



UNICAMP

Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise de chaperonas hipotéticas da *Xanthomonas axonopodis*
pv. *citri* por espectrometria de massas**

Aluna: Adriana Martini Martins (RA: 022974)

Orientadora: Profa. Dra. Ljubica Tasic

Co-Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Campinas, São Paulo

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M366a Martins, Adriana Martini.
Análise de chaperonas hipotéticas da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* por espectrometria de massas /
Adriana Martini Martins. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientadora: Ljubica Tasic.
Co-orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 2. Chaperonas secretórias. 3. Espectrometria de massas. I. Tasic, Ljubica. II. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Mass spectrometry analysis of secretion chaperones from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Palavras-chaves em inglês: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Secretion chaperones, Mass spectrometry

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Prof^a Dr^a Ljubica Tasic (orientadora), Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Shaker Chuck Farah (IQ-USP/SP)

Data de defesa: 27/10/2010

Aos meus pais, co-autores de todas as minhas conquistas.

'Tudo que chega, chega sempre por algum motivo'

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus, e à família que Ele escolheu prá mim. Sem o amor e apoio de vocês, nada disso seria possível!

À professora Buba, pela orientação e por todo o aprendizado proporcionado nestes anos de trabalho conjunto.

Ao grupo do laboratório: Ju, Alê, Fabio, Iza, Marcela, Dosil, Ana, Dani, Pry, Chico, Prof. Nelson Durán e todos os agregados, pelo ambiente de trabalho agradável.

À estrutura provida pelo Instituto de Química durante toda a minha formação acadêmica.

Ao professor Marco Zezzi, pela co-orientação; e ao seu grupo: Herbert, Marcelo, Adilson e Lidiane, pela grande ajuda nos protocolos de digestão enzimática e corridas de HPLC.

Aos professores Carlos Ramos, Celso Benedetti (LNBio/LNLS) e Chuck Farah (IQ/USP-SP) por ceder equipamentos e cepas de *Xac* utilizados neste trabalho.

Ao professor Fabio Gozzo, pelas sugestões dadas no exame de qualificação; e ao seu grupo: Alana, Pilau, Alexandre, Luis e Mariana, pela paciência na obtenção dos espectros de massas.

Às funcionárias do Laboratório MAS do LNBio/LNLS: Adriana, Margareth, Taís e Bianca.

Ao professor Marcos Eberlin, pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos funcionários do IQ: Rita e José (GC) e Daniel (SEM).

À professora Mary Heidi, do IB, pelo auxílio com o protocolo de obtenção das imagens de SEM.

Ao pessoal da CPG: Bel, Miguel e Isabel, sempre atenciosos e prestativos com os trâmites a resolver.

A CAPES, FAPESP, CNPq, CPG-IQ e FAEPEX, pelo apoio financeiro dado durante o desenvolvimento deste projeto.

A todos os meus amigos, família que Deus me permitiu escolher, por compartilharem comigo momentos tão importantes de suas vidas, e, principalmente, por estarem presentes em momentos tão importantes da minha:

- ★ Luzinha, Tati, Barbarete e Taísa, moradoras da J6A, gatas que eu quero muito!
- ★ Thaís, André, Renatcheca e Tati, companheiros de moradia de longa data, que sempre estavam lá quando eu precisei, por serem muito mais que 'o pessoal que mora comigo'.
- ★ toda a turma 03, pelos momentos de estudo, festas no abacateiro, do contrário, brega, churrascos, estudos e conversas na BIQ...
- ★ Marininha, Flavio, Mari, Nathy, Re, Paulo, Amanda, Simão, Mi, Karen Pauzer, Érica, Ina, Chitão, Julia, Thiagão, Jesus, Maurício 02, Thati, Lelé, Renatas, Joyce, Jae, Thiago, Rafa, Andrézão por tudo que passamos juntos nesses 7 anos de Unicamp!
- ★ amigos da RAE, companheiros de aventuras nas viagens pela Argentina.
- ★ Lucas, que me ensinou tantas coisas e deixou ótimas lembranças.
- ★ Ari, Elisa e Rafa, porque vocês são MARA!
- ★ Carla Perez e Ilton, pelos bons momentos e pelos seus respectivos rota-evaporadores!
- ★ Dri (por compartilharmos muito mais que o mesmo nome!) e Paula, petroleiras tão queridas!
- ★ amigos que ficaram em São Paulo, que mesmo longe, estavam sempre presentes!
- ★ todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa minha caminhada, e contribuíram para que eu chegasse até aqui!

Adriana Martini Martins

| | |
|-------------------------------------|---|
| Informações pessoais | Estado civil: solteira Nacionalidade: brasileira Idade: 26 anos Naturalidade: São Paulo (SP) Filiação: Alvacir Pereira Martins e Caterina Vitoria Martini |
| Formação | Graduada em Química (Modalidade Bacharelado) pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) jul/2007 Graduada em Química (Modalidade Licenciatura) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) dez/2008 |
| Idiomas | Inglês Avançado (First Certificate In English – Cambridge University) Espanhol Intermediário (Certificado de Español Lengua y Uso) |
| Atividades extracurriculares | Iniciação Científica na área de Química Inorgânica: 'Heteroestruturas Porosas de Silicato' sob a orientação da Prof ^a Dr ^a Heloise de Oliveira Pastore Duração: jan/2004 a jul/2005 (Projeto financiado pelo SAE/UNICAMP no período de jan/2005 a jul/2005) Assessora de RH na All Química (Empresa Jr. do Instituto de Química) no período de ago/2003 a dez/2003 Diretora de RH na All Química (Empresa Jr. do Instituto de Química) no período de jan/2004 a dez/2004 Iniciação Científica na área de Bioquímica: 'Estudo da Complexação de Anestésicos Locais em Ciclodextrinas por RMN' sob a orientação da Prof ^a Dr ^a Eneida de Paula Duração: jan/2006 a jul/2006 (Projeto financiado pelo SAE/UNICAMP) Curso 'Introdução à Ressonância Magnética (Multi)Nuclear' oferecido pela Associação de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear (AUREMN) fev/2006 Curso 'Qualidade em Laboratório' oferecido pela T&E Analítica mai/2006 Responsável pelas aulas de Química Orgânica no cursinho comunitário 'Identidade Popular' de mar/2006 a set/2006 |

Representação discente da graduação junto ao Departamento de Química Orgânica (DQO) no Instituto de Química – UNICAMP no período de mai/2006 a jun/2007

Atuação como professora plantonista no Elite Pré Vestibular em Campinas no período de set/2006 a jul/2007

Intercâmbio Estudantil com a Universidad Nacional del Litoral (UNL) – Santa Fé, Argentina no período de ago/2007 a dez/2007

Bolsista PED (Programa de Estágio Docente) na disciplina QG-564 – Química Orgânica e Inorgânica Experimental no 1º semestre de 2009

Participação em Congressos

Apresentação do trabalho 'Heteroestruturas Porosas de Silicato' na 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química em Poços de Caldas (30/mai a 05/jun/2005)

Apresentação do trabalho 'Heteroestruturas Porosas de Silicato' no 13º Congresso Brasileiro de Catálise em Foz do Iguaçu (11 a 15/set/2005)

Apresentação do trabalho 'Heteroestruturas Porosas de Silicato' no 13º Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP (28 e 29/out/2005)

Apresentação do trabalho 'Estudo da Complexação de Anestésicos Locais em Ciclodextrinas por RMN' no 14º Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP (27 e 28/set/2006)

Apresentação do trabalho 'A Influência do Professor de Química na Escolha pela Química como Área de Atuação Profissional' no XIV Encontro Nacional de Ensino de Química em Curitiba (21 a 24/jul/2008)

Apresentação do trabalho 'Análise de chaperones hipotéticas da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*' na 19ª Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (09 e 10/fev/2009)

Apresentação do trabalho 'Análise de chaperones hipotéticas da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*' na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química em Fortaleza (30/mai a 02/jun/2009)

Apresentação do trabalho 'Mass Spectrometry Analysis of Secretion Chaperones from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*' no IV Simpósio Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em Havana – Cuba (12 a 16/out/2009)

Apresentação do trabalho 'Mass Spectrometry Analysis of Secretion Chaperones from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*' na 20ª Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (22 e 23/fev/2010)

Apresentação do trabalho 'Mass Spectrometry Analysis of Secretion Chaperones from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*' na 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica em Foz do Iguaçu (18 a 21/mai/2010)

RESUMO

Palavras chave: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, chaperonas secretórias, Sistema Secretório do Tipo III, Sistema Secretório do Tipo IV, espectrometria de massas, proteômica.

A expressão protéica da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) foi avaliada aplicando técnicas de espectrometria de massas (MS) na tentativa de identificar a presença de 40 proteínas classificadas como possíveis chaperonas de secreção dos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV. Embora o processo de virulência da *Xac* ainda não seja bem elucidado, acredita-se que as proteínas alvo desempenhem papel importante em caminhos secretórios. Estas proteínas participam no encaminhamento dos fatores de virulência para a secreção, proporcionando-lhes estrutura específica e compatível aos caminhos secretórios, previnem sua aglomeração e interações inapropriadas. Para alcançar os objetivos, a *Xac* foi cultivada em três condições distintas: meio de cultura LB, considerado como controle, e meios enriquecidos com extratos provenientes de folhas e cascas de laranja, que mimetizam a presença da planta hospedeira por conterem nutrientes específicos. A separação das proteínas da *Xac* foi realizada por eletroforese em uma e duas dimensões, que permitiu verificar a presença das proteínas alvo na região de 8-23 kDa com pI na faixa 4-7. Após lise tríplica, as análises de espectrometria de massas (MS) foram realizadas utilizando-se exclusivamente as técnicas de ionização suave MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e ESI (*Electro Spray Ionization*). Foram identificadas 12 proteínas da *Xac* até então consideradas hipotéticas, sendo uma delas, potencial chaperona secretória dessa bactéria. Aplicando técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi avaliado o consumo preferencial da *Xac* em relação aos extratos de casca e folha de laranja, como, também, a produção de metabólitos. O estudo de metalômica qualitativa possibilitou a identificação de espécies metálicas ligadas às proteínas da *Xac* por ICP-MS em frações obtidas por cromatografia líquida.

ABSTRACT

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), secretion chaperones, Type III Secretion System, Type IV Secretion System, mass spectrometry, proteomics.

The proteome of the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) was studied with the aim to identify 40 hypothetical proteins and possible secretion chaperones from the Type III and Type IV Secretion Systems. It is believed that the target proteins can interact in a conserved manner with virulence factors providing them specific and appropriate structures to travel through the secretion pathways, prevent their improper interactions and aggregation. For this purpose, *Xac* was cultivated in three distinct conditions: rich medium (LB), used as the control condition, and in media enriched with orange's leaves and peels extracts, which simulate the presence of the host plant cell by containing specific nutrients. After protein separation by electrophoresis (1D and 2D), and detection of proteins in the region of 8-23 kDa and pI range from 4-7, characteristic of the target proteins, tryptic lysis was executed. Mass Spectrometry (MS) analyses applying soft ionization sources, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) or ESI (*Electro Spray Ionization*), enabled the identification of 12 proteins, one of them possible secretion chaperone, that were considered hypothetical. *Gas chromatography coupled to mass spectrometry* (GC-MS) was used as a tool for monitoring the consumption of specific nutrients present in the extracts by *Xac* and the production of its metabolites. Also, ICP-MS was applied in a qualitative *Xac*'s metalomics that enabled the discrimination of important metallic species in protein fractions obtained by HPLC.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|------|
| Lista de Abreviaturas | xvii |
| Lista de Tabelas | xix |
| Lista de Figuras | xxi |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Cancro cítrico e <i>Xac</i> | 1 |
| 1.2. Sistemas de Secreção do Tipo III e IV | 5 |
| 1.3. Chaperonas secretórias | 8 |
| 1.4. Proteínas alvo | 16 |
| 1.5. Técnicas de análises de proteínas | 22 |
| 2. Objetivos do trabalho | 27 |
| 3. Materiais e Métodos | 29 |
| 3.1. Cultura das células de <i>Xac</i> | 29 |
| 3.2. Extratos de folha e casca de laranja | 30 |
| 3.3. Análises dos extratos por GC-MS | 30 |
| 3.4. Lise das células de <i>Xac</i> | 31 |
| 3.5. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford | 32 |
| 3.6. Separação por eletroforese bidimensional | 32 |
| 3.7. Separação eletroforética unidimensional | 34 |
| 3.8. Lise tríplica | 34 |
| 3.9. Análises de proteínas por espectrometria de massas | 37 |
| 3.10. Obtenção de imagens da <i>Xac</i> através de SEM | 38 |
| 3.11. Análise de metais presentes nas proteínas da <i>Xac</i> | 39 |
| 4. Discussão dos resultados | 41 |
| 4.1. Morfologia das células de <i>Xac</i> | 41 |
| 4.2. Análise dos extratos específicos e produção de metabólitos | 41 |
| 4.3. Análises do metaloma da <i>Xac</i> | 47 |
| 4.4. Análises de expressão protéica da <i>Xac</i> | 51 |
| 4.5. Quantificação de proteínas da <i>Xac</i> | 53 |
| 4.6. Identificação de proteínas da <i>Xac</i> | 55 |
| 5. Conclusões | 80 |
| 6. Anexo I | 82 |
| Soluções utilizadas | 82 |
| 7. Anexo II | 86 |
| Espectros de massas dos compostos identificados por GC-MS | 86 |

| | |
|---|----|
| 8. Anexo III..... | 92 |
| Relação das proteínas funcionais da <i>Xac</i> identificadas pelas análises de <i>Shotgun</i> | 92 |
| 9. Anexo IV | 99 |
| Espectros de massas/massas dos peptídeos identificados nos experimentos de <i>Shotgun</i> para as proteína hipotéticas identificadas | 99 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- APS: *Amonium Persulfate* (Persulfato de Amônio)
- BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albumina de Soro Bovina)
- DDA: *Data Dependent Acquisition* (Aquisição Dependente de Dados)
- DTT: 1,4-Ditiotreitol
- EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
- ESI: *ElectroSpray Ionization* (Ionização por Eletrospray)
- GC-MS: *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas)
- HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Plasma Acoplado Indutivamente com Espectrometria de Massas)
- IPG: *Immobilized pH Gradient* (Gradiente de pH Imobilizado)
- LC-MS/MS: *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
- MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
- MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)
- ORF: *Open Reading Frame* (Produto de Fase de Leitura Aberto)
- PDB: *Protein Data Bank*
- PEG: Polietilenoglicol
- PM: Peso Molecular
- SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio)
- SEC: *Size Exclusion Chromatography* (Cromatografia por Exclusão de Tamanho)
- SEM: *Scanning Electron Microscopy* (Microscopia Eletrônica de Varredura)
- T3SS: Sistema Secretório do Tipo III
- T4SS: Sistema Secretório do Tipo IV
- TEMED: *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine* (N,N,N',N'-Tetra metil etilenodiamina)
- TFA: *Trifluoroacetic Acid* (Ácido Trifluoracético)
- Xac: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Chaperonas secretórias hipotéticas da <i>Xac</i> e seus genes correspondentes, identificados por experimentos de bioinformática ⁷¹ , em que a localização do gene no genoma pode ser cromossomal (C) ou plasmidial (P)..... | 18 |
| Tabela 2: Parâmetros da corrida eletroforética para focalização em primeira dimensão..... | 33 |
| Tabela 3: Dados das proteínas utilizadas como padrão na calibração da coluna de HPLC..... | 47 |
| Tabela 4: Faixa de massa das proteínas compreendidas em cada fração cromatográfica e as respectivas espécies metálicas identificadas..... | 50 |
| Tabela 5: Número de <i>spots</i> de proteínas detectados em cada gel analisado pelo programa ImageMaster 2D Platinum..... | 53 |
| Tabela 6: Quantidade de <i>spots</i> de proteínas em diferentes regiões dos géis analisados..... | 53 |
| Tabela 7: Dados obtidos para as análises de quantificação de proteínas da <i>Xac</i> realizadas..... | 54 |
| Tabela 8: Proteínas identificadas por MALDI, suas massas nominais e valores de pI teóricos..... | 56 |
| Tabela 9: Dados relativos aos peptídeos encontrados na proteína 2 (identificada como Q8PMD7_XANAC; XAC1492)..... | 63 |
| Tabela 10: Massas nominais, pontos isoeletricos teóricos e sequências de aminoácidos das proteínas identificadas pelas análises de <i>Shotgun</i> após previa separação em gel 1D na condição a anotadas como proteínas hipotéticas da <i>Xac</i> | 67 |
| Tabela 11: Massas nominais, pontos isoeletricos teóricos e sequências de aminoácidos das proteínas identificadas pelas análises de <i>Shotgun</i> de proteínas totais da condição a que foram anotadas como proteínas hipotéticas da <i>Xac</i> | 68 |
| Tabela 12: Massa nominal, ponto isoeletrico teórico e sequência de aminoácidos da proteína identificada pelas análises de <i>Shotgun</i> das bandas de gel 1D na condição b anotada como proteína hipotética da <i>Xac</i> | 68 |
| Tabela 13: Massas nominais, pontos isoeletricos teóricos e sequências de aminoácidos das proteínas identificada pelas análises de <i>Shotgun</i> das bandas de gel 1D na condição c anotadas como proteínas hipotéticas da <i>Xac</i> | 69 |
| Tabela 14: Proteínas da <i>Xac</i> identificadas pelos experimentos de <i>Shotgun</i> na condição controle (a)..... | 93 |
| Tabela 15: Proteínas da <i>Xac</i> identificadas pelos experimentos de <i>Shotgun</i> na presença de extrato de folha de laranjeira (b)..... | 96 |
| Tabela 16: Proteínas da <i>Xac</i> identificadas pelos experimentos de <i>Shotgun</i> na presença de extrato de casca de laranja (c)..... | 98 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Lesões típicas do cancro cítrico, causadas pela *Xac* (A) em folhas e (B) em casca de laranja'..... 1
- Figura 2: Representação dos dois plasmídios da *Xac* 306. No diagrama, os produtos de fase de leituras abertas (ORF's) estão indicados por cores. Os genes relativos ao T4SS estão indicados em azul no plasmídio pXAC64. 4
- Figura 3: Sistemas Secretórios bacterianos: T3SS, onde a chaperona dimérica está livre no citosol (A), associa-se à proteína efetora (B) e o complexo é encaminhado até o aparato secretório (C); T4SS: as chaperonas monoméricas e/ou diméricas que se associam a proteínas (I), fitas simples de DNA (II) ou complexos de DNA/proteína (III) para encaminhá-los ao aparato secretório; e o Sistema Flagelar, onde chaperonas diméricas (a) associam-se às proteínas estruturais dos flagelos (b) e encaminham-nas ao aparato flagelar (c). 7
- Figura 4: Chaperona flagelar FliS, em azul, com sua estrutura secundária predominantemente helicoidal, complexada com sua efetora flagelina, em verde (entrada do PDB: 1ORY). 12
- Figura 5: Estrutura terciária do complexo da chaperona secretória do T4SS VirE1 (mais escura) com sua proteína efetora, VirE2, de *Agrobacterium tumefaciens*, evitando sua agregação no meio intracelular (Entrada do PDB: 3BTP). 13
- Figura 6: Representação de estrutura terciária de duas chaperonas do T3SS de *Shigella flexneri* (Spa15, entrada do PDB: 1RY9) e *Yersinia enterocolitica* (SycE, entrada do PDB: 1N5B), respectivamente, com enovelamento composto de 3 α -hélices e 5 folhas- β 14
- Figura 7: Gel de eletroforese bidimensional de célula de *E. coli*, em que se pôde resolver mais de 1000 proteínas diferentes. Na primeira dimensão (IF), houve separação protéica por focalização isoelétrica e, na segunda dimensão (SDS), as proteínas foram separadas pelo tamanho das cadeias. Cada *spot* observado corresponde a uma cadeia peptídica de (pl, massa molecular) correspondente⁸¹. 24
- Figura 8: (A) Cromatograma obtido após separação por cromatografia líquida dos peptídeos contidos em mistura protéica submetida a lise triptica. Em um experimento do tipo DDA, os peptídeos presentes nos sinais cromatográficos mais intensos são selecionados para fragmentação e obtenção de MS (B) e MS/MS (C). 25
- Figura 9: Imagens da *Xac* obtidas por SEM com aumento de (A) 5500 vezes e (B) 30000 vezes. 41
- Figura 10: Cromatogramas dos extratos (A) de folha de laranjeira bruto e (B) de folha de laranjeira após tratamento térmico, (C) de casca de laranja bruto e (D) de casca de laranja após tratamento térmico. 43
- Figura 11: Cromatogramas obtidos após cultivo da *Xac* (A) na condição a, (B) na condição b e (C) na condição c. 46
- Figura 12: Curva de calibração obtida para a coluna de SEC, em que o x é o volume de retenção em mL, e log P. M. o logaritmo do peso molecular estimado em kDa. 48
- Figura 13: Perfil dos cromatogramas obtidos nas separações das proteínas da *Xac* por HPLC em coluna Superdex 200. 49
- Figura 14: Géis bidimensionais (18%) (A) do sobrenadante e (B) do *pellet* das proteínas da *Xac* na condição a (ausência de extratos); as marcações em (A) referem-se as proteínas já identificadas (discussão a seguir). À esquerda é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas. 51
- Figura 15: Géis bidimensionais (18%) (A) do sobrenadante e (B) do *pellet* de proteínas de *Xac* na condição b (presença de extrato de folha de laranjeira). À esquerda, na região de pl ácido, é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas. 52
- Figura 16: Géis bidimensionais (18%) (A) do sobrenadante e (B) do *pellet* de proteínas de *Xac* na condição c (presença de extrato de casca de laranja). À esquerda, na região de pl ácido, é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas. 52
- Figura 17: Curva de calibração obtida pelo método de Bradford; em que A é a absorbância observada, e c é a concentração da solução de proteína, expressa em $\mu\text{g/mL}$ 54

| | |
|--|-----|
| Figura 18: Espectro de massas obtido para a mistura de peptídeos provenientes da proteína identificada como XAC1492..... | 57 |
| Figura 19: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo com <i>m/z</i> 1070, com atribuição dos sinais e sequência de aminoácidos atribuída (MASCOT) e em vermelho, os fragmentos referentes à fragmentação interna do peptídeo..... | 60 |
| Figura 20: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo com <i>m/z</i> 1289, com atribuição dos sinais e sequência de aminoácidos (MASCOT). Em vermelho, os fragmentos referentes à fragmentação interna do peptídeo. | 61 |
| Figura 21: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo com <i>m/z</i> 1226, com atribuição dos sinais e sequência de aminoácidos (MASCOT). | 62 |
| Figura 22: Sequência de aminoácidos da proteína XAC1492. Em destaque, os peptídeos identificados pelo experimento de MS/MS. | 63 |
| Figura 23: Gel de eletroforese (15%) unidimensional com frações sobrenadante do lisado total da Xac nas condições a, b e c. À esquerda é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas. | 66 |
| Figura 24: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em <i>m/z</i> 734,8, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT). | 71 |
| Figura 25: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em <i>m/z</i> 672,3, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT). | 72 |
| Figura 26: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em <i>m/z</i> 596,3, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT). | 73 |
| Figura 27: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em <i>m/z</i> 780,3, carga 2+, 74 | 74 |
| Figura 28: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em <i>m/z</i> 846,3, carga 2+, 75 | 75 |
| Figura 29: Modelo do PDB para a chaperona flagelar FliS (entrada 1ORY) e o modelo predito pelo I-TASSER com maior probabilidade para a estrutura terciária da XAC1364. | 77 |
| Figura 30: Relações de co-expressão atribuídas à proteína XAC1364 (Figura retirada do <i>site</i> do STRING ¹¹⁴ ; as linhas azuis relacionam a ocorrência de ambas as proteínas, por proximidade física ou funcional, e a linha verde indica vizinhança das proteínas no genoma)..... | 78 |
| Figura 31: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de casca de laranja (A), identificado como terpineol (B). | 87 |
| Figura 32: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de casca de laranja (A), identificado como linalol (B). | 88 |
| Figura 33: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de casca de laranja (A), identificado como carveol (B)..... | 89 |
| Figura 34: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de folha de laranjeira (A), identificado como uma benzopirano substituída (B)..... | 90 |
| Figura 35: Espectros de massas de sinal detectado como metabólito da Xac quando cultivada em presença de extrato bruto de folha de laranjeira (A), identificado como uma benzopirano substituída (B). | 91 |
| Figura 36: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 1028,06, carga 2+, 100 | 100 |
| Figura 37: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 621,85, carga 2+, 101 | 101 |
| Figura 38: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 817,18, carga 2+, 102 | 102 |
| Figura 39: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 819,62, carga 2+, 103 | 103 |
| Figura 40: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 547,59, carga 2+, 104 | 104 |
| Figura 41: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 969,15, carga 2+, 105 | 105 |
| Figura 42: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 630,62, carga 2+, 106 | 106 |
| Figura 43: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 657,86, carga 2+, 107 | 107 |
| Figura 44: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 611,82, carga 2+, 108 | 108 |
| Figura 45: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 606,04, carga 2+, 109 | 109 |
| Figura 46: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 639,59, carga 2+, 110 | 110 |
| Figura 47: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 599,81, carga 2+, 111 | 111 |
| Figura 48: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 708,88, carga 2+, 112 | 112 |
| Figura 49: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 645,36, carga 2+, 113 | 113 |
| Figura 50: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 788,78, carga 3+, 114 | 114 |
| Figura 51: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 607,18, carga 2+, 115 | 115 |
| Figura 52: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal <i>m/z</i> 676,60, carga 2+, 116 | 116 |

Figura 53: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 663,66, carga 2+, 117
Figura 54: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 748,93, carga 2+, 118
Figura 55: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 668,32, carga 2+, 119
Figura 56: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 776,44, carga 2+, 120
Figura 57: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 783,09, carga 2+, 121
Figura 58: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 839,04, carga 2+, 122
Figura 59: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 669,68, carga 2+, 123
Figura 60: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 537,09, carga 2+, 124
Figura 61: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 906,16, carga 3+, 125
Figura 62: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 645,10, carga 2+, 126
Figura 63: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 596,98, carga 3+, 127

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cancro cítrico e Xac

O cancro cítrico é uma doença bacteriana que afeta todos os tipos de citros, reduzindo a produção e qualidade das frutas, sendo a variedade causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac)¹ sua forma mais comum e severa^{2,3,4}. A doença se caracteriza pela presença de lesões salientes em folhas, galhos e frutos (Figura 1), causando desfolhamento, descoloramento dos galhos, frutas danificadas e quedas de galhos e frutas^{4,5}.

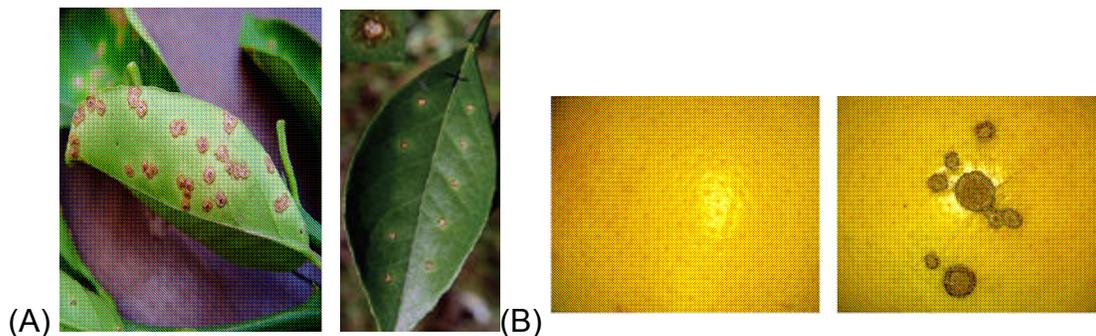


Figura 1: Lesões típicas do cancro cítrico, causadas pela Xac (A) em folhas e (B) em casca de laranja^{1,6}.

O cancro cítrico está presente em 30 países produtores de citros espalhados pela Ásia, Pacífico, Ilhas do Oceano Índico, América do Sul e no

¹ Vojnov, A. A.; do Amaral, A. M.; Dow, J. M.; Castagnaro, A. P.; Marano, M. R.; Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 467–477.

² del Campo, R.; Russi, P.; Mara, P.; Mara, H.; Peyrou, M.; de Leon, I. P.; Gaggero, C.; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after cooper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *298*, 143–148.

³ Tasic, L.; Borin, P. F. L.; Khater, L.; Ramos, C. H. I.; Cloning and characterization of three hypothetical secretion chaperone proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Protein Express. Purif.* **2007**, *53*, 363–369.

⁴ Stall, R.E.; Seymour, C. P.; Canker, a threat to citrus in the Gulfcoast states. *Plant Dis.* **1983**, *67*, 581–585.

⁵ Qin, J.; Burks, T. F.; Ritenour, M. A.; Bonn, W. G.; Detection of citrus canker using hyperspectral reflectance imaging with spectral information divergence. *J. Food Eng.* **2009**, *93*, 183–191.

⁶ Deng, Z. N.; Xu, L.; Li, D. Z.; Long, G. Y.; Liu, L. P.; Fang, F.; Shu, G. P.; Screening citrus genotypes for resistance to canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). *Plant Breeding* **2010**, *129*, 341 - 345.

sudeste dos Estados Unidos, regiões de climas quentes e úmidos, particularmente chuvosos e com ventos, mas não é encontrado nas áreas mais áridas de cultivo de citros² da Europa, que impõem severas restrições comerciais às áreas afetadas, causando enormes prejuízos econômicos para estas regiões².

O cancro cítrico foi identificado no Brasil em 1957, em Presidente Prudente, no Estado de São Paulo, e atingiu a maior região citricultora do país em 1979⁷, constituindo-se na maior ameaça à citricultura brasileira. No combate a esta doença, costuma-se eliminar as plantas próximas ao foco de contaminação em um raio de até 30 metros, se as plantas contaminadas correspondem a menos de 0,5% do bloco de plantação. Caso o percentual de contaminação exceda 0,5%, costuma-se proibir o cultivo na área por um período de 3 anos^{1,8}. No intuito de auxiliar a Campanha Nacional de Erradicação ao Cancro Cítrico, o Ministério da Agricultura⁷ criou o Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura), que realiza inspeções anuais no parque citrícola do Estado de São Paulo, e foi o responsável pela considerável diminuição da incidência do cancro na última década. Acredita-se que, devido às ações de prevenção e combate do Fundecitrus, mais de 300 milhões de reais foram economizados neste período⁷.

Os produtos baseados em sais de cobre são comumente utilizados na prevenção do cancro cítrico⁹, diminuindo a população bacteriana na superfície das folhas, porém, quando ministrado a longo prazo, este tratamento gera resistência ao cobre⁹. O acúmulo de cobre metálico no solo também pode causar efeitos fitotóxicos e ambientais, além do perigo que este metal apresenta para frutos quando aplicado em condições quentes e secas. Além disso, a *Xac* é um dos fitopatógenos que mesmo após do tratamento com o cobre^{10,11,12}, retém a virulência².

⁷ <http://www.fundecitrus.com.br>

⁸ Mendes, B. M. J.; Cardoso, S. C.; Boscardiol-Camargo, R. L.; Cruz, R. B.; Mourão Filho, F. A. A.; Bergamin Filho, A.; Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathol.* **2010**, *59*, 68–75.

⁹ Ryan, R. P.; Ryan, D. J.; Sun Y. C.; Li, F. M.; Wang, Y.; Dowling, D. N.; An acquired efflux system is responsible for copper resistance in *Xanthomonas* strain IG-8 isolated from China. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *268*, 40–46.

¹⁰ Alexander, E.; Pham, D.; Steck, T. R.; The viable-but non culturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microb.* **1999**, *65*, 3754–3756.

Apesar do uso bem sucedido de técnicas agronômicas para o controle dessa fitopatologia, o desenvolvimento de resistência ao patógeno parece ser o meio mais efetivo na prevenção da doença, e a identificação dos fatores de virulência, bem como dos mecanismos de patogenicidade da *Xac* pode permitir o desenvolvimento de análises que revelam a variação genética das plantas para guiar a manipulação de alvos em laboratório¹.

O gênero *Xanthomonas* compreende organismos Gram-negativos^{13,14} e aeróbicos¹³ que pertencem a subdivisão γ de *Proteobacteria*^{13,15,16} e a família *Xanthomonadaceae*^{13,14}. Este é um gênero diversificado e importante economicamente, uma vez que compreende muitas espécies de fitopatógenos¹⁵. O genoma da *Xac* foi completamente sequenciado e analisado em 2002¹⁵, pelo grupo ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*). A *Xac* 306 apresenta um cromossomo circular com 5.175.554 pares de base (bp) e dois plasmídios: pXAC33 (33.699 bp) e pXAC64 (64.920 bp)¹⁵, representados na Figura 2.

O genoma da *Xac* indicou a presença de um Sistema Secretório do Tipo III (T3SS) e leituras referentes a dois Sistemas Secretórios do Tipo IV (T4SS), com funções distintas¹⁷. Sabe-se também que as bactérias do gênero *Xanthomonas*

¹¹ Grey, B. E.; Steck, T. R.; The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl. Environ. Microb.* **2001**, *67*, 3866–3872.

¹² Ordax, M.; Marco-Noales, E.; López, M. M.; Biosca, E. G.; Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl. Environ. Microb.* **2006**, *72*, 3482–3488.

¹³ Brunings, A. M.; Gabriel, D. W.; *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* **2003**, *4*, 141–157.

¹⁴ Moreira, L. M.; de Souza, R. E.; Almeida, N. F.; Setubal, J. C.; Oliveira, J. C. F.; Furlan, L. R.; Ferro, J. A.; da Silva, A. C. R.; Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2004**, *42*, 163–184.

¹⁵ da Silva, A. C. R.; Ferro, J. A.; Reinach, F. C.; *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **2002**, *417*, 459 - 463.

¹⁶ Chen, L.L.; Identification of genomic islands in six plant pathogens. *Gene* **2006**, *374*, 134–141.

¹⁷ Alegria, M. C.; Souza, D. P.; Andrade, M. O.; Docena, C.; Khater, L.; Ramos, C. H. I.; da Silva, A. C. R.; Farah, C. S.; Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded Type IV Secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* **2005**, *18*, 2315–2325.

1.2. Sistemas de Secreção do Tipo III e IV

As bactérias Gram-negativas utilizam de cinco a sete¹⁹ sistemas de secreção para transportar macromoléculas através das membranas do envelope celular, permitindo também sua interação com o hospedeiro^{1,20,21}. Dentre estes sistemas, os Sistemas Secretórios do Tipo III (T3SS) e do Tipo IV (T4SS) são envolvidos no transporte direto de macromoléculas até o citosol da célula do hospedeiro, transportando proteínas efetoras, fitas simples de DNA e/ou complexos de DNA/proteínas²² envolvidos na iniciação e manutenção do estado de patogenicidade¹⁵.

O T3SS é altamente conservado entre bactérias patogênicas para plantas e animais, e é responsável pelo transporte de proteínas efetoras desde o citoplasma bacteriano até o interior da célula do hospedeiro^{1,23,24}. Essas proteínas efetoras são fatores de virulência, que, em alguns casos, apresentam atividade enzimática²³ e interferem com uma variedade de funções celulares do hospedeiro, suprimindo suas defesas basais²³ e promovendo, com isso, sintomas de doença. Em muitos fitopatógenos, a maquinaria do T3SS está relacionada aos genes *avr* e *hrp*¹³, e os genes que codificam esse sistema de secreção são ativados quando a célula bacteriana entra em contato com a parede celular vegetal²⁵, quando o aparato passa então a sintetizar e injetar proteínas efetoras indiscriminadamente, em células de hospedeiros e não hospedeiros¹³. Dependendo da célula atacada, a

¹⁹ Cornelis, G.R.; The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 811-825.

²⁰ Gerlach R. G.; Hensel, M.; Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **2007**, *297*, 401-415.

²¹ Saier M. H. Jr; Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J. Membr. Biol.* **2006**, *214*, 75-90.

²² Alvarez-Martinez C. E.; Christie, P. J.; Biological diversity of procaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2009**, *73*, 775-808.

²³ Alfano, J. R.; Collmer, A.; Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2004**, *42*, 385-414.

²⁴ Marlovits, T. C.; Stebbins, C. E.; Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr. Opin. in Microbiol.* **2010**, *13*, 47-52.

²⁵ Alfano, J. R.; Collmer, A.; The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5655-5662.

resposta do hospedeiro a esses efetores, que são específicos para cada espécie de patógeno, pode ser de avirulência ou patogenicidade^{13,23,26}.

O T3SS possui mais de 20 proteínas estruturais^{27,28} que compõem o corpo basal (que sustenta uma estrutura de agulha); proteínas translocadoras e formadoras de poro; proteínas regulatórias do processo de secreção (essenciais para a secreção ordenada dos elementos estruturais); proteínas efetoras²⁹; e chaperonas^{30,31} que facilitam a secreção e transporte de suas cognatas efetoras (toxinas)^{28,32}. Os T3SS podem ser divididos em duas classes: flagelar e não-flagelar, de origem comum³³. O T3SS flagelar está associado ao corpo basal, homólogo ao não-flagelar, e é responsável pela secreção dos componentes constituintes dos flagelos³⁴, necessários para a locomoção celular. O T3SS não-flagelar transloca as proteínas efetoras diretamente até o citoplasma das células dos hospedeiros, promovendo respostas de patogenicidade e/ou simbiose^{19,32,35}.

O Sistema de Secreção do Tipo IV (T4SS) não é relacionado ao T3SS, embora ambos apresentem similaridades de estrutura e funcionamento²². Uma delas é a necessidade de contato com a célula hospedeira, que inicia a sinalização necessária para o funcionamento destes sistemas³⁶. Alguns

²⁶ Jamir Y.; Guo, M.; Oh, H. S.; Petnicki-Ocwieja, T.; Chen, S. R.; Tang, X. Y.; Dickman, M. B.; Collmer, A.; Alfano, J. R.; Identification of *Pseudomonas syringae* type III secreted effectors that suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* **2004**, *37*, 554-65.

²⁷ Francis, M. S.; Wolf-Watz, H.; Forsberg, A.; Regulation of type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, *5*, 166-172.

²⁸ Deane, J. E.; Abrusci, P.; Johnson, S.; Lea, S. M.; Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 1065-1075.

²⁹ Miki, T.; Shibagaki, Y.; Danbara, H.; Okada, N.; Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 6843-6854.

³⁰ Feldman, M.F.; Cornelis, G.R.; The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *219*, 151-158.

³¹ Bennett, J.C.; Hughes, C.; From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 202-204.

³² Galán, J. E.; Energizing type III secretion machines: what is the fuel? *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 127-128.

³³ Brutinel, E. D.; Yahr, T. L.; Control of gene expression by type III secretory activity. *Curr. Opin. in Microbiol.* **2008**, *11*, 128-133.

³⁴ Apel D.; Surette, M. G.; Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *BBA-Biomembranes* **2008**, *1778*, 1851-1858.

³⁵ Galán, J. E.; Wolf-Watz, H.; Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **2006**, *444*, 567-573.

³⁶ Cascales, E.; Christie, P.; The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2003**, *1*, 137-149.

organismos utilizam o T4SS para transferência de plasmídios (DNA) entre bactérias^{22,37}, secreção de proteínas e/ou complexos de proteína-DNA para seus hospedeiros^{17,22}. O T4SS é bem caracterizado para organismos como *Agrobacterium tumefaciens*¹⁵, e sabe-se que espécies de *Xanthomonas* possuem esse tipo de sistema de secreção, embora não haja evidências de que organismos deste gênero^{15,38} utilizem este sistema para secreção de proteínas.

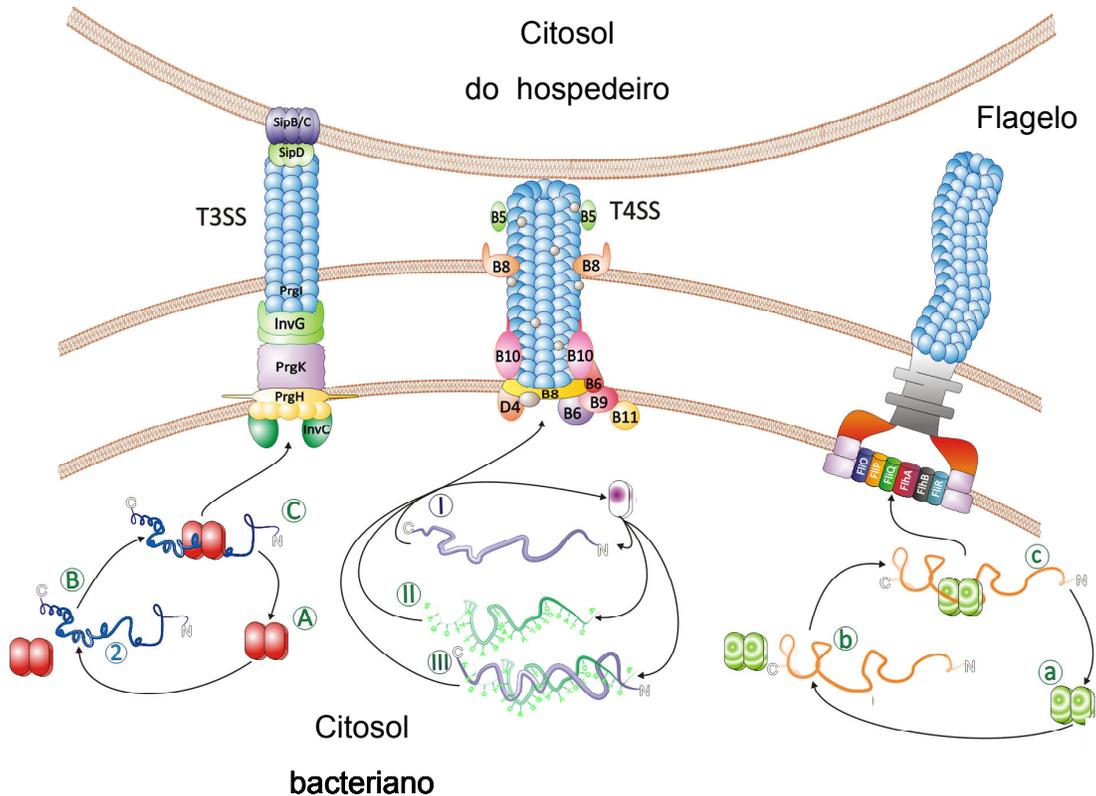


Figura 3: Sistemas Secretórios bacterianos: T3SS, onde a chaperona dimérica está livre no citosol (A), associa-se à proteína efetora (B) e o complexo é encaminhado até o aparato secretório (C); T4SS: as chaperonas monoméricas e/ou diméricas que se associam a proteínas (I), fitas simples de DNA (II) ou complexos de DNA/proteína (III) para encaminhá-los ao aparato secretório; e o Sistema Flagelar, onde chaperonas diméricas (a) associam-se às proteínas estruturais dos flagelos (b) e encaminham-nas ao aparato flagelar (c)³⁹.

³⁷ Llosa, M.; Gomis-Ruth, F. X.; Coll, M.; de la Cruz, F.; Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 1–8.

³⁸ Simpson, A. J.; Reinach, F. C.; Arruda, P.; *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **2000**, *406*, 151–157.

³⁹ Fattori, J.; Prando, A.; Martins, A. M.; Rodrigues, F. H. S.; Tasic, L.; Bacterial secretion chaperones. (submetido, **2010**).

O T4SS também está envolvido no transporte de moléculas de toxinas⁴⁰, fragmentos de DNA²² e proteínas efetoras⁴¹ com o auxílio de chaperonas secretórias³⁹; essa família de sistemas secretórios apresenta origem no T2SS e no sistema flagelar do tipo IV²². Uma diferença com o T3SS é o tamanho e função dessas chaperonas: geralmente, as chaperonas do T4SS são menores que as do T3SS³⁹ e comumente atuam na forma de monômeros.

1.3. Chaperonas secretórias

As chaperonas moleculares são proteínas que se associam a outras cadeias protéicas, sem participar efetivamente de sua estrutura ou função⁴², no intuito de impedir interações intra- e/ou intermoleculares prematuras ou incorretas⁴³. As chaperonas participam no enovelamento de novas cadeias peptídicas e no re-enovelamento de proteínas desnaturadas por choque térmico ou outras condições desnaturantes. Elas também participam efetivamente na solubilização de agregados protéicos, no desenovelamento de proteínas que serão degradadas por enzimas proteolíticas ou translocadas por caminhos secretórios^{44,45,46}.

