

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EXPRESSÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* EM
E. coli, VISANDO ANÁLISE ESTRUTURAL POR
CRISTALOGRAFIA.

Julio Cesar Bortolossi
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

EXPRESSÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* EM
E. coli, VISANDO ANÁLISE ESTRUTURAL POR
CRISTALOGRAFIA.

Julio Cesar Bortolossi

Orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês Tirabosch Ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2007

*Pai nosso que estais no Céu,
santificado seja o Vosso Nome,
venha a nós o Vosso reino,
seja feita a Vossa vontade,
assim na terra como no Céu.*

*O pão nosso de cada dia nos dai hoje;
perdoai-nos as nossas ofensas,
assim como nós perdamos a quem nos tem ofendido,
e não nos deixeis cair em tentação,
mas livrai-nos do mal.*

Amém.

Jesus Cristo

Agradeço primeiramente a DEUS, por tudo que Ele proporcionou na minha vida, pela maneira paciente que me atende nas minhas orações, pelo socorro nas horas de aflições, por fim, só poderia terminar dizendo a Ele, que o amo mais do que qualquer coisa, matéria, ou pessoa que existe; muito obrigado!!!!!!!!!!!!

Agradeço aos meus pais, José Luiz Bortolossi e Sereni A. J. Bortolossi, que mais do que todos sempre acreditaram no meu potencial e nunca deixaram que as barreiras da vida me desanimassem. Pra mim, vocês são o terreno, o alicerce, as estacas, toda parede, design e acabamento do que eu sou hoje como pessoa, amo vocês.

Aos meus irmãos Gustavo e Fabio, sempre com uma palavra amiga nas horas certas, vocês são o meu maior vínculo com o meu passado, presente e futuro, amo vocês.

A toda minha família, tios, primas e primos, avós e avôs, amo vocês.

A minha cunhada Daniela, e aos amores da minha vida meus sobrinhos Luis Gustavo e Maria Eduarda, vocês me tranquilizam nos momentos mais difíceis que passo.

E a minha tia Roseli, por me dar a oportunidade de iniciar na ciência, muito obrigado.

Dedico a todos os cientistas que no decorrer da vida contribuíram para ciência se desenvolver até atingir os conhecimentos de hoje.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, força e tudo que consegui alcançar até aqui.

Ao Prof. Dr Julio Cezar Franco de Oliveira, pela orientação, ensinamentos, dedicação e amizade durante todo meu mestrado,

Ao Prof. Dr Jesus Aparecido Ferro pela oportunidade concedida de iniciar a minha carreira como pesquisador, além da amizade adquirida nestes 7 anos.

A Prof^a Maria Inês Tirabosch Ferro, sempre com uma palavra amiga.

Ao Prof Dr Luiz Roberto Furlan, pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

A Prof^a Maria Célia Bertolini, da UNESP de Araraquara, por abrir as portas do seu laboratório sempre que precisei, além de todo ensinamento e atenção prestados.

Ao Dr Eduardo Hilário, pelo ensino, dedicação e amizade.

Ao prof. Dr Otavio Henrique Thiemann, USP São Carlos, pela cooperação nos ensaios de cristalografia

Ao prof. Dr Glaucius Oliva, USP São Carlos, pela cooperação nos ensaios de cristalografia.

A Nathalia Campos, por me ensinar como proceder com os ensaios de cristalização.

Ao estudante de iniciação científica Cristiano Barbalho (vulgo Chupado) pela grande ajuda no desenvolvimento do meu projeto.

A todos os amigos do laboratório, Daniele, Juliana de Antonio, Juliana Vantini, Agda, Flávia, Renata, Vanessa, Mariana, Gisele, Thais, Karina, Paula, Tiago (meu amigo de festa), Gustavo, André, Marcelo, Fabrício, Rafael (Cabeça), Rafael Marine, Nilson.

A todos meus amigos da pós-graduação, Franco, Denílson, Marcelo e Dani.

Aos docentes e funcionários do departamento de Tecnologia da Unesp/FCAV – Jaboticabal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao CNPQ, por ceder a minha bolsa durante o período de mestrado e à FAPESP pelos recursos proporcionados dentro do Auxílio Jovem Pesquisador nº 04/02006-7.

