do laboratório Adriana, Luís, Eric, Sandro, Áurea, Doro, DT, Daniela, Leonor, Elaine, Carlos, Ângela, Cristiane, Jean e Alessandra pelo ótimo ambiente de trabalho e companheirismo.

Agradecimento especial à Dona Cleusa pela amabilidade e doçura.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio pelas discussões filosóficas...

Às queridas Vivian, Aline e Alice pelo carinho e preocupação.

Aos queridos José e Henrriete pela consideração e carinho.

À todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste projeto.

Este trabalho foi realizado graças ao suporte científico da FAPESP.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
Formas de Controle do Cancro Cítrico	9
Mecanismo de Infecção de <i>Xac</i>	10
Projeto Genoma <i>Xac</i>	11
Bases Moleculares da Virulência de Patógenos Bacterianos de Plantas	12
Sistemas de Secreção de Patógenos Gram-Negativos	18
Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS)	22
Mecanismo de Translocação pelo Sistema III e Proteínas Translocadas	31
Sistema de Secreção do Tipo IV (TFSS)	32
Proteínas Relacionadas a Rpf/"Quorum Sensing"	36
Estudos Funcionais do Genoma	39
Sistema Duplo-Híbrido de Levedura	40
Seleção das Proteínas de <i>Xac</i> para serem Utilizadas como Iscas na	
Triagem da Biblioteca Utilizando o Sistema Duplo-Híbrido de Levedura	44
OBJETIVOS	58
MATERIAIS E MÉTODOS	59
Preparação das Bibliotecas de DNA Genômico de <i>Xac</i>	59
Nebulização do DNA Genômico de <i>Xac</i>	59
Reparo do DNA Genômico Nebulizado e Purificação	60
Reação de Ligação	61
Transformação de Células Eletrocompetentes DH10B	61
Preparo das Células Eletrocompetentes	61
Transformação das Células DH10B por Eletroporação	61
Análise dos Clones Transformantes	62
Transferência da Biblioteca Genômica de <i>Xac</i> em pOAD para <i>E. coli</i>	62
Amplificação das Bibliotecas Genômicas	63
Purificação das Bibliotecas Amplificadas	64

Análise da Amplificação das Bibliotecas, Dosagem e Mistura	64
Escolha dos Genes para Servirem como Iscas no Sistema	
Duplo-Híbrido	65
Amplificação das ORFs de Interesse	69
Reação de ligação entre os produtos da PCR e o Vetor pOBD	70
Cepas de Levedura	70
Transformação Rápida de Levedura com o Plasmídeo pOBD	71
Teste de Auto-ativação do gene repórter <i>GAL1-HIS3</i>	72
Teste de Auto-ativação do gene repórter <i>GAL2-ADE2</i>	72
Teste de Auto-ativação do gene repórter <i>GAL7-LacZ</i>	72
Transformação da Linhagem PJ694-a Contendo as Iscas com a	
Biblioteca Genômica de <i>Xac</i>	73
Identificação de Possíveis Falso-Positivos: Auto-Ativação através	
dos Componentes da Biblioteca Genômica.	74
Identificação de Falso-Positivos	74
Análise dos Clones Positivos	74
Transformação de Células de <i>E. coli</i> e Recuperação dos Vetores	75
Seqüenciamento dos Vetores pOAD-presa e pOBD-isca Obtidos	
nos Ensaio de Duplo-Híbrido	75
Presas Utilizadas como Iscas	76
Teste de Recombinação	76
RESULTADOS	77
Biblioteca Genômica de <i>Xac</i>	77
Preparação do Vetor pOBD	77
DNA Genômico de <i>Xac</i>	77
Preparação das Sub-bibliotecas Genômicas	77
Extração das Bibliotecas em Larga Escala	80
Amplificação e Clonagem das Iscas no Vetor pOBD	81
Identificação de Falso-Positivos	81
Ensaio de Auto-ativação das Iscas	82
Análise do Repórter <i>GAL7-lacZ</i>	83

Triagem das Iscas utilizando o Ensaio de Duplo-Híbrido	83
Controles Positivos da Triagem	84
Teste de Recombinação	85
Interações Proteína-Proteína Identificadas pelo Ensaio Duplo-Híbrido	87
Interações Envolvendo o TTSS	88
Interações Envolvendo o TFSS-plasmídeo	92
Interações Envolvendo o TFSS-cromossomo	93
Interações Envolvendo o Sistema de “Quorum-Sensing”/Rpf	95
DISCUSSÃO	125
Interações do TTSS	127
Interações envolvendo HrpG	127
Interações Envolvendo HrpB2 e HrcU	133
Interações Envolvendo HrpB1, HrpD6 e HrpW	135
Interações envolvendo HrpB4	137
Interações envolvendo HrcN	139
Interações Envolvendo HpaA, HpaB e HrcV	140
Interações do TFSS-plasmídeo	145
Interações Homotrópicas Envolvendo TrwA (XACb0025)	149
Interações Envolvendo as Proteínas Hipotéticas XACb0032 e XACb0033	150
Interações Homotrópicas Envolvendo XACb0035	150
Interações Envolvendo VirB1 e VirB9 do Plasmídeo	151
Interações Envolvendo XACb0042 e VirB6	152
Interações Envolvendo XACb0043 e um Gene Adjacente ao <i>locus tra/trw</i> do pXAC64	153
Interações do TFSS-cromossomo	158
Interações envolvendo a proteína VirD4-cromossomo	158
Interações Homotrópicas Envolvendo VirB11-cromossomo	163
Interações Envolvendo XAC2622 e VirB9	164
Interações do Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf	167
RpfC: Estrutura e Função	168

Interações entre RpfC e RpfG	170
Interações entre RpfC e RpfF	171
Interações entre RpfC e CmfA	173
CONCLUSÕES	179
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
Anexo- Resumo das Atividades Desenvolvidas entre Março/99 e Maio/01:	
Expressão da Miosina de Músculo Esquelético na Levedura <i>Pichia pastoris</i>	190
Publicações	201
Curriculum vitae	233

ABREVIATURAS

3AT- 3-amino-1,2,4-triazol

a.a.- aminoácido

ATP- trifosfato de adenosina

CHP- proteína hipotética conservada

HP- proteína hipotética

HR- Resposta de Hipersensibilidade (“Hypersensitive Response”)

LMC- larva minadora dos citros

pv.- patovar

RR- Regulador de Resposta

TFSS- Sistema de Secreção do Tipo IV (“Type IV Secretion System”)

TTSS- Sistema de Secreção do Tipo III (“Type III Secretion System”)

Xac- Xanthomonas axonopodis pv. *citri*

Xcc- Xanthomonas campestris pv. *campestris*

Xcv- Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*

XCHP- proteína hipotética conservada em *Xanthomonas*

RESUMO

O Cancro Cítrico, um dos mais graves problemas fitossanitários da citricultura atual, é uma doença causada pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*).

Um estudo funcional do genoma de *Xac* foi iniciado com o intuito de identificar interações proteína-proteína envolvidas em processos de patogenicidade de *Xac*. Através da utilização do sistema duplo-híbrido de levedura, baseado nos domínios de ligação ao DNA e ativação da transcrição do GAL4, nós analisamos os principais componentes dos mecanismos de patogenicidade de *Xac*, incluindo o Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS), Sistema de Secreção do Tipo IV (TFSS) e Sistema de “Quorum Sensing” composto pelas proteínas Rpf. Componentes desses sistemas foram utilizados como iscas na triagem de uma biblioteca genômica de *Xac*.

O TTSS é codificado pelos genes denominados *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”), *hrc* (“*hrp* conserved”) e *hpa* (“*hrp* associated”) localizados no *locus hrp* do cromossomo de *Xac*. Esse sistema de secreção é capaz de translocar proteínas efetoras do citoplasma bacteriano para o interior da célula hospedeira. Nossos resultados mostraram novas interações proteína-proteína entre componentes do próprio TTSS além de associações específicas com uma proteína hipotética: 1) HrpG, um regulador de resposta de um sistema de dois componentes responsável pela expressão dos genes *hrp*, e XAC0095, uma proteína hipotética encontrada apenas em *Xanthomonas spp*; 2) HpaA, uma proteína secretada pelo TTSS, HpaB e o domínio C-terminal da HrcV; 3) HrpB1, HrpD6 e HrpW, 4) HrpB2 e HrcU e 5) interações homotrópicas envolvendo a ATPase HrcN.

Em *Xac*, foram encontrados dois *loci vir* que codificam proteínas que possuem similaridade com componentes do TFSS envolvido em processos de conjugação/secreção bacteriana: TFSS-plasmídeo localizado no plasmídeo pXAC64 e TFSS-cromossomo localizado no cromossomo de *Xac*. O TFSS-plasmídeo, o qual possui maior similaridade com sistemas de conjugação, mostrou interações envolvendo proteínas cujos genes estão localizados na mesma região do plasmídeo pXAC64: 1) interação homotrópica da TrwA; 2)

XACb0032 e XACb0033; 3) interações homotrópicas da proteína XACb0035; 4) VirB1 e VirB9; 5) XACb0042 e VirB6; 6) XACb0043 e XACb0021b.

O TFSS-cromossomo apresentou interações envolvendo as proteínas: 1) VirD4 e um grupo de 12 proteínas que contém similaridade entre si, incluindo XAC2609 cujo gene encontra-se no *locus vir*; 2) XAC2609 e XAC2610; 3) Interações homotrópicas da VirB11; 4) XAC2622 e VirB9.

A análise do sistema de “Quorum-Sensing” composto pelas proteínas Rpf mostrou interações envolvendo componentes do próprio sistema: 1) RpfC e RpfF; 2) RpfC e RpfG; 3) interações homotrópicas da RpfF; 4) RpfC e CmfA, uma proteína similar a Cmf de *Dictyostelium discoideum* que, neste organismo, é fundamental para processos de “quorum-sensing”.

As interações proteína-proteína encontradas permitiram-nos entender melhor a composição, organização e regulação dos fatores envolvidos na patogenicidade de *Xac*.

ABSTRACT

Citrus Canker, caused by the bacterial plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) presents one of the most serious problems to Brazilian citriculture.

We have initiated a project to identify protein-protein interactions involved in *pathogenicity* of *Xac*. Using a yeast two-hybrid system based on GAL4 DNA-binding and activation domains, we have focused on identifying interactions involving subunits, regulators and substrates of: Type Three Secretion System (TTSS), Type Four Secretion System (TFSS) and Quorum Sensing/Rpf System. Components of these systems were used as baits to screening a random *Xac* genomic library.

The TTSS is coded by the *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity), *hrc* (*hrp* conserved) and *hpa* (*hrp* associated) genes in the chromosomal *hrp* locus. This secretion system can translocate effector proteins from the bacterial cytoplasm into the host cells. We have identified several previously uncharacterized interactions involving: 1) HrpG, a two-component system response regulator responsible for the expression of *Xac hrp* operons, and XAC0095, a previously uncharacterized protein encountered only in *Xanthomonas spp*; 2) HpaA, a protein secreted by the TTSS, HpaB and the C-terminal domain HrcV; 3) HrpB1, HrpD6 and HrpW; 4) HrpB2 and HrcU; 5) Homotropic interactions were also identified for the ATPase HrcN.

Xac contains two *virB* gene clusters, one on the chromosome and one on the pXAC64 plasmid, each of which codes for a unique and previously uncharacterized TFSS. Components of the TFSS of pXAC64, which is most similar to conjugation systems, showed interactions involving proteins coded by the same locus: 1) Homotropic interactions of TrwA; 2) XACb0032 and XACb0033; 3) XAC0035 homotropic interactions; 4) VirB1 and VirB9; 5) XACb0042 and VirB6; 6) XACb0043 and XACb0021b.

Components of the chromosomal TFSS exhibited interactions involving: 1) VirD4 and a group of 12 uncharacterized proteins with a common C-terminal domain motif, include XAC2609 whose gene resides within the *vir* locus; 2) XAC2609 and XAC2610; 3) Homotropic interactions of VirB11; 4) XAC2622 and VirB9.

Analysis of Quorum Sensing/Rpf System components revealed interactions between the principal Rpf proteins which control *Xanthomonas* quorum sensing: 1) RpfC and RpfF; 2) RpfC and RpfG; 3) RpfF homotropic interactions; 4) RpfC and CmfA, a protein that presents similarity with Cmf (conditioned medium factor) of *Dictyostelium discoideum*, which controls quorum sensing in this organism.

The protein-protein interactions that we have detected reveal insights into the composition, organization and regulation of these important mechanisms involved in *Xanthomonas* pathogenicity.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de grande destaque na citricultura mundial como o principal produtor e maior exportador, respondendo por cerca de 80% do comércio mundial de suco de laranja (*Citrus spp.*) (Estanislau *et. al.*, 2001). Com uma área cultivada de 820 mil hectares, 77% das quais localizada na região Sudeste, a laranja representa 49% de toda a produção brasileira de frutas. Apesar do grande potencial produtivo, que pode chegar a mais de 40t/hectare (Estanislau *et. al.*, 2001), a cultura de citros é um alvo constante de inúmeras pragas e doenças que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, são capazes de causar danos irreversíveis que resultam na queda da produtividade e na qualidade dos frutos. Dentre as principais doenças com grande impacto econômico destacam-se a Tristeza dos Citros, a qual dizimou milhares de hectares no Brasil na década de 30, a Morte Súbita dos Citros, a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e o Cancro Cítrico.

O Cancro Cítrico, um dos mais graves problemas fitossanitários da citricultura atual, é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac). Os membros do gênero *Xanthomonas* são responsáveis por doenças economicamente importantes em muitos hospedeiros diferentes, incluindo citros, arroz, uva, feijão e algodão (Swings e Civerolo, 1993). Esta bactéria não requer um vetor específico de infecção, sendo transferida de um hospedeiro para outro através da ação do vento, chuva ou manuseio.

Os tecidos aéreos como ramos, folhas e frutos são os mais susceptíveis ao ataque da Xac. Altamente contagiosa, a bactéria é resistente e consegue sobreviver em vários ambientes por longos períodos. Os primeiros sintomas aparecem normalmente nas folhas de uma a oito semanas após a infecção/inoculação, dependendo das condições de umidade e temperatura (Fundecitrus, 2004). Inicialmente são observadas pequenas lesões amareladas nos tecidos infectados que adquirem uma tonalidade escura com o avanço da doença (Fig. 1a-c). As lesões causadas pelo Cancro resultam em queda de frutos, folhas e, conseqüentemente, da produtividade.

A mais antiga constatação do Cancro Cítrico foi feita em folhas herbarizadas de *Citrus medica* coletadas na Índia entre 1827-1831 (Fawcett e

Jenkins, 1933). Entretanto, a doença foi descrita pela primeira vez em 1915 quando esta foi introduzida nos Estados Unidos (Christiano, 2003).

Figura 1- Sintomas observados durante a infecção de Xac em citros. a) Nas folhas ocorre o aparecimento de lesões escuras salientes com a formação de um halo amarelado a sua volta. b) Os ramos atingidos formam crostas salientes de coloração parda. c) Nos frutos são observadas manchas salientes em toda a superfície. Em estágios avançados da doença as lesões podem resultar no rompimento das cascas e conseqüente depreciação dos frutos (Fundecitrus, 2004).

O Cancro Cítrico é originário do Sudoeste da Ásia, mesmo centro de origem dos citros, e sua disseminação ocorreu principalmente pelo transporte de mudas atingindo rapidamente várias regiões do mundo como Japão, Austrália e os continentes africano e americano. Em muitos países, a doença ocorre de forma endêmica como na Argentina, Paraguai e Uruguai. O sucesso da erradicação de Xac foi atingido por poucos países como a Austrália, África do Sul e Nova Zelândia. Nos Estados Unidos, apesar de ter sido erradicado em 1933, novos focos foram encontrados nos anos de 1986 e 1995 (Schubert *et al.*, 2001).

No Brasil, sua primeira constatação ocorreu no município paulista de Presidente Prudente em 1957 (Rossetti, 1977; Rossetti *et al.*, 1981). Na tentativa de conter e erradicar a doença do parque citrícola brasileiro, foi criada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC) nos anos 70. Com o término desta campanha, exceto pelo Estado de São Paulo que até hoje mantém a prática da erradicação, o Cancro Cítrico foi disseminado para outras regiões do país como Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais (Ferchtnberger *et al.*, 1997) e, mais recentemente, no estado de Roraima (Nascimento *et al.*, 2003).

A campanha de erradicação em São Paulo, apesar de não conseguir eliminar totalmente os focos de seus pomares, permitiu um relativo controle da

doença e impediu a sua introdução na área nobre da citricultura paulista até o início dos anos 90.

Introduzida no Brasil em 1996, a Larva Minadora dos Citros (LMC-*Phyllocnistis citrella*) foi associada a um aumento drástico da incidência do Cancro Cítrico. A LMC ataca, normalmente, brotações novas de todas as variedades cítricas. Os ovos são depositados nas folhas novas onde, após a eclosão, a LMC penetra rapidamente no tecido foliar iniciando a construção das minas típicas em forma de serpentina, causando lesões no limbo foliar (Chagas *et al.*, 2000) (Fig. 2). LMC normalmente ataca folhas mas, no entanto, em alta população, pode ser observada nos ramos das vegetações novas e em frutos. Os danos diretos causados por este agente incluem a queda prematura das folhas, redução do crescimento e do desenvolvimento de brotações, assim como perdas na produtividade. Entretanto, os danos indiretos são os mais preocupantes uma vez que as lesões causadas pela LMC expõem o mesófilo foliar que serve de entrada para fungos e bactérias, incluindo *Xac*. Folhas com injúrias de LMC apresentam maior incidência de Cancro do que folhas não infestadas (Sohi e Sandhu, 1968). Em propriedades contendo focos de *Xac* e LMC é comum encontrarmos lesões de Cancro nas mesmas folhas/regiões das galerias formadas pelas larvas (Fig. 2-c).

Figura 2- a) Larva Minadora dos Citros (LMC-*Phyllocnistis citrella*) b) Formação de galerias em folhas de citros durante os estágios de desenvolvimento da larva. c) Cancro Cítrico em folhas. A evolução da doença acompanha as lesões causadas pela LMC (Fundecitrus, 2004).

A principal fonte de inoculo de *Xac* são as plantas de citros infectadas pela bactéria, a qual sobrevive de uma estação para a outra em lesões nos ramos e nas folhas das plantas hospedeiras. Na ausência de citros, *Xac* possui um período relativamente curto de sobrevivência, podendo persistir por apenas

alguns meses na rizosfera de gramíneas e em folhas e frutos em decomposição (Goto *et al.*, 1985; Christiano, 2003).

Tecidos foliares em expansão (jovens) são mais suscetíveis que tecidos maduros. A suscetibilidade ao Cancro Cítrico em relação a idade da folha está associada, segundo Stall *et al.* (1982), ao desenvolvimento de resistência do mesófilo à multiplicação de *Xac* em folhas maduras. Cultivares resistentes ao Cancro, como o Mandarin, e tecidos adultos comportam-se como suscetíveis quando inoculadas por transmissão mecânica. Aparentemente, a resistência observada em condições de campo pode estar relacionada com o número e a estrutura dos estômatos (Brunings e Gabriel, 2003). Nenhuma variedade de citros é totalmente imune ao Cancro Cítrico mas o comportamento dos cultivares mais importantes para o Brasil apresentam resistência variada com relação à doença. Assim, foram classificados da seguinte forma (Rossetti, 2001):

- 1) **Altamente Suscetíveis:** pomelo Marsh Seedless, limão Galego, limão Siciliano, tangelo Orlando e lima de Umbigo.
- 2) **Suscetíveis:** laranjas doces Bahia, Bahianinha, Seleta, Hamlin, Vermelha e Piralima.
- 3) **Moderadamente Suscetíveis:** tangor Murcote, tangerina Cravo, laranja Natal.
- 4) **Moderadamente Resistentes:** mexerica do Rio, tangerina Dancy, laranjas doces Lima Verde, Navelina, Sanguínea de Mombuca, Valência, Pêra preimunizada e cidra Diamante.
- 5) **Resistentes:** tangerinas Poncan, Satsuma, Clementina e Tankan, laranjas doces Folha Murcha e Moro, lima ácida Taiti, laranja Azeda e Double Cálice
- 6) **Altamente Resistente:** Calamondin.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*, como os outros membros do gênero *Xanthomonas*, apresenta reação Gram-negativa, respiração aeróbica, formato baciliforme e motilidade por um flagelo polar (monotríquia). É capaz de produzir polissacarídeos extracelulares que auxiliam na dispersão e sobrevivência (Goto e Hyodo, 1985). A partir de uma cultura ou através de um tecido infectado, *Xac* pode ser isolada e facilmente transmitida mecanicamente para outros tecidos de citros e plantas indicadoras.

Devido à existência de outros grupos patovares e variantes, *Xanthomonas axonopodis* patogênicas do gênero *Citrus* foram classificadas em cinco grupos, diferenciados basicamente pelo tipo de hospedeiro e sintomatologia (Gabriel *et al.*, 1989; Feichtenberger *et al.*, 1997).

1) Cancro Cítrico Asiático ou Cancrose A: causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), afeta grande número de espécies da família *Rutacea* e está disseminada em muitas regiões da Ásia, África, Oceania e Américas, sendo a mais importante e severa;

2) Cancro Cítrico B ou Cancrose B: causada pela estirpe B de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* afeta menos hospedeiros que Xac, sendo mais agressiva em limões verdadeiros (*Citrus limon*) e lima ácida Galego (*Citrus aurantifolii*), estando restrita a Argentina, Paraguai e Uruguai;

3) Cancrose do Limoeiro galego ou Cancrose C: Causada pela estirpe C de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* afeta principalmente a lima ácida Galego (*Citrus aurantifolii*) e está restrita a algumas regiões do estado de São Paulo;

4) Cancrose D: Causada pela estirpe D de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* restrita a lima ácida Galego (*Citrus aurantifolii*) e ocorre no México;

5) Mancha bacteriana dos citros: Causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*, afeta principalmente porta-enxertos citrumelos Swingle e ocorre em viveiros da Flórida.

A taxonomia de *Xanthomonas* apresenta muitas controvérsias, sendo constantemente revisada (Schaas *et al.*, 2000). Foram feitas propostas de reclassificação das estirpes do grupo que causa Cancro Cítrico a fim de criar uma nova espécie denominada *Xanthomonas citri* (Brunings e Gabriel, 2003). Neste trabalho, utilizaremos a nomenclatura usual de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Formas de Controle do Cancro Cítrico

A principal medida de controle do Cancro Cítrico é a exclusão e erradicação de plantas doentes. A implantação de quebra-ventos arbóreos reduz a velocidade do vento resultando em condições menos propícias à disseminação da Xac assim como diminui os ferimentos provocados pelo vento. Apesar de controvérsias, o programa de erradicação ainda se mostra

eficiente no controle da doença mesmo após o sinergismo da interação *Xac* e LMC. A utilização de compostos bactericidas, além do alto custo, não é eficiente no combate e controle da doença.

Resumo do Mecanismo de Infecção de *Xac*

O Mecanismo de patogenicidade da *Xac* envolve os seguintes aspectos (Brunings e Gabriel, 2003):

1) *Xac* penetra no hospedeiro através dos estômatos ou pequenos ferimentos. As ações do vento, chuva e manuseio auxiliam esse processo.

2) Uma vez no espaço mesofílico do hospedeiro, *Xac* multiplica-se nos espaços intercelulares e secreta polissacarídeos altamente hidrofílicos (principalmente goma xantana). O acúmulo da goma resulta em um aspecto de encharcamento ("water-soaking") no tecido infectado após os primeiros dias de infecção.

3) Ocorre um aumento da permeabilidade das células do hospedeiro que resulta na perda de nutrientes.

4) O aumento da população de *Xac* ativa sistemas de secreção específicos que permitem que proteínas efetoras sejam secretadas e que algumas destas possam ser translocadas diretamente do citoplasma do patógeno para o interior da célula hospedeira.

5) Existem evidências que alguns destes efetores são transportados para o núcleo do hospedeiro onde podem de alterar o padrão de expressão gênico da planta levando a hipertrofia (aumento do tamanho celular) e hiperplasia (aumento da divisão celular).

6) As alterações sofridas pelo hospedeiro culminam em necrose e rompimento da epiderme onde ocorre a liberação de *Xac* para a superfície externa do tecido onde pode iniciar um novo ciclo de infecção.

Embora o Cancro Cítrico seja responsável por perdas econômicas significativas na produção de frutas cítricas, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares da patogenicidade e virulência do agente causador.

Durante o processo infeccioso, uma grande variedade de bactérias patogênicas Gram-negativas de animais e plantas não somente secretam mas também injetam fatores patogênicos no interior das células hospedeiras. Os principais sistemas envolvidos nesses processos são os Sistemas de Secreção

do Tipo III (**TTSS**- “Type Three Secretion System”) (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Galan e Cloomer, 1999; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Plano *et al.*, 2001; Buttner and Bonas, 2002; Francis *et al.*, 2002) e do Tipo IV (**TFSS**- “Type Four Secretion System”) (Burns, 1999, 2003; Zhu *et al.*, 2000; Christie e Vogel, 2000; Christie, 2001; Baron *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002; Cascales e Christie, 2003). O TTSS é codificado por um grupo de aproximadamente 25 genes localizados em uma região única (*locus*) do cromossomo denominada *hrp*. Os produtos de um subgrupo destes genes são homólogos à maquinaria de secreção de componentes flagelares, indicando que o TTSS evoluiu a partir dos sistemas flagelares (Macnab, 1996; Blocker *et al.*, 2003). Por outro lado, o TFSS responsável pela secreção de fatores de patogenicidade está relacionado com maquinarias responsáveis pela transferência de ácidos nucléicos e complexos protéicos durante a conjugação bacteriana (Christie e Vogel, 2000). Recentemente, os genomas dos fitopatógenos *Xylella spp* (Simpson *et al.*, 2000; Van Sluys *et al.*, 2003), *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat, 2002), *Xanthomonas spp* (da Silva *et al.*, 2002), *Agrobacterium tumefaciens* (Wood *et al.*, 2001) e *Pseudomonas syringae* (Buell *et al.*, 2003) foram totalmente seqüenciados. Estas seqüências revelaram a existência de genes que codificam macromoléculas envolvidas em sistemas de secreção (TTSS e TFSS) que foram caracterizados ou estão possivelmente relacionados com processos de patogenicidade. Como veremos adiante, o genoma de *Xac* codifica um TTSS e dois TFSS que até então não foram bem caracterizados e são os principais focos desta tese.

Projeto Genoma *Xac*

O estudo de genomas no Brasil foi iniciado pela FAPESP em 1997, com o apoio da FUNDECITRUS, com o seqüenciamento do fitopatógeno *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000). O genoma desta bactéria contém um cromossomo circular de aproximadamente 2,6Mb e dois plasmídeos contendo 51,8kb e 1,2kb. No processo de anotação deste genoma foram identificadas uma série de mecanismos associados à patogenicidade, dentre eles sistemas de secreção, “quorum sensing”, toxinas, proteases e polissacarídeos extracelulares.

O genoma de 5.1Mb da *Xac* foi totalmente seqüenciado e anotado por um consórcio de laboratórios do Estado de São Paulo financiados pela FAPESP (da Silva *et al.* 2002). O processo de anotação consistiu na comparação das seqüências com as depositadas nos bancos de dados públicos (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a fim de identificar, por similaridade, genes com funções conhecidas. Dos pouco mais de 4200 genes, uma boa parte destes (60%) apresentou homólogos com funções conhecidas nos bancos de dados do NCBI. Os genes restantes são homólogos a seqüências que codificam proteínas com funções desconhecidas ou não apresentaram similaridade com as seqüências depositadas no banco de dados.

O genoma da *Xac* é duas vezes maior que o da *Xylella fastidiosa* (*Xf*). O genoma mais complexo de *Xac* reflete as diferenças nas formas de infecção e colonização do hospedeiro, uma vez que o crescimento de *Xac* é irrestrito no mesmo hospedeiro de *Xf*, não depende de um vetor específico para sua transmissão e possui uma fase epífita. *Xac* apresenta duas cópias do Sistema de Secreção do Tipo II, diversas enzimas envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro, possui o Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) e sistemas flagelares e quimiotáticos completos (Moreira *et al.*, 2004). Por outro lado, *Xf* não possui TTSS e apresenta um maior número de genes envolvidos na biossíntese de pili do tipo IV o qual é importante em processos de adesão e colonização do hospedeiro (Moreira *et al.*, 2004). Desta forma, é possível supor que o genoma mais complexo de *Xac* seja um reflexo da sua capacidade de transmissão, colonização, adaptação no hospedeiro e sua maior capacidade de sobrevivência.

Bases Moleculares da Virulência de Patógenos Bacterianos de Plantas

Patógenos bacterianos de plantas são hospedeiro-específicos: uma vez presentes eles são capazes de se multiplicar e ativar mecanismos de regulação/sinalização que resultam em sintomas de infecções que são típicos de cada espécie (Chan e Goodwin, 1999). A interação planta-patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: compatível e incompatível. Na interação compatível o patógeno invade o tecido vegetal, se multiplica e provoca doença na planta. Na interação incompatível o patógeno ao penetrar no tecido vegetal

depara com o mecanismo de defesa do hospedeiro, o qual é rapidamente ativado impedindo a multiplicação e produzindo resistência. Neste caso, o hospedeiro é chamado “resistente” e o patógeno considerado avirulento. Os mecanismos de defesa das plantas envolvem a ativação de morte celular programada (apoptose) e são conhecidos como resposta de hipersensibilidade (HR). Este processo restringe e impede a propagação do patógeno na planta. Os genes bacterianos relacionados ao desenvolvimento de HR em plantas não-hospedeiras e de patogenicidade em hospedeiros foram denominados *hrp* (“*hypersensitive response and pathogenicity*”; Brunings e Gabriel, 2003). Contudo, se a infecção bacteriana resulta em patogenicidade ou HR na planta é algo que é determinado diretamente por dois outros grupos de genes: os genes de avirulência *avr* do patógeno e os genes de resistência (*R*) do hospedeiro. Desta forma, as relações entre patógenos de plantas e seus hospedeiros é, portanto, determinada por interações “gene-a-gene” que resultarão em sistemas compatíveis ou incompatíveis (Cordeiro e Sá, 2000; Brunings e Gabriel, 2003).

A principal diferença entre estes dois tipos de interações está relacionada com a presença ou ausência de um gene de resistência na planta e de um gene de avirulência no patógeno (Tabela 1). Acredita-se que os patógenos virulentos não possuem genes *avr*, cujos produtos são reconhecidos pelo hospedeiro, enquanto os avirulentos contêm proteínas *Avr* que são capazes de desencadear HR através do reconhecimento pelos produtos dos genes *R* do hospedeiro (Brunings e Gabriel, 2003; Gabriel, 2001). O produto dos genes *avr* é transportado para o interior da célula hospedeira pelo TTSS onde pode ser um indutor direto (onde ocorre a interação diretamente com o produto do gene *R*) ou ainda o *Avr* pode ser processado pelo hospedeiro e o produto da modificação interagir com a via de resistência (*Avr* indutor indireto) (Buttner e Bonas, 2002). É importante destacar que, para fins de nomenclatura e diferenciação, se um gene *avr* não é reconhecido pelo mecanismo de defesa da planta e, portanto, resulta em uma interação compatível e conseqüente desenvolvimento da doença, o *Avr* passa a ser chamado de *Pth* (“*pathogenicity*”). Desta forma, um gene *avr* pode ser chamado de *pth* para um hospedeiro específico e continuar sendo *avr* para outros (Cordeiro e Sá, 2000).

Tabela 1- Modelo de interação planta-patógeno: processos compatíveis e incompatíveis (Cordeiro e Sá, 1998; Flor, 1971).

Planta	Patógeno virulento (ausência do gene <i>avr</i>)	Patógeno Avirulento (presença do gene <i>avr</i>)
Presença do Gene <i>R</i>	-Ativação Lenta do mecanismo de defesa -Interação Compatível (Doença)	-Ativação Rápida do mecanismo de defesa -HR
Ausência do Gene <i>R</i>	-Ativação Lenta do mecanismo de defesa -Interação Compatível (Doença)	-Ativação Lenta do mecanismo de defesa -Interação Compatível (Doença)

Um dos principais focos de estudos da interação planta-patógeno é a compreensão do mecanismo específico de reconhecimento dos genes de resistência *R* e suas consequências. Assim, diversos genes de resistência foram isolados e caracterizados de acordo com seus aspectos funcionais e estruturais (Godiard *et al.*, 1994; Dangl, 1995; Kunkel *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1997; Cordeiro e Sá, 1998). A maior parte deles contém um domínio de repetições ricas em leucina (LRR; este domínio está normalmente associado a mediadores de interações proteína-proteína) além de apresentar outros domínios como: zíper de leucina (LZ), domínio de interação proteína-proteína homólogo ao das proteínas Toll de *Drosophila* e interleucina 1 (IL-1), domínios transmembrana (DT), sítio de acoplamento à membrana (N-miristilação), sítio de ligação à nucleotídeo (NBS) e ainda podem apresentar domínios quinases com funções catalíticas (CAT). O fato de parte das proteínas *R* apresentarem domínios provavelmente associados à membrana mostra que os genes de resistência podem codificar proteínas receptoras que seriam responsáveis pela especificidade do mecanismo de reconhecimento (Gabriel, 2001). A interação *Avr/R*, possivelmente mediada pelo domínio LRR, resultaria na transdução de sinais que induziriam a resposta de defesa e resistência sistêmica. O domínio LRR seria fundamental no reconhecimento das proteínas *Avr*. Um bom exemplo disso é o gene de resistência *Xa21* encontrado em arroz: o produto deste gene contém os domínios LRR, DT e CAT, e confere resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Song *et al.* (1997) e Wang *et al.* (1998) mostraram que alterações no domínio LRR resultaram em uma proteína *Xa21* modificada capaz de conferir resistência e especificidade a diferentes patógenos contendo diferentes proteínas *Avr*.

A função primária das proteínas *Avr* é certamente promover o parasitismo e a análise de mutantes mostra que aproximadamente um terço

dos mais de 40 genes *avr* já caracterizados de *P. syringae* e *X. campestris* contribuem significativamente para o processo de virulência (Baker *et al.*, 1997; White *et al.*, 2000). Com exceção de apenas um gene *avr* (*avrBs2*) localizado no cromossomo de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, todos os demais são encontrados no plasmídeo o que faz da transferência horizontal um modo primário da transmissão e disseminação dos genes *avr* (Collmer, 1998). Os membros da família *AvrBs3/PthA*, identificada inicialmente em *X. campestris* pv. *vesicatoria* por Bonas *et al.* (1989), estão amplamente distribuídos pelo gênero *Xanthomonas*, mas nem todas as espécies possuem membros desta família de proteínas *Avr*. Yang e Gabriel (1995) determinaram a seqüência da *PthA* de *Xac* e mostraram sua similaridade com a previamente descrita *AvrBs3* de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Este grupo, constituído por quase 30 proteínas com alto grau de identidade entre si (90-97%), são secretados pelo TTSS, constituído pelas proteínas *Hrp*, e contém uma região central com pelo menos 12 repetições de 34 a.a. ricos em leucina (apesar dessas regiões serem ricas em leucina, elas não possuem similaridade ao domínio LRR). As diferenças entre os membros da família *AvrBs3* estão restritas a essa região central, variando apenas no número de repetições. Estudos de deleções nas unidades repetitivas de diferentes homólogos de *AvrBs3* mostraram que tanto avirulência como virulência podem ser determinadas por estas regiões na interação planta-patógeno (Lahaye e Bonas, 2001). Além desta característica, as proteínas pertencentes a este grupo apresentam um sinal de localização nuclear (NLS) e um domínio ácido de ativação de transcrição (AAD), ambos na porção C-terminal. Estudos de duplo-híbrido em levedura revelaram que o domínio NLS da *AvrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* interage especificamente com a α -importina de pimenta (*Capsicum annuum*) a qual, juntamente com a β -importina, possibilita a passagem do complexo através do poro nuclear (Fig. 3; Lahaye e Bonas, 2001). A deleção da região NLS presente em todos os membros da família *AvrBs3* impossibilita, na maioria dos casos, o reconhecimento da *Avr* pela planta, sugerindo que o reconhecimento das proteínas *R* pode ocorrer no núcleo. Além disso, a ativação do sistema de defesa do hospedeiro depende da presença do domínio AAD (Lahaye e Bonas, 2001).

Figura 3- Estrutura e mecanismo proposto de ação da família das proteínas AvrBs3 encontradas no gênero *Xanthomonas*. A figura mostra a região central da proteína contendo 17,5 repetições de 34 a.a., dois domínios funcionais de localização nuclear (NLS) e um domínio ácido de ativação da transcrição (AAD). Uma vez translocada para o hospedeiro pelo sistema de secreção do tipo III do patógeno, AvrBS3 é transportada para o núcleo através da interação da α -importina com o domínio NLS e a ação da β -importina. A interação de AvrBs3 com o DNA da planta (de forma direta ou através de uma proteína alvo representada por X) leva a alterações no transcriptoma do hospedeiro e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de sintomas da doença no caso de plantas suscetíveis. Em plantas resistentes, o mecanismo específico de defesa é ativado através das proteínas R, desencadeando o processo de HR (Buttner e Bonas, 2002).

Xac induz a divisão celular em citros após 72h de inoculação (Lawson *et al.* 1989) devido à atuação da PthA, secretada pelo patógeno utilizando o sistema de secreção do tipo III. As evidências que suportam essa hipótese e mostram o papel fundamental da PthA no desenvolvimento do Cancro Cítrico são (Brunings e Gabriel, 2003):

- 1) Mutantes de *Xac* nos genes *hrp* (El Yacoubi *et al.*, 2001; Yang e Gabriel, 1995) ou *pthA* (Swarup *et al.*, 1991) não causam Cancro;
- 2) *E. coli* contendo os genes *hrp* e homólogos a *pthA* é capaz de causar sintomas semelhantes ao Cancro em citros (Kanamori e Tsuyumu, 1998);
- 3) Plantas de citros transformadas apenas com o gene *pthA* apresentam sintomas semelhantes ao Cancro Cítrico após a sua expressão apesar de não serem tão severos, como mostrado na figura 4 (Duan *et al.*, 1999);

4) Mutações no gene *pthA* em *Xac* resultam na perda da habilidade de causar hiperplasia, encharcamento e apresentam redução da taxa de crescimento na planta (Swarup *et al.*, 1991).

Figura 4- Microscopia analisando os sintomas de Cancro Cítrico em superfícies de folhas (esquerda) e seções (direita). A) Folha de citros não infectada. B) Folha de citros após bombardeamento com um vetor contendo o gene homólogo a *pthA* sob o controle de um promotor de planta. C) Folha de citros após inoculação mecânica de *Xac*. Nas figuras B e C é possível notar a diminuição do espaço livre na região do mesófilo e a presença de necrose (N) na região epidérmica. A figura 4C mostra o rompimento da epiderme e a liberação de bactérias (B) (Brunings e Gabriel, 2003).

Xac linhagem 306 utilizada no projeto genoma (da Silva *et al.* 2002) contém quatro membros da família AvrBs3/PthA denominados PthA1, A2, A3 e A4, os quais possuem alta identidade entre si. Dos quatro genes *pthA*, A1 e A2 estão localizados no plasmídeo pXAC33 e A3 e A4 no pXAC64. Somente PthA4 tem o mesmo tamanho que PthA de *Xac* previamente descrita (Yang e Gabriel, 1995), apresentando o mesmo número de repetições ricas em leucina (17,5) e com 99.7% de identidade. Adicionalmente, parte da região repetitiva de ambas as proteínas é composta por 33 resíduos ao invés de 34, como é

comum nos demais membros da família AvrBs3/PthA. PthA1 contém uma repetição a menos que PthA (16,5), enquanto PthA2 e PthA3 apresentam 2 repetições a menos (15,5). Ainda não foram realizados ensaios de funcionalidade de cada uma destas proteínas, mas acredita-se que a PthA4, por apresentar maior identidade com a previamente descrita PthA, seja o principal efetor/indutor do Cancro Cítrico de Xac linhagem 306 seqüenciada por da Silva *et al.* (2002).

Xac contém outras proteínas, as quais não possuem nenhuma similaridade com as AvrBs3/PthA, que podem estar envolvidas no processo de avirulência. As proteínas AvrXacE2 e AvrXacE1 são similares à proteína AvrPphE de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* a qual é requerida para o desenvolvimento de HR em interações incompatíveis, mas seu papel na virulência ainda não foi demonstrado (Deng *et al.*, 2003). Além das proteínas Avr, diversos outros componentes como proteases, glucanases, pectato-liases, proteínas que apresentam similaridade com hemolisinas, toxinas e polissacarídeos extracelulares são importantes no processo de patogenicidade dos fitopatógenos (Hueck, 1998; Groisman, 2001). Os mecanismos de regulação, ativação e secreção destes componentes são fundamentais para nossa compreensão molecular da patogenicidade destes organismos.

Sistemas de Secreção de Patógenos Gram-negativos

Análises genéticas dos fatores de virulência bacterianos têm mostrado que os organismos patogênicos são diferenciados dos não-patogênicos pela presença de genes específicos, normalmente organizados em uma “ilha de patogenicidade” que aparentemente foram adquiridos durante a evolução via transferência gênica horizontal (Hueck, 1998). Este ponto é particularmente visto em um conjunto de aproximadamente 25 genes que codificam o sistema de secreção do tipo III, o qual possui um papel fundamental na translocação de efetores do patógeno para o citoplasma das células do hospedeiro (vide adiante). Contudo, diversos fatores influenciam na interação planta patógeno. A ativação de diferentes sistemas de secreção possibilita a liberação de fatores que causam degradação do tecido hospedeiro (proteases e glucanases) e citotoxicidade (Hueck, 1998; Buttner e Bonas, 2002). Neste contexto, o termo secreção é usado para descrever o transporte ativo de proteínas do citoplasma

através das membranas interna e externa para a superfície da célula bacteriana ou meio extracelular. A secreção é distinguida do processo de exportação, o qual se refere ao transporte de proteínas ou conjunto de fatores do citoplasma para o espaço periplasmático (Hueck, 1998).

Os sistemas de secreção das bactérias Gram-negativas são, de forma geral, divididos em cinco grupos, Tipo I-V, que podem ser agrupados em Sec-dependentes (Tipos II e V) e Sec independentes (Tipos I e III) ou ainda conter vias que podem ser Sec-dependente ou independente utilizando o mesmo sistema (Tipo IV) como mostrado na figura 5. Os sistemas Sec-dependentes envolvem um complexo de proteínas Sec (formada por Sec A, B, C, D, F, Y, E, G e YajC; Groisman, 2001) que catalisa a translocação de proteínas através da membrana interna para o espaço periplasmático através do reconhecimento de um peptídeo de sinalização localizado na porção N-terminal (Duong *et al.*, 1997). Já nos Sec-independentes, os próprios constituintes do complexo de secreção e proteínas associadas encaminham os substratos para a secreção (Duong *et al.*, 1997).

O sistema de secreção do Tipo V (também chamado de auto-transportador) utiliza o sistema Sec para exportação para o periplasma onde o domínio β localizado na porção C-terminal do auto-transportador associa-se à membrana externa formando um poro por onde a porção N-terminal da proteína, através de auto-proteólise, é liberada no meio extracelular. Alguns exemplos de auto-transportadores associados com patogenicidade bacteriana incluem as proteases de imunoglobulina A de *N. gonorrhoeae* (Koomey *et al.*, 1984) e *H. influenzae* (Poulsen *et al.*, 1989), além da citotoxina VacA de *H. pylori* (Schmitt e Haas, 1994). A presença de uma chaperone capaz de associar-se a uma proteína específica e a um complexo proteico associado à membrana externa é uma outra forma de secreção Sec-dependente principalmente para a secreção de pilinas, as quais participam do processo de adesão do patógeno (Groisman, 2001).

O sistema de secreção do tipo II é a via mais comum e conservada utilizada para a secreção de proteínas nas bactérias Gram-negativas. Este complexo consiste em um sistema formado por 12-14 proteínas e é encontrado em diversos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (sistema *xcp* envolvido na secreção de elastase, fosfolipase C e toxinas) (Filloux *et al.*, 1990), *Xantho-*

Figura 5- Representação dos principais mecanismos de secreção das bactérias Gram-negativas. São mostradas as vias Sec-dependentes (Tipo V, chaperone específica e Tipo II), Sec-independentes (Tipos I e III) além do sistema Tipo IV que possui vias que podem ser Sec dependente (a) ou independente (b). MI: membrana interna; ME membrana externa. (Buttner e Bonas, 2002).

monas campestris (sistema *xps*) (Dums *et al.* 1991) e *Vibrio cholerae* (sistema *eps* envolvido na secreção de quitinases, proteases e toxina cholera) (Sandkvist *et al.*,1997). O sistema do tipo II é também responsável pela secreção de diversas exoenzimas, incluindo pectato liase, poligalacturonase e celulase. O mecanismo de secreção por esta via ocorre em duas etapas: 1) A maquinaria Sec exporta o substrato com o peptídeo de sinalização através da membrana interna e 2) os componentes do sistema de secreção do tipo II secretam o substrato através da membrana externa. Em *Xac* foram encontrados 2 diferentes sistemas de secreção do Tipo II denominados *xps* (“*Xanthomonas* protein secretion”) e *xcs* (“*Xanthomonas citri* protein secretion”). Os genes que compõem o *xps* já haviam sido previamente descritos para *Xcc* (Dums *et al.* 1991), sendo idênticos aos encontrados em *Xac* não somente nos componentes como em sua organização gênica. Já o sistema *xcs* foi pela primeira vez descrito por Da Silva *et al* (2002) para o gênero *Xanthomonas*. *Xcs* possui um gene a mais que o *xps* e a organização genômica é semelhante

a encontrada nos genes *eps* de *Vibrio cholerae*, e os produtos destes sistemas apresentam por volta de 60% de similaridade (Fig. 6). A presença de dois sistemas de secreção reflete o grande número de enzimas secretadas pela *Xac*.

As proteínas XpsE e XcsE, as quais possuem 60% de similaridade entre si, são as únicas citoplasmáticas conhecidas que fazem parte deste sistema de secreção, enquanto as demais estão ligadas à membrana interna, região periplasmática ou associadas à membrana externa (Soderberg *et al.*, 2004). Estas duas proteínas contêm domínios similares aos que ligam ATP (Soderberg *et al.*, 2004) e podem estar envolvidas na transdução de energia durante a translocação de proteínas através da membrana.

Figura 6- Mapa gênico das regiões de *Xac* que possuem genes responsáveis pelo sistema de secreção do Tipo II. O sistema *xps* já havia sido previamente descrito para *Xcc*, possuindo os mesmos constituintes e organização. O sistema *xcs* de *Xac* foi pela primeira vez descrito por da Silva *et al.* (2002) e possui similaridade com o sistema *eps* de *Vibrio Cholerae*. Os produtos codificados pelos sistemas *xcs* e *xps* de *Xac* possuem em torno de 50% de similaridade entre si.

O sistema de secreção do tipo I, Sec- independente, é constituído por apenas três componentes (TolC, HlyB e HlyD) que são capazes de secretar proteínas sem a presença de intermediários periplasmáticos. Este sistema é utilizado para secreção de fatores de virulência e proteases de *Erwinia chrysanthemi*, adenilato ciclase de *Bordetella pertussis*, fosfatase alcalina de *P.*

aeruginosa e a leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* além de hemolisinas em *E. coli* (Finlay e Falkow, 1997). Há a presença de um sinal de secreção por esta via na porção C-terminal da proteína a ser secretada. Este sistema está presente também em *Xac* e *Xcc*, onde possivelmente está envolvido na secreção de hemolisinas e toxinas da família RTX (da Silva *et al.*, 2002).

Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS-“Type Three Secretion System”)

O sistema do tipo III é constituído por aproximadamente 25 proteínas e, devido a este fato, é o mais complexo dentre os sistemas de secreção bacterianos conhecidos (Hueck, 1998). Estruturalmente, este sistema consiste em um grupo de proteínas de membrana externa, incluindo uma proteína similar a transportadores da família das secretinas e várias lipoproteínas que não apenas secretam mas também podem injetar fatores de virulência diretamente no citoplasma da célula hospedeira (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Galan e Collmer, 1999; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Plano *et al.*, 2001; Buttner and Bonas, 2002; Francis *et al.*, 2002). Outros componentes consistem de proteínas integrais de membrana com estreita similaridade a componentes do aparelho de exportação flagelar (Gálan e Collmer, 1999; He, 1998). A estrutura supramolecular do sistema III de *Salmonella typhimurium* foi visualizada em microscópio eletrônico (Kubori *et al.*, 1998). Essa estrutura, denominada “complexo agulha”, atravessa as membranas interna e externa do envelope bacteriano e também se assemelha ao corpo basal flagelar. Este complexo protéico possui uma estrutura alongada com cerca de 120nm de comprimento composta por dois domínios distintos: uma porção semelhante a uma agulha que se projeta para fora da superfície bacteriana e uma base cilíndrica que ancora esta estrutura nas membranas interna e externa. Kubori *et al.* (2000) propuseram que os componentes que formam este complexo são um dos responsáveis pela especificidade do sistema III para a secreção de proteínas em células animais ou de plantas. É importante destacar que apesar de serem bactérias com hospedeiros muito distintos, existem semelhanças entre alguns componentes estruturais desses dois tipos de patógenos.

Genes *hrp*, que codificam os componentes do TTSS, têm sido identificados e caracterizados em diversas espécies de patógenos de planta.

Geralmente são observados *loci* conservados estrutural e, em alguns casos, funcionalmente. Comparações feitas entre seqüências dos produtos dos genes *hrp* obtidos de vários *loci* mostram que onze deles são conservados dentre os quatro principais grupos de patógenos de plantas (*Xanthomonas spp*, *Erwinia spp*, *Pseudomonas spp* e *Ralstonia spp*; Bogdanove, 1996). Assim, nove desses genes tiveram suas denominações alteradas para *hrc* (*hrp* and conserved, Bogdanove, 1996).

Em *Xac* o *locus hrp*, localizado no cromossomo, é considerado parte de uma “ilha de patogenicidade” devido aos seguintes aspectos (Hacker e Kaper, 2000): a) tamanho total maior de 23kb; b) codifica um sistema que secreta fatores de patogenicidade dentro das células hospedeiras; c) está sempre associado com espécies patogênicas de *Xanthomonas*; d) esta região contém um conteúdo de nucleotídeos G+C superior ao restante do genoma; e) contém elementos móveis (transposases); f) representa uma possível região com alta taxa de mutação/evolução uma vez que, apesar da grande proximidade, existem consideráveis diferenças entre os TTSS de *Xac* e *Xc pv. vesicatoria*, na qual a região *hrp* também faz parte uma ilha de patogenicidade (Buttner e Bonas, 2002; Noel *et al.*, 2002).

O TTSS melhor estudado é o de *Yersinia spp*, um patógeno de células animais, que secreta uma gama de proteínas conhecidas como Yops (“*Yersinia* outer proteins”). Na ausência de Ca^{2+} , as proteínas Yops podem ser secretadas diretamente no citoplasma da célula hospedeira, fazer parte do complexo extracelular de secreção ou apenas serem liberadas no meio externo (Fig. 7).

As proteínas que formam este sistema em *Yersinia spp* possuem as seguintes funções:

LcrD (HrcV em *Xac*)- atua na formação do canal que permite a passagem de proteínas pelo envelope bacteriano. A porção N-terminal desta proteína contém várias regiões hidrofóbicas com possibilidade de formar pelo menos seis hélices transmembranais capazes de formar o principal poro do sistema na membrana interna (Hueck, 1998; Plano *et al.* 2001). A porção C-terminal é citoplasmática e pode auxiliar na secreção de efetores por este sistema (Hueck, 1998). A passagem através da membrana interna é auxiliada pela atividade ATPásica da **YscN (HrcN em *Xac*)** citoplasmática (Woestyn *et al.*, 1994).