As chaperonas secretórias compõem uma classe especializada da família de chaperonas moleculares, envolvidas em caminhos secretórios⁴³, e são continuamente reutilizadas no citosol bacteriano¹⁹ enquanto ocorre a invasão de célula hospedeira. No T3SS, por exemplo, funcionam na montagem do aparato secretório¹⁹, no encaminhamento das proteínas efetoras até o

⁴⁰ Van Sluys M. A.; Monteiro-Vitorello, C. B.; Camargo, L. E. A.; Menck, C. F. M.; da Silva, A. C. R.; Ferro, J. A.; Oliveira, M. C.; Setúbal, J. C.; Kitajima, J. P.; Simpson, A. J.; Comparative genomic analysis of plant associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2002**, *40*, 169–189.

⁴¹ Burns, D. L.; Biochemistry of type IV secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 25–29.

⁴² Ellis, R. J.; Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem. Sci.*, **2006**, *31*, 395-401.

⁴³ Parsot, C.; Hamiaux, C.; Page, A. L.; The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. in Microbio.* **2003**, *6*, 7-14.

⁴⁴ Christis, C.; Lubsen, N. H.; Braakman, I.; Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J.*, **2008**, *275*, 4700-4727.

⁴⁵ Ellis, R. J.; Molecular chaperones – the plant connection. *Semin. Cell Biol.* **1990**, *1*, 1-9.

⁴⁶ Melnikov, E. E.; Rotanova, T. V.; Molecular Chaperones. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2010**, *36*, 1-10.

injectossoma^{43,47,48,49}, possibilitam sua secreção via canais de diâmetros de ~2,8 nm^{50,51} e associam-se às proteínas regulatórias²⁷. As chaperonas secretórias também são responsáveis por garantir a estabilidade de suas efetoras cognatas no meio intra-celular, evitando sua degradação e agregação³⁹. As proteínas efetoras são sintetizadas antes do início da sua secreção²⁸, após a aderência da bactéria à célula alvo, ativando a montagem da maquinaria secretória⁴³. Dessa forma, torna-se necessário que as chaperonas associem-se às proteínas efetoras para mantê-las num estado estável^{23,27,43} e competente para a secreção⁵². Portanto, a formação dos complexos chaperona/proteína efetora poderá funcionar como um sinal 3D para os componentes do T3SS requisitados para a translocação³⁹.

As chaperonas secretórias apresentam domínios de ligação específicos, que são reconhecidos pelos domínios presentes nas proteínas efetoras^{23,43}. Na maioria dos casos, este domínio de ligação (CBD-*chaperone binding domain*) é localizado logo após a sequência sinalizadora (30 resíduos de aminoácidos) da região N-terminal^{43,53} das proteínas efetoras. As interações entre a chaperona e sua proteína efetora são não-covalentes, tais como, ligações de hidrogênio entre os resíduos hidrofílicos³⁹, e interações hidrofóbicas específicas entre as regiões de ligação chaperona/proteína efetora^{19,43}. A grande área hidrofóbica das chaperonas

⁴⁷ Creasey, E. A.; Delahay, R. M.; Daniell, S. J.; Frankel, G.; Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.-SGM* **2003**, *149*, 2093–2106.

⁴⁸ Creasey, E. A.; Friedberg, D.; Shaw, R. K.; Umanski, T.; Knutton, S.; Rosenshine, I.; Frankel, G.; CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiol.-SGM* **2003**, *149*, 3639–3647.

⁴⁹ Su, M. S.; Kao, H. C.; Lin, C. N.; Syu, W. J.; Gene I0017 encodes a second chaperone for EspA of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiol.-SGM* **2008**, *154*, 1094–1103.

⁵⁰ Cornelis, G.; Van Gijsegem, F.; Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **2000**, *54*, 735–774.

⁵¹ Stebbins, C. E.; Galán, J. E.; Priming virulence factors for delivery into the host. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 738–743.

⁵² Economou, A.; Christie, P. J.; Fernandez, R. C.; Palmer, T.; Plano, G. V.; Pugsley, A. P.; Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 308–319.

⁵³ Mudgett, M. B.; Chesnokova, O.; Dahlbeck, D.; Clark, E. T.; Rossier, O.; Bonas, U.; Staskawicz, B. J.; Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 13324–13329.

secretórias, muito maior que a de outras proteínas solúveis, também pode ser responsável pela interação com a porção hidrofóbica das efetoras⁵⁴.

As chaperonas de secreção comumente interagem com uma região que compreende de 20 a 100 resíduos de aminoácidos³⁹, domínios de ligação das efetoras, protegendo-as de associações não específicas que podem provocar a agregação no interior celular e efeitos tóxicos¹⁹. Contudo, essa associação com domínios relativamente pequenos não gera um efeito de desenovelamento global das cadeias protéicas, mantendo a atividade de ambas as proteínas^{19,43}.

Essas regiões com alto caráter hidrofóbico, aparentemente, são responsáveis pela estabilidade e especificidade das interações entre chaperonas do T3SS e suas proteínas efetoras⁵⁵, principalmente nas regiões que simulam um 'encaixe' de estruturas helicoidais⁵⁵. Contudo, resíduos de aminoácidos polares das cadeias efetoras, envolvidos em sítios responsáveis pela virulência, também contribuem com interações eletrostáticas com a chaperona específica⁵⁵.

Chaperonas secretórias do T3SS parecem compartilhar um bolso hidrofóbico de interação com suas proteínas efetoras, caracterizado por regiões de folhas β , que podem se associar a diferentes sequências de aminoácidos⁵⁶. O modelo mais bem aceito atualmente para estes sítios de ligação das chaperonas do T3SS propõe um 'alvo-adaptado'⁵⁶, de forma que a região de folhas β serviria para encaixar a proteína efetora em sua chaperona, que encaminharia esta proteína até o aparato do sistema secretório⁵⁶. O entendimento e localização destes sítios de ligação podem auxiliar no desenvolvimento de agentes antibacterianos específicos³⁹.

A secreção pode ocorrer na ausência das chaperonas específicas, uma vez que nem todas as proteínas efetoras do T3SS apresentam regiões específicas de ligação com as chaperonas²⁷. Esse processo de transferência de efetores livres,

⁵⁴ Thomas, J.; Stafford, G.; Hughes, C.; Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2004**, *101*, 3945-3950.

⁵⁵ Triplett, L. R.; Wedemeyer, W. J.; Sundin, G. W.; Homology-based modeling of the *Erwinia amylovora* type III secretion chaperone DspF used to identify amino acids required for virulence and interaction with the effector DspE. *Res. Microbiol.* **2010**, *161*, 613-618.

⁵⁶ Lilic, M.; Vujanac, M.; Stebbins, C. E.; A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 653-664.

porém, ocorre de forma inapropriada^{43,57} e reduzida⁴³, comprometendo a hierarquia das proteínas efetoras exportadas^{19,23,52}. Aparentemente, complexos de chaperona/proteína efetora têm prioridade sobre os efetores livres⁴³, e os efeitos de patogenicidade se apresentam diminuídos na ausência da chaperona específica⁵⁸.

O sistema flagelar, responsável pela mobilidade bacteriana, também apresenta chaperonas citoplasmáticas que se associam às proteínas constituintes dos flagelos³¹ (Figura 4). Contudo, essa associação é bem menos efetiva que aquela observada em proteínas efetoras do T3SS e ocorre na região C-terminal dos substratos, que media as interações entre as subunidades constituintes dos flagelos⁵⁹. Assim como nos outros sistemas secretórios, a atividade secretória é coordenada com a expressão gênica, garantindo a estabilidade das proteínas efetoras e/ou constituintes dos flagelos⁶⁰.

A primeira chaperona secretória do T4SS identificada e estudada é a VirE1, que apresenta uma pequena cadeia protéica estruturada em α -hélice, possível sítio de interações hidrofóbicas com sua proteína cognata⁶¹, VirE2, e pl ácido. A proteína VirE2 apresenta sítios de ligação intracadeia, porém, estes sítios são encobertos pelo sítio de ligação à chaperona⁶¹, fazendo com que as interações com a chaperona sejam mais favoráveis⁶¹, impedindo sua agregação quando a VirE1 se encontra disponível no citosol⁶¹. Apesar de ser do T4SS, a chaperona VirE1 apresenta diversas características próprias das chaperonas do T3SS⁶¹.

⁵⁷ Lee, S. H.; Galán, J. E.; *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* **2004**, *51*, 483-95.

⁵⁸ Cooper, C. A.; Zhang, K.; Andres, S. N.; Fang, Y.; Kaniuk, N. A.; Hannemann, M.; Brummell, J. H.; Foster, L. J.; Junop, M. S.; Coombes, B. K.; Structural and biochemical characterization of SrcA, a multi-cargo Type III Secretion chaperone in *Salmonella* required for pathogenic association with a host. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000751. doi:10.1371/journal.ppat.1000751.

⁵⁹ Auvray, F.; Thomas, J.; Fraser, G. M.; Hughes, C.; Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 221-229.

⁶⁰ Poyraz, O.; Schmidt, H.; Seidel, K.; Delissen, F.; Ader, C.; Tenenboim, H.; Goosmann, C.; Laube, B.; Thünemann, A.; Zychlinsky, A.; Baldus, M.; Lange, A.; Griesinger, C.; Kolbe, M.; Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nature Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 788-792.

⁶¹ Deng, W.; Chen, L.; Peng, W. T.; Liang, X.; Sekiguchi, S.; Gordon, M. P.; Comai, L.; Nester, E. W.; VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1795-1807

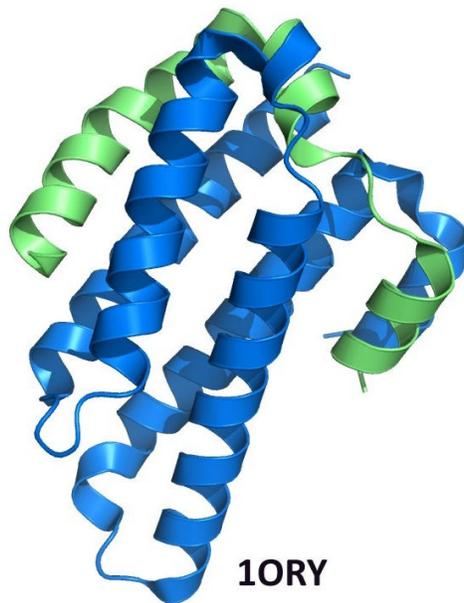


Figura 4: Chaperona flagelar FliS, em azul, com sua estrutura secundária predominantemente helicoidal, complexada com sua efetora flagelina, em verde (entrada do PDB: 1ORY)³⁹.

O complexo formado, mostrado na Figura 5, evita agregação da proteína VirE2 no meio intracelular. Atualmente, os estudos estruturais não elucidaram a estrutura da VirE1 isoladamente, mas sim do complexo formado, indicando que a porção C-terminal da chaperona interage com uma pequena sequência na porção N-terminal da proteína efetora³⁹.

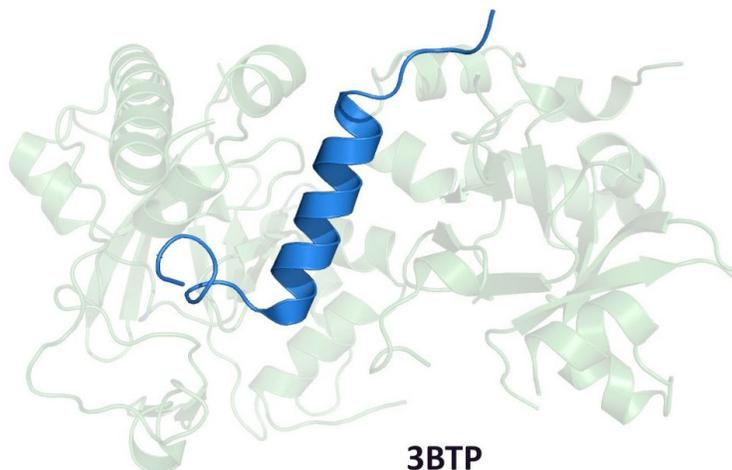


Figura 5: Estrutura terciária do complexo da chaperona secretória do T4SS VirE1 (mais escura) com sua proteína efetora, VirE2, de *Agrobacterium tumefaciens*, evitando sua agregação no meio intracelular (Entrada do PDB: 3BTP)³⁹

Embora não compartilhem de semelhanças na sequência primária⁶², as chaperonas secretórias compartilham algumas propriedades estruturais, tais como o baixo peso molecular (até 20 kDa), um valor de pI baixo, inferior a 7, e a presença de estrutura secundária helicoidal^{43,58} (Figura 6). Estas proteínas também associam-se a uma ampla variedade de proteínas efetoras, e, apesar das diferenças estruturais tanto da chaperona quanto da proteína efetora, os complexos formados podem ser bastante similares^{63,64}.

⁶² Minamino, T.; Imada, K.; Namba, K.; Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol. Biosyst.* **2008**, *11*, 1105-1115.

⁶³ Stebbins, C. E.; Galán, J. E.; Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **2001**, *414*, 77-81.

⁶⁴ Birtalan, S.; Phillips, R.; Ghosh, P.; Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 971-980.

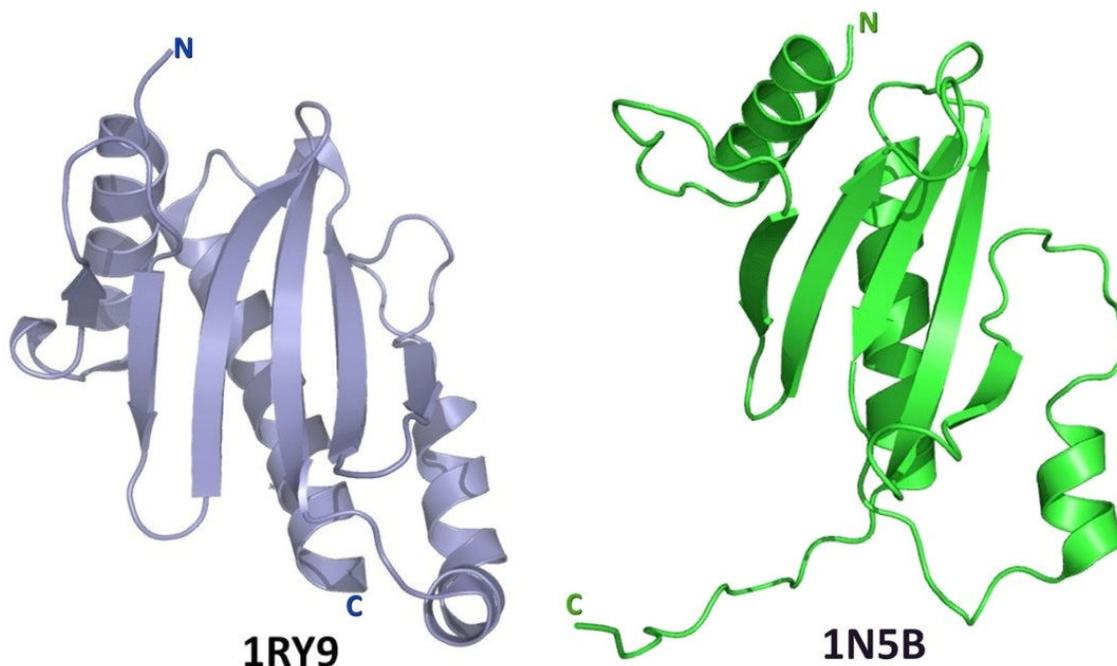


Figura 6: Representação de estrutura terciária de duas chaperonas do T3SS de *Shigella flexneri* (Spa15, entrada do PDB: 1RY9) e *Yersinia enterocolitica* (SycE, entrada do PDB: 1N5B), respectivamente, com enovelamento composto de 3 α -hélices e 5 folhas- β ³⁹.

As chaperonas secretórias são classificadas de acordo com a sua função⁶⁵, estrutura^{29,43} e/ou interação com as correspondentes proteínas cognatas^{23,43,51}, podendo interagir com uma ou várias proteínas, e funcionar na patogenicidade ou biogênese flagelar do T3SS²³. Essas proteínas são agrupadas de acordo com a seguinte classificação:

Classe I: É a classe de chaperonas secretórias mais estudada. Compreende cadeias protéicas pequenas, de até 130 resíduos de aminoácidos⁴³, pl baixo (4 a 5)^{19,29} e formação de homo-dímeros^{19,29,58}, subclassificadas em IA e IB. As chaperonas da subclasse IA se associam a uma proteína cognata⁴³, e os genes que codificam essas chaperonas⁴³ são adjacentes aos genes de suas efetoras^{19,43}, de forma que ocorra sua co-expressão *in vivo*³⁹, aumentando a performance do

⁶⁵ Wilharm, G.; Wilharm, G.; Dittmann, S.; Schmid, A.; Heesemann, J.; On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int. J. Med. Microbiol.* **2007**, 97, 27–36.

sistema⁵³. As chaperonas da subclasse IB podem se associar a duas⁴³ ou até três proteínas efetoras^{19,29} do T3SS, e seus genes estão próximos a *operons* de outros componentes do sistema de secreção e não de suas proteínas efetoras⁴³. Essas chaperonas mediam o transporte de efetoras até a maquinaria do T3SS²⁹, ligando-se a um domínio específico nos primeiros 100 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal^{19,58} dessas cadeias, na direção da pequena sequência sinalizadora de exportação¹⁹. Seus monômeros apresentam pouca similaridade de sequência de aminoácidos¹⁹, porém, uma grande semelhança estrutural, constituída de cinco folhas β e três α -hélices^{19,58} (Figura 6), com a porção C-terminal hidrofóbica enterrada no interior da estrutura terciária⁴³, formando um complexo semelhante a uma ferradura quando associadas com a proteína efetora^{19,58}. Acredita-se que as chaperonas da classe I, ao se associarem a suas efetoras cognatas, expõem uma região após o centro de ligação, que serve como sinalizadora. Dessa forma, promovem o encaminhamento e a interação do complexo com a ATPase do T3SS^{19,43}, e não com o flagelo⁵⁷, o que facilita o desenovelamento da proteína efetora⁶⁶. Essas chaperonas apresentam, também, um papel na regulação da síntese de proteínas efetoras.

Classe II: Compostas de até 160 resíduos de aminoácidos⁵⁴, as chaperonas desta classe se ligam às proteínas translocadoras^{29,43,58} e formadoras de poro¹⁹ do T3SS. Pouco se sabe sobre os mecanismos de interação dessas chaperonas com suas proteínas efetoras¹⁹, porém, sabe-se que desempenham um papel importante na regulação da secreção²⁹. A presença das proteínas translocadoras no citosol bacteriano funciona como um aviso de que o poro está formado na célula hospedeira e que o T3SS está em funcionamento⁵⁴. Uma chaperona interage, então, com duas translocadoras hidrofóbicas^{19,43}, causando mudanças conformacionais dos seus domínios e aumentando a estabilidade das proteínas efetoras⁴³. A toxicidade das proteínas translocadoras para a própria célula

⁶⁶ Akeda, Y.; Galán, J. E.; Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **2005**, 437, 911–915.

bacteriana⁶⁷ também é neutralizada pelas chaperonas da classe II^{68,69}. Da mesma forma que as chaperonas da classe I, as chaperonas da classe II agem como homo-dímeros³⁹, contudo, diferente das primeiras, as chaperonas desta classe se associam a proteínas com uma ampla variedade de estrutura secundária, apresentando assim, uma ampla variedade de sítios de ligação³⁹.

Classe III: Constituída pelas chaperonas flagelares²⁹, com estruturas secundárias de α -hélice estendida⁷⁰, que se associam a subunidades dos flagelos^{19,58} e/ou às subunidades constituintes da estrutura de agulha e do injectossoma¹⁹, prevenindo a polimerização dessas proteínas no citoplasma antes da secreção^{19,29,43}. Essas chaperonas mascaram os sítios de polimerização das proteínas flagelares^{19,43} ao se associarem à porção C-terminal de suas proteínas efetoras³¹. Os componentes helicoidais do injectossoma são associados a chaperonas citoplasmáticas especializadas que mantêm esses componentes num estado monomérico, prevenindo sua auto-associação prematura, e, provavelmente, auxiliando no seu transporte até o canal de exportação¹⁹.

Classe IV: Consiste numa nova classificação das chaperonas secretórias²⁹, que compreende uma chaperona de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) que apresenta estrutura e ação diferentes das outras classes de chaperonas já estabelecidas.

1.4. Proteínas alvo

Os organismos do gênero *Xanthomonas* possuem T3SS e T4SS, que podem estar envolvidos nos processos de invasão celular do hospedeiro e manutenção da patogenicidade¹⁵, e, embora não sejam conhecidos genes para

⁶⁷ Neyt, C.; Cornelis, J. R.; Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 143–156.

⁶⁸ Menard, R.; Sansonetti, P.; Parsot, C.; Vasselon, T.; Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **1994**, *79*, 515–525.

⁶⁹ Wattiau, P.; Bernier, B.; Desleep, P.; Michelis, T.; Cornelis, G. R.; Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10493–10497.

⁷⁰ Yip C. K.; Finlay, B. B.; Strynadka, N. C.; Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 75–81.

chaperonas secretórias⁵³, acredita-se que estas proteínas estejam presentes em *Xanthomonas*, uma vez que são essenciais para o funcionamento dos sistemas secretórios¹⁵. Em 2005⁷¹, análises de bioinformática no genoma da *Xac* identificaram genes que codificam proteínas hipotéticas com as características físico-químicas próprias de chaperonas do T3SS e T4SS, indicando, assim, uma possível função dessas proteínas nos sistemas secretórios envolvidos. Esses genes identificados apresentaram similaridade com genes de chaperonas secretórias de organismos já identificados e/ou próximos cerca de 1,5 kb dos *clusters* relacionados a patogenicidade e virulência na *Xac*, mais uma característica de genes das chaperonas secretórias⁷¹.

Seis desses genes apresentaram similaridade de estrutura primária maior ou igual a 45% com as famílias de chaperonas do T3SS de outras bactérias, como *Yersinia*, *Shigella*, *Rhodobacter* e *Salmonella*⁷¹; cinco deles estavam localizados no cromossomo da *Xac*, e um deles, no plasmídeo pXAC33. Outros 25 genes cromossomais e 9 genes plasmidiais apresentaram características de chaperonas do T3SS; algumas destas sequências estavam próximas ao *cluster* do T4SS, porém, como estas proteínas compartilham semelhanças estruturais com as chaperonas do T3SS, não se pode afirmar se são do T3SS ou T4SS. Estas sequências, entretanto, apresentaram uma semelhança da ordem de 10% com as características próprias de chaperonas, com regiões que compreendem cerca de 10 a 20 resíduos de aminoácidos na estrutura helicoidal⁷¹.

A Tabela 1 contém os dados referentes a estes 40 genes identificados como potenciais chaperonas hipotéticas da *Xac*.

⁷¹ Khater, L.; Santos, T. M.; Alegria, M. C.; Docena, C.; da Silva, A. C. R.; Ramos, C. H. I.; *In silico* identification of potential chaperone genes that belong to type III and type IV secretion systems in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Genet. Mol. Biol.* **2005**, *28*, 321-327.

Tabela 1: Chaperonas secretórias hipotéticas da *Xac* e seus genes correspondentes, identificados por experimentos de bioinformática⁷¹, em que a localização do gene no genoma pode ser cromossomal (C) ou plasmidial (P)

| PROTEÍNA HIPOTÉTICA | LOCALIZAÇÃO NO GENOMA | P. M. / kDa | pI TEÓRICO | GENE DA <i>Xac</i> | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS |
|---|-----------------------|-------------|------------|--------------------|--|
| Possíveis chaperonas secretórias | | | | | |
| XAC2483 | C | 17,8 | 5,8 | NP_642798.1 | MALLVWQDDLNTGIEVIDHQHRRIVDMINQLHVAQTSLQQLAVAEVIDELIDYTLSHFA FEEELMQEAGYPFSQAHQRVHAVFGKRVGEYRLRFQAGEDVSDRLNMLSRWLFN HIRGDDQAYAPQVIAHLDRFSRTHQHGGWLGRTLKRIFG |
| XAC1346 | C | 10,9 | 5,6 | NP_641681.1 | MKTIHMLSLSAIAALTLAACQGPDAEQARRDAASAAKHAAAATEQAADRAAVEAKAA TADASVAARELAADASRATANAADATADKTREMANKAEQNADKHDADHAQH |
| XAC1715 | C | 12,7 | 6,8 | NP_642046.1 | MHATGVQWVAGQHWLPWRWFRNQTSPPEDVTEAKEDAMKFKHILMLTLGAAAVA ALPAMAQAAPQQTGGGAAQKTDDAKAKTEAERKAERRAAAAAQKPKADSAPREE EEEEKPAR |
| XAC3022 | C | 20,2 | 4,5 | NP_643331.1 | MSAPPPAAAGDQVPLATSAADAAREAVHAGRAAALAAARQGMAQAENALGERLR ALAAQRPTETAPRTAPMRPSRADAVTPLHSASTSGDTSMSDDTQTPPPDQTPAATA QSSGSSQIEAALKAAQAQIDQAMAASDRAVRAAMQAATAATAAAGNDQAIDNANQA LQAEQAAAAAVTAAQQQTEQAMAATSPATPNADDGIAS |
| XAC1347 | C | 17,1 | 5,5 | NP_641682.1 | MTINKLLIAMALGLALTACSKPEQAQDAASANEAAADAQTAADQAAASGSQSADAA QAAANTAAASADTAADAAQAASGAATDAAADQAADAAKTAEDTAKAAKDTAEEAKK |
| XACa0025 | P | 21,3 | 6,0 | NP_644711.1 | MQSSNMTIENPASVWRLRVELLDVAPPVWRRFDYADVKLSQLHYFIQGVMGWEL MHLFSYQDGRGYGDQISSELRLCDVCRVGDALTYTYDFGDNWQHRVTVEKTMARP KGTYPRIAGKYACPPEDCGGPWGYGDMLRVLAGHRNARRRELVEWLGPFNPKT FDMEEARERLAEYVVASG |
| XAC0285 | C | 18,6 | 7,0 | NP_640641.1 | MTAFKRLAHLILTTDGVNYVAQQHRSRTMLDPRIEKVDLALTEIAQDPSEKVALWQW ACREMLHETLIGMHQLSHLAGIARQVANDWREPVDVIAPAKPYLAASALADRRLPQV LDGLGSTHDDNDRATLWRLRYASLIASLTLQGMQALAEKHRIDRQAMAIGSLN |
| XAC3222 | C | 14,7 | 9,1 | NP_643529.1 | MDTSESAIFHGLEMSRKSWAYQTAAERLLWYRLRDRRLLGFKFRRQCPVGPYVADF ACLERALIVELDGSQHLEAPSDAVREAFHRKGFQLLRFWNNEVLARTDAVCDIVQ RLCVARFSPPPSGVR |
| XAC1364 | C | 16,3 | 5,5 | NP_641699.1 | MSIQSKTEHSLNDLIAISRDGKDFYEEAAAKVGDALATLFRRIAGVKTDIVSSLSSVV TAVGGTPEQHGLTVGSMQQFYGKVRATLGDTKYGYVAEELEESDRLLKAFDETIAD QDTPAAARDAALRLLPEVRACHDVMRNRKHAMKSAA |

Tabela 1 (continuação): Chaperonas secretórias hipotéticas da *Xac* e seus genes correspondentes, identificados por experimentos de bioinformática⁷¹

| | | | | | |
|---|---|------|------|-------------|---|
| XAC3257 | C | 12,9 | 6,9 | NP_643565.1 | MRRAESAWAASIAYGAGLAKQVSFGHVTPDNAGKVLDMFALDPEQIRELGLIGVEE LGETVYHAWVSINAGELDRVVQWFRTPRVEFVGKHCSELIRAGRIGPVLTMAREHAL LRHR |
| XAC1241 | C | 18,1 | 6,9 | NP_641577.1 | MKASLFTSLLMMVMSAHADGLTKSADGKTLVSFGAPTFFKQVLHYRKLYDKKPPF DAEIIYFSNGMYKIISQGENHYGVVVLQGTFFDDQSYTIRFISLPSEDWGNKTAHFHQL TFVRGDKQNVFIQNAIVDTGEAIAQQNGTYTLEKNTVSNPVPTSWKHD |
| Próximas a genes de patogenicidade/resposta de hipersensibilidade (cluster T3SS) | | | | | |
| XAC1264 | C | 14,3 | 8,5 | NP_641599.1 | MEWMLLPLKRYADFNRSRRKEYWMFALMQFLVLFVFGGLFAVAAMGNENGP GALAWLICAVMVIACLALIVPGIAVTVRRLHDQDKSGWFYLISLVPYVGFVLLVFMCI EGTPGPNQYGENPKQ |
| XAC0419 | C | 10,7 | 7,0 | NP_640774.1 | MPHDPSVVAHVEKTCTAQLAHFASDITRVDVHLRDENGQRGGAADRTCSIEAHVA GLPPIAATNSAETTASAVTGAARKLRTAIEHARGKQHSKATAPPPDML |
| XAC1990 | C | 12,1 | 6,7 | NP_642316.1 | MNVNEFLQRLSDALAGERQALLENIDGLMRHTQDKLSALQALEAAMPAGEEERL RELAEANRANGALLARRRREVNWALRHLGRTESAPSYDAKGQSSVLRGGRSLAVA |
| Próximas a genes de degradação da parede celular do hospedeiro | | | | | |
| XAC0142 | C | 11,3 | 10,3 | NP_640498.1 | MTNPHSLIPNPGPQWTNLSHLVLAFLVSGVCAVLLRFIRAHGALKALANPVITTAVC AVVVQDGSAPPWQNALLIAAFFSVPASLCVVLVSAAMAWLINKRLARKPA |
| XAC0139 | C | 17,1 | 6,2 | NP_640495.1 | MAVSSGLPPPGRFPLCPALQGITNVMTDPQIIPITLTVAHVEFGGNTGRGAYFYSFS PDLLIVGKGEQDVTLRYAFCKSVPHRFKIISLLNSDSTGQIGPQHIDPDGRGVQVWN ANRDRTLIFFSVVVKDTHGTGNHFSCDPQVGNDPEISPTFGRH |
| XAC0138 | C | 18,6 | 7,7 | NP_640494.1 | MSLYRVVCAVLMATCSLLTATGCAKQPTLSSRLIVSDAPMLEKGGAVIVLARPIPD RQWRHLESATSSDAGDEKQFQVTVASPASIIELHYPETGTYSFKLRPAARAKPPFL QSRRLVIGQADLTDPQTKHQVHWPSMSVVHVSGNTYPEGWARILASTFDVPFGSD APDT |
| XAC0167 | C | 14,0 | 11,3 | NP_640523.1 | MSRGEVTHQRSPAQAPHADSALCATFSQEEGTSLRASGWPPSALRAPSPAGGG RQSGDAAVKPLSRLRERGWGEGTAAGSRPRKPCERRGRHTSAVTRSNPATLIRR CAPPSPREKERAPTPTPISTAQ |
| XAC3564 | C | 16,6 | 10,8 | NP_643871.1 | MSDSMSEPIWSDLQVSYLQALGHTVYLDLDRDAVDALPAPVEIAERAPMAAPARVERA LQPATANAPVARRNAPAAPAEAPRAPSTAPASVPQRRSRVGMPPDLQMALLRASG CNPGDPAQALMASWPLAELRGNPAAKRALWPQLRALRRRRDPA |

Tabela 1 (continuação): Chaperonas secretórias hipotéticas da *Xac* e seus genes correspondentes, identificados por experimentos de bioinformática⁷¹

| | | | | | |
|------------------------------------|---|------|------|-------------|---|
| XAC3566 | C | 12,3 | 7,7 | NP_643873.1 | MLVSAAGATDLYKWKDAKGVTHYETPTPPTGQRYEARRIDARSGTAAIAAETAAP ESADCLTARRNELLSGKGEVSMAGADGKPGAVLDQDARATQRNLADAAVKAYC KPAAPGGPAT |
| XAC0027 | C | 15,7 | 5,62 | NP_640383.1 | MTQRLMKTALIGVLALVSQGALAQAADKPAKALTSGEVTSMLTAKGYTKVHDLKFE HGVTADARSGDGKDVVDVHIDPVTGRVYGDQTTSKLSEADVRSLSSTGGYADVH DLKFNDGLWKADAKRNGQKVELHVDPEDGHVSVEND |
| XAC3509 | C | 13,3 | 11,3 | NP_643815.1 | MDEVLRQIARAVHSDTHRRPLRLLRCLSCERYRKTAPRRRPEVELVPGTDRPD GGRTDPDRWQRRRTALNDIARASDAARHVGRRRTMGMWLCTIRRP HARASSRETC RCALVL |
| XAC2367 | C | 10,5 | 4,5 | NP_642683.1 | MQQIEIGQMVFLRDGEVGVGAIRDIRNEGDELVINIENGGDFVLPASVVRDVHSGKV MLDVDKLPDDVRNALRHPHDNELQTSTYAASNMQDGALK |
| Próximas ao cluster do T4SS | | | | | |
| XAC1366 | C | 22,6 | 6,2 | NP_641701.1 | MDIATPLPLHADHLAALEQAYATPPRAYHHFGHVRAVLQHYAEVAAGPGWQQPVE VWLAVLFHDAVYQGRSDNEAQSALMAAESIPRWWPQAQVDVERVHALILLTARH GQLQPQDVDEDAALFLDCDMAILAAPAAVFDAYDQAIIEEYRGHVPSVLYRLNRRR FLAGVLKQPRIFLSDYFHHHDSAARANLRRRLGR |
| XAC2407 | C | 17,8 | 5,2 | NP_642723.1 | MIDLNGQLHDVQATETLGQALAAARPVS AVVQLHGDLGAGKSTLARALLRALGVAG PIRSPTYTLVERYPLSTGDEAWHLDLRIGHAGELDFLGLDEGSASLWLVWPERG AGVLPVVDLDVELAVAGEGRSVLLGRSAIGHAWMDRLSRQPQLQVLF AASREE |
| XAC2622 | C | 14,7 | 6,0 | NP_642935.1 | MNPMYVSKLSLVVAAALVGACATKPAPDFGGRWKVNHVNFDEAPTEIPLYTSYTYQ ATPMDGTLKTMLE RWAADSNMQLSYNLPDYTLIGPVSAISTTSVQQAATELSAVY AAQGVSVSVSANKLLVQVPVSSGAKL |
| XAC0571 | C | 15,4 | 4,7 | NP_640924.1 | MKLELAIAPSLAQLAGANDALERSLTLEGLHAERIGQVRLIVEELGCNALTHGQCAA QPLRLQLQLDAQALVLEMHDAGSAFDPCAAPLPEVTDELDDRAIGGLGLFLVHQFA DHIDYRRDGAYNVVRVTLLHPYAPVPEALS |
| XAC2611 | C | 17,1 | 8,1 | NP_642924.1 | MIIRLASIILLVSWTAPAFQAQTACPAGVAPGSPQCGPDSGTSRDDIPTPPRPTGEW IKTWGAIAGSDSTGEAGTAAGELSEDKAKDIAIRRCVNGASDCKINLVYRNQCAAL VSTQSDSFYQGSATKERAILAIGNCKKSRSGECKVLYSGCSDPIFKKY |
| XAC2606 | C | 17,2 | 8,4 | NP_642919.1 | MKLFILLIFLSSSAAWGQTACPSGVAPGSPQCGPDSGTSRGDIPQPPRPTGEWL KTWGAIASSDNGDIGSSTGKLSENEARVEALKVCSDFGNSDCKVNFYTKNQCVAV VQAAKGRGTGGKIISAATEEIAKKDALDECLKESGAKCYVRGTDCSKPFFRFK |
| XACb0033 | P | 8,4 | 5,6 | NP_644761.1 | MAHVNSRVQKHRDALRMAGLRPVQIWPDRTRPDFAEECRRQCRLAAQADMADT DMQRFMDEALADMDGWTE |

Tabela 1 (continuação): Chaperonas secretórias hipotéticas da *Xac* e seus genes correspondentes, identificados por experimentos de bioinformática⁷¹

| | | | | | |
|--|---|------|------|-------------|---|
| XACb0035 | P | 15,8 | 7,9 | NP_644763.1 | MNNAEIMKIQVNALTPELVTELVALQQEAERFFSIQQSYAKVIFDVFVDFGAELLTPDSL AKVNNAMMIAYQMTANVQKRMHALRGKLPKGYRDENGHFVNARTFELLRDTQKD FDKAVKTAKKISGWASVKIDGTSYPEQ |
| XACb0042 | P | 14,2 | 9,8 | NP_644770.1 | MGARAMRNVVMIVSGLAVVVAIGGAVYYFFPKQSAATTSNVPQPPSTDNRVLPVVP AGNPLLKADKAQFRQWLPPYCGADIFLQSQPEPHKVDVCVNGTVQRVASATGIKLS RADVLDSRVKAHWREVMGAK |
| XACb0043 | P | 9,4 | 9,1 | NP_644771.1 | MRETPTPKGLATMQLFFALLPGLILFWPLLKLIQKGWRLFVAVLFFAALISGCASTSNK FNKSPCASKFENVNTDNYGSQSDA |
| XACb0048 | P | 13,9 | 8,6 | NP_644776.1 | MEREKPKPKRRKLNLTVALLPSTLFFNDEEAMLTLTKKELAVLDEAQPDIYAVYLVETE HENSRRWWRMTLKLPTQDKVYEVVTALGKTKLWKRLDIAVDFIKESCPHTKSVFVVF APWHN |
| XACb0049 | P | 13,6 | 8,5 | NP_644777.1 | MSEAATRSAFRYFGGSLQLPLGLKRPSQFCFQAFVVLDRGVRVSVGLVQGELEQ GSDHHRIGQAAEESGSDGIYELLNHGSWQISRQGDVHGGCFAHRSPKFLWGLTM PIDMRIFKLKSRCLA |
| Próximas à proteína virB6 | | | | | |
| XAC2605 | C | 16,6 | 5,5 | NP_642918.1 | MSHAQGAESITDKQERARQQDELLEQALNSDQQRQRGDLAKDIKLRSSYVQCVK NAGAVVPALMECNSQEYAYQDARLNAAYKRLNLRWPAEKKDRLKQEERDWIKWR DTLCKSNGALGGGQAELEDTSCNLNATAQRAEELEKR |
| XAC2601 | C | 16,4 | 10,2 | NP_642914.1 | MIDTGETSSNNGWLTHTLARRPDASLFVVGESRVSVHATRGAWSASQDRLWSG AAAGDGDVSLGSSISGKRLPDEDRLQKRHSGAMTWLNFQRMSCARNCRKQSVR VSALRPILPTCTERFDPNGRCGSKKSRRCLAGGFSSLEILRF |
| Próximas a clusters de patogenicidade, virulência e adaptação | | | | | |
| XACa0040 | P | 16,1 | 10,9 | NP_644726.1 | MDEIRPCELLLHVCRNLPRLATDQGASGARRPQSRPDRALELTVGSDPARFLAAKT QRRFYCFLYFCKSSSRTSSAILVPRCAQAVLICRCLSGTSMVRRFICSGSSLLLRL STHASAATGAGLLVGLVPIWTFVFLIVRTPSVR |
| XACb0063 | P | 17,2 | 12,1 | NP_644791.1 | MRRTQVGRIGRGLVEVVCYPCVRLPMPMSQNMNRNRCSGWPLLQSRGRDRK RSPA WGAAHRCRVPRHRQSALILAPARSACRSKTAPPPARRFPTGAAMTSVARAN GRHAENCLGHRSSSPGPRSCRQLHRRRCRRPGARSEGRQCVRNP |
| XACb0064 | P | 16,2 | 11,7 | NP_644792.1 | MAVFYTNPCRSPSPATPSTGQPSINSRAGSSTRRLRLCTGGAWPNRPLPYKKKAPH RWSAFGIHYSVGLGISAVSRSRQGIDRVKLSIYRGTTVPSRVRSVVHVHNSGCAR AMQECINPVMRPPDRPAGPRRHRASAWNLCALAAASPR |

1.5. Técnicas de análises de proteínas

A identificação de proteínas tem sido a base da bioquímica atual⁷², e o advento da proteômica, área que estuda o complemento protéico do código genético, permite a comparação entre diferentes tecidos, fluidos e estados celulares^{73,74}. Combinada a ferramentas de bioinformática, a proteômica permite identificar, caracterizar e até mesmo quantificar uma grande quantidade de proteínas presentes em amostras biológicas complexas⁷⁵, ao acoplar métodos de separação a análises de identificação das cadeias protéicas⁷⁵. As identificações são realizadas através de espectrometria de massas (MS)⁷² uma das mais importantes técnicas de análise dentro das ciências da vida^{76,77}. A espectrometria de massas tem apresentado desenvolvimentos reconhecidos nas últimas décadas, devido a sua alta velocidade, sensibilidade, precisão⁷² e exatidão⁷². As técnicas de MS são usadas nos contextos de estudos de proteomas sem maiores problemas^{76,78}, e a principal limitação destes experimentos se deve, em grande parte, às limitações computacionais e tecnológicas⁷⁶.

A separação das proteínas de uma mistura protéica de baixa complexidade^{76,79,80} pode ser realizada através de eletroforese bidimensional, uma

⁷²Mann, M.; Kelleher, N. L.; Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy. *PNAS* **2008**, *105*, 18132–18138.

⁷³ Geromanos, S. J.; Vissers, J. P. C.; Silva, J. C.; Dorschel, C. A.; Li, G. Z.; Gorenstein, M. V.; Bateman, R. H.; Langridge, J. I.; The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **2009**, *9*, 1683–1695.

⁷⁴ Vaezzadeh, A. L.; Deshusses, J. M. P.; Waridel, P.; Francois, P.; Zimmermann-Ivol, C. G.; Lescuyer, P.; Schrenzel, J.; Hochstrasser, D. F.; Accelerated digestion for high-throughput proteomics analysis of whole bacterial proteomes. *J. Microbiol. Meth.* **2010**, *80*, 56–62.

⁷⁵ Aebersold, R.; Mann, M.; Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198–207.

⁷⁶ McCormack, A. L.; Schieltz, D. M.; Goode, B.; Yang, S.; Barnes, G.; Drubin, D.; *et al.* Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 767–776.

⁷⁷ Scherl, A.; Tsai, Y. S.; Shaffer, S. A.; Goodlett, D. R.; Increasing information from shotgun proteomic data by accounting for misassigned precursor ion masses. *Proteomics* **2008**, *8*, 2791–2797.

⁷⁸ Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F.; Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins electroblotted after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 464–470.

⁷⁹ Mann, M.; Hojrup, P.; Roepstorff, P.; Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 338–345.

⁸⁰ O'Farrell, P. H.; High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007–4021.

técnica de separação de biomoléculas introduzida há mais de 35 anos⁸⁰. Os géis resultantes apresentam mapas do proteoma celular, permitindo comparar a expressão protéica em diferentes condições e indicar o aparecimento ou desaparecimento de proteínas ou sua expressão diferenciada⁷⁸. A separação em primeira dimensão ocorre pela migração de proteínas pela rede de poliacrilamida adequadamente tamponada, para que cada molécula de proteína seja focalizada em pH igual ao seu pI (pH em que a molécula encontra-se neutra, com igual número de cargas positivas e negativas), de forma que proteínas fiquem distribuídas pelo gel conforme seu pI. Ao acoplar esta etapa à separação por SDS-PAGE, as moléculas de proteínas são separadas em uma segunda dimensão, de acordo com o seu tamanho⁸¹. Esta técnica permite separar um grande número de proteínas dentro de uma ampla faixa de tamanho e pI, conforme se verifica pelo gel mostrado na Figura 7.

Após a separação das proteínas presentes numa mistura protéica, cada *spot* apresenta uma proteína de pI e massa molecular definidos, e é submetido a lise enzimática, no intuito de fragmentá-lo em peptídeos de tamanhos adequados ao sequenciamento e identificação por medidas de massas. A enzima mais utilizada para este tipo de análise é a tripsina, uma peptidase com especificidade para arginina e lisina⁸¹. Outras proteases também podem ser utilizadas, dependendo do conteúdo de aminoácidos na cadeia a ser analisada ou do tipo de informação que se pretende obter com as medidas de massas.

Com o aumento do número de proteínas presentes, a complexidade das amostras também aumenta⁷⁷, e somente as medidas de massa dos peptídeos provenientes da lise trípica não gera a especificidade necessária para a diferenciação de proteínas com mesma massa molecular ou massas muito próximas⁷⁷. Para tanto, é necessário induzir a fragmentação destes peptídeos, o que permite obter informações sobre sua sequência primária, e, portanto, garante identificações mais confiáveis⁷⁶.

⁸¹ Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed., W. H. Freeman and Company, **2005**, New York.

Experimentos do tipo *Shotgun*⁸² tem sido a forma de análise de proteomas em larga escala atualmente utilizada, em que dezenas de milhares de peptídeos, presentes em várias concentrações, são analisados após separações cromatográficas⁷⁶. Comumente, se utiliza ionização do tipo *Eletrospray*⁷⁷ e aquisição dependente de dados (*Dependent Data Acquisition – DDA*)⁷⁷, onde os peptídeos eluídos são selecionados para fragmentação, na tentativa de obter maior informação sobre as sequências de aminoácidos.