E não poderia deixar de agradecer ao Time do SÃO PAULO (Tricolor do Morumbi), que me deu muitas alegrias nesses anos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
Índice de Figuras	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1 – Introdução.	1
2 Revisão de literatura.....	3
2.1 - Citricultura e Cancro Cítrico.	3
2.2 - Aspectos moleculares de interações planta-patógeno	5
2.3 - Genômica funcional do cancro cítrico.	5
2.4 – Mutantes de <i>Xac</i> com patogenicidade alterada.	7
2.5 – Análise cristalográfica.....	9
3 - Objetivos.....	11
4 - Materiais e métodos	12
4.1 Manutenção e Cultivo de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri (<i>Xac</i>) e dos mutantes de <i>Xac</i>	12
4.2 Obtenção e Inoculação dos Mutantes.....	12
4.3 Caracterização molecular dos mutantes.	13
4.4 Curvas de crescimento <i>in planta</i>	13
4.5 Isolamento e Clonagem dos Genes em vetor de expressão.	15
4.6 Clonagem e Transformação bacteriana.....	15
4.7 Mini-preparação de DNA plasmidial.....	18
4.8 Reações de sequenciamento.....	19
4.9 Transformação em célula competente para indução de proteína recombinante.	20
4.10 Mini indução das Proteínas.	20
4.11 Ensaio de Expressão e Solubilidade das Proteínas.	21
4.12 Expressão e Purificação de Proteína Recombinante.	21
4.13 Ensaio de Cristalização Gene PHA sintase PhaE.	22
5 Resultados.	24
5.1 Fenótipo dos Mutante.	24

5.2 Caracterização molecular dos mutantes.....	27
5.3 Curvas de crescimento <i>in planta</i>	29
5.4 Produção das proteínas recombinantes.	31
5.5 Análise dos ensaios cristalográficos.	33
6 - Discussão	35
7 Conclusão.....	39
8 Referências Bibliográficas.	41
Apêndice 1	46

Índice de Figuras

1. Gene da Tiamina sintase clonada no vetor pETSUMO, formando pETSUMO0789....	16
2. Gene Hipotético clonado no vetor pETSUMO, formando pETSUMO1201.....	17
3. Gene da PHA sintase subunidade E (PhaE), clonada no vetor pETSUMO, formando pETSUMO2047.....	18
4. Ausência de sintomas do mutante 6H10 (DGTP Pirofosforilase Tiamina sintase) e a <i>Xac</i> 306 selvagem induzidos no hospedeiro <i>Citrus limonia</i>	24
5. Sintomas induzidos pelo mutante 11A4 (PHA sintase subunidade E) e a <i>Xac</i> 306 selvagem induzidos no hospedeiro <i>Citrus limonia</i>	25
6. Sintomas induzidos pelo mutante 11D3 (proteína hipotética) e a <i>Xac</i> 306 selvagem induzidos no hospedeiro <i>Citrus limonia</i>	26
7. Perfil de eletroforese de digestão dos mutantes.....	27
8. Curva de crescimento <i>in vivo</i> (<i>in planta</i>), mutante 6H10.....	28
9. Curva de crescimento <i>in vivo</i> (<i>in planta</i>), mutante 11A4.....	29
10. Curva de crescimento <i>in vivo</i> (<i>in planta</i>), mutante 11D3.....	30
11. Eletroforese SDS-PAGE, proteína DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase.....	31
12. Eletroforese SDS-PAGE, proteína hipotética.....	31
13. Eletroforese SDS-PAGE, Pha sintase subuniade E.....	32
14. Eletroforese SDS-PAGE, purificação da proteína Pha sintase subunidade E.....	32
15. PHA sintase subunidade E de <i>Xac</i> em ensaio para condições de cristalização.....	33

RESUMO

O cancro cítrico doença causada pela bactéria gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*), representa muitos prejuízos para citricultura brasileira e mundial. Com objetivo de conhecer os mecanismos de ataque da doença, em 2002, a *Xac* teve todo seu genoma seqüenciado. Posteriormente foram iniciados estudos de genômica funcional da *Xac*. Uma biblioteca de mutantes foi constituída e os mutantes foram analisados por inoculação *in planta*, deste modo três mutantes foram selecionados por apresentarem diferenças nos sintomas, quando comparados com a estirpe selvagem *Xac*. Os genes nocauteados nos mutantes codificam três proteínas diferentes: DGTP pirofosfato tiamina sintase, envolvida na biossíntese de vitamina B1, a subunidade E da enzima PHA sintase, que atua na síntese de polihidroxialcanoatos, que acumulados na forma de grânulos intracelulares constituem substâncias de reserva da célula, e podem formar biopolímeros e, ainda o terceiro gene nocauteado, que codifica uma proteína hipotética. O perfil de crescimento da *Xac* selvagem e dos mutantes foi avaliado a fim de se comparar o perfil de crescimento das bactérias selvagem e mutantes ao longo de infecção em hospedeiro cítrico. As curvas de crescimento revelaram que o mutante da DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase não se desenvolve na planta hospedeira. O mutante da PHA sintase cresce menos que a *Xac* selvagem nos dois primeiros dias de avaliação, já o mutante da proteína hipotética sofre uma fase de declínio a partir do oitavo dia de avaliação experimental. Como um primeiro passo para estudos estruturais da subunidade E da PHA sintase da *Xac*, o gene codificador desta proteína foi clonado em vetor de expressão e a proteína recombinante foi produzida em *E.coli* na forma solúvel.