Figura 7-Sistema de secreção do tipo III de *Yersinia spp.* A figura mostra seus principais constituintes e a ativação deste sistema na ausência de Ca^{2+} . As proteínas Yops podem ser liberadas no meio, fazer parte do complexo de secreção ou ainda serem translocadas diretamente para o citoplasma da célula hospedeira. MI: membrana interna; ME: membrana externa; Yops (*Yersinia* outer proteins) (Groisman, 2001).

YscC (HrcC em *Xac*)- apresenta similaridade com outras proteínas de membrana denominadas secretinas do sistema de secreção do tipo II. A proteína YscC localiza-se na membrana externa e permite a passagem das Yops. As secretinas são uma família de proteínas capazes de formar poros na membrana externa bacteriana e estão, normalmente, relacionadas com sistemas de secreção (Genin e Boucher, 1994).

YscD, J, Q, R, S, T e U (HrcD, J, Q, R, S, T e U, respectivamente, em *Xac*)- proteínas associadas à membrana interna que se assemelham a componentes de exportação flagelar (Tabela 2; Hueck, 1998; Kim *et al.*, 2003).

Pouco é conhecido a respeito dos componentes **YscF, I, K, L e P**, exceto que F, I, K e L são, possivelmente, citoplasmáticas (Hueck, 1998, Groisman, 2001).

Em *Yersinia*, **YopB e YopD** associam-se para formar um canal que se estende até à membrana plasmática da célula hospedeira e permite a passagem das Yops efetoras para o citoplasma do hospedeiro (Fig. 7). Bactérias apresentando alterações na porção externa do TTSS ainda são capazes de secretar proteínas efetoras *in vitro* mas são incapazes de translocar efetores para o citoplasma das células hospedeiras (Buttner e

Bonas, 2002). Em *Xac*, a função de YopB e YopD é efetuada, possivelmente, por HrpF (Buttner e Bonas, 2002).

Diversas Yops já foram descritas, dentre elas a YopE, YopH, YopJ/P que estão efetivamente envolvidas na despolimerização da actina, inibição da fagocitose e indução de apoptose da célula hospedeira (Hueck, 1998). Estes efeitos permitem a colonização por *Yersinia* da célula hospedeira e o desenvolvimento da doença.

No processo de anotação do genoma de *Xac*, foi estabelecido como critério as denominações previamente descritas para *Yersinia spp* para as proteínas que possuíam boa similaridade o que inclui, principalmente, as Hrc. As proteínas que constituem os TTSS encontrados em patógenos de animais e plantas estão comparadas entre si (juntamente com os respectivos componentes flagelares) na tabela 2. A figura 9 esquematiza a localização celular de alguns constituintes conservados nos TTSS e no complexo flagelar.

Os genes *hrp* de *Xac* estão localizados em uma extensa região no genoma formada por 25 genes compreendidos entre *hpaF* e *hpa2* (Fig. 8). Além dos genes *hrp* e *hrc* foram também encontrados nessa região de *Xac* os genes *hpa* (*hrp* associados). Um gene localizado ao lado do *hrpF* possivelmente codifica uma proteína hipotética (representada por uma seta vazia). Com exceção da proteína hipotética localizada no *locus hrp* de *Xac*, todos os demais genes codificam proteínas que apresentam similaridade com componentes do TTSS de outras *Xanthomonas*, como mostra a tabela 2. As proteínas HrpG e HrpX, principais ativadores do TTSS de *Xanthomonas*, não apresentam seus genes correspondentes no *locus hrp* de *Xac*.

Figura 8- Mapa gênico do *locus hrp* de *Xac* constituído por 25 genes. A figura mostra a presença dos genes *hrc*, *hrp* e *hpa*. O gene localizado entre *hrpF* e *hpaB*, representado por uma seta vazia, codifica uma proteína hipotética.

Tabela 2- Similaridade entre os componentes do TTSS de *Xanthomonas*, *Ralstonia solanacearum*, *Yersinia enterocolitica*, *Burkholderia pseudomallet* e o complexo flagelar de *Shigella flexneri* (Kim et al., 2003).

Xag (aa)	Xac (s)	Xcc (s)	Xcv (s)	Xoo (s)	Rs (s)	Ye (s)	Bp (s)	Flagelar Sf (s)
HpaH (187)	Hpa2 (98.6)	Hpa2 (90.6)	HpaH (94.3)	Hpa2 (79.0)		YsaH (34.8)		
HpaG (133)	Hpa1 (93.2)	Hpa1 (31.4)	XopA (50.4)	Hpa1 (66.2)				
HpaC (141)								
HrcC (607)	HrcC (99.7)	HrcC (85.1)	HrcC (97.5)	HrcC (95.2)	HrcC (47.4)	YscC (26.7)	SetC (43.9)	FliB (19.5)
HrcT (276)	HrcT (100)	HrcT (86.6)	HrcT (97.1)	HrcT (97.5)	HrcT (47.1)	YscT (24.1)	SetT (45.0)	
HrpB7 (169)	HrpB7 (98.2)	HrpB7 (66.3)	HrpB7 (91.1)	HrpB7 (91.1)				
HrcN (442)	HrcN (99.5)	HrcN (91.0)	HrcN (97.7)	HrcN (97.7)	HrcN (69.0)	YscN (56.5)	SetN (69.7)	FliE (11.0)
HrpB5 (233)	HrpB5 (100)	HrpB5 (78.1)	HrpB5 (96.1)	HrpB5 (93.1)	HrpB5 (19.6)		SetL (31.3)	
HrpB4 (209)	HrpB4 (100)	HrpB4 (69.9)	HrpB4 (94.7)	HrpB4 (93.3)	HrpB4 (54.5)			
HrcJ (253)	HrcJ (99.6)	HrcJ (87.0)	HrcJ (98.0)	HrcJ (92.5)	HrcJ (27.3)	YscJ (29.5)	SetJ (48.2)	FliF (18.6)
HrpB2 (130)	HrpB2 (100)	HrpB2 (72.3)	HrpB2 (96.2)	HrpB2 (96.9)	HrpB2 (33.1)			
HrpB1 (151)	HrpB1 (100)	HrpB1 (83.4)	HrpB1 (96.0)	HrpB1 (96.0)	HrpB1 (48.7)	YscU (32.2)	SetU (44.7)	FliB (31.7)
HrcU (357)	HrcU (99.2)	HrcU (82.9)	HrcU (NA)	HrcU (92.2)	HrcU (65.6)	LcrD (44.5)	SetV (63.4)	FliA (32.8)
HrcV (640)	HrcV (99.7)	HrcV (94.5)	HrcV (NA)	HrcV (97.2)	HrcV (26.9)			
HpaP (204)	HpaP (98.5)	HpaP (58.1)	HpaP (NA)	HpaP (88.2)	HrcO (87.8)	YscO (16.4)	SetQ (26)	FliN (14.6)/FliY (6)
HrcO (304)	HrcO (98.4)	HrcO (74.0)	HrcO (90.7)	HrcO (87.8)	HrcO (25.3)	YscR (50.5)	SetR (69.5)	FliP (36.5)
HrcR (200)	HrcR (100)	HrcR (96.5)	HrcR (100)	HrcR (98.0)	HrcR (78.0)	YscS (34.9)	SetS (51.2)	FliO (24.4)
HrcS (86)	HrcS (100)	HrcS (97.5)	HrcS (98.8)	HrcS (97.7)	HrcS (62.8)			
HpaA (271)	HpaA (98.9)	HpaA (60.9)	HpaA (77.1)	HpaA (74.5)	HrpW (29.8)		SetD (28.8)	
HrpD5 (312)	HrpD5 (99.0)	HrpD5 (75.0)	HrpD5 (91.7)	HrpD5 (89.4)				
HrpD6 (80)	HrpD6 (97.5)	HrpD6 (77.5)	HrpD6 (81.3)	HrpD6 (81.3)				
HrpE (93)	HrpE (88.2)	HrpE (47.8)	HrpE (81.7)	HrpE (87.1)				
HpaB (156)	HpaB (100)	HpaB (89.7)	HpaB (93.6)	HpaB (92.9)				
HpaD (19)			E3 (31.6)					
ORF1 (124)								
HrpF (805)	HrpF (98.1)	HrpF (68.9)	HrpF (84.3)	HrpF (82.0)	PopF1 (40.2)/ PopF2 (35.5)			
HpaF (646)	HpaF (99.5)		HpaF (72.6)/HpaG (86.1)	HpaF (83.1)	PopC (22.4)			

-(aa): número de aminoácidos das proteínas do TTSS de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag).

-(s): similaridade das proteínas de cada organismo com relação aos correspondentes em Xag.

-Xag: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*; Xac: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Xcv: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; Xoo: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; Rs: *Ralstonia solanacearum*; Ye: *Yersinia enterocolitica*; Bp: *Burkholderia pseudomallet*; Flagelar Sf: complexo flagelar de *Shigella flexneri*.

-(NA): Sequência não disponível em banco de dados públicos

Figura 9- Localização celular de alguns componentes do complexo flagelar e do Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) que apresentam similaridade entre si. A) complexo flagelar; B) TTSS ; MI: membrana interna; ME: membrana externa (He, 1998).

Os padrões de expressão de genes *hrp* nos principais gêneros de fitopatógenos bacterianos são bastante similares, sendo reprimidos em meios de cultura complexos mas induzidos *in planta* ou em meio mínimo adequado (Bonas, 1994). Fatores como pH, osmolaridade, temperatura, concentrações de metais divalentes, flavonóides e fontes de carbono e nitrogênio influenciam diretamente na expressão dos genes *hrp* (Hueck, 1998). De fato, cada patógeno apresenta uma ou mais condições que levam à ativação da expressão dos genes *hrp* e montagem TTSS. No caso do gênero *Xanthomonas*, é possível observar a indução do TTSS em meio mínimo e em extratos vegetais, mas o fator específico ou condição *in planta* capaz de induzir esse sistema ainda permanece desconhecido (Lahaye e Bonas, 2001; Buttner e Bonas, 2002).

A existência de fatores da planta capazes de ativar especificamente a expressão dos genes *hrp* do fitopatógeno foi demonstrada em *Ralstonia solanacearum* (Fig. 10). Este fitopatógeno contém um receptor denominado PrhA (plant regulator of *hrp* genes) o qual é expresso constitutivamente e codifica uma proteína homóloga a receptores sideróforos que se localizam na membrana externa (Marenda, 1998). Um sinal ainda não caracterizado é percebido pela porção N-terminal da PrhA, transduzido para sua porção C-

PrhA e, posteriormente, para a proteína PrhR associada à membrana interna. No citoplasma, o fator sigma PrhI inativo, cuja expressão é induzida por um fator ainda não caracterizado, pode ser ativado pela PrhR. Adicionalmente, os genes *prhJ* e *hrpG*, requeridos para o completo desenvolvimento da patogenicidade em *Ralstonia solanacearum*, são expressos através do PrhI e a ação destes leva à expressão dos genes *hrp*, *hrc* e *pop* (Brito *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2002).

Figura 10- Mecanismo regulatório proposto para a ativação dos genes *hrp* de *Ralstonia solanacearum*. O receptor PrhA, localizado na membrana externa, é ativado através de fatores desconhecidos da planta. É possível que, além do PrhA, existam outros receptores que auxiliem esse processo. A transdução de sinais para PrhR leva a ativação de PrhI que induz a expressão de *prhJ*. O regulador PrhJ controla diretamente a expressão de *hrpG* que, por sua vez, ativa a expressão de *hrpB*. Desta forma, os demais genes do TTSS são ativados para a montagem do complexo e secreção de efetores (Brito *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2002). ME: membrana externa; MI: membrana interna.

O produto do gene *hrpG* de *Ralstonia* é similar ao de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (53%). O *prhI* codifica um fator de transcrição sigma e *prhJ* codifica uma nova proteína regulatória de genes *hrp* que possui homologia a ativadores de transcrição da família LuxR/UhpA e induz a expressão dos genes *hrp* na presença de células da planta (Brito *et al.*, 1999, 2002).

O mecanismo proposto por Brito *et al.* (1999; 2002) (Fig. 10) envolve uma cascata regulatória através da qual um fator/sinal da planta é percebido por PrhA resultando na expressão de *hrpG*. Dessa maneira, o produto do gene *hrpG* ativa o gene regulatório *hrpB* que, subsequente, ativa todas as demais unidades transcricionais do locus *hrp*. O gene *hrpB*, então, pode integrar duas vias regulatórias que controlam a expressão dos genes *hrp*: 1) via controlada pelo receptor PrhA localizado na membrana externa da bactéria e ativada por contato com um fator ainda não caracterizado presente na superfície da célula vegetal; 2) via de regulação dependente de sinais metabólicos (Brito *et al.*, 2002).

Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) a expressão dos genes *hrp* é controlada pelos fatores HrpG e HrpXv. HrpG apresenta 53% de similaridade com HrpG de *Ralstonia solanacearum* e 40% de similaridade com reguladores de resposta do tipo OmpR de *E. coli*. A proteína HrpG de *Xac* possui 263 a.a. e, como as demais HrpG, possui um domínio regulador de resposta (RR) na porção N-terminal e um domínio de ligação ao DNA na porção C-terminal. Em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, HrpG ativa a expressão de *hrpA* (*hrcC* em *Xac*) e *hrpXv* (Hueck, 1998; Buttner e Bonas, 2002). HrpXv é um ativador transcricional do tipo AraC e ativa a transcrição dos operons *hrpB* até *hrpF*, além de poder ativar outros genes denominados *xop* ("Xanthomonas outer protein") que também podem ser secretados por este sistema como mostrado na figura 11 (Wengelnik, 1996; Buttner e Bonas, 2002). Algumas mutações no gene *hrpG* resultam na expressão constitutiva de todos os genes *hrp* de *Xcv* sendo, portanto, considerado um gene regulatório chave para a ativação dos demais *hrp* (Hueck, 1998). Considerando que a proteína HrpG de *Xac* contém similaridade de 53% e 43% com HrpG de *Ralstonia solanacearum* e *Xcv*, respectivamente, e que HrpX de *Xac* também exibe boa similaridade com HrpB de *Ralstonia solanacearum* (48%), o mecanismo de ativação dos genes *hrp* em *Xac* possivelmente é semelhante ao proposto para *Xcv* e *Ralsto-*

Figura 11- Modelo de ativação dos genes *hrp* proposto para *Xc pv. vesicatoria*. A) Um sensor (indicado por ?) percebe estímulos ambientais e transduz esse sinal para a expressão e ativação de HrpG, o qual irá ativar a expressão de *hrpA* (*hrcC* em *Xac*) e *hrpX*. O fator HrpX é responsável pela ativação dos demais operons *hrp* e de *xop*. B) Formação do aparato de secreção do Tipo III. A figura mostra os componentes extracelulares do sistema de secreção assim como a formação do poro na membrana plasmática do hospedeiro através de HrpF. A secreção de Avr e outros efetores irão caracterizar uma interação compatível (doença) ou incompatível (mecanismo HR). MP: membrana plasmática; PC: parede celular; ME: membrana externa; PM: periplasma; MI: membrana interna; (Buttner e Bonas, 2002).

nia solanacearum. Em *Xac* foram encontradas diversas proteínas com relativa similaridade a PrhA e PrhJ e duas proteínas que apresentam maior similaridade à PrhI (XAC4129 e XAC2191) e PrhR (XAC4130 e XAC2192) de *Ralstonia solanacearum*. A observação de que os homólogos a PrhI e PrhR em *Xac* possuem genes adjacentes (XAC4129 e XAC4130; XAC2191 e XAC2192) podem indicar que o mecanismo proposto para *Ralstonia solanacearum* pode ter semelhanças em *Xac*. Essa hipótese está sendo atualmente analisada em nosso laboratório. Uma questão ainda em aberto é o mecanismo de controle de

HrpG ao nível da fosforilação do seu domínio RR. Até este momento, nenhum sensor histidina quinase que possa preencher este papel foi identificado.

Os mecanismos envolvidos na secreção de proteínas de virulência através do sistema do tipo III ainda são pouco conhecidos. No gênero *Xanthomonas*, a expressão de genes estruturais e efetores é mediada, em parte, pelos produtos dos genes *hrpX* e *hrpG*. Alguns genes regulados de maneira HrpX-dependente possuem uma seqüência consenso denominada PIP BOX ("Plant Induced Promoter" TTCG...N₁₆...TTCG) na região promotora (da Silva *et al.*, 2002). A detecção desta região pode ser utilizada na identificação de possíveis genes candidatos que são ativados por HrpX e que podem ser secretados ou fazer parte do sistema de secreção/sinalização dos efetores (da Silva *et al.*, 2002). Contudo, existem genes com PIP BOX que não são regulados por HrpX, assim como outros, regulados por HrpX, que não o contém (Buttner e Bonas, 2002). É importante destacar que, apesar de serem secretadas por este sistema, as proteínas da família AvrBs3/PthA não possuem PIP Box e são constitutivamente expressas (Buttner e Bonas, 2002).

Mecanismo de Translocação pelo Sistema III e Proteínas Translocadas

O principal candidato para a formação do canal de translocação na célula do hospedeiro é a proteína HrpF. HrpF não é necessária para a secreção de efetores para o meio extracelular, mas é fundamental para a translocação de efetores para células da planta (Buttner e Bonas, 2002). Recentemente foi mostrado que HrpF liga-se à bicamada lipídica e induz a formação de um canal, como mostrado na figura 11 (Buttner e Bonas, 2002).

Proteínas secretadas pelo TTSS possuem múltiplos sinais que as direcionam para a secreção e eventualmente para os alvos subcelulares no hospedeiro. Evidências experimentais indicam que, em certos casos, a estrutura da extremidade 5' dos mRNAs de algumas das proteínas é um dos sinais necessários para a secreção (Anderson and Schneewind, 2001; Karlinsey *et al.*, 2000). Além disso, a secreção de algumas proteínas por este sistema pode requerer o auxílio de chaperones específicas que interagem com domínios protéicos localizados nos 100 primeiros aminoácidos da proteína a ser secretada e, através dessa interação, previnem possíveis processos de agregação e degradação dos efetores (Bennet e Hughes, 2000). A associação

com uma chaperone pode também ser eficiente para o reconhecimento deste complexo pelo sistema de secreção.

Além das proteínas efetoras Avr, o sistema de secreção III secreta harpinas e outras proteínas que auxiliam no processo de patogenicidade (Hueck, 1998). Um exemplo disso é a proteína HpaA (*hrp*-associada A) de *Xcv* (Huguet *et al.*, 1998). Algumas mutações em *hpaA* em *Xcv* afetam a patogenicidade em hospedeiros mas não alteram a indução de resposta de hipersensibilidade (HR) em não-hospedeiros (Huguet *et al.*, 1998). HpaA de *Xcv* contém 275 a.a. e duas regiões sinalizadoras de localização nuclear (NLS), uma na porção N e outra na C-terminal e apresenta 71% de similaridade com HpaA de *Xac*. Ensaios de citolocalização com HpaA de *Xcv* mostraram que esta proteína não faz parte da maquinaria de secreção do tipo III e é secretada e translocada para o interior da célula do hospedeiro. Apesar de não ter função conhecida, a presença de duas regiões NLS podem levá-la ao núcleo da célula hospedeira e, assim, auxiliar o processo infeccioso (Huguet *et al.*, 1998). A localização de HpaA de *Xcv* no núcleo de células de cebola (*Allium cepa*) foi observada por Huguet *et al.* (1998).

Sistema de Secreção do Tipo IV (TFSS- “Type Four Secretion System”)

A transferência de material genético através de conjugação por bactérias Gram-negativas é mediada por um sistema supramolecular denominado complexo Mpf (“mating pair formation”). O Mpf é composto por um pilus conjugativo capaz de estabelecer contato entre as células receptora e doadora, resultando no processo de transferência (Christie, 2001). A conjugação permite que plasmídeos contendo genes cujos produtos conferem resistência a antibióticos, fatores de patogenicidade e características que auxiliam em processos adaptativos sejam eficientemente disseminados. É possível constatar que alguns patógenos bacterianos Gram-negativos utilizam sistemas de secreção, intimamente relacionados com sistemas de conjugação, para a transferência de moléculas efetoras para o interior da célula eucariótica. Por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens*, um fitopatógeno que induz o crescimento de tumores do tipo galha da coroa (“crown gall”) em plantas, utiliza um mecanismo de transferência de T-DNA e alguns outros efetores proteicos para

células vegetais (Zhu *et al.*, 2000). *Helicobacter pylori*, um agente que causa disfunções gástricas, utiliza um sistema semelhante para a liberação da proteína CagA em células de mamíferos (Covacci *et al.*, 1999), assim como *Legionella pneumophila*, *Brucella spp*, *Bartonella spp* e *Bordetella pertussis* utilizam processos correlacionados (revisado por Lee e Schneewind, 2001). No caso deste último, a secreção da toxina pertussis ocorre através de uma via alternativa Sec-dependente (Fig. 5; Christie e Vogel, 2000). A maquinaria de transferência e secreção de macromoléculas derivados do complexo de conjugação Mpf é chamada de sistema de secreção do Tipo IV (TFSS) (Christie e Vogel, 2000).

O TFSS é melhor caracterizado em *A. tumefaciens*, onde os fatores de virulência, juntamente com o sistema do Tipo IV, são codificados pelos genes *vir* localizados no plasmídeo Ti (indutor de tumor). Um segmento de DNA fita simples (ssDNA; T-DNA) é transferido do plasmídeo Ti para a célula vegetal onde é posteriormente integrado ao genoma do hospedeiro. As proteínas que são co-transportadas com o ssDNA estão envolvidas no processamento do DNA através da clivagem na região da origem de transferência (*oriT*) e na formação de um complexo nucleoproteico que é conjugado através do TFSS. A proteína VirD2, uma transesterase, é exportada juntamente com o T-DNA para o interior da célula hospedeira onde, através de sua seqüência de localização nuclear, possibilita o encaminhamento do ssDNA para o núcleo.

O TFSS de *A. tumefaciens* é formado por 12 proteínas como mostrado na figura 12. Na porção extracelular, as proteínas VirB2 e VirB5 são capazes de formar uma estrutura semelhante a um pilus, sendo VirB2 seu principal constituinte. A região periplasmática tem como seus principais componentes VirB9 e a lipoproteína VirB7, ambas associadas à membrana externa. VirB6, juntamente com VirB3, B8 e B10, formam o canal que permite a passagem do T-DNA pela membrana interna. Três ATPases, VirD4, B11 e B4, associadas à membrana interna possivelmente provêm a energia necessária para a secreção dos componente dos complexos Tipo IV e do T-DNA. A princípio, a proteína VirB1 possui duas localizações diferentes na maquinaria de secreção: primeiramente localiza-se na região periplasmática onde, após clivagem, é exportada para a superfície. Através de sua atividade transglicosilásica, VirB1 auxilia na formação de poros na camada peptidoglicana que irão permitir a for-

Figura 12- Representação do sistema de secreção do Tipo IV de *A. tumefaciens*. As ATPases, constituintes associados às membranas interna e externa além do pilus de secreção são mostrados. O complexo nucleoproteico T é secretado para a célula hospedeira através do sistema formado pelas proteínas Vir. ME-Membrana externa; MI-membrana interna; (Groisman, 2001).

mação do pilus de secreção (Groisman, 2001; Burns, 2003, Christie e Vogel, 2000; Ward *et al.*, 2002).

O seqüenciamento completo do genoma de *Xac* revelou a presença de dois diferentes *loci* cujos produtos codificam TFSS, sendo um deles localizado no cromossomo e o outro no plasmídeo pXAC64 (Fig. 13). O nível de similaridade entre esse dois sistemas de *Xac* é relativamente baixo, como mostrado na Tabela 3. Os genes *vir* encontrados no cromossomo de *Xac* possuem uma organização diferente do sistema encontrado no pXAC64. A figura 13 mostra a comparação da região *vir* encontrado em algumas bactérias. Até o presente momento não existem estudos que mostrem a funcionalidade e a importância do TFSS no processo de patogenicidade de *Xac* e em outros membros dos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Xylella*.

O *locus vir* presente no plasmídeo pXAC64 de *Xac* possui maior similaridade com o sistema *mpfA-J* presente no plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida*, o qual é requerido para conjugação e formação do pilus

Tabela 3- Análise da identidade e similaridade dos genes localizados nos *loci vir* do plasmídeo pXAC64 e no cromossomo de *Xac*.

Proteína	Locus <i>vir</i> plasmídeo pXAC64		Locus <i>vir</i> Cromossomo		Identidade (%)	Similaridade (%)
	Gene	a.a.	Gene	a.a.		
VirB1	XACb0036	292	XAC2617	280	57	62
VirB2	XACb0047	125	XAC2616	136	<20	<20
VirB3	XACb0046	99	XAC2615	103	20	32
VirB4	XACb0045	877	XAC2614	817	26	42
VirB5	XACb0044	220	-----		----	----
VirB6	XACb0041	288	XAC2612	350	<20	<20
VirB7*	XACb0042	131	XAC2622	139	----	----
	XACb0043	82			----	----
VirB8	XACb0040	224	XAC2621	348	25	40
VirB9	XACb0039	260	XAC2620	255	23	42
VirB10	XACb0038	406	XAC2619	389	24	39
VirB11	XACb0037	340	XAC2618	346	34	51
TrwB/ VirD4	XACb0030	524	XAC2623	557	20	39

* Não identificado como VirB7 na anotação do genoma de *Xac* (da Silva *et al.*, 2002). Nossos resultados forneceram evidências de que XAC2622 (cujo gene encontra-se no *locus vir* do cromossomo) pode ser um homólogo de VirB7 (Vide Resultados e Discussão). Os candidatos a VirB7 XACb0042 e XACb0043, cujos genes encontram-se no *locus vir* do plasmídeo, não possuem identidade/função definidas até este momento. (----) representa proteínas que não apresentam identidade/similaridade significativa.

de conjugação (Greated *et al.*, 2002). De fato, a maioria dos genes *vir* encontrados no pXAC64 possui de 40-60% de similaridade e são ordenados da mesma maneira que os correspondentes em pWW0 (Figs. 13B e C). Próximo a este *locus* de *Xac* é possível encontrar alguns genes que codificam proteínas hipotéticas assim como quatro genes (*traK*-XACb00024; *trwA*-XACb00025; *trwB*-XACb00026; *trwC*-XACb00032) que possuem similaridade com os genes *traD*, *A*, *B* e *C* do plasmídeo pWW0, os quais são essenciais para processos de conjugação (Figs. 13B e C). Nós identificamos uma região entre os genes XACb00024 e XACb00025 que possui alta similaridade com a *oriT* de pWW0 (Fig.

¹³C, Alegria e Farah-não publicado). Apesar do plasmídeo pXAC33 de *Xac* não apresentar os genes *vir*, é possível constatar a presença da região *oriT* assim como dos genes *traA* e *D*. Desta forma, no caso do TFSS codificado pelo pXAC64 ser funcional para a conjugação de DNA, a presença de *oriT* nos dois plasmídeos (pXAC64 e pXAC33) poderia possibilitar a mobilização de ambos para processos conjugativos. Christie e Vogel (2000) mostraram que plasmídeos que a princípio não são mobilizados para conjugação, quando contêm a região *oriT* são capazes de ser conjugados pelo sistema *mpf* de *P. putida*.

Proteínas Relacionadas a Rpf (Fatores de Regulação de Patogenicidade) e “Quorum Sensing”

O termo “quorum sensing” (QS) descreve mecanismos de comunicação celular que são ativados e resultam da transdução de sinais dependentes, principalmente, da densidade celular e alterações ambientais (von Bodman *et al.*, 2003). Estes mecanismos atuam de forma a coordenar a ação de bactérias individuais em processos que promovem a sobrevivência, cooperação, competitividade e colonização de hospedeiros. QS envolve a liberação de moléculas sinalizadoras que são reconhecidas pelos membros semelhantes de uma população. Se a produção dessas moléculas sinalizadoras por uma população é maior que a sua perda por difusão ou inativação, o sinal acumulado ativa grupos de proteínas receptoras que, posteriormente, causarão a ativação de genes específicos (Zhang *et al.*, 2003, von Bodman *et al.*, 2003; Crossman e Dow *et al.*, 2004; Dow *et al.*, 2003; Whitehead *et al.*, 2001). O principal critério para ativação de QS é a densidade celular que normalmente é elevada quando ocorre a formação de biofilmes ou crescimento bacteriano em espaço restrito no hospedeiro (von Bodman *et al.*, 2003). Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), a molécula sinalizadora é chamada DSF (“Density Signalling Factor”) e foi recentemente identificada como um ácido graxo *cis*-11-methyl-2-dodecenoico α,β -insaturado (Wang *et al.*, 2004).

A expressão e secreção de enzimas (incluindo proteases, pectinases e endoglucanases) e polissacarídeos extracelulares em *Xcc* é dependente de processos ativados por QS e está sob o controle e regulação de um grupo de proteínas denominadas Rpf (fatores de regulação de patogenicidade) (Slater *et al.*, 2000; Crossman *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). A expressão dos genes

Figura 13 –A) Comparação entre alguns TFSS encontrado em *A. tumefaciens* (T-DNA-VirB), *Brucella* spp., *Xylella fastidiosa* e *Xac* (plasmídeo e cromossomo). Esta figura foi baseada na publicação de Christie e Vogel (2000) acrescida dos mapas gênicos de *Xylella fastidiosa* juntamente com os dois sistemas presentes em *Xac*. B) Comparação entre os TFSS, do plasmídeo pXAC64 de *Xac* e do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida* sequenciado por Greated *et al.* (2002). C) mostra a similaridade entre alguns componentes do TFSS do plasmídeo pXAC64 e do sistema Mpf do pWW0, incluindo a região *oriT*. (—) representa proteínas que não apresentam similaridade significativa entre esses dois sistemas.

sob o controle do sistema Rpf é observada durante o processo infeccioso, o que leva a crer que estas proteínas estejam relacionadas com o processo adaptativo na presença do hospedeiro. O *locus* descrito para o gênero *Xanthomonas* mostra os componentes *rpfABFCHGDIE*. *Xac* não possui *rpfH* e *rpfI*, sendo semelhante ao observado em *Xylella fastidiosa* (*Xf*) (da Silva *et al.*, 2002). A comparação dos *loci rpf* de *Xac* e *Xcc* está mostrada na figura 14.

Figura 14- Mapa gênico dos principais componentes do sistema Rpf de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). A comparação entre os genes que compõe esse sistema mostra a ausência de *rpfH* em *Xac*.

Apesar dos produtos codificados por estes genes nunca terem sido estudados, a análise das estruturas primárias codificadas possibilitou atribuir possíveis funções: RpfC codifica uma das partes de um sistema de dois componentes ("two-component system") que possui: a) região N-terminal associada à membrana interna; b) domínio histidina quinase fosfoceptor que contém um resíduo de histidina conservado; c) domínio receptor regulador de resposta (RR) contendo um resíduo de aspartato conservado; d) domínio Hpt envolvido com processos de fosfotransferência. RpfG é uma proteína que apresenta um domínio RR além de um possível domínio HD-GYP envolvido em atividades fosfodirolásicas e transdução de sinais. Foi proposto que domínios HD-GYP atuam como di-GMPc fosfodiesterases (Galperin *et al.*, 1999; Crossman, 2004). Di-GMPc foi implicado como ativador alostérico de níveis de celulose em *Acetobacter xylinum* (Tal *et al.*, 1998). Outros estudos apresentam evidências indiretas do papel de di-GMPc na regulação de outros processos, incluindo a formação de biofilmes (Ausmees *et al.*, 2001; Drenkard e Ausubel 2002; Chan *et al.*, 2004).

O domínio RR da RpfG está normalmente presente em proteínas que fazem parte de um sistema de dois componentes bacterianos que são ativados por uma proteína sensora (neste caso o RpfC) e associam-se ao DNA através

da porção C-terminal (como proposto para RpfG) (Pao e Saier, 1995). RpfF e RpfB são enzimas envolvidas na síntese de DSF (Slater *et al.*, 2000; Dow *et al.*, 2003). Mutantes em *rpfF* e *rpfB* são incapazes de sintetizar DSF mas, mutantes em *rpfF* podem secretar enzimas e polissacarídeos da mesma forma que a cepa selvagem quando DSF exógeno está presente no meio. Não foram observadas reduções na síntese de proteases e endoglucanases quando *rpfH* está ausente, mas seus níveis foram reduzidos na ausência de *rpfI* (Slater *et al.*, 2000). O mecanismo de regulação proposto para Xcc está mostrado na figura 15. A princípio, secreção de DSF é contínua e independe da densidade celular e das condições ambientais. Com o aumento da proliferação do patógeno, a concentração de DSF no meio aumenta gradativamente até atingir níveis capazes de ativar o sistema Rpf.

O mecanismo que envolve a percepção de densidade celular proposto por Slater *et al.* (2000) ocorre através da ligação de DSF ao domínio sensor N-terminal de RpfC associada à membrana interna, o que resulta em um processo de auto-fosforilação. Os estímulos que ativam esse processo incluem o próprio DSF além de outros possíveis fatores ainda desconhecidos. A auto-fosforilação de RpfC leva à transferência dos fosfatos para resíduos de His-Asp-His da própria RpfC até ser transferido para um resíduo Asp conservado no domínio RR da RpfG. Um via alternativa pode ocorrer envolvendo apenas RpfC-His do domínio sensor seguida da fosforilação de RpfG-Asp (Fig. 15). Uma vez fosforilada, RpfG levaria à ativação de uma série de genes importantes no processo de virulência, entre eles *eng* (endoglucanases), *prt* (proteases) e *gum* (goma xantana). Dentre estes, a ativação dos genes *gum* e a exportação de goma xantana é um fator importante no processo infeccioso, já que uma vez exportada ela é um dos componentes estruturais do biofilme que previne a ação de derivados antimicrobianos do hospedeiro (Dow *et al.*, 2003).

Estudos Funcionais do Genoma

Embora os esforços de seqüenciamento e anotação de genomas constituam importantes avanços no estudo de um organismo, a informação gerada não é suficiente para a total compreensão dos processos de regulação, interação e ativação gênica. Assim, é fundamental que essa informação seja

Figura 15- Mecanismo de transdução de sinal envolvendo genes *rpf*, os quais são responsáveis pela síntese e detecção dos fatores DSF e outros estímulos ambientais. A ativação de RpfC faz com que um sinal de fosforilação seja transmitido para RpfG que, por sua vez, ativa a transcrição de genes de virulência. As enzimas RpfF e RpfB atuam na síntese do fator de sinalização DSF. ME-membrana externa; MI-membrana interna; (Slater *et al.*, 2000).

traduzida e analisada de forma funcional. Nesse sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas para investigar expressão, estrutura, função e regulação de proteínas em escala genômica. Algumas metodologias incluem eletroforese bidimensional ou HPLC associada a espectrometria de massa (Dutt e Lee, 2000; Washburn e Yates, 2000), determinação de estruturas tridimensionais (Christendat *et al.*, 2000), "Microarray" (Zhu *et al.*, 2003) e elaboração de redes de interação proteína-proteína utilizando interações *in vitro* e através do sistema duplo-híbrido (Walhout *et al.*, 2000; Uetz *et al.*, 2000)

Sistema Duplo-Híbrido de Levedura

A determinação de uma rede de interações protéicas é um meio eficaz para obtermos informações sobre a função, vias de atuação de regulação de uma determinada proteína ou grupo de proteínas, incluindo aquelas que não possuem similaridade com outras proteínas de função conhecida. Isso é particularmente importante quando focalizamos um sistema cujo funcionamento somente foi estudado ao nível gênico.

Ambos Fields and Song (1989) e Chien *et al.* (1991) foram os primeiros a demonstrar o uso do sistema duplo-híbrido para a triagem de interações proteína-proteína específicas. Este sistema é baseado na habilidade de

separar o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ativação do ativador de transcrição GAL4 de levedura (Ma & Ptashne, 1987; Keegan *et al.*, 1986). A expressão destes domínios isoladamente não permite a transcrição de um gene repórter sob o controle de um promotor GAL mas, se estes dois domínios são co-expressos como proteínas de fusão (“híbridos”) as quais contêm domínios que interagem entre si, o complexo pode ativar a transcrição (Fig. 16). A transcrição dos genes repórteres pode resultar em colônias com colorações específicas (*lacZ*) ou permite o crescimento celular em condições restritas através da utilização de mutantes auxotróficos como *his*, *ura* e *ade*.

Figura 16- Representação do sistema duplo-híbrido em levedura utilizando proteínas em fusão com o domínio de ativação (AD) e com o domínio ligação (BD) do fator de transcrição GAL4. A) Proteínas que não interagem impossibilitam a transcrição dos genes repórteres. B) Proteínas capazes de interagir reconstituem o complexo GAL4 e possibilitam a ativação dos repórteres.

O sistema duplo-híbrido de levedura envolve o uso de dois diferentes plasmídeos em uma única célula. Um deles contém o segmento de DNA de interesse (denominado “isca”) em fusão com o fragmento que codifica o domínio de ligação ao DNA GAL4 (vide figura 18 de Materiais e Métodos). O outro plasmídeo é derivado de uma biblioteca de DNA genômico, cDNA ou

ainda um segundo segmento de interesse em fusão com o domínio de ativação do GAL4 (vide figura 17 de Materiais e Métodos). A proteína capaz de interagir com a proteína “isca” é denominada “presa”. Através de processos de co-transformação, transformação seqüencial ou cruzamento sexual (a/α), as duas construções são introduzidas em uma única célula de levedura. O grande potencial desta metodologia reside no fato que uma proteína específica em fusão com o domínio de ligação ao DNA pode ser utilizada para a triagem de uma biblioteca genômica ou de cDNA completa em fusão com o domínio de ativação. Esta biblioteca pode ser gerada através da digestão parcial do DNA genômico com endonucleases, clivagem mecânica randômica do DNA utilizando sonicador/nebulizador, preparação de cDNA ou ainda através da amplificação específica de genes por PCR (Evangelista *et al.*, 1996, Uetz *et al.*, 2000).

O sistema duplo-híbrido tem sido usado para identificar interações proteína-proteína de grandes complexos protéicos tais como o complexo da via de resposta a feromônio em *Drosophilla* (Evangelista *et al.*, 1996), RNA polimerase III de levedura (Flores *et al.*, 1999), o conjunto de proteínas que interage com a quinase dependente de ciclina envolvida na regulação do ciclo celular (Harper *et al.*, 1993) e o complexo de secreção Tipo IV de *A. tumefaciens* (Ward *et al.*, 2002). Essa mesma metodologia tem sido utilizada em mapeamento em larga escala de genomas como *Saccharomyces cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000) e *Helicobacter pylori* (Rain, *et al.*, 2001). Para determinação da rede de interações de *S. cerevisiae* ao invés de ser utilizada uma biblioteca genômica ou de cDNA, Uetz *et al.* (2000) desenharam pares de oligonucleotídeos específicos para cada uma das 6.000 ORFs existentes no seu genoma, amplificaram todas elas por PCR e clonaram nos vetores de duplo-híbrido por meio de recombinação *in vivo* em levedura. Do total de interações encontradas, cerca de 40% envolviam proteínas com função desconhecida e aproximadamente 10% já haviam sido previamente caracterizadas por ensaios de co-precipitação, cromatografia de afinidade, co-purificação e análise de duplo-híbrido em menor escala.

O sistema duplo-híbrido, apesar de ser uma metodologia com grande potencial na determinação de interações proteína-proteína, produz um número considerável de falso-positivos (proteínas cuja interação não tem relevância

fisiológica mas apresentam resultado positivo no duplo-híbrido) e falso negativos (proteínas que interagem no organismo de interesse mas em levedura não apresentam o fenótipo de interação). As razões para a presença de falso-positivos incluem: 1) a interação obtida ocorre com proteínas que estão presentes em diferentes organelas ou são expressas em condições diferentes no organismo de interesse; 2) proteínas que contêm domínios comuns de interação mas sem contexto fisiológico para a interação observada; 3) uma das proteínas é um auto-ativador dos genes repórteres independente da natureza da segunda proteína; 4) caso uma das proteínas seja um fator de transcrição ela também pode ativar os repórteres. Nestes casos, a utilização de diferentes genes repórteres sob o controle de diferentes promotores reduz em grande número os falso-positivos (James *et al.*, 1996; Coates e Hall, 2003). Os fatores que podem levar à presença de falso-negativos são: 1) a proteína não apresenta sua conformação correta devido, por exemplo, ao fato de estar sendo expressa em fusão com o domínio GAL4; 2) modificações pós-tradução ocorridas na levedura não são observadas no organismo de interesse; 3) a presença de domínios transmembrana impede que o complexo dirija-se ao núcleo para a ativação dos repórteres; 4) A proteína é tóxica para a levedura (neste caso há a possibilidade de utilizar promotores induzíveis); 5) problemas relacionados a expressão da fusão. Apesar destes aspectos, a utilização de cepas de levedura contendo diferentes genes repórteres e a utilização de compostos que aumentam a estringência da triagem permite que essa metodologia seja aplicada de forma satisfatória em estudos de genômica funcional (Coates e Hall, 2003; Causier and Davies, 2002; Uetz e Hughes, 2000; Uetz *et al.*, 2000; James *et al.* 1996). James *et al.* (1996) mostraram que o uso das linhagens de levedura PJ694-a ou PJ694- α (*MATa* (ou *MAT α*) *trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) reduz o número de falso-positivos quando a expressão simultânea dos genes repórteres *GAL1-HIS3* e *GAL2-ADE2* é usada na seleção. Além disso, o fato dessas linhagens possuírem os genes repórteres *lacZ*, *HIS3* e *ADE2* sob o controle de três promotores diferentes (*GAL7*, *GAL1* e *GAL2*, respectivamente) permite realizar a triagem em condições de alta estringência. Finalmente, o uso de 3-aminotriazol reduz a ativação basal do

repórter *HIS3* quando são observadas interações fracas entre as proteínas de fusão.

Seleção das Proteínas de *Xac* para serem Utilizadas como Iscas na Triagem da Biblioteca Utilizando o Sistema Duplo-Híbrido de Levedura

As principais proteínas analisadas neste trabalho são componentes (ou fatores relacionados) com o TTSS, TFSS-plasmídeo, TFSS-cromossomo e Sistema “Quorum Sensing”/Rpf de *Xac*. Além destas, controles positivos e outras proteínas não diretamente relacionadas com mecanismos conhecidos de patogenicidade também foram estudadas.

As Tabelas 4-9 listam todas as proteínas utilizadas como iscas. Além dos componentes do TTSS (Tabela 4), TFSS-plasmídeo (Tabela 5), TFSS-cromossomo (Tabela 6) e Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf (Tabela 7), outras proteínas também foram testadas como controles positivos (Tabela 8). Além disso, outras proteínas estudadas apesar de não estarem diretamente relacionadas com a patogenicidade (Tabela 9).

Tabela 4- Relação de proteínas de Xac associadas ao Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) usadas como iscas na triagem da biblioteca utilizando o sistema de duplo-híbrido em levedura.

Isca	Gene	a.a.	Descrição
HrpG	XAC1265	263	Domínio regulador de resposta (RR) de um sistema de dois componentes da família OmpR e domínio de ligação ao DNA responsável pela ativação da expressão dos genes <i>hrp</i> através de HrpX (Buttner e Bonas, 2003).
XAC0095	XAC0095	73	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> . Esta proteína foi utilizada como isca depois que a triagem da biblioteca com HrpG mostrou uma forte interação HrpG-XAC0095.
HrpB2	XAC0408	130	Componente estrutural do TTSS. Em Xcv esta proteína é secretada para a superfície bacteriana e é necessária para a secreção de outras proteína pelo TTSS (Wengelnik <i>et al.</i> , 1999).
HrpB1	XAC0407	151	HrpB1 é um componente citoplasmático do TTSS. Esta proteína é essencial para a patogenicidade de Xcv (Rossier <i>et al.</i> , 2000).
HrpB4	XAC0410	209	HrpB4 é uma proteína altamente conservada em <i>Xanthomonas spp</i> (em torno de 90% de identidade). Sua função não é conhecida.
HrpD5	XAC0399	312	Homólogos a HrpD5 são encontrados em outros fitopatógenos como HrpW de <i>R. solanacearum</i> e HrpJ3 de <i>P. syringae</i> (Huguet <i>et al.</i> , 1998).
HrpD6	XAC0398	80	Homólogos a HrpD6 são encontrados apenas em <i>Xanthomonas spp</i> . Possui possível associação com a membrana interna na região periplasmática (Huguet <i>et al.</i> , 1998).
HrcN	XAC0412	442	HrcN é um componente conservado em todos os TTSS. Com domínios citoplasmáticos, esta é uma ATPase possivelmente associada à membrana interna (Plano <i>et al.</i> , 2001) que apresenta boa similaridade com F ₁ ATPases bacterianas.
HpaA	XAC0400	271	HpaA de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> contém duas regiões sinalizadoras de localização nuclear (NLS), uma na porção N e outra na C-terminal e apresenta 71% de similaridade com HpaA de Xac. Huguet <i>et al.</i> , (1998) mostraram que os domínios NLS da HpaA são funcionais e podem direcioná-la ao núcleo do hospedeiro.

HpaB	XAC0396	156	Esta proteína possivelmente se associa à membrana interna devido à presença de uma região transmembrânica entre os aminoácidos 92-108. Sua função não está descrita na literatura. Devido à presença desta região transmembrânica na porção central da proteína, nós utilizamos HpaB como isca usando apenas a porção C-terminal (resíduos 108-157) e a proteína inteira.
HrcV	XAC0405	645	HrcV é similar aos componentes LcrD de <i>Yersinia pestis</i> e ao componente flagelar FliA. A porção N-terminal desta proteína contém várias regiões hidrofóbicas que resultam em pelo menos seis hélices transmembranaais capazes de formar o principal poro do TTSS na membrana interna (Hoeck, 1998; Plano <i>et al.</i> 1991).
HP	XAC0392	165	Proteína hipotética cujo gene está localizado ao lado do locus <i>hrp</i> no genoma de <i>Xac</i> .
HpaP	XAC0404	204	Função desconhecida. Homólogos a HpaP de <i>Xac</i> são encontrados apenas em <i>X. campestris</i> pv. <i>glycines</i> e <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .
HrcS	XAC0401	86	Componente estrutural do TTSS com similaridade a FliQ do complexo flagelar e a YscS de <i>Yersinia spp.</i>
HrpF	XAC0394	824	HrpF é um dos principais componentes externos do TTSS. Recentemente foi mostrado que HrpF liga-se à bicamada lipídica e induz a formação de um canal na membrana da célula hospedeira (Buttner e Bonas, 2002).
HrpB5	XAC0411	233	HrpB5 é similar aos componentes HrpE de <i>Pseudomonas spp.</i> , YscL de <i>Yersinia spp</i> e FliH do complexo flagelar (Hoeck, 1998). Pouco é conhecido a respeito da função desta proteína (Hoeck, 1998; Groisman, 2001; He, 1998).
CHP	XAC1568	157	Proteína hipotética conservada encontrada em <i>Xanthomonas spp</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . XAC1568 foi utilizada como isca depois que a triagem da biblioteca pelo ensaio duplo-híbrido com HrpG mostrou interações entre elas.
HrpB7	XAC0413	169	XAC0413 possui homólogos apenas no gênero <i>Xanthomonas</i> . Sua função não é conhecida.
HpaF	XAC0393	646	XAC0393 possui homólogos no gênero <i>Xanthomonas</i> . Proteína rica em leucina similar a HpaG de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> descrita por Noel <i>et al.</i> (2002).
HrcQ	XAC0403	304	HrcQ é similar a YscQ de <i>Yersinia spp</i> e ao componente flagelar FliY. HrcQ possivelmente encontra-se associada à membrana interna na região periplasmática (He, 1998).

Hpa2	XAC0417	138	Hpa2 de Xac possui homólogos no gênero <i>Xanthomonas</i> . Linhagens de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> contendo deleções nos genes <i>hpa1</i> e <i>hpa2</i> apresentam patogenicidade reduzida e fraco desenvolvimento de HR em não-hospedeiros ou plantas resistentes (Zhu <i>et al.</i> , 2000).
Hpa1	XAC0416	137	A proteína Hpa1 apresenta similaridade a harpinas encontradas em <i>P. syringae</i> e <i>Erwinia spp</i> assim como com a proteína PopA de <i>R. solanacearum</i> . Linhagens de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> contendo deleções nos genes <i>hpa1</i> e <i>hpa2</i> apresentam patogenicidade reduzida e fraco desenvolvimento de HR em não-hospedeiros ou plantas resistentes (Zhu <i>et al.</i> , 2000).
AvrXacE2	XAC3224	356	AvrXacE2 é similar à proteína AvrPphE de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> , a qual é requerida para o desenvolvimento de HR em interações incompatíveis, mas seu papel na virulência ainda não foi demonstrado (Deng <i>et al.</i> , 2003).
HrpXct	XAC1266	476	HrpXct corresponde ao fator de transcrição HrpX do gênero <i>Xanthomonas</i> . Esta proteína pertencente à família de fatores de transcrição AraC e é responsável pela ativação da transcrição dos genes <i>hrp</i> além de ativar outros genes cujos produtos podem ser secretados pelo TTSS (Wengelnik, 1996; Buttner e Bonas, 2002). Sua transcrição é controlada por HrpG.
HrpE	XAC0397	93	HrpE é um dos principais componentes extracelulares do TTSS (Wengelnik, 1996; Buttner e Bonas, 2002). Com função estrutural, esta proteína é altamente conservada no gênero <i>Xanthomonas</i> .
XCHP	XAC0277	410	Proteína hipotética cujo gene está localizado próximo ao gene <i>avrXacE1</i> . XAC0277 contém um possível PIP-BOX em sua região promotora.
CHP	XAC1706	369	Proteína hipotética conservada que possui um possível PIP-BOX na região promotora do seu gene.
CHP	XAC0424	542	Proteína hipotética conservada que possui um possível PIP-BOX na região promotora do seu gene.
XAC3090	XAC3090	497	Proteína hipotética contendo uma região rica em leucina similar a PopC de <i>Ralstonia solanacearum</i> , a qual é importante para o processo de patogenicidade. PopC possui uma região promotora similar a de alguns genes <i>hrp</i> que são ativados pelo fator HrpB (Cunnac <i>et al.</i> , 2004).
XCHP	XAC0419	103	Proteína hipotética conservada no gênero <i>Xanthomonas</i> cujo gene está localizado próximo ao locus <i>hrp</i> em Xac.
HP	XAC0395	266	Proteína hipotética cujo gene está localizado no locus <i>hrp</i> de Xac.

HrcU	XAC0406	357	Componente do TTSS, HrcU é similar a YscU de <i>Yersinia spp</i> e à FlhB do complexo flagelar. HrcU apresenta-se associada à membrana interna contendo uma porção C-terminal citoplasmática.
HP-Proteína Hipotética CHP-Proteína Hipotética Conservada em diferentes organismos XCHP-Proteína Hipotética Conservada no gênero <i>Xanthomonas</i>			

Tabela 5- Relação de proteínas de Xac associadas ao Sistema de Secreção do Tipo IV (TFSS) do plasmídeo usadas como iscas na triagem da biblioteca utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura.