Figura 7: Gel de eletroforese bidimensional de célula de *E. coli*, em que se pôde resolver mais de 1000 proteínas diferentes. Na primeira dimensão (IF), houve separação protéica por focalização isoeletrica e, na segunda dimensão (SDS), as proteínas foram separadas pelo tamanho das cadeias. Cada *spot* observado corresponde a uma cadeia peptídica de (pI, massa molecular) correspondente⁸¹.

A análise proteômica por cromatografia líquida acoplada a *tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) se inicia com a digestão de uma complexa mistura de proteínas e separação dos peptídeos por cromatografia líquida de fase reversa⁸³

⁸² Tabb, D. L.; Vega-Montoto, L.; Rudnick, P. A.; Variyath, A. M.; *et al.* Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 761–776.

⁸³ Steen, H.; Mann, M.; The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 699–711.

peptídeos selecionados para fragmentação⁷⁷, o que aumenta a especificidade da técnica e, conseqüentemente, a qualidade e confiabilidade das identificações⁷⁷.

Um experimento do tipo DDA é cíclico: o ciclo se inicia pela varredura de sinais de m/z seguida da seleção de íons precursores, que podem estar ou não no pico do sinal cromatográfico, para fragmentação e obtenção de espectros de massas/massas⁷⁷. Diferenças mínimas na separação cromatográfica, contudo, podem mudar a ordem de eluição dos peptídeos⁸⁵ ou alterar quais deles são selecionados para a fragmentação⁸⁶. O maior desafio analítico na reprodutibilidade das identificações nos experimentos de LC-MS/MS reside na diferença da eficiência de ionização dos diferentes peptídeos resultantes da digestão enzimática^{77,87}, uma vez que a maioria destes peptídeos está na região menos intensa da distribuição⁷⁶. Em geral, a concentração das proteínas em misturas complexas corresponde a uma ampla faixa, com a maioria das proteínas em concentrações de duas a três ordens de magnitude menores que o peptídeo mais abundante⁷⁷. O número de íons selecionados e o tempo da aquisição de MS/MS são otimizados para determinado tipo e complexidade da amostra⁷⁷; geralmente, com o aumento da complexidade, o número de íons precursores aumenta, e o tempo de aquisição diminui, criando um problema fundamental para a análise dessas misturas⁷⁷.

⁸⁵ Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. R.; A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4193–4201.

⁸⁶ Mallick, P.; Schirle, M.; Chen, S. S.; Flory, M. R.; Lee, H.; Martin, D.; Raught, B.; Schmitt, R.; Werner, T.; Kuster, B.; Aebersold, R.; Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 125–131.

⁸⁷ Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; *et al.* Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1265–1272.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

O processo de virulência da *Xac* ainda não está bem elucidado e embora possa ser semelhante ao de outras bactérias Gram-negativas e/ou envolver os Sistemas de Secreção do Tipo III e IV, ainda há poucas informações sobre as bases moleculares do cancro cítrico. Dessa forma, a identificação de chaperonas secretórias, essenciais para funcionamento do T3SS e T4SS, pode ajudar a conhecer melhor o fitopatógeno e a doença, ajudando, também, no combate e tratamento do cancro cítrico, uma vez que atualmente a única maneira de eliminação é a erradicação das plantas contaminadas²¹.

A confirmação da expressão das chaperonas secretórias ainda hipotéticas, e o posterior estudo de sua função, podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de virulência da *Xac*, permitindo, a longo prazo, desenvolver compostos que interajam com estas proteínas²⁷, interferindo nos processos de translocação, e evitando, assim, a disseminação da doença em plantações de citros.

O objetivo principal deste trabalho foi determinar a expressão das 40 proteínas alvo, identificadas como hipotéticas e possíveis chaperonas dos Sistemas de Secreção do Tipo III e IV⁷¹ na bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), que possuem peso molecular na faixa de 8 a 23 kDa e valores de pI entre 4 e 12, e comparar a expressão destas proteínas em meio rico (LB) e em meios enriquecidos com nutrientes provenientes da laranja. Essas análises foram realizadas através de experimentos do tipo MS/MS, que permitem obter maior informação sobre a sequência primária dos peptídeos detectados, e associá-los às proteínas a que pertencem, através de comparação com sequências existentes em bancos de dados.

Paralelamente, foi feito monitoramento do consumo dos nutrientes presentes nos extratos específicos pela *Xac* e a produção de metabólitos potencialmente tóxicos para o seu hospedeiro. Para tanto, foram feitas análises de

GC-MS e os espectros de massas obtidos foram comparados com bancos de dados para identificar as moléculas presentes.

Um pequeno estudo qualitativo do metaloma da *Xac* também foi realizado, através da identificação de espécies metálicas presentes nas frações protéicas da bactéria cultivada em meio controle. A identificação de possíveis íons metálicos associados às cadeias protéicas pode ajudar no entendimento da função dessas proteínas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura das células de *Xac*

As células de *Xac* cultivadas foram da cepa 306¹⁶, que teve seu genoma sequenciado em 2002¹⁵. As células utilizadas foram cedidas pelos grupos de pesquisa dos Profs. Carlos H. I. Ramos (IQ-Unicamp), Celso Benedetti (LNBio-LNLS) e Shaker Chuck Farah (IQ-USP/SP).

Inicialmente, a *Xac* foi cultivada em placas de meio de cultura Luria Bertani (10 g/L de peptona bacteriológica e 5 g/L de extrato de levedura, pH 7) com ágar (15 g/L de meio de cultura), na presença de ampicilina. A solução estoque de ampicilina foi preparada na concentração de 50 mg/mL de ampicilina sódica cristalina (Sigma-Aldrich), em água deionizada estéril ou mistura de água e etanol na proporção 1:1 v/v, filtradas em filtros de 0,22 µm e estocadas a -4°C. Esta solução foi adicionada ao meio de cultura para que a concentração final de antibiótico fosse de 50 µg/mL. Nestas condições, as culturas foram mantidas a 32°C por um período de 24 a 48 horas.

Posteriormente, as células obtidas foram cultivadas em meio de cultura Luria Bertani líquido, na presença de ampicilina, e mantidas a 32°C por um período de 24 a 48 horas, sob agitação, sendo possível verificar um melhor e maior crescimento celular. As células foram então aliqüotadas em glicerol estéril, na proporção 1:1 v/v, e armazenadas a -80°C.

As cepas de *Xac* foram cultivadas em três condições diferentes, sempre em meios de cultura líquidos:

- a) meio Luria Bertani (LB, meio controle);
- b) meio LB com extrato de folhas de laranjeiras; e
- c) meio LB com extrato de cascas de laranjas.

Em todas as condições, o meio de cultura foi esterelizado antes da adição das células de *Xac* em autoclave por um período de 30 minutos. Os meios de cultura com adição de extratos de folhas e cascas de laranjas passaram pelo mesmo procedimento, para garantir a esterilidade dos meios de cultura.

3.2. Extratos de folha e casca de laranja

As folhas de laranjeira submetidas a extração foram obtidas de pés de laranja provenientes do CEASA, Campinas, cultivados sem agrotóxicos, no dia dos experimentos. Para cada ciclo de extração, 20 folhas saudáveis foram selecionadas, lavadas com água corrente, secas, picotadas e acomodadas em filtro do tipo Soxhlet.

As cascas de laranja utilizadas foram obtidas de frutas do tipo 'laranja pêra' compradas em supermercado na véspera dos experimentos. A cada ciclo de extração, três laranjas foram lavadas com água corrente, secas e descascadas; as cascas foram então picotadas e acomodadas dentro de filtros do tipo Soxhlet. Em todos os experimentos, os filtros utilizados eram novos.

As folhas e cascas de laranjas foram submetidas a ciclos de extração com diclorometano, em sistema Soxhlet, por um período de 24 horas. Após esse período, adicionou-se Na_2SO_4 , no intuito de eliminar traços de água, e o diclorometano foi removido por evaporador rotativo (Büchi R-215). O extrato bruto foi redissolvido em etanol (suficiente para dissolver todo o extrato obtido), e essa solução alcoólica foi adicionada ao meio LB líquido para cultura de células, numa proporção de 0,4% (v/v).

3.3. Análises dos extratos por GC-MS

Os extratos obtidos foram analisados antes e após cultivo da *Xac*. Nas análises antes da cultura celular, os extratos brutos obtidos, após dissolução em etanol, foram dissolvidos em água na proporção 0,4% (v/v), seguido de extração com diclorometano, adição de Na_2SO_4 , e remoção do solvente com evaporador rotativo. Esse procedimento visou preparar extratos de modo semelhante aos extratos obtidos após cultivar a *Xac*.

Para verificar a perda de compostos voláteis durante os processos de autoclavagem e incubação, os extratos brutos, após dissolução em etanol, foram adicionados aos meios de cultura na proporção já indicada, submetidos a autoclavagem e mantidos nas condições de cultivo da *Xac* pelo período indicado,

sem adição das células bacterianas. Após o período de incubação, os meios passaram por nova extração com diclorometano, adição de Na₂SO₄ e remoção do solvente por rota evaporação.

Após cultivar a *Xac*, os meios de cultura foram centrifugados e extraídos com diclorometano para análise dos metabólitos gerados. Todas as amostras foram injetadas em sistema GC-MS (HP 5890/5970) equipado com uma coluna HP5-MS (30mx0,25mmx0,25µm), utilizando-se o método de Adams⁸⁸. Todos os dados obtidos (tempo de retenção e espectros de massas) foram comparados com banco de dados Wiley275 e os compostos presentes, identificados via busca por identidade.

3.4. Lise das células de *Xac*

As culturas foram centrifugadas a 4°C, com rotação de 15000 rpm (Alegra X-22R), por um período de 30 minutos; a massa celular foi solubilizada em solução tampão de lise (Anexo I) em uma proporção de 0,8 % v/v (8 mL de solução tampão de lise para cada litro de meio de cultura) e submetida a sonicação em um sonicador de ponta (Sonics VCX-750), com amplitude de pulso de 30% por 1 minuto (pulsando 15s e descansando 5s) em banho de gelo, por um período de 15 minutos. O lisado obtido foi centrifugado a 4°C, rotação de 15000 rpm por 15 minutos; a fração sobrenadante foi dialisada contra água por um período de 48 horas, utilizando membranas de celulose regeneradas com porosidade de 3,5 kDa (Dialysis Tubing – Fisher Scientific) fervidas em água por 15 minutos antes do uso; a fração *pellet* foi lavada com água através de 10 ciclos de centrifugação a 4000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804R), por 30 minutos, a temperatura ambiente. Ambas as frações obtidas foram liofilizadas após o processo de lavagem, utilizando um liofilizador TERRONI LB 300TT.

⁸⁸ Adams, R. P.; Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 2º ed., Allured Publishing Corporation, 1995, Carol Stream.

Posteriormente, as proteínas contidas nos lisados foram quantificadas através do método de Bradford⁸⁹.

3.5. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

Para determinar a concentração de proteínas totais provenientes da lise celular da *Xac*, foi construída uma curva de calibração com soluções de Albumina de Soro Bovino (BSA, Sigma Aldrich) cujas concentrações foram de 25 a 80 µg/mL, em água. Para cada solução padrão, adicionou-se um volume de 200 µL de reagente de Bradford (Anexo I) a 800 µL da solução de BSA, e, após um período de 5 minutos, fez-se leitura de absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro (Agilent 8453) utilizando-se cubetas de caminho ótico de 10 mm. As proteínas obtidas após a lise da *Xac* também foram dissolvidas em água numa concentração de 1 mg/mL, e analisadas da mesma forma que as soluções de BSA.

3.6. Separação por eletroforese bidimensional

As frações de proteínas liofilizadas (*pellet* e sobrenadante) foram separadas através de experimentos de eletroforese 2D. Para a separação em primeira dimensão, utilizou-se fitas de poliacrilamida de 13 cm, com graduação de pI de 4 a 7, em um equipamento IPGPhor Isoelectric Focusing System (Amersham Pharmacia Biotech); utilizou-se, para cada experimento, uma massa de 1 mg a 2 mg de proteínas liofilizadas, que foi dissolvida em solução de hidratação (Apêndice I); cada fita foi hidratada por um período de 12 horas antes de iniciar a corrida. Os parâmetros de corrida utilizados foram os indicados no manual da GE Health Care⁹⁰, indicados na Tabela 2, além de controle de temperatura em 20°C e corrente de 50 µA por fita. O tempo de corrida para cada fita foi de 5 horas e 25 minutos.

⁸⁹ Bradford, M. M.; Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

⁹⁰ Manual da GE HealthCare Immobiline™ DryStrip pH 4-7, 13 cm 17-6001-13.

Tabela 2: Parâmetros da corrida eletroforética para focalização em primeira dimensão

| ETAPA DE SEPARAÇÃO | VOLTAGEM | TEMPO |
|--------------------|----------|------------|
| 1) STEP AND HOLD | 500 V | 1 hora |
| 2) GRADIENT | 1000 V | 1 hora |
| 3) GRADIENT | 8000 V | 2,5 horas |
| 4) STEP AND HOLD | 8000 V | 55 minutos |

Após a corrida da primeira dimensão, cada fita foi submetida a um processo de redução e alquilação de ligações de dissulfeto, através da adição de DTT (100 mg/10mL) e iodoacetamida (250 mg/10mL) em solução tampão de SDS 10% m/v (Anexo I), por um período de 30 minutos em cada etapa. Concluída esta etapa, cada fita foi submetida à corrida para separação na segunda dimensão.

Para a separação em segunda dimensão, cada fita foi acomodada sobre gel de poliacrilamida 15% ou 18% (Anexo I), juntamente com uma tira de papel de filtro embebida em 10 µL de padrão molecular (Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, com proteínas de massas na região de 14,4 a 97 kDa) na região de menor pI, e selada com uma solução de agarose 0,5% m/v com traços de azul de bromofenol, que impede a oxidação e flutuação dos géis durante a corrida, além de permitir o monitoramento da corrida, devido à presença de azul de bromofenol. As placas utilizadas foram de 14 x 15 cm, imersas em solução tampão de corrida (Anexo I) em cuba eletroforética Hoefer SE 600 Standart Vertical (Amersham Pharmacia Biotech), com voltagem máxima de 90 V, controle de temperatura em 12,5°C e corrente de 25 mA por placa; o tempo total de corrida foi, em média, de 12 horas.

Os géis obtidos foram tratados com solução fixadora etanol:ácido acético glacial:água (4:1:6 v/v/v) por um período de 3 horas sob agitação e corados com corante coloidal Comassie (Anexo I) por 48 horas sob agitação; os *spots* de proteína obtidos foram recortados para digestão *in gel*⁹¹ com tripsina.

⁹¹ Thiede, B.; Hohenwarter, W.; Krah, A.; Mattow, J.; Schmid, M.; Schmidt, F.; Jungblut, P. R.; Peptide mass fingerprint. *Methods* **2005**, *35*, 237-247.

3.7. Separação eletroforética unidimensional

A separação eletroforética em uma dimensão foi realizada utilizando-se géis de poliacrilamida 15% (Anexo I) com placas de 10 x 10 cm. Na separação por eletroforese em uma dimensão, o gel de poliacrilamida é precedido por um gel de empacotamento (Anexo I), e as amostras foram aplicadas dissolvidas em solução tampão apropriada (Anexo I) em volumes de 10 a 20 μL , dependendo de sua concentração. Para essas separações, utilizou-se cubas MiniVE Vertical Electrophoresis System (Amershan Biosciences) com voltagem máxima de 180 V, corrente de 90 mA e a solução tampão para corrida já indicada (Anexo I). Em todos os experimentos, aplicou-se um volume de 5 μL de solução tampão apropriada para o padrão molecular (Anexo I), e o tempo médio de corrida foi de 1 hora e 20 minutos. Após o término da corrida, os géis foram corados da mesma forma que os géis 2D, e as bandas obtidas na região abaixo de 20 kDa foram recortadas para digestão *in gel*⁹¹ com tripsina.

3.8. Lise trípica

O procedimento de digestão de proteínas foi realizado de acordo com 3 protocolos diferentes:

- a) Para *spots* obtidos por separação em gel 2D, utilizou-se protocolo Montège da Millipore⁹²: a remoção do corante Comassie ocorreu através da adição sucessiva de soluções tampão bicarbonato de amônio 25 mM em 5% de acetonitrila (por 30 minutos), bicarbonato de amônio 25 mM em 50% de acetonitrila (por 30 minutos, duas vezes) e acetonitrila pura (por 10 minutos); após este processo, a quebra enzimática dos peptídeos se deu através da adição de solução de tripsina (PROMEGA) ativada com HCl concentrado e mantida a 37°C por 3 horas ou a 30°C por 24 horas (a concentração desta solução foi ajustada para que houvesse, aproximadamente, 166 ng de tripsina por *spot*); a extração dos peptídeos

⁹² Manual Montage In-Gel Digest ZIP Kit User Guide da Millipore.

foi feita com solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,6% em água e eluição com solução de 0,1% de TFA em 50% de acetonitrila através de coluna cromatográfica C₁₈. Todo este procedimento foi realizado em placas ZipPlate 96-Well Plate da Millipore.

- b) Para bandas obtidas por separação em gel 1D, utilizou-se protocolo cedido pelo laboratório MAS do LNBio⁹³: a remoção do corante Comassie se deu através da adição de solução de bicarbonato de amônio 25 mM em 50% de acetonitrila (por 15 minutos, três vezes); para redução das possíveis ligações de dissulfeto presentes, cada banda foi imersa em solução de DTT (10 mM em 25 mM de NH₄HCO₃) a 56°C por 1 hora, seguido de imersão em solução de iodoacetamida (55 mM em tampão bicarbonato de amônio 25 mM) a temperatura ambiente, por 45 minutos, protegida da luz, para que as ligações reduzidas fossem alquiladas, seguida de adição de acetonitrila para desidratação do gel. As bandas foram então re-hidratadas com solução de tripsina 20 µg/mL em tampão bicarbonato a 4°C por 10 minutos, para então serem incubadas a 37°C por um período de 16 a 24 horas (a concentração foi ajustada para que houvesse uma quantidade próxima a 300 ng de tripsina por banda). Após o período de ativação da tripsina, os peptídeos foram extraídos das bandas com três adições sucessivas de solução aquosa de acetonitrila e TFA (45:50:5 v/v/v). Esta solução final foi concentrada por liofilização antes das análises por espectrometria de massas.
- c) Para digestão de proteínas totais do extrato celular, utilizou-se o seguinte protocolo⁹⁴: para cada análise, uma massa de 1 mg de lisado total liofilizado foi suspensa em 100 µL de solução de uréia 6M em tampão Tris-HCl 100 mM; para a redução das ligações dissulfeto, adicionou-se uma solução de DTT em tampão Tris-HCl de forma que a concentração final de agente redutor fosse próxima de 9,5 mM, mantido a temperatura ambiente por 1 hora; seguiu-se, para alquilação das ligações rompidas, adição de uma

⁹³ <http://mas8.lnls.br/rpsp/>

⁹⁴ Kinter, M.; Sherman, N. E.; Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. **2000** Wiley-Interscience, Inc.

solução de iodoacetamida no mesmo tampão, em uma concentração final próxima de 32 mM, também mantida a temperatura ambiente por 1 hora; para consumir o excesso de iodoacetamida, adicionou-se alíquota de DTT, atingindo uma concentração aproximada de 27,5 mM, mantido por mais 1 hora a temperatura ambiente. A concentração de uréia foi reduzida a 0,6 M através da adição de 775 μ L de água para manter a atividade da tripsina, que foi finalmente adicionada e mantida a 37° C por um período de 16 a 24 horas. A solução de tripsina, em tampão Tris-HCl 100 mM, continha uma massa total de 20 μ g, provendo uma razão protease:substrato de 1:50. A reação enzimática foi interrompida através de adição de ácido acético glacial até que o pH do meio atingisse valor menor que 6. Devido a presença de várias espécies interferentes na solução final, é necessário um processo de purificação dos peptídeos obtidos, que foi realizado com utilização de ponteiros C₁₈ ZipTip™ da Millipore. Cada ponteira foi preparada com sucção de solução aquosa de acetonitrila 50% (v/v) seguida de solução aquosa de TFA 0,1% (v/v). 10 μ L da solução de digestão foi acidificada com 1 μ L de solução aquosa de TFA 1% (v/v), e sugada por 10 vezes na ponteira já preparada, para que os peptídeos pudessem se ligar à resina. A solução de TFA 0,1% foi succionada para limpar a resina e, finalmente, os peptídeos foram extraídos em 5 μ L de solução de acetonitrila, que foi sugada na ponteira 5 vezes, e a solução final recolhida. Este ciclo foi repetido cerca de 6 vezes, e seguiu-se concentração da solução final através de liofilização ou *speed vac*.

Todos os procedimentos de digestão enzimática foram realizados em microtubos previamente lavados com metanol e água destilada, e a enzima estava armazenada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH próximo 7,0) a uma temperatura de -20°C.

3.9. Análises de proteínas por espectrometria de massas

Para as análises de MS de amostras preparadas pelo protocolo (a), uma solução de concentração 10 mg/mL de ácido α -ciano 4-hidroxi cinâmico em água:acetonitrila:ácido trifluoracético (1:1:0,1 v/v/v) foi utilizada como matriz, e a solução de peptídeos foi misturada à de matriz na proporção de 1:1 v/v⁹⁵, seguida de aplicação na placa de análise até que todo o solvente fosse seco. Após a aquisição do espectro de massas, os peptídeos referentes aos cinco sinais mais intensos foram selecionados e fragmentados para obtenção dos espectros de massas/massas. As informações obtidas foram comparadas com banco de dados MSDB, sem restrição de taxonomia, considerando-se como modificação fixa a redução e alquilação das ligações de dissulfeto, e como modificação variável a oxidação dos resíduos de metionina, através do programa de buscas MASCOT⁹⁶, permitindo determinar a estrutura primária, e, portanto a identidade, dos peptídeos analisados^{97,98}. Estas análises foram realizadas através de experimentos de MALDI-Q-TOF-MS/MS no Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), no Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (LNLS), com um espectrômetro de massas Applied Biosystems e também no laboratório do Prof. Fábio Gozzo, no Instituto de Química da Unicamp, com um equipamento Waters Synapt HDMS. As análises foram feitas utilizando-se fonte de ionização do tipo MALDI, equipada com um *laser* de estado sólido do tipo Nd:YAG a 200 Hz, com energia 200-250 a.u. e voltagem inicial da placa em 0 V. O instrumento foi operado no modo V positivo (LDI+). Para calibração, foram adquiridos espectros de massas de solução de polietilenoglicol (PEG) na faixa de m/z 300-3000, e MS/MS na faixa de m/z 50-2000.

⁹⁵ Tiroli, A. O.; Tasic, L.; Oliveira, C. L. P. *et al.* Mapping contacts between regulatory domains of skeletal muscle TnC and Tnl by analyses of single-chain chimeras. *FEBS J.* **2005**, *272*, 779-790.

⁹⁶ www.matrixscience.com

⁹⁷ Wattenberg, A.; Organ, A.; Schneider, K.; *et al.* Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 772-783.

⁹⁸ Raska, C. S.; Parker, C. E.; Sunnarborg, S. W.; Rapid and sensitive identification of epitope-containing peptides by direct matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry of peptides affinity-bound to antibody beads. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 1076-1085.

As amostras preparadas pelos protocolos (b) e (c) foram analisadas por experimentos de *Shotgun*, através de separação dos peptídeos por cromatografia líquida (UPLC), com um equipamento nanoAcquity Waters UPLC conectado a um espectrômetro de massa Waters SYNAPT HDMS (geometria Q-TOF). O sistema UPLC foi equipado com uma coluna de dessanilização Waters Symmetry C₁₈ (20 mm x 180 id µm; 5 µm de tamanho de partícula), seguido por uma coluna analítica C₁₈ Waters BEH130 (100 mm x 100 id µm; 1,7µm de tamanho de partícula). As amostras injetadas foram dessanilizadas na coluna *trap* por 3 minutos, com fluxo de 5 µL/min de 97:3 água:acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, em seguida, a eluição dos peptídeos da coluna *trap* foi realizada direcionando-a para a coluna analítica BEH130 C₁₈ (Waters) utilizando fluxo de 1,0 µL/min com gradiente de 97:3 para 30:70% H₂O:CH₃CN, com 0,1% de ácido fórmico para um tempo total de análise de 60 minutos.

Os espectros de massas/massas foram obtidos para os sinais mais intensos dos peptídeos eluídos, através de experimentos de DDA²⁸. Os arquivos RAW obtidos foram processados utilizando o programa ProteinLynx Global Server versão 2.2 (Waters) e analisados utilizando MASCOT (Matrix Science Ltd., versão 2,2). As sequências identificadas foram submetidas a busca por similaridade no banco de dados MSDB, e os parâmetros de busca foram os mesmos que aqueles utilizados nos experimentos de MALDI-Q-TOF.

3.10. Obtenção de imagens da Xac através de SEM

As células foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (SEM). As células obtidas por cultivo da condição **a**, após centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, foram ressuspensas em solução 2% v/v de glutaraldeído/tampão fosfato (pH 7,2) por um período de 18 horas a 4°C; após novo ciclo de centrifugação, foram ressuspensas em solução 4% m/v de tetróxido de ósmio/ tampão fosfato (pH 7,2) por 40 minutos a temperatura ambiente.

Após esse tratamento, as células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em água, e gotas dessa suspensão foram transferidas para um porta amostra de latão até completa secagem. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd pelo processo de *Sputtering* utilizando-se um metalizador BAL-TEC. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol (JSM-6360LV), utilizando-se uma tensão de aceleração de 20 kV.

3.11. Análise de metais presentes nas proteínas da *Xac*

Para a separação das proteínas da *Xac* utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Series 200, PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) e detector do tipo DAD (Series 200, PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) para detecção das moléculas orgânicas eluídas. A coluna utilizada foi do tipo Superdex 200 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), com faixa de exclusão de 10 a 600 kDa; a fase móvel utilizada, tampão fosfato 90 mM (pH 7,2), foi previamente deaerada, a vazão na coluna foi de 0,25 mL/min, e o tempo total de corrida foi de 72 minutos. As proteínas liofilizadas foram dissolvidas em água numa concentração de 1 mg/mL de proteínas totais, filtradas e deaeradas; o volume de injeção foi de 60 µL e o comprimento de onda utilizado para detecção das cadeias protéicas foi de 280 nm.

Após a coleta, as frações foram diluídas até um volume de 5 mL com água, e um equipamento de ICP-MS quadrupolo (modelo ELANR DRCE, PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) foi utilizado para detecção elemento-seletiva destas soluções. O equipamento foi utilizado no modo semi-quantitativo (TotalQuant) para que se pudesse detectar as espécies presentes em cada fração. O ICP-MS foi operado nas seguintes condições: 1200 W de potência RF, 0,91 L/min de vazão do gás do plasma, 15 L/min de vazão do gás nebulizador e 1,2 L/min de vazão do gás auxiliar. O nebulizador utilizado foi do tipo Meinhard, com câmara de nebulização ciclônica.

Essas condições foram verificadas usando um padrão aquoso multi elementar (PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) contendo Mg, Al, Cr, Mn, Cu, Rh, Cd, In, Ce, Pb, Th, U e Ba (na concentração de 1 µg/L para cada elemento,

exceto para Ba cuja concentração foi de 10 µg/L). Todo o conjunto, HPLC e ICP-MS encontra-se em sala limpa⁹⁹.

⁹⁹ Mataveli, L. R. V.; Metalômica comparativa de soja (*Glycine max* L. Merril) transgênica e não-transgênica empregando sistemas bidimensionais de separação. Relatório Parcial de Doutorado FAPESP Processo no 2008/03981-4, **2009**.

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Morfologia das células de *Xac*

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são proteobactérias Gram-negativas, aeróbicas, de forma alongada e fina²⁷, com flagelos móveis e suas colônias apresentam coloração amarelada⁵. As células observadas nas imagens obtidas por SEM (Figura 9) indicam uma forma alongada, com dimensões da ordem de 3 μm de comprimento por 0,7 μm de largura. Os flagelos não foram identificados visualmente, porém isso se deve ao fato de as estruturas flagelares serem menores e, dessa forma, menos visíveis nas imagens obtidas por esta técnica.

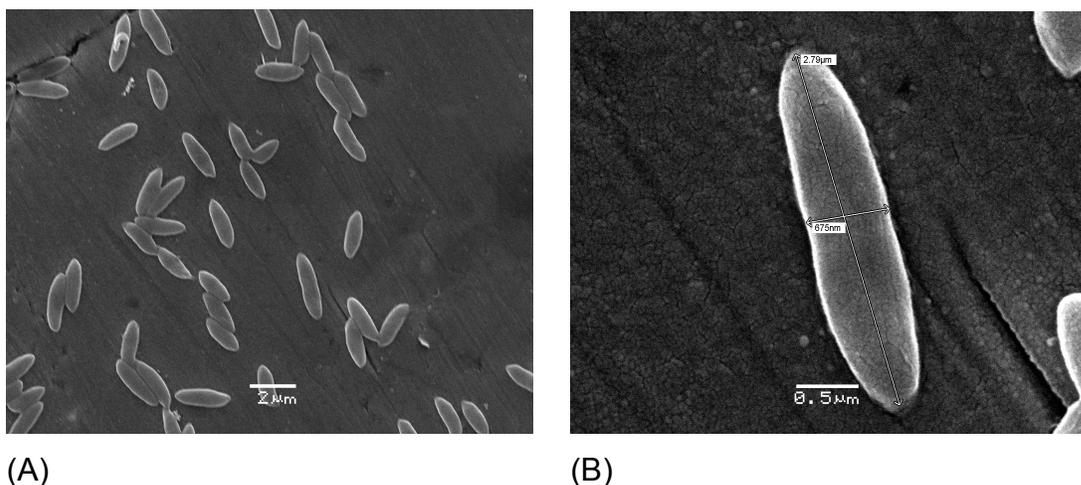


Figura 9: Imagens da *Xac* obtidas por SEM com aumento de (A) 5500 vezes e (B) 30000 vezes.

4.2. Análise dos extratos específicos e produção de metabólitos

Optou-se por monitorar e comparar os compostos consumidos e gerados pela *Xac* nas condições estudadas, na tentativa de se estabelecer um mapa do consumo preferencial de compostos presentes nos meios enriquecidos e comparar o metabolismo da *Xac* nestas condições. Os cromatogramas apresentados na Figura 10 correspondem aos obtidos pelas análises dos extratos

brutos de folha e de casca de laranja, antes e após o tratamento térmico de autoclavagem e incubação.

Pelos perfis dos cromatogramas dos extratos brutos (Figuras 10A e 10C), pode-se perceber a presença de compostos com tempos de retenção distintos em cada um dos extratos. Os espectros de massas correspondentes aos sinais cromatográficos possibilitaram identificar além de terpenos, vários compostos orgânicos, tais como derivados de ciclohexenos, benzopiranonas e ésteres (Anexo II). O extrato bruto de casca de laranja também apresentou derivados de ciclohexenos substituídos, ácido propenóico e ésteres.

Devido à presença de compostos voláteis nos extratos brutos de folha e casca de laranja, e considerando o tratamento térmico de autoclavagem e incubação, após adição ao meio de cultura, realizou-se análises desses extratos após aquecimento, na ausência de células da *Xac*. Para tanto, os extratos, após tratamento térmico, foram submetidos a análises GC-MS que não resultaram na detecção de compostos voláteis. Dessa forma, foi realizada extração em fase sólida desses extratos, com fibra trifásica, por 10 minutos, no intuito de concentrar possíveis compostos voláteis, para então proceder à separação por cromatografia gasosa.

Como se pode verificar pelo cromatograma da Figura 10B, o extrato de folha, após aquecimento, não apresentou sinais dos compostos presentes inicialmente. Os sinais pouco intensos presentes no cromatograma da Figura 10B são relativos a compostos da própria coluna cromatográfica e contaminações inerentes à manipulação das amostras. O cromatograma da Figura 10D revela a presença de um único composto no extrato de casca de laranja após aquecimento, referente a um álcool derivado de ciclohexeno.

Pode-se concluir que as condições de cultivo da *Xac* nomeadas **a** e **b** não apresentaram diferenças quanto à presença de compostos voláteis específicos provenientes de folhas de laranjeira, uma vez que estes compostos foram eliminados pelos processos de aquecimento durante o crescimento da *Xac*. A condição **c**, contudo, continha um composto específico proveniente da casca da laranja durante o crescimento da bactéria.

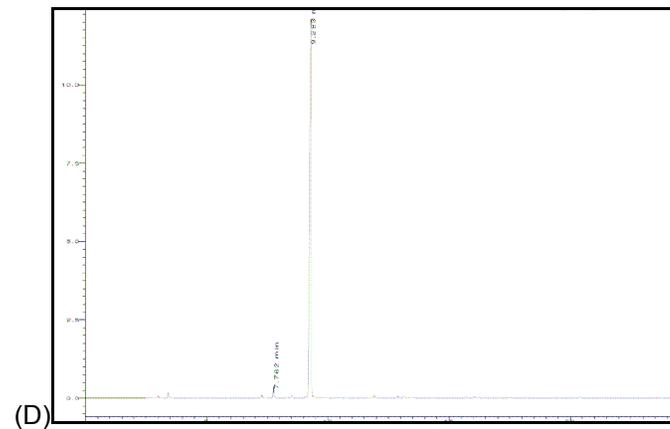
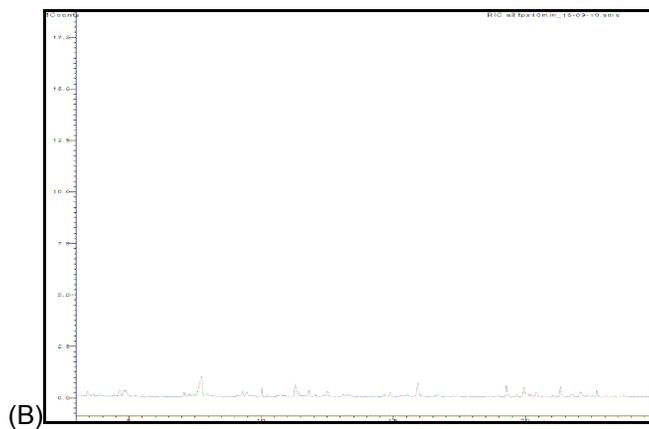
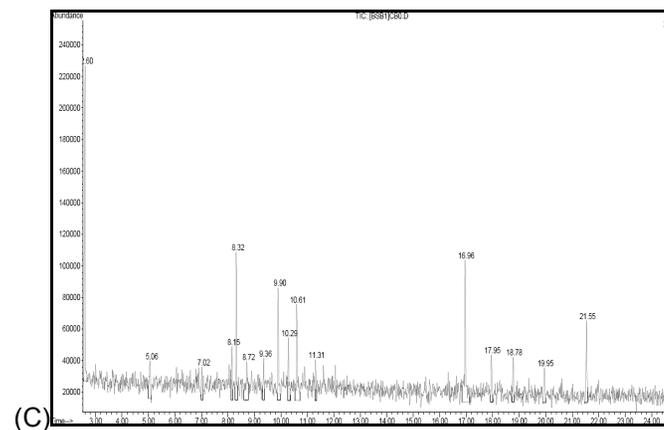
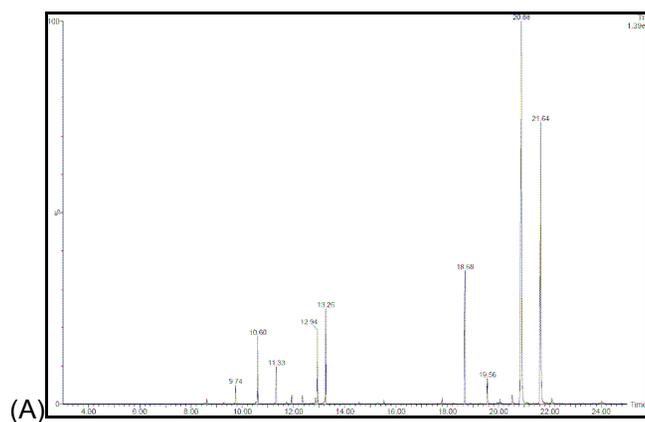


Figura 10: Cromatogramas dos extratos (A) de folha de laranja bruto e (B) de folha de laranja após tratamento térmico, (C) de casca de laranja bruto e (D) de casca de laranja após tratamento térmico.

Os cromatogramas dos metabólitos gerados pela *Xac* nas três condições estudadas são apresentados na Figura 11, sendo possível verificar um perfil semelhante na produção de metabólitos da *Xac* em todas as condições de crescimento da bactéria. Há presença de compostos pouco voláteis, eluídos em tempos de retenção entre 15 e 25 minutos. Uma vez que os meios de cultura com extratos específicos não apresentaram grandes diferenças do meio na condição controle, com relação a compostos voláteis provenientes do hospedeiro da *Xac*, um perfil semelhante nas moléculas produzidas pela bactéria em todas essas condições é um resultado compatível. Dentre os compostos detectados pelas análises de GC-MS, pode-se citar benzopirranonas substituídas, derivados de piperazinas, pirazinas e benzocompostos substituídos.

Portanto, de acordo com os resultados apresentados, não foi possível identificar o consumo da *Xac* por moléculas voláteis inicialmente presentes no extrato de folha de laranjeira, porém, pôde-se identificar o consumo de um álcool derivado de ciclohexeno, presente no extrato de casca de laranja mesmo após o processo de aquecimento e ausente no cromatograma obtido após cultivo da *Xac*.

Um composto gerado por microorganismo pode ser chamado toxina quando provoca sintomas no hospedeiro específico, e pode ser de duas classes distintas: enzimas que atacam a integridade estrutural da célula hospedeira ou moléculas que afetam a membrana e o metabolismo celulares¹⁰⁰. Os efeitos tóxicos destes metabólitos podem ser de inibição de enzimas responsáveis pela respiração, inibição competitiva de metabólitos necessários para processos anabólicos e/ou interferência no movimento vascular e intercelular de água e nutrientes¹⁰⁰. Dessa forma, é possível que os compostos detectados tenham influência sobre o metabolismo das células do hospedeiro da *Xac*, porém, a compreensão de seu papel exato requer ensaios *in vivo* e análise mais profunda do metabolismo do hospedeiro.

¹⁰⁰ Goodman, R. N.; Király, Z.; Zaitlin, M. The Biochemistry and Physiology of Infectious Plant Disease, 1st ed., D. Van Nostrand Company, Inc., 1967, Princeton.

As camadas mais externas da parede celular vegetal são constituídas por compostos com alto grau de hidrofobicidade, como hidrocarbonetos parafínicos, álcoois primários e secundários, ácidos, ésteres de cadeia longa, hidrocarbonetos e cetonas¹⁰⁰. Os metabólitos identificados apresentam hidrofobicidade alta também, podendo solubilizar estas camadas mais externas da célula do hospedeiro, facilitando a ação de enzimas degradativas da *Xac* ao chegar às camadas mais internas, compostas de lignina, pectina e celulose.

A alta hidrofobicidade destes metabólitos também pode diminuir as interações hidrofóbicas no interior da estrutura enovelada de proteínas estruturais do hospedeiro, causando a desnaturação destas proteínas, e, conseqüentemente, perda de sua função^{84,101}, facilitando, mais uma vez, o acesso da *Xac* ao interior da célula, podendo interferir no metabolismo celular ou degradar mais proteínas importantes do meio intracelular.

É necessário ressaltar que a exata ação dos metabólitos identificados e descritos não pode ser atribuída sem estudos mais específicos e *in vivo*.

¹⁰¹ Voet, D.; Voet, P.; Pratt, C. Fundamentos de Bioquímica, 2ª ed., Artmed, **2008**, Porto Alegre.

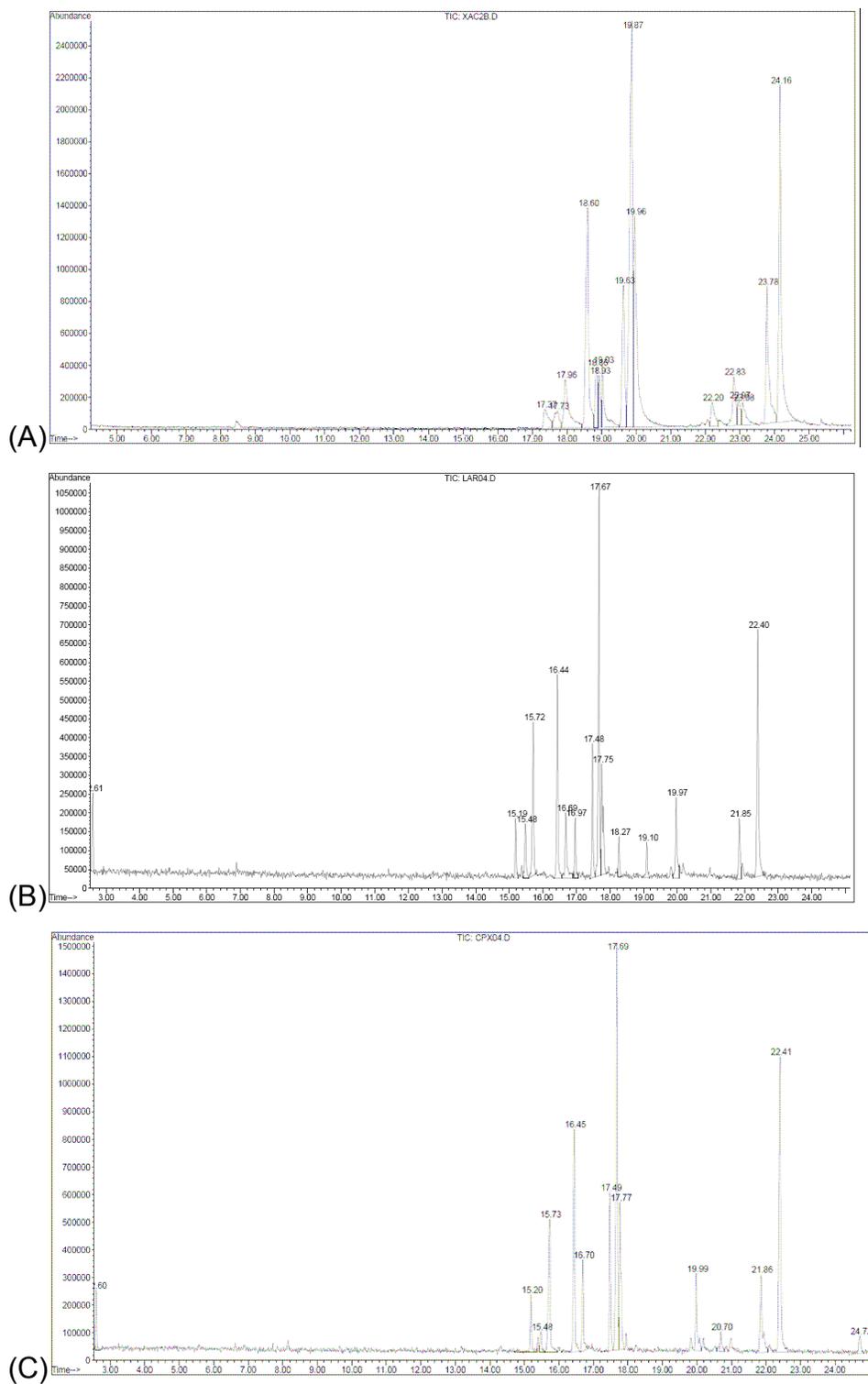


Figura 11: Cromatogramas obtidos após cultivo da *Xac* (A) na condição a, (B) na condição b e (C) na condição c.

4.3. Análises do metaloma da Xac

A calibração da coluna de HPLC foi realizada utilizando proteínas padrão, cujo peso molecular é conhecido, utilizando como fase móvel tampão fosfato 90 mM (pH 8) e vazão de 0,25 mL/min. Os ensaios foram feitos em triplicata e com tempo de corrida de 95 min, mantido constante⁹⁹, e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados das proteínas utilizadas como padrão na calibração da coluna de HPLC

| PROTEÍNA | PESO MOLECULAR / kDa | TEMPO DE RETENÇÃO / MIN |
|---------------------|----------------------|-------------------------|
| Tiroglobulina | 669 | 30,32± 0,08 |
| Ferritina | 440 | 35,79± 0,02 |
| β-Amilase | 200 | 40,1± 0,4 |
| IgG | 150 | 41,9± 0,1 |
| Albumina bovina | 66 | 48,4± 0,3 |
| Anidrase Carbonica | 29 | 56,3± 0,1 |
| Lactalbumina Bovina | 14,4 | 57,2± 0,2 |

A partir dos tempos de retenção das proteínas padrão, foi calculado o volume de retenção das mesmas para que fosse possível construir a curva de calibração da coluna em função do logaritmo do peso molecular e do volume de retenção (Figura 12)⁹⁹.