Palavras chaves: Cancro cítrico, mutante, polihidroxialcanoatos, Tiamina sintase e hipotético.

ABSTRACT

The citric canker disease caused for the bacterium gram negative *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*), presents many damages for Brazilian and world-wide citriculture. In 2002, aiming to know the mechanisms of attack of the disease, the *Xac* had all its sequenced genome. After this period, it started the studies of structural genomic of the *Xac*. A library of mutants was constituted and the mutants had been analyzed by inoculation *in plant*, three mutants had been isolated for not to show differences in the symptoms when compared with the wild lineage *Xac*. The mutants codify three different proteins: DGTP pyrophosphate tiamine synthase involved in biosynthesis B1 vitamin; enzyme PHA synthase subunit E that is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoate, in the intracellular granule form, they constitute substances of reserve of the cell, and can still to form biopolymer; and hypothetical proteins. The profile of growth of the wild *Xac* and the mutated *Xacs* in the three cases of the mutants had been evaluated in order to compare the profile of growth of the bacterial wild and mutant during the infection in citric host. The growth curves showed that the mutant of the DGTP pyrophosphate tiamine synthase does not develop the disease in the host plant. The PHA synthase grows less than the wild *Xac* in the first days of evaluation, however the mutant of the hypothetical, shown a decline period for eighth day of the experimental evaluation. Aiming the structural studies of the subunit E the PHA synthase of the *Xac*, the code gene of this protein was cloned in expression vector and the recombinant protein was produced in *E.coli* in the soluble form.

Keywords: Citric canker, mutant, polyhydroxyalkanoate, tiamine synthase and hypothetical

1 – Introdução.

A cultura de citros em larga escala apresenta alta produtividade e o Brasil produziu, 20.526.500 toneladas de frutas em 2005 (Koller *et al.*, 2006), sendo o maior produtor mundial de citros desde a década de 80. Por outro lado, a cultura de citros é suscetível a um elevado número de doenças com grande potencial de destruição, dentre as quais destacam-se a tristeza dos citros (que devastou pomares nas décadas de 30 e 40), a clorose variegada dos citros (CVC - amarelinho) causada pela *Xyllela fastidiosa* (Laranjeira & Palazzo, 1999), e o cancro cítrico, uma das mais destrutivas, causado pela bactéria fitopatogênica gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) (Namekata *et al.*, 1996).

O cancro cítrico encontra-se em pelo menos 30 países, sendo endêmica em todos aqueles produtores da Ásia e em vários outros da América do Sul (Feichtenberger *et al.*, 1997). Introduzido, no Brasil, na década de 50, trazido do Japão em mudas de citros infectadas, que entraram ilegalmente no país (Hasse, 1987). No intuito de conhecer o mecanismo utilizado pela *Xac* no processo de infecção, em 2002, o agente do cancro cítrico teve seu genoma completamente seqüenciado, revelando um total de 4.428 proteínas codificadas (da Silva *et al.*, 2002). A partir deste momento, a genômica funcional tornou-se uma poderosa ferramenta para o estudo e entendimento do

patossistema citros::*Xac*, possibilitando a identificação de genes bacterianos responsáveis pela indução de sintomas do cancro em hospedeiros cítricos.

A mutagênese ao acaso por inserção aleatória de transposon constitui-se numa metodologia eficiente para o estudo de variações fenotípicas da patogenicidade em plantas hospedeiras inoculadas com mutantes do patógeno em questão, através da observação de alterações dos sintomas típicos do desenvolvimento da doença, as quais podem ir desde alterações discretas na patogenicidade, até a ausência completa dos sintomas. A existência de uma biblioteca de mutantes de *Xac* por inserção aleatória de transposon (Levano-Garcia *et al.*, 2005) possibilitou a identificação de três mutantes que apresentaram sintomas interessantes para o estudo da interação planta patógeno, nos quais, se encontram mutadas as seguintes ORFs: ORF (XAC2047) que codifica a subunidade E da PHA sintase (PhaE), cuja inoculação revelou alterações discretas nos sintomas típicos de cancro induzidos em plantas cítricas hospedeiras (Laia *et al.*, resultados não publicados). A ORF (XAC0789) que codifica uma tiamina sintase pirofosfato, precursora da vitamina B1, onde as inoculações do mutante desta proteína apresentaram evidentes discrepâncias de desenvolvimento entre a estirpe selvagem e o mutante. E ORF (XAC1201) que codifica uma proteína hipotética conservada em citros.