Isca	Gene	a.a.	Descrição
VirB11-plasmídeo	XACb0037	340	Possível ATPase do TFSS que, juntamente com VirD4 e VirB4, é um dos candidatos responsável pela transdução da energia necessária para o mecanismo de secreção. VirB11-plasmídeo possui 46% de similaridade com a proteína MpfJ do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel, 2000).
VirB4 Plasmídeo	XACb0045	877	Possível ATPase do TFSS que, juntamente com VirD4 e VirB11, seria responsável por prover a energia necessária para o mecanismo de secreção. VirB4-Plasmídeo possui 58% de similaridade com a proteína MpfC do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel, 2000).
HP	XACb0035	139	Proteína hipotética cujo gene está localizado entre os <i>loci vir</i> e <i>tra</i> do plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0049	124	Proteína hipotética cujo gene está localizado próximo ao <i>locus vir</i> do plasmídeo pXAC64.
VirB1 plasmídeo	XACb0036	292	Possível transglicosilase que auxilia na formação de poros na camada peptidoglicana que irão permitir a formação do pilus de secreção (Groisman, 2001; Burns, 2003, Christie e Vogel, 2000; Ward <i>et al</i> , 2002). XACb0036 possui 44% de similaridade com a proteína MpfJ do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel, 2000).

CHIP	XACb0032	107	Proteína hipotética cujo gene está localizado entre os <i>loci vir</i> e <i>tra</i> do plasmídeo pXAC64.
TwB	XACb0030	524	TwB é uma possível ATPase do TFSS que, juntamente com VirB4 e VirB11, seria um dos responsáveis por prover a energia necessária para a o mecanismo de secreção. XACb0030 possui 65% de similaridade com <i>traB</i> do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel 2000).
HP	XACb0043	82	Proteína hipotética cujo gene está localizado no <i>locus vir</i> do plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0034	140	Proteína hipotética cujo gene está localizado entre os <i>loci vir</i> e <i>tra</i> do plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0048	118	Proteína hipotética cujo gene está localizado próximo ao <i>locus vir</i> do plasmídeo pXAC64.
CHIP	XACb0033	72	Proteína hipotética cujo gene está localizado entre os <i>loci vir</i> e <i>tra</i> do plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0026	57	Proteína hipotética cujo gene está localizado ao lado de <i>traA</i> no plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0029	124	Proteína hipotética cujo gene está localizado no <i>locus tra</i> do plasmídeo pXAC64.
CHIP	XACb0023	111	Proteína hipotética cujo gene está localizado ao lado de <i>traD</i> no plasmídeo pXAC64. XACb0023 possui 77% de similaridade com a porção N-terminal do produto da ORF177 do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel, 2000).
HP	XACb0021	129	Proteína hipotética localizada próxima ao <i>locus tra</i> do plasmídeo pXAC64. Esta proteína foi usada como isca na fase +2 depois que a triagem da biblioteca com XACb0043 mostrou uma forte interação desta com XACb0021(+2).
HP	XACb0020	150	Proteína hipotética localizada próxima ao <i>locus tra</i> do plasmídeo pXAC64.
TrwA (HP)	XACb0025	131	XACb0025 possui 56% de similaridade com a proteína TraA do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Greated <i>et al.</i> , 2002) e 29% identidade com TrwA do plasmídeo R388 de <i>E. coli</i> . TrwA é um inibidor de transcrição do operon <i>traABC</i> e facilita o relaxamento de DNA catalizado por TrwC.
TrwC	XACb0031	991	XACb0031 possui 66% de similaridade com a proteína TraC do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Greated <i>et al.</i> , 2002) e com TrwC do plasmídeo R388 de <i>E. coli</i> (Liosa <i>et al.</i> , 1996). TrwC liga-se ao DNA e cliva a região da <i>oriT</i> .

TraK (HP)	XACb0024	148	XACb0024 possui 59% de similaridade com a proteína TraD do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Greated <i>et al.</i> , 2002) e 19% de identidade (39% similaridade) com "oriT binding protein"/TraK do plasmídeo pB10 de <i>Pseudomonas</i> . TraK facilita a formação do relaxosomo no processo de conjugação (Ziegelin <i>et al.</i> , 1992).
HP	XACb0027	90	Proteína hipotética cujo gene está localizado no locus <i>tra/trw</i> do plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0028	151	Proteína hipotética cujo gene está localizado no locus <i>tra/trw</i> do plasmídeo pXAC64.
CHP	XACb0022	165	Proteína hipotética localizada próxima à região <i>tra/trw</i> . XACb0022 possui 84% de similaridade com a porção C-terminal do produto da ORF177 do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel 2000).
HP	XACb0018	107	Proteína hipotética cujo gene está localizado próximo ao locus <i>tra</i> do plasmídeo pXAC64.
HP	XACb0042	131	Proteína hipotética cujo gene está localizado no locus <i>vir</i> do plasmídeo pXAC64.

HP-Proteína Hipotética
CHP-Proteína Hipotética Conservada em diferentes organismos
XCHP-Proteína Hipotética Conservada no gênero *Xanthomonas*

Tabela 6- Relação de proteínas de *Xac* associadas ao Sistema de Secreção do Tipo IV (TFSS) do cromossomo usadas como iscas na triagem da biblioteca utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura.

Isca	Gene	a.a.	Descrição
VirD4 cromossomo	XAC2623	557	XAC2623 é uma possível ATPase do TFSS que, juntamente com VirB4 e VirB11, atua no mecanismo de secreção. VirD4 encontrada no cromossomo possui 39% de similaridade com TrwB do plasmídeo pXAC64 e 53% com VirD4 de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> .
VirB11 cromossomo	XAC2618	346	XAC2618 é uma possível ATPase do TFSS que, juntamente com VirB4 e VirD11, atua no mecanismo de secreção por este sistema. VirB11 encontrada no cromossomo de <i>Xac</i> possui 51% de similaridade com VirB11 do plasmídeo pXAC64 e 54% com VirB11 de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> .
VirB4- cromossomo	XAC2614	817	XAC2614 é uma possível ATPase do TFSS que, juntamente com VirB11 e VirD4, atua no mecanismo de secreção por este sistema. VirB4 encontrada no cromossomo de <i>Xac</i> possui 42% de similaridade com VirB4 do plasmídeo pXAC64 e 44% com VirB4 de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> .
HP	XAC2613	275	Proteína hipotética cujo gene está localizado entre <i>virB6</i> e <i>virB4</i> da região <i>vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i> .
XAC2609	XAC2609	431	Proteína hipotética cujo gene está localizado na região <i>vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i> . XAC2609 foi uma das presas encontradas na triagem da biblioteca quando utilizamos VirD4 do cromossomo de <i>Xac</i> como isca no duplo-híbrido.
XAC0466	XAC0466	589	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> . XAC0466 foi uma das presas encontradas na triagem da biblioteca quando utilizamos VirD4 do cromossomo de <i>Xac</i> como isca no duplo-híbrido.
XCHIP	XAC2611	164	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> cujo gene está localizado ao lado da cópia completa do <i>virB6</i> (XAC2612) na região <i>vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i> . XAC2611 apresenta 69% de similaridade com XAC2606, outra proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> e localizada ao lado das cópias parciais de <i>virB6</i> no mesmo <i>locus</i> .
CHIP	XAC2605	147	Proteína hipotética conservada cujo gene está localizado próximo ao <i>locus vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i> .
XCHIP	XAC2606	163	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> cujo gene está localizado ao lado das cópias parciais de <i>virB6</i> (XAC2608 e XAC2607) no <i>locus vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i> . XAC2606 apresenta 69% de similaridade com XAC2611, outra proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> e localizada ao lado do gene completo do <i>virB6</i> (XAC2612).

XCHP Vir cromossomo	XAC2622	139	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> cujo gene está localizado entre <i>virB8</i> e <i>virD4</i> no locus <i>vir</i> do cromossomo.
VirB1- cromossomo	XAC2617	280	Possível transglicosilase que auxilia na formação de poros na camada peptidoglicana que irão permitir a formação do <i>pilus</i> de secreção (Groisman, 2001; Burns, 2003, Christie e Vogel, 2000; Ward et al, 2002). XAC2617 possui 62% de similaridade com VirB1 encontrada no plasmídeo pXAC64 de <i>Xac</i> e 51% com MpfJ do plasmídeo pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> (Christie e Vogel, 2000).
HP Vir cromossomo	XAC2610	267	Proteína hipotética localizada no locus <i>vir</i> do cromossomo de <i>Xac</i> ao lado das cópias parciais de <i>virB6</i> (XAC2607 e XAC2608).
XCHP 295	XAC0096	646	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> . XAC0096 foi uma das presas encontradas na triagem da biblioteca quando utilizamos VirD4 do cromossomo de <i>Xac</i> como isca no duplo-híbrido.

HP-Proteína Hipotética

CHP-Proteína Hipotética Conservada em diferentes organismos

XCHP-Proteína Hipotética conservada no gênero *Xanthomonas*

Tabela 7 - Relação de proteínas de Xac associadas ao Sistema de “Quorum-Sensing”/Rpf usadas como iscas na triagem da biblioteca utilizando o sistema de duplo-híbrido de levedura.

Isca	Gene	a.a.	Descrição
CHP	XAC1883	82	Proteína hipotética conservada cujo gene está localizado ao lado de <i>rpfA</i> no locus <i>rpf</i> .
Histidina quinase	XAC3673	578	Histidina quinase que exibe 49% de similaridade com RpfC de Xac. Estas proteínas não são similares na porção N-terminal, local onde ocorre a ancoragem e percepção de sinais através da RpfC.
RpfF	XAC1879	289	RpfF é uma enoil-CoA hidratase que participa da síntese de derivados de ácidos graxos que atuam como fatores de sinalização denominados DSF (“diffusible signal factors”) (Slater <i>et al.</i> , 2000; Dow <i>et al.</i> , 2003. Apesar do modelo proposto por Slater <i>et al.</i> , (2000), seu mecanismo de regulação ainda não foi estabelecido.
Sistema de dois componentes	XAC2493	328	Possível membro de um sistema de dois componentes que possui 54% de similaridade com a proteína RpfG de Xac.
XCHP	XAC1881	170	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> localizada no locus <i>rpf</i> entre <i>rpfA</i> e <i>rpfB</i> .
RpfE	XAC1864	306	RpfE está localizada no locus <i>rpf</i> de <i>Xanthomonas</i> spp. Mutantes em <i>rpfE</i> apresentam redução na patogenicidade devido à redução dos níveis de enzimas e polissacarídeos extracelulares (Dow <i>et al.</i> , 2000).
CHP	XAC1884	136	Proteína hipotética conservada cujo gene está localizado próximo ao locus <i>rpf</i> de Xac.
RpfC	XAC1878	725	RpfC é um membro de um sistema de dois componentes que contém ambos domínios: sensor e regulador de resposta. A porção N-terminal, associada à membrana interna, é responsável pela percepção de variações ambientais e posterior transdução de sinais. Apesar de um modelo proposto por Slater <i>et al.</i> , (2000) seu mecanismo de regulação/função ainda não foi bem estabelecido.
RpfN	XAC2504	378	<i>rpfN</i> não faz parte do locus <i>rpf</i> . Mutantes em <i>rpfN</i> levam a um aumento da produção de poligalacturonato liase e outras enzimas extracelulares (Dow <i>et al.</i> , 2000).
RpfA	XAC1882	922	<i>rpfA</i> está localizada no locus <i>rpf</i> e codifica uma aconitase possivelmente envolvida na homeostase de ferro (Dow <i>et al.</i> , 2000).

CmfA	XAC0330	557	CmfA ("Conditioned Medium Factor") está presente apenas em Xac e Xcc, quando analisamos procaríotos, e possui 50% de similaridade com a proteína de mesmo nome encontrada em <i>Dictyostelium discoideum</i> onde é fundamental para mecanismos de "quorum sensing" (Deery e Gomer, 1999). CmfA de Xac foi utilizada como isca depois que a triagem da biblioteca utilizando RpfC mostrou interações RpfC-CmfA.
RpfG	XAC1877	378	RpfG é proteína que contém um domínio regulador de resposta envolvido em processos de transdução de sinal. O modelo proposto por Slater <i>et al.</i> (2000) mostra que RpfG é capaz de associar-se a RpfC e ativar a expressão de genes envolvidos no processo de patogenicidade.
RpfB	XAC1880	560	RpfB é uma acil-CoA sintetase que participa da síntese de derivados de ácidos graxos que atuam como fatores de sinalização denominados DSF ("diffusible signal factors") (Slater <i>et al.</i> , 2000; Dow <i>et al.</i> , 2003). Apesar do modelo proposto por Slater <i>et al.</i> , (2000) seu mecanismo de regulação ainda não foi estabelecido.
XAC2492	XAC2492	1364	XAC2492 está localizada no genoma de Xac ao lado de XAC2493 cujo produto possui 54% de similaridade com RpfG. Essa proteína foi utilizada como isca depois que a triagem da biblioteca com XAC2492 mostrou interações específicas entre XAC2492-XAC2493.
PilJ	XAC3099	678	A proteína PilJ está envolvida com a motilidade do <i>pilJ</i> do tipo IV, o qual está envolvido em processos de movimentação bacteriana independentes do complexo flagelar (Wall e Kaiser, 1999). Esta proteína foi utilizada como isca depois que a triagem da biblioteca com RpfE mostrou interações envolvendo RpfE-PilJ.
CHP	XAC4102	449	XAC4102 codifica uma proteína hipotética conservada que possui 39% de similaridade com um possível receptor de CmfA, denominado CmfR1, de <i>Dictyostelium discoideum</i> (Deery e Gomer, 1999). Esta proteína foi utilizada com isca após a identificação da interação RpfC-CmfA.
RpfD	XAC1874	304	RpfD está localizado próximo ao <i>locus rpf</i> . Sua função ainda não foi bem estabelecida. A análise de mutantes de <i>Xanthomonas</i> em <i>rpfD</i> mostrou apenas uma pequena redução dos níveis de enzimas e polissacarídeos extracelulares (Dow <i>et al.</i> , 2000).

HP-Proteína Hipotética

CHP-Proteína Hipotética Conservada em diferentes organismos

XCHP-Proteína Hipotética Conservada no gênero *Xanthomonas*

Tabela 8- Relação de proteínas de *Xac* usadas como iscas controle na triagem da biblioteca utilizando o sistema de duplo-híbrido de levedura.

Isca	Gene	a.a.	Descrição
GroES	XAC0541	95	<i>groES</i> codifica uma chaperone que, juntamente com GroEL, é requerida para o correto enovelamento de diversas proteínas citoplasmáticas. GroES forma um anel heptamérico capaz de interagir com um complexo formado por GroEL (Neidhardt, 1996).
HolB	XAC1132	319	<i>holB</i> codifica a subunidade <i>delta</i> da DNA polimerase III, a qual apresenta-se associada a outras subunidades da DNA polimerase III (Neidhardt, 1996).
FtsZ	XAC0784	403	<i>ftsZ</i> codifica uma proteína semelhante à tubulina e é capaz de formar longos filamentos fundamentais para o processo de divisão celular (Hale e de Bôer, 1999).
CheA	XAC1903	668	<i>cheA</i> codifica uma histidina quinase envolvida na transdução de sinais em processos de quimiotaxia. Seu mecanismo de ação envolve a interação com um grupo de proteínas Che, dentre elas CheW, CheY e CheB (Neidhardt, 1996).

Tabela 9- Outras proteínas de Xac usadas como iscas na triagem da biblioteca utilizando o sistema de duplo-híbrido de levedura.

Isca	Gene	a.a.	Descrição
VirS	XAC0536	336	XAC0536 codifica um fator de transcrição da família araC. Esta proteína exibe 40% de similaridade com a ORFY2 de <i>Pseudomonas alcaligenes</i> que pode estar envolvida com mecanismos de patogenicidade (Gerritse <i>et al.</i> , 1998).
CHP	XAC2573	153	XAC2573 é uma proteína hipotética conservada localizada no <i>locus gum</i> cujos produtos estão envolvidos na produção da goma xantana e, conseqüentemente, na patogenicidade ((Dow e Daniels, 2000).
PthX	XAC1242	170	PthX pode estar envolvida na patogenicidade de <i>Xanthomonas</i> (resultados não publicados).
MreB	XAC0656	348	XAC0656 codifica uma proteína que possui estrutura semelhante a actina de eucariotos (van den Ent <i>et al.</i> , 2001).
XAC1670	XAC1670	124	Proteína hipotética conservada semelhante a uma série de reguladores de resposta de proteínas histidina quinases.
XAC2956	XAC2956	233	XAC2956 é similar a proteínas relacionadas com processos de replicação.
AcvB	XAC1368	457	AcvB é uma proteína inicialmente caracterizada em <i>A. tumefaciens</i> onde, juntamente com VirJ, é requerida para a formação de tumorigênese no hospedeiro (Kalogeraki e Winans, 1995).
XrvA	XAC1495	134	XAC1495 é uma proteína que contém 70% de similaridade com XrvA de <i>Xanthomonas oryzae</i> , onde mostra uma possível participação na patogenicidade (resultados não publicados).
CHP	XAC4301	489	Proteína hipotética conservada. A utilização desta proteína como isca foi proposta depois que a triagem da biblioteca utilizando HrpX-like como isca mostrou interações HrpXlike-XAC4301.
XCHP	XAC1343	70	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> .
VppA	XACb0060	86	Proteína localizada no plasmídeo que possui similaridade com VppA de <i>Rhodopseudomonas palustris</i> que pode estar envolvida com patogenicidade (Larimer <i>et al.</i> , 2004).

HrpX-like	XAC1994	710	HrpX-like, apesar do nome, não possui nenhuma similaridade com o ativador de transcrição HrpX de <i>Xanthomonas</i> . Esta proteína possivelmente está relacionada com transdução de sinais.
VirP	XAC0569	207	VirP é uma fosfatase que possui similaridade de 52% com a proteína de mesmo nome presente em <i>A. tumefaciens</i> . <i>virP</i> encontra-se associado ao locus <i>vir</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Sua função é desconhecida, mas acredita-se que não seja essencial para a tumorigênese de <i>A. tumefaciens</i> (Zhu <i>et al.</i> , 2000).
Modulador Sigma-54	XAC2973	105	XAC2973 codifica um modulador do fator de transcrição sigma-54. Esta proteína mostrou uma forte interação com HrpX-like quando esta foi usada na triagem da biblioteca.
AcvB	XAC2411	420	AcvB é uma proteína inicialmente caracterizada em <i>A. tumefaciens</i> onde, juntamente com VirJ, é requerida para a formação de tumorigênese no hospedeiro (Kalogeraki e Winans, 1995).
ApaG	XAC0862	127	Possui um domínio similar a uma sub-classe das proteínas F-BOX relacionadas com a degradação de proteínas pela via da ubiquitina.
HP	XAC1497	300	XAC1497 codifica uma proteína hipotética que mostrou interação com HrpX-like quando esta foi utilizada como isca no duplo-híbrido.
AtsE 317	XAC0108	132	Esta proteína contém 50% de similaridade com AtsE de <i>A. tumefaciens</i> , que está localizada em uma região do genoma responsável pela virulência (Kaneco <i>et al.</i> , 2000).
VapC	XACb0059	133	Proteína exibindo 61% de similaridade com VapC (virulence-associated protein C) de <i>Gloeobacter violaceus</i> .
CHP	XACb0057	395	Proteína hipotética conservada provavelmente envolvida na estabilidade de plasmídeos.
CHP	XACb0070	79	Proteína hipotética conservada com 88% de similaridade com uma proteína encontrada no plasmídeo pXF51 de <i>Xylella fastidiosa</i> .
HP	XACb0058	87	Proteína hipotética cujo gene está localizado ao lado de <i>vapC</i> .
CHP	XAC3146	152	Proteína hipotética conservada associada ao locus <i>tol</i> . As proteínas Tol estão envolvidas na estabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Lazzaroni <i>et al.</i> , 2002).

HP-Proteína Hipotética
 CHP-Proteína Hipotética Conservada em diferentes organismos
 XCHP-Proteína hipotética conservada no gênero *Xanthomonas*

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- 1) A construção de uma biblioteca genômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), em um vetor de levedura, para estudos de interações proteína-proteína através do sistema duplo-híbrido de levedura.
- 2) Estudo das interações proteína-proteína do Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) de *Xac*.
- 3) Estudo das interações proteína-proteína dos Sistemas de Secreção do Tipo IV (TFSS) de *Xac* localizados nos *loci vir* presentes no cromossomo e no plasmídeo pXAC64.
- 4) Estudo das interações proteína-proteína do Sistema de “Quorum-Sensing”/Rpf de *Xac*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação das Bibliotecas de DNA Genômico de *Xac*

O vetor pOAD, gentilmente cedido pelo Dr. Stan Fields do Howard Hughes Medical Institute, Departments of Genome Sciences and Medicine da University of Washington (Fig. 17; Uetz *et al.*, 2000), foi utilizado para a construção da biblioteca genômica de *Xac*. Inicialmente, cerca de 20µg deste vetor foram linearizados com 20U de *PvuII* 3h, 37°C em um volume final de 50µL. Após a digestão, foi adicionado ao vetor 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e a mistura centrifugada por 15min a 12000g. O precipitado foi dissolvido em água até uma concentração de 0,1µg vetor/µL e submetido ao tratamento com fosfatase alcalina (CIP). A defosforilação das extremidades cegas do vetor possibilitou a diminuição do número de clones contendo apenas o vetor sem inserto durante a construção das bibliotecas. Esta etapa foi extremamente crítica já que há grandes possibilidades de danificar as extremidades do vetor durante esse tratamento. Existem diversos protocolos diferentes para o tratamento de extremidades cegas com CIP, sendo que as melhores condições foram obtidas adicionando a 5µg do vetor linearizado 1U CIP em um volume final de 50µL, 15min/37°C, 15min/55°C, adição de mais 1U CIP e novamente 15min/37°C, 15min/55°C.

Nebulização do DNA Genômico de *Xac*

Cerca de 50µg de DNA genômico de *Xac* (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro da FCAV/Unesp) foram acrescidos de 30% glicerol e água ultra-pura (volume final de 1mL) em um nebulizador previamente autoclavado. O processo de clivagem mecânica foi feito através da nebulização sob pressão de 0,75kgf/cm² durante 45s utilizando N₂(g). Após a realização de 4 ciclos deste processo, o DNA foi coletado por centrifugação, precipitado com etanol/acetato de sódio e, por fim, dosado para que 5µg deste fossem utilizados na reação de reparo.

GAG ATC GAA TTC CAG CTG ACC ACC ATG GCA ATT CCC GGG GAT
EcoRI *PvuII* *NcoI* *SmaI*

CCG TCG AC C TGC AGA GAT CTA TGA ATC GTA GAT ACT GAA AAA
SalI *PstI* Stop(+1) Stop(+2) Stop(+3)

Figura 17- Mapa gênico do vetor pOAD (Uetz *et al.*, 2000). A figura mostra o marcador de seleção (*bla*) e a origem de replicação (*ori*) em bactéria além da marca de auxotrofia para seleção (*LEU2*) e replicação (CEN4/ARS) em levedura. O domínio de ativação do fator GAL4 (GAL4-AD) está sob o controle das regiões promotora e terminadora do gene da álcool desidrogenase (ADH). A representação da região múltipla de clonagem mostra o sítio de restrição da enzima *PvuII*, localizado no final da região que codifica o domínio GAL-AD, que foi utilizado para a clonagem dos fragmentos genômicos de *Xac* na confecção da biblioteca. Após o sítio de clonagem múltipla existem três códons de parada em fases de leitura diferentes.

Reparo do DNA Genômico Nebulizado e Purificação

A reação de reparo consistiu na adição a 5µg de DNA nebulizado de 6U T4 DNA polimerase, 5U Fragmento Klenow da DNA polimerase de *E. coli*, 10U polinucleotídeo quinase, mistura de 1mM de dNTPs e 2mM ATP em um volume final de 40µL. A mistura foi incubada a 15°C por 20min e, posteriormente, aplicada em gel de agarose "Low-Melting" 0,8% contendo brometo de etídio (1µg/mL). O DNA genômico fragmentado foi purificado separadamente em duas faixas específicas de tamanho: 500-1500bp e 1500-3000bp utilizando extrações de fenol/clorofórmio de acordo com a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001). O DNA purificado foi precipitado com

etanol/acetato de sódio, dissolvido em 15 μ L água ultra-pura e analisado em gel de agarose 0,8%.

Reação de ligação

A fim de testarmos a eficiência do tratamento com fosfatase alcalina do vetor pOAD e da reação de reparo do DNA fragmentado de *Xac*, o vetor e os diferentes fragmentos foram submetidos à reação de ligação inicialmente em pequena escala utilizando 0,5 μ L de vetor (0,05 μ g) e 1-2 μ L (0,25-0,5 μ g) de DNA reparado juntamente com 200U T4 DNA ligase em 10 μ L de volume final. A mistura foi incubada a 16°C por 12h. O produto da ligação foi então precipitado utilizando etanol/acetato de sódio, dissolvido em 10 μ L de água ultra-pura e utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH10B.

Transformação de Células Eletrocompetentes DH10B

Preparo das Células Eletrocompetentes

Células DH10B foram inicialmente inoculadas em 5mL de meio 2YT (1,6% triptona; 1% extrato de levedura e 0,5% de NaCl; Sambrook e Russel, 2001), acrescido de 0,2% de glicose, e crescidas durante 12h a 37°C sob agitação. A seguir, 1mL desta cultura foi transferido para 100mL do mesmo meio. O inóculo foi incubado nas mesmas condições até obtermos OD_{600nm} de aproximadamente 0,6. A cultura foi transferida para gelo por 30min e as células coletadas por centrifugação a 4000g, 15min, 4°C. O centrifugado foi lavado 3 vezes com 40mL de glicerol 10% estéril gelado, centrifugado e então suspensas em 200 μ L de GYT (10% glicerol; 0,125% extrato de levedo e 0,25% triptona) gelado. As células foram aliqüotadas e estocadas a -70°C.

Transformação das Células DH10B por Eletroporação

A reação de transformação foi realizada através de eletroporação adicionando 1 μ L da reação de ligação a 40 μ L de células DH10B eletrocompetentes em cubetas de 0,2cm. O eletroporador Bio-Rad GenePulser

foi ajustado para 100 Ω , 50 μ F e 2,5kV. A mistura foi colocada em gelo por 5min e, em seguida, transferida para o eletroporador e o pulso elétrico aplicado nas condições descritas acima. Imediatamente após este procedimento, foi adicionado 800 μ L de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedo; NaCl 10mM; MgSO₄ 10mM e MgCl₂ 10mM) gelado e a suspensão transferida para tubo 1,5mL e incubada por 40min a 37°C sem agitação. As células foram então plaqueadas (100 μ L/placa) em meio 2YT acrescido de 0,2% de glicose, 2% de ágar, 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas durante 12h a 37°C.

Análise dos Clones Transformantes: Obtenção de Plasmídeos para Seqüenciamento

A extração dos plasmídeos de bactéria foi feito através de “boiling prep” utilizando placa de 96 orifícios segundo metodologia descrita por Holmes e Quigley (1981). Os clones obtidos foram submetidos a seqüenciamento automático de DNA no equipamento ABI 377 Perking-Elmer Applied Biosystems. O plasmídeo de cada clone foi submetido a reação parcial de amplificação para seqüenciamento utilizando o kit BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Para isto, foram desenhados “primers” específicos para a região inicial do domínio de ativação (“primer” pOAD-F 5'-CAAAGACAGTTGACTGTATCGAACTATC-3') e na região terminadora da transcrição (“primer” pOAD-R 5'-TTGAGATGGTGCACGATGCACAG-3') do vetor pOAD. O seqüenciamento dos transformantes obtidos com estes dois primers permitiu estimar a proporção de clones que continham fragmentos de Xac assim como o tamanho destes fragmentos. Foram seqüenciados aproximadamente 180 clones e as proporções observadas variaram de 70-90% de vetores que continham fragmentos de Xac. Esta análise foi realizada através da submissão das seqüências obtidas ao BLAST de Xac disponível no site <http://genoma4.iq.usp.br>.

Transferência da Biblioteca Genômica de Xac em pOAD para *E. coli*

Para este procedimento fizemos em média 100 transformações/dia utilizando os fragmentos 500-1500 e 1500-3000bp separadamente, em um total

de 23 dias. Para que isso fosse possível, a cada dia eram feitas 10 reações de ligação, como descrito acima, já que ligações estocadas a -20°C por períodos superiores a 48h resultavam em perda de aproximadamente 10% no número de transformantes.

O procedimento de transformação utilizado foi o mesmo descrito para pequena escala mas, devido ao grande número de eletroporações, a cada 10 transformações as células eram coletadas em tubos estéreis de 50mL, incubadas por 40min, 37°C e estocadas a -70°C após a adição de 1 volume de glicerol 50%. Antes do congelamento, alíquotas de $20\mu\text{L}$ foram retiradas de cada tubo, congeladas com 1 volume de glicerol 50%, descongeladas, misturadas e plaqueadas para termos uma estimativa do número de colônias obtidas a cada dia de trabalho. É importante destacar que o tratamento sofrido pelas amostras de $20\mu\text{L}$ (glicerol/congelamento/descongelamento) foi exatamente o mesmo executado para todo o conjunto de 100 transformações/dia. O número de transformantes obtidos variou de 17.000 a 200.000 colônias/dia. Através do seqüenciamento de 96 clones de cada dia de transformação, foi possível estimar a fração e o número total de clones que continham fragmentos de *Xac*.

A transformação em larga escala foi feita até atingirmos aproximadamente 1×10^6 clones positivos (com fragmentos de *Xac*) para cada uma das duas bibliotecas; uma contendo fragmentos de 500-1500bp e outra com fragmentos de 1500-3000bp.

Amplificação das Bibliotecas Genômicas

Os transformantes estocados a -70°C foram descongelados e submetidos a amplificação. Para isso, grupos de 100.000-250.000 clones foram combinados e inoculados em 8L de meio 2TY, contendo $200\mu\text{g/mL}$ de ampicilina ou carbenicilina, divididos em 16 erlenmeyers de 2L contendo 500mL de meio 2TY e incubados a 37°C sob agitação. Após 8h de crescimento, amostras de 10mL de cada frasco foram coletadas, combinadas, centrifugadas e estocadas a -70°C após adição de 1 volume de glicerol 50% (estes estoques podem ser utilizados no futuro para novas amplificações). O

restante da cultura permaneceu a 37° sob agitação até OD_{600nm}=1,2. As células foram transferidas para gelo por 30min, coletadas através de centrifugação por 15min, 8000g e congeladas a -20°C.

Este procedimento de amplificação foi feito durante 11 dias sendo que aproximadamente 70% destes foram destinados aos transformantes provenientes de fragmentos de 500-1500bp devido ao maior número de transformações e clones obtidos.

Purificação das Bibliotecas Amplificadas

As células estocadas a -20°C foram descongeladas e o DNA purificado utilizando o procedimento descrito por Sambrook e Russell (2001) incluindo lise alcalina, precipitação de RNA com cloreto de lítio, tratamento com RNase, extração com fenol:clorofórmio e precipitação do DNA plasmidial com polietilenoglicol (PEG 8000). As células coletadas foram lisadas e purificadas separadamente a fim de que, após a extração, o DNA fosse combinado entre todas as amostras levando-se em conta o número de clones iniciais, a quantidade de DNA obtida na extração e a faixa de tamanho do fragmento (500-1500bp ou 1500-3000bp) a que corresponde.

Análise da Amplificação das Bibliotecas, Dosagem e Mistura.

Amostras de DNA das bibliotecas amplificadas foram separadamente digeridas com *HindIII* e os produtos da digestão analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA das bibliotecas foram dosadas através de medidas de absorbância a 260nm e diluídas até atingirmos uma concentração de 1µg/µL de ácidos nucleicos em água ultra-pura. A mistura das bibliotecas foi feita baseando-se no tipo da biblioteca (500-1500bp ou 1500-3000bp), número inicial de clones transformados, número de clones transformados contendo insertos de *Xac* e concentração obtida após a purificação. Esta mistura foi feita visando manter a representatividade da biblioteca e foi posteriormente utilizada na transformação de células de levedura.

Escolha dos Genes para Servirem como “Isclas” no Sistema Duplo-Híbrido

Como mostrado na parte final da introdução, os genes escolhidos foram aqueles relacionados com os TTSS (Tabela 4, Introdução), TFSS-plasmídeo (Tabela 5, Introdução), TFSS-cromossomo (Tabela 6, Introdução) e Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf (Tabela 7, Introdução). A utilização do programa PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) possibilitou a detecção de possíveis domínios transmembrana das proteínas codificadas pelos genes selecionados. A prioridade foi a escolha de segmentos que codificam proteínas citoplasmáticas ou apenas os domínios citoplasmáticos de proteínas com domínios transmembrana. Além deste foco principal, outras isclas de interesse foram selecionadas mas sem estarem necessariamente envolvidas com patogenicidade (Tabela 9, Introdução) e genes cujas redes ou vias de interações dos seus produtos já são bem caracterizados utilizados como controles positivos (Tabela 8, Introdução).

Os “primers” utilizados para a amplificação de cada um dos genes de interesse (Tabela 10) foram desenhados de forma que sítios de restrição específicos fossem introduzidos nas extremidades do produto da PCR. Para determinação dos sítios de restrição que seriam inseridos foram feitas análises de restrição de cada um dos genes utilizando o programa Gene Runner (Hastings Software, Inc). Como mostrado na figura 18, o vetor pOBD possui um sítio múltiplo de clonagem que contém sítios para as enzimas *EcoRI*, *PvuII*, *NcoI*, *SmaI/XmaI*, *Sall* e *PstI*. Os possíveis pares de enzimas utilizados para a clonagem das isclas foram: 1-*EcoRI/NcoI*, 2-*EcoRI/Sall*, 3-*EcoRI/PstI*, 4-*NcoI/XmaI*, 5-*NcoI/Sall*, 6-*NcoI/PstI*, 7-*XmaI/Sall*, 8-*XmaI/PstI*, 9-*Sall/PstI*. Como as extremidades geradas pela digestão com as enzimas *Sall* e *XhoI* são compatíveis, em diversos casos foram introduzidos sítios de *XhoI* nos “primers” para posterior clonagem no sítio *Sall* do vetor pOBD. Em alguns casos outros sítios de restrição foram introduzidos nos primers para que, futuramente, os genes amplificados possam ser clonados em outros vetores para, por exemplo, a expressão de proteínas recombinantes. Os “primers” foram desenhados de forma que a temperatura de desnaturação estimada fosse de aproximadamente 60°C.

GAG ATC GAA TTC CAG CTG ACC ACC ATG GCA ATT CCC GGG GAT
EcoRI PvuII NcoI SmaI

CCG TCG AC C TGC AGA GAT CTA TGA ATC GTA GAT ACT GAA AAA
SalI PstI Stop(+1) Stop(+2) Stop(+3)

Figura 18- Mapa gênico do vetor pOBD (Uetz *et al.*, 2000). A figura mostra o marcador de seleção (*bla*) e a origem replicação (*ori*) em bactéria além da marca de auxotrofia para seleção (*TRP1*) e a origem de replicação (*CEN4*) em levedura. O domínio de ligação ao DNA do fator GAL4 (GAL4-DBD) está sob o controle das regiões promotora e terminadora do gene da álcool desidrogenase (ADH). O sítio múltiplo de clonagem, localizado no final da região que codifica o domínio GAL4-DBD, foi utilizado para a clonagem dos diferentes genes utilizados como iscas no ensaio de duplo-híbrido. Após o sítio de clonagem múltipla existem três códons de parada em diferentes fases de leitura.

Tabela 10- Relação de “primers” utilizados para a amplificação das iscas por PCR

Gene	“Primers”	Sítios após PCR (5’/3’)	Clonagem pOBD
XAC 0095	15016F ATGAATTCCATATGCAGCGGGAGCCAGCCCATGG 15016R ATGCTCGAGAAGCTTTATTACCGGGCGGTGCCAA	E/X	E-S
XAC 0096	295F-A CGTGCCATGGGTCAAATCTATCGGTACGTTGA 295F-B AATGCCATGGGGCCGGACGATCCTGC 295R AAACCTCGAGCTAGCGGGACAGGCTGCC	N/X	N-S
XAC 0108	317F CATGCCATGGGTCTGCAAATTCCTCAGGG 317R AGAATTCCTCGAGTTACGACAAGGCGCGCTGG	N/X-E	N-S
XAC 0277	7491F GGAATTCATGCGCTTGACTTCTGTTCTTTTCG 7491R TTCCTCGAGTATTAGTAATAGCCGTTTTTCGATCGCCT	E/X	E-S
XAC 0330	4151F CATGCCATGGCGGCAGCCGGGCC 4151R ACGACAGCTGTCATGGAGCGTCTCGTTGTTGC	N/P	N-P
XAC 0392	25740F GCCATGCCATGGTCCCATCTGTGGCCC 25740R GGAATTCGTCGACTATTACAACGCAAGCTCGGCAGTG	N/S-E	N-S
XAC 0393	25613F GCCGTGCCATGGTCAATATAAATCGCTTACTGCGC 25613R TATAAGCTTCTCGAGTATTAACGGATGTCCCATTCCTGAG	N/X-H	N-S
XAC 0394	7388F CATGCCATGGGCGCACCCGTGCG 7388 R CCGCTCGAGTTATCTACGACGCACTCTGATATTC	N/X	N-S
XAC 0395	25739F GGAATTCGTGGTCCGGCAGCTAAGTC 25739R TTCCTCGAGTATTAAGCCAGGAACGGTGCCAATA	E/X	E-S
XAC 0396	7399F CATGCCATGGGCGAGCGCGATTTC 7399R AGAATTCCTCGAGTATTAAGCTGTGCCTGGTCTTGCG 7399RT ACGCTCGAGTATTAGGCGCGCAACCACAGATAG	N/X-E	N-S

XAC 0397	7402F GCCGTGCCATGGAATTATTACCGCAAATCAGTTCAATC 7402R GGAATTCCTCGAGTATTACTGGCCAACGAGCTGCTTG	N/X-E	N-S
XAC 0398	7404F CATGCCATGGTCGATGCCATGACCGATAC 7404R TGAATTC GTCGACTTACGACATGCCGGCGATGTG	N/S-E	N-S
XAC 0399	7405F CATGCCATGGCCATGCACTTCGCGTAC 7405R TAGCTCGAGTCATTGCGCCGCTGCTG	N/X	N-S
XAC 0400	7406F CATGCCATGGCTCATATGATCCGTCGCATTTCTCCC 7406R CCGCTCGAGTATTATGGGCGAACCTCCTGAGC	N/X	N-S
XAC 0401	7407F CCATGCCATGGACCACGACGATCTAGTG 7407R TGAATTCCTCGAGTCATGGGAACGCCGCTG	N/X-E	N-S
XAC 0403	7409FAATGCCAGGTCGGCGATCCACGCGC 7409RATGCTCGAGTCAGGCATCTGCATGCGTGC	N/X	N-S
XAC 0404	7410F CATGCCATGGCTCATATGCGCATCCTGCCGGT 7410R CCCGCTCGAGTATTAGACAACCTCGATGCTGATC	N/X	N-S
XAC 0405	7411F CATGCCATGGGCAAGCAACGCGATATCAGCG 7411R TGAATTCCTCGAGTCACACCACCACCTGCCG	N/X-E	N-S
XAC 0406	7412F CATGCCATGGACTGGCTGTTTCATCCGCGAC 7412R TGAAGCTTCTCGAGCTAGCATGGCAGAGCTCCATC	N/X-H	N-S
XAC 0407	7413F CGTGCCATGGAGAAGATTCAATGTCCCGG 7413R AGAATTCCTCGAGTCAGGCACGAGGTATTGCG	N/X-E	N-S
XAC 0408	7414F CGGAATTCATATGACGCTCATTCCTCCTGTC 7414R CCGCTCGAGCTATTGGTTCTTGACCAAGTGTCTG	E-N/X	N-S
XAC 0410	7418F CATGCCATGGACAACACGCGGATCGAC 7418R TGAATTCCTCGAGTCAACGACGATGACGC	N/X-E	N-S
XAC 0411	7419F CATGCCATGGGTCTCTGGTTGAGGTCAAC 7419R TGAATTC CTCGAGTCAGCCAGCATCCACGGG	N/X-E	N-S
XAC 0412	7420F CCTGCCATGGTGGCTGAGATGCCCT 7420R AATCGTCGACTCACGCATCGTCGGTCACG	N/S	N-S
XAC 0413	7422F CATGCCATGGGTGAGCCTGCCACAC 7422R TGAATTCCTCGAGTCATGGGCGCCCGCT	N/X-E	N-S
XAC 0416	15001F GCCATGCCATGGATTCTTTGAACACACAGCTCG 15001R TATAAGCTTCTCGAGTATTACTGCATCGATCCGGTGTG	N/X-H	N-S
XAC 0417	7433F CATGCCATGGTTGCAGCAGCACTGGCATG 7433R TGAATTCCTCGAGCTATTCCGGAATCACACCGCG	N/X-E	N-S
XAC 0419	15020F GTCATGCCATGGCGCAGATCCGTCTGTT 15020R TGAATTCCTCGAGTATTAAGCATGTCCGGCGGCG	N/X-E	N-S
XAC 0424	7448F GTCATGCCATGGCAGACCAGCCGAAC 7448R TATAAGCTTCTCGAGTATTAATCGGCGTTGATCACCCGG	N/X-H	N-S
XAC 0466	11478F-A GGAATTCATGAGGAGTTACACCATGGCAAC 11478F-B GGAATTCAGCAGGACGGTGTGTTGG 11478R AAATCGAGTCAGCGACCGCCCATCGC	E/X	E-S
XAC 0536	25594F GGAATTCATGGCAGCGAACCTCACGTTTT 25594R ATTAGTCGACTATTAGTTACGGCGCATGGCGTTG	E/S	E-S
XAC 0569	4380F GGAATTCATGCCCCGCCCTGATCATTTTCG 4380R TTAGCTCGAGTATTATCCCCGCTCAACGCAAGC	E/X	E-S
XAC 0656	5021F GCCATGCCATGGTCAAGAACTCCGCGGCAT 5021R GGAATTCCTCGAGTATTACTCCGGCGCGAAGAACTC	N/X-E	N-S
XAC 0784	5230F GCCATGCCATGGCTCCCAACGCGGTCAT 5230R TATAAGCTTCTCGAGTATTAGTCGGCCTGGCGGCG	N/X-H	N-S
XAC 0862	2684F CATGCCATGGCTCATATGGAAGATGATCCGCGCTACC 2684R CAGCTCGAGTATTAGTCAGCGCTCCTGGGCAC	N/X	N-S
XAC 1132	HoIBF CATGCCATGGCCGCCGCGATTTTCGCC 3' HoIBR ACGCTCGAGTATTATCGAGTTCCCTAGAACGTGG	N/X	N-S
XAC 1242	5861F GCCATGCCATGGGCAAGATCTTCAGCAGTCAA 5861R AGAATTCCTCGAGTATTAGCGCGCACTGGAGCTGG	N/X-E	N-S
XAC 1265	5823F TTACCCGGGATGAACGACCACTCTCCCCC 5823F TTACCCGGGATGAACGACCACTCTCCCCC	Sma/X	Sma-S
XAC 1266	5819F GCCATGCCATGGTCCTTTCCACTTACTTTCAGC 5819R GGAATTCCTCGAGTATTACCGCTGCAAGGTCTCCAT	N/X-E	N-S
XAC 1343	15034F CATGCCATGGGTGCACCTCGCCCGG 15034R TGAATTCCTCGAGTTAATGCCGCGTACGCCGC	N/X-E	N-S
XAC 1368	1274F CATGCCATGGCCATCAACAACTGCCGCG 1274R TATAAGCTTCTCGAGTATTACGGCTTCGACAGCGCGT	N/X-H	N-S
XAC 1495	25403F GCCATGCCATGGCCAAATCAACCCTAGATTCCATTG 25403R GGAATTCCTCGAGTATTATCCTGGAACTTCGGAAATTTTTCATC	N/X-E	N-S
XAC 1497	25701F CGGAATTCATGCATTGGAGAGATATGCGCAC 25701R CAACCTCGAG CATTAAATAATCATGATCTCACAAATTGGAGG	E/X	E-S
XAC 1568	2589F CCTGCCATGGACACTTCAAGCGAATACAGC 2589R TGAATTC CTCGAGTCACGCGGGCCAATGCG	N/X-E	N-S
XAC 1670	2065F CATGCCATGGCTCATATGGCTTACGCATTACCCAACGC 2065R CCGCTCGAGTATTAGAGCGCCGTCTGTACGATG	N/X-E	N-S

XAC 1706	3555F GCAGTGCCATGGCCGACTGCTGGAATGCT 3555R CCGCTCGAGTATTACACCAAGGTCACGTCCAG 2349F CCATGCCATGGCCACCGCCACATTGCTG	N/X	N-S
XAC 1864	2349R GGAATTCCTCGAGTATTATTGCGCCAGCTGTACCCG 2366F GGAATTCCTCGAGTATTATTGCGCCAGCTGTACCCG 2372R TATAAGCTTGTGCGACTATTAGGGATCGCCATTACCGCTG	N/X-E	N-S
XAC 1874	2366R CATCTCGAGTATTGCCACCAAGTGCCTCGG 2371F GCCATGCCATGGAGGATGTTTTAGGGAATCCG	E/X	E-S
XAC 1877	2371R AGAATTCCTCGAGTATTATGCTCCTGGACGCACCGA 2372F ACCATGCCATGGTGCGCCAGCTGACGC	N/X-E	N-S
XAC 1878	2372R TATAAGCTTGTGCGACTATTAGGGATCGCCATTACCGCTG 2375F CATGCCATGGCTCATATGAACACGATTGAAAAGATTTCCCTC	N/S-H	N-S
XAC 1879	2375R ATGCTCGAGTATTAGGCGACGCCCATGCCG 15111F GGAATTCCTCGAGTATTATGCTCCTGGACGCACCGA	N/X-E	N-S
XAC 1881	15111R TTACTCGAGTATTAGCGCGCTGCCGGCAC 2381F ATGCCATGGCGGATTCTTTTCCACTCGC	E/X	E-S
XAC 1882	2381R TAT CTCGAGTCAGGCGGCCTTGCGTGC 2382F CATGCCATGGCTCATATGGAAGCCACCGTTGCCG	N/X	N-S
XAC 1883	2382R CCGCTCGAGTATTATGGGTGCAACGGGTCTCC 2383F CATGCCATGGATATGGCTAGCCTGGATTCTCGGCTGCT	N/X-E	N-S
XAC 1884	2383R TAGCTCGAGTATTAGGGGGCGGGTTTGGGAAC CheAF CGGAATTCATGAGCATGGACCTGCAACGTTT	N/X-E	N-S
XAC 1903	CheAR TTCCTCGAGTATTACGCGGCTTGCGGCAC 6804F TTCATGCCATGGTCAAGGCTTGATCGTGGAC	E/X	E-S
XAC 1994	6804R TATAAGCTTCTCGAGTATTAACTGCCACCATCGTCGTGG 1972F CGTGCCATGGGCATGGGGATCAAATGTTTC	N/X-H	N-S
XAC 2411	1972R CATCTCGAGTATTAGGAGCGGCTCGCCGT 1825F CCTGCCATGGCTGCGCTTCAGCTTGC	N/X	N-S
XAC 2492	1825R CATCTCGAGTATTACCTCGCCGCATTGCAATC 818F CCATGCCATGGCGTCCCGCCCCCT	N/X	N-S
XAC 2493	818R AGAATTCCTCGAGTATTACGCCACTGGGCTGTCCC 193F ACATGCCATGGTGCAGCGCGGCCGC	N/X-E	N-S
XAC 2504	193R AGAATTCCTCGAGTATTACAGATTCAGTCGATCCGCATG 4271F CATGCCATGGCTCATATGCATCCGACCGCCGC	N/X-E	N-S
XAC 2573	4271R CCGCTCGAGTATTAGCGTGGCAGCAGCGTC 25646F CATGCCATGGGTCATGCTCAAGGTGCTGAAA	N/X-E	N-S
XAC 2605	25646R AGAATTCCTCGAGTATTAGCGCTTCTCCAGTTCTTCG 10505F ATGCCATGGAATTTATTTTACTAATTTTCTG	N/X-E	N-S
XAC 2606	10505R CCCTCGAGTATTAGAATTTCTAAAAAATGGCTTGA 25384F-A CATGCCATGGGCGATGGACGTGGTGC	N/X	N-S
XAC 2609	25384F-B AATGCCATGGCGCGCGGCACAGGCAG 25384R ACGCGTCGACTTACATGGACATTGAGCGCGAAG	N/S	N-S
XAC 2610	25645F CATGCCATGGTGACGCGCAATTAGCAA 25645R CAGCTCGAGCTAGTTGGACACCTCCTTCATTTT	N/X	N-S
XAC 2611	10503F CATGCCATGGTTATTATCCGCTTGGCTTCAATTAT 10503R CCCTCGAGTCAATATTTCTTGAATATTGGATCAGA	N/X	N-S
XAC 2613	25385F ACATGCCATGGGTGCGCAATGGGAAGTTATCGAC 25385R GGAATTCCTCGAGTATTAGTCCTTGTCGATCTCTAATCTTCCAT	N/X-E	N-S
XAC 2614	4333F TTACCCGGGATGTTTACGCCCAGACAGTCCG 4333R CCGCTCGAGTATTATGCATCTTCGACCTCCTTGTC	Sma/X	E-S
XAC 2617	4337F CGTGCCATGGTGCCTGGCATGGAAGTATG 4337R CCGCTCGAGCTAAAAACGAATGCGCTATCCACTT	N/X	N-S
XAC 2618	4338F TTACCCGGGGTGAATGAAATGGTTGCCATGACG 4338R ATTCTCGAGTATTAGCCGCGCAGGG	Sma/X	Sma-S
XAC 2622	4344F GGAATTCATATGAATCCGATGTATGTGTCCAAGC 4344F GGAATTCATATGAATCCGATGTATGTGTCCAAGC	E-N/X-H	N-S
XAC 2623	4346F GCCATGCCATGGCCAAACCCAAAATCATCGCAAT 4346R TATAAGCTTCTCGAGTATTACATTCTGATGGTAAGCGTCTTCAC	N/X-H	N-S
XAC 2956	6138F CATGCCATGGCTCATATGAGTGTTCCGCAATGGCG 6138R CCGCTCGAGTATTACGAGCCGCGATCTCTCAAG	N/X-E	N-S
XAC 2973	6161F CCTGCCATGGGTATCGAGACGTATGGCC 6161R CAACTCGAGTATTATGCGGGATTGTCGCGCAC	N/X	N-S
XAC 3090	4598F ATCATGCCATGGCACCAGCCGTGGGC 4598R TGAATTCCTCGAGTATTACTGATCGCGTGAAGGTGCC	N/X-E	N-S
XAC 3099	4584F AAACCCGGGATGGGTACCGCCCCGGAC 4584R CAGCTCGAGTCACGCGGCGGCTTGAAG	Sma/X	Sma-S
XAC 3146	4506F CATGCCATGGCTCATATGACCATCGAATCCCCATTCC 4506R CCGCTCGAGTATTAGTAATCGGATTCTGGGGTTCTAG	N/X-E	N-S
XAC 3324	25630F GCCATGCCATGGGTTGCACTATCTCAACGAC 25630R CGCTCGAGTATTACTGGCTCTGCTCGCACAG	N/X	N-S

	25772F CCATGCCATGGCGCTGGCCTCGCG	N/X-E	N-S
XAC 3673	25772R AGAATTCCTCGAGTATTAGGGCGTGCATGGCTGG		
	2376F CGTGCCATGGATCAGGCACGTCCTTGTTG	N/X	N-S
XAC 4102	2376R CAACTCGAGTTATGGGCGTGCGGAATCTCG		
	6659F CCTGCCATGGAGCACCAGGCCCGTAT	N/X	N-S
XAC 4301	6659R CCACTCGAGTATTAGACCAGTTCATTGCGTTTCTCC		
XAC b0018	10241F CATGCCATGGGCATGAAGGGCAAGCCC	N/X	N-S
	10241R TGAATCGAGTCAACCCCTTGAGGAAGGCTTCC		
XAC b0020	10244F CATGCCATGGATTGGGAACGCCCTTGTTTC	N/X	N-S
	10244R TGAATCGAGCTATCTATGTATATACATACCGATGGG		
XAC b0021	10249(+2)-F CATGCCATGGGGAGTAACGTATCGACG	N/X	N-S
	10249(+2)-R ATACTCGAGTTACATCCCGCCAGCTTGG		
XAC b0022	11003F CATGCCATGGGTGCATCCAACGTGCGAA	N/X	N-S
	11003R ATACTCGAGTCACTTGAACAACGCCTTGATAGAC		
XAC b0023	11004F CATGCCATGGAGTCGCCGTGCTAAATTTTCAGT	N/X	N-S
	11004R ATACTCGAGTCAGCGTGTCTGCTTGTCTGCTT		
XAC b0024	10252F CATGCCATGGCTAAATCTGACCTGACACAG	N/X-E	N-S
	10252R TGAATTCCTCGAGTCATTGTGCTTTCTCCATTTCTC		
XAC b0025	10253F CATGCCATGGGCAGCGGTAAATCTATCCC	N/X-E	N-S
	10253R TGAATTC CTCGAGTTACGAATCCTCCGTAAAGCGG		
XAC b0026	10255F CATGCCATGGCAGACACCCGGCC	N/X-E	N-S
	10255R TGAATTCCTCGAGTTACACCCTCTGGAATCGCAG		
XAC b0027	10256F CATGCCATGGCAAAATTCGGCGTACTGC	N/X-E	N-S
	10256R TGAATTCCTCGAGTCACATACTCCAATGCTTTGGGG		
XAC b0028	10257F GGAATTCATATGTATGGCCAGCCACCT	E-N/X-H	N-S
	10257R TTTAAGCTTCTCGAGTTATTGCTCCTCTTGCGAAGGG		
XAC b0029	10259F CATGCCATGGAATCGCAGCGCGAC	N/X-E	N-S
	10259R TGAATTCCTCGAGCTACACCTTGGGCGCGCA		
XAC b0030	77F CATGCCATGGAGAAGCAGCAAGTCGAAAGC	N/X	N-S
	77R TTGCTCGAGTCACTTGATGTCGATAGCGGCC		
XAC b0031	76F CACGCCATGGTCAATGTGACGCCGATTCTG	N/S	N-S
	76R AAGC GTCGACCTAGCCAAAGCGTCCGTACTC		
XAC b0033	10073F GCCATGCCATGGCAGCAGTCAATTCACGAGTT	N/X-E	N-S
	10073R AGAATTCCTCGAGTATTATTCCGTCCAGCCATCCATGTC		
XAC b0035	10266F GCCATGCCATGGACAACGCCGAAATTATGAAGATACAA	N/X-E	N-S
	10266R AGAATTCCTCGAGTATTATTGTTCCGGGTAGCTTGTGCC		
XAC b0036	68F CATGCCATGGCGGCAGGGCTGTTGG	N/X	N-S
	68R CTG CTCGAGTCAATTCACAACTGCACGAAAGGC		
XAC b0037	67F CCATGCCATGGCGCAGATTGCCTCCTTCC	N/X-E	N-S
	67R GGAATTCCTCGAGTATTACGCACCTGCATAGATGATCTC		
XAC b0042	10279F TATGCCATGGAGTCGGCCGCTACCACCT	N/X-E	N-S
	10279R AGAATTCCTCGAGTATTATTCTGCTCCATCACTTCCC		
XAC b0045	146F CCATGCCATGGCGCTGTCGATGCCGGT	N/X-H	N-S
	146R CATAAGCTTCTCGAGTATTATGCTCCTTTCTGCTTGAGGTTGT		
XAC b0049	10289F GAATTCATATGTGCGAGGCCGCTACTCGC	E/S	E/S
	10289R GTGGACCTAGGCTAGGCACCGACTTTTGAG		
XAC b0057	10163F CATGCCATGGACGAAAAACGCTTCCAATGA	N/X	N-S
	10163R AACTCGAGCTATCTCTTGCCAAATCCTTGGGT		
XAC b0058	10302F CATG CCAATGGACACTCCCTTTACCGATT	N/X-E	N-S
	10302R AGAATTCCTCGAGTCACCCGTGCATCGGTTTGAG		
XAC b0059	165F CATGCCATGGAGCGGTACATGCTTGATACC	N/X-E	N-S
	165R AGAATTC CTCGAGTTAGCTGCGTGTCCAATCTTCC		
XAC b0060	10166F CATGCCATGGCCAAAGTTGCCAAGCTGTTT	N/X-E	N-S
	10166R AGAATTCCTCGAGTCATTGCGGCCATCCCGCA		
XAC b0070	10319F CATGCCATGGCTCATATGAATACCGTGCGCTGGAACAT	N/X-E	N-S
	10319R CCGCTCGAGTATTAATGCTCACGCGCCCATTCG		

N-NcoI; S-SalI; Sma-SmaI; E-EcoRI; H-HindIII; P-PvuII; X-XhoI

Amplificação das ORFs de Interesse

Os genes escolhidos foram amplificados por PCR utilizando as seguintes condições: 5µL Thermo pol buffer (10x); 1µL dNTP mix (10mM); 10pmols primer F; 10pmols primer R; 300ng DNA genômico de *Xac*; 1µL

MgSO₄ (100mM); 1U Hi-Fidelity Taq DNA polimerase (Invitrogen); água ultra-pura quantidade suficiente para 50μL. Em alguns casos, a adição de 5% de DMSO permitiu uma melhor especificidade na reação. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando o sistema “Concert Nucleic Acid Purification System” (Gibco BRL).