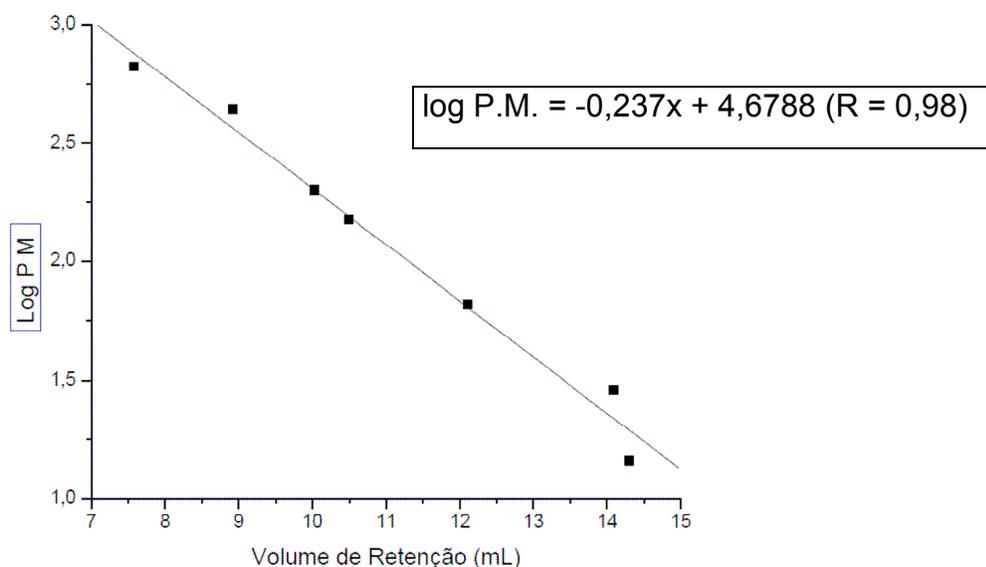


Figura 12: Curva de calibração obtida para a coluna de SEC, em que o x é o volume de retenção em mL, e log P. M. o logaritmo do peso molecular estimado em kDa.

A fração sobrenadante das proteínas totais obtida da *Xac* na condição **a** (condição controle) foi submetida a separação por HPLC. Os três cromatogramas obtidos apresentaram perfil muito similar (Figura 13), e as frações coletadas (F1 a F9) foram analisadas por ICP-MS. De acordo com a equação de linearização obtida pela calibração da coluna, calculou-se a faixa de massa das proteínas eluídas em cada fração. A Tabela 4 contém os dados referentes a faixa de massa das proteínas eluídas em cada fração, bem como as espécies metálicas detectadas. Devido ao baixo volume eluído na fração 5 (F5) não foi possível realizar suas análises de ICP-MS, que exigem um volume maior de amostra para injeção.

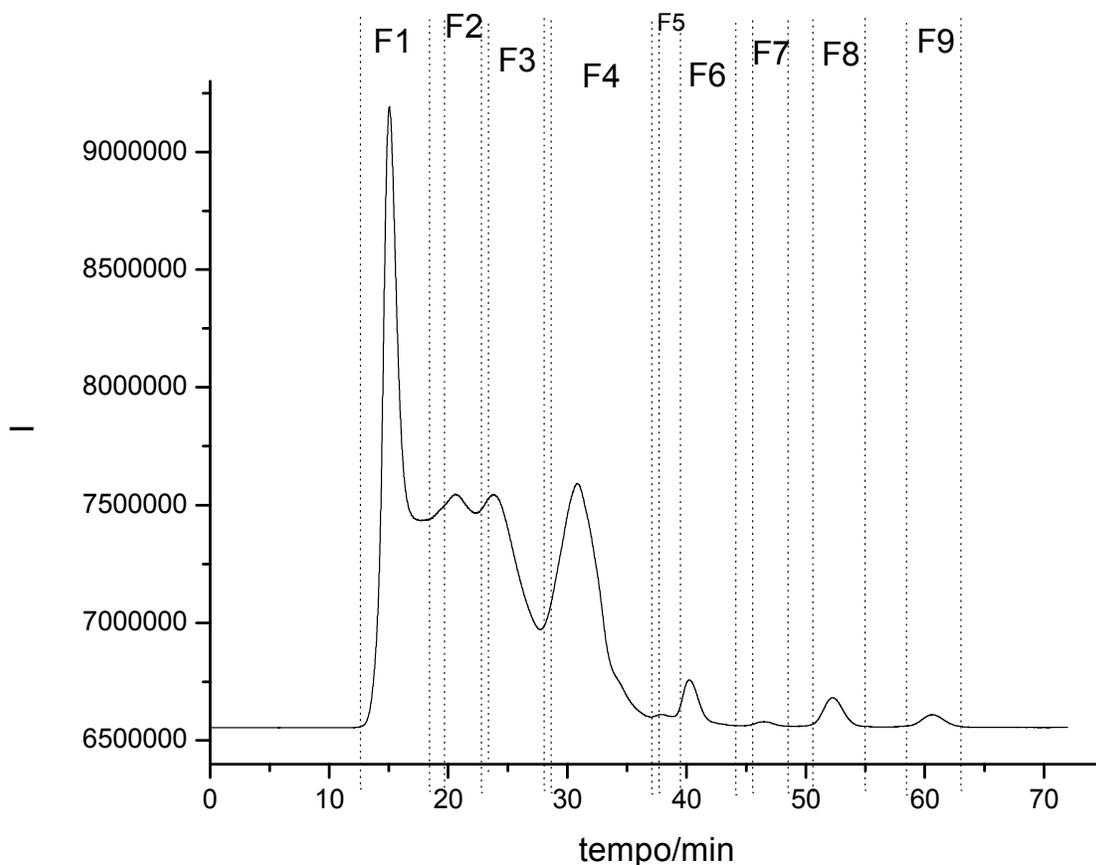


Figura 13: Perfil dos cromatogramas obtidos nas separações das proteínas da *Xac* por HPLC em coluna Superdex 200.

Muitas funções biológicas são dependentes de espécies metálicas, seja na forma de co-fatores ou de ligantes estruturais nas cadeias peptídicas¹⁰². A presença de diversas espécies metálicas nas proteínas da *Xac* em condições basais pode ser um indicativo da grande importância das metaloproteínas no metabolismo da bactéria. As frações F8 e F9, que compreendem a faixa de massa das proteínas alvo, apresentaram várias espécies metálicas presentes (12 no total), o que pode ser um indicativo de que estas proteínas estejam associadas a metais, ou que a presença destes íons seja importante para o seu correto funcionamento.

¹⁰² Andreini, C.; Bertini, I.; Rosato, A.; Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts Chem. Res.* **2009**, *42*, 1471-1479.

Sabe-se que, em procariotos, íons zinco estão presentes em uma fração de 5% a 6% das proteínas totais, sendo a espécie metálica mais abundante no proteoma de diversos organismos. No outro extremo, íons de cobre estão presentes em menos de 1% do proteoma dos organismos conhecidos¹⁰².

Tabela 4: Faixa de massa das proteínas compreendidas em cada fração cromatográfica e as respectivas espécies metálicas identificadas

| FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA | FAIXA DE MASSA / KDa | ESPÉCIES METÁLICAS IDENTIFICADAS |
|-----------------------|----------------------|---|
| F1 | 8595 - 4249 | Ti, V, Mn, Co, Ga, Ge, In, Cu, Rh, Os |
| F2 | 3480 - 2226 | Ge, As, Au |
| F3 | 2099 - 1032 | Ti, Cr, Mn, Co, Ga, Ge, As, Rb, Zn, Nb, Mo, In, Sb, Cs, Ta, W, Ir, Cu, Os |
| F4 | 990 - 298 | Li, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ge, As, Rb, Zn, Mo, Ta, W, Cu, Os Mn, Ni |
| F5 | 280 - 227 | - |
| F6 | 220 - 115 | Ti, Cr, Mn, Zn, Sb |
| F7 | 93,5 - 60,9 | Ti, Cr, As, Rb, Mo, In, Sb |
| F8 | 49,4 - 26,0 | Ti, Cr, Mn, Co, Rb, Zn, Mo, In, Sb, Cs |
| F9 | 16,1 - 8,2 | Ti, Cr, Co, Ge, In |

Íons de zinco estão espalhados pelo proteoma de muitos organismos, e, por ocuparem sítios estruturais em algumas enzimas, são responsáveis pela ação catalítica destas proteínas¹⁰². Íons de molibdênio e tungstênio, embora sejam menos frequentes, também são descritos na literatura¹⁰², e podem estar envolvidos em reações de transferência de elétrons ou em atividade de enzimas oxido-redutases, assim como cobre e ferro.

A presença de íons de cobre em diferentes estados de oxidação faz com que este elemento seja um dos mais comuns em catálises, porém, devido a sua alta toxicidade, esses íons se encontram, na sua maioria, associados a cadeias protéicas, o que mantém sua concentração celular livre muito baixa¹⁰².

Dessa forma, o mapeamento do metaloma da *Xac* pode vir a auxiliar no desenvolvimento de métodos e agentes de prevenção e inibição para o cancro cístico, através do conhecimento das metaloproteínas e seu funcionamento.

Contudo, é importante destacar que as análises realizadas foram feitas num aspecto qualitativo, de forma que é necessário um estudo mais aprofundado do

seu metaloma, para melhor identificação e estudo de função das metaloproteínas presentes nesse organismo.

4.4. Análises de expressão protéica da *Xac*

Através da comparação dos géis eletroforéticos obtidos em duas dimensões, foi possível detectar uma maior expressão protéica nas condições ricas em nutrientes específicos provenientes da laranja. Por exemplo, quando comparados os géis eletroforéticos obtidos das frações do sobrenadante (A) e do *pellet* (B) da condição de cultura **a**, condição controle (Figura 14), poucas proteínas foram detectadas.

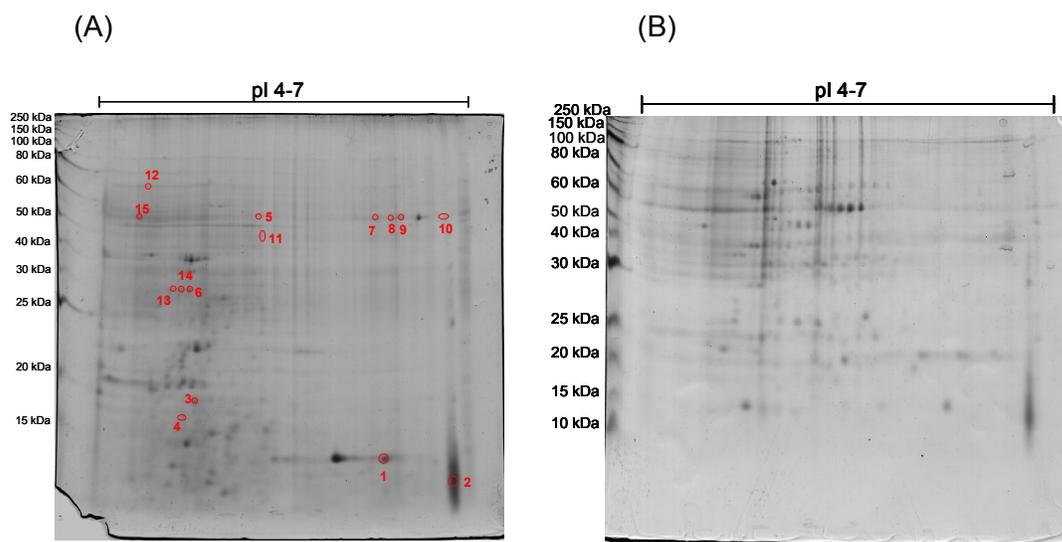


Figura 14: Géis bidimensionais (18%) (A) do sobrenadante e (B) do *pellet* das proteínas da *Xac* na condição **a** (ausência de extratos); as marcações em (A) referem-se as proteínas já identificadas (discussão a seguir). À esquerda é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas.

Os géis eletroforéticos ilustrados nas Figuras 15 e 16 correspondem às porções sobrenadante (A) e *pellet* (B) das proteínas totais de *Xac* obtidas em meios enriquecidos (condições **b** e **c**, respectivamente). Mais uma vez, é possível verificar visualmente que a expressão de proteínas foi maior que na condição **a**, especialmente na região de proteínas de baixa massa molar, que corresponde as proteínas alvo do projeto.

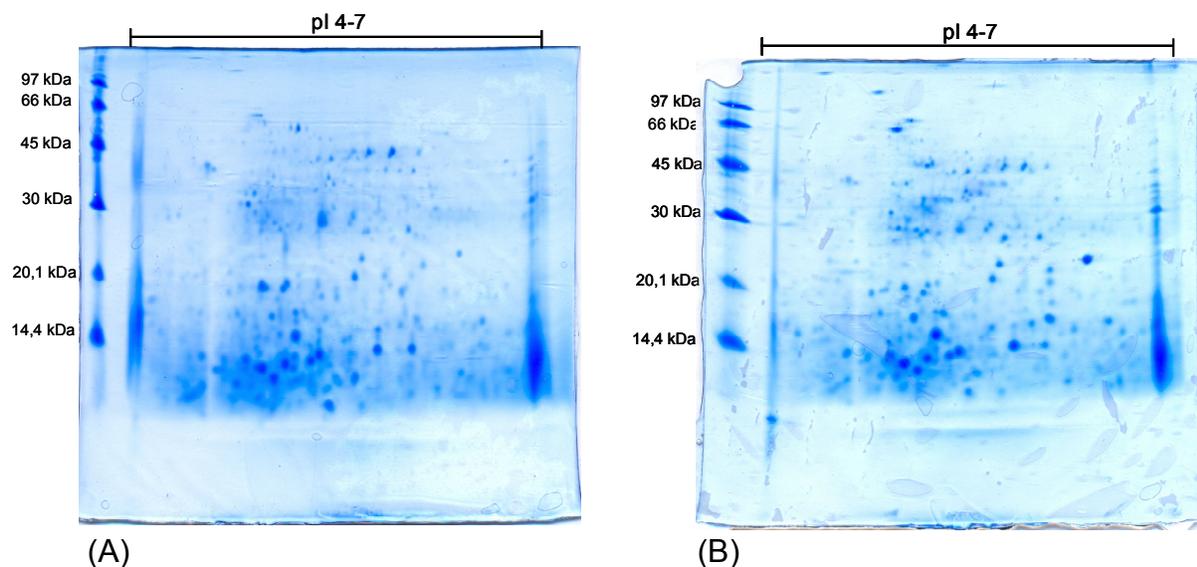


Figura 15: Géis bidimensionais (18%) (A) do sobrenadante e (B) do *pellet* de proteínas de Xac na condição b (presença de extrato de folha de laranjeira). À esquerda, na região de pI ácido, é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas.

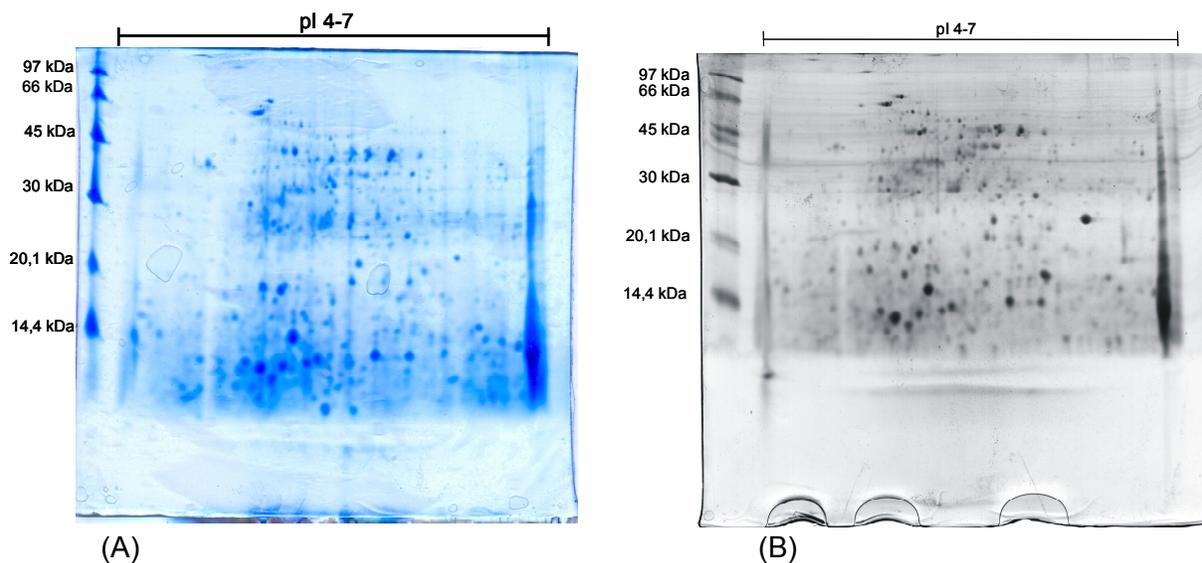


Figura 16: Géis bidimensionais (18%) (A) do sobrenadante e (B) do *pellet* de proteínas de Xac na condição c (presença de extrato de casca de laranja). À esquerda, na região de pI ácido, é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas.

Análises com o programa ImageMaster 2D Platinum possibilitaram contabilizar a população de *spots* presentes em cada gel, permitindo compará-los, e observar a maior expressão protéica em condições analisadas (Tabela 5).

Tabela 5: Número de *spots* de proteínas detectados em cada gel analisado pelo programa ImageMaster 2D Platinum

| FRAÇÃO | CONTROLE | EXTRATO DE FOLHA | EXTRATO DE CASCA |
|--------------|------------------|------------------|------------------|
| SOBRENADANTE | 100 <i>spots</i> | 192 <i>spots</i> | 272 <i>spots</i> |
| PELLET | 153 <i>spots</i> | 231 <i>spots</i> | 353 <i>spots</i> |

É possível verificar, portanto, que, na presença dos extratos houve uma maior expressão protéica, especialmente de proteínas com tamanho menor que 40 kDa, e de baixo *pl*, como se pode verificar nos géis mostrados. Ainda através do programa ImageMaster 2D Platinum, cada gel foi dividido em quatro regiões, e os *spots* presentes em cada uma delas foram contabilizados, dando origem à Tabela 6, que relaciona a quantidade de *spots* dessas regiões específicas dos géis.

Tabela 6: Quantidade de *spots* de proteínas em diferentes regiões dos géis analisados

| FRAÇÃO/ CONDIÇÃO | <i>pl</i> 4 – 5,5 | | <i>pl</i> 5,5 - 7 | |
|-----------------------|-------------------|------------|-------------------|------------|
| | BAIXO P. M. | ALTO P. M. | BAIXO P. M. | ALTO P. M. |
| SOBRENADANTE a | 79 | 2 | 20 | 0 |
| PELLET a | 70 | 51 | 22 | 13 |
| SOBRENADANTE b | 98 | 5 | 88 | 1 |
| PELLET b | 93 | 28 | 76 | 37 |
| SOBRENADANTE c | 112 | 17 | 140 | 3 |
| PELLET c | 151 | 38 | 155 | 7 |

4.5. Quantificação de proteínas da *Xac*

Devido ao aumento de *spots* de proteínas nos géis obtidos da cultura de *Xac* nas condições **b** e **c**, foi realizada quantificação de proteínas totais nas frações sobrenadantes de todas as condições estudadas. A curva de calibração

da Figura 17 foi obtida a partir de medidas de absorbância em 595 nm de soluções de BSA em concentrações de 25 a 80 µg/mL.

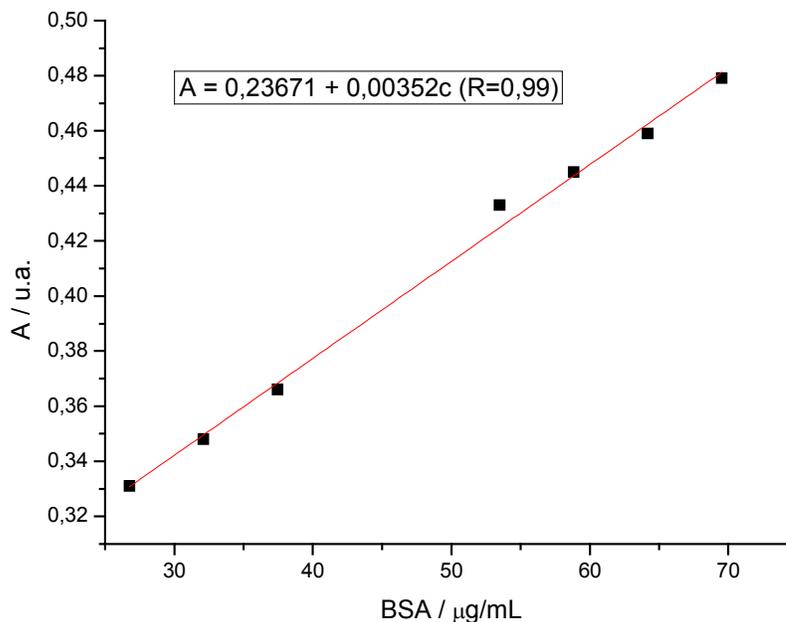


Figura 17: Curva de calibração obtida pelo método de Bradford; em que A é a absorbância observada, e c é a concentração da solução de proteína, expressa em µg/mL.

A Tabela 7 resume os dados obtidos para as medidas realizadas com as frações sobrenadantes de proteínas da *Xac* nas três condições estudadas.

Tabela 7: Dados obtidos para as análises de quantificação de proteínas da *Xac* realizadas

| FRAÇÃO ANALISADA | CONTEÚDO PROTÉICO CALCULADO / % |
|-------------------------|---------------------------------|
| Sobrenadante condição a | 9,2 ± 0,6 |
| Sobrenadante condição b | 10,9 ± 0,7 |
| Sobrenadante condição c | 7,9 ± 0,6 |

Foi possível verificar que o conteúdo protéico total médio foi de 10% (m/m). Esta informação pode indicar que a expressão protéica não muda na presença dos extratos específicos, porém, como observados nos géis das Figuras 14 a 16,

as proteínas expressas são diferentes na situação controle e na presença dos extratos.

4.6. Identificação de proteínas da *Xac*

As sequências das proteínas isoladas e analisadas por espectrometria de massas foram comparadas com as do genoma da *Xac*, através de busca por similaridade no banco de dados do programa MASCOT. A Tabela 8 contém os dados das proteínas identificadas pelas análises de MALDI dos *spots* obtidos pela separação em gel 2D (Figura 14A); a busca de *spots* diferentes por vezes resultou na identificação da mesma proteína, o que pode ocorrer no caso de proteínas isoformas, que possuem peso molecular muito próximo e valores de pI diferentes. Nestes casos, na Tabela 8, segue a identificação através do símbolo *.

Tabela 8: Proteínas identificadas por MALDI, suas massas nominais e valores de pI teóricos

| SPOT | PROTEÍNA | MASSA NOMINAL / Da | pI CALCULADO |
|-------------|--|-----------------------|-----------------|
| 1 | Q8PHV8_XANAC - PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA P6 | 19822 | 7,62 |
| 2 | PROTEÍNA HIPOTÉTICA XAC1492 | 11247 | 8,15 |
| 3, 4 | AAM35432 AE011680NID - CHAPERONINA* (PROTEÍNA GroEL) | 57131 | 5,05 |
| 5 | Q8PPG7_XANAC - ATP SINTASE CADEIA BETA | 50979 | 5,18 |
| 6 | Q8PGW2_XANAC - GLUTARREDOXINA | 29789 | 4,59 |
| 7, 8, 9, 10 | Q8PMV4_XANAC - PROTEASE PERIPLÁSMICA* | 53877 | 7,79 |
| 11 | Q8PP23_XANAC - PEPTIDIL-PROLIL CIS-TRANS ISOMERASE | 50084 | 5,43 |
| 12 | AAM36391 AE011784NID - CHAPERONA MOLECULAR DnaK | 68810 | 4,97 |
| 13, 14 | QPIW2_XANAC - TIORREDOXINA* | 31423 | 4,61 |
| 15 | AAM36505 AE011796 - HISTIDINA-AMÔNIA LIASE | 53527 | 5,41 |

A proteína 2 (**XAC1492**) é uma proteína hipotética da *Xac*, e a Figura 18 contém o espectro de massas obtido no experimento de MALDI.

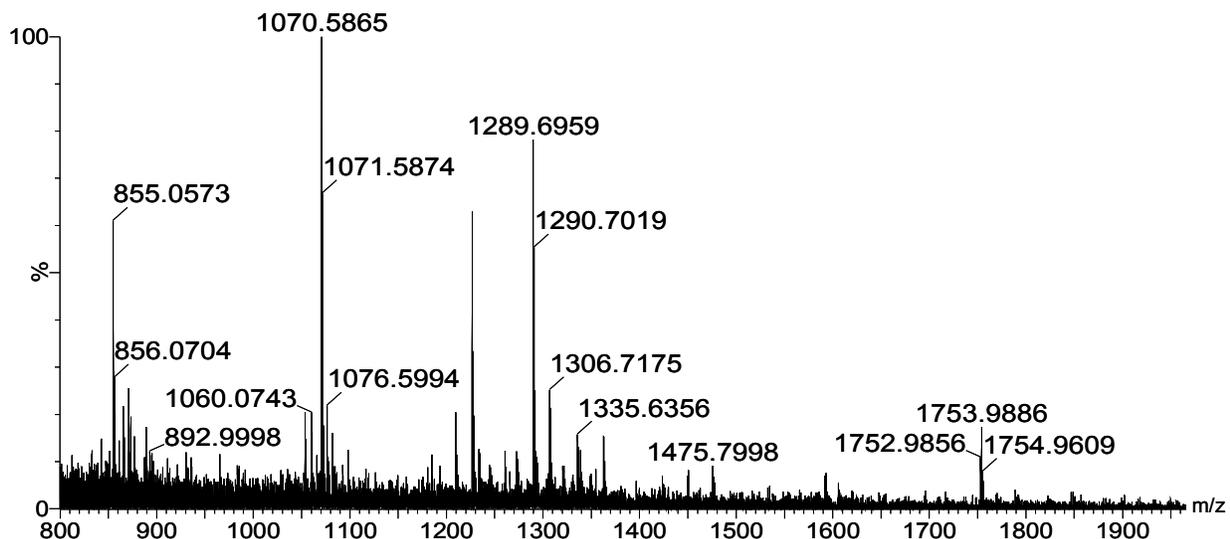


Figura 18: Espectro de massas obtido para a mistura de peptídeos provenientes da proteína identificada como **XAC1492**.

Os peptídeos referentes aos cinco sinais mais intensos deste *spot* foram selecionados para posterior fragmentação, resultando em espectros que permitiram associar uma sequência de aminoácidos ao padrão de fragmentação observado em cada um. As Figuras 19 a 21, a seguir, contêm as respectivas atribuições dos sinais e sequência de aminoácidos obtida pela resolução do espectro¹⁰³.

Após o processo de dessorção e ionização, os peptídeos são separados na câmara de colisão (MS), fragmentados e separados novamente, quando os espectros de massas/massas⁹⁴ são obtidos. As reações de fragmentação podem ocorrer por rotas diferentes, o que resulta em obtenção de moléculas protonadas com características diferentes. Os íons formados por MALDI são, na grande maioria, monocarregados, e essa carga tende a ser localizada em sítios básicos da sequência peptídica, de forma que a fragmentação de íons provenientes de ionização do tipo MALDI ocorre longe do sítio de carga⁹⁴. Esse tipo de

¹⁰³ <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct>

fragmentação resulta em íons imônio, íons provenientes de fragmentação interna ou perdas neutras, e íons das séries a, b ou y.

Os íons imônio, com estrutura $H_2N = CHR^+$, aparecem na região de baixa massa dos espectros obtidos, e são importantes porque servem como indicação da presença de um dado resíduo de aminoácido na sequência peptídica. Contudo, a ausência desses íons não indica, necessariamente, ausência do respectivo resíduo na sequência analisada⁹⁴.

Quando a fragmentação gera íons que retêm a carga na porção N-terminal do íon precursor, os íons resultantes, do tipo imônio, são denominados 'íons b'; os íons dessa série são favorecidos quando se usa fonte de ionização MALDI, e pode-se perceber pelos espectros obtidos, que esses íons são bastante abundantes. Os íons da série b possuem um intermediário cíclico, que não se forma quando há apenas um aminoácido, de forma que o íon b_1 nunca é observado. Os íons da série b, ao perderem uma molécula de CO, neutra, dão origem a íons da série a; contudo, a formação de íons menores da série b é mais favorecida que a formação do correspondente íon a⁹⁴.

Quando a fragmentação gera íons que retêm a carga na porção C-terminal do íon precursor, os íons resultantes são denominados 'íons y', que apresentam estrutura de íons acílio ($R-CO^+$) e são pouco favorecidos quando se usa fonte de ionização do tipo MALDI. Um íon da série y, abundante, que é fragmentado para produzir íons da série b, gera íons denominados de fragmentação interna, representados em vermelho nas sequências mostradas nas Figuras 19 a 21. Este tipo de fragmentação é governado pelas posições dos resíduos de aminoácidos e até mesmo pelas interações entre resíduos na cadeia peptídica.

Em um espectro de massas, a abundância relativa de um íon reflete a frequência relativa da reação que o produz, incluindo os efeitos de qualquer reação, e essa frequência varia muito, chegando ao ponto de, em um dado espectro, certo fragmento não ser observado. Como a população de ligações peptídicas é finita, o favorecimento de uma reação é obrigatoriamente acompanhado pela redução de outra, resultando em sinais com intensidades variadas.

Nas Figuras 19 a 21, que contêm os espectros de massas/massas dos íons precursores mais intensos da proteína identificada como **XAC1492** é possível verificar a grande abundância de íons da série b, a presença de alguns íons da série a, e a baixa intensidade e abundância de íons da série y, o que está de acordo com o esperado, uma vez que a formação destes íons é favorecida quando se utiliza fonte de ionização do tipo MALDI.

Nos espectros mostrados, as sequências destacadas em vermelho são resultantes de processos de fragmentação interna, também bastante abundantes para experimentos com fonte de ionização do tipo MALDI. É possível observar, também, para os três espectros mostrados, muitos sinais relacionados a perdas neutras dos peptídeos precursores.

No espectro da Figura 21, não se observa o sinal referente à molécula protonada, contudo, a grande quantidade de sinais relacionados a fragmentações e perdas neutras justifica essa ausência, indicando que este pode ser um peptídeo com ligações peptídicas lábeis, originando muitas fragmentações.

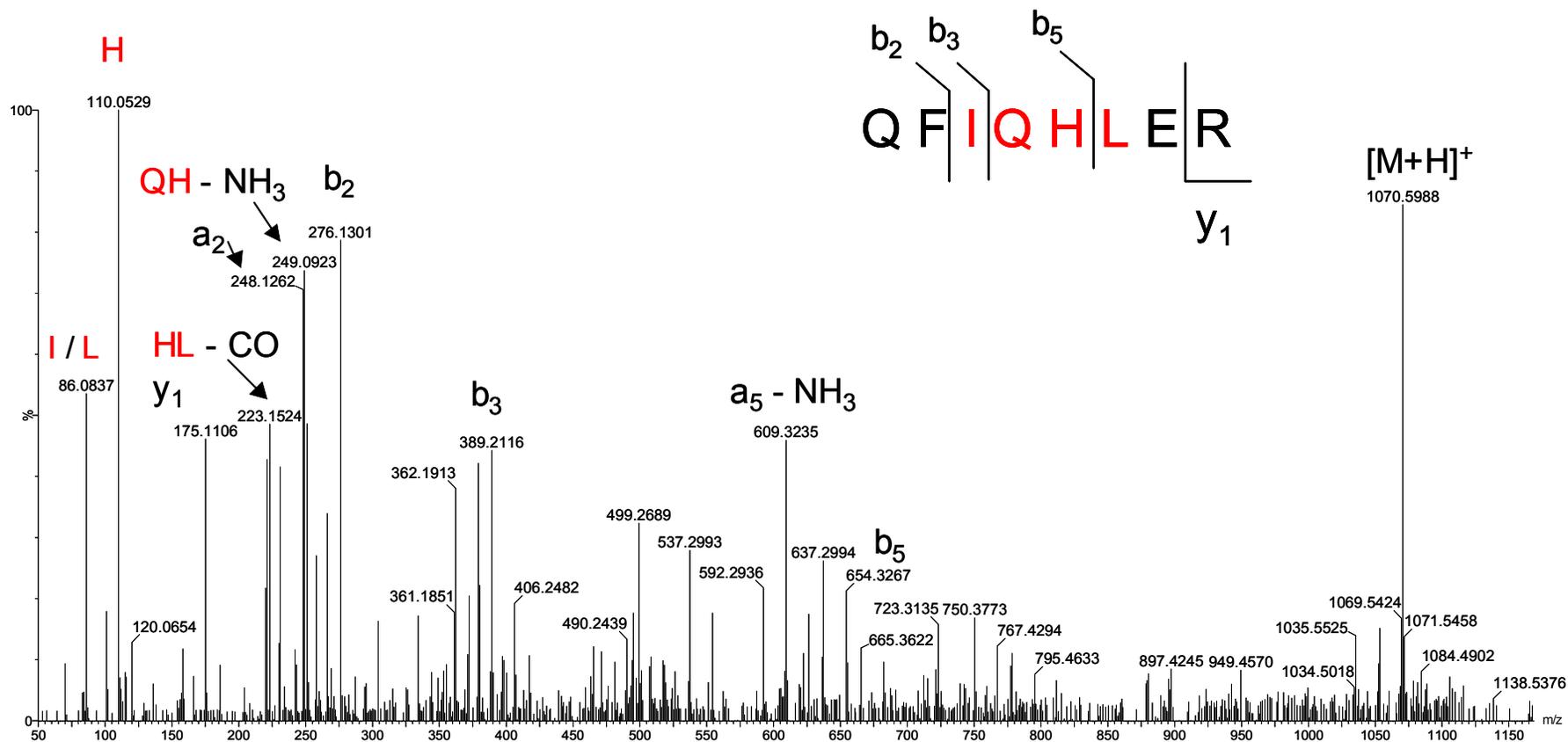


Figura 19: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo com m/z 1070, com atribuição dos sinais e sequência de aminoácidos atribuída (MASCOT) e em vermelho, os fragmentos referentes à fragmentação interna do peptídeo.

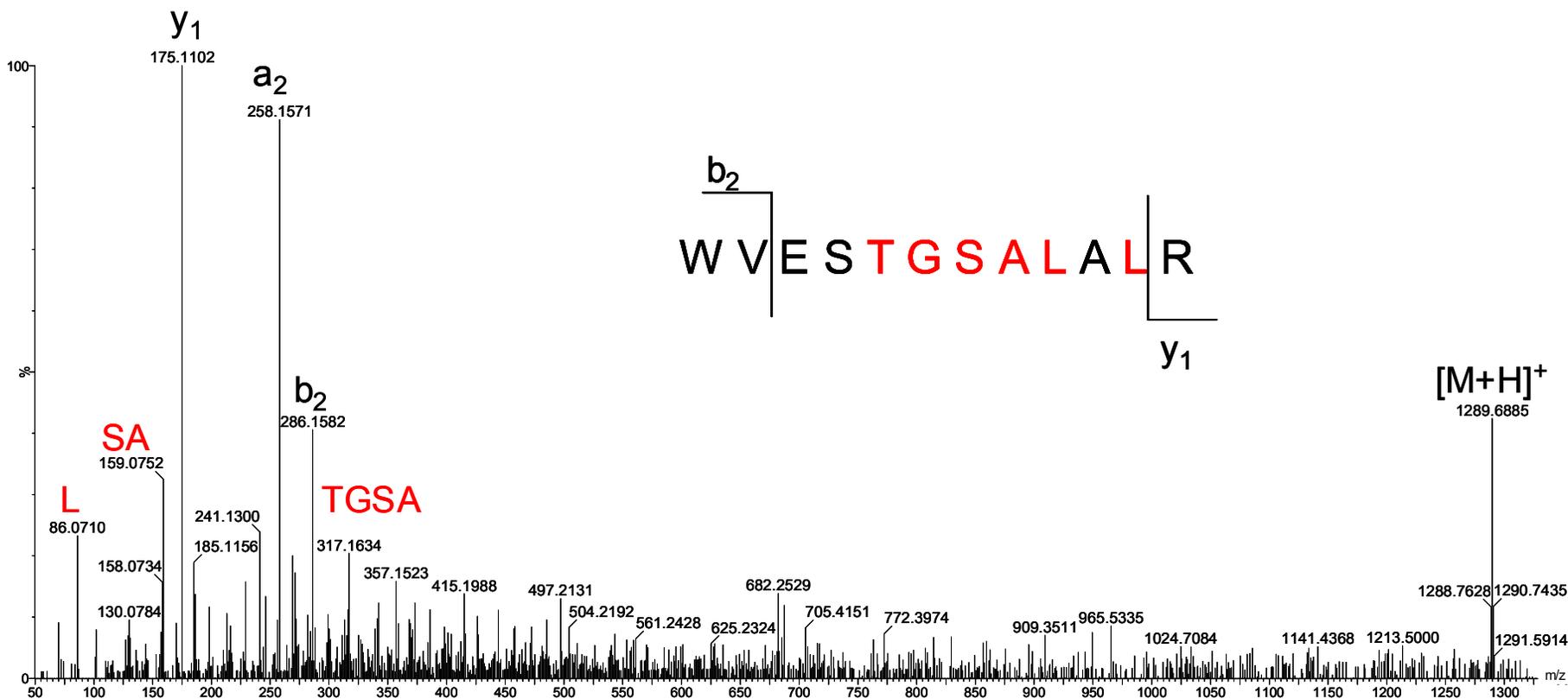


Figura 20: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo com m/z 1289, com atribuição dos sinais e sequência de aminoácidos (MASCOT). Em vermelho, os fragmentos referentes à fragmentação interna do peptídeo.

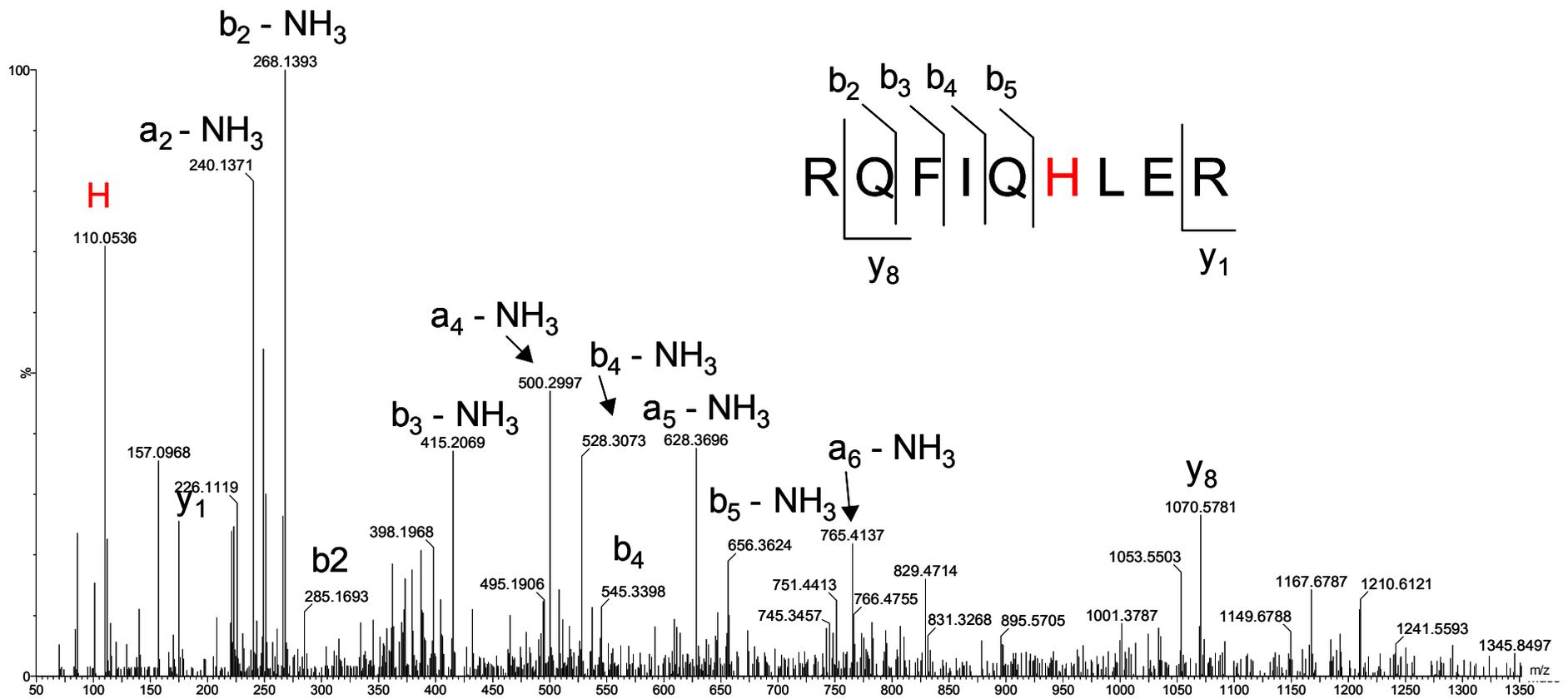


Figura 21: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo com m/z 1226, com atribuição dos sinais e sequência de aminoácidos (MASCOT).

A Tabela 9 resume os dados referentes às sequências de aminoácidos atribuídas a cada um dos espectros obtidos, atribuídos pelo programa MASCOT, e a Figura 22 contém a sequência de aminoácidos atribuída à proteína analisada, através da detecção e identificação dos peptídeos submetidos a fragmentação, em destaque na sequência primária.

Tabela 9: Dados relativos aos peptídeos encontrados na proteína 2 (identificada como Q8PMD7_XANAC; XAC1492)

| SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS | MASSA OBSERVADA / Da | MASSA ESPERADA / Da | MASSA CALCULADA / Da |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| R.RQFIHLER.H | 1226,6834 | 1225,6761 | 1225,6680 |
| R.QFIHLER.H | 1070,5796 | 1069,5723 | 1069,5669 |
| R.WVESTGSALALR.D | 1289,6918 | 1288,6845 | 1288,6775 |

MAVYVVTWNLNKERSNYDAARR**QFIHLER**HPNVQDRGLESVR**WVES**
TGSALALRDDLRLQKLDDNDRIFVSKLNASQNDGWLNENVWDWIKRRQ

Figura 22: Sequência de aminoácidos da proteína XAC1492. Em destaque, os peptídeos identificados pelo experimento de MS/MS.

A proteína Q8PHV8_XANAC foi identificada como uma proteína de membrana externa e presente em outras espécies do gênero *Xanthomonas*. Após a busca por sequência no banco de dados PFAM¹⁰⁴, que classifica as proteínas em famílias com mesma função, foi possível prever qual é o possível papel desta proteína na *Xac*. Esta proteína, Q8PHV8_XANAC, pertencente à família OmpA, compartilha semelhanças estruturais e de função com proteínas de membrana externa de bactérias Gram-negativas¹⁰⁵, que apresentam domínios característicos

¹⁰⁴ <http://pfam.sanger.ac.uk/>

¹⁰⁵ Demot, R.; Proost, P.; Vandamme, J.; Vanderleyden, J.; Homology of the root adhesion of *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3 with porin-F of *Pseudomonas aeruginosa* and p-syringae *Molecular & General Genetics* **1992**, 231, 489-493.

de porinas¹⁰⁶ e outros próprios de lipoproteínas¹⁰⁷, e estão ancoradas a canais de próton¹⁰⁸. Em *E. coli*, as proteínas desta família são utilizadas no processo de patogenicidade, interagindo com moléculas receptoras do hospedeiro¹⁰⁹ e os receptores transmembrana servem para se ancorar na célula hospedeira e acionar o rotor flagelar da *E. coli*¹⁰⁸.

Este tipo de abordagem já foi aplicado em várias espécies de bactérias¹¹⁰, mas em poucas bactérias com importância agrícola, como a *Xac*. Um dos poucos estudos em espécies desse tipo descreve a identificação de quatro proteínas diferencialmente expressas induzidas por flavonóides em *Rhizobium leguminosarum*¹¹¹.

Em *Xac*, já foi realizado um estudo da expressão protéica em resposta a diferentes meios de crescimento, analisados por eletroforese bidimensional seguida do sequenciamento da porção N-terminal de cinco proteínas com expressão diferenciada¹¹⁰. O meio MM1¹¹², descrito como não indutivo à expressão dos genes *hrp* em *Xanthomonas campestris*, foi utilizado como meio de cultura basal. A *Xac* foi cultivada nesse meio e na presença de extratos de folhas de laranja (hospedeiro), em ponkan (resistente) e em maracujá (*passion fruit*, não hospedeiro) em concentrações variadas.