2 Revisão de literatura

2.1 - Citricultura e Cancro Cítrico.

O Brasil, desde a década de 80, tornou-se o maior produtor mundial de laranjas, tendo no estado de São Paulo sua maior produção, com cerca de 70% das caixas de laranjas produzidas e 98% da produção de suco (Hasse, 1987). É a segunda atividade em termos de importância agro-econômica do estado de São Paulo, movimentando 5 bilhões de Reais por ano, segundo dados do FUNDECITRUS. Além de gerar 400 mil empregos diretos, movimenta a economia de 316 municípios paulistas e cerca de 15 municípios mineiros, sendo para estes municípios a base da economia local.

Muitas doenças têm feito com que os produtores de laranja desistam de continuar com a cultura de citros, recentemente, surgiram duas novas doenças tão destrutivas quanto o cancro cítrico. A “morte súbita do citros” (MSC), que não possui ainda um agente causal confirmado (suspeita-se de um agente viral) e é uma doença de combinação copa/porta enxerto, que manifesta os sintomas na região da enxertia em plantas sobre porta-enxerto intolerantes ao seu agente patogênico. Pesquisas mostram que os vasos do floema, que levam os produtos gerados na fotossíntese para toda a planta, inclusive a raiz, ficam bloqueados. Sem alimento, a árvore definha e pode morrer. A morte súbita dos citros provoca diminuição no tamanho, peso e quantidade de frutos

(http://www.fundecitrus.com.br/doencas/morte_subita.html), o “greening”, também chamada de “huanglongbing” (HBL), que é uma doença de difícil controle, provavelmente originária da China e que atualmente afeta seriamente a produção de citros na Ásia e na África. O agente causal é uma bactéria com crescimento limitado ao floema, chamada provisoriamente *Candidatus liberibacter* spp. Antes da constatação no Brasil, existiam duas formas de bactérias causadoras do greening: *Candidatus liberibacter africanus*, associado à forma africana da doença, e *Candidatus liberibacter asiaticus* associada à forma asiática. Não é conhecida até o presente nenhuma variedade de copa ou porta-enxerto resistente à doença (<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening.html>).

O cancro cítrico, causado pela bactéria fitopatogênica gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) (Namekata *et al.*, 1996), foi introduzido, no Brasil, na década de 50, trazido do Japão infectando mudas de citros, que entraram ilegalmente no país (Hasse, 1987). Esta doença é considerada, para a citricultura, uma das causadoras de maior prejuízo econômico, pois causa danos na qualidade dos frutos e, por conseqüência, na produção de laranjas para processamento em suco, bem como a destruição de milhares de árvores em pomares constituídos e, até então, produtivos, já que como na maioria das bacterioses de vegetais, o cancro cítrico não possui controle curativo eficiente, sendo que a única forma de eliminar o cancro cítrico é erradicar todo material contaminado em um raio de, no mínimo, 30 metros do foco de contaminação, se ocorrer de 0,5% das plantas do talhão. Se a contaminação for maior do que 0,5% do total de laranjeiras, erradica-se todo o pomar e, nesta área, não se pode plantar citros por dois anos, o que acarreta sérias perdas ao produtor. Nos Estados Unidos, o cancro cítrico vem se alastrando de maneira preocupante e progressiva desde 1995, após anos de esforços em programas de erradicação da doença, os quais já consumiram mais de U\$200 milhões (Brown, 2001).

O cancro cítrico infecta plantas através de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, nos tecidos jovens ou por meio de ferimentos em tecidos maduros (folhas, frutos e ramos). Esta doença pode provocar lesões nas folhas, frutos e ramos e, conseqüentemente, a queda prematura de folhas e frutos. As galerias produzidas pela larva minadora são uma excelente porta de entrada para a bactéria. Para se desenvolver

no espaço apoplástico da planta (parênquima aerado), a *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) tem que coordenar seu programa de multiplicação celular à percepção do ambiente representado pelo interior da planta cítrica hospedeira, promovendo a indução de genes requeridos para que o processo infeccioso se estabeleça com sucesso. Altamente contagiosa, a bactéria é resistente e consegue viver em vários ambientes por mais de nove meses. Além disso, trata-se de um patógeno de fácil dispersão, sendo o homem e as intempéries os principais agentes disseminadores.