Reação de ligação entre os produtos da PCR e o Vetor pOBD

Os genes amplificados e o vetor pOBD foram digeridos com pares de enzimas de restrição específicos para cada caso. Após este procedimento, vetor e fragmentos foram precipitados com etanol absoluto/acetato de sódio e utilizados para a reação de ligação, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para a confecção da biblioteca genômica.

Transformação de células competentes DH10B

Após a reação de ligação, vetor + fragmento foram utilizados na transformação de células DH10B competentes como descrito anteriormente. As colônias resistentes a ampicilina foram inoculadas em meio líquido 2TY + ampicilina 37°C, 12h, sob agitação e os plasmídeos extraídos através de mini-prep (Sambrook e Russell, 2001) e sua sequência determinada como descrito acima. As construções contendo as sequências corretas foram estocadas e utilizadas para as transformações de leveduras.

Cepas de Levedura

A cepa PJ694-a (ou PJ694-α) (*MATa* (ou *MATα*) *trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*), descrita por James *et al.* (1996) foi utilizada nas transformações com as iscas e a biblioteca genômica de *Xac*. Os meios para crescimento são: Meio YAPD- extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, adenina 0,008% e ágar bacteriológico (somente para meio sólido) 1,6%. Meio mínimo SC- bases nitrogenadas 0,66%, glicose 2%, mistura de aminoácidos acrescida de adenina e uracila 0,083%, ágar bacteriológico (somente para meio sólido) 1,6% e pH

ajustado para 5,6. A partir desta composição básica do meio de cultura SC, diversas variações foram feitas de acordo com o tipo de seleção desejada, variando os componentes da mistura de aminoácidos acrescida de adenina e uracila (m/m: Ade 5%; Arg 5%; His 5%, Ile 5%; Leu 10%; Lys 5%; Met, 5%; Phe 8%; Ser 5%; Thr 5%; Trp 8%, Tyr 5%; Ura, 3% e Val 23,5%). As combinações obtidas foram: SC-Trp (sem triptofano), SC-Leu (sem leucina), SC-Trp-Leu-His (sem triptofano, leucina e histidina) e SC-Trp-Leu-His-Ade (sem triptofano, leucina, histidina e adenina).

Transformação Rápida de Levedura com o Plasmídeo pOBD Contendo a Isca

A linhagem PJ694-a foi inicialmente usada para os testes de duplo-híbrido. A transformação desta linhagem baseou-se no método descrito por Gietz *et al.* (1998). Uma amostra de células foi removida de uma placa contendo uma cultura fresca, suspensa em 1mL de água estéril e centrifugada a 12.000g por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e às células foram adicionados os seguintes componentes respeitando a ordem em que são citados: 240µL PEG MW 3350 50%, 36 µL acetato de lítio 1M, 50µL DNA de esperma de salmão 2mg/mL, 2µL do plasmídeo contendo a isca de interesse (0,5-10µg totais) e água estéril para um volume final de 360µL. Após ressuspender as células nessa mistura, as células foram incubadas a 42°C por 30 minutos e então novamente centrifugadas. Ao pellet adicionamos 400µL de água estéril e incubamos a temperatura ambiente por 5 min. Amostras de 200µL foram plaqueadas em meio SC-Trp e incubadas a 30°C por 2-4 dias. As colônias obtidas foram repicadas para uma nova placa contendo o mesmo meio e passaram por repiques periódicos para manutenção do plasmídeo.

Teste de Auto-Ativação do Gene Repórter *GAL1-HIS3* com a Isca de Interesse

O clone contendo a isca de interesse foi inoculado em meio sólido SC-Trp por 16-24 h a 30°C. Após este período, uma alça com aproximadamente 10µL de células foi transferida para um tubo contendo 1mL de água estéril e o

número total de células determinado pela leitura da absorbância a 600nm (no caso de leveduras podemos considerar que $OD_{600nm}=0,1$ corresponde a 1×10^6 células/mL) (Sambrook e Russel, 2001). Baseados nessa leitura fizemos uma diluição de forma a obter aproximadamente 10 células/ μ L e plaqueamos 100 μ L dessa diluição (1000 colônias) em placas SC-Trp-His contendo concentrações crescentes de 3-aminotriazol (3-AT): 5, 10, 25 e 50 mM. As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e a concentração inibitória de 3-AT (ausência de colônias) foi determinada para cada isca.

Teste de Auto-Ativação do Gene Repórter *GAL2-ADE2* com a Isca de Interesse

O clone contendo a isca de interesse foi inoculado em placas com meio de cultura SC-Trp-Ade ou YAPD (como controle positivo) e incubado a 30°C por 5 dias. O crescimento na ausência de adenina indicou a auto-ativação do repórter *GAL2-ADE2*.

Teste de Auto-Ativação do Gene Repórter *GAL7-LacZ* com a Isca de Interesse

Uma membrana de nitrocelulose com 9cm de diâmetro foi colocado sobre as placas testadas para auto-ativação do repórter *GAL1-HIS3* em meio SC-Trp sem 3-AT (as quais continham aproximadamente 1000 colônias). Após a remoção da nitrocelulose, à membrana foi cuidadosamente mergulhada em nitrogênio líquido por 15 segundos e colocada em filme plástico com a face contendo as colônias adsorvidas voltada para cima até o seu total descongelamento. A nitrocelulose foi então colocada sobre uma placa contendo um papel de filtro umedecido em tampão Z (60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 0,1mM $MgSO_4$ e 4mM β -mercaptoetanol) contendo X-Gal 0,3mg/mL. A verificação de colônias com coloração azul foi realizada após 1, 2 e 24 h de incubação a 37°C. Colônias azuis indicaram a auto-ativação do repórter *GAL7-lacZ*.

Transformação da Linhagem PJ694-a Contendo as Iscas com a Biblioteca Genômica de *Xac*

A triagem das interações proteína-proteína requer um grande número de co-transformantes (contendo o plasmídeo pOBD-isca e o plasmídeo pOAD derivado da biblioteca) para possibilitar uma boa amostragem da biblioteca. Antes de partirmos para uma transformação em larga-escala, testamos a eficiência da transformação em função da quantidade de DNA das bibliotecas de *Xac*. Foram empregadas diferentes quantidades das bibliotecas 1 (fragmentos 500-1500pb) e 2 (fragmentos 1500-3000 pb): 0,5; 1,0; 2,0; e 5,0µg de DNA de cada biblioteca em transformações e plaqueamos as células em meio SC-Leu. Como o número de transformantes foi semelhante quando comparamos as mesmas quantidades de DNA das bibliotecas 1 e 2, adotamos a utilização de uma biblioteca única de 500-3000bp (mistura das bibliotecas 1 e 2 em quantidades iguais) com 30 µg de DNA total (Gietz *et al.*, 1998), o que resultou em aproximadamente $1,0 \times 10^7$ transformantes.

A linhagem previamente transformada com pOBD contendo a isca foi inoculada em 50 mL de meio SC-Trp e incubada sob agitação a 30°C por 16 horas. Após este período, medimos a OD_{600nm} e calculamos o volume de inóculo necessário para um total de $7,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas e inoculadas em 150mL de meio YAPD. Após nova incubação a 30°C, o crescimento da cultura foi acompanhado até atingir uma OD₆₀₀= 2, o que corresponde a aproximadamente $2,0 \times 10^7$ células/mL. A cultura foi então centrifugada a 4000rpm por 5min e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com 75mL de água estéril, centrifugadas e ressuspensas em 3mL de acetato de lítio (100mM). A mistura foi incubada a 30°C por 15min, em banho-maria; centrifugada e o sobrenadante descartado. Às células sedimentadas foram adicionados os seguintes componentes na ordem em que são citados: 7,2mL PEG 50%, 1,08mL acetato de lítio 1,0M, 1,5mL DNA de esperma de salmão (2mg/mL), 30µL biblioteca genômica de *Xac* (1µg/µL) e 970µL água estéril. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada em banho-maria a 30°C por 30 min, agitando-se gentilmente o tubo por 15s a cada 10min. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico: 42°C por 45min, sendo gentilmente homogeneizado por 15s a cada 5min.

Posteriormente a mistura foi centrifugada a 4.000rpm por 5min e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 10mL de água estéril e plaqueadas em cerca de 25 placas (150x15mm) contendo meio SC-Trp-Leu-His + 3-AT (a concentração deste último variou para cada isca de acordo com os testes de ativação do repórter *GAL1-HIS3*). Em outra placa, contendo SC-Trp-Leu, plaqueamos 50 µL de uma diluição 1:100 da mistura para determinarmos o número total de transformantes. As placas foram incubadas a 30°C por até 14 dias onde, no decorrer dos quais, as colônias foram repicadas e devidamente identificadas em placas SC-Trip-Leu-His + 3-AT e SC-Trip-Leu-His-Ade+ 3-AT e incubados a 30°C por até 5 dias. Somente foram considerados positivos os clones que foram capazes de crescer em ambas as condições, isto é, na ausência de histidina e de adenina.

Identificação de Possíveis Falso-Positivos: Auto-Ativação através dos Componentes da Biblioteca Genômica.

Com o objetivo de identificarmos possíveis falso-positivos resultantes da auto-ativação dos componentes presentes na biblioteca, a cepa PJ694-a foi transformada com a biblioteca genômica em larga escala (30µg de DNA da biblioteca, como descrito anteriormente) e plaqueada em meio SC-Leu-His + 3mM 3-AT e resultando em um total de aproximadamente 1×10^7 transformantes.

Análise dos Clones Positivos: Recuperação dos Vetores pOAD e pOBD de Colônias de Levedura Capazes de Crescer na Ausência de Histidina e Adenina

O protocolo para isolamento dos vetores da levedura baseou-se no método descrito por Sambrook e Russell (2001) com algumas modificações. A extração de DNA foi feita a cada 96 clones utilizando placas de 96 orifícios (COSTAR, assay block, cat No. 3960). As colônias His+/Ade+ foram inoculadas em 1mL de meio seletivo SC-Trip-Leu-His-Ade e a placa foi incubada a 30°C, sob agitação (300rpm) por 36h. Após este procedimento as células foram coletadas por centrifugação a 2.700rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Ressuspendemos as células no volume residual utilizando vortex e

adicionamos 1 mL de tampão de extração (50mM Tris-Cl pH 7,5; 10mM EDTA; 0,3% β -mercaptoetanol). A placa foi agitada em vortex e as células novamente coletadas por centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e adicionamos 25 μ L de solução de lise (tampão de extração contendo 2mg/mL de zimoliase (Seikagaku) e 0,2mg/mL de RNase). Incubamos a placa a 37°C por 1h sob agitação lenta (180rpm) e adicionamos 25 μ L de SDS 10%. Após 5min à temperatura ambiente, a placa foi colocada em freezer -80°C por 15min. Adicionamos 100 μ L de acetato de potássio 3M novamente centrifugamos a 4.000rpm por 15min a 4°C. Aproximadamente 120 μ L do sobrenadante foi coletado em placa MicroAmp (Applied Biosystem, cat. N° 801-0560), 84 μ L de isopropanol foi adicionado e a placa centrifugada a 4.000rpm por 30min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200 μ L etanol 70%. O DNA foi seco em “speed-vac” por 10min, dissolvido em 20 μ L de água e usado na transformação de células de *E. coli* para a obtenção dos vetores para seqüenciamento.

Transformação de Células de *E. coli* e Recuperação dos Vetores

Células de DH10B de *E. coli* foram transformadas segundo o método descrito por Sambrook e Russel (2001) o qual utiliza CaCl_2 e choque térmico a 42°C. Este procedimento foi realizado em placa MicroAmp com 96 orifícios (Applied Biosystem, cat. N° N801-0560) utilizando 2 μ L dos plasmídeos extraídos da levedura e 100 μ L de células competentes DH10B. Após o choque térmico, uma alíquota de 20 μ L de cada transformação foi inoculada em 1mL de meio TYE contendo carbenicilina em placas de 96 orifícios (COSTAR, assay block, cat No. 3960) e incubadas durante 24h, 37°C a 300rpm. A extração dos plasmídeos das bactérias foi feita segundo a metodologia utilizada por Da Silva *et al.* (2002).

Seqüenciamento dos Vetores pOAD-presa e pOBD-isca Obtidos nos Ensaio de Duplo-Híbrido

O seqüenciamento seguiu o protocolo “save money”, sugerido pela Applied Biosystems (Big Dye Terminator vs. 3.0), utilizando “primers” F ou R

específicos para cada vetor. Apesar de termos uma mistura de vetores pOBD-isca e pOAD-presas em cada uma das extrações de DNA, o seqüenciamento foi feito de acordo com a região de interesse variando apenas o tipo de “primer”: pOBDMCS-F, pOBD-R, pOADMCS-F ou pOAD-R. Isto permitiu que para cada amostra apenas um dos vetores fossem seqüenciados.

As seqüências obtidas foram analisadas através do programa BlastX contra os bancos de dados públicos (NCBI) e contra a seqüência genômica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (<http://genoma4.iq.usp.br>).

Presas Utilizadas como Iscas

Diversas presas encontradas nos ensaios de duplo híbrido foram posteriormente clonadas no vetor pOBD e utilizadas como iscas a fim de expandir as redes de interações protéicas.

Teste de Recombinação

Após algumas triagens, identificamos que o uso de algumas iscas estava associado a eventos de recombinação entre os vetores pOAD e pOBD dentro das células de levedura. Para confirmar essa hipótese, escolhemos uma isca que resultou em interações homólogas nas nossas triagens (XAC0095) e fizemos um teste de recombinação em levedura. Para isso, o vetor pOBD contendo a isca XAC0095 foi utilizado para a transformação da levedura PJ694-a. Após seleção em meio SC-Trp, os clones de levedura foram transformados com o vetor pOAD “vazio” (sem os fragmentos da biblioteca). Após ensaio de seleção em meio SC-Trp-Leu-Ade-His, os vetores dos clones obtidos foram extraídos, utilizados para transformar *E. coli* e suas seqüências determinadas (vide Resultados).

RESULTADOS

Biblioteca Genômica de *Xac*

Preparação do Vetor pOAD

O vetor pOAD (Fig. 17-Materiais e Métodos; Uetz *et al.*, 2000) foi escolhido para a construção da biblioteca genômica de *Xac*. Após a digestão com a enzima *PvuII* e o tratamento com fosfatase alcalina (CIP), o vetor foi analisado em gel de agarose (Fig. 19A) e mostrou o tamanho esperado (em torno de 8kb).

DNA Genômico de *Xac*

O DNA genômico total de *Xac* (cromossomo e plasmídeos), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, foi inicialmente submetido a clivagem mecânica através de nebulização e analisado em gel de agarose (Fig. 19B). Os fragmentos gerados foram reparados com as enzimas T4 DNA polimerase, Fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* e polinucleotídeo quinase (PNK) a fim de garantir que estes contenham extremidades fosforiladas e do tipo cegas para posterior ligação no vetor pOAD digerido com *PvuII* e tratado com CIP. Após a nebulização e o reparo, o DNA foi aplicado em gel de agarose e os fragmentos com tamanhos de 500-1500bp e 1500-3000bp foram separadamente extraídos, purificados e analisados em gel de agarose (Fig. 19C). Estas faixas de tamanho foram escolhidas pelo fato de que aproximadamente 95% dos genes anotados para *Xac* estão compreendidas entre 500 e 3000bp. Considerando que, teoricamente, no processo de ligação vetor-fragmento a probabilidade de clonagem de insertos menores é maior do que a clonagem de insertos maiores, nós decidimos construir bibliotecas com essas duas faixas de tamanho de forma independente e combiná-las posteriormente a fim de termos uma melhor representatividade dos fragmentos superiores a 1500bp.

Preparação das Sub-Bibliotecas Genômicas

Os fragmentos de DNA genômico e o vetor pOAD submetidos à reação de ligação foram utilizados para transformar células de bactéria DH10B através de eletroporação. Inicialmente as transformações foram feitas em pequena escala e os clones obtidos analisados através de seqüenciamento para a determinação da porcentagem de clones considerados válidos, onde fragmentos do DNA genômico

Figura 19- Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. A) Análise do vetor pOAD após tratamento com CIP. 1- Marcador de peso molecular: DNA do fago λ digerido com *BstEII* (NEB); 2- Vetor pOAD após linearização com *PvuII*, tratamento com CIP e purificação. B) DNA genômico de *Xac* após nebulização e reparo. 1- Marcador de peso molecular 250bp (Gibco BRL); 2- Amostras do DNA genômico fragmentado. A figura mostra uma boa concentração de fragmentos na faixa de 500-3000bp. C) Análise dos DNA genômico de *Xac* após purificação. 1- Marcador de peso molecular 250bp (Gibco BRL); 2-Fragmentos de 500-1500bp; 3 Fragmentos de 1500-3000bp.

estavam devidamente clonados. Os resultados mostraram que aproximadamente 70% dos clones continham fragmentos de *Xac*. Este valor foi considerado satisfatório e o próximo passo foi a obtenção de bibliotecas com aproximadamente 1×10^6 transformantes para cada uma das faixas de tamanho (500-1500 e 1500-3000bp) do DNA genômico.

Como descrito em Materiais e Métodos, as bibliotecas foram obtidas através de 100 eletroporações/dia até atingirmos um número de clones válidos com insertos de aproximadamente 1×10^6 para cada grupo de fragmentos. Considerando que *Xac* contém um genoma de aproximadamente 5Mb, uma biblioteca contendo 2×10^6 clones teria, em média, 1 clone/2,5 bases do genoma de *Xac*. Como no sistema duplo híbrido é fundamental que o clone da biblioteca seja expresso na fase correta em fusão com o domínio de ativação do GAL4, apenas 1/6 destes preencheriam este critério onde o fragmento clonado estaria em fase +1. Desta forma teríamos 1 clone na fase +1 a cada 15 bases do genoma de *Xac*.

Após cada dia de transformação, uma alíquota de 200 μ L era retirada e plaqueada em meio sólido TYE contendo ampicilina ou carbenicilina e o restante estocado a -80°C. Desta forma, poderíamos estimar o número de transformantes/dia além da proporção de clones válidos (aqueles que continham fragmentos de *Xac* clonados). Inicialmente, foram feitas as transformações envolvendo os fragmentos de 500-1500bp (Biblioteca 1). Nesta primeira etapa o número de clones variou de

13.600 a 227.200/dia. O sequenciamento mostrou que a proporção de clones contendo insertos do DNA genômico de *Xac* variou de 64-96,5%, sendo que em média obtivemos 79% de clones contendo fragmentos entre 500-1500bp de *Xac*, totalizando $1,35 \times 10^6$ clones válidos da Biblioteca 1 como mostra a Tabela 11.

Na confecção da Biblioteca 2 obtivemos em média 205.000 clones/dia onde cerca de $1,07 \times 10^6$ clones eram válidos, o que representou aproximadamente de 74% dos clones totais (Tabela 12). Desta forma, ambas as bibliotecas continham o número de clones inicialmente proposto.

Tabela 11- Biblioteca 1: Fragmentos genômicos de 500-1500bp

Sub-biblioteca	Nº Transformações	Nº Colônias/ 100µL	Nº Total de Clones	Eficiência (%)	Clones (+)
1.1	100	66	52.800	64	33.796
1.2	100	182	145.600	78	113.568
1.3	100	142	113.600	77	87.472
1.4	100	38	30.400	65	19.760
1.5	50	34	13.600	77	10.472
1.6	80	253	161.920	58	93.913
1.7	80	355	227.200	67	152.224
1.8	82	332	217.792	80	174.233
1.9	82	198	129.888	82,2	106.793
1.10	85	130	88.400	93,5	82.627
1.11	96	172	142.096	85	120.782
1.12	98	208	162.448	90,5	147.015
1.13	96	65	49.920	96,5	48.173
1.14	91	119	86.632	90,6	78.489
1.15	81	147	95.256	88,9	84.683

Eficiência (%)- porcentagem de clones contendo inserto de DNA de *Xac* após o sequenciamento.
Clones(+)- número de clones com inserto após a análise por sequenciamento.

Total: 1.354.000

Tabela 12-Biblioteca 2: Fragmentos genômicos de 1500-3000bp

Sub-biblioteca	Nº Transformações	Nº Colônias/ 100µL	Nº Total de Clones	Eficiência (%)	Clones (+)
2.1	79	319	204.308	70	143.015
2.2	102	293	239.088	80	191.270
2.3	88	266	187.264	73,6	137.751
2.4	93	261	194.184	89,2	173.173
2.5	100	410	328.000	77,3	202.360
2.6	66	496	261.888	77,3	202.360
2.7	30	90	21.600	90,7	19.440

Eficiência (%)- porcentagem de clones contendo inserto de DNA de *Xac* após o sequenciamento.
Clones(+)- número de clones com inserto após a análise por sequenciamento.

Total: 1.069.369

Extração das Bibliotecas em Larga Escala

A extração das bibliotecas foi feita como descrito em Materiais e Métodos. As quantidades obtidas variaram de 7-14mg de DNA por extração utilizando 100.000-250.000 clones iniciais. Amostras das amplificações das bibliotecas foram digeridas com a enzima *Hind*III e analisadas em gel de agarose (Fig. 20). Esta enzima possui sítios de restrição nos dois lados do sítio múltiplo de clonagem do vetor pOAD, com aproximadamente 700bp de distância entre si. Desta forma, a digestão da biblioteca com *Hind*III permitiu que os fragmentos de *Xac* clonados no sítio *Pvu*II sejam visualizados em gel agarose. Podemos observar na figura 20 uma grande população de fragmentos com tamanhos diferentes, o que permite concluir que a metodologia aplicada para a expansão da biblioteca não comprometeu, a princípio, sua representatividade. Isto foi confirmado através do seqüenciamento inicial de 96 clones escolhidos aleatoriamente onde observamos que aproximadamente 80% destes continham insertos de DNA de *Xac* e, dentre estes, todos apresentavam fragmentos com seqüências diferentes.

Figura 20- Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, das amostras das bibliotecas genômicas digeridas com *Hind*III após a amplificação. 1: marcador de peso molecular (250 bp ladder). 2-9: bibliotecas de pOAD + fragmentos de 500-1500bp: a digestão resulta em fragmentos de 1217-2217bp. 10-14: bibliotecas de pOAD + fragmentos de 1500-3000bp: a digestão resulta em fragmentos de 2217-3717bp. As bandas nítidas inferiores (717 bp) e superiores (7483 bp) são derivadas do vetor pOAD.

Amplificação e Clonagem das Iscas no Vetor pOBD

Com exceção da HrcU (XAC0406) que apresentou problemas na PCR, todos os demais 112 genes cujas proteínas foram inicialmente propostas como iscas (Tabelas 4-9, Introdução) foram amplificados e clonados no vetor pOBD para posteriormente serem utilizados na triagem da biblioteca genômica de *Xac*. A figura 21 mostra a análise em gel de agarose de alguns genes amplificados por PCR.

Identificação de Falso-Positivos: Auto-ativação dos Componentes da Biblioteca Genômica

Como descrito anteriormente, o teste de auto-ativação é fundamental para que possamos determinar se existem componentes da biblioteca que são capazes de auto-ativar os repórteres da levedura independentemente da natureza da isca, o que caracterizaria um falso-positivo. Primeiramente, a cepa de levedura PJ694-a foi transformada com a biblioteca e plaqueada em meio SC-Leu-His + 3mM de 3-aminotriazol (análise de auto-ativação do repórter *His*) e SC-Leu-Ade (análise de auto-ativação do repórter *Ade*). Após 7 dias de incubação a 30°C não foram observados clones com a capacidade de crescer em meio seletivo, mostrando que nenhum componente da biblioteca é capaz de auto-ativar os repórteres na ausência do domínio de ligação ao DNA do *GAL4* presente no vetor pOBD. Já na transformação em larga escala (aproximadamente 1×10^7 transformantes) da mesma cepa previamente transformada com o vetor pOBD vazio (isto é, sem isca) detectamos o crescimento de centenas de clones em meio seletivo. Cerca de 100 destes foram isolados, submetidos à extração plasmidial e os fragmentos da biblioteca (presas) identificados através de sequenciamento de DNA. Dos clones analisados, 89% tratavam-se de segmentos que codificavam a proteína TolC (XAC3463), um componente do sistema de secreção do Tipo I, 6,5% correspondiam a segmentos do gene *ribA* (XAC3792) envolvido na biossíntese de riboflavina e clones únicos derivados dos genes *phoQ* (XAC4022), *glnA* (XAC0204) e *piuB* (XAC4036). Assim, como observado neste ensaio, durante toda a triagem da biblioteca muitos clones considerados positivos continham segmentos do gene *tolC* ligados ao vetor pOBD. Os resultados obtidos não deixaram dúvida que os fragmentos da proteína TolC são capazes de auto-ativar os repórteres de levedura independente da natureza ou presença da isca no vetor pOBD. Além de TolC, outras

Figura 21- Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio dos produtos de PCR de alguns genes que foram clonados no vetor pOBD. L-marcador de peso molecular 250bp (Gibco BRL); 1- XAC3324: 1071bp; 2- XAC0416: 411bp; 3- XAC0397: 279bp; 4- XAC0393: 1938bp; 5-XAC1706:1110bp e 6- XAC0419: 312bp.

proteínas encontradas como presas quando utilizamos diferentes iscas foram consideradas falso-positivos: a) membros da família de receptores dependentes de TonB; b) o produto dos genes *wapA* (XAC1866 e XAC1305); c) a subunidade C da celulose sintase (XAC3515); d) as proteínas PthA e KfrA cujos genes são encontrados nos plasmídeos de *Xac*. No caso de algumas iscas, como por exemplo HrpF, Hpa2 e o fragmento N-terminal da HpaB, as presas eram derivadas de diferentes proteínas e as interações observadas não continham aparente relevância biológica. Nestes casos, os clones também foram considerados falso-positivos.

Ensaio de Auto-ativação das iscas

Além do ensaio de auto-ativação através dos componentes da biblioteca é necessário que cada isca seja individualmente submetida ao mesmo procedimento. Observamos que aproximadamente 10% das iscas analisadas são capazes de auto-ativar os repórteres *GAL1-HIS3* *GAL-2ADE2* nas condições de SC-Trp-His + 5mM 3-AT e SC-Trp-Ade. Neste ensaio, utilizamos concentrações de 3-AT que variavam de 5-50mM. As iscas XACb0020, XACb0023, XACb0026, XACb0027, XACb0028, XACb0029, XACb0033, XACb0070, XAC0466, XAC0096, XAC0416 e XAC1903 são auto-ativadores mesmo quando utilizamos altas concentrações de 3-AT (50mM). Desta forma, estas proteínas não puderam ser utilizadas no ensaio de duplo-híbrido. A proteína hipotética XAC0466 mostrou ser um auto-ativador quando usada como isca utilizando os aminoácidos de 1-589; o mesmo efeito não foi observado quando o domínio C-terminal desta mesma proteína, compreendido entre os aminoácidos

450-589, foi usado como isca. Outras proteínas mostraram que com o aumento da concentração de 3-AT a auto-ativação era inibida; são elas: XAC0862 (50mM), XAC1670 (30mM), XAC0400 (10mM), XAC0412 (50mM) e XAC1706 (50mM). Todas as demais proteínas utilizadas como iscas não são capazes de auto-ativar os genes repórteres da cepa de levedura PJ694-a.

Análise do Repórter *GAL7-lacZ*

O uso do repórter *GAL7-lacZ* permite selecionar interações positivas através de ensaios capazes de medir a atividade da β -galactosidase. O método mais usado para este ensaio baseia-se na imobilização de colônias em filtros com posterior lise celular através de congelamento rápido utilizando N₂ líquido (James *et al.*, 1996; vide Materiais e Métodos). Na cepa de levedura PJ694-a, o promotor *GAL7* parece ser ativado em resposta a esse tratamento de permeabilização celular (James *et al.*, 1996). Desta forma, é comum observarmos um grande número de falso-positivos quando a ativação deste repórter é analisada (James *et al.*, 1996). Como a presença dos repórteres *GAL1-HIS3* e *GAL-2ADE2* mostrou ser eficiente e suficiente para a triagem através de duplo-híbrido (James *et al.*, 1996; Uetz *et al.*, 2000) nós não utilizamos o *GAL7-lacZ* para a seleção de clones positivos.

Triagem das Iscas Utilizando o Ensaio de Duplo-Híbrido

A transformação sequencial em larga escala dos clones de levedura contendo as iscas com a biblioteca genômica de *Xac* foi feita como descrito em Materiais e Métodos e plaqueada em meio seletivo SC-Trp-Leu-His-Ade + 3AT. As concentrações ideais de 3-AT para cada isca foram previamente determinadas através do teste de auto-ativação. As ausências de triptofano e leucina são necessárias para que haja a manutenção dos vetores ao longo de todo o processo de triagem. O uso de 3-AT é importante para a diminuição de falso-positivos neste tipo de seleção por tratar-se de um inibidor competitivo da proteína His3p codificada pelo gene *HIS3* que, neste caso, está sob controle do promotor GAL (James *et al.*, 1996). O 3-AT é capaz de inibir baixos níveis de His3p e, desta forma, apenas os clones que conseguem expressar níveis mais altos dessa proteína é que são capazes de crescer na ausência de histidina. O gene repórter *ADE2* possibilita uma seleção mais estrigente durante a triagem. *ADE2* codifica a proteína fosforibosilaminoimidazol carboxilase que participa da biossíntese da adenina; a sua

ausência resulta no acúmulo de alguns intermediários da via de biossíntese que produzem uma pigmentação avermelhada (James *et al.*, 1996). É comum durante a triagem que as colônias positivas cresçam na ausência de Ade como colônias brancas mas que, com o passar dos dias, adquirem coloração ligeiramente avermelhada. Os falso-positivos, a princípio, não crescem nestas condições ou crescem pouco e logo desenvolvem cor vermelha intensa. Colônias brancas identificam maior ativação do sistema *GAL2-ADE2* e, conseqüentemente, interações mais fortes (estáveis) envolvendo isca e presa (James *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2001). Os clones selecionados em meio SC-Trp-Leu-His-Ade + 3-AT foram identificados e inoculados em novas placas contendo o mesmo meio de cultura (Fig. 22).

Controles Positivos da Triagem

A Tabela 14 (no final dos Resultados) mostra os resultados obtidos quando a triagem foi realizada utilizando como isca proteínas que possuem redes de interação e função conhecidas. Dentre os controles positivos escolhidos estão: a) *cheA*-XAC1903, que codifica uma histidina quinase envolvida na transdução de sinal de processos de quimiotaxia e que interage com um grupo de proteínas Che, dentre elas CheW, CheY e CheB (Neidhardt, 1996); b) *holB*-XAC1132, que codifica a subunidade *delta* da DNA polimerase III (Neidhardt, 1996); c) *groES*-XAC0541, que codifica uma chaperone que, juntamente com GroEL, é requerida para o correto enovelamento de diversas proteínas citoplasmáticas. GroES forma um anel heptamérico capaz de interagir com um complexo formado por GroEL (Neidhardt, 1996); d) *ftsZ*-XAC0784, a qual codifica uma proteína semelhante a tubulina capaz de formar longos filamentos fundamentais para o processo de divisão celular (Hale e de Bôer, 1999). CheA mostrou ser um auto-ativador e não foi possível a sua utilização no duplo híbrido. As demais iscas utilizadas como controles positivos, GroES, HolB e FtsZ mostraram interações com proteínas previamente identificadas e descritas na literatura: GroES mostrou interações homotrópicas em 22 dos 24 clones seqüenciados, caracterizando as interações GroES-GroES que são observadas na formação de um complexo heptamérico. HolB interagiu com diversas proteínas. Dentre estas a interação esperada entre fragmentos do produto do gene *dnaX* que codifica as subunidades *tau* e *gama* da DNA polimerase III foi identificada. FtsZ, devido a sua capacidade de formação de polímeros, mostrou interações

Figura 22- Colônias de levedura durante o processo de triagem utilizando o sistema duplo-híbrido em meio SC-Trp-Leu-His-Ade + 3-AT. As setas amarelas indicam colônias com pequeno crescimento e com coloração avermelhada caracterizando possíveis falso-positivos. As setas verdes representam clones negativos. Os demais clones brancos ou ligeiramente avermelhados são considerados positivos.

homotrópicas em 11 de 13 clones analisados. Assim, os 3 controles positivos efetivamente testados apresentaram interações previamente descritas na literatura.

Teste de Recombinação

Durante a triagem das bibliotecas em levedura foi observado que, em alguns casos, nós encontrávamos no vetor pOAD, onde havia sido confeccionada a biblioteca, a isca que, a princípio, foi clonada no vetor pOBD. O fenômeno observado era semelhante a um processo de recombinação entre os vetores dentro da levedura onde ocorreria a troca de vetor dos fragmentos da isca e, possivelmente, da biblioteca. Os vetores pOBD e pOAD contêm regiões idênticas de aproximadamente 60bp antes e 2400bp depois do sítio múltiplo de clonagem. Uetz *et al.* (2000) em estudos de genômica funcional em larga escala utilizaram estes vetores para clonar 6000 genes através de recombinação em levedura. Na confecção das bibliotecas, fragmentos de DNA genômico de *Xac* foram clonados no sítio de *PvuII*, o qual gera extremidades cegas. Na clonagem das iscas utilizamos diferentes combinações de sítios de restrição. A figura 23 esquematiza a

recombinação que estamos propondo e é consistente com os dados de seqüenciamento de algumas presas de determinadas iscas. Das proteínas utilizadas como iscas, encontramos recombinação nos seguintes casos: HrpG (XAC1265), XAC0095, XAC1568, HrcV (XAC0396), TrwA (XACb0035), XACb0025, VirB11 (XAC2618), XAC1343, GroES (XAC0541) e FtsZ(XAC0784).

Figura 23- A) Seqüência de nucleotídeos de parte da região do sítio múltiplo de clonagem comum aos vetores pOAD e pOBD. B) Fragmento da biblioteca clonado no sítio *PvuII* do vetor pOAD. C) Isca clonada no sítio *EcoRI* do vetor pOBD. D) Representação de parte do vetor pOAD após recombinação com pOBD. Devido à recombinação, não vemos mais as bases CAG provenientes de parte do sítio de *PvuII* onde a biblioteca foi clonada no vetor pOAD. E) Representação geral das construções GAL-BD Isca e GAL-AD Biblioteca. As regiões do sítio múltiplo de clonagem (MCS) e terminadora da álcool desidrogenase (ADH) estão presentes nas duas construções e podem permitir o processo de recombinação. F) Produto da recombinação entre GAL-BD Isca e GAL-AD Biblioteca: ambos os vetores contém a seqüência da Isca.

Para testarmos essa nossa hipótese analisamos o comportamento da isca XAC0095. Como será mostrado posteriormente a triagem desta proteína através de duplo-híbrido mostrou que na grande maioria dos casos o seqüenciamento do vetor pOAD para a identificação das presas mostrou produtos de recombinação nos clones considerados positivos. O seqüenciamento destes vetores utilizando os “primers” pOAD-F e pOBD-F, os quais hibridizam com as regiões anteriores ao domínio de ativação e ligação ao DNA do GAL4, respectivamente, mostrou que o gene da proteína XAC0095 estava presente nos dois vetores “clonado” no sítio de *EcoRI*. Isso era esperado apenas para o vetor pOBD e não para o pOAD onde o fragmento deveria estar clonado no sítio de *PvuII*.

Assim, o gene XAC0095 clonado no vetor pOBD foi utilizado para transformar a cepa de levedura PJ694-a. As células resultantes foram transformadas em larga escala (ver Materiais e Métodos) com o vetor pOAD “vazio”, isto é, sem nenhum inserto. De um total de $4,4 \times 10^6$ clones obtidos na transformação, 22 deles foram capazes de ativar os genes repórteres e, conseqüentemente, crescer em meio seletivo. A análise destes clones positivos mostrou a presença do gene XAC0095 nos dois vetores em todos os 22 clones. Isso representa, para este caso, uma taxa de recombinação de 5×10^{-6} . Com isso, mostramos que no caso de uma interação homotrópica, a recombinação entre os vetores leva a uma condição onde os genes repórteres podem ser ativados. Desta forma, durante os ensaios de duplo-híbrido, em diversos casos fomos capazes de identificar interações homotrópicas onde parte das presas seqüenciadas eram provenientes da biblioteca e outra parte fruto da recombinação. Esses resultados estão resumidos nas Tabelas 14-19 (no final dos Resultados) e as interações onde observamos a recombinação estão listadas como R.

Interações Proteína-Proteína Identificadas pelo Ensaio Duplo-Híbrido

As Tabelas 4-9 (Introdução) listam todas as iscas utilizadas nas triagens, através de duplo-híbrido, das bibliotecas genômicas de Xac. As tabelas 14-19 mostram as interações proteína-proteína identificadas após a triagem. A seguir, serão apresentadas apenas as principais interações envolvendo os TTSS, TFSS-plasmídeo, TFSS-cromossomo e Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf que podem nos levar a propor mecanismos de regulação/interação destes sistemas. No caso de triagens que resultaram na identificação de várias presas derivadas da mesma

proteína foi possível estimar um domínio mínimo de interação, o qual consiste no menor fragmento encontrado da presa. O que segue é uma descrição resumida das interações com óbvia (ou possível) relevância para o funcionamento desses sistemas. Na Discussão os resultados serão contemplados com maior profundidade e postos no contexto dos nossos conhecimentos sobre o funcionamento do TTSS, TFSS e sistema “Quorum-Sensing”/Rpf baseados na literatura atual.

Uma boa parte das proteínas utilizadas como iscas apresentaram interações com um grande número de presas ou mostraram interações que, a princípio, não conseguimos identificar sua relevância biológica. Outras iscas utilizadas eram de interesse no nosso grupo para estudos de estrutura/função e não estão, necessariamente, envolvidas com os sistemas TTSS, TFSS e Rpf, os quais são os focos deste trabalho. Os resultados obtidos quando fizemos a triagem com estas iscas estão listados na tabela 19 e não serão discutidos com maior profundidade neste trabalho.

Interações Envolvendo o TTSS

A Tabela 15 mostra todos os resultados das iscas associadas ao TTSS. A representação do mapa gênico do *locus hrp* de *Xac* está na figura 8 (Introdução). Um esquema das interações envolvendo proteínas do TTSS está mostrado na figura 24.

1) HrpG (XAC1265)

A proteína HrpG, o principal regulador de transcrição dos genes *hrp* do TTSS, mostrou interações com as proteínas (Fig. 24A):

1.1) HrpG (XAC1265): Interação homotrópica (48 vezes). Todas as presas encontradas neste caso eram resultado de processos de recombinação.

1.2) XAC0095: Proteína hipotética conservada em *Xanthomonas* que interagiu com HrpG 36 vezes. O início dos segmentos de XAC0095 encontrados variaram do códon -26 ao 4.

1.3) XAC1568: Proteína conservada hipotética localizada ao lado do gene *vacB*. Foram identificadas 5 interações entre estas proteínas sendo que o domínio mínimo encontrado foi a partir do aminoácido 65 de XAC1558.

1.4) XAC3683 é um possível sensor histidina quinase o qual pode fazer parte de um sistema de dois componentes juntamente com um regulador de resposta. Foi

identificada apenas 1 interação entre estas proteínas a partir do aminoácido 96 de XAC3683.

2) XAC0095

A proteína XAC0095 foi uma das presas identificadas quando HrpG foi utilizado como isca na triagem. O gene de XAC0095 contém um possível GTG de iniciação opcional no códon -12. Assim, a região utilizada nesta triagem foi aquela compreendida entre os códons -12 e 76. Os resultados obtidos foram:

2.1) XAC0095: Foram encontradas 62 interações homotrópicas sendo que 61 delas eram resultantes de processos de recombinação.

2.2) HrpG (XAC1265): 3 interações envolvendo HrpG com domínio mínimo de interação a partir do aminoácido 6. Este resultado é condizente com o observado quando HrpG foi utilizado como isca na triagem.

2.3) XAC0095b: O gene que codifica esta proteína está em uma região que inicialmente não foi anotada no genoma de *Xac* publicado por da Silva *et al.* (2002). Localizado no cromossomo na região 1331630-1331896, este gene codifica uma proteína de 88 a.a. que apresenta similaridade com XAC0095. A única interação encontrada envolve XAC0095b a partir do códon -4. A análise dos homólogos a XAC0095 será apresentada na Discussão.

2.4) XAC0524: é uma proteína hipotética que foi encontrada 6 vezes com domínio mínimo a partir do resíduo 63. Quando XAC0524 foi utilizada como isca, encontramos 17 interações homotrópicas.

Os resultados obtidos com a XAC0095 estão esquematizados na figura 24A.

3) HrpB2 (XAC0408)

A proteína HrpB2 é um dos principais componentes extracelulares do TTSS e um candidato a ser um componente do *pilus* Hrp (Buttner e Bonas, 2002). Os principais resultados obtidos na triagem usando esta proteína foram (Fig. 24D):

3.1) HrcU: Componente do TTSS associado à membrana interna (Hueck, 1998; He, 1998) contendo uma porção C-terminal citoplasmática. Esta interação envolvendo HrpB2 e HrcU foi encontrada 4 vezes com domínio mínimo a partir do aminoácido 256 da HrcU.

3.2) XAC0452: Esta proteína é uma possível 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase que foi encontrada 5 vezes e apresentou domínio mínimo a partir do códon -15 do seu gene.

4) HrpB4 (XAC0410)

HrpB4 é um componente citoplasmático do TTSS que contém uma possível associação com a membrana interna (Kim *et al.*, 2003). A triagem utilizando essa proteína como isca mostrou duas presas principais (Fig.24E):

4.1) XAC2054: Constituinte de um sistema de dois componentes composto por um domínio sensor histidina quinase e um regulador de resposta. Foram encontradas 6 interações a partir do aminoácido 313 da XAC2054.

4.2) XAC3515: Celulose sintase que foi identificada como presa em diversas triagens. Como as interações observadas independem, a princípio, da natureza da isca, XAC3515 foi considerada um possível falso-positivo.

5) HpaA (XAC0400)

HpaA é um dos efetores secretados pelo TTSS (Huguet *et al.*, 1998). A utilização desta proteína como isca mostrou uma interação altamente específica (40 vezes) com uma única presa: HpaB (Fig. 24B). Esta presa é um componente citoplasmático do TTSS possivelmente associado à membrana que apresentou domínio mínimo de interação a partir do resíduo número 6.

6) HpaB (XAC0396)

HpaB é codificado por um gene localizado no *locus hrp* mas esta proteína não possui função conhecida. Esta proteína foi utilizada como isca de duas formas diferentes (Fig. 24B):

- a) HpaB parcial (resíduos 1-92): Nestas condições, HpaB não mostrou interações específicas com nenhuma presa.
- b) HpaB total (resíduos 1-156): Utilizando todos os resíduos desta proteína como isca encontramos duas interações altamente específicas: HpaA, 37 vezes e HrcV, 12 vezes. Na interação com HpaA o domínio mínimo encontrado foi a partir do resíduo 126, enquanto para HrcV foi a partir do resíduo 360.

7) HrcV (XAC0405)

HrcV é um componente conservado do TTSS possivelmente responsável pela formação do poro na membrana interna (Hueck *et al.*, 1998). Como esta proteína contém seis possíveis domínios transmembranais principalmente na porção N-terminal, utilizamos como isca apenas a porção C-terminal citoplasmática desta proteína compreendida entre os resíduos 325-646. As principais interações observadas com esta porção da HrcV foram (Fig. 24B):

7.1) HrcV(XAC0405): 14 interações homotrópicas envolvendo HrcV a partir do resíduo 325, sendo que todas essas presas foram derivadas de eventos de recombinação.

7.2) HpaB (XAC0396): 1 interação com HpaB a partir do resíduo 1. Este resultado é consistente com a interação observada anteriormente entre HpaB e C-terminal da HrcV quando utilizamos HpaB como isca.

8) HrcN (XAC0412)

HrcN é um componente conservado do TTSS localizado no citoplasma bacteriano e possivelmente associado à membrana interna (Hueck, 1998; He, 1998). O uso desta proteína como isca mostrou, principalmente, 4 interações homotrópicas (Fig.24F) sendo que nenhuma delas derivou de eventos de recombinação e com domínio mínimo a partir do resíduo 30.

9) HrpB1 (XAC0407)

HrpB1 é um componente possivelmente citoplasmático do TTSS. Quando usado como isca na triagem da biblioteca de *Xac*, esta proteína interagiu com diversas presas diferentes, dentre elas (Fig. 24C):

9.1) HrpD6 (XAC0398): Esta proteína também faz parte do TTSS e interagiu 10 vezes com HrpB1. O domínio mínimo da HrpD6 necessário para interagir com HrpB1 inicia no resíduo 3.

9.2) HrpW (XAC2922): Pectato liase possivelmente secretada pelo TTSS. Foram encontradas 2 interações com HrpW a partir do códon -76 do seu gene correspondente.

9.3) PHAE (XAC2047): subunidade da PHA sintase que interagiu 6 vezes com domínio mínimo a partir do resíduo 185.

9.4) XAC3712: Metalopeptidase que interagiu 3 vezes com HrpB1 com domínio mínimo de interação a partir do resíduo 92.

Interações Envolvendo o TFSS do Plasmídeo

A Tabela 16 mostra o resultado das triagens envolvendo as iscas deste sistema. O mapa gênico deste *locus vir* está mostrado na figura 13 (Introdução). A figura 25 mostra um esquema das principais interações envolvendo o TFSS-plasmídeo.

1) VirB1-plasmídeo (XACb0036)

VirB1, uma possível transglicosilase do TFSS (Burns, 2003; Christie e Vogel, 2000), foi utilizada como isca na triagem e mostrou uma interação específica (6 vezes) com a proteína VirB9 do plasmídeo (XACb0036) (Fig. 25A). Ambas estão localizadas no *locus vir* do plasmídeo e o domínio mínimo de interação encontrado foi a partir do resíduo 32 da VirB9.

2) XACb0042

Proteína hipotética codificada pelo *locus vir* do plasmídeo. XACb0042 mostrou uma interação específica (13 vezes) com a proteína VirB6-plasmídeo (XACb0041) (Fig. 25B) cujo gene está localizado ao seu lado. O domínio mínimo de interação é a partir do resíduo 8 da VirB6.