Foi possível verificar um aumento na expressão da maioria das proteínas; aquelas que apresentaram maior variação foram sequenciadas em sua região N-

¹⁰⁶ Freudl, R.; Klose, M.; Henning, U.; Export and sorting of the *Escherichia coli* outer-membrane protein OmpA *J. Bioenerg. Biomembr.* **1990**, *22*, 441-449.

¹⁰⁷ Bouveret, E.; Benedetti, H.; Rigal, A.; Loret, E.; Lazdunski, C.; *In vitro* characterization of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)-peptidoglycan and PL-TolB interactions'; *J. Bacteriol.* **1999** *181*, (20), 6306-6311.

¹⁰⁸ Hosking, E. R.; *et al.*; 'The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged' *J. Mol. Biol.* **2006** *364*, (5), 921-937.

¹⁰⁹ Selvaraj, S. K.; Periandythevar, P.; Prasadarao, N. V.; Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intracellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells *Microbes Infect.* **2007**, *9*, 547-557.

¹¹⁰ Mehta, A.; Rosato, Y., B.; Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant *Proteomics* **2001**, *1*, 1111-1118.

¹¹¹ Guerreiro, N.; Redmond, J. W.; Rolfe, B. G.; Djordjevic, M. A.; New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins *Mol. Plant Microbe Interact.* **1997**, *10*, 506-516.

¹¹² Schulte, R.; Bonas, U.; Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene-cluster which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 815-823.

terminal e, através dessas informações, foram atribuídas possíveis funções, de acordo com sua homologia com proteínas já identificadas e depositadas nos bancos de dados públicos. Contudo, o maior problema foi a atribuição de função a estas proteínas, uma vez que o trabalho¹¹⁰ é anterior ao sequenciamento do genoma da *Xac*¹⁵.

Devido a problemas encontrados nas análises por MALDI, que não resultaram na identificação de um número adequado e esperado de proteínas, apesar de diversas tentativas de otimização dos procedimentos de separação eletroforética e lise tríplica, deu-se início às separações eletroforéticas em uma única dimensão. As bandas na região de baixa massa molecular foram recortadas e submetidas ao protocolo de lise tríplica conforme já descrito, separação dos peptídeos por cromatografia líquida seguida de detecção por espectrometria de massas destes peptídeos.

A Figura 23 mostra um gel de eletroforese unidimensional da fração sobrenadante do lisado total de *Xac* em todas as condições estudadas: na ausência de qualquer extrato nutritivo (situação **a**), na presença de extrato de folha (situação **b**) e de casca (situação **c**). As regiões de massa molar menores que 20 kDa foram recortadas dos géis, submetidas a digestão enzimática e posterior análise por *Shotgun*; todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As análises por experimentos de *Shotgun* das bandas de gel 1D na condição **a** permitiram a identificação de 12 proteínas já conhecidas da *Xac*; além disso, 4 proteínas anotadas como hipotéticas foram identificadas através desta abordagem, e os valores de massa das proteínas identificadas estão em concordância com a altura das bandas no gel. Na Tabela 10, estão listados os dados sobre as proteínas consideradas até então hipotéticas da *Xac* e identificadas nas bandas analisadas. Nesta e nas Tabelas seguintes, as sequências de aminoácidos em destaque referem-se aos peptídeos identificados pelas análises de MS/MS realizadas (Anexo II).

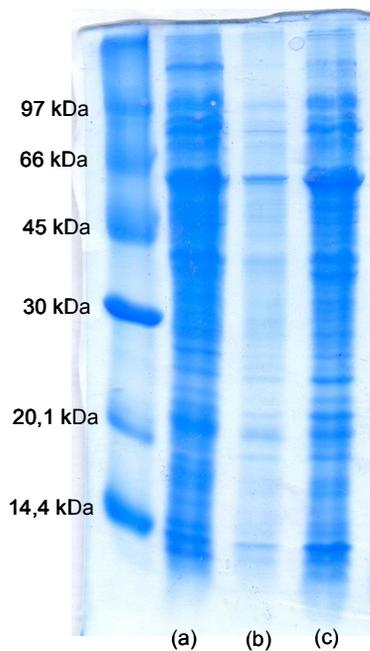


Figura 23: Gel de eletroforese (15%) unidimensional com frações sobrenadante do lisado total da *Xac* nas condições **a**, **b** e **c**. À esquerda é mostrado o padrão de peso molecular com massas das proteínas constituintes identificadas.

Da mesma forma que as bandas de gel unidimensional, o extrato sobrenadante total das condições de cultivo da *Xac* também foi submetido a lise trípica para análise através de separação e identificação de peptídeos. Foi possível alcançar nestes experimentos a identificação de 82 proteínas (Anexo III), algumas já identificadas pelo método discutido. A Tabela 11 contém os dados referentes às proteínas consideradas hipotéticas da *Xac* encontradas nos experimentos com digestão de proteínas totais da condição **a**.

Tabela 10: Massas nominais, pontos isoelétricos teóricos e sequências de aminoácidos das proteínas identificadas pelas análises de *Shotgun* após previa separação em gel 1D na condição **a** anotadas como proteínas hipotéticas da *Xac*

| PROTEÍNA | MASSA NOMINAL / Da | pi CALCULADO | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS |
|----------------|-----------------------|-----------------|---|
| XAC3972 | 20640 | 6,06 | MKFTLITASLLAMLSLTACDRPGGDASRTAPAVS PEPTAAPVSGNGATELAK GDSAVLGVLA AIDDN EIALAK QAI AQDLGGATGEFAQQMLHDHQANLE KTKSLGATESPRAQAMRAKGKAAVEALSRTLTP DGKDAYRNAFMR NMVIDHGD TIKIIDSELLPAAES APVKQHLEETRRVVSAHFERAHAVSSSK |
| XAC2525 | 16954 | 5,50 | MRALALASIAALAVTACK KEEP APTAAA PAPLT APAK DDNAGWKKYLQEVVGGNLTGTTNSPFLYY LPPESDAEFAGSYERQLESVKTALAR GVQPGNM LAFGSSASSKMADLIDAAF KDV APDSMK GVRVL FIGNAADNAR VQTIVQPKGAEYIFVEA K |
| XAC1364 | 16432 | 5,56 | MSIQSK TEHSLNDLIA SRD GKDFYEEAAK VG D AELATLFR RRIAGVKTDIVSSLSSVTVAVGGTPEQ HGTLVGSMQQFYGKVRATLGD TKYGYVAE LEES EDRLLKAFDETIADQDTPAAAR DAALRLLPEVRA CHDVMRNRKHAMKSAA |
| XAC0292 | 15000 | 11,07 | MSKLTVITERALER ALELAGTAGDQL RHAASNA GDQARNAGSSLRHFGPSASEWLKTGAALGAVRT GGKAASKLVKRNPVAVTAAAVAGLGLIGYAVYRK RQR DQQVLGGNVHR LDREHASNANARRAAYQR RGAVTPSDGIE |

Nas análises de proteínas totais, também foi possível identificar as proteínas hipotéticas **XAC2525**, **XAC1364** e **XAC0292**, todas já identificadas em análises anteriores. A proteína hipotética **XAC1364**, identificada em todas as análises realizadas por experimentos de *Shotgun* para amostras da condição **a**, é uma das 40 proteínas alvo deste projeto. A comprovação de sua expressão pela bactéria faz com que estudos estruturais e funcionais desta proteína sejam necessários. Sua expressão numa condição de ausência de nutrientes específicos pode significar que nem todas as proteínas dos T3SS e T4SS sejam expressas somente em contato com a célula do hospedeiro, sendo necessários estudos mais aprofundados e específicos frente a esta proteína.

Tabela 11: Massas nominais, pontos isoelétricos teóricos e sequências de aminoácidos das proteínas identificadas pelas análises de *Shotgun* de proteínas totais da condição **a** que foram anotadas como proteínas hipotéticas da *Xac*

| PROTEÍNA | MASSA NOMINAL / Da | pI CALCULADO | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS |
|----------|-----------------------|-----------------|---|
| XAC4007 | 7977 | 5,01 | MNSDIISGKWTQLKGKAQAK WGDLTDDDFK VAEGNAEYLQGK LQERYGWRDRAQTEVR AFEKSLRDDT |
| XAC3981 | 12172 | 4,93 | MSPTNTDQLK ENLSEAGTHL KSANAAGEA VRGATSAAGDELKLGANVKAELSDTALAG MAAAEFGGAAAKEQIDVLVAK GNDLLESAT DLIRER PLAAFVAFAGWVIAKLARSNDN |
| XAC0682 | 12406 | 9,40 | MTHARKLLALSLSLGLTLGASQAFAPQEHA DHKDHAAGMNESK KPVTDTWITTK VKADLL ATDNVSGTDVKVETK NGIVTLTGAVATQAE HDKAVAVAK GIEGVKSVKSTGLKVTAACK |
| XAC3725 | 18344 | 5,03 | MAIKTVEDLFIHELSDIYSAEKQLTKSLPRLAR AATEPKLKQAFETHLEETQGQIER IDQVVEV LGIKLKRIKCAAMEGLVEESREVIDEIEAGPV RDAALIGGAQKVEHYEIASYGTIAAIKQLGY ADALPLLLATLEEEKATDEKLTLLAEQGGNQ KASKASKAA |

As análises dos peptídeos das bandas de gel 1D mostrado na Figura 23 para a condição **b** (em presença de extrato de folhas de laranja) resultaram na identificação de 10 proteínas já conhecidas da *Xac*, além das proteínas hipotéticas **XAC0292**, **XAC2525**, **XAC3981**, **XAC1364**, que já haviam sido identificadas nas frações da condição **a**. Nas análises das bandas da condição **b**, também foi possível identificar a proteína hipotética **XAC1761**, que não havia sido identificada até então. A Tabela 12 contém os dados referentes a esta proteína.

Tabela 12: Massa nominal, ponto isoelétrico teórico e sequência de aminoácidos da proteína identificada pelas análises de *Shotgun* das bandas de gel 1D na condição **b** anotada como proteína hipotética da *Xac*

| PROTEÍNA | MASSA NOMINAL / Da | pI CALCULADO | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS |
|----------|--------------------------|-----------------|---|
| XAC1761 | 17512 | 7,88 | MRHSVSPVRVLSLALLATATVAATSGCSWFHKGARGD YALAPEARPLEVPPDLNLPDTSGAMKVPTLASTTQQQT NTPPSASANSFTVPGERDEVFGK VGAALADIPGLTIA SKAQMLGSYDVSIEGSSFLVRVVKVDAGSYVSAVDP RGMPATAAAPVAVIAALK GKLG |

As análises de *Shotgun* do extrato celular obtido após cultivar a *Xac* na condição **b** resultaram na identificação de 128 proteínas, sendo 7 delas hipotéticas, e 46 adicionais às proteínas identificadas nas análises da condição **a** (Anexo III). As proteínas anotadas na *Xac* como hipotéticas e identificadas nesta condição já haviam sido identificadas nas análises dos lisados da condição **a**: **XAC1364**, **XAC3981**, **XAC0292**, **XAC3657** e **XAC0682**, cujos dados foram apresentados.

Nas análises das bandas do gel unidimensional mostrado na Figura 23 da fração protéica da *Xac* obtida na condição **c** (em presença de extrato de casca de laranja), foi possível identificar 20 proteínas já conhecidas da *Xac*, e 10 proteínas anotadas como hipotéticas, identificadas em análises precedentes: **XAC2525**, **XAC3972**, **XAC1364**, **XAC0292**, **XAC3981**, **XAC1761** e **XAC1492**, esta última, identificada em análises de MALDI na condição **a**. Nas análises das bandas da condição **c** foi possível identificar mais 3 proteínas anotadas como hipotéticas: **XAC1476**, **XAC0587** e **XAC2319**, e os dados referentes a estas proteínas estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13: Massas nominais, pontos isoelétricos teóricos e sequências de aminoácidos das proteínas identificadas pelas análises de *Shotgun* das bandas de gel 1D na condição **c** anotadas como proteínas hipotéticas da *Xac*

| PROTEÍNA | MASSA NOMINAL / Da | pi CALCULADO | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS |
|----------|-----------------------|-----------------|---|
| XAC1476 | 20304 | 5,77 | MSKLTIAVLVGSRLRAESYNRQLARALEHLA GDRAVFEYLEIGDIPLYNQDPDGDYPAEGTR LKQQIR AADAVLFVTPEYNRS SIPGVLKNAIDT GSRPYGDSAFAGKPAAVVGVSVGAIGTATA QQHLRNVLAYLDMHVLGQPEVFLQYK DGLF GPDDQVANADSR KFLQGFIDQFLGLIGHLKR |
| XAC0587 | 15604 | 10,53 | MHMALIHSLMGAVAGMRSMTPLAAVANAA RTGKLPADNGAPALLANPLASAGMLALAGG ELAGDKMKTAPDRIVLPGMIAR IATGVIVGTA LAPRE QRGIAALLGATTAVAAAYLTFNARMR AIERYGQTSTGVVEDAISVGAATLIVRDAAKR |
| XAC2319 | 14657 | 9,39 | MIKLSLIALLLGAATLAPQAQAAGNIDCQLSF NLGWSVVFYKTASGTGTIK CDNGAVIPVKIS SKGGGLTVGKSKIVGGR GTFSGAYSLNDLF GTAAAAEAHAGVVK SSTAQVVTKGDLSLAL AGTGEGVDLGVNVGNFVIERRK |

As análises por *Shotgun* da fração de proteínas do sobrenadante da *Xac* cultivada na condição **c** resultou na identificação de 119 proteínas, sendo 7 delas hipotéticas: **XAC3981**, **XAC0292**, **XAC0682**, **XAC1364**, **XAC2525**, **XAC4007** e **XAC1492**, e 37 proteínas adicionais as já identificadas na condição **a** (Anexo III). Dentre as hipotéticas, todas foram identificadas nas análises realizadas em outras condições.

É interessante destacar que a proteína **XAC1492**, identificada nas análises de MALDI, cujos espectros são apresentados nas Figuras 19 a 21 foi identificada novamente só na condição **c**, tanto nas análises de bandas de gel 1D como nas análises de *Shotgun* para a mistura de proteínas totais, sem nenhum fracionamento prévio.

As Figuras 24 a 28 contêm os espectros de massas dos peptídeos da proteína **XAC1364** que resultaram na identificação desta proteína pelos experimentos de *Shotgun*. Pode-se verificar, pelas atribuições feitas das sequências de aminoácidos aos sinais observados nos espectros que, nos experimentos com fonte de ionização do tipo ESI, os fragmentos observados são diferentes dos observados em espectros obtidos com fonte de ionização do tipo MALDI (Figuras 19 a 21).

Nos espectros obtidos por ionização do tipo ESI, os fragmentos y, pouco abundantes quando a ionização é do tipo MALDI⁹⁴, são notavelmente mais favorecidos pelas reações de fragmentação. Os primeiros íons da série b estão mais presentes que aqueles do final da série. Isso pode ser atribuído ao fato de que, como os peptídeos gerados são multicarregados, no momento da fragmentação, geram íons y e b complementares.

Os espectros de massas/massas obtidos para as proteínas anotadas como hipotéticas da *Xac* nos experimentos de *Shotgun* com as respectivas atribuições de sinais estão reunidos no Anexo IV.

XAC1364

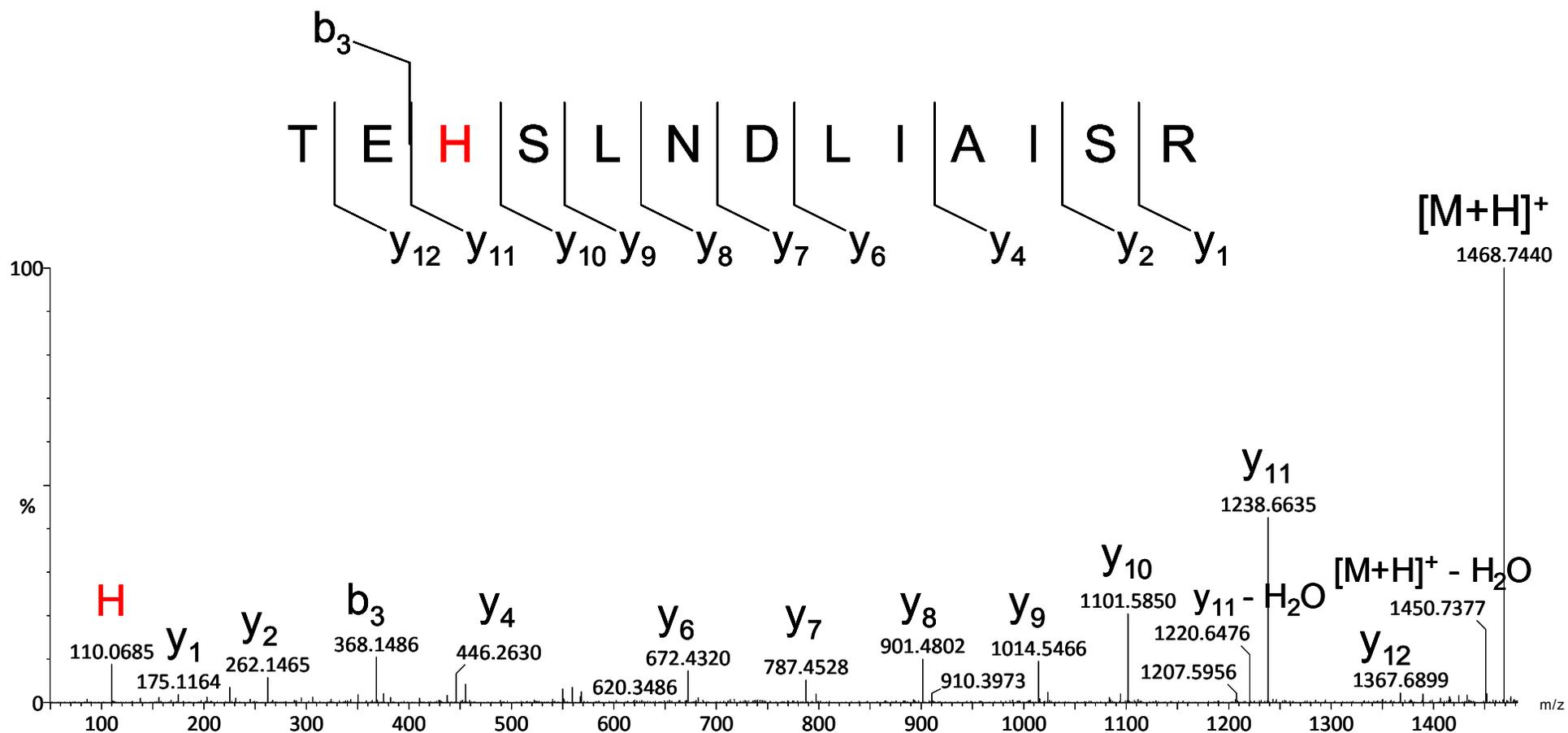


Figura 24: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em m/z 734,8, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1364

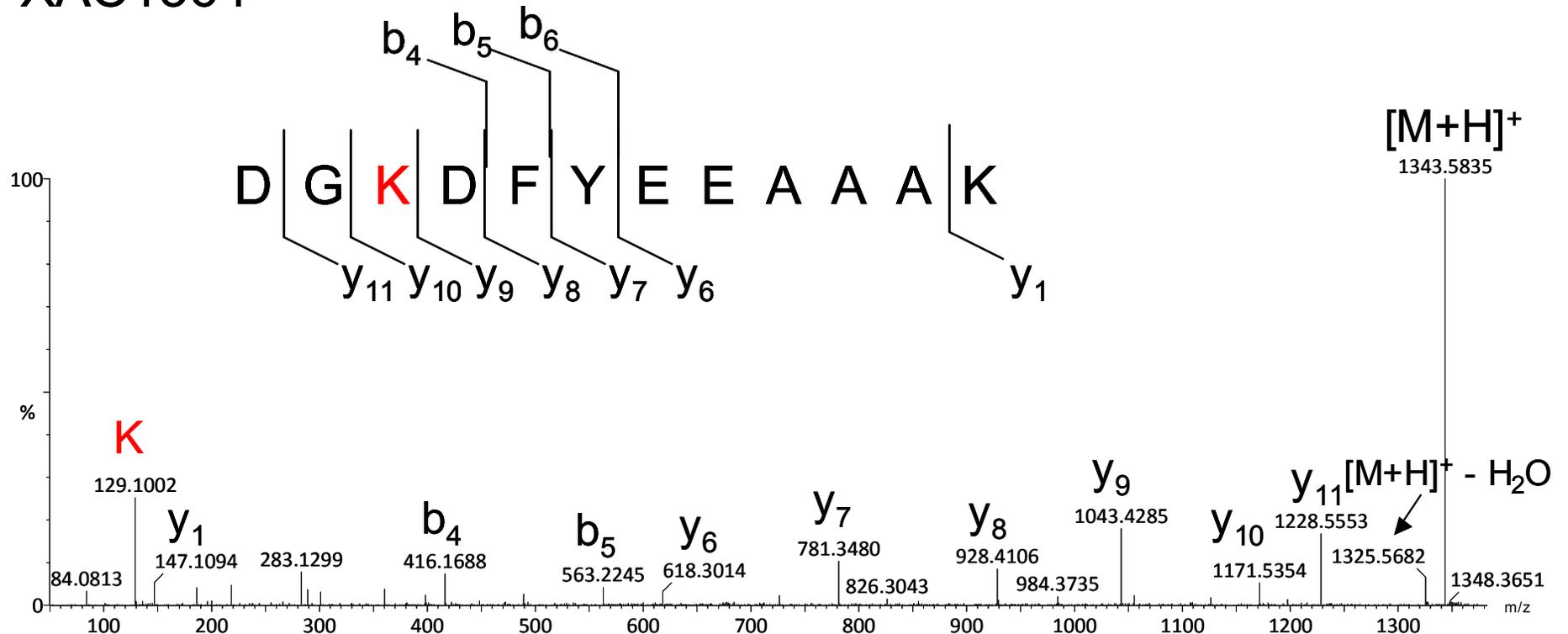


Figura 25: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em m/z 672,3, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1364

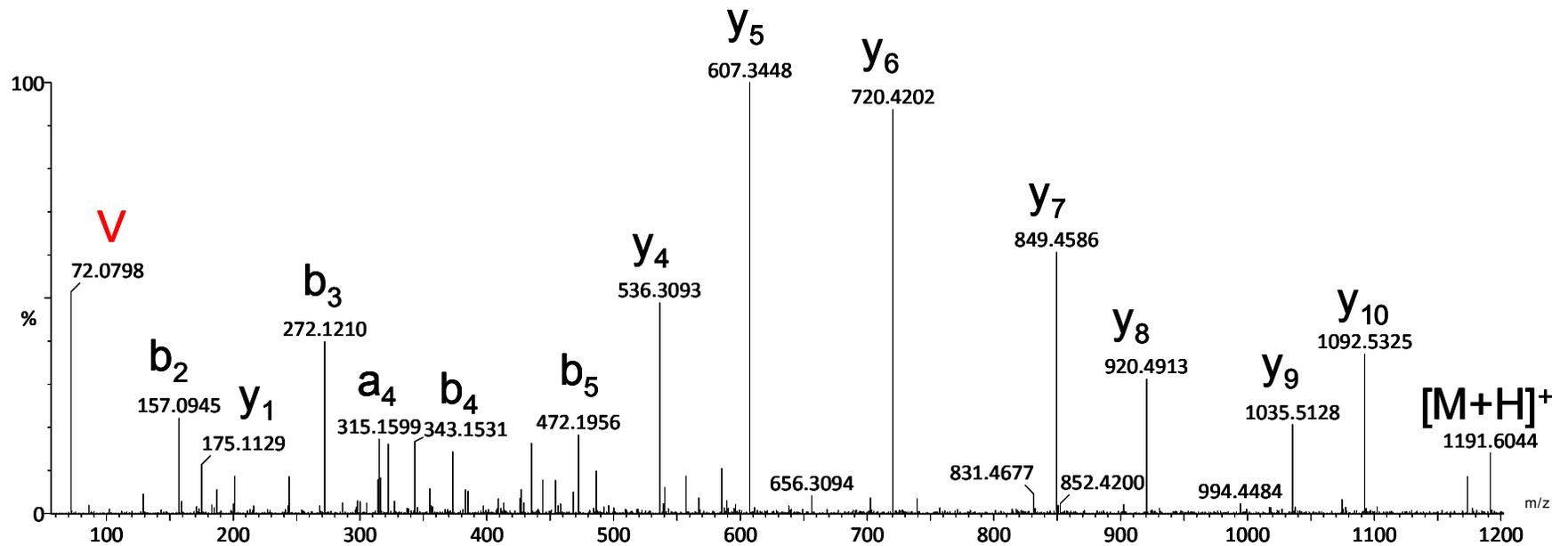
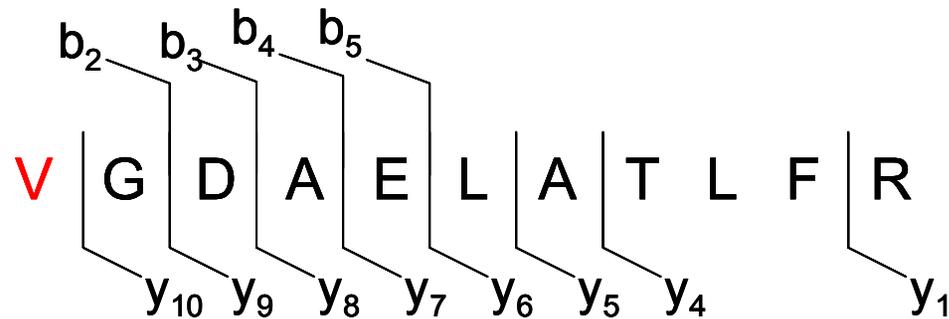


Figura 26: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em m/z 596,3, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1364

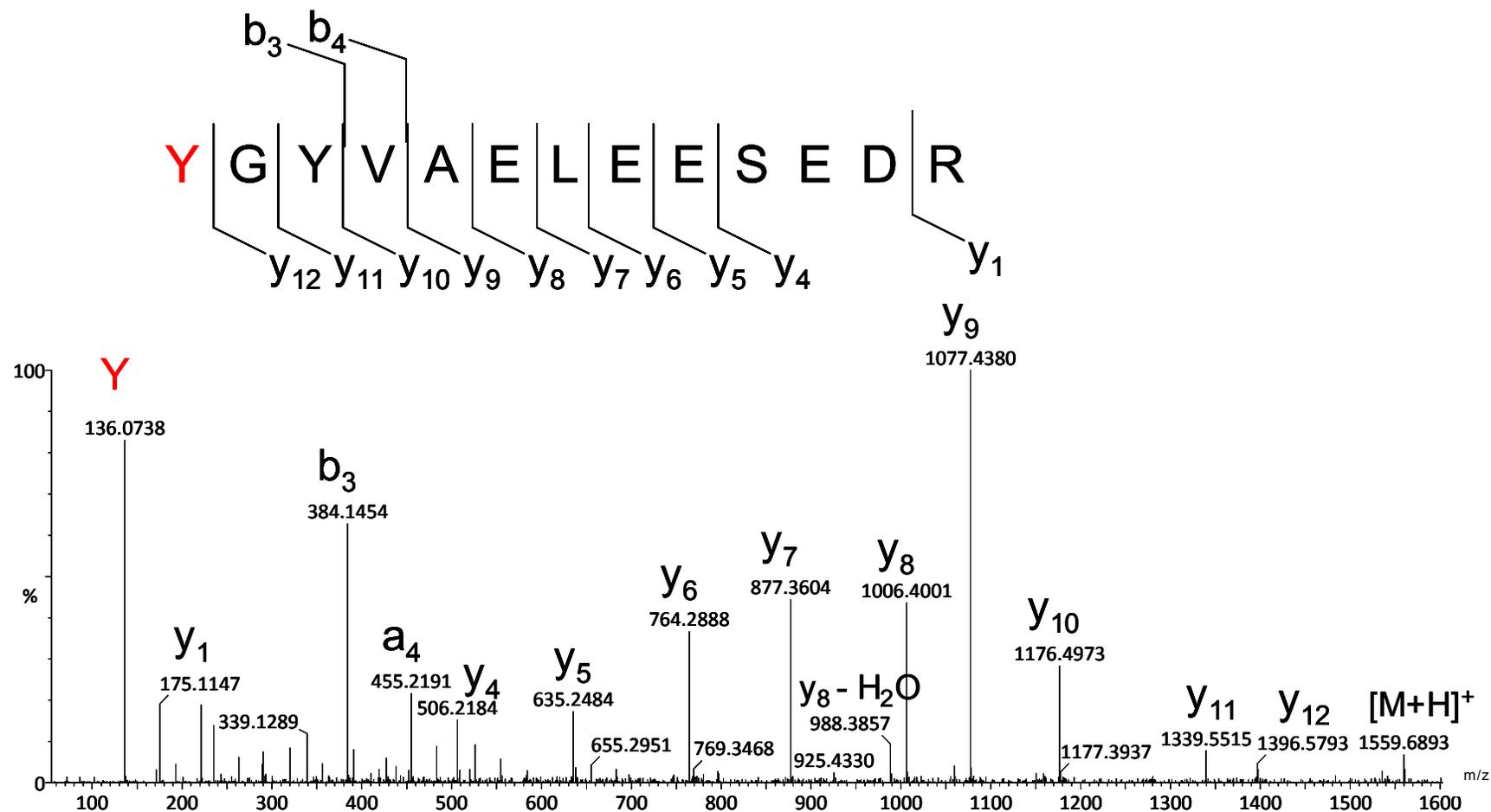


Figura 27: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em m/z 780,3, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1364

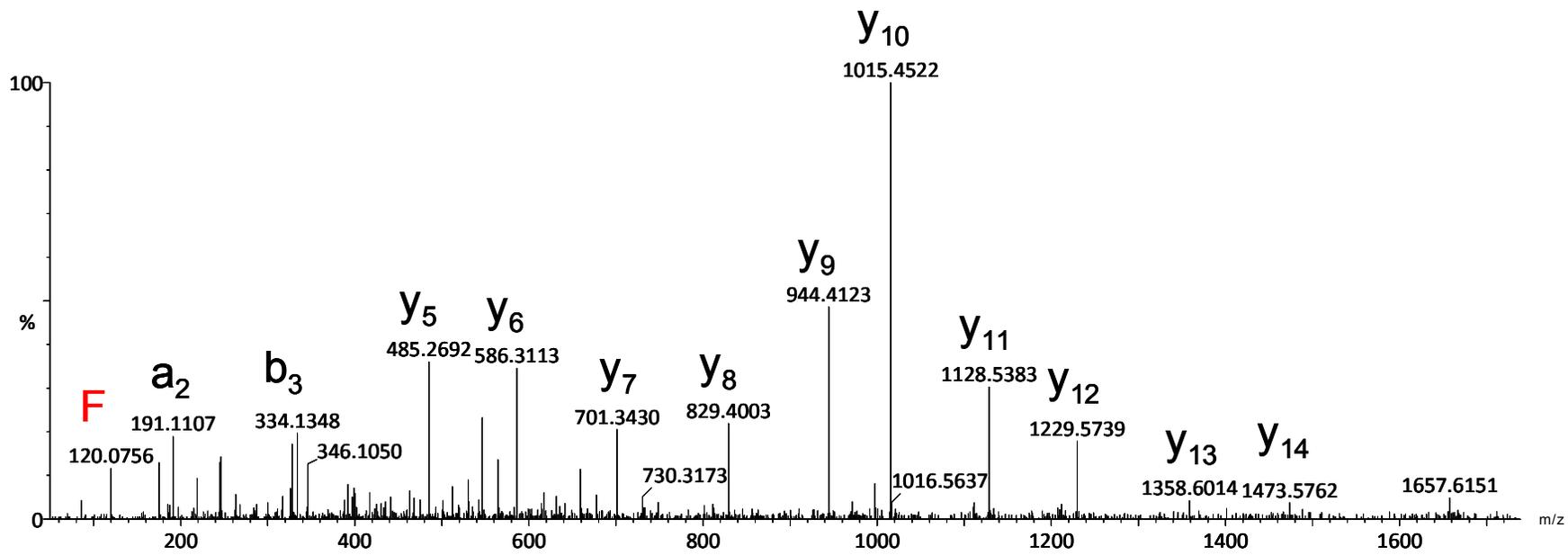
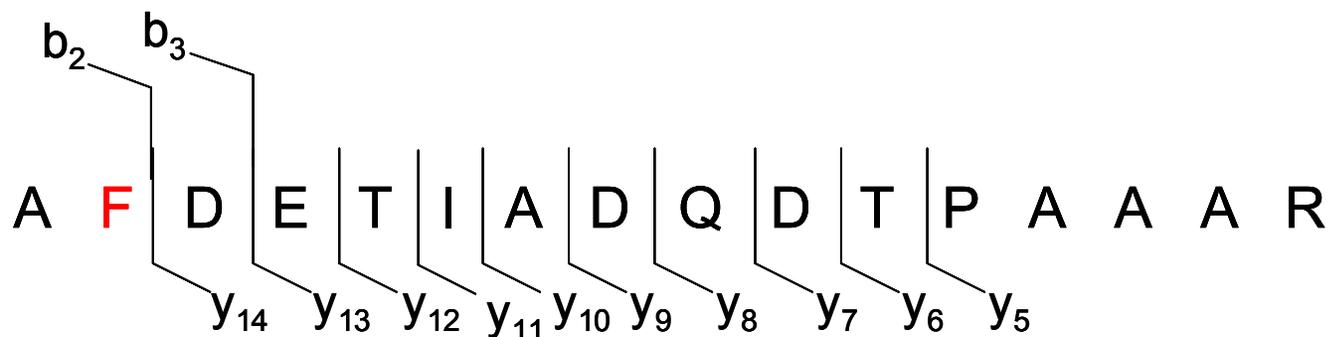


Figura 28: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo em m/z 846,3, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

Na predição de estrutura secundária realizada por Khater e *col.*⁷¹, a região envolvida na formação de estruturas de α -hélice compreende os resíduos de aminoácidos das posições 72 a 83, resultando num baixo conteúdo de estruturas de α -hélice. Predições de estrutura terciária realizadas com o programa I-TASSER¹¹³, após a identificação da expressão da **XAC1364**, mostraram um perfil um pouco diferente. Este é um servidor que realiza predições estruturais e funcionais para sequências protéicas, baseadas em alinhamentos com sequências que apresentam estrutura terciária e função já conhecidas¹¹³.

Através dessa simulação, a sequência de aminoácidos correspondente à XAC1364 resultou em cinco regiões com domínios de estruturas de α -hélices: dos resíduos 5 a 31, 35 a 61, 72 a 87, 90 a 114 e 120 a 149, conferindo a esta proteína mais uma característica de chaperona secretória (o alto conteúdo de estrutura helicoidal).

O modelo mais provável para esta proteína, de acordo com o I-TASSER, juntamente com a estrutura terciária da chaperona flagelar FliS, são mostrados na Figura 29. É possível verificar a semelhança da estrutura terciária do modelo proposto com a da chaperona flagelar FliS, que também possui muitas regiões helicoidais; esta semelhança pode ser um indicativo do papel da XAC1364 como chaperona flagelar.

¹¹³ <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>

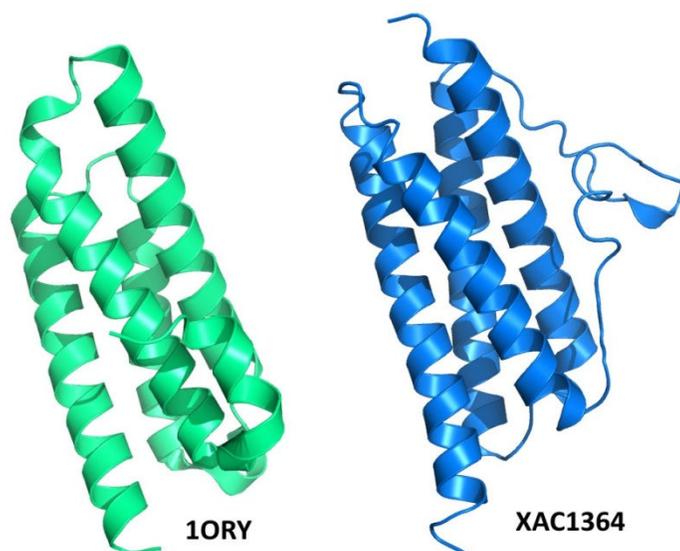


Figura 29: Modelo do PDB para a chaperona flagelar FliS (entrada 1ORY) e o modelo predito pelo I-TASSER com maior probabilidade para a estrutura terciária da XAC1364.

O banco de dados STRING 8.3¹¹⁴ apresenta associações físicas e funcionais entre mais de 2 milhões de proteínas conhecidas de 630 organismos, derivadas de contextos genéticos, dados experimentais e da co-expressão de proteínas. Quando se busca relações da proteína XAC1364, é possível verificar que esta proteína é co-expressa com muitas outras proteínas ainda hipotéticas da *Xac*, como se pode ver pela Figura 30.

¹¹⁴ <http://string-db.org/>

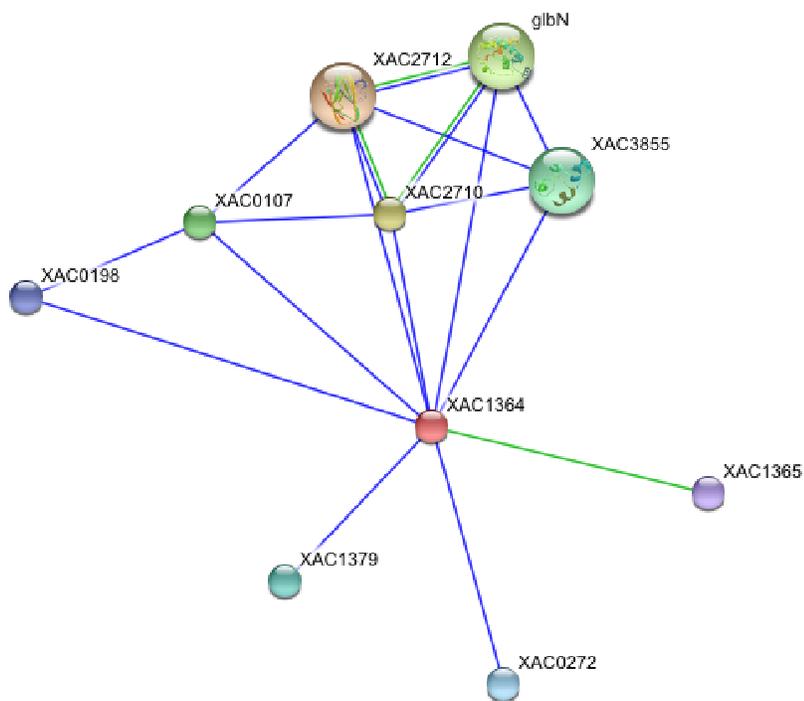


Figura 30: Relações de co-expressão atribuídas à proteína XAC1364 (Figura retirada do site do STRING¹¹⁴; as linhas azuis relacionam a ocorrência de ambas as proteínas, por proximidade física ou funcional, e a linha verde indica vizinhança das proteínas no genoma).

O fato de esta proteína estar associada a diversas proteínas que também apresentam função desconhecida pode ser mais um indicativo de seu papel como chaperona secretória, que pode se associar a mais de uma proteína efetora. Além disso, essa proteína apresenta uma similaridade de estrutura primária com a proteína de *Xanthomonas campestris campestris*, e um certo grau de similaridade com as proteínas de outras proteobactérias e de outros organismos de classes distintas.

A não identificação das proteínas relacionadas à XAC1364 não exclui a possibilidade de estas proteínas serem expressas pela *Xac*. Além disso, se a XAC1364 realmente for uma chaperona secretória dos sistemas de secreção envolvidos na patogenicidade, e as proteínas associadas a ela forem efetoras, sua expressão deve ocorrer somente quando a bactéria entra em contato com células do hospedeiro, situação que não foi estudada nos experimentos realizados.

Em um trabalho recente¹¹⁵, em que a expressão protéica da *Xac* foi estudada a 42°C, foi possível observar, a partir da comparação de géis de eletroforese 2D, uma maior expressão de proteínas da família HspA e GroES, chaperonas moleculares envolvidas nas respostas a condições de *stress*. Juntamente com essas proteínas, os autores observaram a maior expressão de uma proteína até então considerada hipotética, a XAC1364, indicando que essa proteína pode estar envolvida em mecanismos de resposta a altas temperaturas, por exemplo.

As características físico químicas próprias de chaperonas secretórias, o alto conteúdo de estrutura secundária helicoidal, a expressão em condições basais e a relação de co-expressão para várias outras proteínas da *Xac* são indicativos de uma possível ação de chaperona da XAC1364, em processos secretórios, flagelares e até mesmo em respostas a altas temperaturas. Um estudo mais aprofundado desta proteína, estrutural e funcional, deve ser conduzido para que se tenha um melhor entendimento de seu papel no metabolismo da *Xac*.

¹¹⁵ Martins, D.; Astua-Monge, G.; Coletta-Filho, H. D.; Winck, F. V.; Baldasso, P. A.; de Oliveira, B. M.; Marangoni, S.; Machado, M. A.; Novello, J. C.; Smolka, M. B.; Absence of classical heat shock response in the citrus pathogen *Xylella fastidiosa* *Curr. Microbiol.* **2007**, *54*, 119–123.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados possibilitaram verificar a maior expressão protéica da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em condições enriquecidas com extratos de cascas e folhas de laranja, evidenciado pela maior quantidade de spots de proteínas em géis de eletroforese em duas dimensões nestas condições. A modulação do proteoma da *Xac*, no sentido de expressar proteínas com uma característica específica (baixa massa molecular) foi percebida através de quantificação das proteínas expressas nas condições estudadas, já que a quantidade de proteínas totais não mudou significativamente de uma condição para outra.

A identificação de muitas proteínas até então consideradas hipotéticas no genoma da *Xac* implica um avanço no entendimento deste organismo, bem como no entendimento de seu processo de invasão e infecção da célula do hospedeiro. Uma proteína dentre as consideradas chaperonas hipotéticas, **XAC1364**, foi identificada em todas as condições de cultivo da bactéria analisadas, mostrando que existe uma tradução do genoma em sua sequência protéica, o que faz com que esta não seja mais uma proteína hipotética.

A predição de estrutura secundária realizada com o programa I-TASSER para esta proteína mostrou um perfil bem próximo ao das chaperonas secretórias, uma vez que o modelo gerado atribuiu à XAC1364 um alto conteúdo de α -hélice. Essa característica, além da confirmação de sua expressão em meio basal, também pode indicar um papel de chaperona flagelar à proteína. O fato de esta proteína já ter sido identificada em um trabalho em 2007, em que sua maior expressão foi observada em condições de *stress*, requer estudos mais aprofundados e específicos, para que se confirme se esta proteína apresenta função de chaperona. Estudos estruturais e funcionais devem ser executados com intuito de caracterizar melhor não só esta, mas todas as proteínas identificadas, e entender o seu real papel no metabolismo da *Xac*.

O monitoramento do consumo de moléculas presentes nos extratos provenientes da folha e casca de laranja não foi possível devido à perda de

grande parte dessas moléculas no processo de preparo dos meios de cultura para crescimento da *Xac*. Contudo, a identificação de algumas moléculas orgânicas apolares geradas pela bactéria pode indicar um potencial papel tóxico destas moléculas na célula vegetal do seu hospedeiro, de forma que, mais uma vez, estudos mais específicos e aprofundados sobre esse tema devem ser realizados.

A identificação qualitativa de espécies metálicas presentes nas frações protéicas da *Xac* cultivada em meio basal também mostra a importância dessas espécies em proteínas da bactéria. A identificação de algumas metaloproteínas, somada à presença de um grande número de íons metálicos presentes deve ser considerada para o melhor entendimento do proteoma da *Xac*, de seus processos metabólicos e, principalmente, de seu processo de invasão e infecção da célula hospedeira, no sentido de se desenvolver novas alternativas para a prevenção e erradicação do cancro cítrico.