3) XACb0035

Proteína hipotética de 139 aminoácidos possui seu gene correspondente localizado entre os *loci tra/trw* e *vir* no plasmídeo. A utilização desta proteína como isca mostrou 27 interações homotrópicas com domínio mínimo a partir do resíduo 3 (Fig. 25C).

4) XACb0032

Proteína hipotética de 107 aminoácidos cujo gene está localizado entre os *loci vir* e *tra/trw* do plasmídeo pXAC64. XACb0032 quando utilizada como isca apresentou 10 interações com a proteína XACb0033, cujo gene está localizado ao lado de XACb0032 (Fig. 25E). O domínio mínimo encontrado nessa interação foi a partir do resíduo 18 da XACb0033.

5) XACb0043

Esta proteína, cujo gene está localizado no *locus vir* do plasmídeo pXAC64, quando utilizada como isca mostrou uma interação com o produto do gene XACb0021 na fase +2. As presas seqüenciadas iniciaram nos nucleotídeos 22841, 22817, 22790, 22793, 22829, 22832 e 22799 do plasmídeo pXAC64 no sentido decrescente. A análise desta região mostra que ao invés do gene XACb0021 pode existir um novo gene, denominado de XACb0021b, cujo resultou na interação com XACb0043 (Fig. 25D).

6) XACb0025

Proteína hipotética similar a proteína TraA do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida* e denominada como TrwA em Xac. A utilização desta proteína na triagem resultou em 9 interações homotrópicas, sendo 5 delas derivadas de eventos de recombinação. O domínio mínimo encontrado envolvendo XACb0025-XACb0025 (Fig. 25F) foi a partir do resíduo 2.

Interações Envolvendo o TFSS-cromossomo

A Tabela 17 mostra as interações encontradas quando as iscas do TFSS do cromossomo foram utilizadas na triagem. O mapa gênico deste *locus vir* está mostrado na figura 13 (Introdução). Um esquema das principais interações encontradas nesse sistema está mostrado na figura 26.

1) VirD4-cromossomo (XAC2623)

A proteína VirD4 do cromossomo, uma das principais ATPases do TFSS (Christie e Vogel, 2000), quando utilizada como isca resultou na interação com 12 presas diferentes (Fig. 26A). Todas são proteínas hipotéticas conservadas sendo que a maioria possui homólogos encontrados apenas no gênero *Xanthomonas*. A lista dessas presas de VirD4 encontra-se na Tabela 13.

Como será mostrado na Discussão, as proteínas deste grupo possuem uma porção C-terminal similar entre si.

Tabela 13- Presas obtidas na triagem da biblioteca utilizando a proteína VirD4 (XAC2623) como isca.

Presa	a.a.	Domínio Mínimo (resíduo inicial)	Número de Interações
XAC0151	254	120	5
XAC1918	606	470	8
XAC3266	861	680	9
XAC2609	431	314	8
XAC0096	646	500	7
XAC0574	440	134	7
XAC1165	112	6	2
XAC0466	589	456	13
XAC3634	306	38	6
XAC4264	304	94	1
XAC0323	136	30	1
XAC2885	395	82	1

2) XAC0466

Esta proteína, encontrada inicialmente como sendo presa de VirD4-cromossomo, foi utilizada como isca na triagem da biblioteca. Apesar da triagem resultar em um grande número de falso-positivos provenientes da proteína TolC, conseguimos identificar um clone contendo o segmento que codifica VirD4 a partir do resíduo 136 (Fig. 26A).

3) XAC2609

A proteína XAC2609 também foi uma das presas da VirD4-Cromossomo. O gene que codifica esta proteína, assim como *virD4*, encontra-se no *locus vir* do cromossomo. A utilização de XAC2609 como isca resultou na interação específica (11 vezes) com a proteína XAC2610 (Fig. 26A) com um domínio mínimo a partir do resíduo 76. O gene da XAC2610 está localizado ao lado de XAC2609 no *locus vir* do cromossomo.

4) XAC2610

XAC2610, cujo gene está localizado no *locus vir* do cromossomo, foi presa da proteína XAC2609. Quando XAC2610 foi utilizada como isca, ela interagiu principalmente (6 vezes) com a proteína FliK (XAC1949), a qual faz parte do complexo flagelar. Além desta presa, podemos destacar as interações com outras proteínas contendo genes que também estão localizadas no *locus vir* do Cromossomo: 1 clone derivado da XAC2609 (Fig. 26A) (proteína que já havia

mostrado anteriormente interação com XAC2610) a partir do resíduo 9 e também 1 clone derivado da VirB11-cromossomo (XAC2618) iniciando no códon -14 do seu gene correspondente.

5) XAC2622

Proteína hipotética conservada em *Xanthomonas* localizada no *locus vir*. A maioria das presas obtidas (5 em 6) foram derivadas da proteína VirB9-cromossomo (XAC2620) (Fig. 26B) com domínio mínimo a partir do resíduo 130 e cujo gene também faz parte do *locus vir*.

6) VirB11-Cromossomo (XAC2618)

VirB11 quando utilizada como isca mostrou 55 interações homotrópicas (Fig. 26C) com a grande maioria das presas iniciando no resíduo 1 e apenas uma delas a partir do resíduo 11.

Interações Envolvendo o Sistema de “Quorum-Sensing”/Rpf

A Tabela 18 mostra as interações encontradas neste sistema. O mapa gênico do *locus rpf* está mostrado na figura 14 (Introdução). Um esquema que mostra as interações entre as proteínas deste sistema está mostrado na figura 27.

1) RpfF (XAC1879)

Esta enzima, a qual é responsável pela biossíntese dos fatores DSF (Slater *et al.*, 2000), quando foi utilizada na triagem mostrou interações altamente específicas com RpfC (XAC1878) (Fig. 27). O curioso é que apenas nesta interação observamos que a presa RpfC encontrava-se em três fases diferentes: +1(44 vezes), +2(33 vezes) e +3 (8 vezes). Segundo Lecrenier *et al.* (1998) esse fenômeno é raro mas pode ocorrer quando utilizamos o sistema duplo-híbrido de levedura. Acredita-se que a alteração na fase de leitura (“frameshift”) pode ocorrer em levedura com taxas relativamente altas (até 5%). Desta forma, se temos uma forte interação proteína-proteína envolvendo uma presa cujo gene encontra-se clonado nas fases +2 ou +3, os baixos níveis de proteína expressa na fase correta (devido ao “frameshift”) podem ser suficientes para que ocorra a interação com a isca e, conseqüentemente, ativar os genes repórteres. No total, foram encontradas 85 presas derivadas de RpfC com

domínio mínimo a partir do resíduo 442. Além desta principal interação, observamos também duas presas derivadas da própria RpfF (Fig. 27) iniciando no resíduo 14.

2) RpfC (XAC1878)

A utilização desta proteína na triagem mostrou resultados muito consistentes com os obtidos quando utilizamos RpfF como isca e também com o modelo de interação da RpfG proposto por Slater *et al.* (2000). Além de identificarmos como presa a proteína RpfF (Fig. 27) (32 vezes com domínio mínimo a partir do resíduo 65) também detectamos como presa a proteína RpfG (Fig. 27) (XAC1877; 6 vezes com domínio mínimo iniciando no resíduo 6). Outra interação relevante foi com a proteína CmfA (Fig. 27) (XAC0330; 4 vezes com domínio mínimo iniciando no aminoácido 165).

Figura 24- Representação das interações proteína-proteína envolvidas no TTSS identificadas após a triagem das bibliotecas. A) Interações da HrpG (HrpG, XAC0095, XAC3683 e XAC1568) e XAC0095 (HrpG, XAC0095, XAC0095b e XAC0524); B) Interações da HpaA (HpaB), HpaB (HpaA e HrcV) e HrcV (HpaB e HrcV); C) Interações da HrpB1 (HrpD6, HrpW, XAC2047 e XAC3712); D) Interações da HrpB2 (HrcU e XAC0452); E) Interação da HrpB4 (XAC2054); F) Interação homotrópica da HrcN. As setas pontilhadas nas partes A e B representam interações homotrópicas. As setas azuis mostram interações que ocorreram quando as duas proteínas envolvidas foram usadas como iscas na triagem da biblioteca.

Figura 25- Representação das interações proteína-proteína envolvidas no TFSS-plasmídeo identificadas após a triagem das bibliotecas. A) Interação VirB1-VirB9; B) Interação XAC0042-VirB6; C) Interação homotrópica da XAC0035; D) XACb0043-XACb0021b; E) Interação XAC0032-XAC0033; F) Interação homotrópica da XACb0025.

Figura 26- Representação das interações proteína-proteína envolvidas no TFSS-cromossomo identificadas após a triagem das bibliotecas. A) Interações da VirD4 (XAC0051, XAC1918, XAC3266, XAC0096, XAC0574, XAC1165, XAC4264, XAC3634, XAC2609, XAC0466, XAC0323 e XAC2885), XAC0466 (VirD4), XAC2609 (XAC2610) e XAC2610 (XAC2609). As interações reversas ocorridas entre VirD4-XAC0466 e XAC2609-XAC2610 estão representadas pelas setas azuis; B) Interação da XAC2622 (VirB9); C) Interação homotrômica da VirB11.

Figura 27- Representação das interações proteína-proteína envolvidas no Sistema “Quorum-Sensing” (Rpf) de *Xac* identificadas após a triagem das bibliotecas. As interações de RpfC (RpfG, RpfF e CmfA), e RpfF (RpfC e RpfF) são mostradas. A seta azul indica a interação reversa envolvendo RpfC-RpfF. A seta pontilhada a interação homotrópica de RpfF.

Tabela 14- Interações Envolvendo Iscas Controles

Isca	Gene	a.a.	Domínio 2H (a.a.)	Clones seq.	Presas	Gene	Códon inicial (número de vezes)/Observações	Total
GroES	XAC0541	95	1-95	24	GroES	XAC0541	R(21), -1(1) (2)	22
					TolC	XAC3463		2
HoIB	XAC1132	319	1-319	10	DNAX	XAC1109	-52(1)	1
					BcsC	XAC3515	851(1), 975(1)	2
					fecA (receptor TonB dependente)	XAC1023	161(1)	1
					XadA	XAC3598	200(1)	1
					OmpA	XAC4273	563(1)	1
FtsZ	XAC0784	403	1-403	13	HP	XAC2506	1(1)	1
					TolC	XAC3463	(3)	3
					FtsZ	XAC0784	R(3), -22(2), -10(1), -7(2), -3(3) (2)	11
					TolC	XAC3463		2
					metiltransferase	XAC1696		
CheA	XAC1903	668	1-668				Auto-Ativador	
R- Produto de recombinação entre os plasmídeos pOBD-isca e pOAD-biblioteca.								

Tabela 15- Interações Envolvendo Iscas do TTSS

Isca	Gene	a.a.	Domínio 2H (a.a)	Clones seq.	Presas	Gene	Códon inicial (número de vezes)/Observações	Total
HrpG	XAC1265	263	1-263	90	HrpG (sistema de secreção III)	XAC1265	R(48)	48
					XAC0095 XCHIP	XAC0095	-27(2), -26(6), -25(1), -21(8), -19(5), -16(1), -14(4), -12(1), -11(1), -2(2), 3(2), 4(3)	36
					XAC1568 CHP	XAC1568	64(2), 65(3)	5
					Sensor histidina-quinase	XAC3683	96 (1)	1
XAC0095 (Presa da HrpG)	XAC0095	73	-12 a 73 (ATG alternativo posição -12)	72	XAC0095 XCHIP	XAC0095	R(61), -64 (1)	62
					HrpG (sistema de secreção III)	XAC1265	1(2), 6(1)	3
					XAC0095b XCHIP	XAC0095b	-4 (1)	1
					XAC0524	XAC0524	-70(1), -43(2), -34(1), -24(1), 63(1)	6
CHP (Presa da HrpG)	XAC1568	157	1-157	19	CHP ToIC	XAC1568 XAC3463	R(17) (2)	17 2
HpaA	XAC0400	271	1-271	42	HpaB (sistema de secreção III)	XAC0396	-15(10), -14(2), -7(28), 6(2)	42

HpaB-parcial	XAC0396	156	1-92	7	HspA	XAC1151	-36(2)	2
					FepA (receptor TonB-dependente)	XAC3121	13(1)	1
					UahA	XAC4326	14(1)	1
					PmrB/EmrB	XAC2769	-36(1)	1
					PmrB/EmrB	XAC1446	590(1)	1
					XAC3266HP	XAC3266	72(1)	1
HpaB-Total	XAC0396	156	1-156	49	HpaA (sistema de secreção III)	XAC0400	-73(1), -69(1), -65(2), -44(2), -23(3), -16(3), -9(2), -5(3), -4(2), 6(2), 26(5), 42(1), 69(2), 72(2), 87(2), 93(1), 108(2), 126(1)	37
					HrcV (sistema de secreção III)	XAC0396	136(1), 267(2), 270(1), 325(1), 335(3), 351(1), 353(2), 360(1)	12
HrcV	XAC0405	645	325-645	15	HrcV (sistema de secreção III)	XAC0396	R(14)	1
					HpaB (sistema de secreção III)	XAC0405	1(1)	1
					FtsY	XAC2552	-2(1)	1
					XAC2821 XCHP	XAC2821	18(1)	1
					XAC3418	XAC3418	37(1)	1
					TolC (sistema de secreção I)	XAC3463	(10)	10
HrcU	XAC0406	357	208-357	NR	NR		NR	

HrpB2	XAC0408	130	1-130	13	HrcU (sistema de secreção III) XAC0452 Bga β-galactosidase FyuA (receptor TonB-dependente) FecA (receptor TonB-dependente) TolC (sistema de secreção I)	XAC0406 XAC0452 XAC1308 XAC3489 XAC1023 XAC3463	222(1), 248(1), 256(2) -86(1), -81(1), -20(1), -15(2) -7(1) 3(1) 77(1) (1)	4 5 1 1 1 1
	XAC0407	151	1-151	29	HrpD6 (sistema de secreção III) HrpW (sistema de secreção III) PHAE Metalopeptidase ClpB XAC2810 CHP GyrA XAC0571 CHP LeuA XAC1307 XCHP XAC4300 XCHP	XAC0398 XAC2922 XAC2047 XAC3712 XAC4140 XAC2810 XAC1631 XAC0571 XAC3455 XAC1307 XAC4300	1(8), 2(1), 3(1) -76(2) 183(3), 185(3) 67(1), 97(2) 127(1) 5(1) 41(1) 9(1) -3(1) 78(1) 70(2)	10 2 6 3 1 1 1 1 1 1 1 2
	XAC0410	209	1-209	24	Sistema de dois componentes BcsC BtuB (receptor TonB-dependente) XAC3245 XAC2530 CHP XAC0037 CzcC	XAC2054 XAC3515 XAC3194 XAC3245 XAC2530 XAC0037 XAC4162	1(1), 135(1), 137(1), 147(1), 313(2) (12) 215(1) (1) 347(1) 117(1) 181(1)	6 12 1 1 1 1 1

HrpD5	XAC0399	312	1-312	34	DNAN (Subunidade β da DNA pol.III)	XAC0002	-3(2), 3(1), 7(1), 15(2), 19(2), 29(1)	9
					PHAE	XAC2047	102(1)	1
					Ppx	XAC1039	25(1)	1
					KfrA	XACa0042	42(2)	2
					aglA	XAC2602	23(1), 77(1)	2
					CobC	XAC3189	54(1)	1
					XAC0544 CHP	XAC0544	12(2)	2
					XAC4301 CHP	XAC4301	22(1)	1
					XAC3054	XAC3054	20(2), 32(2)	4
					XACb0029 HP	XACb0029	13(1)	1
					XAC1290	XAC1290	99(1)	1
					RecC	XAC4337	51(1)	1
					CHP	XAC1420	29(2)	2
					TatB	XAC4217	14(1)	1
					MutL	XAC2405	-8(1)	1
					FecA	XAC0690	26(1)	1
					TatC	XAC4216	101(1)	1
					XAC0544 CHP	XAC0544	-17(1), 1(1)	2
HrcN	XAC0412	442	1-442	6	HrcN (Sistema de secreção III)	XAC0412	30(3), -22(1)	4
					XAC2610 HP	XAC2610	51(1)	1
					PthA	PthA	457(1)	1
HP	XAC0392	165	1-165	9	XAC1343 XCHP	XAC1343	-3(2), 1(4), 2(1), 4(2)	9
HpaF	XAC0393	646	1-646	9	PilL	XAC3098	1714(1)	1
					FhaB	XAC1815	3279(2)	2
					ParA	XAC0192	(1)	1
					CheR	XAC3730	(1)	1
					BcsC	XAC3515	(2)	2
					ClpB	XAC3195	(2)	2

HrpF	XAC0394	824	1-824	20	Pgk	XAC3347	27(1)	1
					GndA	XAC0680	-4(1), 2(1)	2
					TolC	XAC3463	(12)	12
					XAC1630	XAC1630	Fase -1(1)	1
					SahH/AhcY	XAC0804	10(1)	1
					SdeB	XAC1639	Fase +2(1)	1
					XAC4213	XAC4213	Fase -1(1)	1
					FliK	XAC1949	265(1)	1
					NR	NR		
HP	XAC0395	266	1-266		NR			
HrpE	XAC0397	93	1-93	22	TolC	XAC3463	(22)	22
HrpD6	XAC0398	80	1-80	15	TolC (Sistema de secreção I)	XAC3463	(15)	15
HrcS	XAC0401	86	1-86	16	XAC3871	XAC3871	158(1)	1
					XAC1356 CHP	XAC1356	39(1)	1
					XAC3861 CHP	XAC3861	348(1)	1
					XAC3806 CHP	XAC3806	1(1)	1
					TolC (Sistema de secreção I)	XAC3463	(12)	12
HrcQ	XAC0403	304	1-304	8	HrcQ (Sistema de secreção III)	XAC0403	170(1)	1
					WapA	XAC1305	407(2)	2
					BtuB (Receptor TonB dependente)	XAC2600	361(1)	1
					FyuA (Receptor TonB-dependente)	XAC1143	123(1)	1
					CirA (Receptor TonB dependente)	XAC4256	410	1
					XAC0737	XAC0737	5(1)	1
					BfeA	XAC3207	309(1)	1

HrpP	XAC0404	204	1-204	20	XAC3245 FyuA (Receptor TonB-dependente)	XAC3245 XAC0716	599(1) 295(1)	1 1
					FhaB flagelar	XAC1815	1547(1)	1
					PurL	XAC3549	192(1), 197(1)	2
					XAC1304 HP	XAC1304	502(1)	1
					IroN (Receptor TonB-dependente)	XAC4048	15(1)	1
					FepA (Receptor TonB-dependente)	XAC3121	314(1)	1
					FecA (Receptor TonB-dependente)	XAC2998	30(1)	1
					WapA	XAC1866	598(1)	1
					FecA (Receptor TonB-dependente)	XAC1023	7(1)	1
					BtuB (Receptor TonB-dependente)	XAC3448	22(1)	1
					XcsK	XAC0702	46(1), 50(1), 65(1)	3
					XAC3167 CHP	XAC3167	Fase -1(2)	2
					IroN (Receptor TonB-dependente)	XAC3311	31(1)	1
					XAC3756	XAC3756	100(1)	1
					XAC0817 HP	XAC0817	17(1)	1
HrpB5	XAC0411	233	1-233	4	MoaC	XAC1098	-30(1), -14(1), -2(2)	4
HrpB7	XAC0413	169	1-169	7	ParA AspG	XACa0041 XAC0932	-12(1), -10(2), -9(1), -6(1), -5(1) -100(1)	6 1
Hrp1	XAC0416	137	1-137				Auto-Ativador	

Hpa2	XAC0417	138	1-138	9	NdvB XAC0023 XAC2530 CHP XAC1179 CHP CysB XAC3836 CHP UahA XAC1594 CHP	XAC4195 XAC0023 XAC2530 XAC1179 XAC3603 XAC3836 XAC4326 XAC1594	216(1) Fase -1(1) 328(1) 235(1) 128(1) 299(2) 381(1) Fase -1(1)	1 1 1 1 1 2 1 1
	XAC0419	103	1-103	64	TolC PheA XAC3183 HP XAC2197	XAC3463 XAC1649 XAC3183 XAC2197	(50) (6) (5) (3)	50 6 5 3
	XAC0424	542	1-542	59	OrfT OrfT TolC	XACb0010 XAC3229 XAC3463	(39) (6) (14)	39 6 14
	XAC0277	410	1-410	7	PthA XAC2496 CheR Kfr	PthA XAC2496 XAC3730 XACa0042	Fase -3(4) 7(1) 47(1) -3(1)	4 1 1 1
	XAC1266	476	1-476	27	FhuA XAC2810 CHP XAC2412 CHP CzcC PilL GlgB2 XAC0593 CHP XAC0940 CHP XAC3234 HP	XAC1435 XAC2810 XAC2412 XAC4162 XAC3098 XAC0426 XAC0593 XAC0940 XAC3234	70(1), 98(2), 492(3) 1(3) -17(3), 12(1) 1(4) 18(2) 29(2) 11(1), 68(1) (2) (2)	6 3 4 4 2 2 2 2 2

CHP	XAC1706	369	1-369	31	ToIC	XAC3463	(31)	31
XAC3090	XAC3090	497	1-497	9	LeuA LeuS	XAC3455 XAC2781	(6) (3)	6 3
AvrXacE2	XAC3224	356	1-356	59	XAC3245 WapA Egl2 WapA RhsD FhaB flagelar XAC1304 HP XAC2412 CHP XAC2009CHP Flh flagelar ToIC XAC2810 CHP	XAC3245 XAC1866 XAC2522 XAC1305 XAC2529 XAC1815 XAC1304 XAC2412 XAC2009 XAC1952 XAC3463 XAC2810	732(2) 487(2), 592(4) 123(3), 132(3), 141(2), 147(2) 693(4), 729(6) 103(1) 19(1), 75(3), (1) -3(2), 8(4) 77(2) -7(3) 112(1), 82(2) (5) (6)	2 6 10 10 1 5 6 2 3 3 5 6

HP- proteína hipotética

CHP- proteína hipotética conservada

XCHP- proteína hipotética conservada em *Xanthomonas*

R- Produto de recombinação entre os plasmídeos pOBD-isca e pOAD-biblioteca

NIR- Não realizado

Tabela 16- Interações envolvendo proteínas do TFSS-plasmídeo

Isca	Gene	a.a.	Domínio 2H (a.a.)	Clones seq.	Presas	Gene	Códon inicial (número de vezes)/Observações	Total
VirB1 plasmídeo	XACb0036	292	1-292	6	VirB9-plasmídeo	XACb0039	28(1), 30(3), 32(2)	6
HP	XACb0042	131	33-131	20	VirB6-plasmídeo TolC	XACb0041 XAC3463	-4(2), -3(4), -2(1), 2(1), 3(1), 4(1), 8(3) (7)	13 7
HP	XACb0035	139	1-139	27	XACb0035 HP	XACb0035	R(11), -133(2), -99(1), -65(1), -55(1), 1(3), 2(4), 3(4)	27
CHP	XACb0032	107	1-107	22	XACb0033 CHP TolC XAC3433 CHP XAC1696 CHP	XACb0033 XAC3463 XAC3433 XAC1696	-46(1), -43(1), -4(1), 3(1), 5(2), 6(1), 8(1), 16(1), 18(1) (10) Fase -2(1) -50(1)	10 10 1 1
HP	XACb0043	82	1-82	14	XACb0021 HP	XACb0021	Todas as presas na fase +2; início em nucleotídeos (decrecente):22790(1), 22793(1), 22799(2), 22817(1), 22829(1), 22832(1), 22841(1)	8
HP (Presa de XACb0043)	XACb0021b	129	1-129		TatC fabB rhlB	XAC4216 XAC3625 XAC3829	1(4) 1(1) 359(1)	4 1 1
TrwA (HP)	XACb0025	131	1-131	9	TrwA	XACb0025	Auto-Ativador R(5), -4(2), 2(2)	9

Twb	XACb0030	524	1-524	11	XAC0915 CHP	XAC0915	Fase -1(1)	1
					XAC2810 CHP	XAC2810	-10(1), 5(1)	2
					yajC	XAC2512	99(1)	1
					CheR	XAC3730	247(1), 250(1)	2
					purL	XAC3549	627(1)	1
					KfrA	XACa0042	16(1)	1
					RadC	XAC3915	-28(1)	1
					XAC1623	XAC1623	1(1)	1
					parC	XAC1441	347(1)	1
HP	XACb0034	140	1-140	9	XAC3601	XAC3601	Fase +2 (2)	2
					XAC3375 CHP	XAC3375	201(1)	1
					TolC	XAC3463	(6)	6
VirB11- plasmídeo	XACb0037	340	1-340	38	TolC	XAC3463	(38)	38
VirB4 plasmídeo	XACb0045	877	1-877	25	FliH	XAC1952	1(3), -2(8), 19(5), 30(1), 37(2), -2(3)	22
					accC	XAC0530	345(1)	1
					pobB	XAC0362	14(1)	1
					XAC1918 (Presa VirD4-cromossomo)	XAC1918	306(1)	1
CHP	XACb0049	124	1-124	7	XACa0008 HP	XACa0008	12(1)	1
					XAC2860 HP	XAC2860	Fase -1(1)	1
					BtuB (receptor TonB- dependente)	XAC3560	209(1)	1
					XAC1290	XAC1290	72(1)	1
					TolC	XAC3463	(3)	3
HP	XACb0048	118	1-118	7	TolC	XAC3463	(7)	7
HP	XACb0018	107	1-107		NR		NR	
HP	XACb0020	150	1-150				Auto-Ativador	
CHP	XACb0022	165	1-165		NR		NR	

CHP	XACb0023	111	1-111		Auto-Ativador
TraK (HP)	XACb0024	148	1-148	NR	NR
HP	XACb0026	57	1-57		Auto-Ativador
HP	XACb0027	90	1-90		Auto-Ativador
HP	XACb0028	151	1-151		Auto-Ativador
HP	XACb0029	124	1-124		Auto-Ativador
TwC	XACb0031	991	1-991	NR	NR
CHP	XACb0033	72	1-72		Auto-Ativador
HP -proteína hipotética CHP - proteína hipotética conservada XCHP - proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i> R - Produto de recombinação entre os plasmídeos pOBD-isca e pOAD-biblioteca NR - Não realizado					

Tabela 17- Interações envolvendo o TFSS-cromossomo

Isca	Gene	a.a.	Domínio 2H (a.a.)	Clones seq.	Presas	Gene	Códon inicial (número de vezes)/Observações	Total
VirD4 cromossomo	XAC2623	557	1-557	68	XAC0151 HP	XAC0151	11(1), 22(1), 25(1), 40(1), 120(1)	5
						XAC1918	120(1), 222(1), 229(1), 306(1), 360(1), 369(1), 470(2)	8
					XAC3266 HP	XAC3266	301(1), 318(1), 320(2), 416(1), 514(1), 658(1), 663(1), 680(1)	9
						XAC2609	30(2), 90(1), 127(1), 144(1), 170(1), 187(1), 314(1)	8
	XAC0096				XCHP	XAC0096	329(1), 330(1), 355(1), 402(1), 463(1), 478(1), 500(1)	7
						XAC0574	10(1), 75(1), 80(1), 82(1), 88(1), 96(1), 134(1)	7
						XAC1165	1(1), 6(1)	2
						XAC0466	40(1), 124(1), 158(1), 195(1), 227(1), 280(1), 308(1), 352(1), 400(2), 436(1), 456(1), 471(1)	13
	XAC3634				CHP	XAC3634	1(1), 13(1), 18(1), 20(1), 29(1), 38(1)	6
						XAC4264	94(1)	1
XAC0466 (Presas do VirD4)	XAC0466	589	450-589	47	VirD4-cromossomo	XAC0323	30(1)	1
						XAC2885	82(1)	1
						XAC2623	136(1)	1
	XAC0466	589	1-589		TolC		(46)	46
							Auto-ativador	
	25384 (presa do VirD4)	431	1-431	11	XAC2610 HP cromossomo)	XAC2610	19(1), 28(1), 39(1), 41(1), 49(2), 51(4), 76(1)	11

XAC2609 (presa do VirD4)	XAC2609	431	300-431	34	ToIC	XAC3463	(33)	33
					nodW	XAC2150	131(1)	1
HP Vir Crom (presa da XAC2609)	XAC2610	267	1-267	9	FliK	XAC1949	255(2), 265(3), 266(1)	6
					XAC2609	XAC2609	9(1)	1
					VirB11 cromossomo	XAC2618	-14(1)	1
					bfeA	XAC3207	596 (1)	1
XCHP (Presa do VirD4)	XAC0096	646	1-646				Auto-ativador	
Presa do VirD4	XAC0096	646	1-500				Auto-ativador	
XCHP Vir Cromossomo	XAC2622	139	1-139	7	VirB9-Cromossomo	XAC2620	19(4), 101(1), 130(1)	6
					fyuA receptor TonB- dependente	XAC3489	266(1)	1
VirB11 cromossomo	XAC2618	346	1-346	63	VirB11 (sistema de secreção IV)	XAC2618	R(54), 11(1)	55
					ToIC (sistema de secreção I)	XAC3463	(3)	3
					yhiX	XAC2488	343(2), 348(1)	3
					poxF	XAC4066	80(1)	1
					XAC3517 CHP	XAC3517	651(1)	1

HP	XAC2613	275	50-275	23	*região do cromossomo sem anotação	---	Nucleotídeos iniciais (sentido decrescente) 4270760(1), 4270910(2), 4270936(1), 4270940(2), 4270994(2), 4271093(1), 4271095(1), 4271438(1), 4271444(5)	16
					XAC0437	XAC0437	3(1), 37(1)	2
					XAC2261	XAC2261	193(1), 207(1)	2
					PhaE (PHA sintase)	XAC2047	102(1)	1
					CHP	XAC2913	63(1)	1
					moxJ	XAC0649	258(1)	1
XCHP	XAC2611	164	1-164	8	RadC	XAC3269	35(1), 36(1), 77(3)	5
					RadC	XAC3915	7(1), 13(1)	2
					RadC	XAC2179	3(1)	1
CHP	XAC2605	147	1-147	23	ToIC	XAC3463	(23)	23
XCHP	XAC2606	163	1-163	9	tetA	XAC4295	-36(1), -34(4)	5
					XAC1455	XAC1455	58(1), 63(1)	2
					XAC2305	XAC2305	6(1)	1
					XAC3982 CHP	XAC3982	12(1)	1
VirB4- Cromossomo	XAC2614	817	1-817	33	ToIC (Sistema de secreção I)	XAC3463	(33)	33

VirB1- Cromossomo	XAC2617	280	1-280	8	XAC2810 CHP	XAC2810	7(1)	1
					btuB receptor TonB- dependente	XAC3444	-3(1)	1
					yapH	XAC2151	103(1)	1
					iroN receptor TonB- dependente	XAC25839	263(1)	1
					fecA receptor TonB- dependente	XAC1023	151(1)	1
					yapH	XAC4113	1881(1)	1
					XAC4122 CHP	XAC4122	158(1)	1
					cirA receptor TonB- dependente	XAC4256	183(1)	1

HP- proteína hipotética

CHP- proteína hipotética conservada

XCHP- proteína hipotética conservada em *Xanthomonas*

R- Produto de recombinação entre os plasmídeos pOBD-isca e pOBD-biblioteca

NR- Não realizado

Tabela 18- Interações envolvendo iscas do Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf

Isca	Gene	a.a.	Domínio 2H (a.a)	Clones seq.	Presas	Gene	Códon inicial (número de vezes)/Observações	Total
RpfF	XAC1879	289	1-289	95	RpfC	XAC1878	Fase +1(44): 210(2), 247(5), 351(2), 353(2), 384(7), 394(4), 401(2), 402(7), 423(3), 442(8), 443(2)	44
							Fase +2(33): 226(1), 244(1), 265(1), 276(3), 316(2), 315(4), 317(2), 346(1), 349(4), 351(3), 352(1), 353(4), 357(3), 436(3) Fase +3(8): 375(2), 392(3), 402(3)	33
RpfC	XAC1878	725	170-725	83	RpfF	XAC1879	14(2)	16 2
							-80(2), -65(1), -60(1), -44(4), -31(2), -25(2), -7(2), -2(4), 1(4), 7(4), 8(2), 13(1), 14(1), 16(1), 18(1)	32
CmfA (presa de RpfC)	XAC0330	557	1-557	6	YapH	XAC1877	-11(1), 6(1), 26(4)	6
						XAC0330	19(1), 22(1), 165(2)	4
						XAC3463	(23)	23
						XAC3455	361(2), 362(2), 363(1)	5
						XAC1293	108(2)	2
						XAC0330	-25(2)	2
						XAC1136	-25(4)	4
						XAC1282	216(1)	1
						XAC0207	156(2)	2
						XAC0076	133(1)	1
						XAC3254	549(1)	1
						XAC2151	1274(3)	3
						XAC3515	1215(1)	1
						XAC4113	70(1), 1926(1)	2

similar ao receptor CmfA	XAC4102	449	1-449	NR	NR		
Histidina quinase (similar a RpfC)	XAC3673	578	198-578	35	SahH/AhcY	XAC0804	-33(1)
					PthA	PthA	Fase +2(1), 331(1)
					XAC4193	XAC4193	476(1)
					FecA (receptor TonB-dependente)	XAC1023	108(2), 255(1)
					WapA	XAC1866	Fase +2(1)
					XAC2198	XAC2198	26(3)
					XAC3473	XAC3473	451(1), 476(1)
					XAC3959 CHP	XAC3959	Fase +3(1)
					XadA	XAC3548	171(1)
					XAC2743	XAC2743	36(1)
					KfrA	XACa0042	Fase +3(1)
					FlgL (flagelar)	XAC1976	Fase +2(1)
					PilS	XAC3237	262(1)
					XAC0291	XAC0291	18(1)
					TolC (sistema de secreção I)	XAC3463	(15)
RpfG (presa de RpfC)	XAC1877	378	1-378				Auto-Ativador
Sistema de dois Componentes (similar a RpfG)	XAC2493	328	1-328	31	Sistema de dois componentes/sensor	XAC2492	639(4)
					TolC	XAC3463	(27)
XAC2492 (Presença de XAC2493)	XAC2492	1364	643-1364		NR		NR

RpfE 2349	XAC1864	306	1-306	14	PilJ IronN (receptor TonB-dependente)	XAC3099 XAC0706	172(1), 243(1), 289(2), 321(2), 349(2) 382(1)	8 1
					OrfT	XAC3229	52(1)	1
					FecA	XAC1023	66(1)	1
					OrfT	XACb0010	68(1)	1
					oprN	XAC1485	270(1)	1
					nucH	XAC0447	379(1)	1
PilJ (presa de RpfE)	XAC3099	678	1-678	NR	NR			
RpfD	XAC1874	304	126-304	NR	NR			
RpfB	XAC1880	560	1-560	NR	NR			
XCHP	XAC1881	170	53-170	13	ToIC (sistema de secreção I)	XAC3463	(13)	13
RpfA	XAC1882	922	1-922	7	PthA XAC4330 XCHP XAC2860 HP CheR XAC4301 CHP XAC2010	PthA XAC4330 XAC2860 XAC3730 XAC4301 XAC2010	908(1) 102(1) Fase -1(1) 514(1) 85(1) 234(1), 327(1)	1 1 1 1 1 2
XAC1883 CHP	XAC1883	82	1-82	3	Sensor histidina quinase EcfR	XAC3683 XAC4128	359(1) Fase +3(2)	1 2

CHP	XAC1884	136	1-136	13	XAC2228 ShIB	XAC2228	69(1), 77(3), 80(1), 87(1), 95(1), 102(1)	8
					CycW	XAC4114	390(1)	1
					CobS	XAC2324	99(1)	1
					CyoD	XAC3184	65(1)	1
					AppA	XAC1261	1(1)	1
						XAC25831	227(1)	1
RpfN	XAC2504	378	1-378	5	YapH	XAC2151	1482(1), 1554(1)	2
					FlbD/ffrC	XAC4326	342(1)	1
					BtuU receptor	XAC3560	333(1)	1
					TonB dependente			
					XAC0540	XAC0540	522(1)	1

HP- proteína hipotética

CHP- proteína hipotética conservada

XCHP- proteína hipotética conservada em *Xanthomonas*

R- Produto de recombinação entre os plasmídeos pOBD-isca e pOAD-biblioteca

NR- Não realizado

Tabela 19- Interações de Proteínas Incluídas na Categoria “Outros”

Isca	Gene	a.a.	Domínio 2H (a.a)	Clones seq.	Presas	Gene	Códon inicial (número de vezes)/Observações	Total
HrpX-like	XAC1994	710	93-710	41	Modulador Sigma-54 XAC1497 HP XAC4301 CHP XAC1748 XAC1816	XAC2973	(25)	25
						XAC1497	(5)	5
						XAC4301	(6)	6
						XAC1748	(2)	2
						XAC1816	(3)	3
Modulador Sigma-54 (Presa da HrpX-like	XAC2973	105	1-105	70	XAC1036 CHP	XAC1036	(8)	8
CHP (presa de HrpX-like)	XAC4301	489	1-489	11	HrpX-like TolC	XAC1994	(6)	6
						XAC3463	(56)	56
XAC1497 (presa de HrpX-like)	XAC1497	300	1-300	NR	NR	XAC4300	-53(2), -31(1), 1(1), 5(1), 12(1), 19(1), 55(2)	9
						XAC3515	845(1)	1
						XAC1815	3349(1)	1
XivA	XAC1495	134	1-134	16	XivA TolC	XAC1495	-40(4), -12(1), -11(2), -10(2), 4(1), 15(1)	14
						XAC3463	16(3) (2)	2
VppA	XACb0060	86	1-86	4	VapC XAC1383 HP	XACb0059	3(3)	3
						XAC1383	83(1)	1
VapC (presa de VppA)	XACb0059	133	1-133	NR	NR		NR	

XAC1670	XAC1670	124	1-124	14	Sistema de dois componentes/sensor Histidina quinase/regulador de resposta	XAC1282 XAC1669	61(2), 63(1), 65(2), 79(2) -3(2), -1(2)	7 4
					Sistema de dois componentes	XAC1279	130(1), 149(1)	2
					ToIC	XAC3463	(1)	1
VirP 4380	XAC0569	207	1-207	18	XAC2247 CHP XAC0026 CHP	XAC2247 XAC0026 XAC2492	(5) (8) (5)	5 8 5
					Sistema de dois componentes/sensor			
VirS	XAC0536	336	1-336	29	CHP XAC2515 XAC0147 XAC3327 CHP metalopeptidase PtpR PheS XAC0107 HP ToIC (sistema de secreção I)	XAC2009 XAC2515 XAC0147 XAC3327 XAC0115 XAC3712 XAC1136 XAC2590 XAC0107 XAC3463	-124(1), -97(1), 1(1), 30(1) 1(1) 258(2), 288 (2) 37(1), 38(1), 48(1) 609(1) 325(1) 1(1) 61(1) (1) (12)	4 1 4 3 1 1 1 1 1 12
XAC2956	XAC2956	233	1-233	21	Bga β-galactosidase ToIC	XAC1308 XAC3463	445(2), 478(2), 492(1) (16)	5 16
AcbB	XAC1368	457	351-457	17	XAC1343 XCHP XAC2312 CHP YadF DNAX WapA	XAC1343 XAC2312 XAC1604 XAC1109 XAC1305	-30(2), -22(6), -20(1), -17(1), -13(3) 390(1) 20(1) 1(1) 729(1)	13 1 1 1 1
AcbB	XAC2411	420	1-420		NR		NR	

CHP	XAC2573	153	1-153	34	MoaE RbsK XAC5180 CHP TolC	XAC1100 XAC2753 XAC5180 XAC3463	-42(1), -26(1), -13(1), -10(3), 1(3), 7(1) -18(1), -16(1), 1(1), 8(1) 305(2), 380(1) (17)	10 4 3 17
XCHP (presa da AcvB XAC1368)	XAC1343	70	-51 a 70 (ATG alternati- vo no códon -51)	14	XAC1343	XAC1343	R(8)	8
ApaG	XAC0862	127	1-127	57	XAC1344 CHP GlmS TolC WapA TolC XAC1080 XAC2958 CHP PthA XAC3245	XAC1344 XAC0714 XAC3463	69(1) Fase +3(1) (4)	1 1 4
PthX	XAC1242	170	1-104	24	TolC	XAC3463	(24)	24
MreB	XAC0656	348	1-348	7	XAC1641 XCHP XAC4213	XAC1641 XAC4213	-10(3), -7(1), 2(2) 1(1)	6 1
HP	XACb0058	87	1-87	9	PlaS TolC	XAC2884 XAC3463	85(1) (8)	1 8
HP	XACb0057	395	1-395		NR		NR	

HP	XACb0070	79	1-79	Auto-Ativador
AtsE	XAC0108	132	1-132	NR
HP	XAC3146	152	1-152	NR

HP- proteína hipotética
 CHP- proteína hipotética conservada
 XCHP- proteína hipotética conservada em *Xanthomonas*
 R- Produto de recombinação entre os plasmídeos pOBD-isca e pOAD-biblioteca
 NR- Não realizado

BIBLIOTECA
 INSTITUTO DE QUÍMICA
 Universidade de São Paulo

DISCUSSÃO

O sistema duplo-híbrido tem sido utilizado para identificar interações proteína-proteína em complexos protéicos como aquelas envolvidas na via de resposta a feromônios de levedura (Evangelista *et al.*, 1996), RNA polimerase III de levedura (Flores *et al.*, 1999) e determinação de vias de interação de proteínas quinases envolvidas na regulação do ciclo celular de *Drosophila* (Harper *et al.*, 1993). Essa mesma metodologia também foi aplicada para elucidar interações envolvidas no desenvolvimento vulval de *C. elegans* (Walhout *et al.*, 2000), para a triagem de bibliotecas de oligopeptídeos (Yang *et al.*, 1995) e identificação de interações em escala genômica (Uetz *et al.*, 2000; Bartel *et al.*, 1996) entre outros.

Neste trabalho, nós identificamos vias de interações envolvendo proteínas codificadas por conjuntos de genes com conhecidos ou possíveis papéis na patogenicidade de *Xac*, outros membros do gênero *Xanthomonas* e/ou outros fitopatógenos:

- i) Subunidades, substratos e reguladores do TTSS com funções na patogenicidade de *Xac* e em outras espécies do gênero *Xanthomonas* (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Galan e Cloomer, 1999; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Plano *et al.*, 2001; Buttner and Bonas, 2002; Francis *et al.*, 2002; He, 1998);
- ii) Os produtos codificados pelo *locus vir* do cromossomo o qual pode representar um TFSS funcional com substratos ainda não identificados;
- iii) Os produtos codificados pelo *locus vir* do plasmídeo pXAC64 que podem representar um TFSS funcional envolvido em processos de conjugação dos plasmídeos pXAC64 e pXAC33 onde são encontrados os quatro genes *pthA* (*pthA1*, *pthA2*, *pthA3*, *pthA4*) de *Xac*;
- iv) Os produtos codificados pelo *locus rpf* ("Regulators of Pathogenicity Factors") envolvidos em sistemas de "Quorum

Sensing” com conhecido papel na patogenicidade de *Xanthomonas* e outros patógenos (Slater *et al*, 2000; Crossman *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004).

Os experimentos apresentados neste trabalho mostram uma forte evidência da especificidade das interações proteína-proteína envolvendo componentes com comprovada ou possível importância para o processo de patogenicidade de *Xac*. Muitos dos genes analisados não haviam sido caracterizados funcionalmente e suas interações são de grande importância para a compreensão e regulação dos mecanismos utilizados pelos fitopatógenos.

Antes de entrarmos em uma discussão detalhada sobre os resultados, devemos destacar alguns pontos que dizem respeito a questões gerais da relevância dos resultados obtidos neste tipo de ensaio. Assim, destacamos que a forma como os ensaios de duplo-híbrido foram conduzidos juntamente com a natureza dos resultados obtidos aumentam a nossa confiança quanto à credibilidade do experimento pelas seguintes razões:

- i) Os ensaios foram feitos utilizando componentes dos TTSS, TFSS e Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf como iscas na triagem de uma biblioteca de presas derivadas do DNA genômico total de *Xac*. Logo, qualquer interação observada entre dois componentes de um mesmo sistema apresenta poucas chances de ser uma interação inespecífica. Por exemplo, se considerarmos que o *locus hrp* é constituído por 25 genes, isso representa apenas 0,5%, aproximadamente, dos quase 5.000 genes de *Xac*;
- ii) Boa parte das interações foram confirmadas em triagens reversas (onde a presa foi posteriormente utilizada como isca) contra a mesma biblioteca genômica;

- iii) Apesar da biblioteca incluir DNA plasmidial e cromossômico, nós não observamos nenhuma interação entre componentes do TFSS codificado pelo cromossomo e TFSS codificado pelo plasmídeo pXAC64. Nossos resultados mostraram apenas interações entre componentes codificados pelo mesmo *locus vir*,
- iv) O grande número de clones independentes contendo diferentes segmentos das mesmas presas quando determinadas iscas foram utilizadas na triagem.

Nesta discussão nós iremos analisar os resultados obtidos no contexto do que é conhecido a respeito dos mecanismos dos sistemas TTSS, TFSS-cromossomo, TFSS-plasmídeo e “Quorum-Sensing”. Os resultados obtidos na análise destes sistemas revelaram detalhes sobre o seu funcionamento que levam a novas hipóteses que estão sendo ou serão testadas através de ensaios específicos incluindo interações *in vitro* e estudo de mutantes.

Interações do TTSS

Interações envolvendo HrpG

HrpG é uma proteína reguladora de transcrição que funciona no início da cascata de regulação do *locus hrp*, controlando a expressão de *hrpA* em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*hrcC* em *Xac*). HrpG também controla a expressão do gene que codifica HrpX, o principal ativador da transcrição dos demais *hrp* (*locus hrpB-F*) e outros genes que contém, em grande parte, a sequência PIP-BOX em sua região promotora incluindo as proteínas denominadas Xop (“*Xanthomonas* outter protein”) em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Buttner e Bonas, 2002). Os 263 resíduos da HrpG de *Xac*, a qual possui similaridade com a família OmpR de reguladores de reposta de membros de sistemas de dois componentes, contém na porção N-terminal um domínio receptor regulador de resposta (RR) e um motivo de ligação ao DNA, encontrado em fatores de transcrição, na porção C-terminal (Wengelnik *et al.*, 1999). Enquanto o mecanismo pelo qual a HrpG de *Xanthomonas* é regulada permanece desconhecido, seu homólogo em *Ralstonia solanacearum* mostra ser regulado

(ao nível de transcrição) através do contato celular que resulta em uma cascata de transdução de sinais envolvendo PrhA (um provável receptor associado à membrana externa), PrhR (proteína associada à membrana interna com possível participação na transdução de sinais), PrhI (um fator sigma-ECF) e PrhJ (um regulador de transcrição da família LuxR/UhpA) (Fig. 10 Introdução) (Adon *et al.*, 2000, Brito *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2002). PrhA, R e I são homólogos às proteínas FecA, R e I as quais interagem com vias de sinalização que controlam genes envolvidos no transporte de citrato férrico em *E. coli* (Enz *et al.*, 2000; Stiefel *et al.*, 2001). Mas, apesar disso, não foram encontradas ou propostas interações diretas envolvendo HrpG de *Ralstonia* ou *Xanthomonas*. Além disso, não foram propostos sistemas de dois componentes com domínios sensor, histidina quinase e fosfoceptor associados à membrana que pudessem levar à fosforilação do domínio RR da HrpG. Logo, apesar da importância da HrpG no controle da expressão do TTSS, a regulação de sua atividade através de modificações covalentes (fosforilação do ácido aspártico do domínio RR) permanece desconhecida. A identificação de proteínas que interagem com HrpG potencialmente poderia fornecer subsídios para a compreensão do funcionamento deste sistema.

Quando utilizamos HrpG como isca na triagem das bibliotecas de *Xac* através do sistema duplo-híbrido, obtivemos presas derivadas de quatro proteínas (Tabela 15 Resultados). 48 eventos encontrados consistiram de interações homotrópicas envolvendo HrpG. A análise do sequenciamento mostrou que essas interações eram derivadas de eventos de recombinação envolvendo os plasmídeos pOBD-HrpG e pOAD-biblioteca. Associações HrpG-HrpG não haviam sido descritas antes, mas o fato das proteínas da família OmpR serem conhecidas por ligarem a DNA como dímeros (Harrison-McMonagle *et al.*, 1999; Kenny, 2002) podem ser uma indicação da consistência dos resultados obtidos. A segunda presa, encontrada 36 vezes quando utilizamos HrpG como isca, é derivada da proteína hipotética XAC0095. Homólogos a esta proteína são três proteínas hipotéticas encontradas no genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (da Silva *et al.*, 2002). XAC0095 é uma proteína de 73 a.a. (Fig. 29A) e todos os clones encontrados codificam pelo menos os resíduos 4-73 (Tabela 15 Resultados). A interação HrpG-XAC0095 foi confirmada quando utilizamos

XAC0095 como isca: 3 interações de 71 observadas foram derivadas da proteína HrpG, sendo duas destas a partir do resíduo 1 e uma a partir do resíduo 6 (Tabela 15, Resultados). Um fator pode contribuir para o baixo número de interações encontradas com HrpG: 1) o domínio RR da HrpG é encontrado na porção N-terminal da proteína (resíduos 11-130) e pode ser requerido para a interação com XAC0095; 2) a presença de um códon de terminação TAA na mesma fase de leitura e imediatamente anterior ao códon de iniciação do gene da HrpG (TAA ATG) impossibilita que os clones da biblioteca que contém insertos que iniciam antes do códon de iniciação de HrpG sejam capazes de expressar essa proteína. Se as interações observadas entre HrpG-HrpG (acima) também exigirem a porção N-terminal, é compreensível termos encontrado um elevado número de recombinações entre os clones positivos.

Cinco presas de HrpG foram derivadas da proteína XAC1568, uma proteína hipotética conservada de 157 resíduos. Todos os segmentos destas presas iniciavam no resíduo 64 ou 65, indicando que a porção C-terminal desta proteína é requerida para a interação com HrpG. Curiosamente, o domínio N-terminal contém alguns resíduos de cisteína conservados e possui homologia com um grande número de proteínas de diferentes bactérias, enquanto a porção C-terminal somente é encontrada em *Xcc*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Caulobacter crescentus*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nenhum destes homólogos a XAC1568 possuem função conhecida.

Finalmente, HrpG mostrou uma única interação com a proteína XAC3683, a qual contém as características necessárias para ser um possível componente de ativação no modelo atualmente aceito para a ativação da HrpG. Os domínios encontrados na XAC3683, a qual possui 631 aminoácidos, incluem motivos PAS (resíduos 110-172) e PAC (resíduos 182-224) no N-terminal (frequentemente associados com domínios sensores de sinais) (Ponting e Aravind, 1997), motivo fosfoceptor (resíduos 251-317) e histidina quinase na região central (resíduos 363-475), além de domínio regulador de resposta (RR) na porção C-terminal (resíduos 505-631) (Pao e Saier, 1995; Stock *et al.*, 2000). O fragmento detectado como positivo inicia no resíduo 96

localizado antes do primeiro domínio PAS (resíduos 110-172). Apesar de termos encontrado apenas uma interação envolvendo a proteína XAC3683, a partir do resíduo 96, esta foi a primeira vez que detectou-se uma associação envolvendo HrpG e uma proteína histidina quinase. XAC3683 é, portanto, um candidato para ser um possível sensor de sinais externos que poderiam modular a atividade da HrpG através da fosforilação do seu domínio RR. A figura 28 apresenta de forma simplificada esta possível via de transdução de sinais. A significância desta interação deve ser futuramente confirmada por ensaios bioquímicos e interações *in vitro*.

Figura 28- Via de transdução de sinais, ativada por estímulos externos não-caracterizados, para a ativação da HrpG. A proteína XAC3683, uma das presas da HrpG, pode ser o componente sensor que leva à ativação deste sistema através de processos de auto-fosforilação e fosfo-transferência para HrpG. Os domínios PAC, PAS, Histidina quinase fosfoceptor, Histidina quinase-ATPase e RR da XAC3683 juntamente com dos domínios RR e de ligação ao DNA da HrpG são mostrados.

Como os resultados utilizando HrpG como isca mostraram que por volta de 40% das presas são derivadas da proteína XAC0095, nós decidimos utilizar esta proteína como isca na triagem da biblioteca. A presa utilizada contém uma extensão de 12 a.a. na porção N-terminal que começa a partir de um códon de

iniciação alternativo localizado na posição -36 do gene da XAC0095. A grande maioria das presas encontradas mostrou interações homotrópicas envolvendo todos os resíduos da XAC0095. Quase todas estas presas eram fruto de recombinação, sendo que apenas uma era proveniente da biblioteca contendo todos os resíduos da XAC0095 juntamente com uma extensão de 23 a.a. na porção N-terminal.

XAC0095 também interagiu uma vez com uma proteína codificada por uma região do genoma de *Xac* que não havia sido previamente anotada e que possui 45% de identidade com a própria XAC0095. Esta proteína, que foi chamada de XAC0095b (Alegria *et al.*, 2004 em anexo), contém seu gene correspondente localizado entre os nucleotídeos 1331630 e 1331896 do cromossomo de *Xac* e codifica uma proteína hipotética de 88 resíduos (Fig 29A). Curiosamente, análises seguintes mostraram que a sequência gênica de *Xac* contém um terceiro gene (também não anotado por da Silva *et al.*, 2002) que codifica uma proteína hipotética (XAC0095c) que possui 35% de identidade com XAC0095 e seu gene está localizado entre os nucleotídeos 5030863-5031120 e codifica 85 aminoácidos. A análise de ambas, *Xac* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), mostra que cada uma contém três proteínas homólogas a XAC0095. O alinhamento destas proteínas hipotéticas de *Xac* e *Xcc* está mostrado na figura 29A. Algumas características destas proteínas podem ser destacadas: 1) Existem duas regiões particularmente conservadas de 29 resíduos no N-terminal e 23 na C-terminal (indicados pelas linhas horizontais da figura 29A). Nestas duas regiões, 19 resíduos são conservados em todos os seis homólogos; 2) Cada bloco N-terminal é flanqueado por resíduos de prolina. Os blocos C-terminais também aparecem flanqueados por prolinas e podem refletir características estruturais específicas destas proteínas; 3) todos os seis homólogos possuem um resíduo conservado de cisteína na porção C-terminal; 4) Ambas as regiões contém hepta repetições (*abcdefg*) onde as posições *a* e *d* são, na maioria das vezes, ocupadas por um resíduo hidrofóbico (Fig. 29B). De fato, o bloco C-terminal contém duas hepta repetições superpostas. Como este tipo de repetição está relacionada com interações laterais hidrofóbicas entre α -hélices amfipáticas em proteínas “coiled-coil” e oligomerização (Lupas, 1996; Fig. 29B), isto pode explicar o fato de encontrarmos interações homotrópicas envolvendo XAC0095.

Figura 29 A) Alinhamento da estrutura primária da proteína XAC0095 com seus homólogos em *Xac* (XAC0095b e XAC0095c) e em *X. campestris* pv. *campestris* (XCC0067, XCC1070 e XCC2900). A figura mostra regiões contendo aminoácidos idênticos (*), altamente conservados (:) e menos conservados (.). O alinhamento mostra a presença de duas regiões mais conservadas indicadas pelas linhas horizontais finas. A presença de duas regiões contendo repetições heptapeptídicas (*abcdefg*) é indicada pelas linhas horizontais grossas. B) Representação da associação de um complexo formado por moléculas que possuem repetições heptapeptídicas. As posições *a* e *d* desta estrutura são compostas por resíduos hidrofóbicos. A presença de resíduos hidrofóbicos nessas regiões permite que, através de interações hidrofóbicas entre α -hélices anfipáticas, ocorra a formação da estrutura "coiled-coil" (Lupas, 1996).

XAC0095 também mostrou interações com 6 presas derivadas da proteína XAC0524 (Tabela 15, Resultados). Essa proteína não caracterizada de 125 resíduos contém na porção N-terminal (resíduos de 8-60) um domínio hélice-volta-hélice potencialmente capaz de associar-se a DNA o qual é

encontrado em reguladores de transcrição que incluem proteínas repressoras de bacteriófagos Cro, C1 e C2. A porção C-terminal contém similaridade com um baixo número de proteínas no banco de dados, entre elas a proteína DicA (30% de identidade) de *E. coli*, derivada do profago críptico Qin (Bejar *et al.*, 1986). O domínio mínimo identificado na interação com XAC0095 envolvem os resíduos 63-125 da XAC0524, o qual não contém o possível domínio de interação com DNA.

As funções da proteína XAC0095 e seus homólogos não são conhecidas até este momento, mas as suas interações com HrpG e XAC0524 sugerem que XAC0095 pode estar envolvida no controle da expressão gênica, particularmente na expressão dos genes *hrp*. Considerando que a HrpG apresenta domínios receptor/regulador de resposta e de ligação a DNA (Fig. 28), sua interação com XAC0095 pode servir para modular sua função na ativação dos genes *hrpX* e *hrcC/hrpA* ou modular a ativação de HrpG pelo receptor/sensor de sinais associado à membrana. XAC0095 poderia modular a estabilidade da proteína HrpG ou modular processos de fosforilação e desfosforilação do ácido aspártico específico localizado no domínio RR (Asp60 na HrpG de *Xac*). A fosforilação do domínio RR em resíduos Asp é um mecanismo conhecido para modular a função dos sistemas de dois componentes associados à transdução de sinais (Pao *et al.*, 1995; Stock *et al.*, 2000).

Interações Envolvendo HrpB2 e HrcU

HrpB2 é um dos substratos e componente extracelular do pilus do TTSS: em *X. campestris* pv. *vesicatoria* ela é secretada para o exterior da célula bacteriana e é necessária para a secreção de outras proteínas através deste sistema (Rossier *et al.*, 2000). Homólogos a HrpB2 são encontrados apenas em *Xanthomonas* spp e *Ralstonia solanacearum* e são essenciais para a patogenicidade de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em tomate e pimenta (Rossier *et al.*, 2000). Quando HrpB2 foi utilizada como isca para a triagem da biblioteca de *Xac*, parte das interações observadas foram derivadas da proteína HrcU, um componente conservado do TTSS associado à membrana interna (Tabela 15 Resultados). HrcU de *Xac* possui 357 aminoácidos. A análise da sequência utilizando o programa PSORT (Nakai e Kanehisa, 1991) revela a possibilidade

de cinco domínios transmembrânicos entre os resíduos 29-45, 85-101, 138-154, 155-171 e 185-201, todos na porção N-terminal da proteína. Uma estrutura similar é encontrada em outras proteínas que possuem homologia a HrcU (Fig. 30B; Lavander *et al.*, 2002).

As quatro presas que codificavam fragmentos de HrcU iniciavam entre os resíduos 222 e 256, localizados na região citoplasmática da HrcU, e todos terminavam após o códon de terminação. Comparando os componentes do TTSS e do complexo flagelar, vemos que HrcU é similar ao componente FlhB o qual no sistema flagelar também está associado à membrana interna (Fig. 30A e B). FlhB possui uma importante função no processo de montagem do flagelo, selecionando os componentes que devem ser secretados para, primeiramente, ocorrer a confecção da estrutura basal para que, posteriormente, possa ocorrer a secreção das flagelinas as quais serão os principais componentes da porção filamentosa do complexo flagelar (Fig. 30A) (Williams *et al.*, 1996). FliK, uma proteína que é secretada pelo complexo flagelar durante a formação do gancho, de uma forma ainda não totalmente esclarecida está envolvida na determinação do momento exato em que a estrutura de gancho atingiu o tamanho correto. Essa informação é transmitida para o sistema de secreção que altera o seu substrato: de componentes do gancho para flagelinas, as quais irão compor o flagelo filamentoso (Lavander *et al.*, 2002). Mutantes de *Salmonella typhimurium* em *fliK* formam uma estrutura denominada “poly hook”, onde o gancho do complexo flagelar apresenta um tamanho anormal (Fig. 30A). Além de FliK, FlhB atua na mudança de substrato do sistema de secreção. A porção C-terminal citoplasmática da FlhB apresenta um sítio de clivagem proteolítica (Fig. 30B) que, quando o gancho atinge seu tamanho correto, é clivada e, conseqüentemente, ocorre a troca de substrato do sistema iniciando assim a secreção de flagelinas (Lavander *et al.*, 2002).

YscU, uma das proteínas associadas à membrana interna do TTSS de *Yersinia spp* e homólogo a FlhB e HrcU, é um componente fundamental para a secreção dos fatores Yops (“*Yersinia* outer proteins”) (Lavander *et al.*, 2002). Mutantes de *Yersinia* em *yscU* não são capazes de secretar Yops, enquanto a superexpressão da porção C-terminal, correspondente ao fragmento após o sítio de clivagem da YscU, resulta em um aumento da secreção das Yops (Lavander *et al.*, 2002). Desta forma, assim como no sistema flagelar, o TTSS

também possui mecanismos de controle da secreção dos substratos e YscU/HrcU apresenta importante função na seleção destes substratos.

Ambas, FlhB e YscU, contém um sítio de clivagem proteolítica específico e conservado composto pela sequência Asn-Pro-Thr-His. Esta sequência também é encontrada na HrcU de *Xac* na posição 264-267. De fato, todas as presas derivadas de HrcU que mostraram interações com HrpB2 continham apenas a porção C-terminal desta proteína, iniciando em uma região próxima ao possível sítio proteolítico. O fato de HrcU estar possivelmente envolvida no controle da secreção de substratos específicos para montagem do TTSS e o fato desta interagir com a proteína HrpB2, o qual possivelmente é um componente da estrutura extracelular do TTSS (Fig. 30C) (Buttner e Bonas, 2002), sugere um possível mecanismo de regulação deste sistema que ainda não havia sido proposto (Fig. 34).

Interações Envolvendo HrpB1, HrpD6 e HrpW.

Quando utilizamos a proteína HrpB1 como isca na triagem, nossos resultados mostraram interações com presas diferentes. Dez de vinte e nove presas seqüenciadas foram derivadas da proteína HrpD6, um dos componentes do TTSS cujo gene também está localizado no *locus hrp*. Ambas HrpB1 e HrpD6 são pequenas (151 e 80 resíduos, respectivamente), citoplasmáticas e seus homólogos em *X. campestris* pv. *vesicatoria* são essenciais para a patogenicidade (Rossier *et al.*, 2000). Contudo, essas proteínas não possuem homólogos no sistema flagelar ou no TTSS de outros patógenos de plantas e animais e suas funções ainda não foram descritas na literatura. Homólogos de HrpD6 são encontrados apenas em *Xanthomonas spp* enquanto homólogos a HrpB1 são encontrados em *Xanthomonas spp*, *Ralstonia solanacearum* e *Burkholderia pseudomallei*. A interação observada entre essas duas proteínas, identificada aqui pela primeira vez, pode indicar que elas atuam juntas no TTSS e, além disso, podem apresentar uma função comum. Infelizmente, quando HrpD6 foi utilizada como presa, conseguimos identificar apenas interações com TolC (falso-positivo).

Figura 30- A) Representação dos componentes do complexo flagelar. A seta vermelha mostra a proteína FlhB que possui similaridade aos componentes YscU e HrcU do TTSS (para uma relação das homologias encontradas entre os componentes flagelares e o TTSS vide Tabela 2, Introdução). A figura também mostra uma representação do efeito observado em mutantes de *Salmonella typhimurium* em *fliK* que resultam em um gancho com estrutura anormal. B) Representação da estrutura da proteína YscU de *Yersinia spp* a qual possui similaridade com HrcU de *Xac*. A figura mostra a porção N-terminal com domínios associados à membrana interna e uma porção C-terminal citoplasmática. O sítio de clivagem proteolítica – NPTH–, localizado entre os resíduos 269-272 é mostrado (Lavander *et al.*, 2002). Na HrcU de *Xac* o sítio NPTH corresponde aos resíduos 264-267. C) TTSS baseado na similaridade com os componentes do complexo flagelar, representado pelas proteínas Hrc. Os componentes extracelulares do TTSS não possuem similaridade com o sistema flagelar. A figura destaca a presença da HrpB2 como um possível componente extracelular além da HrcU como um componente citoplasmático (Buttner e Bonas, 2002).

Duas outras presas da HrpB1 foram derivadas da proteína HrpW. Apesar do gene *hrpW* não estar localizado no *locus hrp* de *Xac*, em *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) ele faz parte desse *locus* em uma posição adjacente ao gene *hpaB*. Em *Pseudomonas syringae* e *Erwinia amylovora*, a proteína HrpW possui atividade de pectato liase e sua secreção através do TTSS resulta em HR em plantas não-hospedeiras (Charkowski *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003). O domínio harpina de HrpW de *P. syringae* possui sete repetições ricas em glicina localizadas entre os resíduos 119 e 188. Segundo Charkowski *et al.* (1998), proteínas que contêm domínios harpina são capazes de induzir resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco. Contudo, HrpW de *Xac* e *Xcc*, as quais possuem 46% de identidade e 59% de similaridade entre si, não possuem o domínio harpina completo e contêm poucas repetições ricas em glicinas (Fig. 31). O domínio pectato liase de *Xac* e *Xcc* aparentemente estão completos mas apresentam baixa identidade (28%) com os domínios correspondentes encontrados em *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* e *Bacillus spp* (Fig. 31). A interação envolvendo HrpB1, uma proteína citoplasmática, e HrpW, cujos homólogos são secretados pelo TTSS, podem indicar que HrpB1 e HrpD6 estejam envolvidos no direcionamento de proteínas para a secreção através do TTSS. Além destas interações envolvendo HrpB1, nós também identificamos como presa a proteína XAC2047, a qual possui 407 resíduos que contêm 40% de similaridade com uma proteína indicada como possível polihidroxialcanoato sintase (PhaE) de *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. A possível relevância biológica desta interação pode ser reforçada pelos resultados obtidos com a proteína HrpB4 (mostrada abaixo).

Interações envolvendo HrpB4

HrpB4 é uma proteína de 209 resíduos altamente conservada (>90% identidade) em *Xanthomonas spp*. Homólogos a esta proteína quando analisamos outros fitopatógenos são encontrados apenas em *Ralstonia solanacearum* (HrpH). Ensaios de fracionamento celular mostraram que HrpB4 estava presente na fração citoplasmática solúvel de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Rossier *et al.*, 2000), apesar da análise de sua estrutura primária mostrar a presença de uma possível hélice transmembrânica (Buttner e Bonas,

```

pectato_liase_Bacillus -----
HrpW_Xac -----
HrpW_Xcc -----
HrpW_Pto_Pseudomonas -----MSIGITPRPQQTTTPLDPSALSGKSPQNTFGEQNTQQ 38
HrpW_Erwinia MSILTLNNNTSSSPGLFQSGGDNGLGHNANSALGQQPIDRQTIEQMAQL 50

pectato_liase_Bacillus -----
HrpW_Xac -----
HrpW_Xcc -----
HrpW_Pto_Pseudomonas AIDPSALLFGSDTQKDVNFGTDPSTVQNPQDASKPNDSQSNIAKLISALI 88
HrpW_Erwinia LAELLLKSLSPQSGNAATGAGGNDQTTGVGNAGGLNGRKGTAGTTFQSDS 100

pectato_liase_Bacillus -----
HrpW_Xac -----
HrpW_Xcc -----M 1
HrpW_Pto_Pseudomonas MSLLQMLTNSNKKQ-----DTNQEQPDSQAPFQNNGGGLTFPSADS 128
HrpW_Erwinia QNMLSEMGNNGLDQAITPDGQGGGQIGDNFLKAMKLKIARMMDGQSDQF 150

pectato_liase_Bacillus -----
HrpW_Xac IMSELLQRLIQTFQFPQNTSQYDWNPSFSHGTSNQGEGNEHGRRNRGRG 51
HrpW_Xcc SDGQPPPTNPNTPPMPFSRPPCSTNPGGQHSGSTGDGSGGNGGNHNRGNG 66
HrpW_Pto_Pseudomonas GGGGTPDATGGGGGDTFSATGGGGGDTPTATGGGGSGGGTPTATGGGSG 178
HrpW_Erwinia GQPGTGNNASASGTSSSGGSPFNDLSGGKAPSGNSPSGNYSPVSTFSPPS 200

pectato_liase_Bacillus -----MMKRLAG-----TVILSGLLVCFGQALPEKAL 28
HrpW_Xac GDN---FLATTFETSDHSDK-----SAHSTVTGS-GPVGSGRTINV 88
HrpW_Xcc GTCG--TGADHRASPTNPGQ-----AVRCPDGFQAPLPPGKVVTA 105
HrpW_Pto_Pseudomonas GTPATATGGGEGGVTPQITPQLAN-----PNRTSGTGSVSDTAGSTEQAG 222
HrpW_Erwinia TPTSPTSPLDFPSSPTKAAGGSTPVTDFDPVGSAGIGAGNSVAFTSAGA 250
|--- Domínio Pectate liase →

pectato_liase_Bacillus AAEVVHKTIIVVEKQTYDGGKRLIAGPELGDGSQREDQKPIFKVEDGAT 78
HrpW_Xac -----NSPIVVHKGEVFDGHNHLYVGGSGIGDGSQSEHQQPMFVVEQGGT 133
HrpW_Xcc PPGLQNKTIIVVHKGEVFDGKGQTYIGGPGLDGGSQNEHQQLFVVEDGGS 155
HrpW_Pto_Pseudomonas KINVVKDTIKVGAGEVFDGHGATFTADKSMGNGDQGENQKMFELAEAGAT 272
HrpW_Erwinia NQTVLHDTITVKAGQVFDGKGQFTAGSELGDGGQSENQKPLFILEDGAS 300
... * * : : : * : . . : : * * * : : : : : : : : :

pectato_liase_Bacillus LKNVVLGAPAADGVHTYGN----ASINNVWEDVGEDALTVKSEGS---- 120
HrpW_Xac LQNVMSG--GGDGIHLLGD----ATLKNVHNLNVSEDAMTIDGPGNREHD 178
HrpW_Xcc LCNVNMKG--GGDGVHFMGS----GMVNCVNDVSEDAVTIDGQGNREHD 200
HrpW_Pto_Pseudomonas LKNVNLGENEVDGIHVKAQNAQEVTDINVHAQNVGEDLITVKEGG---- 318
HrpW_Erwinia LKNVTMGDDGADGIHLYGD----AKIDNLHVTNVGEDAITVKPNSAG--- 343
* * * : * * * : . . : * : : * * * : : : . .

pectato_liase_Bacillus -----VTINGGSARLAADKIFQINKASTFTVKNTADQG 154
HrpW_Xac SRIAGTPASGLFARPKIEILDSSFDNASDKVIQDNQAADVLLRNVSNGA 228
HrpW_Xcc ARIAGCRP-EVSGRPKVDIINCTFKNAADKVVQDNGAADVVMGSGCTVNGA 249
HrpW_Pto_Pseudomonas -----AAVTNLNINKSSAKGADDKVVQLNANTHLKIDNFKADDF 357
HrpW_Erwinia -----KKSHVEITNSSFEHASDKILQLNADTNLSVDNVKAKDF 381
: * : : * * : * : : : : : : : :

pectato_liase_Bacillus GKFTIRQLGGST-FKAVVNI DNCTITNMKEAIFRTDSSTSSVTMINTRYSK 203
HrpW_Xac GKVFRTNGGHTDIDSHVTVEDSTLKGIEAVFRTDAPGAHVS LHGVRRDA 278
HrpW_Xcc GKVFRTNGGHADIDTHLQVENCDFQQVKEAVFRTDAPGATVKLANLKTD 299
HrpW_Pto_Pseudomonas GTMVRTNGGKQFDDMSIELNGIEANHGKFALVKSDDDLKLATGNIAMTD 407
HrpW_Erwinia GTFVRTNGGQQ--GNWDLNLSHISAEDGKFSFVKSDSEGLNVNTSDISLGD 430
*...* * * : : : * : : : : : : : :

pectato_liase_Bacillus VGQKWIQVGHVTERNNHEF----- 222
HrpW_Xac PHQVEALSPSQADGARSVSRKEYTG 303
HrpW_Xcc PDEVIAPSAFQATGATRI GHQPYSG 324
HrpW_Pto_Pseudomonas VKHAYDKTQASTQHTL----- 424
HrpW_Erwinia VENHYKVMSANLKVAE----- 447

```

Figura 31- Alinhamento entre as proteínas HrpW/Pectato liase de *Bacillus spp*, *Xac*, *Xcc*, *Pseudomonas syringae* e *Erwinia amylovora*. A figura mostra que a região harpina rica em glicina (sublinhado; Charkowski *et al.*, 1998) de *P. syringae* não apresenta similaridade com as proteínas HrpW de *Xac* e *Xcc*. O domínio pectato liase das proteínas de *Xac* e *Xcc* apresenta identidade de 28% com as HrpW mostradas.

2002b). Quando usada como isca na triagem da biblioteca, HrpB4 mostrou, na maioria das vezes, interações com a proteína XAC2054. XAC2054 é uma proteína de 1127 aminoácidos que apresenta características de um membro de um sistema de dois componentes composto por domínios sensor/histidina quinase/regulador de resposta. Esta proteína possui na sua porção N-terminal o domínios GAF (resíduos 160-198), freqüentemente associados com histidinas quinases sensoras de sinais, dois domínios PAS (312-350; 438-500), dois domínios PAC (384-426; 510-552) e além de um domínio fosfoceptor na região central (HisKA 746-812; HATPase 859-971) e regulador de resposta na porção C-terminal (1001-1124). Um segundo domínio GAF também está presente entre os resíduos 574-717. O domínio mínimo observado foi a partir do resíduo 313 de 1127 totais, o que inclui todos os domínios da proteína com exceção do GAF N-terminal. Curiosamente o gene XAC2054 está localizado a 3,6kB do gene XAC2047 cujo produto foi observado na interação com HrpB1, como descrito acima. Estas interações nos levam a refletir sobre uma integração das vias e funções das proteínas HrpB4, HrpB1 e HrpD6 de *Xac*.

Interações envolvendo HrcN

HrcN é um componente conservado em todos os TTSS, localizado no citoplasma e, possivelmente, associado a componentes da membrana interna do TTSS (Plano *et al.*, 2001). HrcN possui grande similaridade com FliI, essencial para o sistema flagelar bacteriano (Williams *et al.*, 1996). FliI é uma ATPase associada à membrana interna que, possivelmente, fornece a energia para que ocorra a secreção dos substratos durante a montagem do sistema flagelar. O componente FliH liga-se a FliI e controla negativamente a sua atividade (Minamino e MacNab, 2000). HrcN também apresenta similaridade com InvC, Spa47 (MxiB), HrpB6 e YscN presentes no TTSS de *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas campestris* e *Yersinia pestis*, respectivamente (Blocker *et al.*, 2003; Plano *et al.*, 2001). Todas essas proteínas são homólogas às subunidades catalíticas α e β da ATPase F_1 . Quando utilizada como isca, HrcN mostrou interações homotrópicas com domínio mínimo a partir do resíduo 30. Neste caso, não foram observadas interações provenientes de recombinação. Esta interação pode refletir a formação de um anel hexamérico de HrcN similar às estruturas encontradas em ATPases F_0F_1 e como

recentemente proposto para Spa47, homólogo a HrcN, de *Shigella* (Blocker *et al.*, 2003). No caso do Spa47, Blocker *et al.*, (2003) sugerem que ela é associada a outros componentes do sistema de secreção de uma maneira que se encaixa dentro da cavidade citossólica do complexo agulha de *Shigella* (Fig. 32).

Figura 32- Modelo proposto por Blocker *et al.* (2003) a partir de modelagem molecular para a localização e estrutura da proteína Spa47 de *Shigella* a qual, assim como HrcN, é uma ATPase do TTSS que possui similaridade com ATPasesF₀F₁. A proteína Spa47, representada em verde, formaria um anel hexamérico dentro da cavidade citossólica do complexo agulha, representado em roxo.

Interações Envolvendo HpaA, HpaB e HrcV

HpaA e HpaB são duas proteínas codificadas por genes localizados no locus *hrp* de *Xanthomonas* (Fig. 8, Introdução). Homólogos de HpaA são encontrados somente em *Xanthomonas spp* e *Ralstonia solanacearum*. Huguet *et al.* (1998) mostraram que HpaA é uma proteína secretada por *X. campestris* pv. *vesicatoria* e que a mutação no seu gene correspondente é capaz de eliminar os sintomas da doença em plantas de tomate e pimenta sem afetar o desenvolvimento de HR em não-hospedeiros. A sequência primária da HpaA contém dois domínios de localização nuclear (NLS) N e C-terminais que são capazes de, uma vez no hospedeiro, direcionar esta proteína para o núcleo (Huguet *et al.* 1998). HpaA de *Xac* possui dois domínios NLS que iniciam nos resíduos 51 e 241. A função e a atividade da HpaA no núcleo do hospedeiro não são conhecidas.

Pouco também é conhecido a respeito da HpaB, exceto que esta proteína é possivelmente associada à membrana devido à presença de uma putativa hélice transmembrânica na porção central. A análise de mutantes em HpaB mostrou uma redução na patogenicidade em *X. axonopodis* pv. *glycines* (Kim *et al*, 2003). Homólogos a HpaB foram encontrados em *Xanthomonas* spp, *Ralstonia solanacearum* e *Burkholderia pseudomallei*.

Ambas, HpaA e HpaB foram utilizadas na triagem da biblioteca. HpaA (271 a.a.), quando usada como isca, resultou em 100% das suas presas derivadas da proteína HpaB, como mostrado na tabela 15 (Resultados). A análise destes clones positivos mostrou que a interação HpaA-HpaB requer a proteína HpaB a partir do resíduo 6, indicando que a porção N-terminal desta proteína é requerida para a interação com HpaA. Para aprofundar os estudos dessas interações, utilizamos a HpaB como isca na triagem da biblioteca. Como esta proteína contém uma possível região transmembrana na porção central (resíduos 92-108), utilizamos duas construções diferentes: uma codificando a proteína inteira (156 aminoácidos) e outra utilizando apenas a região N-terminal, antecedendo o possível domínio associado à membrana, compreendida entre os resíduos 1-92. As presas obtidas quando utilizamos apenas a porção N-terminal foram aleatórias e sem relação entre si. A proteína HpaB inteira, quando usada na triagem, resultou em uma interação altamente específica com duas únicas presas: HpaA (37 vezes) e HrcV (12 vezes). O menor fragmento de HpaA encontrado como presa iniciou no resíduo 126, indicando que a região C-terminal da HpaA é necessária para que haja a interação com HpaB.

As outras presas encontradas na interação com HpaB foram derivadas da proteína HrcV, a qual possui 645 aminoácidos. O domínio mínimo encontrado nesta interação foi a partir do resíduo 360, o qual corresponde justamente à porção C-terminal desta proteína que é, possivelmente, citoplasmática. A porção N-terminal da HrcV contém pelo menos 6 regiões associadas à membrana compreendidas entre os resíduos 24-40, 43-59, 108-124, 201-217, 243-259 e 300-316 (PSORT-Nakai e Kanehisa, 1991). A utilização de Hrcv como isca mostrou interações homotrópicas derivadas de eventos de recombinação e uma das presas derivadas da proteína HpaB, confirmando a interação anteriormente observada. Acredita-se que HrcV esteja

localizada na membrana interna. Hueck (1998) descreve que HrcV pode ser um dos principais componentes do poro do TTSS localizado na membrana interna. O fato de encontrarmos interações homotrópicas HrcV-HrcV e a presença de vários domínios transmembranais na porção N-terminal podem sugerir que esta proteína é capaz de formar um poro na membrana interna e possuir um fragmento citoplasmático capaz de interagir com HpaB. Analisando todas as interações obtidas, podemos propor que HpaA, HpaB e o domínio citoplasmático da HrcV podem associar-se de forma que HpaA seja direcionada para a secreção via HpaB através de seu encaminhamento para HrcV, o possível poro do TTSS (Fig. 34). Estes resultados indicam que HpaB pode ser uma possível chaperone de HpaA que permite a secreção ou interação entre as proteínas HpaA-HrcV, possibilitando sua secreção.

Muitas das interações encontradas quando os componentes do TTSS foram utilizados na triagem envolveram proteínas cujos genes estão localizados na mesma região: o *locus hrp* o qual codifica as proteínas deste sistema. A figura 33 apresenta um resumo das interações observadas entre os produtos do *locus hrp*. Nós identificamos interações envolvendo proteínas não caracterizadas ou envolvidas no processo de patogenicidade de *Xac*, incluindo HrpG, HpaA, HpaB, HrcV, HrpB1, HrpD6, HrpD2, HrcU, HrpW, HrpB4 e HrcN. As interações proteína-proteína mostradas aqui possuem clara implicação para a compreensão dos mecanismos moleculares da patogenicidade de *Xac* relacionados com o TTSS. A figura 33 mostra as interações observadas por nós em função da localização gênica dos componentes do TTSS no *locus hrp*. A figura 34 apresenta as interações observadas e sua integração com modelos do TTSS previamente descritos (Alfano e Collmer, 2001; Blocker *et al.*, 2003; Buttner e Bonas, 2002; Harrison-McMonagle *et al.*, 1999; Hueck, 1998; Rossier *et al.*, 2000). É importante destacar que agora nós temos subsídios que podem relacionar substratos do TTSS (HpaA, HrpB2 e HrpW) e componentes específicos conservados da maquinaria de secreção (HrcV e HrcU). No caso da HpaA e HrcV, sua associação parece ser mediada pela HpaB. Esses resultados são o ponto de partida para estudos mais aprofundados que pretendem investigar: a) interações moleculares importantes para a secreção da HpaA incluindo aquelas envolvendo HpaB e HrcV; b) a possibilidade de ocorrer clivagem proteolítica na porção citoplasmática da HrcU durante a

montagem e regulação do TTSS, em particular na secreção de HrpB2, como descrito para *Yersinia spp* (Lavander *et al.*, 2002); c) especificidade das interações entre HrpB1, HrpD6 e a pectato liase HrpW, além de uma possível integração com HrpB4 e as proteínas hipotéticas conservadas XAC2047 e XAC2054. Finalmente, nosso principal interesse está relacionado com estudos específicos de interação entre HrpG e seus reguladores, incluindo os membros da nova família XAC0095, fatores de transcrição e sistemas de dois componentes/sensores histidina quinase.

Figura 33- Interações observadas entre proteínas do TTSS cujos genes estão localizados no *locus hrp*. A figura esquematiza o mapa gênico do *locus hrp* e as interações envolvendo HpaA-HpaB, HpaB-HpaA, HpaB-HrcV, HrcV-HpaB, HrcV-HrcV, HrpD6-HrpB1, HrpB2-HrcU e HrcN-HrcN.

Figura 34- Resumo das interações observadas neste trabalho e sua integração com modelos funcionais previamente propostos (Alfano e Collmer, 2001; Blocker *et al.*, 2003; Buttner e Bonas, 2002; Harrison-McMonagle *et al.*, 1999; Hueck, 1998; Rossier *et al.*, 2000). Proteínas cujas interações foram encontradas neste trabalho estão representadas como formas preenchidas, enquanto formas sem preenchimento representam proteínas não estudadas neste trabalho. HpaA pode ser secretada pela ação da HpaB a qual interage com um dos componentes do poro, a HrcV. A secreção da HrpB2 pode ser mediada pela interação com a porção C-terminal da HrcU. Interações entre HrpB1, HrpD6, HrpW e XAC2047 além da interação envolvendo HrpB4 e XAC2054 também estão representadas. A possível formação de um anel hexamérico da ATPase HrcN. Vide texto para detalhes. MI: membrana interna; ME: membrana externa; A: HpaA; B: HpaB; B1: HrpB1; B2, HrpB2; B4, HrpB4; B5, HrpB5; B7, HrpB7; C (HrcC); D5, HrpD5; D6, HrpD6; E, HrpE; J, HrcJ; N, HrcN; Q, HrcQ; R, HrcR; S, HrcS; T, HrcT; U, proteína HrcU completa; U*, produto da clivagem proteolítica da HrcU; V, HrcV; 2054 (XAC2054) e 2047(XAC2047).

Interações do TFSS-plasmídeo

Como mostrado na Introdução, *Xac* possui dois TFSS, ambos constituído pelos genes *vir*, localizados no cromossomo e no plasmídeo pXAC64. O *locus vir* do plasmídeo de *Xac*, quando analisado em termos da ordem dos genes e produtos codificados por eles, possui maior similaridade (40-60%) com o sistema *mpf* do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida* (Fig. 13 Introdução) (Greated *et al.*, 2002). Adjacente ao *locus vir* encontramos em *Xac* genes que codificam proteínas hipotéticas (XACb0024 e XACb0025) juntamente com *trwB* (XACb0030) e *trwC* (XACb0031) cujos produtos possuem similaridade com as proteínas TraD, TraA, TraB e TraC, respectivamente, do plasmídeo pWW0 (Fig. 13 Introdução). Além disso, a similaridade das proteínas hipotéticas codificadas pelos genes XAC00024 e XACb0025 permite que elas passem a ser chamadas de *traK* (similaridade com TraK do plasmídeo Inc-P1 de *P. aeruginosa*) e *trwA* (similaridade com TrwA de *E. coli*), respectivamente.

As proteínas Tra/Trw possuem um papel fundamental no mecanismo de conjugação. TrwA de *E. coli* é uma proteína tetramérica capaz de ligar-se especificamente à região *oriT* do plasmídeo R388 de *E. coli* (Moncalian *et al.* 1997). Acredita-se que a ligação desta proteína à *oriT* permite a repressão da transcrição dos genes *tra/trw* localizados próximos a *oriT* e também proporcione um maior relaxamento do DNA nessa região para que TrwC possa clivá-la (Moncalian *et al.* 1997). TrwA de *Xac* possui 25% de identidade com a mesma proteína de *E. coli*.

TrwB é uma proteína integral de membrana que contém um domínio citoplasmático com atividade ATPásica e possui similaridade com a proteína VirD4 do TFSS. O homólogo mais estudado é a TrwB codificada pelo plasmídeo conjugativo R388 de *E. coli*. TrwB é conhecida como a proteína acopladora do processo de conjugação devido a capacidade de ligar-se a complexos núcleo-proteicos (TrwC-DNA) e encaminhá-los para a secreção/conjugação (Hormaeche *et al.*, 2004). O complexo TrwB é formado pela associação de seis monômeros equivalentes associados de forma que resulta em uma estrutura quaternária quase esférica (Fig. 35) e fortemente similar a ATPase-F1 (Gomis-Ruth *et al.*, 2001). TrwB de *Xac* possui 52% de similaridade com TrwB de *E. coli*.

Figura 35- Características estruturais da proteína TrwB (homóloga a VirD4 do TFSS) do sistema de conjugação bacteriana de *E. coli*. A figura mostra uma visão superior da organização do complexo hexamérico da TrwB (Gomis-Ruth *et al.*, 2001).

TrwC é uma enzima bifuncional codificada pelo plasmídeo R388 de *E. coli* e é capaz de clivar uma das fitas do DNA em um sítio específico do plasmídeo, a região *oriT* (origem de transferência). Além dessa atividade, TrwC também atua como uma helicase e relaxase de moléculas de DNA (Gomis-Ruth *et al.*, 2001) TrwC de *Xac* possui por volta de 50% de similaridade com TrwC de *E. coli*.

TraK é uma proteína que altera a topologia da região *oriT* e facilita a formação do relaxossomo através da ação da proteína TrwC (Ziegelein *et al.*, 1992). TraK de *Xac* (XACb0024) contém 30% de similaridade TraK de *E. coli*.

A figura 36 apresenta um modelo do processo de conjugação bacteriana (Llosa *et al.*, 2002). Neste modelo, TrwC liga-se a *oriT* como um dímero, cliva uma das fitas de DNA e o dímero se dissocia. Uma das moléculas de TrwC permanece ligada covalentemente ao terminal 5' da fita simples de DNA (ssDNA). Esse complexo TrwC-ssDNA interage com a proteína TrwB do canal de conjugação do TFSS e é secretado. O outro monômero de TrwC permanece ligado à outra fita de DNA relaxando-a para que todo o plasmídeo possa ser conjugado. O ssDNA é, desta forma, bombeado de uma maneira contínua através do canal de conjugação pela ação da ATPase TrwB.

Figura 36- Modelo do mecanismo bacteriano de processamento e transporte de DNA na conjugação. A) Após a ligação do dímero TrwC à *oriT* e posterior clivagem do DNA, uma das moléculas permanece covalentemente ligada à extremidade 5' da fita simples de DNA. Este complexo interage com a ATPase TrwB do TFSS. B) TrwB bombeia o complexo TrwC-DNA para o interior do TFSS onde o complexo nucleoproteico será conjugado/secretado (Llosa *et al.*, 2002).

Análises de interações proteína-proteína podem revelar as redes de interações e o papel destas proteínas em *Xac*.

Greated *et al.*, (2002) mostraram que o sistema *tra/mpf* encontrado no plasmídeo pWW0 de *P. putida*, o qual possui maior similaridade com TFSS-plasmídeo de *Xac*, é funcional. Isso foi possível através da clonagem da região *oriT* do pWW0 em um vetor (pUC18) que não é transferido por conjugação devido a ausência de uma sequência *oriT*. Ensaios de conjugação mostraram que, apesar de não codificar o seu próprio sistema de conjugação, o plasmídeo pUC-oriT pode ser mobilizado e conjugado pelo sistema codificado pelos genes *tra* e *mpf* do pWW0.

No genoma de *Xac* publicado por da Silva *et al.* (2002) apenas o plasmídeo pXAC64 apresenta os *loci vir* e *tra/trw*. No entanto, uma análise mais detalhada dos plasmídeos pXAC64 e pXAC33 mostrou que existe uma região de 8591bp idêntica entre os dois plasmídeos (Fig. 37). Este segmento idêntico inclui a região *oriT* e o *locus tra/trw* (Fig. 37). Como este segmento inclui a possível região *oriT*, no caso deste sistema de conjugação/secreção de *Xac* ser funcional, existe a possibilidade dos dois plasmídeos serem mobilizados. Neste caso, a mobilização do pXAC33 será dependente da presença do pXAC64 enquanto o pXAC64 será automobilizável.

Figura 37- Mapas gênicos dos plasmídeos pXAC64 e pXAC33 de Xac. A figura mostra uma região que contém 8591pb com seqüências idênticas presentes nos dois plasmídeos: nucleotídeos 16869 - 25459 de pXAC64 correspondem aos nucleotídeos 14059-5469 do pXAC33. Nós confirmamos as estruturas dos dois plasmídeos nestas regiões através de amplificação das junções por PCR com primers específicos (resultados não mostrados). Notar que uma pequena região deste trecho (genes XACb0026 e XACb0027 do pXAC64 e genes XACa0009,XACa0010, XACa0011 e XACa0012 do pXAC33) apesar de idêntica foi anotada de forma diferente (da Silva *et al.*2002). A figura mostra que a possível região *oriT* está presente nos dois plasmídeos. A seqüência da *oriT* nos dois plasmídeos de Xac é quase idêntica a *oriT* do pWW0, apresentando diferença em apenas uma base mostrada em vermelho no quadro com as seqüências.

Os resultados de interações proteína-proteína que obtivemos utilizando o sistema duplo-híbrido quando o TFSS do plasmídeo foi analisado mostrou várias interações ainda não descritas entre componentes já caracterizados assim como interações envolvendo proteínas hipotéticas cujos genes encontram-se no mesmo *locus*.

Interações Homotrópicas Envolvendo TrwA (XACb0025)

A proteína TrwA (XACb0025), cujo gene correspondente encontra-se no *locus trw* do plasmídeo pXAC64, contém 131 aminoácidos e apresenta 56% de similaridade com TraA do pWW0 de *Pseudomonas putida* (Greated *et al.*, 2002), 90% com a TraA do plasmídeo pXcB de *Xanthomonas citri* e 29% de identidade com a proteína TrwA do plasmídeo R388 de *E. coli*. A proteína TrwA de *E. coli* foi expressa e caracterizada por Moncalian *et al.* (1997). Este grupo mostrou que se trata de uma proteína tetramérica de 53kDa capaz de ligar-se especificamente à região *oriT* do plasmídeo R388 de *E. coli*. Baseados no resultado da ligação de TrwA à região *oriT*, foram propostos dois mecanismos de ação desta proteína em processos de conjugação: 1) a ligação de TrwA à região *oriT* resulta na repressão da transcrição do operon *trwABC*, cujos produtos são fundamentais para o processo de conjugação. Esta hipótese foi confirmada pelo fato que a superexpressão da TrwA resulta em células com baixos níveis de conjugação; 2) A ligação de TrwA permite um maior grau de relaxamento do plasmídeo e, desta forma, permite que TrwC possa clivar o DNA a ser conjugado. O fato da proteína XACb0025 de *Xac* possuir similaridade com TrwA de *E. coli*, a qual apresenta-se como um complexo tetramérico, é condizente com o resultado obtido na triagem da biblioteca com a isca XACb0025. Neste experimento, todas as presas encontradas (9) foram derivadas da própria XACb0025 através de eventos de recombinação e fragmentos da biblioteca.

Nota-se a presença de 4 genes inseridos entre *trwA* e *trwB* (Fig. 13, Introdução). A função das proteínas codificadas por estes genes é completamente desconhecida. Nossas tentativas de investigá-las na triagem da biblioteca através de duplo-híbrido foram impossibilitadas devido ao fato que todos esses genes codificam proteínas que auto-ativam os genes repórteres da levedura PJ694-a.

Interações Envolvendo as Proteínas Hipotéticas XACb0032 e XACb0033

Entre *trwC* e *virB1* do pXAC64 existem quatro genes cujos produtos são proteínas hipotéticas (Fig.13, Introdução e Fig. 41). Essas proteínas não apresentam similaridade com as proteínas correspondentes do pWW0. XACb0032, de 107 resíduos, possui homólogos encontrados em *Azotobacter vinelandii*, *Chlorobium tepidum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Brucella melitensis*, *Rickettsia conorii*, *Nitrosomonas europaea*, *Rhodospirillum rubrum* e *Xylella fastidiosa* enquanto XACb0033 (72 resíduos) possui similaridade com proteínas hipotéticas encontradas em *Nitrosomonas*, *Rhodospirillum* e *Xylella fastidiosa*. Não foram encontradas proteínas similares a XACb0034 e XACb0035 nos bancos de dados públicos.

O uso de XACb0032 como isca na triagem da biblioteca mostrou uma interação específica com XACb0033 (domínio mínimo a partir do resíduo 18), cujo gene encontra-se exatamente ao lado do gene da XACb0032. Infelizmente, quando XACb0033 foi utilizada como isca esta proteína mostrou ser um auto-ativador dos repórteres da levedura PJ694-a. A interação observada, pelo fato de tratar-se de duas proteínas hipotéticas, não revela muito sobre suas funções ou participações no TFSS, mas trata-se de mais um exemplo de associação de proteínas cujos genes encontram-se em um mesmo *locus*.

Interações Homotrópicas Envolvendo XACb0035

O gene XACb0035 está localizado ao lado do *virB1* no pXAC64 (Fig. 13, Introdução) e codifica uma proteína de 139 aminoácidos. Como mencionado acima, não foram encontradas proteínas similares a XACb0035. Quando esta proteína foi utilizada como isca, todas as interações observadas foram derivadas da própria XACb0035, sendo que parte destas foram resultado de fenômenos de recombinação entre os plasmídeos (pOBD-XACb0035 e pOAD-Biblioteca) e parte provenientes de fragmentos da biblioteca que codificavam essa proteína com domínio mínimo a partir do resíduo 3. Esses resultados mostram que a porção N-terminal é requerida para que haja esta interação homotrópica de XACb0035. Experimentos futuros podem elucidar e caracterizar a estrutura e função desta proteína.

Interações Envolvendo VirB1 e VirB9 do Plasmídeo

VirB1 é uma proteína que possui duas localizações celulares: espaço periplasmático e, após clivagem de um peptídeo sinal localizado na região N-terminal, VirB1 é exportada para a região extracelular (Baron *et al.*, 1997). Esta proteína tem similaridade com transglicosidases líticas e, possivelmente, é capaz de formar poros na camada peptidoglicana para facilitar a montagem do TFSS (Thorstenson *et al.*, 1993; Groisman, 2001). A utilização desta proteína como isca na triagem da biblioteca mostrou interações envolvendo uma única presa: VirB9 do plasmídeo. VirB9 é um dos principais componentes periplasmático do TFSS provavelmente associada com a membrana externa formando o poro da região periplasmática (Christie e Vogel, 2000). Em *A. tumefaciens*, interações envolvendo VirB9 e as subunidades VirB7, VirB8 e VirB10 já haviam sido detectadas previamente através de diversos ensaios, incluindo duplo-híbrido (Das *et al.*, 1997; Das e Xei, 2000; Ward *et al.*, 2002). A interação envolvendo VirB1 e VirB9 de *A. tumefaciens* também foi recentemente reportada por Ward *et al.* (2002). Segundo Ward *et al.* (2002) foram encontradas interações entre VirB1 e VirB4, VirB8, VirB9, VirB10 e VirB11. Este trabalho consistiu na realização de ensaios de duplo-híbrido utilizando somente peptídeos das proteínas Vir do TFSS de *A. tumefaciens*. Essa metodologia pode gerar um número maior de falso-positivos do que a metodologia empregada por nós já que o “universo” analisado por Ward *et al.* (2002) estava restrito às iscas e presas derivadas somente das proteínas Vir (isto é, falso-positivos são derivados do mesmo sistema e, desta forma, fica difícil distinguí-los de interações positivas).

Nossos resultados mostraram uma interação específica envolvendo VirB1 e VirB9 do TFSS do plasmídeo pXAC64. A interação entre as proteínas VirB1 e VirB9 é consistente com suas funções e localizações no TFSS. Através de sua atividade transglicosilásica, VirB1 auxilia na formação de poros na camada peptidoglicana que irão permitir a formação do *pilus* de secreção (Groisman, 2001; Burns, 2003, Christie e Vogel, 2000; Ward *et al.*, 2002). A proteína VirB9 é o principal componente da região periplasmática formando o canal por onde serão secretados os componentes extracelulares do TFSS e, posteriormente, os substratos desse sistema. Desta forma é possível supor que na montagem do complexo, a proteína VirB1 possa associar-se a VirB9.

Interações Envolvendo XACb0042 e VirB6

A anotação original do genoma de *Xac* (da Silva *et al.*, 2002) não identificou nenhum gene correspondente a *virB7* no plasmídeo pXAC64. Boa parte dos TFSS descritos requer um componente VirB7 para que seja funcional (Anderson *et al.*, 1996). VirB7 é uma lipoproteína a qual contém um peptídeo sinal que, após a clivagem, permite que ocorra a ancoragem desta proteína na membrana externa através de um resíduo de cisteína (Baron *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 1996). A análise do *locus vir* do plasmídeo revela que existem dois gene que codificam proteínas hipotéticas (XACb0042 e XACb0043) entre os genes *virB6* e *virB5*, a posição onde normalmente é encontrado o gene *virB7* em *locus vir* de outras bactérias. XACb0042 e XACb0043 exibem similaridade apenas com proteínas hipotéticas do plasmídeo pWW0 de *P. putida* (ORFs 199 e 200, respectivamente; Greated *et al.*, 2002) e com duas proteínas hipotéticas codificadas pelo plasmídeo pXcB de *Xanthomonas citri* (Brunings e Gabriel, 2003). Enquanto a função destas duas proteínas em *Xanthomonas citri* e *Pseudomonas putida* permanecem desconhecidas, Brunings e Gabriel (2003) sugeriram que a proteína codificada pelo gene XACb0043 não é uma proteína VirB7 funcional devido a uma mutação na região do lipobox (veja adiante).

Hapfelmeier *et al.* (2000) mostraram que a proteína VirB6 é requerida para a estabilização de VirB5 e VirB3 além de possibilitar a formação do homodímero VirB7 em *A. tumefaciens*. Jakubowski *et al.* (2003) mostraram a interação direta das proteínas VirB6, VirB7 e VirB9 independentemente da presença de outras proteínas Vir. Quando nós utilizamos a proteína XACb0042 como isca, encontramos uma interação altamente específica com a proteína VirB6 do plasmídeo, cujo gene (XACb0041) encontra-se ao lado do XACb0042. Esta interação requer a porção N-terminal de VirB6, já que todas as presas encontradas iniciavam antes do resíduo 8. A proteína VirB6 do plasmídeo de *Xac* mostra 47% de identidade com MpfE do pWW0. VirB6 e seus homólogos possuem domínios transmembrana (Ward *et al.*, 1988) e podem formar parte do canal do TFSS na membrana citoplasmática e/ou mediar a formação dos complexos VirB7 e VirB9 requeridos para a formação do canal de secreção e da estrutura extracelular do TFSS (Fig. 12, Introdução) (Christie, 2001; Jakubowski *et al.*, 2003).

A proteína XACb0042 não possui similaridade com outros homólogos de VirB7 previamente descritos. Contudo, as proteínas VirB7 de diferentes organismos mostram apenas uma baixa similaridade entre si (Brunings e Gabriel, 2003). Sem dados adicionais, nós não podemos propor que esta proteína atue como VirB7 no sistema de *Xac*, mas a interação efetiva apresentada com VirB6 pode indicar um novo componente do TFSS codificado por este plasmídeo que poderia desempenhar um papel que compensa a ausência de uma VirB7 tradicional.

Interações Envolvendo XACb0043 e um Gene Adjacente ao *locus tra/trw* do pXAC64

O gene XACb0043 codifica uma proteína hipotética que apresenta similaridade com o produto da ORF200 do plasmídeo pWW0 (Greated *et al.*, 2002) e com a proteína anotada como VirB7 do plasmídeo pXcB de *X. citri* pv. *aurantifolli* linhagem B69 (Brunings *et al.*, 2001). Como mencionado acima, apenas uma pequena similaridade é observada entre as proteínas VirB7 encontradas em diferentes organismos e, tem sido proposto que esta proteína de *Xac* pode ser um homólogo de VirB7 devido a presença de um lipobox (identificado pela sequência [LV][ASTV][ASG][C]) o qual caracteriza algumas lipoproteínas, além de um segundo resíduo de cisteína conservado localizado de 9 a 12 resíduos adiante do lipobox (Fig. 38). Brunings e Gabriel (2002) sugerem que a proteína XACb0043, apesar de apresentar similaridade com VirB7 do *X. citri* pv. *aurantifolli*, não representa uma proteína funcional. Essa afirmação é baseada no fato que a região do lipobox da proteína XACb0043 contém uma substituição que resulta na presença de uma isoleucina ao invés de leucina (Fig. 38). Segundo Brunings e Gabriel (2003), esta modificação pode resultar em: 1) A substituição não compromete a estrutura/função da proteína XACb0043; 2) o TFSS de *Xac* pode ser funcional sem um componente VirB7; 3) A substituição no gene *virB7* pode comprometer todo o TFSS codificado pelo plasmídeo de *Xac*, resultando em um sistema não-funcional.