6. ANEXO I

Soluções utilizadas

I.I

Solução tampão de lise pH 8,0 (autoclavada)

50 mM tris-HCl pH 8,0

50 mM NaCl

10 mM a EDTA

I.II

Solução de hidratação das fitas de poliacrilamida (primeira dimensão)

8 M uréia

CHAPS a 2% m/v

Tampão IPG pH 4-7 (Amersham Biosciences) a 2% v/v

Traços de azul de bromofenol

I.III

Reagente de Bradford

0,5 g/mL Comassie Brilliant Blue G-250

Metanol a 25% v/v

Ácido fosfórico a 42,5% v/v

Solução estocada no escuro a 4° C e filtrada antes do uso

I.IV

Solução SDS de equilíbrio (fitas da primeira dimensão)

50 mM tris-HCl pH 8,8

6 M uréia

Glicerol a 30% v/v

SDS a 2% m/v

traços azul de bromofenol

I.V

Composição gel de poliacrilamida (segunda dimensão)

Solução 30% poliacrilamida:0,8% m/v N,N'-metiletenobisacrilamida a 18% ou 15% v/v

Solução tris-HCl pH 8,8 a 25% v/v

Solução SDS 10% m/v a 1% v/v

Solução APS 10% m/v a 5% v/v

TEMED a 0,033% v/v

I.VI

Solução tampão de corrida

25 mM tris (hidroximetil) amino metano

192 mM glicina

SDS a 0,1% m/v

I.VII

Corante coloidal Comassie Blue

100 g/L sulfato de amônio

Ácido fosfórico (85% PA) a 1,2% v/v

Solução Comassie Brilliant Blue G250 (5% m/v em água) a 2% v/v

Dissolver a solução em metanol na proporção 4:1 v/v no momento de usar

I.VIII

Composição gel de empacotamento

Solução 30% poliacrilamida:0,8% m/v N,N'-metiletenobisacrilamida a 5% v/v

0,19 M solução tris-HCl (pH 6,8)

SDS a 0,1 % m/v

APS a 0,1 % m/v

TEMED a 0,04% v/v

I.IX

Solução tampão de amostra (pH 6,8)

50 mM

100 mM DTT

SDS a 2% m/v

Azul de bromofenol a 0,1% m/v

Glicerol a 10% m/v

I.X

Solução tampão para o padrão molecular (pH 6,8)

0,0625 M tris-Hcl

SDS a 2% m/v

Glicerol a 10% v/v

0,1 M DTT

Azul de bromofenol a 0,01% m/v

7. ANEXO II

Espectros de massas dos compostos identificados por GC-MS

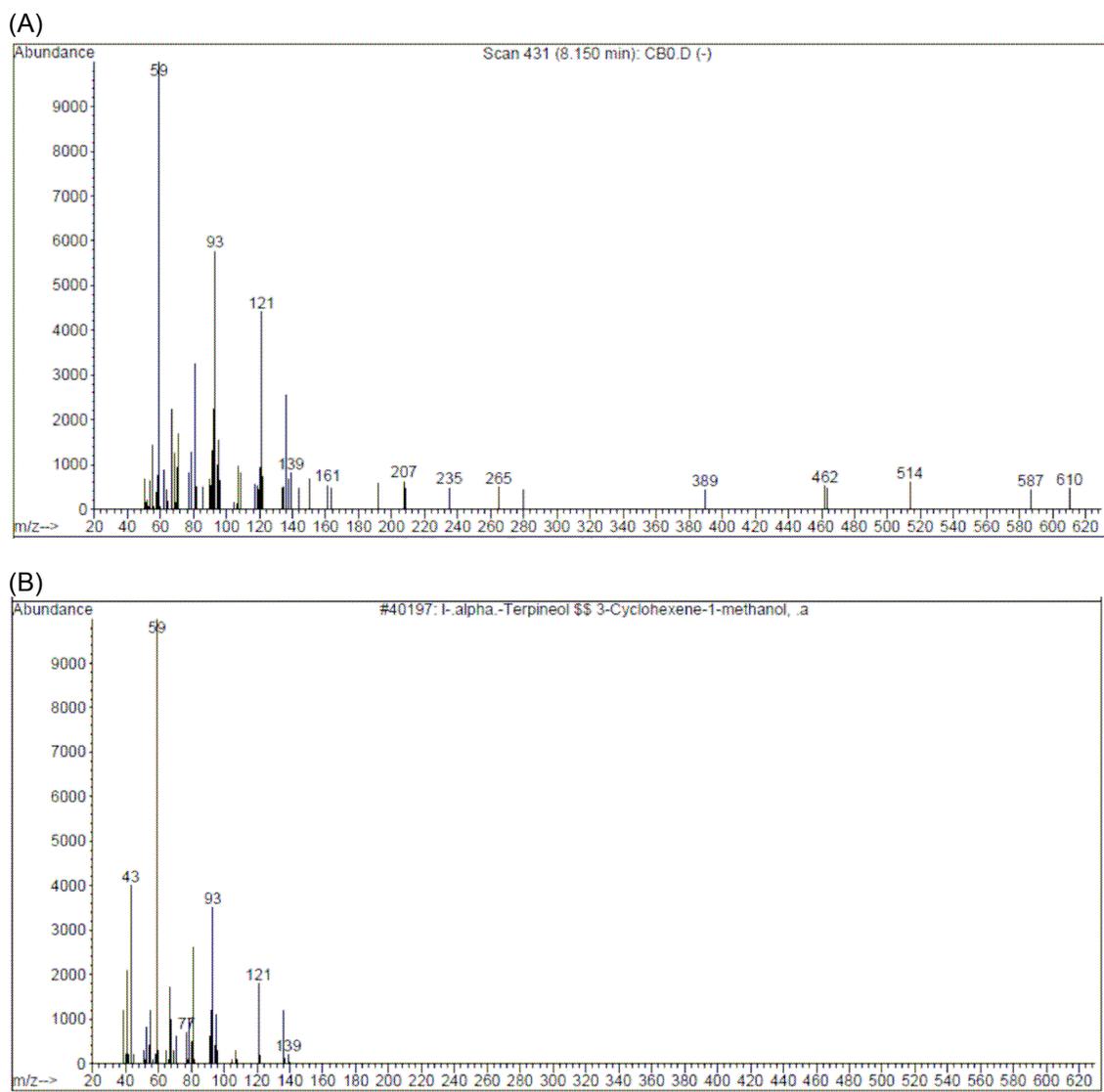


Figura 31: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de casca de laranja (A), identificado como terpineol (B).

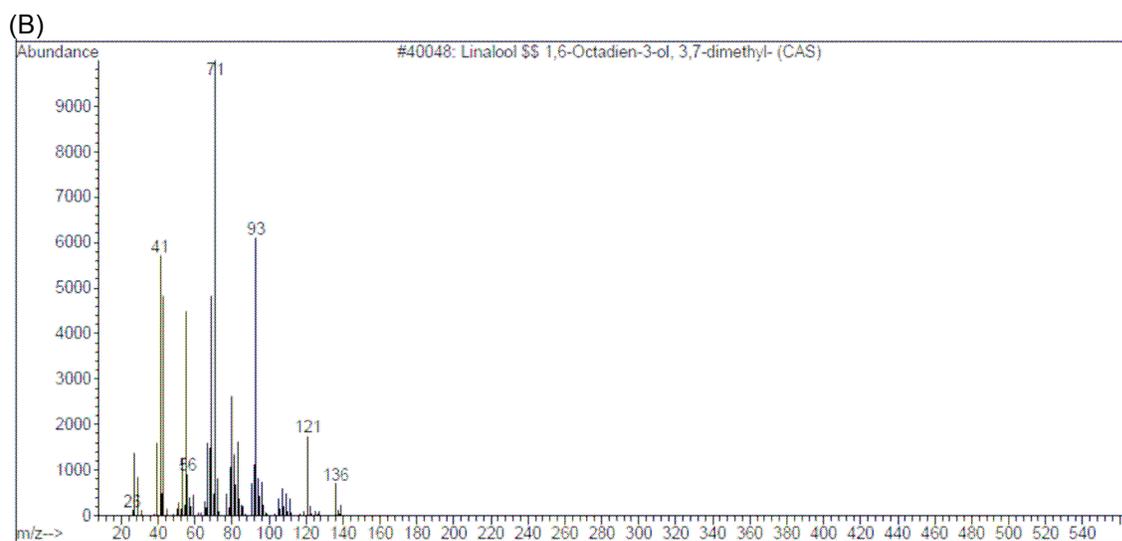
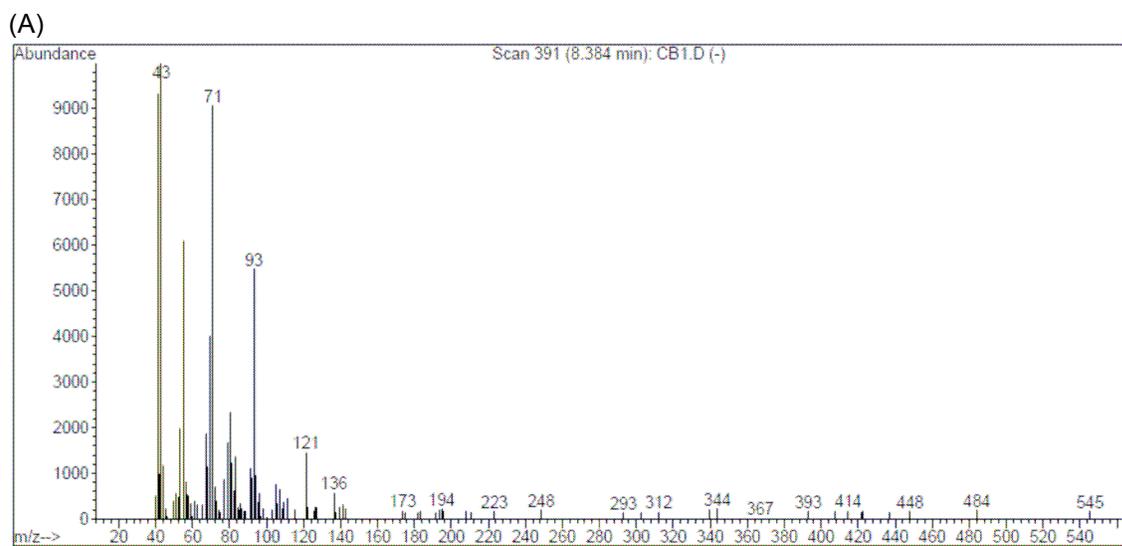


Figura 32: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de casca de laranja (A), identificado como linalol (B).

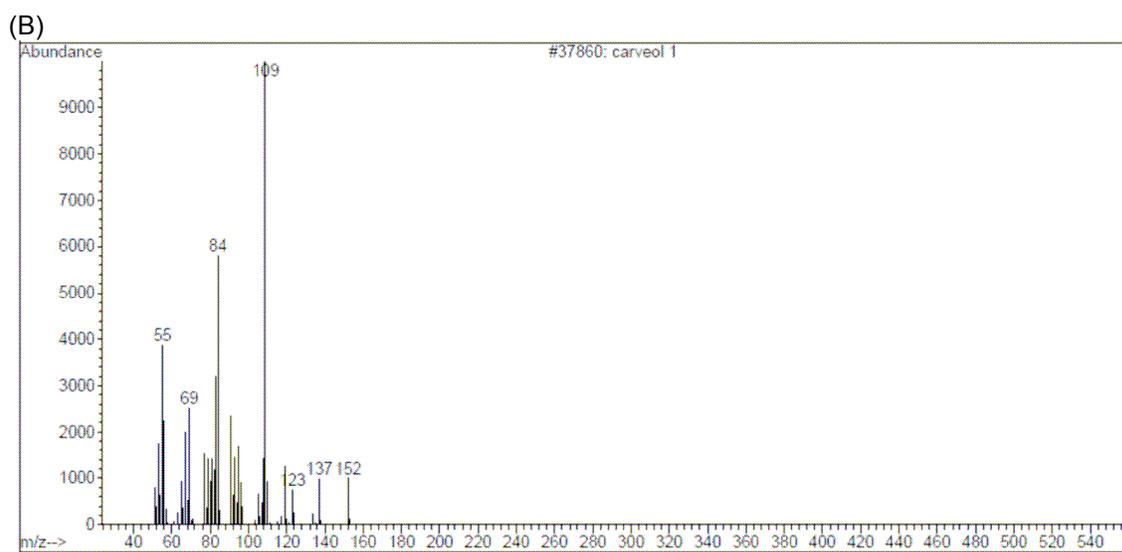
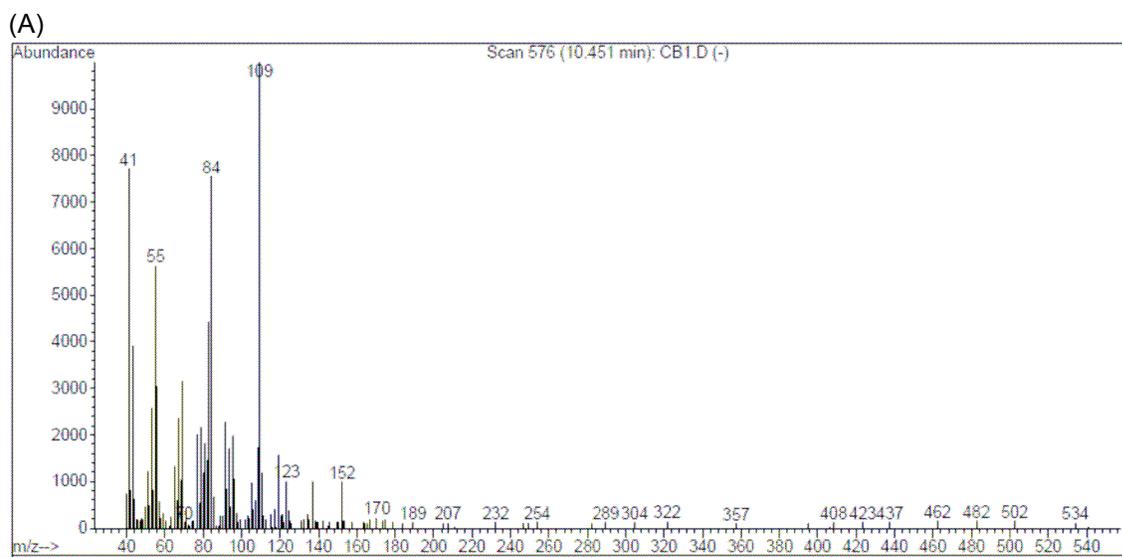


Figura 33: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de casca de laranja (A), identificado como carveol (B).

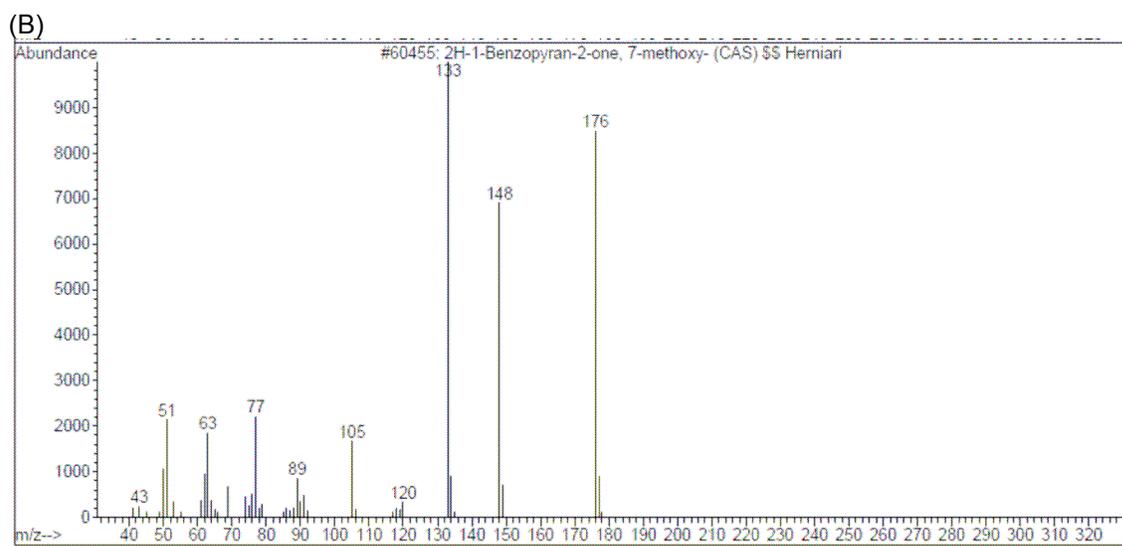
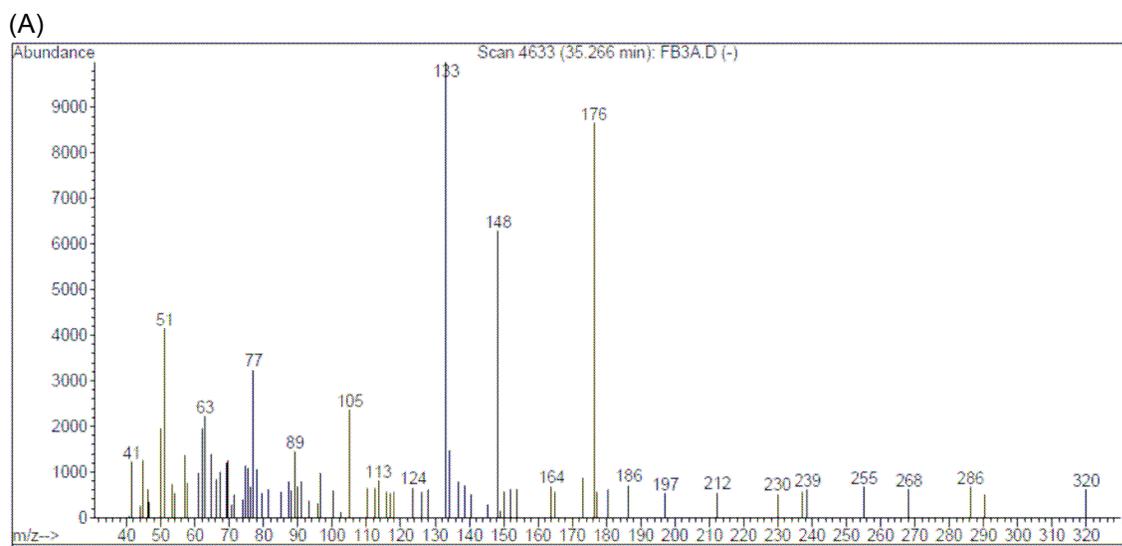


Figura 34: Espectros de massas de sinal detectado no extrato bruto de folha de laranja (A), identificado como uma benzopirano substituída (B).

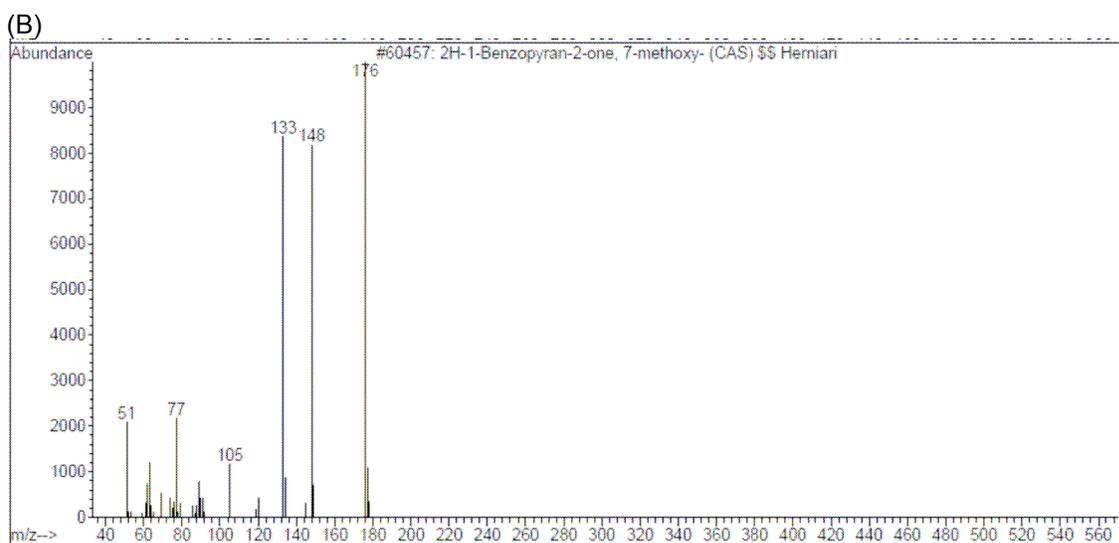
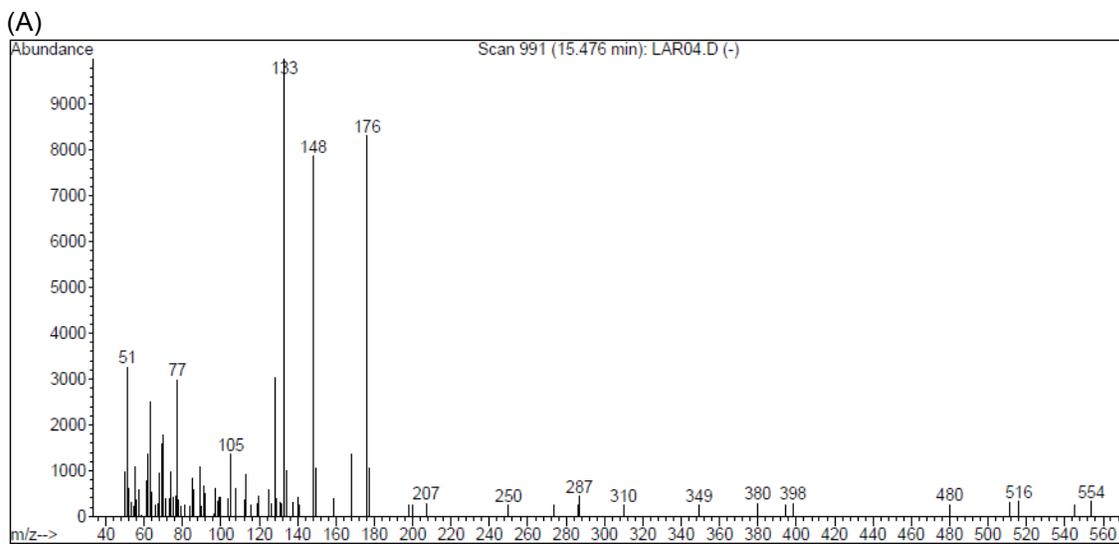


Figura 35: Espectros de massas de sinal detectado como metabólito da Xac quando cultivada em presença de extrato bruto de folha de laranjeira (A), identificado como uma benzopirano substituída (B).

8. ANEXO III

Relação das proteínas funcionais da *Xac* identificadas pelas análises de *Shotgun*

Tabela 14: Proteínas da *Xac* identificadas pelos experimentos de Shotgun na condição controle (a)

| |
|--|
| AAM35431 AE011680 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35692 AE011711 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35701 AE011713 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35790 AE011721 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35837 AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35838 AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35841 and AAM35853 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35844 AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35845 AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35847 AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35848 AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35849 AE011727 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35851 AE011727 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35852 AE011727 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35855 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35856 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35858 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35861 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35867 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35869 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35876 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35878 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35889 AE011730 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35955 AE011737 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36030 AE011745 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36292 AE011774 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36390 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36391 AE011784 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36488 AE011794 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36490 AE011794 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36586 AE011804 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM37232 AE011875 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM37719 AE011929 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM37998 AE011959 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38187 AE011980 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38190 AE011981 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38280 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |

Tabela 14 (continuação): Proteínas da *Xac* identificadas pelos experimentos de Shotgun na condição controle (a)

| |
|--|
| AAM38399 AE012005 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38494 AE012015 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38843 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| Q8NKZ7_XANAC Cold shock protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NL05_XANAC 30S ribosomal protein S1 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NL12_XANAC Histone-like protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NL14_XANAC Two-component system regulatory protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NL26_XANAC Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PEK7_XANAC Toluene tolerance protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PFT3_XANAC Bifunctional PutA protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PFY7_XANAC Isocitrate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PGF6_XANAC Dihydrolipoamide acetyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PGG7_XANAC ATP synthase beta chain - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PH71_XANAC Citrate synthase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PH87_XANAC Transketolase 1 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHA5_XANAC Outer membrane protein W - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHA7_XANAC Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHL6_XANAC Succinyl-CoA synthetase alpha subunit - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHT7_XANAC Beta lactamase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHV8_XANAC Outer membrane protein P6 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHX5_XANAC - DNA-binding related protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PII2_XANAC Osmotically inducible protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PJ00_XANAC Metallopeptidase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PJ54_XANAC N utilization substance protein A - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PJ59_XANAC Polynucleotide phosphorylase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PJI4_XANAC Dihydrodipicolinate synthetase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PJL4_XANAC L-lysine 6-aminotransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PJZ1_XANAC Superoxidase dismutase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PK40_XANAC Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PK77_XANAC 30S ribosomal protein S1 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PKW6_XANAC Phosphoenolpyruvate synthase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PKZ3_XANAC 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PLB7_XANAC - Aconitate hydratase 2 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PM97_XANAC Oxoglutarate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PM98_XANAC Dihydrolipoamide S-succinyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PMD4_XANAC Virulence regulator - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PMU0_XANAC Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PMV4_XANAC Periplasmic protease - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |

Tabela 14 (continuação): Proteínas da *Xac* identificadas pelos experimentos de Shotgun na condição controle (a)

| |
|---|
| Q8PNK9_XANAC Isocitrate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNP2_XANAC Outer membrane protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNQ9_XANAC 50S ribosomal protein L15 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PP54_XANAC Two-component system regulatory protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PPV7_XANAC Pyruvate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . |
| Q8PQ76_XANAC 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PRF4_XANAC Biopolymer transport ExbB protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |

Tabela 15: Proteínas da *Xac* identificadas pelos experimentos de *Shotgun* na presença de extrato de folha de laranja (b)

| |
|--|
| AAM35400 AE011678 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35430 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35795 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35862 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35864 AE011728 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35956 AE011737 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35957 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36166 AE011760 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36293 AE011774 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM37626 AE011919 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38080 AE011969 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38630 AE012027 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38761 AE012042 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM39014 AE012068 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| Carbamoyl-phosphate synthase large chain (EC 6.3.5.5) (Carbamoyl- phosphate synthetase ammonia chain) - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Chaperone clpB - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NKX9_XANAC Rod shape-determining protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NL21_XANAC 50S ribosomal protein L13 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PFK2_XANAC Histone H1 homolog - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PGN0_XANAC Electron transfer flavoprotein beta subunit - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PGN5_XANAC UDP-glucose dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PGN7_XANAC Phosphoglucomutase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHB4_XANAC Pyruvate kinase type II - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHV8_XANAC Outer membrane protein P6 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PIH1_XANAC Histone-like protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PIZ8_XANAC Metallopeptidase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PK83_XANAC UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PK87_XANAC Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PKT5_XANAC Succinate dehydrogenase subunit A - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PKU1_XANAC Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PL05_XANAC ATP-dependent Clp protease subunit - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PLI9_XANAC Aldehyde dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PM98_XANAC Dihydrolipoamide S-succinyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PMR4_XANAC GTN reductase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PMW3_XANAC Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PN48_XANAC Septum site-determining protein (Cell division inhibitor) MinD - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |

Tabela 15 (continuação): Proteínas da *Xac* identificadas pelos experimentos de *Shotgun* na presença de extrato de folha de laranja (b)

| |
|---|
| Q8PN95_XANAC Oxidoreductase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNC2_XANAC Low molecular weight heat shock protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNC4_XANAC Bacterioferritin - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNE4_XANAC 3-oxoacyl-[ACP] reductase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNI3_XANAC ATP-dependent serine proteinase La - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNP9_XANAC Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNQ0_XANAC GTP-binding elongation factor protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PPK6_XANAC 6-phosphogluconate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PRE0_XANAC Carboxyl-terminal protease - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| DNA-directed RNA polymerase alpha chain (EC 2.7.7.6) (RNAP alpha subunit) (Transcriptase alpha chain) (RNA polymerase subunit alpha) - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |

Tabela 16: Proteínas da *Xac* identificadas pelos experimentos de *Shotgun* na presença de extrato de casca de laranja (c)

| |
|---|
| 10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein) - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| AAM35430 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35431 - AE011680 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35692 - AE011711 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35790 - AE011721 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35838 - AE011726 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35852 - AE011727 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM35889 - AE011730 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36030 - AE011745 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36293 - AE011774 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36391 - AE011784 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM36453 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM38187 - AE011980 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| AAM39014 - AE012068 NID: - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 |
| DNA-directed RNA polymerase alpha chain (EC 2.7.7.6) (RNAP alpha subunit) (Transcriptase alpha chain) (RNA polymerase subunit alpha) - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8NKZ8_XANAC - Partition protein A.- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PFK2_XANAC - Histone H1 homolog.- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PH71_XANAC - Citrate synthase (EC 2.3.3.1) - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHV8_XANAC - Outer membrane protein P6 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PHX5_XANAC - DNA-binding related protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PII2_XANAC - Osmotically inducible protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PJ59_XANAC - Polynucleotide phosphorylase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PJZ1_XANAC - Superoxidase dismutase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PK77_XANAC - 30S ribosomal protein S1 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PK83_XANAC - UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PKW6_XANAC - Phosphoenolpyruvate synthase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PLB7_XANAC - Aconitate hydratase 2 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PLC0_XANAC - Aconitase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PM97_XANAC - Oxoglutarate dehydrogenase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PM98_XANAC - Dihydrolipoamide S-succinyltransferase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PMV4_XANAC - Periplasmic protease - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNC2_XANAC - Low molecular weight heat shock protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNC4_XANAC - Bacterioferritin - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNP2_XANAC - Outer membrane protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PNP9_XANAC - Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> |
| Q8PRF4_XANAC - Biopolymer transport ExbB protein |
| Q8PRF4_XANAC - Biopolymer transport ExbB protein |

9. ANEXO IV

Espectros de massas/massas dos peptídeos identificados nos experimentos de *Shotgun* para as proteína hipotéticas identificadas

XAC3972

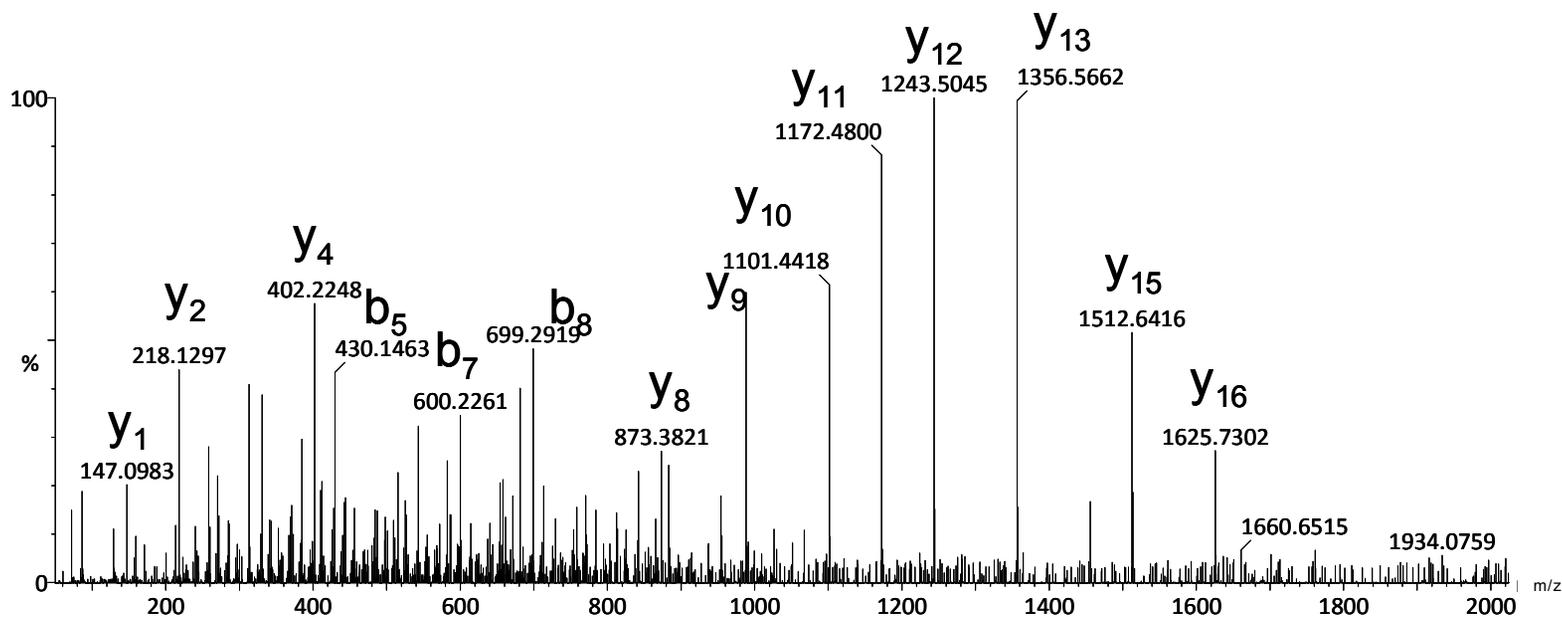
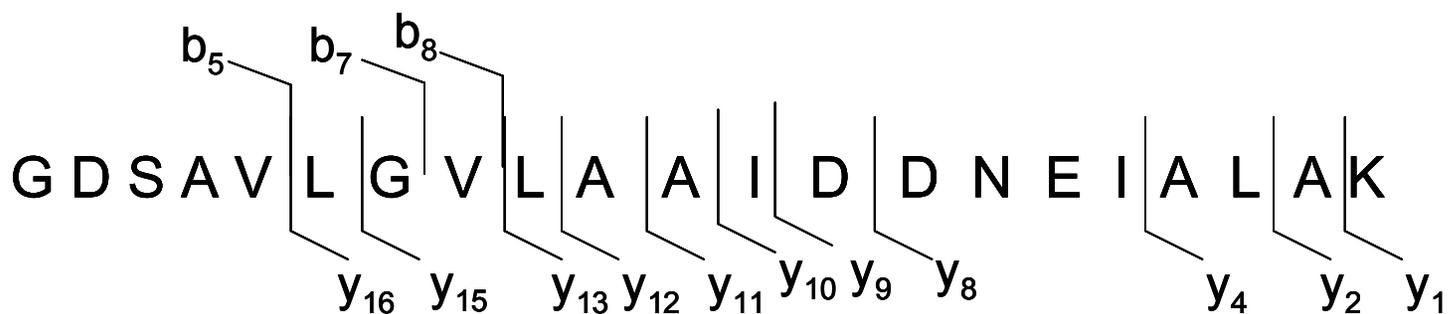


Figura 36: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 1028,06, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

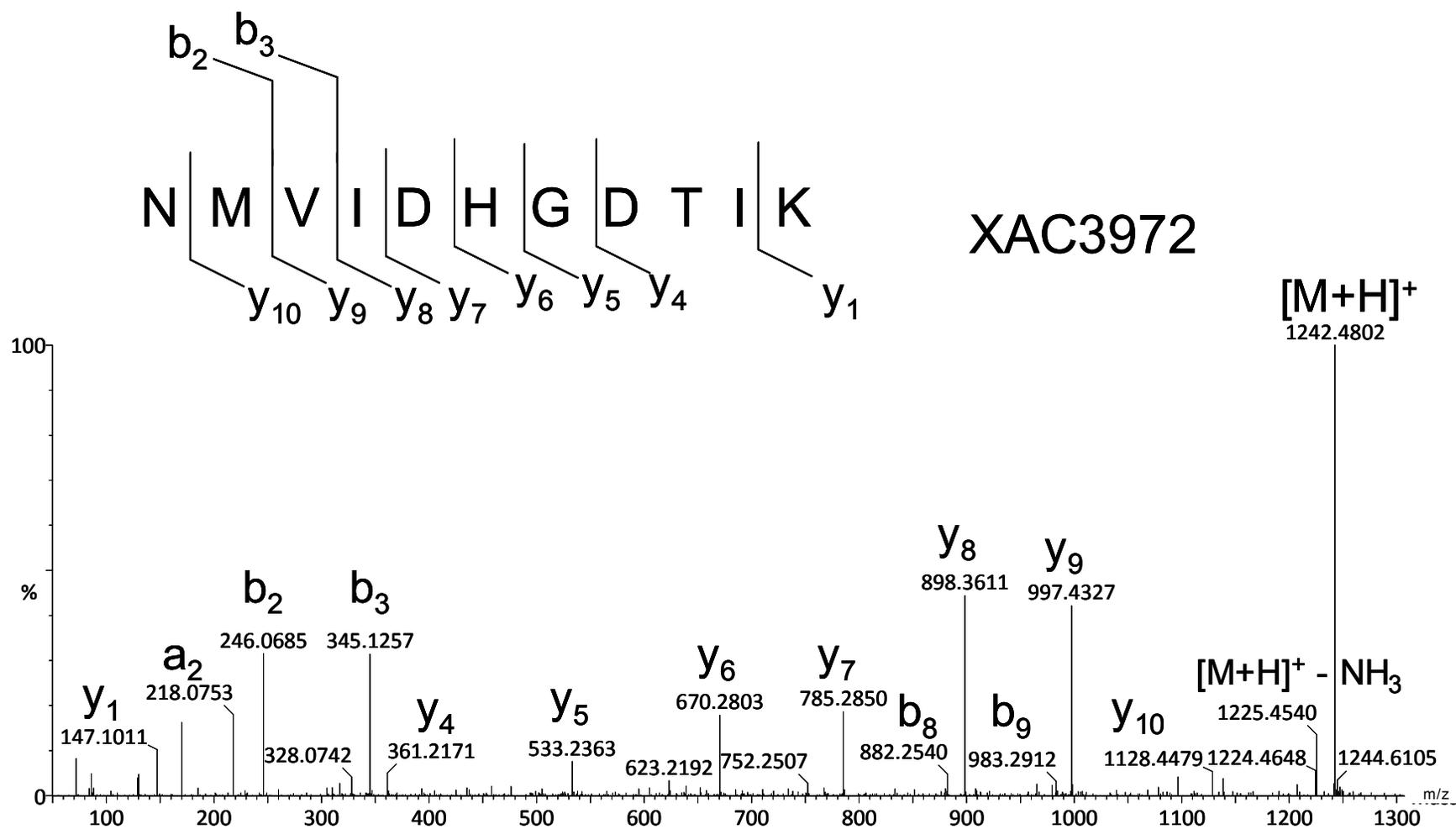


Figura 37: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 621,85, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2525

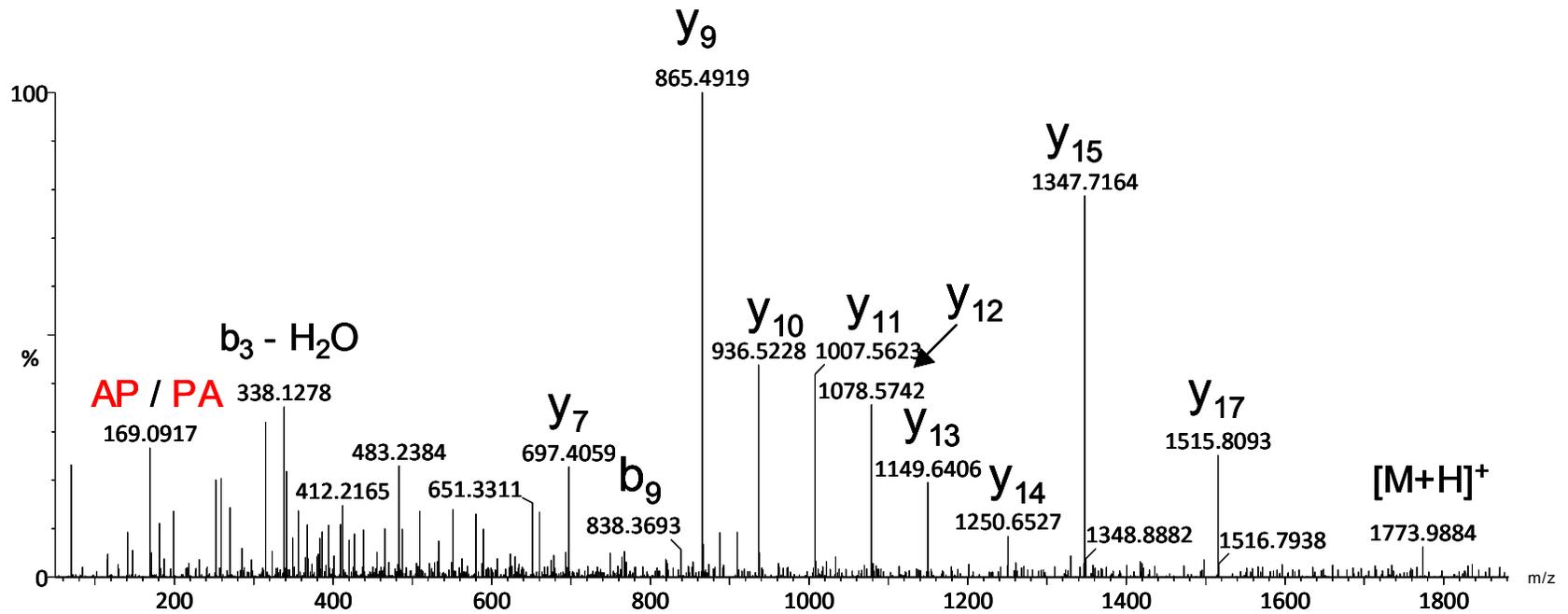
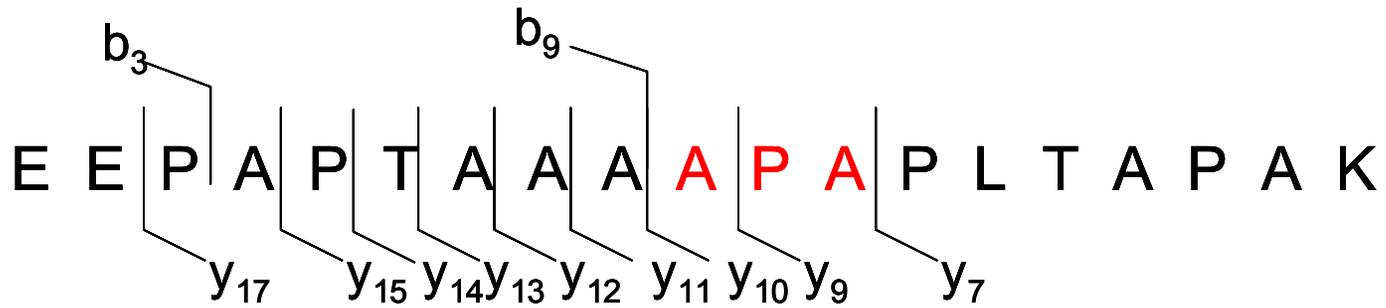


Figura 38: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 817,18, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2525

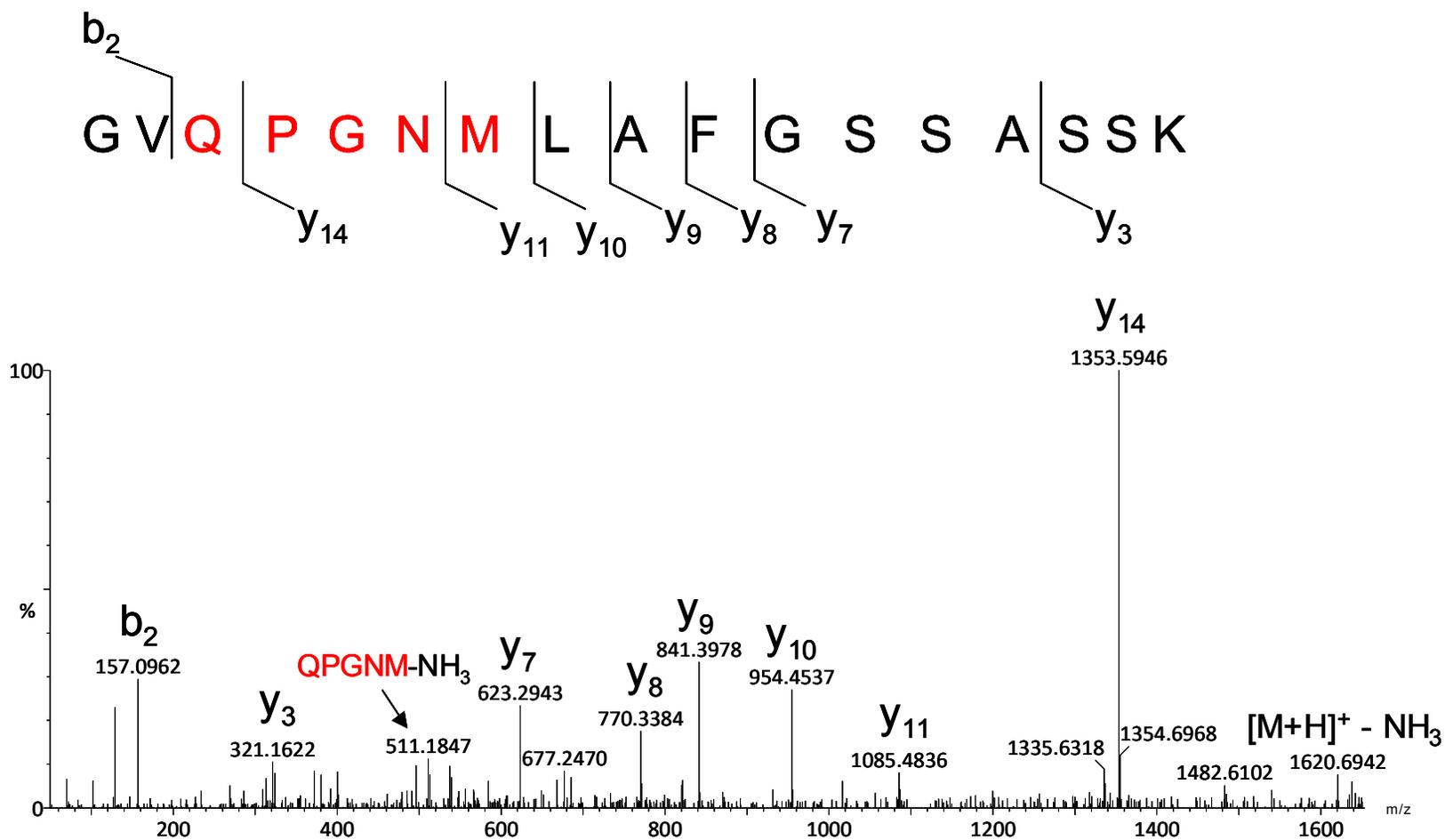


Figura 39: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 819,62, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2525