Quando XACb0043 foi utilizada como isca na triagem da biblioteca, não foram observadas interações que já houvessem sido descritas para VirB7 (interações com a própria VirB7 além de VirB6, VirB8, VirB9 e VirB10; Jakubowski *et al.* 2003; Anderson *et al.*, 1996; Krall *et al.*, 2002; Spudich *et al.*,

Figura 38- Alinhamento (Brunings e Gabriel, 2003) da proteína VirB7 do plasmídeo pXcB de *X. citri* pv. *aurantifolii* linhagem B69 com o produto do gene XACb0043 do plasmídeo pXAC64 de *Xac*, LvhB7 de *Legionella pneumophila* e VirB7 de *A. tumefaciens*. Os resíduos conservados estão marcados com *. A região do possível lipobox está indicada, assim como o resíduo conservado de cisteína que é necessário para a formação de homodímeros VirB7-VirB7 e heterodímeros VirB7-VirB9 (Anderson *et al.*, 1996; Krall *et al.*, 2002; Spudich *et al.*, 1996). A metionina grifada (M) na sequência XACb0043 corresponde a um códon de iniciação alternativo.

1996; Ward *et al.*, 1988). Esta proteína de *Xac* mostrou uma interação específica (8 vezes) com um polipeptídeo codificado por um trecho não anotado do plasmídeo pXAC64 próximo ao *locus tra/tw*. Esta região é imediatamente “downstream” ao gene XACb0022 e se sobrepõe ao gene XACb0021 em uma fase diferente (Fig. 39). Esta região de interação com XACb0043 foi denominada de XACb0021b e seus nucleotídeos e respectivos aminoácidos estão mostrados na figura 40. O fragmento mínimo que interagiu com XACb0043 iniciou no resíduo 17 da XACb0021b.

Como descrito anteriormente, essa região faz parte do segmento que é comum aos dois plasmídeos de *Xac* (Fig. 37). Desta forma, o gene XACb0021b também pode ser encontrado no plasmídeo pXAC33 de *Xac*, onde deve ser nomeado XACa0021b.

Os únicos homólogos a XACb0021b encontrado nos bancos de dados públicos é o produto do ORF176 (70% de similaridade) do plasmídeo pWW0 de *Pseudomonas putida* (Greated *et al.*, 2002) (Fig. 13, Introdução) e uma proteína hipotética do plasmídeo pXcB de *X. citri* pv. *aurantifolii* (Brunings *et al.*, 2001). A ORF176 de *P. putida* possui uma localização gênica (próximo ao *locus tra*) semelhante ao gene XACb0021b de *Xac* (Fig. 13B e C, Introdução).

Desta forma, a interação observada por XACb0043 não foi a esperada para um homólogo a VirB7. A proteína XAC0021b, por ser um auto-ativador, não pôde ser usada na triagem reversa por duplo-híbrido. Como este sistema de *Xac* não está caracterizado, os resultados encontrados necessitam de mais estudos para serem totalmente compreendidos. O fato de, mais uma vez, encontramos interações de proteínas cujos genes encontram-se próximos no

Figura 39- Mapa gênico da região próxima ao locus *trw* do plasmídeo pXAC64 de *Xac* (Figura 13, Introdução). A) mapa gênico da região do gene XACb0021 localizado próximo ao locus *tra/trw*. B) A figura mostra os genes XACb0021 e XACb0022. Todas as 8 presas encontradas na triagem da biblioteca quando utilizamos XACb0043 como isca foram derivadas da região adjacente ao gene XACb0022 correspondendo a um segmento sem anotação do genoma. Os possíveis códons de iniciação (|) e terminação (|) deste “novo” gene (XACb0021b), além de uma representação das presas obtidas nesta região quando utilizamos XACb0043 como isca, estão mostrados.

Gene XACb0021b (387bp)

```
ATGGGGAGTAACGTATCGACGGCCCGCAAGCGCTCATGGCCGAGCTGCTGCAAGATGCCGACGCCCT
CGTACGTCGCTTCGAGCAGGCAGACGAGGCACTGACAGGAAAGATCGAGAAGCCGACAACGGACGCGG
CCGGAAAGGCGTTCTTGGCCGCCAAGCTCAATTTTCGAGTCGGTCATCGACAAGAACGCCGAGAAGCTC
ACTGAAGCTGGCCGACATGCAGCCGCGCAGATCGGAAATCAGCTCAATAGCGGCGCGGCGCAGGTCGT
CGCCGCGAATGCGGCGTTTGAGAGCAAGGCGCGGCGGTTTCGTGCTGCTGCTGGCTGGGTTTCGCGTTTG
TCGCCGCGCTGGTGGGCGGCTTCGTTGGCGCCAAGCTGGCCGGGATGTAA
```

Proteína XACb0021b (129 a.a.)

```
MGSNVSTAREALMAELLQDADALVRRFEQADEALTGKIEKATTTDAAGKAFLAAKLNFEVIDKNAEKL
TEAGRHAAAQIGNQLNSGAAQVVAANAAFESKARRFVLLLAGFAFVAGVVGGFVGAFLAGM*
```

Figura 40- Sequência nucleotídica entre as regiões 22841-22452 do pXAC64 e 8086-8475 do pXAC33 e os respectivos aminoácidos codificados. Nomeamos esse novo gene como XACb0021b (pXAC64) e XACa0021b (pXAC33). O produto desta região mostrou uma interação específica com a proteína XACb0043.

genoma aumentam as chances de correlações verdadeiras. Como veremos adiante, o TFSS-cromossomo possui uma cópia de *virB7*. Logo, não podemos descartar a possibilidade de uma integração entre os dois TFSS de *Xac* que poderia resultar em sistemas completos.

A figura 41 mostra o mapa do *locus vir* encontrado no plasmídeo de *Xac* e destaca os genes cujos produtos interagiram entre si neste nosso trabalho. A presença de proteínas semelhantes ao complexo Vir, juntamente com a identificação de proteínas relacionadas com a conjugação de material genético, assim como uma possível região *oriT* nos dois plasmídeos de *Xac* nos leva a acreditar que este sistema está envolvido em processos de secreção/conjugação de macromoléculas. Outro aspecto que corrobora essa possibilidade é a grande semelhança existente entre o TFSS-plasmídeo de *Xac* e o sistema Mpf de *P. putida*. Brunings e Gabriel (2003) relatam que o plasmídeo pXcB de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolli* linhagem B69 também é capaz de ser conjugado, indicando que esse sistema, o qual também possui similaridade com o encontrado em *Xac*, é funcional.

Figura 41- Mapa gênico dos loci *vir* e *tra/trw* localizados no plasmídeo pXAC64 de Xac. A figura esquematiza as interações observadas entre os produtos dos genes localizados nessa região. XACb0042-VirB6; XACb0043-XACb0021b, XACb0035-XACb0035; XACb0032-XACb0033; TrwA-TrwA e VirB1-VirB9.

Interações do TFSS-cromossomo

O TFSS codificado pelo *locus vir* do cromossomo de *Xac* contém uma organização diferente do mesmo sistema codificado pelo plasmídeo pXAC64 (Fig. 13, Introdução). Como mostrado na Tabela 3 (Introdução), também é observado um baixo nível de similaridade entre estes dois sistemas de *Xac*. Enquanto TFSS-plasmídeo de *Xac* possui maior similaridade com o sistema encontrado em pWW0 de *Pseudomonas putida*, o *locus vir* do cromossomo exibe aproximadamente 40% de similaridade com o *locus tra* encontrado nos plasmídeos pSB105 e pIPO2 isolados de uma comunidade bacteriana residente em alfafa e trigo (Schneiker *et al.*, 2001; Tauch *et al.*, 2002). Brunings e Gabriel (2003) propuseram que o TFSS codificado pelo cromossomo de *Xac* não é funcional pelo fato de não encontrarmos uma proteína correspondente a VirB5. Pelo fato deste sistema de *Xac* não estar caracterizado, a presença de proteínas hipotéticas que fazem parte do *locus* ou estão ao seu lado poderiam suprir essa ausência. Apesar de nenhuma destas apresentar similaridade com qualquer VirB5 não podemos descartar a importância deste sistema até que sejam feitos ensaios específicos de sua funcionalidade. Covacci *et al.*, (1999) propuseram que a estrutura mínima para a secreção envolve VirB11, B4, B7, B9, B10 e D4 (note a ausência de VirB5). Um outro aspecto é que o TFSS-plasmídeo contém todos os componentes descritos (incluindo VirB5) para que esse sistema possa ser funcional (com a possível exceção do VirB7) e, desta forma, existe a possibilidade de alguns destes componentes serem compartilhados pelos dois sistemas. A figura 42 mostra um alinhamento dos *loci* codificadores de TFSS possivelmente envolvidos em conjugação e secreção de fatores patogênicos. Podemos notar que vários dos sistemas patogênicos não codificam todos os componentes.

Interações envolvendo a proteína VirD4-Cromossomo

A proteína VirD4 e seus homólogos são ATPases do TFSS associadas à membrana as quais estão envolvidas no reconhecimento e processamento de substratos a serem transferidos por este sistema. Estes substratos podem ser

Figura 42- Análise da organização e composição gênica dos TFSS de diferentes bactérias. A figura mostra as diferenças e relações entre os sistemas de secreção/conjugação. É importante notar que vários desses sistemas, assim como os encontrados em *Xac*, não apresentam todos os componentes conhecidos do TFSS mas, mesmo assim, são funcionais. (http://www.molgen.mpg.de/~ag_lanka/phylogenetic.html).

complexos proteína-DNA como o complexo T-DNA-VirD2-VirE2 de *A. tumefaciens* e o complexo TrwC-DNA transferido por conjugação bacteriana ou simplesmente proteínas como CagA de *Helicobacter pylori* e a toxina pertussis de *Bordetella pertussis*. Os substratos podem ser destinados ao meio extracelular ou ainda serem translocados para a célula hospedeira ou outras células bacterianas (Christie, 2001; Burns, 2003; Baron *et al.*, 2002). Como mostrado anteriormente, VirD4 é um homólogo da proteína TrwB e, devido à essa correlação, a estrutura,

função e regulação é possivelmente similar. VirD4 apresenta homólogos em diversos sistemas de conjugação e, possivelmente, também está envolvido no acoplamento e direcionamento dos substratos a serem secretados por este sistema (Pantoja *et al.*, 2002).

O gene *virD4* de *Xac* (XAC2623) está localizado no *locus vir* do cromossomo (Fig. 13A Introdução) e apresenta 39% de similaridade com a proteína TrwB do plasmídeo de *Xac*. VirD4 possui identidade significativa com outras VirD4 de *Xanthomonas spp* (93%), *Burkholderia spp* (50%), *Xylella spp* (41%), *Rickettsia spp* (33%) e com VirD4 de *A. tumefaciens* (28%). O fato dos TFSS de *Xac* não terem sido caracterizados e, em outros sistemas semelhantes, a VirD4 ser uma das proteínas responsáveis pelo reconhecimento e processamento dos substratos secretados por estes sistemas, é de extrema importância mapear as proteínas que interagem com VirD4 de *Xac*. Para isso, utilizamos esta proteína como isca na triagem das bibliotecas.

Como mostrado nas Tabelas 13 e 17 (Resultados), todas as presas de VirD4 foram derivadas de 12 proteínas. Estas presas constituem um grupo de proteínas não caracterizadas, com função desconhecida e com tamanhos que variam de 112 a 861 aminoácidos. O alinhamento de todos os domínios mínimos encontrados na interação (Tabela 13, Resultados) utilizando o servidor SAM-T99 (<http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T99-query.html>; Karplus *et al.*, 1998) revela que todas estas presas possuem regiões comuns que apresentam similaridade entre si (Fig. 43). Este domínio de aproximadamente 100 aminoácidos é encontrado na região C-terminal das proteínas maiores e corresponde quase a totalidade das menores proteínas deste grupo (XAC1165 e XAC0323). O critério para a determinação da possível sequência consenso entre essas proteínas foi a identificação de posições contendo resíduos conservados em pelo menos seis das doze proteínas. Tanto a possível sequência consenso como o domínio individual de cada uma destas proteínas não apresenta similaridade significativa com proteínas presentes nos banco de dados públicos. Além de encontrarmos regiões bem conservadas entre essas proteínas é importante


```

XAC0466 HPDHAL-----HNAIRSKLP-----SMISNETAAHVTL.QAKQN-----
XAC3266 HPDHST-----YQIHSWVR-----GTGNWNVEESKNVTASLYKQQTEDP-----
XAC2609 HPDNAM-----YNGAVSKLEALGERGGFANRKELEQAAGQIVF.ESKVS-----
XAC0096 HPDHRM-----LEQIRSGVRKIDESVGKPYDDMSERVSRLLA.VCKDNREAYPAAGDRSLADN
XAC1918 LSQDPL-----HSQAEDAVRRLEQGGLGREYDDNSARLAASSAY.LAKEN-----
XAC0574 HVGNGL-----FQDAQRGVHAQDARAGRTPDQHSACLSSGLAS.EMHAA-----
XAC3634 NPDHPL-----FNQALNKLEQLGPN-AFANRQQLVNAAGHMTF.GAKVS-----
XAC0151 -----IRSKVEQLDAANGRTFDATSERMTASLLT.LAKDN-----
XAC1165 -----MGRASDAHSERMSASLAH.LAKEH-----
XAC0323 GPDHPEHPDHYLFAQIREAVGVLDDELKFPVDEASERMAARLLP.LAKQH-----
XAC2885 ARGNALQPGSQLEFNDVAVKLDGQRDRLLGLRDDTAFLNTAASVAA.RAGND-----
XAC4264 PPERAEHPNNELLEKIRSGVRGLDQAGKSWDESSDRLSASLLL.MATEK-----
      PD      V      G      D      S      ASL      K
      76      7      *      8      9      887      8

XAC0466 GIDSADKLQNV-----VQDGKAFVMTTPG-----FRAAVDLNQPAFT-LEQTSACL-LAGQS
XAC3266 LLQRVDKVT-----GGLGKDGAEVFAVYAPFGDKGPFHFAHVDGREASQEPAQNNLQQAQAEVIKQD
XAC2609 GLQRIDHVPVNK-----SGDGFFAVQCELTDP.MQRVFVDRNQANQPLENSSRQAEEESQR
XAC0096 ALSRVDHVVVGK-----TGNMFAVEGRLLDDPA.HRRVHVEIDQAIRTPVEQSSDQKLLAANQA
XAC1918 GLSRIDHVVLS-----NTKSVRQGENVFVVEGALNDPA.HKMAHMKTSDAIAQPVESQLAQALGET
XAC0574 GGRRIDAVMMS-----DAARTFAVQGRVDDPA.QLRVSVDTMTAMNTPLEQSSQSRVAENAAR
XAC3634 GMQRIDHVAQSK-----DGNGLFAVQCGPTDPA.HQRIYTEKATAAERPLEQSSNAVRQDAQT
XAC0151 GLTRVDHVVLS-----KTRDSPAAQTLFVVQGDPKDPA.MLRHMTPTADAAQRPVQESFTQLESVNQR
XAC1165 GLERIDHVMLSN-----QTPRAAAAATVFVVQCEPSNPA.HLRASMTPTDVAVTPVEQSLAKLQELDAR
XAC0323 GFDQVDVVLVSRHLGE-----VGENVFVVRGELSDPA.HLRAHITTQEAMETSVASLAQLDEINRR
XAC2885 GLQRIDHVLVNRD-----GDSLIAVQGRMDPA.HLRSHVQTASAANEPAQTNVSQQLQHNQ
XAC4264 GFTARDLKLFAFNTPTTEKLAGGELHWMREGHSPDPAAH.RAHMTTQELAVPADQRLAQMEVMMQQT
      GL RIDHV S      FAV G      DPA H RA V T A      P EQS QL Q
      *7 96*69 6      *6* 9      *** * *7 6 7 *      * 788 87 8

XAC0466 -QQQQAAQQEQQKVAMGGR
XAC3266 -QTRQQALEETQQQTARQDQARPSRL
XAC2609 -QAIQVQTQESASRSMSM
XAC0096 -IAQERALTQQQEVARGMNEPNQGSLSR
XAC1918 -QRQQQSQQQEQQREQLIAPQHRMV
XAC0574 -QSAVLEQQQSQTQQQQQGARALG
XAC3634 -QTQVQDQHEQQRSTQTRSVG
XAC0151 -LAQERTQDLAVEQQRSEQQHGRGPVPSR
XAC1165 TLAQAQSLAQERSMAQGEAVKPRSIG
XAC0323 -LMLRLPRR
XAC2885 -HTQPPQQQQEQRRVIOQ
XAC4264 -KAQEIMQAQQQETMQTQSTQARS
      Q Q      Q Q Q
      6 8      7 7 6

```

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Figura 43- Alinhamento protéico, segundo Karpus *et al.* (1998), dos domínios mínimos de interação (localizado em todas elas na porção C-terminal) das doze diferentes presas obtidas quando a proteína VirD4 de *Xac* foi utilizada como isca na triagem da biblioteca. Os resíduos conservados em pelo menos 6 das 12 proteínas estão em **negrito**. Abaixo de cada resíduo conservado é mostrado o número de proteínas que apresentam esse mesmo aminoácido. (*) representa resíduos conservados em pelo menos 10 das 12 presas.

destacar que onze delas possuem um domínio C-terminal rico em glutamina (Q) (Fig. 43). Esse grupo de proteínas foi por nós chamada de VIPs (“VirD4 Interacting Proteins”) e as regiões mais conservadas denominadas VIPCDs (“VIP Conserved Domains”). Alguns fatores de transcrição eucarióticos são ricos em prolina ou glutamina. Os fatores de transcrição eucarióticos ricos em glutamina, como o Sp1 e Oct1, apresentam domínios onde aproximadamente 25% dos resíduos são

compostos por glutaminas, os quais são responsáveis pela ativação da transcrição (Escher *et al.*, 2000). Normalmente essas proteínas possuem domínios que podem ligar-se ao DNA com motivos de “leucine zipper” ou “zinc-fingers”. Apesar das VIPs apresentarem uma região C-terminal rica em glutamina, não foram encontradas similaridades com esses fatores de transcrição eucarióticos.

Uma sequência C-terminal conservada, identificada como RXR, tem sido encontrada em alguns fatores de virulência secretados pelo TFSS (Simone *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2002). Entretanto, nenhuma sequência RXR foi encontrada nas presas de VirD4. Simone *et al.* (2001), mostraram que a porção C-terminal da proteína VirE2 é fundamental para que haja a correta identificação e secreção do complexo núcleoproteico em *A. tumefaciens* e, possivelmente, este sistema possui um mecanismo de regulação/reconhecimento diferente.

De um total de 68 interações encontradas envolvendo as 12 VIPs, 8 delas eram derivadas do produto do gene XAC2609, o qual, assim como *virD4*, está localizado no *locus vir* do cromossomo (Fig. 44). Quando todos os 431 resíduos de XAC2609 foram utilizados como isca na triagem, nós encontramos uma interação específica com a proteína XAC2610, cujo gene está localizado ao lado do XAC2609 no mesmo *locus vir* (Fig.44). XAC2610 é uma proteína de 267 resíduos, também com função desconhecida, e sua interação com XAC2609 envolveu a região entre os resíduos 76-267. Esta proteína possui um sinal de localização nuclear (NLS) PKKK na porção C-terminal entre os resíduos 249-252 identificado pelo PSORT (Nakai e Kanehisa, 1991). Utilizando XAC2610 como isca foram encontradas quatro diferentes presas sendo que duas delas, apesar de serem identificadas apenas uma vez, merecem destaque: 1) interação reversa com XAC2609, a qual confirma a interação observada quando XAC2609 foi utilizada como isca; 2) interação com VirB11-Cromossomo (não observamos interações com XAC2610 quando VirB11 foi usada com isca; veja abaixo). Em nenhuma das presas encontradas foi identificado fragmentos derivados da VirD4.

Uma outra presa da proteína VirD4, a XAC0466, quando utilizada como isca mostrou um grande número de falso-positivos (interações com TolC) mas, em um

dos casos, identificamos a presa VirD4. Desta forma, nós confirmamos a interação anteriormente caracterizada entre VirD4 e XAC0466.

Apesar de não terem sido feitos ensaios de funcionalidade do TFSS de *Xac*, os resultados obtidos indicam uma nova rede de interações que podem ser importantes no processo de patogenicidade. A proteína VirD4, por ser um possível acoplador do sistema TFSS, é uma das responsáveis pela secreção/seleção de componentes a serem secretados por este sistema. O fato de termos encontrado interações com VirD4 envolvendo proteínas com regiões conservadas (VIPCDs) podem revelar uma nova via de reconhecimento e de proteínas secretadas por este sistema. Obviamente, existem falso-positivos em ensaios duplo-híbrido que são encontrados na triagem pelo fato de possuírem um domínio semelhante ao da presa verdadeira (James *et al.*, 1996). O fato de uma das VIPs mostrar interação reversa com VirD4 e outra VIP estar presente no mesmo *locus* fortalece a hipótese de relevância biológica dessas interações.

Interações Homotrópicas Envolvendo VirB11-Cromossomo

VirB11, assim como VirD4 e VirB4, é uma ATPase do TFSS associada à membrana interna e seria um dos responsáveis pelo transporte de substratos através do TFSS (Burns, 2003; e Christie, 1997). Covacci *et al.*, (1999) propuseram que a estrutura mínima para a secreção envolve VirB11, B4, B7, B9, B10 e D4. A resolução da estrutura de um homólogo a VirB11 de *Helicobacter pylori* associado a ADP (Yeo *et al.*, 2000), revela a formação de um anel hexamérico semelhante ao observado para VirD4/TrwB. Devido a este fato, não foi surpresa encontrarmos na triagem da biblioteca com a isca VirB11 um grande número de presas derivadas da própria VirB11 (55 de 63 clones positivos analisados). Das presas contendo VirB11, apenas uma delas foi identificada como não sendo um evento de recombinação entre os plasmídeos. O fato de VirB11 comprovadamente formar um anel hexamérico mostra a relevância dos nossos resultados: um grande número de interações homotrópicas envolvendo esta ATPase. VirB11 localiza-se na face interna da membrana citoplasmática independentemente da interação com outras proteínas Vir e estudos de proteínas

mutantes sugerem que essa ligação com a membrana é modulada pela hidrólise de ATP (Sagulenko *et al.*, 2001). Acredita-se que VirB11 atua como uma chaperone que permite o tráfego de substratos desenovelados pela membrana citoplasmática (Sagulenko *et al.*, 2001).

Interações Envolvendo XAC2622 e VirB9

VirB9 é um dos principais componentes do poro periplasmático do TFSS possivelmente associado à membrana externa da bactéria (Chistie e Vogel, 2000; Burns, 2003). Em *A. tumefaciens*, interações entre VirB9 e as subunidades VirB7, VirB8 e VirB10 foram detectadas previamente em diversos ensaios, incluindo duplo-híbrido (Das *et al.*, 1997; Das e Xie, 2000; Ward *et al.*, 2002). No *locus vir* do cromossomo de *Xac* o gene *virB9* está localizado entre *virB8* e *virB10* (Fig. 44). Contudo, não foi identificado na anotação do genoma de *Xac* um gene que fosse equivalente a *virB7* de outros TFSS, normalmente encontrado ao lado de *virB8* do *locus vir* de bactérias Gram-negativas (vide Figs. 13A, Introdução, e 42) (Christie e Vogel, 2000; Baron *et al.*, 2002). As proteínas VirB7 são normalmente pequenas lipoproteínas (apenas 55 resíduos em *A. tumefaciens*) com alta variabilidade em sua sequência primária e são consideradas importantes para o correto funcionamento do TFSS (Anderson *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1999). No local correspondente ao *virB7* foi identificada um gene (XAC2622) que codifica uma proteína hipotética de 139 aminoácidos cujo único homólogo encontra-se na mesma posição do genoma de *X. campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002).

Quando XAC2622 foi utilizada como isca na triagem da biblioteca, a grande maioria das presas foi derivada de VirB9. A interação entre XAC2622 e VirB9 observada por nós pode indicar que XAC2622 seja o substituto da proteína de VirB7 em *Xac* e *X. campestris* pv. *campestris*. Certamente, ensaios funcionais detalhados devem ser realizados para confirmar essa suposição. A análise da estrutura primária utilizando o programa PSORT (Nakai e Kanehisa, 1991) da proteína XAC2622 mostra uma possível localização associada à membrana externa devido à presença da sequência CATK (resíduos 21-24) onde o resíduo de cisteína é modificado em lipoproteínas. Caso a proteína XAC2622 realmente

tenha uma função semelhante a VirB7, o TFSS do cromossomo está completo com exceção do VirB5. Como discutido acima, um gene *virB5* encontra-se no *locus vir* do plasmídeo e por vezes não está presente em alguns TFSS (Fig. 42). A sua função na patogenicidade permanece indefinida. Contudo, é importante notar que o *locus vir* do cromossomo de *Xac* não contém genes para o processamento de DNA normalmente encontrados em TFSS associados à conjugação bacteriana. Se funcional, um grupo de substratos candidatos são aqueles identificados pelas interações com VirD4 (VIPs) na triagem da biblioteca.

Nós obtivemos evidências de interações proteína-proteína envolvendo alguns componentes do TFSS codificado pelo *locus vir* do cromossomo de *Xac*. Algumas destas proteínas não haviam sido caracterizadas funcionalmente antes e suas interações são de considerável interesse. Alguns desses resultados envolvendo componente cujos genes estão localizados no próprio *locus vir* estão esquematizados na figura 44. Em resumo, a interação entre XAC2622 e VirB9 indica que XAC2622 tem possibilidade de ser equivalente a VirB7. Esta observação aumenta a possibilidade deste *locus* codificar um TFSS funcional. Além disso, identificamos um conjunto de 12 proteínas, previamente não caracterizadas, que interagem com VirD4. Todas estas proteínas possuem uma região C-terminal que apresenta similaridade e podem representar um conjunto de cofatores ou substratos do TFSS. O gene de um dos membros desta família (XAC2609) está localizado no mesmo *locus vir* e, detectamos ainda a sua interação com o produto de outro gene adjacente, o XAC2610.

Figura 44- Mapa gênico do locus *vir* localizado no cromossomo de *Xac*. A figura esquematiza as interações observadas entre os produtos dos genes localizados no mesmo locus: XAC2622, possível VirB7, com VirB9; VirB11-VirB11; VirD4-XAC2609; XAC2609-XAC2610; XAC2610-XAC2609.

Interações do Sistema “Quorum-Sensing”/Rpf

A comunicação celular é mediada por uma variedade de sinais químicos. Este processo é importante para que uma célula individual em uma população atue de maneira a aumentar suas chances de sobrevivência sob diferentes condições ambientais. Grande parte das bactérias Gram-negativas utiliza a detecção de derivados de homoserina lactona (acil-HSL) para estimar a densidade celular local e regular processos fisiológicos densidade-dependentes (Whitehead *et al.*, 2001). O processo, chamado “quorum-sensing”, regula a bioluminescência em *Vibrio Fischeri* e a secreção de diversos fatores de virulência de um grande número de patógenos animais e de planta (Zhang, 2003, van Bodman *et al.*, 2003; Crossman *et al.*, 2004; Dow *et al.*, 2003; Whitehead *et al.*, 2001). O disparo das cascatas de sinalização envolvendo o sistema Lux ocorre através da variação dos níveis de acil-HSL extracelulares e possui como principais componentes LuxR, um regulador de transcrição sensível a variações dos níveis de acil-HSL e LuxI, uma enzima responsável pela síntese de acil-HSL. Os membros do gênero *Xanthomonas* de fitopatógenos não produzem derivados de HSL. Ao invés disso, o sistema de “quorum-sensing” nestes organismos é mediado por uma outra via de sinalizadores denominados DSF (“diffusible signal factor”) cuja composição foi recentemente elucidada (Wang *et al.*, 2004). Como descrito na Introdução, em *X. campestris* pv. *campestris* o mecanismo de “quorum sensing” é capaz de ativar síntese de enzimas extracelulares, polissacarídeos e outros fatores envolvidos na patogenicidade. Nesta bactéria, o “quorum sensing” está sob o controle de um grupo de proteínas chamadas Rpf (“regulators of pathogenicity factors”). A análise de *X. campestris* pv *campestris* contendo mutações em alguns dos genes *rpf* possibilitou atribuir funções para algumas das proteínas Rpf. Enquanto em *Xanthomonas* estudos genéticos forneceram um grande número de informações da regulação e integração do “quorum sensing” e a produção de enzimas extracelulares e outros fatores de patogenicidade (Slater *et al.*, 2000; Crossman *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004), as interações específicas envolvendo as proteínas que compõem esse sistema não foram identificadas.

RpfC: Estrutura e Função

A proteína RpfC de *Xac*, contendo 725 resíduos, é um membro de um sistema de dois componentes que possui uma estrutura primária com aproximadamente 60% de identidade com RpfC de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002; Slater *et al.*, 2000) e 53% com a mesma proteína de *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000). Todas essas proteínas contêm domínios funcionais identificados através de similaridade em bancos de dados Pfam (Bateman *et al.*, 2004) e o uso de algoritmos para identificar possíveis domínios transmembrânicos (PSORT- Nakai e Kanehisa, 1991). A figura 45 mostra os domínios encontrados na proteína RpfC. Iniciando na porção N-terminal, temos: a) uma região contendo cinco possíveis hélices transmembrânicas do resíduo 1-174; b) domínio histidina quinase fosfoceptor (HisKA/HATPase) entre os resíduos 189-417, contendo uma histidina conservada na posição 200, provável sítio de auto-fosforilação; c) domínio receptor regulador de resposta (RR) entre os resíduos 460-583 contendo resíduos conservados de aspartato nas posições 466, 467 e 510, o quais podem ser sítios de fosfo-transferência; d) domínio Hpt na porção C-terminal compreendido entre os resíduos 623-699, o qual também contém uma histidina conservada na posição 656, também um putativo sítio de fosfo-transferência (todos esses domínios referem-se à RpfC de *Xac*). Baseados nessas informações, Slater *et al.*, (2000) sugeriram que a porção N-terminal da proteína está associada à membrana interna enquanto a porção C-terminal encontra-se na região citoplasmática (Fig. 45). O domínio N-terminal associado à membrana não possui homologia com sensores conhecidos encontrados em sistemas de dois componentes. Em *X. campestris* pv. *campestris* é encontrada uma outra proteína associada à membrana denominada RpfH. Essa proteína contém 207 aminoácidos e apresenta 51% de similaridade como domínio sensor da RpfC, sendo considerada uma possível proteína auxiliar da proteína RpfC na detecção de DSF e outros possíveis estímulos ambientais. *Xac*, assim como *Xylella fastidiosa*, não apresenta RpfH.

Figura 45- Modelo de ativação da síntese de fatores de virulência em *X. campestris* sob a influência do DSF (Crossman *et al.*, 2004). A ligação de DSF no domínio N-terminal da RpfC leva à autofosforilação do domínio fosfoceptor histidina quinase (HisKA). A fosfo-transferência ocorre através do domínio receptor (RR) e do domínio Hpt da RpfC para o domínio receptor RR da RpfG, o que leva à sua ativação como uma possível di-cGMP fosfodiesterase. Possivelmente, RpfC também pode reconhecer outros estímulos ambientais que levam à ativação da RpfG. As setas mostradas na figura indicam as reações de fosfo-transferência (Crossman *et al.*, 2004). DSF- "Difusible Signal Factor"; HisKA-aceptor histidina quinase; HATPase-histidina quinase/ATPase; HPT-histidina fosfo-transferência; RR-regulador de resposta; HD-GYP- fosfoidrolase metal-dependente relacionada com transdução de sinais e atividade di-cGMP fosfodiesterase.

Mutantes *rpfH* de *X. campestris* pv. *campestris* mostram um pequeno aumento nos níveis de endoglucanases mas não foram observadas alterações significativas nos níveis de outras enzimas e polissacarídeos extracelulares (EPS) (Slater *et al.*, 2000). Como descrito na Introdução, o mecanismo que envolve a percepção dos estímulos ambientais proposto por Slater *et al.* (2000) ocorre através da ligação de DSF ao domínio sensor N-terminal de RpfC associada à membrana interna, o que resulta em um processo de auto-fosforilação. Os estímulos que ativam esse processo incluem o próprio DSF além de outros possíveis fatores ainda desconhecidos. A auto-fosforilação de RpfC leva a outros processos que envolvem a transferência dos fosfatos para resíduos de His-Asp-His, localizados em outros domínios da própria RpfC, até ser transferido para o resíduo Asp do domínio RR da proteína RpfG. Um via alternativa poderia ocorrer envolvendo apenas RpfC-His do domínio sensor seguida da fosforilação de RpfG-Asp (Fig. 15, Introdução). Uma vez fosforilada, RpfG levaria à ativação de uma série de genes

importantes no processo de virulência, entre eles *eng* (endoglucanases), *prt* (proteases) e *gum* (goma xantana). Dentre estes, a ativação dos genes *gum* e a exportação de goma xantana é um fator importante no processo infeccioso já que, uma vez exportada, ela auxilia na formação de um biofilme que previne a ação de derivados antimicrobianos do hospedeiro (Dow *et al.*, 2003). A maneira com que RpfG controla a expressão desses genes não é bem conhecida, mas há hipóteses de que ocorre através do controle dos níveis de um segundo mensageiro, o di-GMPc (veja adiante). As proteínas RpfF e RpfB seriam responsáveis pela síntese de DSF, um derivado de ácidos graxos. O aumento da população de bactérias semelhantes seria refletida pelo conseqüente aumento dos níveis de DSF extracelulares. O domínio sensor da proteína RpfC detectaria as alterações na concentração de DSF extracelular e, a partir daí, iniciaria o processo de transdução de sinais que, através da ativação da RpfG, levaria à expressão de fatores de patogenicidade (Slater *et al.*, 2000). Os principais componentes deste sistema foram utilizados na triagem da biblioteca de *Xac*. A seguir, serão mostrados os mecanismos de interação encontrados no estudo dos componentes do sistema “quorum-sensing” e, finalmente, a apresentação de um modelo baseado na literatura e nas redes de associação encontradas no nosso trabalho.

Interações entre RpfC e RpfG

A provável porção citoplasmática da proteína RpfC (compreendida entre os resíduos 170-725) de *Xac* foi utilizada como isca para a triagem da nossa biblioteca. Uma das presas da RpfC na triagem foi a proteína RpfG, a qual havia sido proposta como um dos componentes que interagem com RpfC por Slater *et al.*, (2000) baseados em análise de similaridade de seqüências e estudo de fenótipos de mutantes. A proteína RpfG de 378 aminoácidos apresenta domínios regulador de resposta (RR) no seu N-terminal (resíduos 28-151) e HD-GYP (um subgrupo dos domínios HD que possuem atividade fosfodirolase metal-dependente e estão relacionados com transdução de sinais e com a atividade di-GMPc fosfodiesterase; Crossman *et al.*, 2004) no seu C-terminal localizado entre os resíduos 199-320 (Fig. 45). Proteínas que apresentam domínios HD-GYP

possuem diversas funções associadas com o metabolismo de ácidos nucleicos e transdução de sinais (Aravind e Koonin, 1998). Os domínios encontrados nas proteínas RpfC e RpfG levaram à hipótese que após o processo de ativação (autofosforilação) da RpfC e conseqüente transferência de grupos fosfato para os demais domínios desta proteína, teríamos um processo de fosfo-transferência para o domínio RR da RpfG. A fosforilação deste domínio da RpfG mudaria a atividade do seu domínio HD-GYP que, através da sua atividade fosfoidrolase, modificaria os níveis intracelulares de diGMPc (Slater *et al.*, 2000). O domínio mínimo da RpfG que interage com RpfC inicia no resíduo 26. Considerando que o domínio regulador de resposta da RpfG está compreendido entre os aminoácidos 28-151, nossos resultados mostram que é necessária a presença de todo o domínio RR para que haja interação com RpfC. Apesar dessa interação ter sido prevista por Slater *et al.*, (2000) baseada em análises da estrutura primária e fenótipo de mutantes (nocautes), esta é a primeira vez que a interação proteína-proteína entre RpfC e RpfG foi identificada. O ensaio reverso utilizando RpfG como isca que permitiria mapear o domínio de interação com RpfC não foi possível de ser realizado uma vez que RpfG é um auto-ativador dos genes repórteres da levedura PJ694-a.

Interações entre RpfC e RpfF

A maioria das presas encontradas na triagem utilizando RpfC como isca foram derivadas da proteína RpfF (Tabela 18 Resultados) de 289 aminoácidos e homóloga a enoil-CoA hidratase. Como descrito acima, RpfF participa da síntese de derivados de ácidos graxos que atuam como fatores de sinalização, o DSF. O domínio mínimo da RpfF encontrado na interação com RpfC foi a partir do resíduo 65. Considerando que o domínio enoil-CoA hidratase está compreendido entre os resíduos 44 e 211 da RpfF, os resultados obtidos na interação com RpfC mostram que, provavelmente, a interação entre essas proteínas requer esta região da RpfF. O modelo proposto por Slater *et al.* (2000) indica que RpfC influencia os níveis de expressão de *rpfF* e *rpfB* uma vez que mutantes de *rpfC* em *X. campestris* pv. *campestris* mostram um aumento de 2-3 vezes nos níveis de transcrição de *rpfF* e

rpfB. Além disso, foi proposto que RpfC atua negativamente na síntese de DSF devido ao fato que mutantes *rpfC* de *X. campestris* pv. *campestris* mostram um aumento da produção de DSF. Apesar destas informações terem sido utilizadas na construção do modelo de regulação/ativação do sistema de “quorum-sensing”/Rpf, não foram mostrados (ou propostos) mecanismos de regulação que envolveriam uma interação direta entre as proteínas RpfC e RpfF como encontrado no nosso trabalho. A relevância e o possível mecanismo serão discutidos posteriormente.

DSF é um derivado de ácido graxo recentemente identificado como cis-11-metil-2-dodecenoico α,β insaturado (Wang *et al.*, 2004). A estrutura do DSF está mostrada na figura 46. Uma das principais características dessa molécula é a região contendo a insaturação: derivados saturados de DSF são 20.000 vezes menos ativos do que o padrão insaturado. Componentes responsáveis pelo “quorum-sensing” podem ser alvos moleculares promissores para controle de infecções bacterianas (Wang *et al.*, 2004). A proteína RpfF, a qual tem similaridade com enoil-CoA hidratase, juntamente com RpfB, uma acil-CoA sintetase, são as responsáveis pela síntese de DSF. A síntese de DSF é completamente dependente de RpfF e parcialmente dependente de RpfB (Crossman *et al.*, 2004). Mutantes *rpfF* e *rpfB* são incapazes de sintetizar DSF mas mutantes *rpfF* podem secretar enzimas e polissacarídeos da mesma forma que a cepa selvagem quando DSF exógeno está presente no meio (Slater *et al.*, 2000).

Figura 46- Estrutura química do fator de sinalização DSF de *Xanthomonas*. O DSF é um derivado de ácidos graxos (cis-11-metil-2-dodecenoico α,β insaturado) cuja biossíntese tem a participação das proteínas RpfF e RpfB do sistema de “quorum-sensing”/Rpf (Wang *et al.*, 2004).

A fim de confirmarmos os resultados acima descritos que envolvem interações entre RpfC e RpfF, utilizamos RpfF como isca na triagem da biblioteca. Os resultados mostraram uma interação altamente específica com RpfC (Tabela 18, Resultados). O domínio mínimo de interação encontrado foi a partir do resíduo 442. Considerando que os domínios HisKA/HATPase são encontrados entre os resíduos 189-417 e o domínio regulador de resposta RR entre os resíduos 460-583, podemos concluir que a interação entre RpfF-RpfC não requer o domínio HisKA/HATPase. O sequenciamento reverso das presas RpfC, o qual consistiu na determinação da sequência da extremidade 3' das presas obtidas, mostrou um domínio mínimo C-terminal até o resíduo 675, localizado no meio do domínio HPT. Assim, o domínio HPT da RpfC pode não ser necessário para a interação com RpfF como será discutido posteriormente.

Além desta principal interação, observamos também duas presas derivadas da própria RpfF iniciando a partir resíduo 14. Não sabemos mensurar a relevância deste resultado, mas a formação de dímeros ou polímeros poderia refletir na sua estrutura quaternária *in vivo* ou ser importante para o mecanismo de controle da sua atividade e/ou suas interações com a RpfC.

Interações entre RpfC e CmfA

Algumas presas da proteína RpfC, um total de quatro, foram derivadas da proteína CmfA (XAC0330). Os únicos homólogos de Cmf são encontrados em *X. campestris* pv. *campestris* (90% de identidade) e em *Dictyostelium discoideum* (50% de identidade). Neste último organismo, Cmf ("conditioned medium factor") está envolvida em processos de "quorum sensing" (Jain e Gomer, 1994; van Haastert *et al.*, 1996; Deery *et al.*, 2002; Deery e Gomer, 1999). *D. discoideum*, em condições ideais, apresenta-se em forma de amebas que se dividem em intervalos de poucas horas e consomem bactérias por fagocitose (revisado por Williams e Harwood, 2003). Em condições de carência nutricional as células cessam o processo de divisão em resposta a pulsos de cAMP, se agrupam para formar montes e, posteriormente, as células sofrem um processo de diferenciação celular que leva a formação de talos e corpos de frutificação (revisado por Williams e

Harwood, 2003). Em *D. discoideum* a densidade celular é monitorada pelos níveis extracelulares de Cmf, uma glicoproteína de 80kDa. Células em estado de carência nutricional secretam o fator Cmf. Altas concentrações de Cmf extracelular indicam que a população de células em estado de carência também é elevada e o processo de formação de agregados (montes) dependentes de pulsos de cAMP e diferenciação celular é iniciado (Deery *et al.*, 2002). Em condições envolvendo baixa densidade celular ou células mutantes *cmf* não é observada a formação de agregados; nessas condições, a adição de Cmf recombinante exógeno permite a formação de agregados (Deery *et al.*, 2002).

O alinhamento entre as proteínas Cmf de *Xac*, *Xcc* e *D. discoideum* (Fig. 47) mostra similaridade entre essas proteínas ao longo de toda a sua estrutura primária. Jain e Gomer (1994) mostraram que a adição de fragmentos recombinantes de Cmf correspondendo aos aminoácidos 1-88 tiveram a capacidade de recuperar a habilidade de mutantes *cmf* de formar agregados em condições de carência nutricional. Além disso, esse mesmo grupo mostrou que as modificações pós-tradução (glicosilação) não são necessárias para a atividade da Cmf. Logo, a visão que emerge destes resultados é que a RpfC interage com duas proteínas que podem estar relacionadas com “quorum sensing”: RpfF que produz DSF e Cmf que também pode ter uma atividade sinalizadora.

A significância da interação de RpfC de *Xac* com uma proteína similar a Cmf a qual, em *D. discoideum*, também está envolvida em processos de “quorum sensing” no momento não é conhecida. É possível que a proteína Cmf atue também como um sinalizador de “quorum sensing” em *Xac* assim como observado em *D. discoideum*. Ainda não temos resultados que mostrem se essa proteína em *Xac* é secretada e se mutantes afetam o desenvolvimento e colonização de *Xac*.

Uma outra hipótese é que a produção de Cmf faça parte de um mecanismo de defesa de *Xac* contra amebas de solo, como *D. discoideum*, que seriam um de seus “predadores” naturais. É de se esperar que *D. discoideum* e bactérias do gênero *Xanthomonas* se encontrem na natureza. Foi determinado que *Xac* pode sobreviver por meses na rizosfera de gramíneas e em folhas e frutos em decomposição (Goto *et al.*, 1985; Christiano, 2003), um nicho onde também

poderíamos encontrar *Dictyostelium*. Se a Cmf de *Xac* possuir atividade similar a do *D. discoideum*, sua produção poderia induzir o predador a agregar e esporular inibindo, temporariamente, seu consumo de bactérias. Certamente essa hipótese necessita de experimentos futuros para ser melhor embasada. Não sabemos se essa proteína de *Xac* é secretada e, caso seja, quais são os níveis e função. Outra questão pertinente é de que forma *Xac* adquiriu o gene da Cmf? Por que nenhum outro procarioto (e até mesmo eucarioto além de *D. discoideum*) exibe algo similar? Cmf poderia estar envolvida em “quorum-sensing” de *Xac* através da RpfC? Cmf participa de mecanismos de “quorum-sensing” de outros organismos? Na busca de respostas para algumas dessas questões, ensaios de análise de reversão de fenótipo de *D. discoideum* mutantes em *cmf* na presença de Cmf recombinante de *Xac* estão sendo feitos pelo nosso grupo de pesquisa.

As interações observadas entre as proteínas do sistema Rpf de *Xac* através da triagem da biblioteca utilizando duplo-híbrido estão resumidas na figura 48. Detectamos interações proteína-proteína condizentes com o modelo proposto por Slater *et al.* (2000) além de revelar possíveis mecanismos de associação/regulação deste sistema até agora não contemplados. Interações envolvendo RpfC e RpfG confirmam as predições feitas a partir da estrutura primária destas proteínas e, a princípio, realmente podem constituir um sistema de dois componentes tendo RpfC como proteína sensora capaz de auto-fosforilação e fosfotransferência para RpfG que é ativado e assim possibilita a expressão de genes importantes para o processo de patogenicidade. Não foi possível mapear a região que RpfG necessita para interagir com RpfC, já que RpfG é um auto-ativador. Contudo, podemos confirmar que a RpfC necessita da presença do domínio RR da RpfG para interagir. Isso é consistente com a previsão de que a região RR da RpfG é a receptora da fosfotransferência através da RpfC. O domínio RR da RpfG possivelmente interage com os domínios HisKA/HATPase ou HPT da RpfC.

Os resultados mostrando a associação entre RpfC-RpfF podem significar uma nova via de regulação da síntese de DSF. A literatura relata que mutantes *rpfC* de *X. campestris* pv. *campestris* produzem de 2-3 vezes mais transcritos de

rpfF e *rpfB*, sendo proposto que RpfC controla os níveis de produção de DSF através do controle da via de transcrição destes genes, cujos produtos estão diretamente envolvidos na síntese de DSF (Slater *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram um segundo mecanismo de regulação deste sistema onde RpfC pode controlar os níveis de DSF. Nós mostramos que RpfC interage diretamente com a proteína RpfF e, da mesma forma, RpfF mostrou interação com RpfC. Vemos duas possibilidades: 1) níveis elevados de DSF extracelular (um reflexo do aumento da densidade celular) seriam detectados pelo sensor RpfC e levariam a mudanças conformacionais que resultariam, além da fosfo-transferência para RpfG, em uma interação específica com RpfF de modo que a síntese de DSF fosse interrompida; 2) A proteína RpfF pode ser ativa apenas quando está associada a RpfC e as mudanças conformacionais em RpfC resultariam na dissociação do complexo RpfC-RpfF, o que levaria à inativação de RpfF. Esses dois mecanismos poderiam ser distinguidos se fosse possível identificar se RpfC associa-se a RpfF quando ela está fosforilada ou desfosforilada. Esta última hipótese é menos provável uma vez que mutantes *rpfC* de *Xcc* apresentam aumento nos níveis de DSF (Slater *et al.*, 2000). A determinação dos domínios mínimos requeridos para interação de RpfF e RpfC mostrou que: 1) o domínio enoil-CoA-hidratase da RpfF é necessário para interação com RpfC; 2) Apenas a região do domínio RR da RpfC é necessário para interagir com RpfF.

Como os domínios de RpfC necessários para interagir com RpfG (domínio HisKA/HATPase ou HPT de RpfC) e RpfF (domínio RR de RpfC) são aparentemente distintos, podemos propor que estas proteínas associam-se a regiões diferentes da RpfC. Estas hipóteses estão sendo testadas neste momento pelo nosso grupo de pesquisa.


```

Dicty_CMF -----
XAC_CMF -----
XCC_CMF -----MENGHLRFMVL 11

Dicty_CMF -----MGSFGIDGATTPSFSLTWDPVVGDNVVTATSSLRKNEKFQKMVEDSTP 51
XAC_CMF -----MAALQLAGARATAVATPLHAQRTLLGTAEHGTSGMRYAVESARNGAWSLTL 51
XCC_CMF AGDQQWDAVAAPRVAGARA-AAAPQLQAQRTRLGSADSGTSGMRYAVDAAQNGVWSLTL 70
      . : : * : : : . . . : : : : : *

Dicty_CMF QLLMLVQNPSDTHIYSYSSYNNLFTGQKVSVLAMLHKKSEFIKKSSANRPLNWKPSPII 111
XAC_CMF QSSSPVAQRGYVLMEGDARTQLASYLRTRQQVQSLTLNALLSGNDARGATLLTAQAGT 111
XCC_CMF QSASPTAQRGYVLMEGDPRTQLASYPRHRHQVQSLTLNALLSGSDAQAGLLAQAGQ 130
      * . : . . : : : : : : : : . . . . . * . . . .

Dicty_CMF LSDVSAEMILGLPDGSKETIPMFDDGLHDEQANDGLFGGYINVSELGNHDLQVVKG-S 170
XAC_CMF IDQASLRVID--PQGGVRSLEPMADDGKHGDGAAGDGVYGGTFQPTSEGTWIAQVIVHGD 169
XCC_CMF IDQASLRVID--PQGTARTFAMADDGKHDDGAAGDGVYGGSFQPTSAGTWIAQVIVHGR 188
      : : . * : : : * : : : : * : : * : : * : : : : * : : : : * : : : :

Dicty_CMF QNGNGVIRSNQHLPITTSQYLELTGEVQSVQDGDANLNIYFIVNSPNQTTVDQTPVHVYS 230
XAC_CMF QAGQPFVRTSEHVVPVVDTSRLRLGNALGARAAG--TQLTIALPVAARGNAPSHYRVFG 227
XCC_CMF QAGQPFVRTSEHVLVLDTSVRLLGNALSARAADG--TRLSIGLPFAARGQAPTHYRVFG 246
      * * : : : : : : : : : : * * : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Dicty_CMF EVYGTDDDGKKVAIAWVAGVTSAQPIQGSTTTFALSAVLNERWIAKVGATAPFFVKNVQV 290
XAC_CMF QVWGTDAGKGDVPVAVIAGMLTPQGGQ-----LHLSLDERWIARAGARAPFTLRSLRI 280
XCC_CMF QVWGTDAGKQIPVAVIGMLTPQGGQ-----LPLSLDERWVARAGARAPFTLRGLRI 299
      : : * : : * : : : : : : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : :

Dicty_CMF SDLDTFIPLSNTTSTSNVKMVGKEYKDVRTIVHSPPLHEITKEMRDGKMPKELADRIGKST 350
XAC_CMF EDFDHYIPLVQAGALPL-----QVPALRRASLAHASTAIDESMRMGPRPTALASAMATAQ 335
XCC_CMF EDFDHYIPLAQADTLPLPLQL-QLPALRRASIA RATAGIDESMRMGPRPTLATASALAQ 358
      . * : : * : : : : : : : : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

Dicty_CMF GNGK---LILTHGYCSEGVWPIEDFENSVEFQDFNQNRGNDEFAQILANFGSQYTDGFHL 407
XAC_CMF PQAAGSQLVLVHGYCSNGVWPQAQFTNASTFLDAKQNRNSNDQFAQRLAQFASQWSS-FST 394
XCC_CMF PQAAGSRLVLVHGYCSNGVWPEAFSNASSFIDAKQNRNSNDQFAQRLAQFASQWSS-FAT 417
      . : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Dicty_CMF LLIVKVVNAALHLVTFYFSGLDLSQKLEGRVIQSMGTPYQGTALAGTWASIGSAVGVGCS 467
XAC_CMF VAHSQGGMAALHLYTYYSGLDN--ATGGRVMQSVGT PYQGTNLSGVLAAGVSWFGVCG 452
XCC_CMF VAHSQGGMAALHLYTYYSGLDN--ATGGRVMQSVGT PYQGTNLSGILAAGVSWFGVCG 475
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Dicty_CMF ANDDLTVDGAALWLKSI PADKRALVYYTTTQYSTGSILN--YCNLASNADLRMAEMMVLW 525
XAC_CMF TNSDMTYDGAKAWLAGIPADARAKVNYYTTSFAKTNWTNDYCNAA SDLVNDPEDGTVE 512
XCC_CMF SNTDLTYDGAKAWLAGIPADARAKVNYYTTSFAKTNWTNDYCNAA SDLVNDPEDGTVE 535
      : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : :

Dicty_CMF IMRHTPLEGGVYLNNFKDWCHSDGMHSPQQTNTNTEYNKEMSSNSVW 571
XAC_CMF Q-VNAQLPGGVNRGHTTGQCHTTGMRDPAQYLDANRNAV MNANAAR 557
XCC_CMF Q-ANAQLPGGVNRGHTTGQCHTTGMRDPAQYLDASRNAV MNANAAR 580
      : : * * * : : . . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

```

Figura 47- Alinhamento da proteína Cmf encontrada em *D. discoideum* juntamente com as proteínas Cmf de *Xac* e *X. campestris* pv. *campestris*. Os resíduos de 1-88 (grifados) de *D. discoideum* foram mostrados por Jain e Gomer (1994) que possuem atividade similar à proteína inteira em ensaios de agregação de mutantes de *D. discoideum* em *cmf*. (*)-resíduos idênticos; (:-) resíduos altamente conservados; (.)-resíduos conservados.

Figura 48- Mapa gênico da região contendo o locus *rpf* no cromossomo de Xac. A figura mostra os genes cujos produtos interagiram entre si: RpfC-RpfG; RpfC-RpfF; RpfF-RpfC e RpfF-RpfF.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, nós identificamos um conjunto de interações envolvendo proteínas codificadas por grupos de genes com conhecidos ou possíveis papéis na patogenicidade de *Xac*, membros do gênero *Xanthomonas* e/ou outros fitopatógenos.

Subunidades, substratos e reguladores do TTSS com funções na patogenicidade de *Xac* e em outras espécies do gênero *Xanthomonas* (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Galan e Cloomer, 1999; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Plano *et al.*, 2001; Buttner and Bonas, 2002; Francis *et al.*, 2002; He, 1998) foram analisadas. Muitas das interações encontradas quando os componentes do TTSS foram utilizados na triagem da biblioteca genômica de *Xac* envolveram proteínas cujos genes estão localizados na mesma região: o *locus hrp*. Nós identificamos interações envolvendo proteínas não caracterizadas ou envolvidas no processo de patogenicidade de *Xac*, incluindo HrpG, HpaA, HpaB, HrcV, HrpB1, HrpD6, HrpD2, HrcU, HrpW, HrpB4 e HrcN. As interações proteína-proteína mostradas aqui possuem clara relevância para a compreensão dos mecanismos moleculares da patogenicidade de *Xac* relacionados com o TTSS.

Os produtos codificados pelo *locus vir* do cromossomo podem representar um TFSS funcional com substratos ainda não identificados. A interação entre XAC2622 e VirB9 indica que XAC2622 tem possibilidade de ser uma proteína de *Xac* com propriedades semelhantes a VirB7. Esta observação aumenta a possibilidade deste *locus* codificar um TFSS funcional. O fato de termos encontrado interações com VirD4 envolvendo proteínas com regiões conservadas (VIPCDs) podem revelar uma nova via de reconhecimento deste sistema. Todas estas proteínas possuem uma região C-terminal que apresenta similaridade e podem representar um conjunto de co-fatores ou substratos do TFSS. O gene de um dos membros desta família (XAC2609) está localizado no mesmo *locus vir* e, detectamos ainda, a sua interação com o produto de outro gene adjacente, o XAC2610.

Os produtos codificados pelo *locus vir* do plasmídeo pXAC64 podem representar um TFSS funcional envolvido em processos de conjugação dos

plasmídeos pXAC64 e pXAC33 onde são encontrados os quatro genes *pthA* (*pthA1*, *pthA2*, *pthA3*, *pthA4*) de *Xac*. O fato deste sistema possuir similaridade com outros complexos funcionais juntamente com as interações que nós encontramos podem revelar os mecanismos que regem esta maquinaria.

Os produtos codificados pelo *locus rpf* (“Regulators of Pathogenicity Factors”) estão envolvidos em sistemas de “Quorum Sensing” com conhecido papel na patogenicidade de *Xanthomonas* e outros patógenos (Slater *et al*, 2000; Crossman *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). Detectamos interações proteína-proteína condizentes com o modelo proposto por Slater *et al.* (2000) além de revelar possíveis mecanismos de associação/regulação deste sistema até agora não contemplados. Interações envolvendo RpfC e RpfG confirmam as predições feitas a partir da estrutura primária destas proteínas e, a princípio, realmente podem constituir um sistema de dois componentes tendo RpfC como proteína sensora capaz de auto-fosforilação e fosfotransferência para RpfG. Os resultados mostrando a associação entre RpfC-RpfF podem revelar uma nova via de regulação deste sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldon, D., B. Brito, C. Boucher, & S. Genin. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* **19**, 2304-14.
- Alfano, J.R. & A. Collmer. (2001). Mechanisms of Bacterial Pathogenesis in Plants: Familiar Foes in a Foreign Kingdom. In Principles of Bacterial Pathogenesis. Groisman, E.A. (ed). New York: Academic Press, pp 179-226.
- Anderson, D. M. & Schneewind, O. (2001). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**, 1140–1143.
- Anderson, L. B., Hertz, A. V. & Das, A. (1996). *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc. Natl Acad. Sci USA* **93**, 8889–8894.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **23**(12), 469-72.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. & Lindberg, M. (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett.* **204**(1), 163-7.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signalling in plant-microbe interactions. *Science* **276**, 726-733.
- Baron, C., D. O'Callaghan, & E. Lanka. (2002). Bacterial secrets of secretion: Euro Conference on the biology of type IV secretion processes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1359-1365.
- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S. & Zambryski, P. C. (1997). VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J. Bacteriol.* **179**(4), 1203-10.
- Bartel, P. L., J. A. Roecklein, D. SenGupta & S. Fields. (1996). A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nature Genetics* **12**, 72-77.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C. & Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32** Database issue:D138-41.
- Bejar, S., K. Cam & J.P. Bouche. (1986). Control of cell division in *Escherichia coli*. DNA sequence of *dicA* and of a second gene complementing mutation *dicA1*, *dicC*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 6821-33.
- Bennett, J. C. & Hughes, C. (2000). From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* **8**(5), 202-4.
- Blocker, A., K. Komoriya & S. Aizawa. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 3027-30.
- Bogdanove, A., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J. & Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**, 681–683.
- Bonas U., Stall R. E. & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* **218**(1), 127-36.
- Bonas, U. (1994). *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**, 79-98.
- Bruto, B., D. Aldon, P. Barberis, C. Boucher & S. Genin. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contactdependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol. Plant Microbe Interactions* **15**, 109-19.
- Bruto, B., M. Marenda, P. Barberis, C. Boucher & S. Genin. (1999). *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by *PrhA* in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* **31**, 237- 46.
- Brunings, A. M. & Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: Breaking the Surface. *Molecular Plant Pathology* **4**(3), 141–157.
- Brunings, A. M., El Yacoubi, B., Shanker, S., Yuan, Q. & Gabriel, D. W. (2001). A self-transmissible plasmid carries at least two non-*hrp* genes required to cause citrus canker disease. *Abstracts of the American Society for Microbiology General Meeting*. Orlando, Florida.
- Buell CR, V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I.T. Paulsen, M.L. Gwinn, R.J. Dodson, R.T. Deboy, A.S. Durkin, J.F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M.J. Beanan, D.H. Haft, W.C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova,

- B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S.E. Van Aken, T.V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W.L. Deng, A.R. Ramos, J.R. Alfano, S. Cartinhour, A.K. Chatterjee, T.P. Delaney, S.G. Lazarowitz, G.B. Martin, D.J. Schneider, X. Tang, C.L. Bender, O. White, C.M. Fraser, A. Collmer. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10181-10186.
- Burns, D.L. (1999). Biochemistry of type IV secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 25-29.
- Burns, D.L. (2003). Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 29-34.
- Büttner, D. & U. Bonas. (2002). Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* **21**, 5313-5322.
- Büttner, D. & U. Bonas. (2002). Port of entry-The type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**, 186-92.
- Cascales, E. & P.J. Christie. (2003). The versatile bacterial type IV secretion system. *Nature Reviews* **1**, 137-149.
- Causier, B. & Davies, B. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol.* **50**(6), 855-70.
- Chagas, M. C. M. & Parra, J. R. P. (2001). *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationships with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. *Neotropical Entomology* **30**, 55-59.
- Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot N.C., Giese B., Jenal U., Schirmer T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **101**(49), 17084-9.
- Chan, J.W. & P.H. Goodwin. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Adv.* **17**, 489-508.
- Charkowski, A.O., J.R. Alfano, G. Preston, J. Yuan, S.Y. He, & A. Collmer. (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 to Pectate. *J. Bacteriol.* **180**, 5211-5217.
- Chien, C.T., P.L. Bartel, R. Sternglanz, & S. Fields. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**, 9578-82.
- Christendat, D., Yee, A., Dharamsi, A., Kluger, Y., Savchenko, A., Cort, J. R., Booth, V., Mackereth, C. D., Saridakis, V., Ekiel, I., Kozlov, G., Maxwell, K. L., Wu, N., McIntosh, L. P., Gehring, K., Kennedy, M. A., Davidson, A. R., Pai, E. F., Gerstein, M., Edwards, A. M. & Arrowsmith, C. H. (2000). Structural proteomics of an archaeon. *Nat. Struct. Biol.* **7**(10), 903.
- Christiano, R. S. C. (2003). Componentes monocíclicos de Cancro Cítrico no sistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*-Limão tahiti-*Phyllocnistis citrella*, sob condições controladas. Dissertação de Mestrado- ESALQ-USP.
- Christie, P.J. & J.P. Vogel. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiol.* **8**, 354-360.
- Christie, P.J. (1997). *Agrobacterium* T-Complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in *Eubacteria*. *J. Bacteriol.* **179**, 3085-3094.
- Christie, P.J. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**, 294-305.
- Coates, P. J. & Hall, P. A. (2003). The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions. *J Pathol.* **199**(1), 4-7.
- Collmer, A. (1998). Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol.* **1**(4), 329-335.
- Cordeiro, M. C. R. & Sá, M. F. R. (2000). Biotecnologia e resistência a patógenos: interação planta-patógeno e o uso da biotecnologia na obtenção de plantas resistentes. *Biotecnologia* **10**.
- Cornelis, G.R. & F. Van Gijsegem. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* **54**, 735-74.
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. & Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**, 1328-33.
- Crossman, L. & Dow, J. M. (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect.* **6**(6), 623-9.
- da Silva, A.C., J.A. Ferro, F.C. Reinach, C.S. Farah, L.R. Furlan, R.B. Quaggio, C.B. Monteiro-Vitorello, M.A. Van Sluys, N.F. Almeida, L.M. Alves, A.M. do Amaral, M.C. Bertolini, L.E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergó, L.P. Ciapina, R.M.

- Cicarelli, L.L.Coutinho, J.R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J.B.Faria, A.J. Ferreira, R.C.Ferreira, M.I. Ferro, E.F.Formighieri, M.C. Franco, C.C. Greggio, A.Gruber, A.M. Katsuyama, L.T. Kishi, R.P. Leite, E.G. Lemos, M.V. Lemos, E.C. Locali, M.A. Machado, A.M. Madeira, N.M. Martinez-Rossi, E.C.Martins, J. Meidanis, C.F. Menck, C.V. Miyaki, D.H. Moon, L.M. Moreira, M.T. Novo, V.K. Okura, M.C. Oliveira, V.R. Oliveira, H.A. Pereira, A. Rossi, J.A. Sena, C. Silva, R.F.de Souza, L.A. Spinola, M.A. Takita, R.E.Tamura, E.C. Teixeira, R.I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S.M. Tsai, F.F.White, J.C.Setubal, J.P. Kitajima. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**, 459-463.
- Dang, J. L. (1995). Pièce de résistance: novel classes of plant resistance genes. *Cell* **80**, 363-366.
- Das, A. & Xie, Y. H. (2000). The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol.* **182**(3), 758-63.
- Das, A., Anderson, L. B. & Xie, Y. H. (1997). Delineation of the interaction domains of *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 by use of the yeast two-hybrid assay. *J Bacteriol.* **179**(11), 3404-9.
- Deery, W. J, Gao, T., Ammann, R. & Gomer, R.H. (2002). A single cell density-sensing factor stimulates distinct signal transduction pathways through two different receptors. *J. Biol. Chem.* **277**(35), 31972-9.
- Deery, W. J. & Gomer, R. H. (1999). A putative receptor mediating cell-density sensing in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **274**(48), 34476-82.
- Deng, W. L., Rehm A. H., Charkowski A. O., Rojas C. M. & Collmer A.(2003). *Pseudomonas syringae* exchangeable effector loci: sequence diversity in representative pathovars and virulence function in *P. syringae* pv. *syringae* B728a. *J. Bacteriol.* **185**(8), 2592-602.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He. Y. Q., Feng, J. X. & Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(19), 10995-1000.
- Drenkard, E. & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**, 740-3.
- Duan, Y. P., Castaneda, A. L., Zhao, G., Erdos, G. & Gabriel, D.W. (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.
- Dums, F., Dow, J. M. & Daniels, M. J. (1991). Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. *Mol Gen Genet.* **229**(3), 357-64.
- Duong, F., Echler, J., Price, A., Leonard, M. R. & Wickner, W. (1997). Biogenesis of the Gram-negative bacterial envelop. *Cell* **91**, 567-573.
- Dutt, M. J. & Lee, K. H. (2000). Proteomic analysis. *Curr Opin Biotechnol.* **11**(2), 176-9.
- El Yacoubi, B., Brunings, A., Yuan, Q. & Gabriel, D. W. (2001). A self transmissible plasmid isolated from *Xanthomonas campestris* carries a member of the *avr/pth* gene family and additional factor(s) required for pathogenicity. *Abstracts of 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Madison*, p650.
- Enz, S., S. Mahren, U.H. Stroehel & V. Braun. (2000). Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 637-46.
- Escher, D., Bodmer-Glavas, M., Barberis, A. & Schaffner, W. (2000). Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Mol Cell Biol.* **20**(8), 2774-82.
- Estanislau *et al.* (2001). Informativo agropecuário, **22**, 8-20.
- Evangelista, C., D. Lockshon & S. Fields. (1996). The yeast two-hybrid system: prospects for protein linkage maps. *Trends in Cell Biology* **6**, 196-201.
- Fawcett, H. S. & Jenkins, A. E. (1993). Records of citrus canker from herbarium specimens of genus *Citrus* in England and the United States. *Phytopathology* **23**, 820-824.
- Feichtenberger, E., Muller, G. W. & Guirado, N. (1997). Doença dos citrus (*Citrus spp*) Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres p261-296.
- Fernandez, D., Dang, A. T., Spudich, G. M., Zhou, X., Berger, B. R. & Christie, P. J. (1996). The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* **178**, 3156-3167.

- Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-46.
- Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J. & Lazdunski, A. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria: Transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J.* **9**, 4323-4329.
- Finlay, B. B. & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**(2), 136-69.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Flores A., J.F. Briand, O. Gadai, J.C. Andrau, L. Rubbi, V. Van Mullem, C. Boschiero, M. Goussot, C. Marck, C. Carles, P. Thuriaux, A. Sentenac, M. Werner. (1999). A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 7815-7820.
- Flores, A., Briand, J.F., Gadai, O., Andrau, J. C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A. & Werner, M. (1999). A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(14), 7815-20.
- Francis, M.S., H. Wolf-Watz & A. Forsberg. (2002). Regulation of type III secretion systems. *Curr. Opin Microbiol.* **5**, 166-172.
- FUNDECITRUS <http://www.fundecitrus.com.br>
- Gabriel, D. W. (2001). Bacterial avirulence genes. *Encyclopedia of Plant Pathology*. New York: John Wiley & Sons. p.68-71.
- Gabriel, D. W., Kingsley, M. T., Hunter, J. E. & Gottwald, T. R. (1989). Resistance of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of System Bacteriology* **39**, 14-22.
- Galan, J.E. & A. Collmer. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.
- Galperin, M. Y., Natale, D. A., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999). A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **1**(2), 303-5.
- Genin, S., Boucher, C. A. (1994). A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in Gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol Gen Genet.* **243**(1), 112-8.
- Gietz, R.D., R.A. Woods, P. Manivasakam, & R.H. Schiestl. (1998). Growth and Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Cells: A Laboratory Manual, Volume I. Culture and Biochemical Analysis of Cells. Spector, D., Goldman, R. and Leinwand, L. (eds). Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Press).
- Godiard, L., Grant, M. R., Dietrich, R. A., Kiedrowski, S. & Dangl, J. L. (1994). Perception and response in plant disease resistance. *Curr Opin Gen Dev.* **4**, 662-671.
- Gomis-Ruth, F. X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F. & Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**, 637-41.
- Goto, M. & Hyodo, H. (1985). Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. *Annual Phytopathology Society Japan* **51**, 22-31.
- Goto, M., Ohta, K. & Okabe, N. (1975). Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soil. *Annual Phytopathology Society Japan* **41**, 141-147.
- Groisman, E. A. (2001). Principles of Bacterial Pathogenesis. London-Academic Press, pp. 826.
- Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 641-679.
- Hale, C. A. & P. A. de Bôer. (1999). Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J. Bacteriol.* **181**, 167-176.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C. & Baron, C. (2000). VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **182**(16), 4505-11.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomars & S. J. Elledge. (1993). The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.

- Harrison-McMonagle, P., N. Denissova, E. Martinez-Hackert, R.H. Ebright, & A.M. Stock. (1999). Orientation of OmpR monomers within an OmpR:DNA complex determined by DNA affinity cleaving. *J. Mol. Biol.* **285**, 555-566.
- He, S. Y. (1998). Type III protein secretions systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 363-92.
- Hormaeche, I., Iloro, I., Arrondo, J. L., Goni, F. M, de la Cruz, F. & Alkorta, I. Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J Biol Chem.* **279**(12), 10955-61.
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **62**, 379-433.
- Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik & U. Bonas. (1998). *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiology* **29**, 1379-1390.
- Ito, T., Chiba, T. & Yoshida, M. (2001). Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol.* **19**(10 Suppl), S23-7.
- Jain, R. & Gomer, R. H. (1994). A developmentally regulated cell surface receptor for a density-sensing factor in *Dictyostelium*. *J Biol Chem.* **269**(12), 9128-36.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V. & Christie, P. J. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J Bacteriol.* **185**(9), 2867-78.
- James, P., J. Halladay & E.A. Craig. (1996). Genomic libraries a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Kanamori, H. & Tsuyumu, S. (1998). Comparison of Nucleotide Sequences of Canker-forming and Non-canker-forming *pthA* Homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Annu. Phytopathol. Soc. Jpn.* **64**, 462-470.
- Karlinsey, J. E., Lonner, J., Brown, K. L. & Hughes, K. T. (2000). Translation/secretion coupling by type III secretion systems. *Cell* **102**(4), 487-97.
- Karplus, K., Barrett, C. & Hughey R. (1998). Hidden Markov Models for Detecting Remote Protein Homologies. *Bioinformatics* **14**, 846-856.
- Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.
- Kenny, L.K. (2002). Structure/Function relationships in OmpR and other winged helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 135-141.
- Kim, J.-G., B.K. Park, C.-H. Yoo, E., Jeon, J. Oh & I. Hwang. (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines* Hrp Pathogenicity Island. *J. Bacteriol.* **185**, 3155-3166.
- Koomey, J. M. & Falkow, S. (1994). Nucleotide sequence homology between the immunoglobulin A1 protease genes of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* serotypeb. *Infect. Immun.* **57**, 3097-3105.
- Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N. & Baron, C. (2002). Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11405-11410.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E., Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-5.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. & Galan, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(18), 10225-30.
- Kunkel, B., Bent, A. F., Dahlbeck, D., Innes, R. W. & Staskawicz, B. J. (1993). *RPS2*, an Arabidopsis disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Plant Cell* **5**, 865-875.
- Lahaye, T. & Bonas, U. (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* **6**(10), 479-85.
- Lavander, M., L. Sundberg, P.J. Edqvist, S.A. Lloyd, H. Wolf-Watz & A.Forsberg. (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.
- Lawson, R. H., Dienelt, M. M. & Civerolo, E. L. (1989). Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: light and scanning electron microscopy. *Phytopathology* **79**, 329-335.

- Lecrenier, N., Foury, F. & Goffeau, A. (1998). Two-hybrid systematic screening of the yeast proteome. *BioEssays* **20**, 1-6.
- Lee, V. T. & Schneewind, O. (2001). Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* **15**, 1725–1752.
- Llosa, M., Gomis-Ruth, F. X., Coll, M. & de la Cruz, Fd. F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol.* **45**(1), 1-8.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 375-382.
- Ma, J. & Ptashne, M. (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**(5), 847-53.
- Macnab, R.M. (1996). Flagella and Motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition. Neidhart, F.C. (ed.). New York: ASM Press, Chapter 10.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C. & Arlat, M. (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Mol. Microbiol.* **27**, 437–453.
- Minamino, T. & MacNab, R. M. (2000). FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol.* **37**(6), 1494-503.
- Moncalian, G., Grandoso, G., Llosa, M. & de la Cruz, F. (1997). oriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol.* **270**(2), 188-200.
- Moreira, L. M., de Souza, R. F., Almeida Jr, N. F., Setúbal, J. C., Oliveira, J. C. F., Furlan, L. R., Ferro, J. A. & da Silva, A. C. R. (2004). Comparative Genomics Analyses of Citrus-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 163-184.
- Nakai, K. & M. Kanehisa. (1991). Expert System for Predicting ProteinLocalization Sites in Gram-Negative Bacteria. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **11**, 95-110.
- Nascimento, J. F., Rodrigues Neto, J., Alves, J. M. A., Rego, M., M. & Araújo, A. E. S. (2003). Ocorrência de Cancro Cítrico no Estado de Rondônia. *Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia* **26**.
- Neidhardt, F. C. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. ASM Press.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. & Bonas, U. (2002). The novel type III secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island. *J. Bacteriol.* **184**, 1340–1348.
- Pantoja, M., Chen, L., Chen, Y. & Nester, E. W. (2002). *Agrobacterium* type IV secretion is a two-step process in which export substrates associate with the virulence protein VirJ in the periplasm. *Mol Microbiol.* **45**(5), 1325-35.
- Pao, G.M., & M.H. Saier. (1995). Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J. Mol. Evol.* **40**, 136-154.
- Plano, G.V, J.B. Day & F. Ferracci. (2001). Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol.* **40**, 284-293.
- Ponting, C.P. & L. Aravind. (1997). PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.* **7**, 674-677.
- Poulsen, K., Brandt, J., Hjorth, J. P., Thogersen, H. C. & Kilian, M. (1989). Cloning and sequencing of the immunoglobulin S 1 protease gene (iga) of *Haemophilus influenzae* serotype b. *Infect. Immun.* **57**, 3097-3105.
- Rain, J. C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. & Legrain, P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**, 211-5.
- Rossetti, V. V. (2001). Manual ilustrado de doenças dos citros-Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, 207p.
- Rossetti, V., Feichtenberger, E. & Silveira, M. L. (1981). Cancro Cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) bibliografia analítica. São Paulo, Instituto Biológico, 203p.
- Rossetti, V. (1997). Citrus canker in Latin America: A review. Proceedings of the International Society of Citriculture **3**, 918-924.
- Rossier, O., G. Van den Ackerveken & U. Bonas. (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.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J. & Christie, P. J. (2001). Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol.* **183**(20), 5813-25.

- Salanoubat M, S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J.C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choise, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, C.A. Boucher. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.
- Sambrook, J. & D.W. Russel. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandkvist, M., Michel, L. O., Hough, L. P., Morales, V. M., Bagdasarian, M., Koomey, M., DiRita, V. J. & Bagdasarian, M. (1997). General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* **179**(22), 6994-7003.
- Schaas, N. W., Vidaver, A. K., Lacy, G. H., Rufolph, K. & Jones, J. B. (2000). Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* and *Xanthomonads* and recommendations. *Phytopathology* **90**(3), 208-213.
- Schmitt, W. & Hass, R. (1994). Genetic Analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: Structural similarities with de IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol* **12**, 307-319.
- Schneiker, S., Keller, M., Droge, M., Lanka, E., Puhler, A. & Selbitschka, W. (2001). The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfafa. *Nucleic Acids Res.* **29**, 5169-81.
- Schubert, T. S., Rizvi, A. S., SUN, X., Gottwald, T. R., Graham, J. H. & Dixon, W. N. (2001). Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-Again. *Plant Disease* **85**-4, 340-356.
- Schulte, R. & U. Bonas. (1992). Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* **174**, 815-823.
- Simone M., McCullen, C. A., Stahl, L. E. & Binns, A. N. (2001). The carboxy-terminus of VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* is required for its transport to host cells by the virB-encoded type IV transport system. *Molecular Microbiology* **41**(6), 1283-1293.
- Simpson A.J., F.C. Reinach, P. Arruda, F.A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L.M. Alves, J.E. Araya, G.S. Baia, C.S. Baptista, M.H. Barros, E.D. Bonaccorsi, S. Bordin, J.M. Bove, M.R. Briones, M.R. Bueno, A.A. Camargo, L.E. Camargo, D.M. Carraro, H. Carrer, N.B. Colauto, C. Colombo, F.F. Costa, M.C. Costa, C.M. Costa-Neto, L.L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A.P. Facincani, A.J. Ferreira, V.C. Ferreira, J.A. Ferro, J.S. Fraga, S.C. Franca, M.C. Franco, M. Frohme, L.R. Furlan, M. Garnier, G.H. Goldman, M.H. Goldman, S.L. Gomes, A. Gruber, P.L. Ho, J.D. Hoheisel, M.L. Inqueira, E.L. Kemper, J.P. Kitajima, J.E. Krieger, E.E. Kuramae, F. Laigret, M.R. Lambais, L.C. Leite, E.G. Lemos, M.V. Lemos, S.A. Lopes, C.R. Lopes, J.A. Machado, M.A. Machado, A.M. Madeira, H.M. Madeira, C.L. Marino, M.V. Marques, E.A. Martins, E.M. Martins, A.Y. Matsukuma, C.F. Menck, E.C. Miracca, C.Y. Miyaki, C.B. Monteriro-Vitarello, D.H. Moon, M.A. Nagai, A.L. Nascimento, L.E. Netto, A.J. Nhani, F.G. Nobrega, L.R. Nunes, M.A. Oliveira, M.C. de Oliveira, R.C. de Oliveira, D.A. Palmieri, A. Paris, B.R. Peixoto, G.A. Pereira, H.A. Pereira Jr, J.B. Pesquero, R.B. Quaggio, P.G. Roberto, V. Rodrigues, A.J. de M Rosa, V.E. de Rosa Jr, R.G. de Sa, R.V. Santelli, H.E. Sawasaki, A.C.R. da Silva, A.M. da Silva, F.R. da Silva, W.A. da Silva Jr, J.F. da Silveira, M.L. Silvestri, W.J. Siqueira, A.A. de Souza, A.P. de Souza, M.F. Terenzi, D. Truffi, S.M. Tsai, M.H. Tsuchako, H. Vallada, M.A. Van Sluys, S. Verjovski-Almeida, A.L. Vettore, M.A. Zago, M. Zatz, J. Meidanis & J.C. Setubal. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**, 151-157.
- Slater, H., A. Alvarez-Morales, C.E. Barber, M.J. Daniels & J.M. Dow. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.* **38**, 986-1003.
- Soderberg, M. A., Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2004). The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *J Bacteriol.* **186**(12), 3712-20.
- Sohi, G. S. & Sandhu, M. S. (1968). Relationship between Citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton) injury and Citrus canker (*Xanthomonas citri* (Hase) Dowson) incidence on citrus leaves. *Journal of Research of the Punjab Agricultural University* **5**, 66-69.
- Song, W. Y., Pi, L. Y., Wang, G. L., Gardner, J., Holsten, T. & Ronald, P. C. (1997). Evolution of the Xa21 disease resistance gene family. *Plant Cell* **9**, 1279-1287.

- Spudich, G. M., Fernandez, D., Zhou, X. & Christie, P. J. (1996). Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 7512–7517.
- Stall, R. E., Marco, G. M. & Canteros de Echenique, B. I. (1982). Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of citrus. *Phytopathology* **72**(8), 1097–1100.
- Stiefel, A., S. Mahren, M. Ochs, P.T. Schindler, S. Enz & V. Braun. (2001). Control of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: mutations in region 2.1 of the FecI extracytoplasmic-function sigma factor suppress mutations in the FecR transmembrane regulatory protein. *J Bacteriol.* **183**, 162–170.
- Stock, A.M., V.L. Robinson & P.N. Goudreau. (2000). Two component signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* **69**, 183–215.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R. H. & Gabriel, D. W. (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.
- Swings, J. G. & Civerolo, E. L. (1993). *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London.
- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P. & Benziman, M. (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**(17), 4416–25.
- Tauch, A., Schneiker, S., Selbitschka, W., Puhler, A., van Overbeek, L. S., Smalla, K., Thomas, C. M., Bailey, M. J., Forney, L. J., Weightman, A., Ceglowski, P., Pembroke, T., Tietze, E., Schroder, G., Lanka, E. & van Elsas, J. D. (2002). The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. *Microbiology* **148**(Pt 6), 1637–53.
- Thorstenson, Y. R., Kuldau, G. A. & Zambryski, P. C. (1993). Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: implications for the formation of a T-DNA transport structure. *J Bacteriol.* **175**(16), 5233–41.
- Uetz P., L.Giot, G.Cagney, T.A. Mansfield, R.S. Judson, J.R. Knight, D.Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A.Qureshi-Emili, Y. Li, B.Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M.Johnston, S. Fields & J.M. Rothberg. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623–627.
- Uetz, P. & Hughes, R. E. (2000) Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol.* **3**(3), 303–8.
- Van Haastert, P. J., Bishop, J. D. & Gomer, R. H. (1996). The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *J Cell Biol.* **134**(6), 1543–9.
- Van Sluys M.A., M.C. de Oliveira, C.B. Monteiro-Vitorello, C.Y. Miyaki, L.R. Furlan, L.E. Camargo, A.C. da Silva, D.H. Moon, M.A. Takita, E.G.Lemos, M.A. Machado, M. Ferro, F.R. da Silva, M.H. Goldman, G.H.Goldman, M.V. Lemos, H. El-Dorry, S.M. Tsai, H. Carrer, D.M. Carraro, R.C. de Oliveira, L.R. Nunes, W.J. Siqueira, L.L. Coutinho, E.T. Kimura, E.S. Ferro, R. Harakava, E.E. Kuramae, C.L. Marino, E. Giglioti, I.L. Abreu, L.M. Alves, A.M. do Amaral, G.S. Baia, S.R. Blanco, M.S. Brito, F.S. Cannavan, A.V. Celestino, A.F. da Cunha, R.C. Fenille, J.A. Ferro, E.F. Fornighieri, L.T. Kishi, S.G. Leoni, A.R. Oliveira, V.E. Rosa Jr, F.T. Sasaki, J.A. Sena, A.A. de Souza, D. Truffi, F. Tsukumo, G.M. Yanai, L.G. Zaros, E.L. Civerolo, A.J. Simpson, N.F. Almeida Jr, J.C. Setubal and J.P. Kitajima. (2003). Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J. Bacteriol.* **185**, 1018–1026.
- Von Bodman, S. B., Bauer, W. D. & Coplin, D. L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* **41**, 455–82.
- Walhout, A. J. M., R. Sordella, X. Lu, J. L. Hartley, G. F. Temple, M. A. Brasch, N. Thierry-Mieg & M. Vidal. (2000). Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**, 116–122.
- Wang, G. L., Ruan, D. L., Song, W. Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L. Y., Zhang, S., Zhang, Z., Fauquet, C., Gaut, B.S., Whalen, M. C. & Ronald, P. C. (1996). Xa21 encodes a receptor like molecule with leucine-rich repeat domain that determinates race-specific recognition and is subject to adaptative evolution. *Plant Cell* **8**, 375–391.

- Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E, Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X. & Zhang, L. H. (2004). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol.* **51**(3), 903-12.
- Ward, D.V., O. Draper, J.R. Zupan & P.C. Zambryski. (2002). Peptidelinkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 11493-11500.
- Ward, J. E., Akiyoshi, D. E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1988). Characterization of the virB operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Biol Chem.* **263**(12), 5804-14.
- Washburn, M. P. & Yates, J. R. (2000). Analysis of the microbial proteome. *Curr Opin Microbiol.* **3**(3), 292-7.
- Wengelnik, K. & U. Bonas. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **178**, 3462-3469.
- Wengelnik, K., O. Rossier & U. Bonas. (1999). Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all hrp genes. *J. Bacteriol.* **181**, 6828-6831.
- White, F. F., Yang, B. & Johson, L. B. (2000). Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr Opin Plant Biol.* **3**(4), 291-8.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol* **25**(4), 365-404.
- Williams, A.W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S. Aizawa, I. Kawagishi & R.M. Macnab. (1996). Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**, 2960-2970.
- Williams, H. P. & Harwood, A. J. (2003). Cell polarity and *Dictyostelium* development. *Curr Opin Microbiol.* **6**(6), 621-7.
- Winther-Larsen, H.C. & M. Koomey. (2002). Transcriptional, chemosensory and cell-contact-dependent regulation of type IV pilus expression. *Curr Opin Microbiol.* **5**, 173-178.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. & Cornelis, G. R. (1994). YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol.* **176**(6), 1561-9.
- Wood DW, J.C. Setubal, R. Kaul, D.E. Monks, J.P. Kitajima, V.K. Okura, Y. Zhou, L. Chen, G.E. Wood, N.F. Almeida Jr, L. Woo, Y. Chen, I.T. Paulsen, J.A. Eisen, P.D. Karp, D. Bovee Sr, P. Chapman, J. Clendenning, G. Deatherage, W. Gillet, C. Grant, T. Kutayavin, R. Levy, M.J. Li, E. McClelland, A. Palmieri, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, Z. Wu, P. Romero, D. Gordon, S. Zhang, H. Yoo, Y. Tao, P. Biddle, M. Jung, W. Krespan, M. Perry, B. Gordon-Kamm, L. Liao, S. Kim, C. Hendrick, Z.Y. Zhao, M. Dolan, F. Chumley, S.V. Tingey, J.F. Tomb, M.P. Gordon, M.V. Olson & E.W. Nester. (2001). The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2317-2323.
- Yang, M., Z. Wu & S. Fields. (1995). Protein-protein interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1152-1156.
- Yang, Y. & Gabriel, D. W. (1995). *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 627-631.
- Yeo, H. J., Savvides, S. N., Herr, A. B., Lanka, E. & Waksman, G. (2000). Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell.* **6**(6), 1461-72.
- Zhang, L. H. (2003). Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* **8**(5), 238-44.
- Zhu, H., Bilgin, M. & Snyder, M. (2003). Proteomics. *Annu Rev Biochem.* **72**, 783-812.
- Zhu, J., P.M. Oger, B. Schrammeijer, P.J. Hooykaas, S.K. Farrand, S.C. Winans. (2000). The basis of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**, 3885-3895.
- Ziegelin, G., Pansegrau, W., Lurz, R. & Lanka E. (1992). TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. *J. Biol. Chem.* **267**(24), 17279-86.

Expressão da Miosina de Músculo Esquelético na Levedura *Pichia pastoris*

As miosinas são proteínas altamente conservadas, encontradas em todas as células eucarióticas, onde apresentam função motora para diversos movimentos através de sua capacidade de converter energia química em força mecânica (movimento e/ou tensão). Nosso principal objetivo neste período foi a expressão da miosina de músculo esquelético de ave utilizando um sistema eucariótico e, assim, produzir uma proteína ativa para a realização de ensaios de correlação estrutura-função através da construção de mutantes.

Miosina, uma macromolécula hexamérica composta por duas cadeias pesadas (1980 a.a.) e dois pares de cadeias leves, é o principal componente dos filamentos grossos musculares. A cadeia pesada consiste em uma porção N-terminal globular caracterizada como “cabeça” (resíduos de 1-780), ligada a um longo segmento com estrutura “coiled-coil” denominado “cauda”. A cabeça contém os sítios de ligação da actina e do ATP. Os sítios de interação das cadeias leves na cadeia pesada correspondem aos resíduos 780-842 (Fig. 1; Rayment *et al.*, 1993).

Figura 1: Estrutura da cabeça da miosina contendo os sítios de ligação a ATP e actina, além da presença das cadeias leves regulatória e essencial (Rayment *et al.*, 1993)

Fragmentos do cDNA da cadeia pesada da miosina de músculo esquelético de embrião de galinha foram subclonados no vetor pPIC9Kf1⁺ (Fig. 2), sob o controle do promotor da álcool oxidase (AOX1), de *Pichia pastoris*. Duas diferentes construções para expressão intracelular foram obtidas. A primeira codifica o domínio motor compreendido entre os resíduos 1-780 (pPICMyol; Fig. 3), enquanto a outra codifica o domínio motor juntamente com o sítio de ligação das cadeias leves e uma pequena porção da região S2, compreendida entre os resíduos 1-962 da cadeia pesada (pPICMyoll; Fig. 4).

As linhagens de *P. pastoris* (Tabela 1) (Clare e Romanos, 1995) foram transformadas com os vetores linearizados com diferentes enzimas de restrição.

Tabela 1- Linhagens da levedura *Pichia pastoris* utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes (Clare e Romanos, 1995).

Linhagem	Fenótipo	Genótipo
KM71	<i>Mut^s, Arg⁺</i>	<i>arg4 his4 aox1::ARG4</i>
GS115	<i>Mut⁺</i>	<i>his4</i>
SMD1168	<i>Mut⁺</i>	<i>his4 pep4</i>

P. pastoris pode apresentar dois fenótipos distintos quanto ao metabolismo do metanol: *Mut^s* ("methanol utilization slow") e *Mut⁺* (methanol utilization plus") (Tabela 1). A linhagem KM71 é *Mut^s* por apresentar o gene AOX1 nocauteado e, portanto, cresce lentamente na presença de metanol (Clare *et al.*, 1998). As demais são *Mut⁺* devido a presença do gene AOX1 sem alterações.

As linhagens KM71, GS115 e SMD1168 possuem uma mutação no gene da histidinol desidrogenase (*his4*) que impede a síntese de histidina pela levedura. Os plasmídeos de expressão para *P. pastoris* carregam o gene *his4* que complementa o gene mutado do genoma da levedura (Clare *et al.*, 1998). Os transformantes foram selecionados através da capacidade de crescimento em meio de cultura sem histidina.

As amostras de DNA foram individualmente linearizadas com *SalI* ou *PmeI*. A linearização dos vetores em determinadas regiões, exceto na região do inserto, pode produzir eventos de recombinação homóloga, integração ou ainda ambos combinados. A linearização com *SalI* permite eventos de integração no gene *His4* do genoma da levedura, enquanto a linearização com *PmeI* permite eventos de recombinação/integração no gene *AOX1*. As células de levedura foram então transformadas com os vetores linearizados através de eletroporação e selecionadas em meio de cultura sem histidina. Após a obtenção dos clones, iniciamos o processo de análise do DNA genômico dos transformantes para confirmarmos a presença dos genes de interesse.

Figura 2: Mapa genético do vetor pPIC9Kf1⁺ de *P. pastoris*. O vetor de expressão pPIC9Kf1⁺ de *P. pastoris* é uma modificação do plasmídeo pPIC9 (Invitrogen) em que o gene *Kan^r*, o qual possibilita a seleção de clones com múltiplas integradas utilizando geneticina (G418), e a origem de replicação f1 do fago, que permite a obtenção de ssDNA, foram introduzidos (D. C. Tessier, "Biotechnology Research Institute", Montreal-Canadá).

Figura 3: Mapa genético do vetor pPIC9Kf1 após subclonagem do segmento do cDNA que codifica os 780 primeiros aminoácidos da cadeia pesada da miosina (Miosina 1-780), gerando o vetor pPIC9MyoI.

Figura 4: Mapa genético do vetor pPIC9Kf1 após subclonagem do segmento do cDNA que codifica os 962 primeiros aminoácidos da cadeia pesada da miosina (Miosina 1-962), gerando o vetor pPIC9MyoII.

Os DNA genômicos dos clones foram analisados através da PCR utilizando “primers” específicos para miosina de músculo esquelético. Foram analisados de 50-100 clones de cada transformação por este método, sendo que aproximadamente 60% apresentavam o inserto de tamanho esperado.

A indução da expressão heteróloga em pequena escala foi feita através do crescimento dos clones selecionados em meio de cultura contendo metanol e a proteína recombinante foi detectada após lise celular e análise do extrato bruto através de Western blot. Ensaios preliminares de tolerância ao metanol e variação da composição do meio de cultura permitiram determinar as melhores condições de cultivo e expressão da proteína recombinante. Nesta primeira fase, não foi observada a produção da proteína recombinante em géis de SDS-PAGE corados com Coomassie-Blue.

Alguns estudos têm mostrado que existem dois fatores essenciais que afetam a expressão de proteínas em *P. pastoris*: o número de cópias do vetor integrado ao genoma e o nível de aeração durante a indução (Clare e Romanos, 1995). O processo de seleção utilizando geneticina, um antibiótico aminoglicosídico utilizado na seleção de células de mamíferos, plantas e leveduras, pode ser usado para identificação de clones com múltiplas cópias integradas de vetores que possuem o gene *Kan^r* (que confere resistência à geneticina). Foram feitos meios de cultura onde a concentração de geneticina foi

gradativamente aumentada, já que existe uma relação entre a resistência e o número de cópias integradas. Nosso ensaio mostrou um crescimento de clones em até 1mg/mL de geneticina o que, segundo Clare *et al.* (1998), representa de 3-4 cópias do vetor integradas ao genoma da levedura. Foram isoladas 37 colônias da linhagem GS115 transformada com pPIC9Myol e 28 colônias desta mesma linhagem transformada com pPIC9MyolII. A seleção com as demais linhagens resultaram em um número muito reduzido de colônias e não foram utilizadas para o ensaio de indução em pequena escala.

Todas as colônias obtidas, 37 com pPIC9Myol e 28 com pPIC9MyolII, foram analisadas quanto à expressão da proteína recombinante em meio MM após 24h de indução. Através de SDS-PAGE com o gel corado com Coomassie-Blue não foi possível detectar sinais de expressão. Assim, através de Western-Blot utilizando anticorpo monoclonal para miosina de músculo esquelético, detectamos a presença da proteína em um clone (pPIC9Myol-21) transformado com o vetor pPIC9Myol que resulta na expressão do fragmento 1-780 da cadeia pesada (Fig. 5). Foram detectadas diversas reações cruzadas do anticorpo com proteínas da própria levedura, mas podemos notar que a banda correspondente ao fragmento 1-780 não foi detectada no clone controle mesmo quando analisamos diferentes condições de cultivo. A banda observada possui o mesmo tamanho do controle do mesmo fragmento da miosina (1-780) produzida em *E. coli*, e está ausente nas amostras transformada com o vetor pPIC9Kf1⁺ e com o vetor pPIC9MyolII. No caso desta última construção, não foi observada a produção do fragmento 1-962 em nenhum dos 28 clones analisados.

Figura 5- Western-Blot dos extratos celulares dos clones transformados com as construções pPIC9Myol e pPIC9MyolII em meio MM. PM, marcador de peso molecular (não corado, High Molecular Weight Range, SigmaMarker); MR, miosina recombinante produzida em *E. coli*; 1-5, clones 18, 19, 20, 21 e 37 transformados com pPIC9Myol; C, linhagem GS115 transformada com o vetor pPIC9Kf1⁺ (controle negativo); 6-11, clones 3, 4, 5, 6, 7 e 8 transformados com pPIC9MyolII. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubada com anticorpo monoclonal anti-miosina produzido em camundongo. A seta indica a cabeça da miosina recombinante do clone pPIC9Myol-21.

Uma nova metodologia, proposta pelo nosso grupo de pesquisa, permitiu isolar clones com maior números de cópias do vetor integrado ao genoma através do processo de re-transformação dos clones que inicialmente apresentaram pequena produção da proteína recombinante e/ou baixa resistência a geneticina. Como resultado, obtivemos um aumento considerável dos níveis de expressão.

A metodologia de obtenção de clones com maior número de integrações consistiu na re-transformação do clone pPIC9MyoI-21. O método baseia-se no fato que, apesar do clone não possuir mais auxotrofia para His devido à integração do vetor, a seleção poderia ser feita através de aumento gradativo da concentração de geneticina no meio de cultura. Após a re-transformação, as células foram plaqueadas em meio YPD contendo 3, 4, 5 ou 6mg/mL de geneticina. Os níveis de expressão aumentaram de acordo com a capacidade de crescimento em maiores níveis de geneticina. A figura 2 mostra os níveis de produção da proteína recombinante após este processo.

A mesma metodologia foi utilizada para isolar clones transformados com a construção pPICMyoII e um clone foi isolado com 4mg/ml de geneticina e apresentou a expressão da proteína recombinante (Fig. 6, linha 7).

Os clones pPICMyoI-21/6, pPICMyoI-21/4 e pPICMyoII-1/4 (isolados de placas contendo 6, 4 e 4mg/mL de geneticina, respectivamente) foram utilizados para a realização dos ensaios de solubilidade e atividade. O processo foi padronizado em pequena escala através de três diferentes métodos de lise celular: bolas de vidro, "French Press" e lise enzimática utilizando a enzima Novozima (Novo BioLabs).

Figura 6- Western-Blot dos extratos celulares dos clones transformados com a construção pPIC9MyoI após o processo de re-transformação. 2, 4, 6 e 8- clones selecionados com 6, 3, 4 e 5mg/mL de geneticina após indução com metanol. 1, 3, 5 e 7- clones não induzidos. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubada com anticorpo monoclonal anti-miosina produzido em camundongo.

O ensaio de solubilidade consistiu em ultracentrifugar a amostra após o processo de lise e a subsequente análise das frações solúveis e insolúveis por SDS-PAGE e Western-blot. A realização do mesmo ensaio utilizando como padrão a porção S1 purificada de músculo esquelético mostrou que a proteína permanece no sobrenadante mesmo após a ultracentrifugação. A figura 7 mostra que a proteína de 780 aminoácidos encontra-se precipitada após este processo, enquanto que a proteína de 962 aminoácidos possui uma pequena fração solúvel que se encontra no sobrenadante.

O ensaio de co-sedimentação com actina utilizando diferentes condições de reação (com e sem ATP) mostrou que, apesar de termos uma fração parcialmente solúvel, o comportamento do fragmento de 962 aminoácidos é independente da presença ou ausência de actina, assim como com relação ao ATP (Fig. 8). O extrato bruto foi inicialmente lisado, ultracentrifugado, a fração solúvel coletada, concentrada e submetida ao ensaio funcional. O comportamento desta proteína produzida em levedura mostrou-se semelhante à expressa em *E. coli*, onde é observada uma fração solúvel que, depois de determinado período, torna-se insolúvel (dados não mostrados). Além disso, a solubilidade da proteína expressa em *E. coli* também independe da presença de actina (dados não mostrados).

Figura 7 – Ensaio de solubilidade nos extratos celulares de clones re-transformados com as construções pPIC9MyoI e pPIC9MyoII após o processo de lise celular. MR, miosina recombinante produzida em *E. coli*; 1, 2 e 3/4, 5 e 6- mistura, sobrenadante e pellet, respectivamente, dos clones pPIC9MyoI-21/6 e 21/4; 7, 8 e 9- mistura, sobrenadante e pellet, respectivamente, do clone pPIC9MyoII-1/4. A seta indica a fração solúvel da proteína recombinante.

Figura 8- Ensaio de co-sedimentação da fração o solúvel da miosina recombinante produzida pelo clone pPICMyoII-1/4. 1-fração solúvel. 2 e 3- sobrenadante e pellet após ultracentrifugação. 4 e 5- sobrenadante e pellet após adição de ATP. 6 e 7- sobrenadante e pellet após adição de actina. 8 e 9- sobrenadante e pellet após adição de actina e ATP. MR- miosina recombinante produzida em *E. coli*.

Srikakulam e Winkelmann (1999) conseguiram produzir pequenas quantidades da miosina muscular recombinante utilizando o sistema de expressão *in vitro* através de extrato de reticulócito de coelho. Nesse estudo é proposto que a miosina para adquirir sua conformação correta necessita da interação com chaperones de eucariotos superiores do tipo CCT (Srikakulam e Winkelmann, 1999). Assim, como descrito para actina e tubulina, estas chaperonas interagem com a proteína em formação e constituem um complexo estável até que a chaperona encontre uma região denominada “release sequence”, constituída por RK(A,C,T)F, em que ocorre a dissociação do complexo, e liberação da proteína com a conformação correta (Zabala *et al.*, 1996). Uma seqüência homóloga a esta foi encontrada na parte final do domínio catalítico da miosina (R⁷⁰⁸K⁷⁰⁹G⁷¹⁰F⁷¹¹), precedendo o sítio de ligação com as cadeias leves. Esta seqüência é encontrada em todos os membros da família das cadeias pesadas das miosinas II de músculo estriado. As miosinas não-musculares e de músculo liso também possuem uma “release sequence” constituída por RKAF, mas esta está localizada na hélice de interação com as cadeias leves.

O alinhamento da miosina de embrião de músculo esquelético com a miosina II de levedura mostra uma baixa identidade entre estas proteínas na região “release sequence”. Isso pode indicar que as interações de chaperones de levedura com miosina II endógenas são diferentes das encontradas em músculo. Uma análise mais detalhada do alinhamento de todas as miosinas II musculares e não-musculares mostram que o fungo *Dictyostelium discoideum* possui a seqüência RKGF na mesma posição da miosina de

músculo esquelético (dados não mostrados). Baseados nessa informação, nós exploramos a possibilidade de expressar miosina muscular neste organismo.

D. discoideum, em condições ideais, apresenta-se em forma de amebas que se dividem em intervalos de poucas horas. Em condições de carência nutricional as amebas param de se dividir, se agrupam para formar “mounds” e, posteriormente, formam uma estrutura primária denominada “slug” que migra em função da temperatura e luz ideais (Kessin *et al.* 1992). A medida que esta estrutura migra, as células passam por uma etapa de diferenciação, iniciando um processo que resulta, cerca de 30 horas depois, na formação de talos e corpos de frutificação. O ciclo do *D. discoideum* é mostrado na figura 9.

Figura 9- Ciclo de vida do organismo *Dictyostelium discoideum* quando em estado de carência nutricional. a) agregação; b) formação de “mound”; c) “slug” com características de mobilidade; d) processo de culminação com o início da formação do talo; e) início da formação do corpo de frutificação; f) corpo de frutificação.

As células amebóides de *D. discoideum* se agregam por quimiotaxia, migrando na direção de cAMP secretado pelas células vizinhas. Linhagens mutantes em miosina II podem se locomover e responder quimiotaticamente a uma fonte de cAMP, embora ambos processos estejam, de alguma forma, alterados. Os mutantes são incapazes de formar o anel contrátil no final da mitose, gerando assim células de tamanho acima do normal, multinucleadas e que após 3-4 dias de crescimento em meio líquido sofrem lise. Além disso, são incapazes de formar estruturas como talos e corpos de frutificação, não ultrapassando o estado de “mound” (Kessin *et al.* 1992).

Nossa expectativa era de expressar miosina II de músculo esquelético em células HS1, que são mutantes em miosina II (Ruppel *et al.*, 1994). A princípio através da utilização do vetor integrativo pDNeo67 (Fig. 10; Silva e Klein, 1990) e do vetor extracromossômico pBIG (Fig. 11; Egelhoff *et al.*, 1993), conseguimos clonar, fizemos os