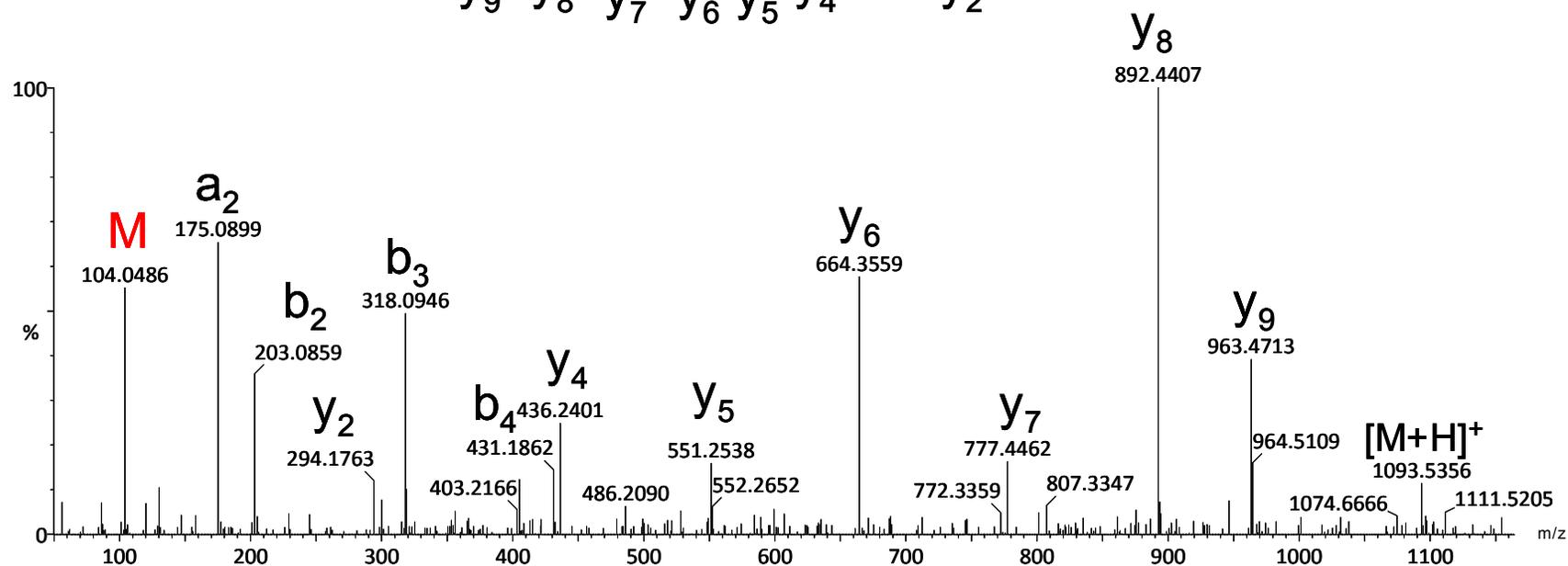
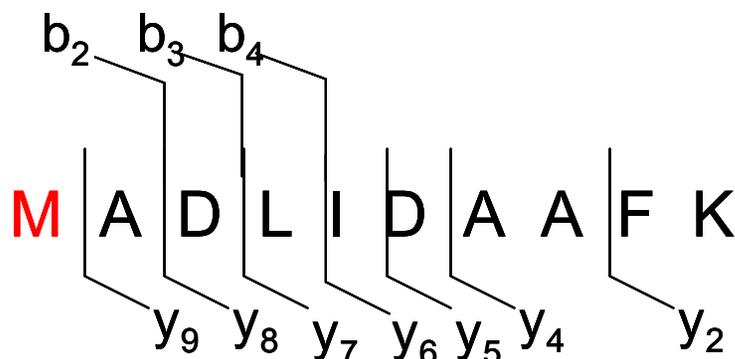


Figura 40: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 547,59, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2525

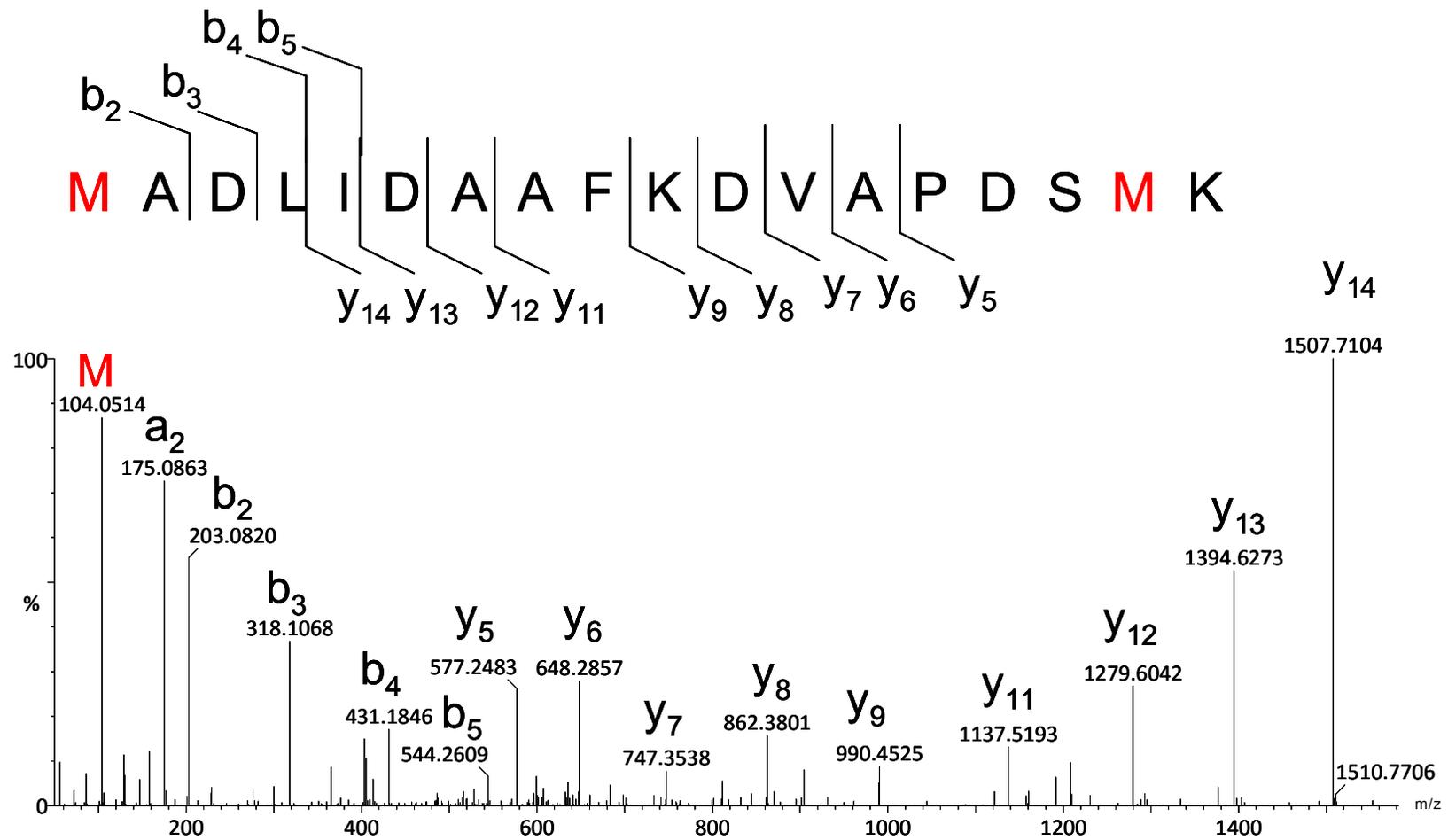


Figura 41: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 969,15, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2525

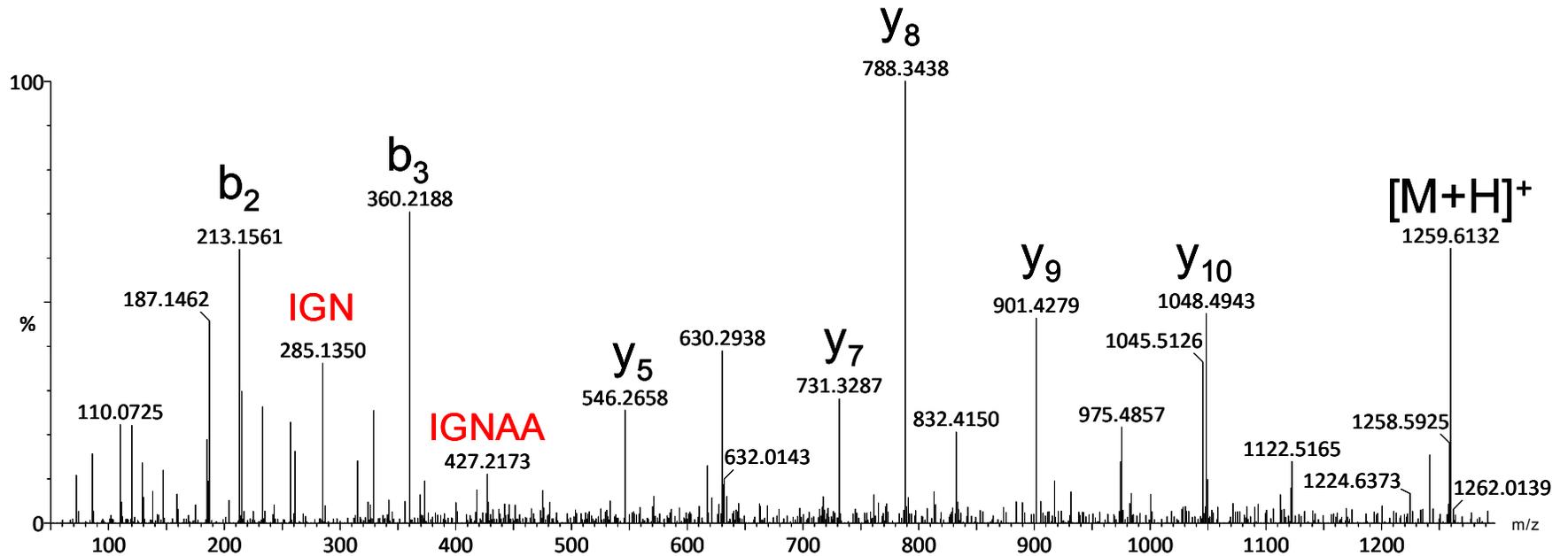
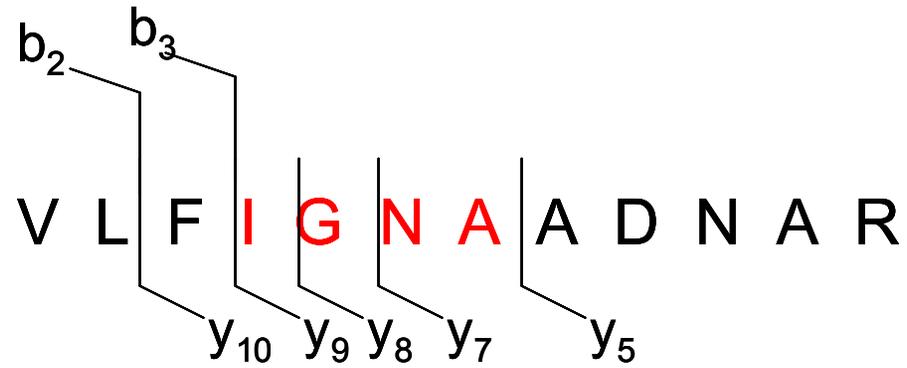


Figura 42: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 630,62, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC0292

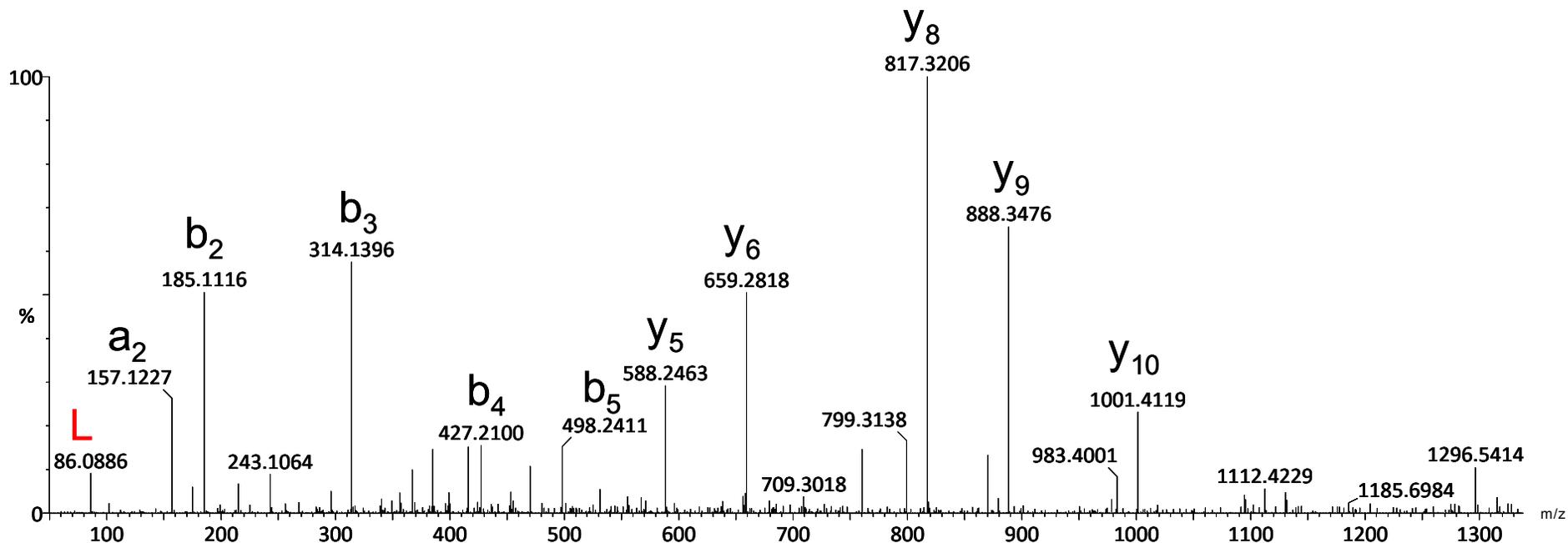
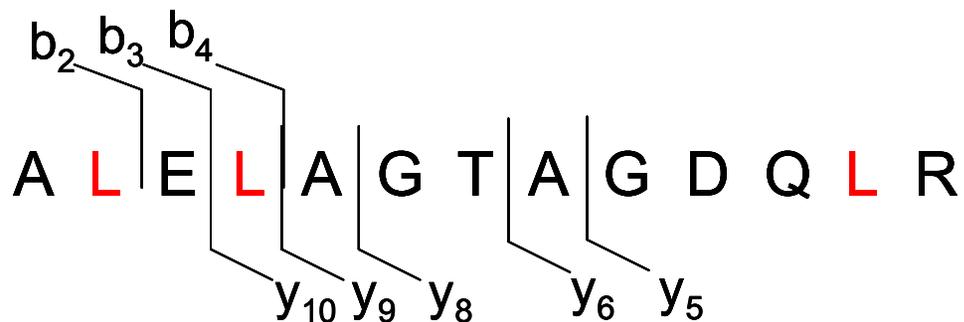


Figura 43: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 657,86, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC0292

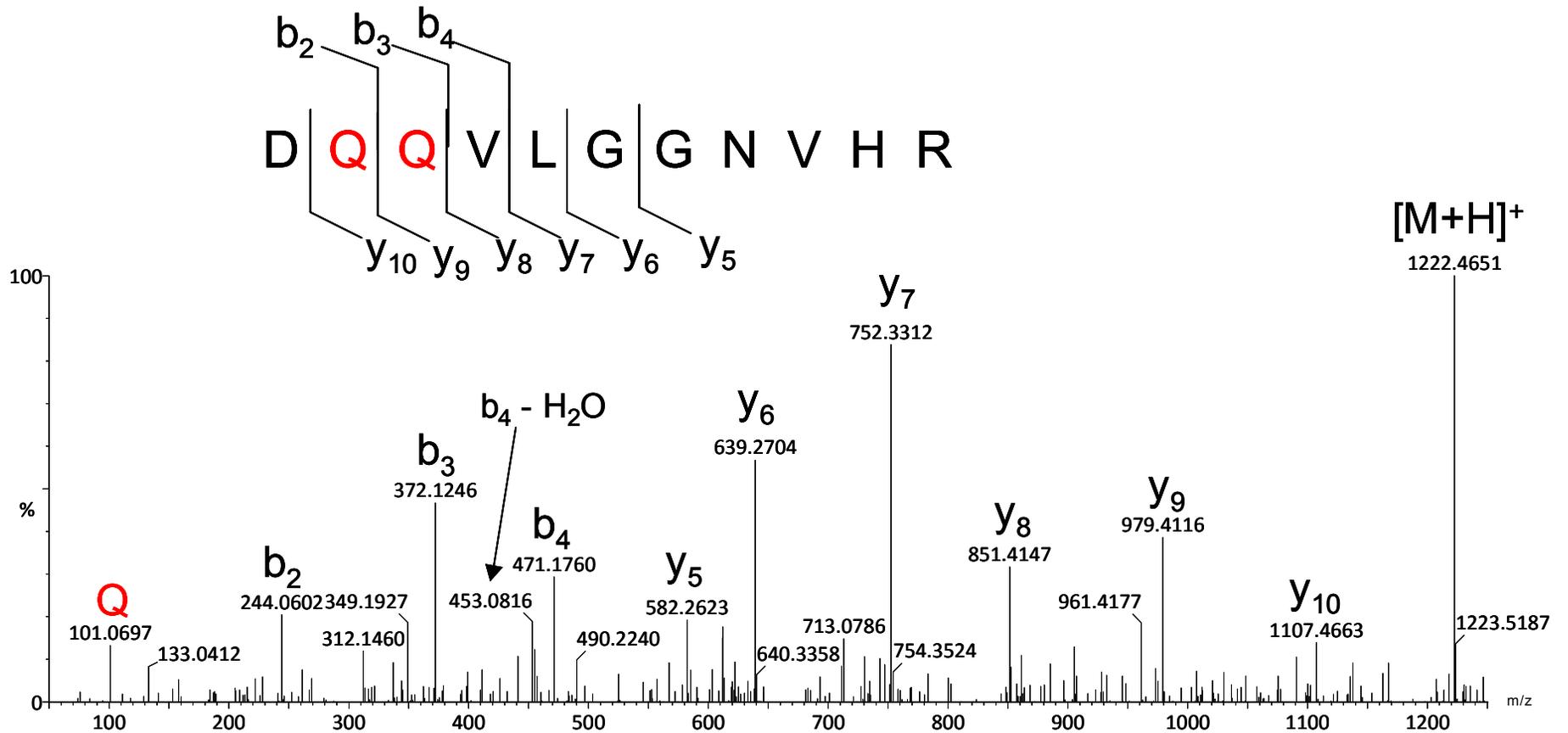


Figura 44: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 611,82, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC4007

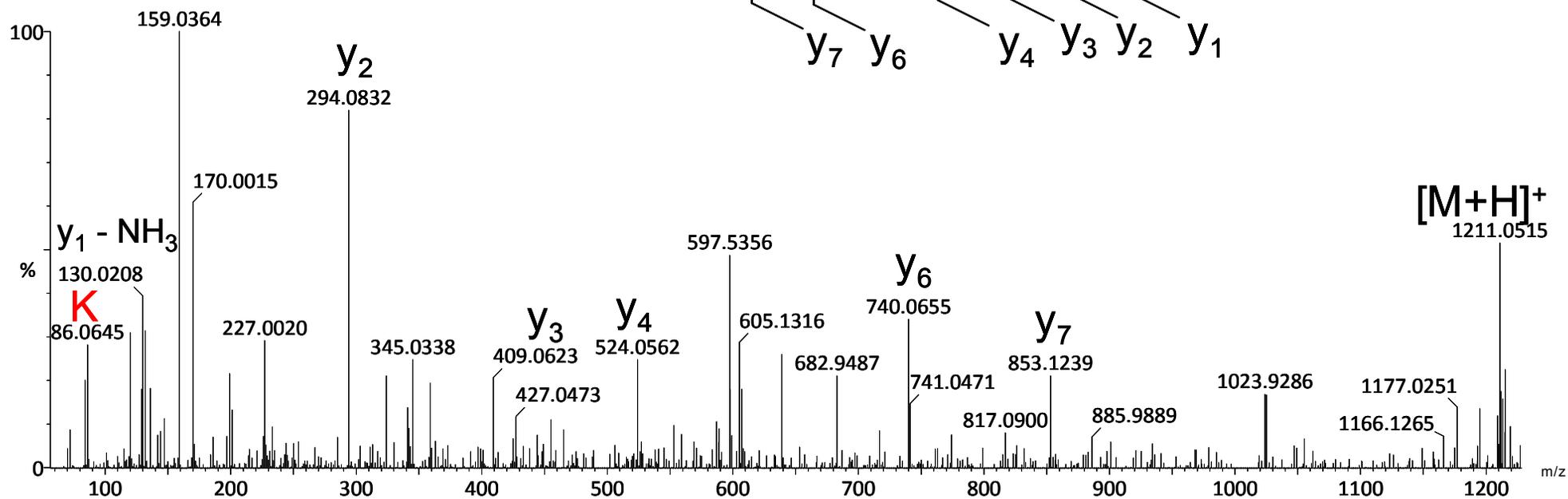
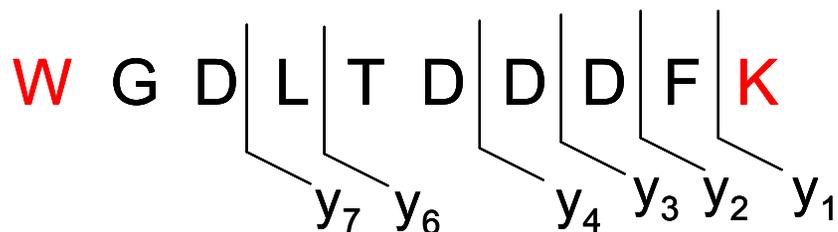


Figura 45: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 606,04, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC4007

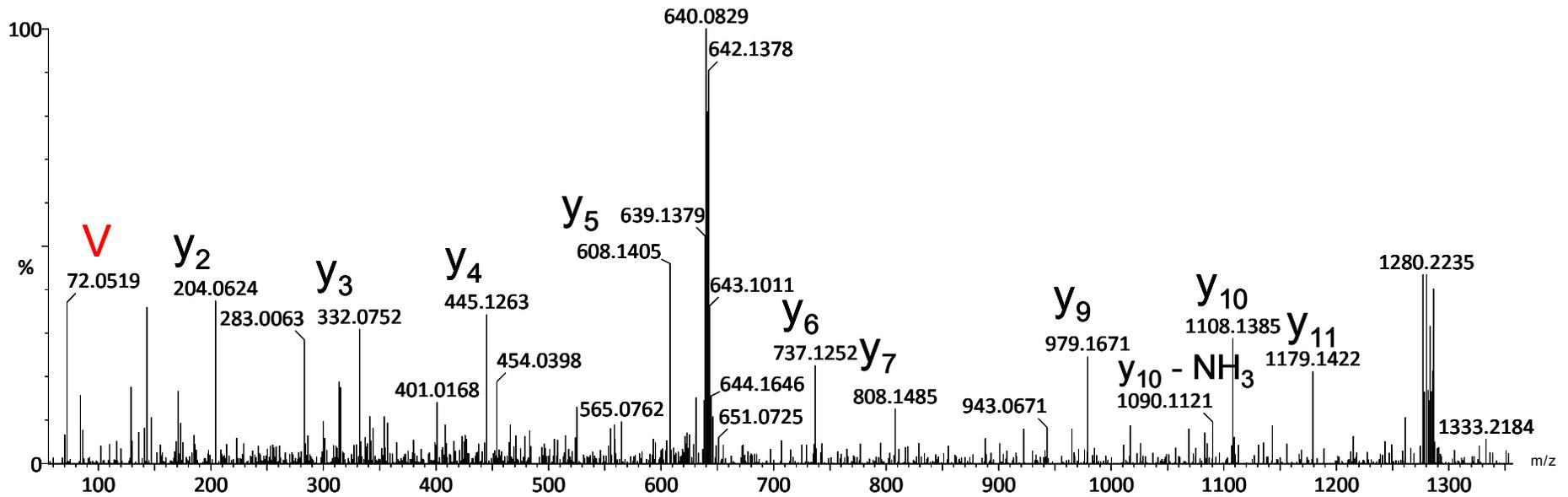
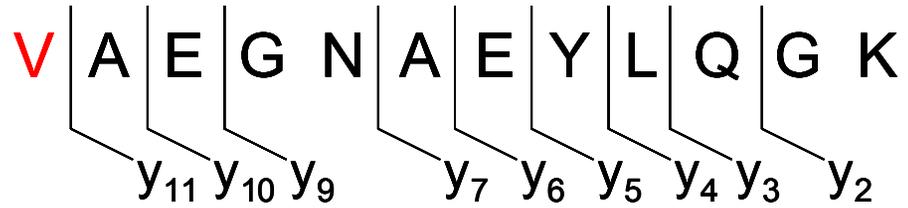


Figura 46: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 639,59, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC3981

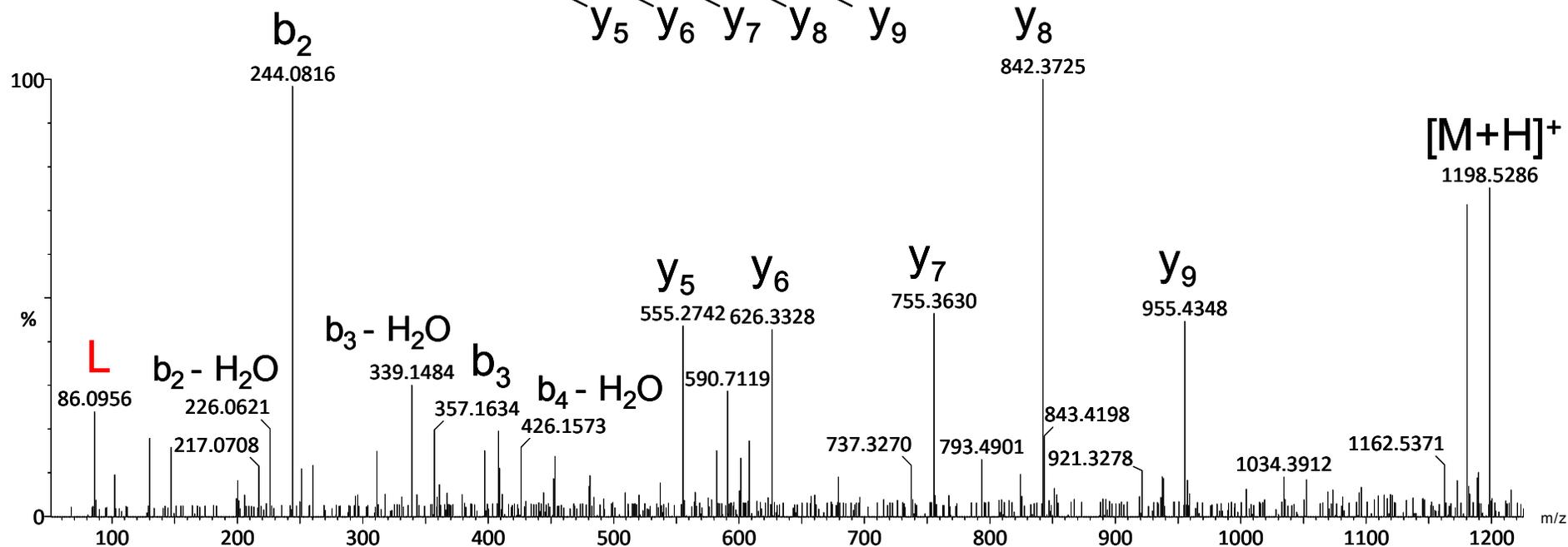
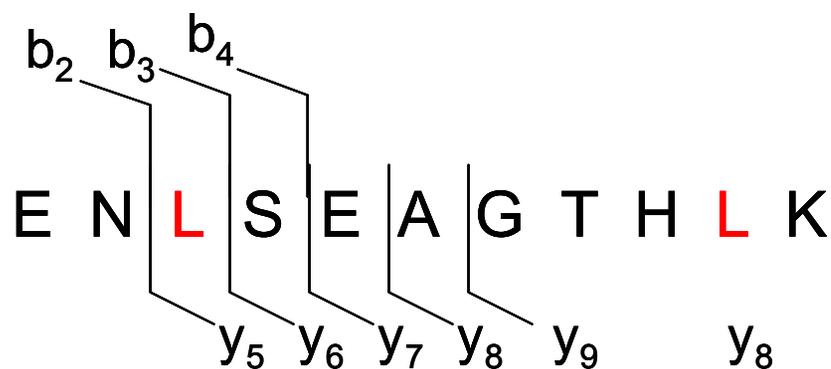


Figura 47: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 599,81, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC3981

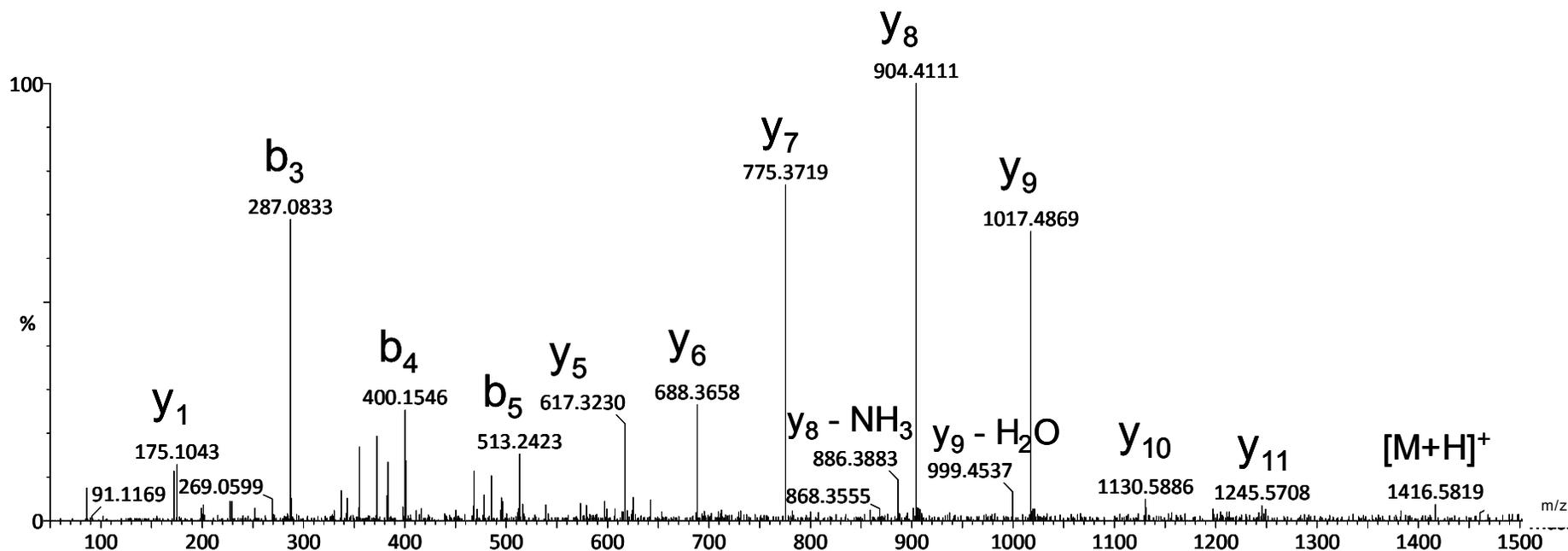
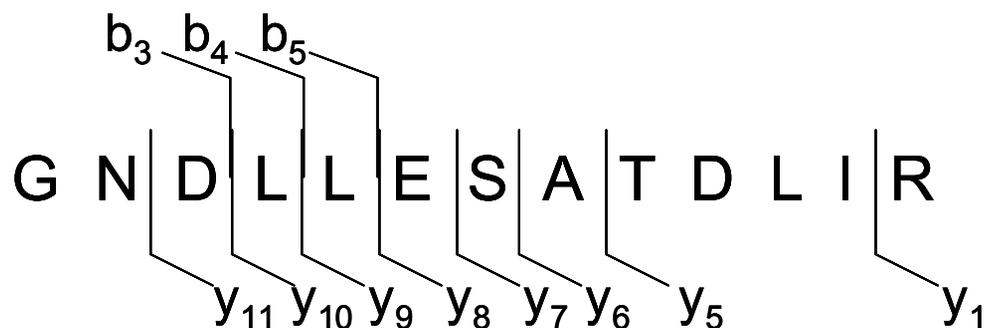


Figura 48: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 708,88, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC0682

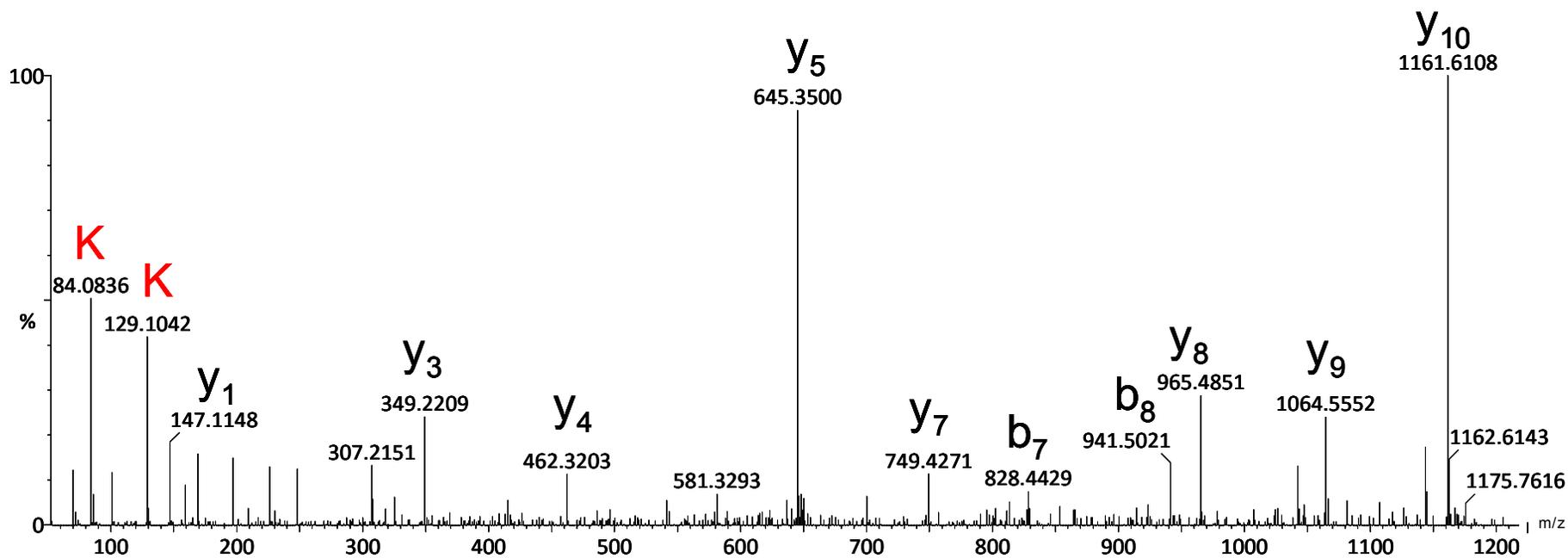
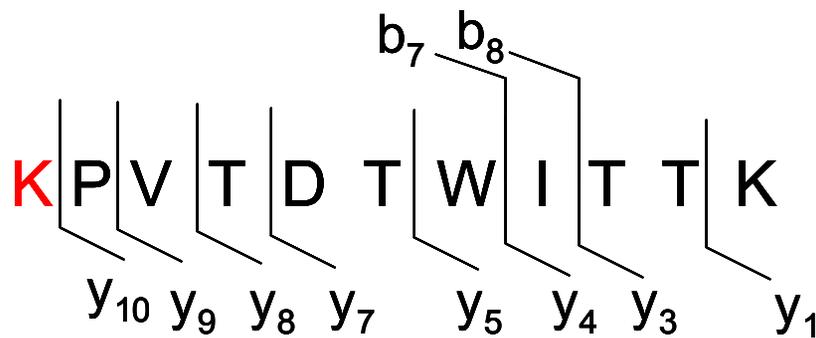


Figura 49: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 645,36, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC0682

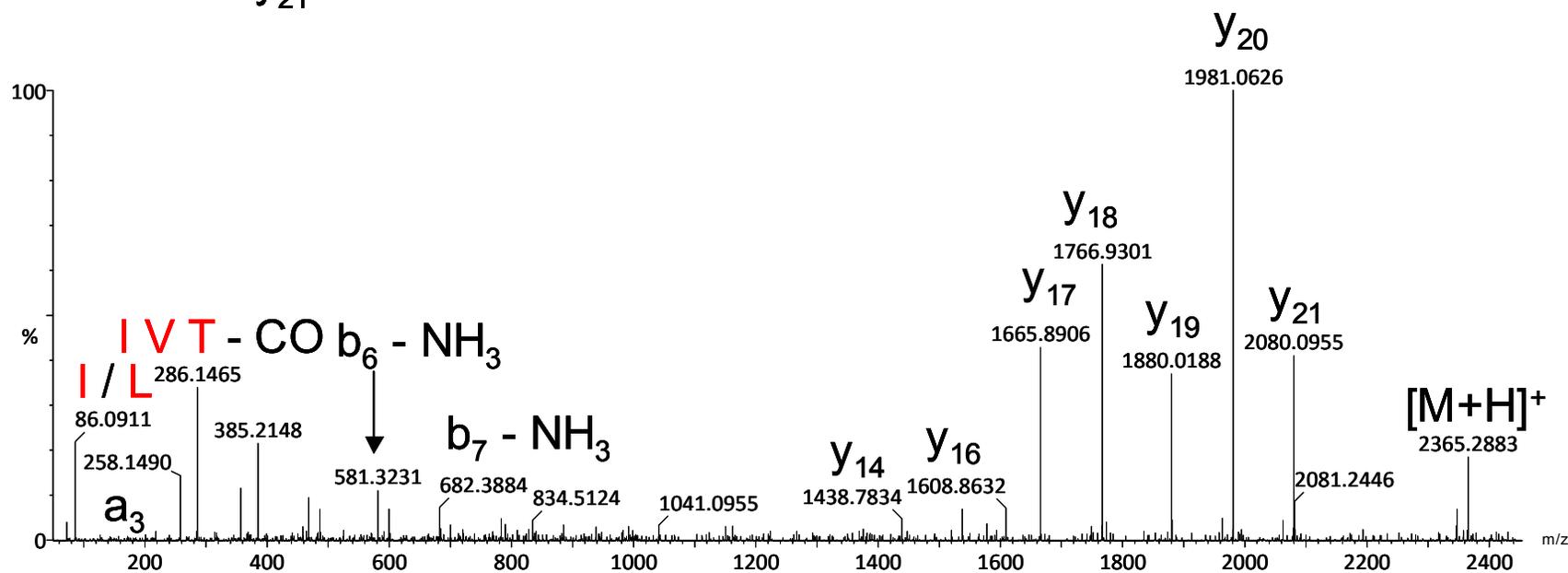
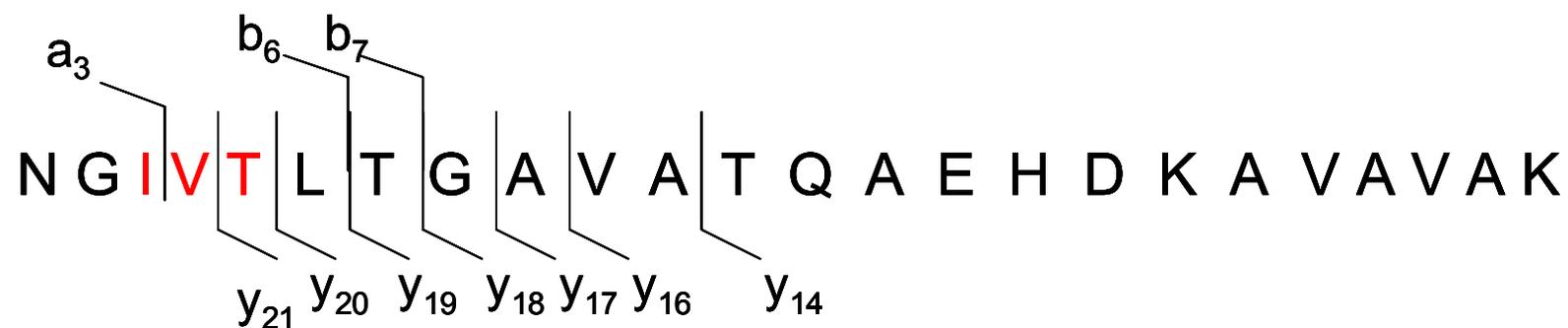


Figura 50: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 788,78, carga 3+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC3725

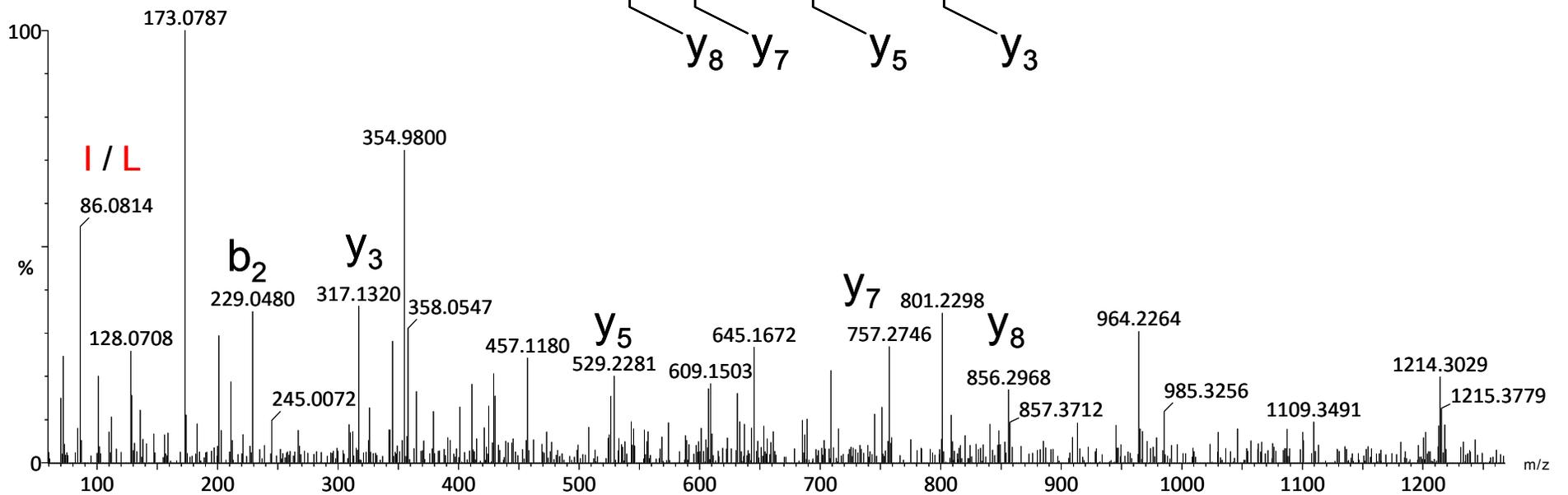
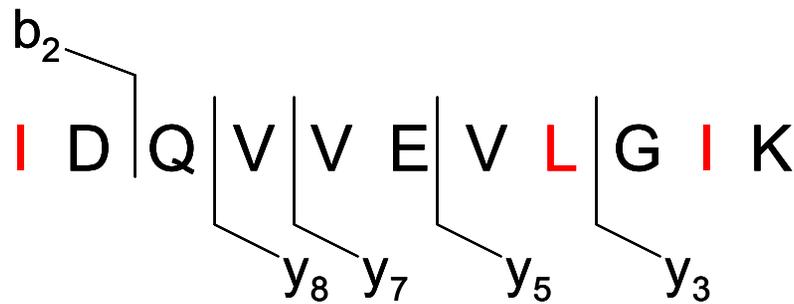


Figura 51: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 607,18, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC3725

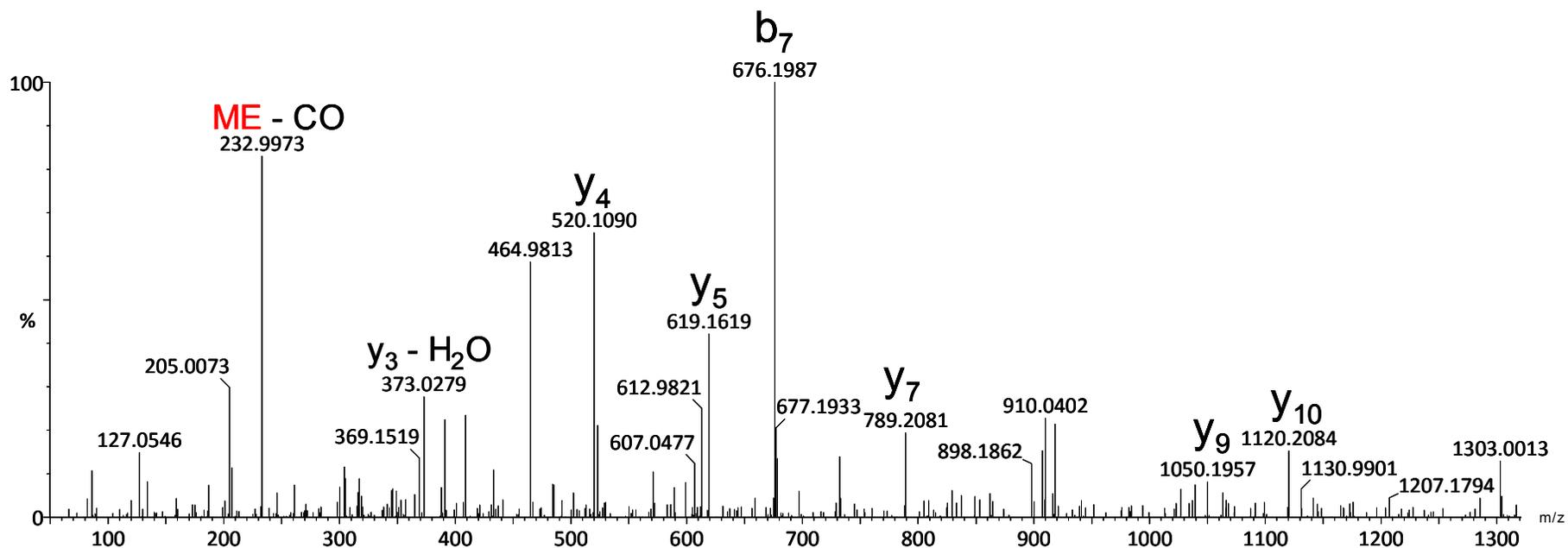
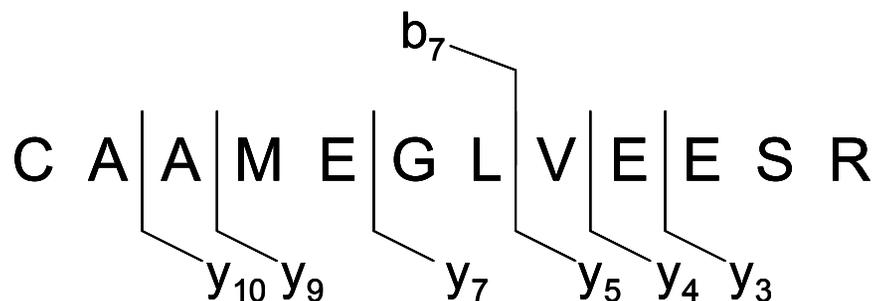


Figura 52: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 676,60, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC3725

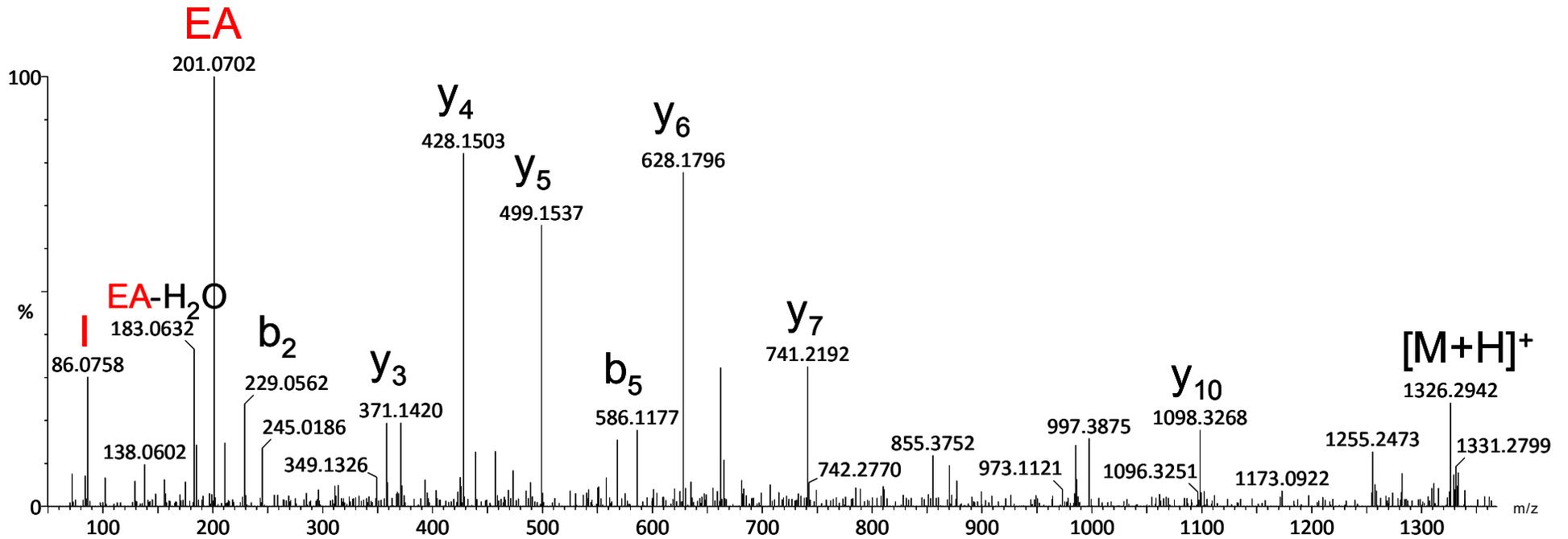
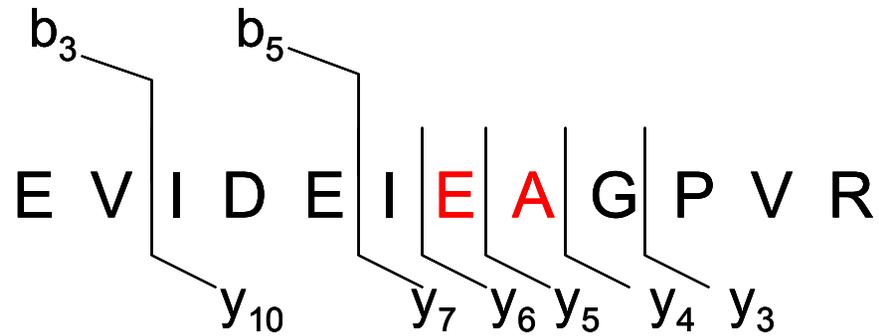


Figura 53: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 663,66, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1761

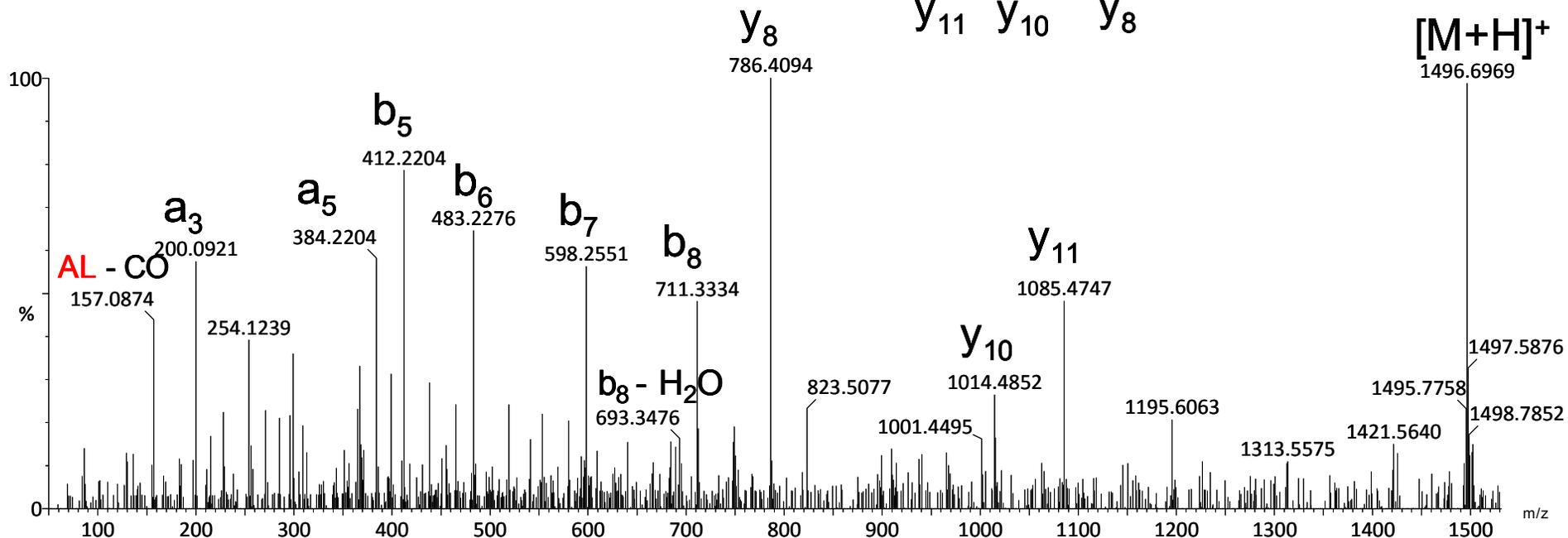
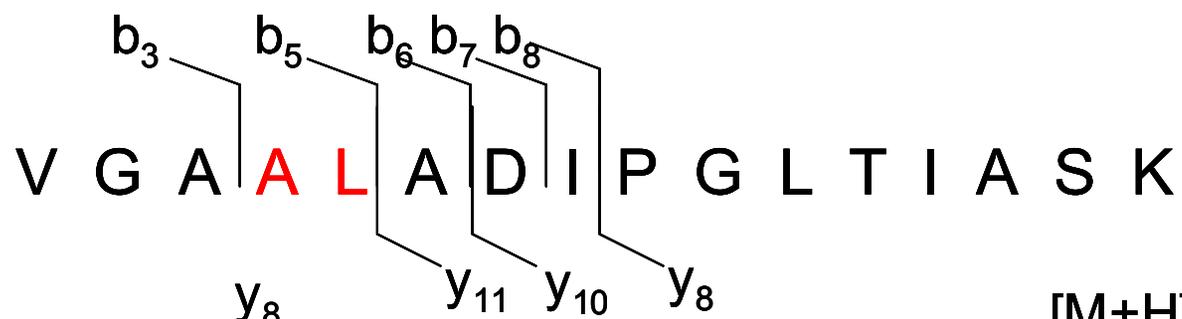


Figura 54: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 748,93, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1761

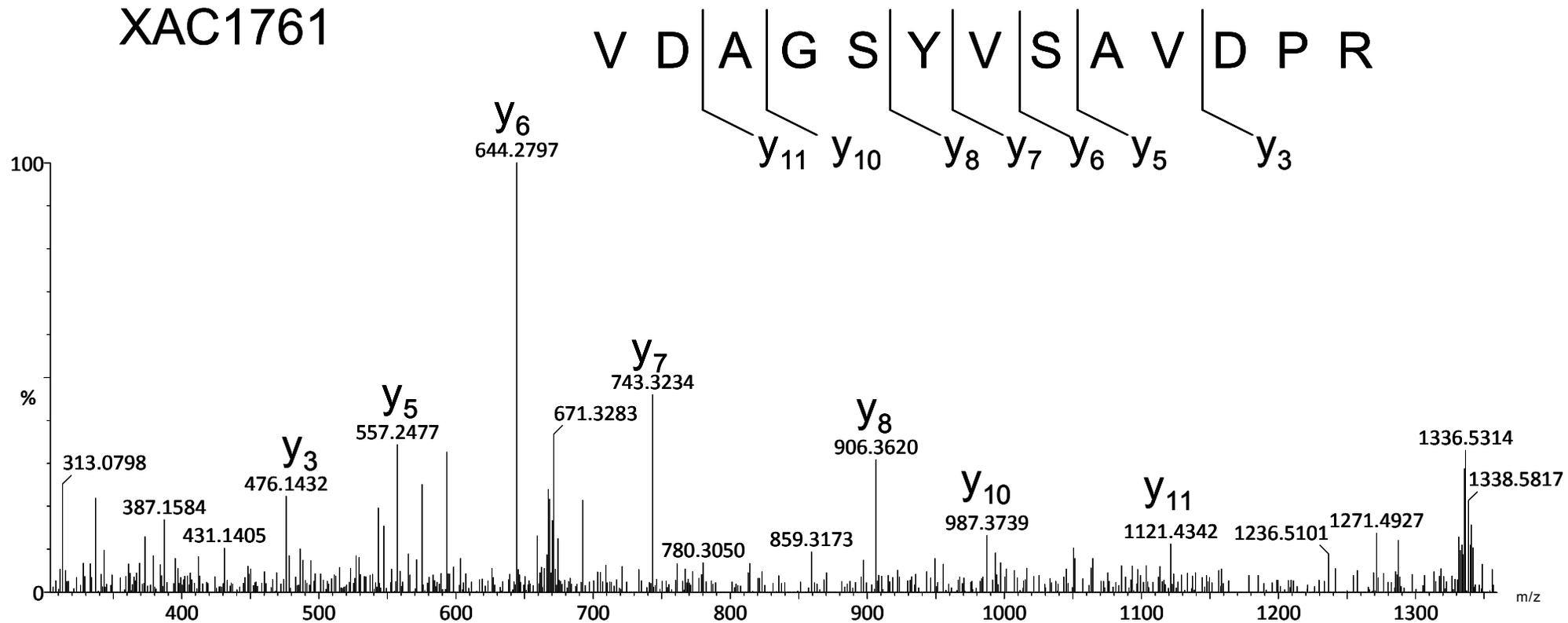


Figura 55: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 668,32, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1761

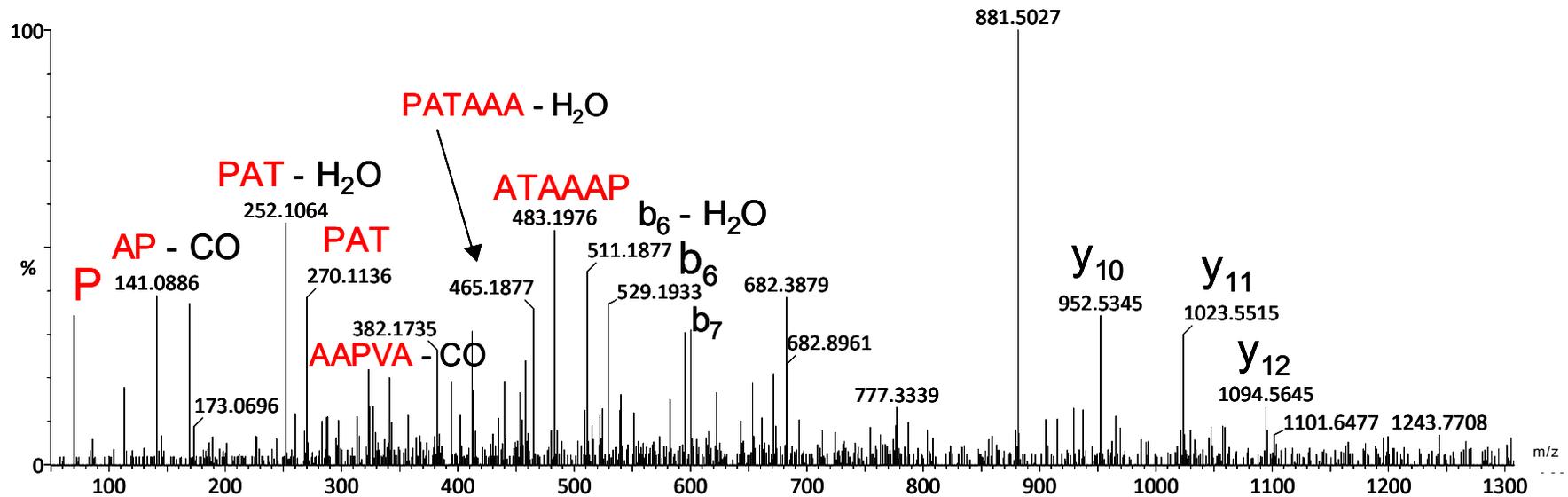
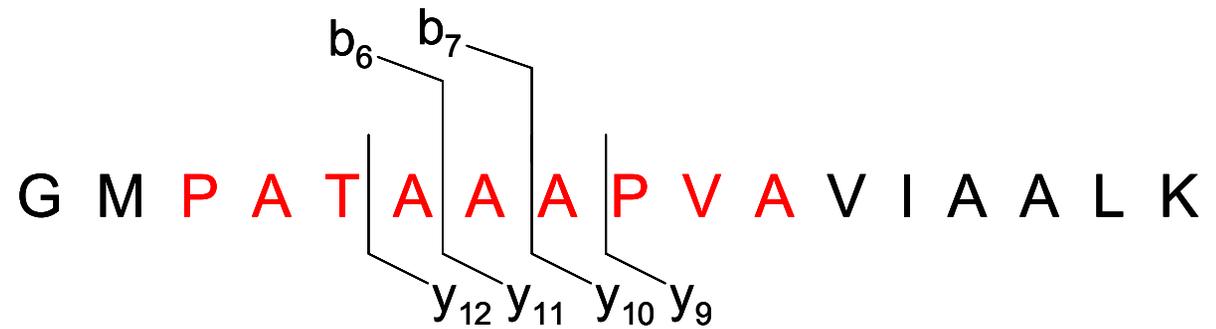


Figura 56: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 776,44, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC1476

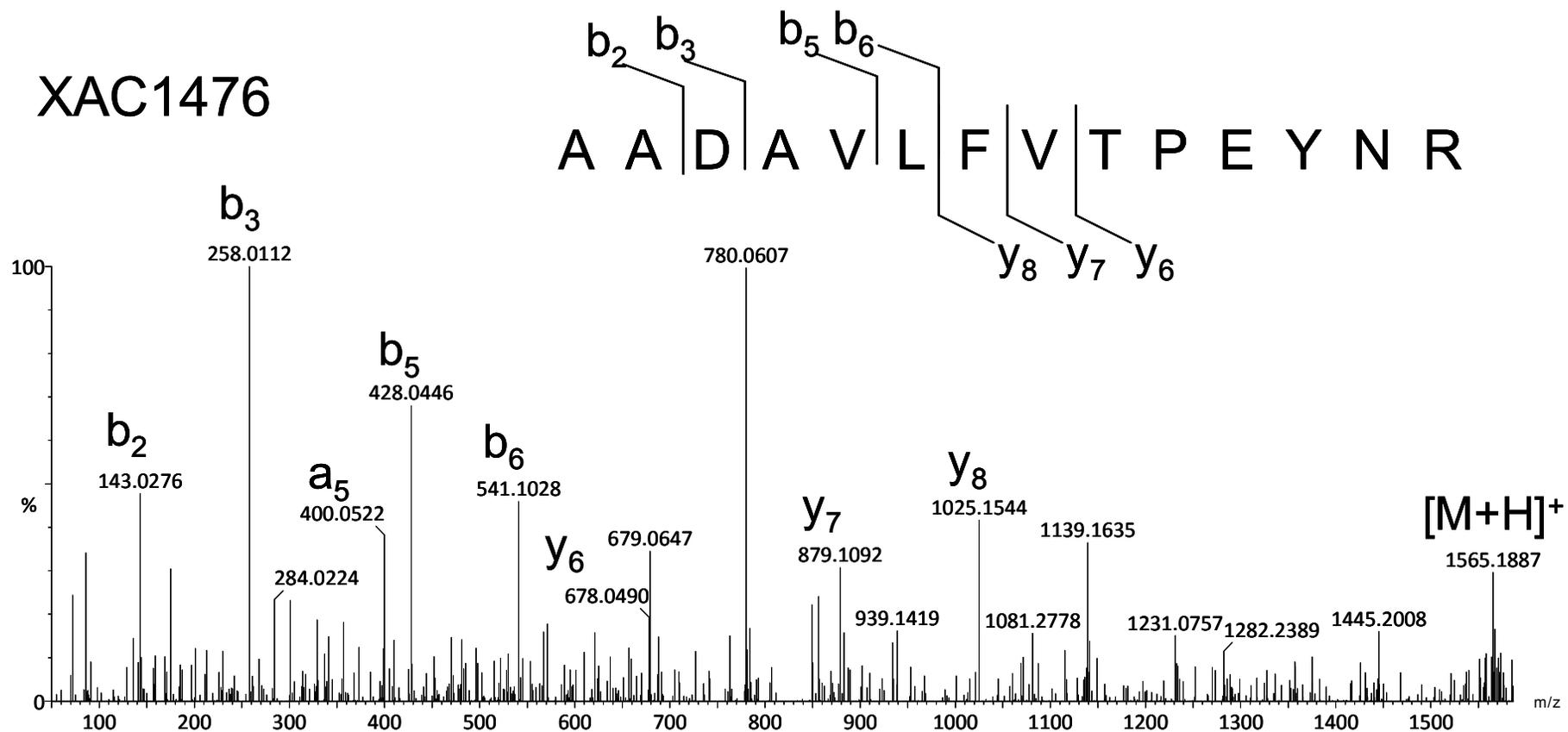


Figura 57: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 783,09, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

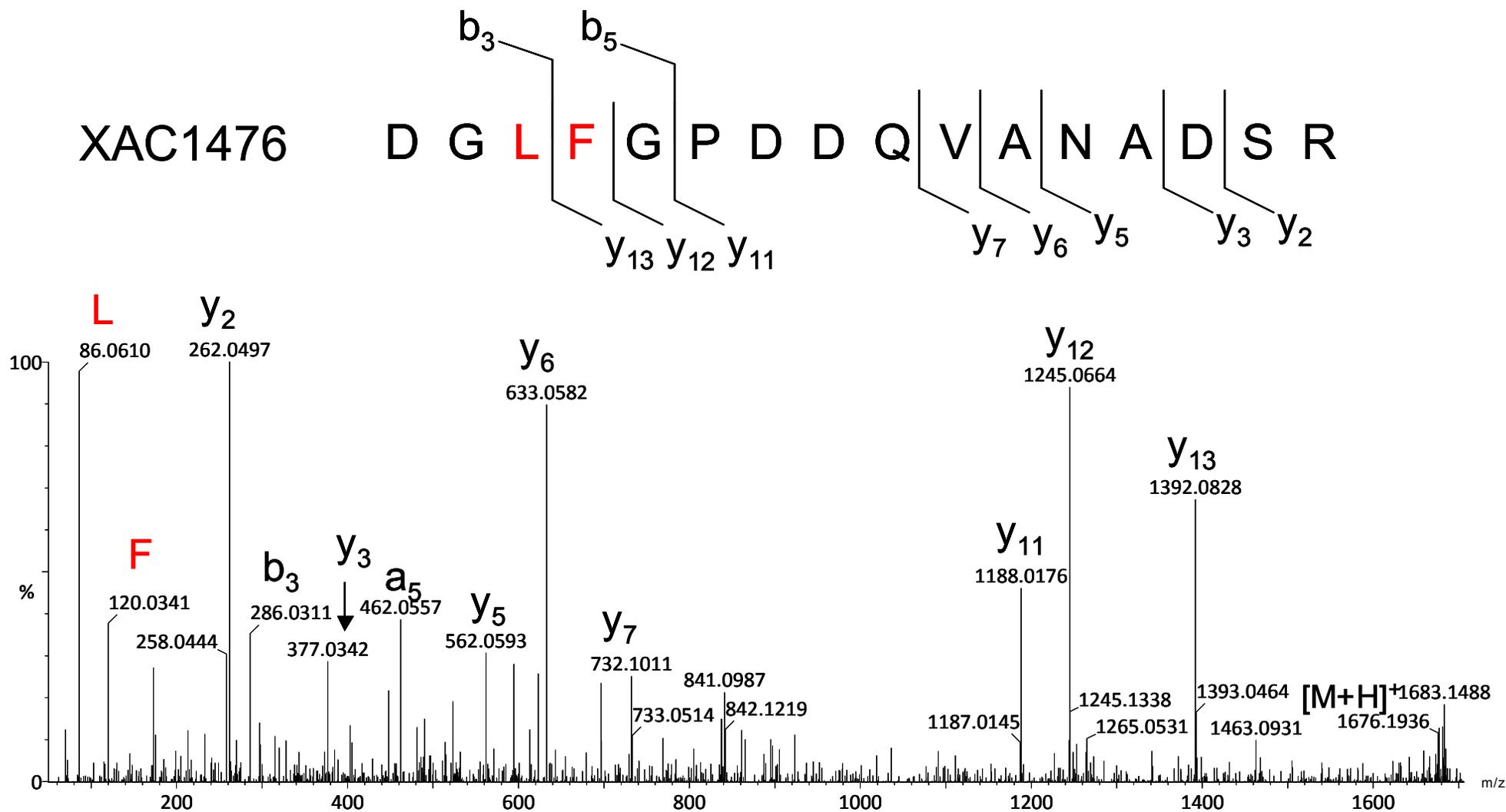


Figura 58: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 839,04, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC0587

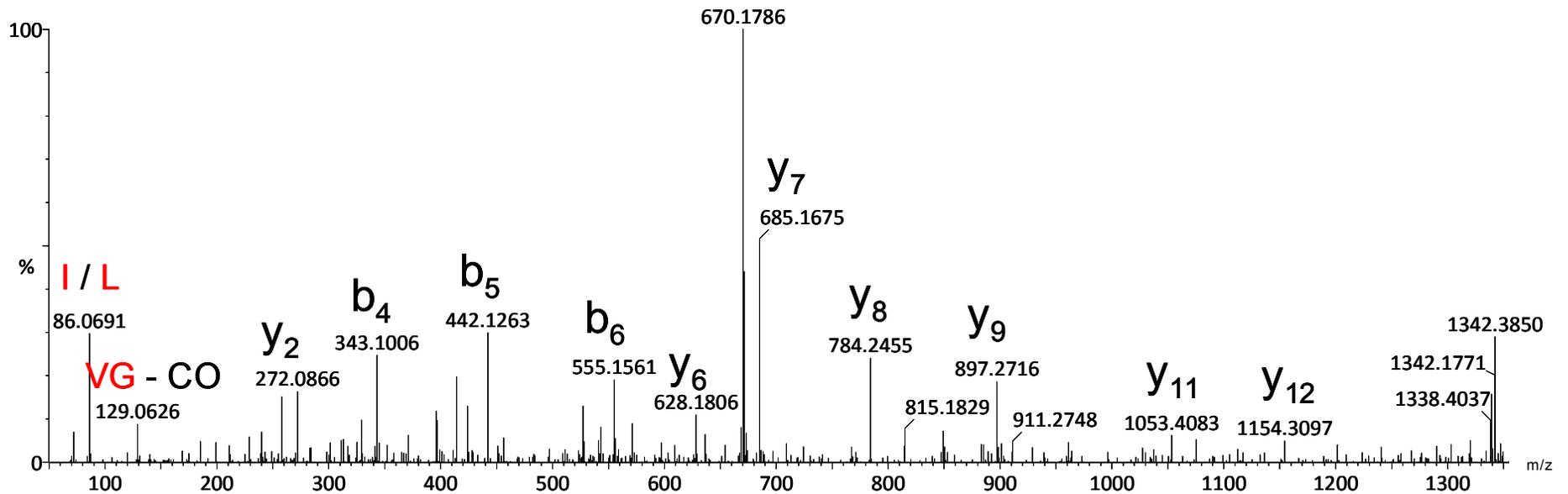
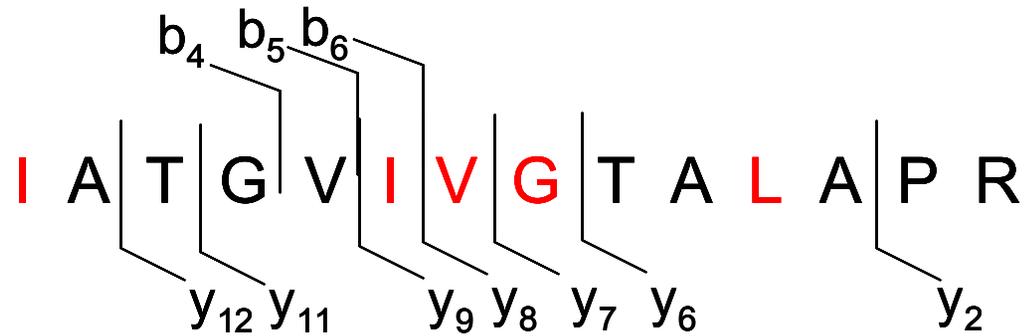


Figura 59: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 669,68, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2319

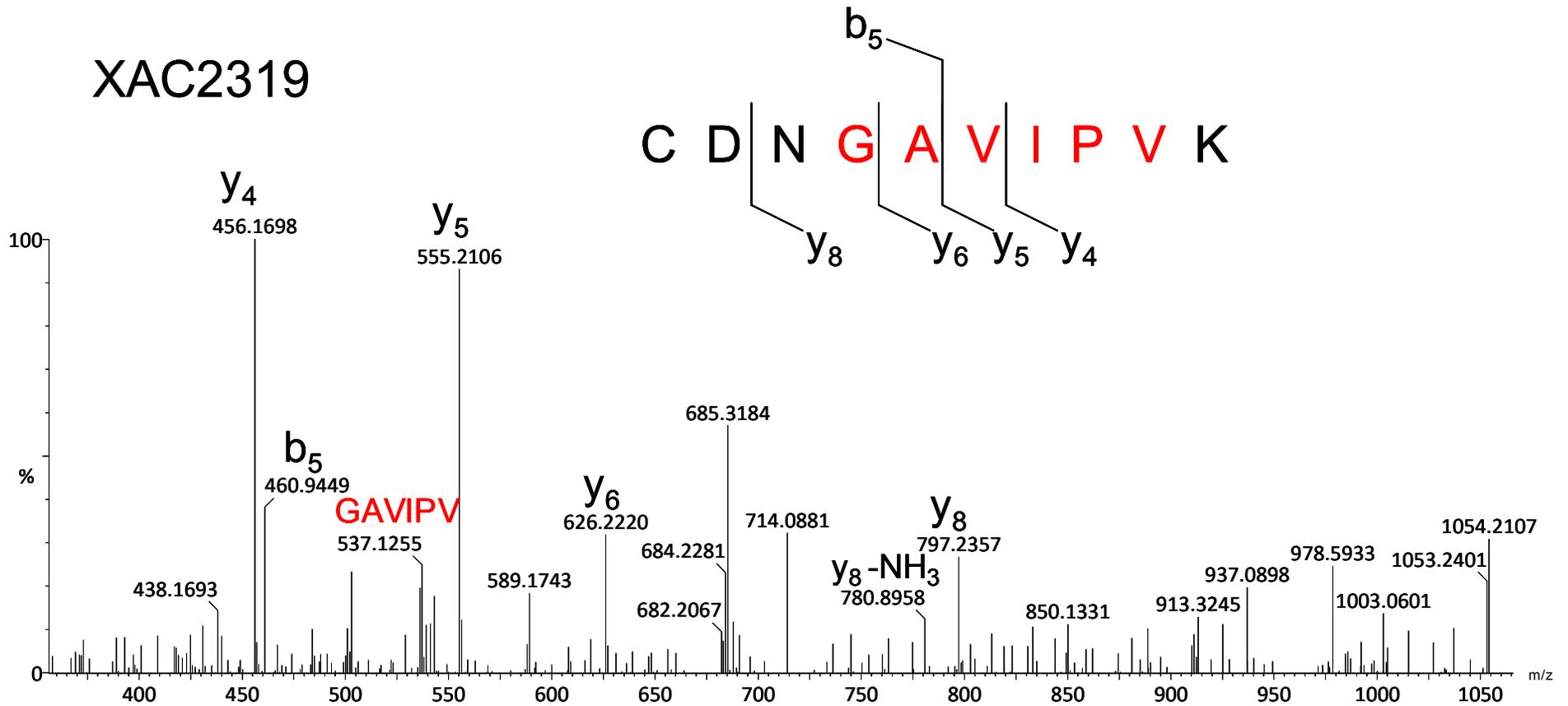


Figura 60: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 537,09, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

XAC2319

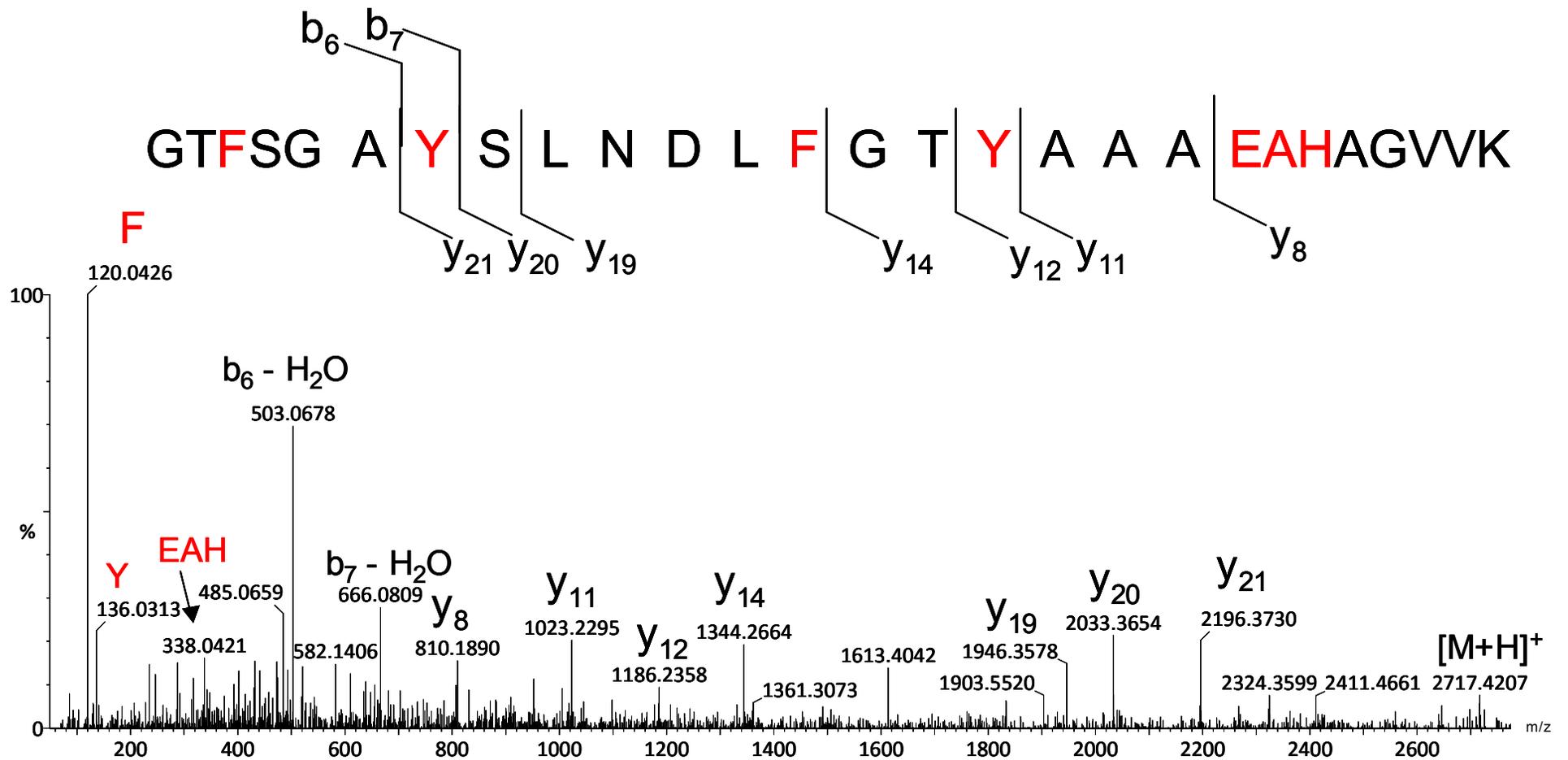


Figura 61: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 906,16, carga 3+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

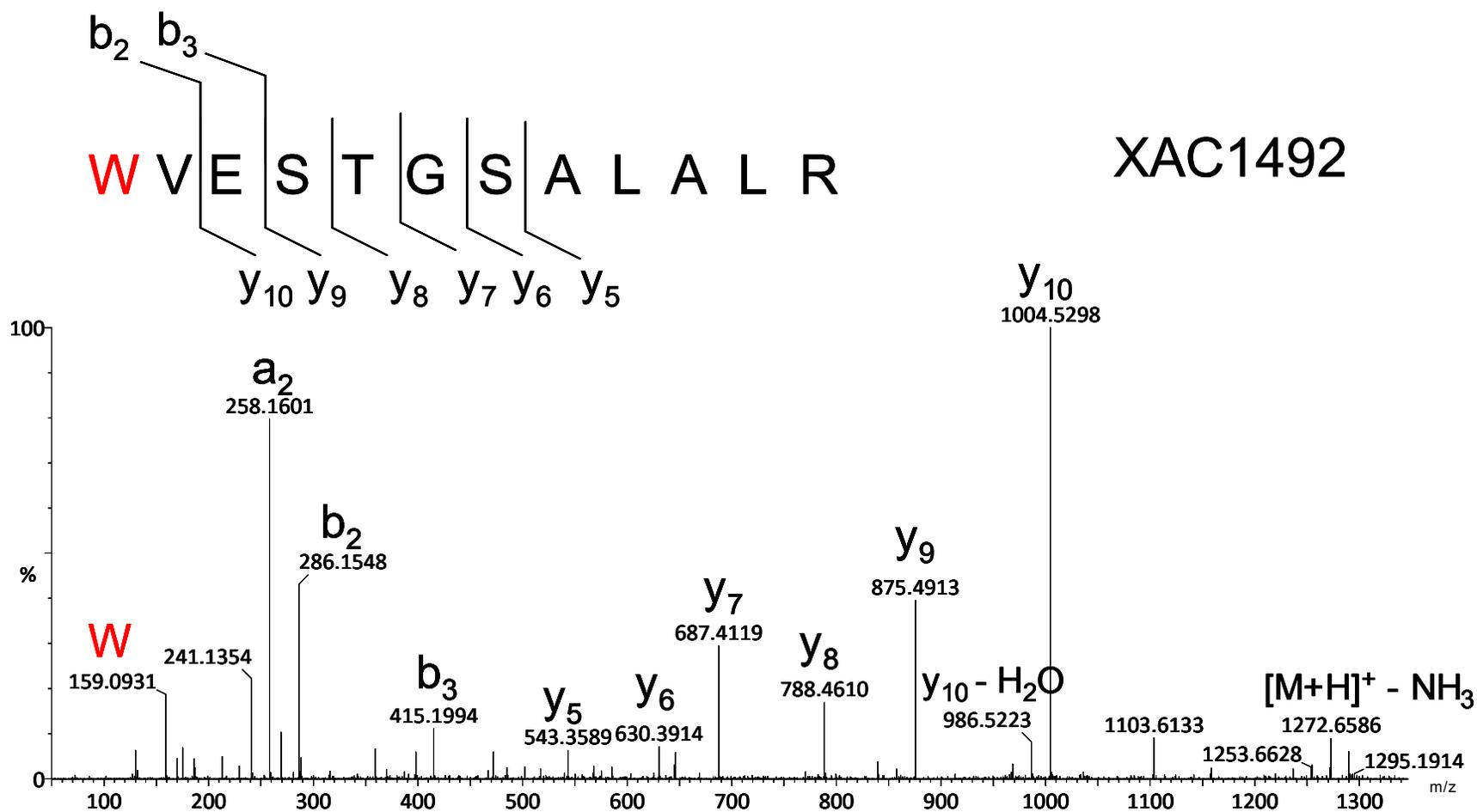


Figura 62: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 645,10, carga 2+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).

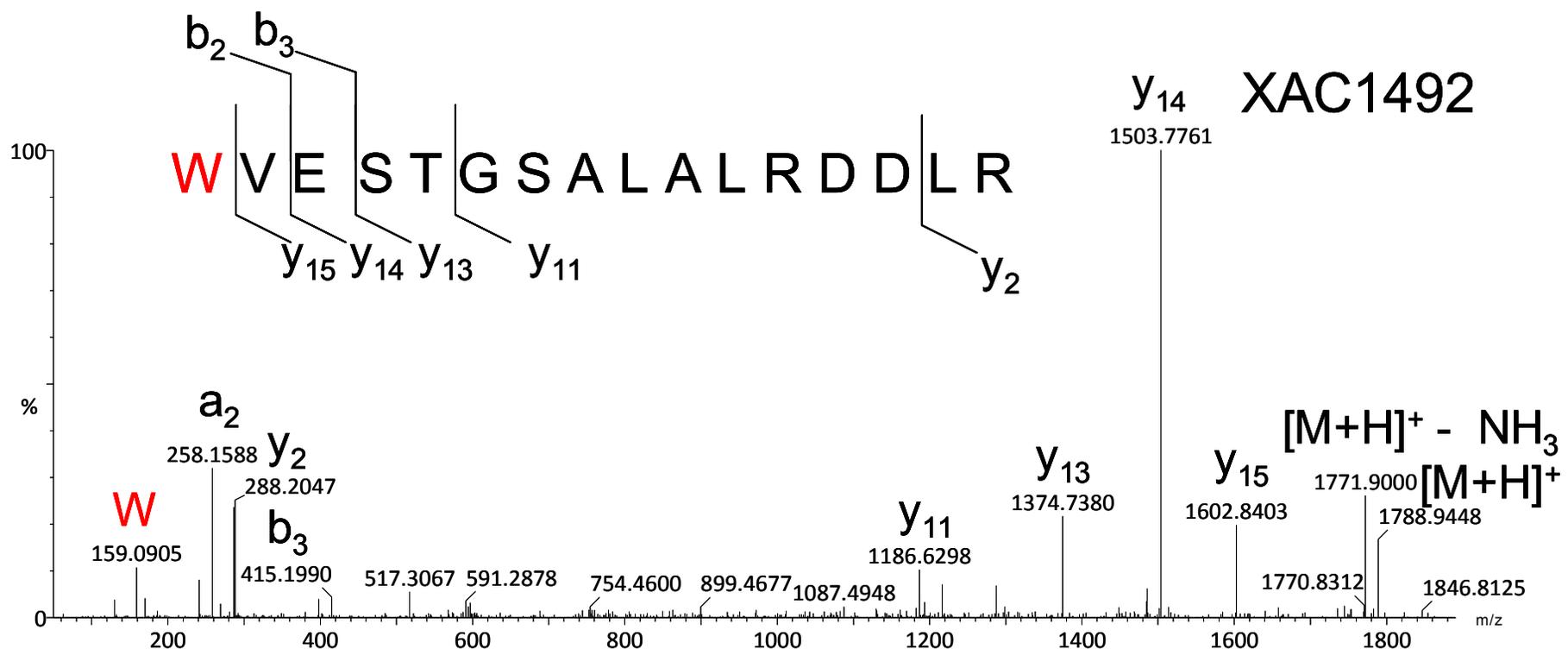


Figura 63: MS/MS obtido a partir da fragmentação do peptídeo do sinal m/z 596,98, carga 3+, e a respectiva atribuição dos sinais à sequência de aminoácidos (MASCOT).