2.2 - Aspectos moleculares de interações planta-patógeno

As interações entre plantas e bactérias fitopatogênicas podem ser caracterizadas como compatíveis ou incompatíveis. Na "interação compatível", o patógeno invade o tecido vegetal, sendo capaz de inibir os mecanismos de defesa da planta hospedeira e servir-se de um arsenal de patogenicidade, que envolve a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta atacada (White *et al.*, 2000). Na "interação incompatível", o patógeno é restringido e eliminado no sítio de infecção, após o disparo dos mecanismos de defesa da planta. Este tipo de interação prediz que o gene de avirulência (*Avr*) do patógeno codifica uma proteína elicitora (*Avr*) capaz de interagir especificamente com um receptor da planta (proteína R) codificada por um gene de resistência *R* (Keen, 1990). O disparo das defesas da planta implica na acelerada e intensa ativação das vias de transdução de sinais que resultam na resposta de resistência, muitas vezes caracterizada por uma necrose localizada também denominada reação de hipersensibilidade (HR, "Hypersensitivity Response") (Staskawicz *et al.*, 1995).

2.3 - Genômica funcional do cancro cítrico.

O seqüenciamento em larga escala de diversos genomas bacterianos e a implantação de análises pós-genômicas de caráter funcional têm levado ao acúmulo de uma grande quantidade de dados relativos aos processos infecciosos envolvidos nas

interações entre bactérias patogênicas e hospedeiros animais (Domenech *et al.*, 2001, Graham *et al.* 2001, Bjorkholm *et al.*, 2001). Seguindo esta tendência, tal avanço deve se estender, também, ao domínio das interações entre bactérias fitopatogênicas e hospedeiros vegetais. Análises genômicas de caráter funcional visam, no caso de microrganismos patogênicos, a identificação de fatores de virulência, moléculas alvo de substâncias anti-microbianas e o incremento nos métodos de diagnose de doenças.

O seqüenciamento completo do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*/CVC constitui-se num marco para a ciência brasileira, um feito de ampla repercussão internacional, que colocou o Brasil no seletor rol de países que dominam a tecnologia genômica (Simpson *et al.*, 2000). Os genomas de outras bactérias fitopatogênicas de interesse agro-industrial também foram seqüenciadas em nosso estado: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (cancrose de citros), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (podridão negra das crucíferas), *Xylella fastidiosa*/PD (doença de Pierce em videiras), *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar).

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), que teve seu genoma completamente seqüenciado, revelou um total de 4.428 proteínas codificadas, das quais 62,6% tem suas funções associadas a proteínas com funções conhecidas descritas na literatura e 37,4% correspondem a proteínas sem função descrita até o momento de conclusão do genoma (da Silva *et al.*, 2002). Além disso, genes envolvidos em patogenicidade e virulência foram identificados neste genoma, codificando para sistemas de secreção de toxinas e proteínas de virulência avirulência, enzimas de degradação da parede celular vegetal, estrutura de adesão bacteriana e enzimas com capacidade de neutralizar espécies ativas de oxigênio gerado pela planta hospedeira. Considerando-se que 37,4% dos genes da *Xac* correspondem a proteínas sem função conhecida, e que muitos destes genes podem codificar proteínas com funções importantes para o entendimento da colonização do patógeno e seu mecanismo de ataque na planta hospedeira, muito resta a saber sobre o arsenal e estratégias utilizadas pelo patógeno na indução do cancro no hospedeiro cítrico.

Métodos de genômica funcional podem constituir-se numa poderosa ferramenta para o estudo do patossistema citros::*Xac*, possibilitando a identificação de genes bacterianos responsáveis pela indução de sintomas do cancro em hospedeiros cítricos.

Dentre estes, podemos identificar tanto genes com função pressuposta pela comparação com sequências de genes ortólogos depositados em bancos de dados, como genes com função hipotética e, portanto, representando novidades em termos de função e sua relação com o processo de patogenicidade e virulência.

A mutagênese ao acaso por inserção de transposon é uma metodologia capaz de levar à interrupção gênica em larga escala. O fenótipo de patogenicidade resultante pode ser verificado por inoculação dos mutantes no organismo hospedeiro e pela observação de alterações dos sintomas típicos do desenvolvimento da doença, as quais podem ir desde alterações na patogenicidade, até a ausência completa de sintomas. O estudo integrado, associando os genes mutados e respectivos fenótipos apresentados, e as vias de expressão gênicas e metabólicas em que tais genes se situam, deve levar a uma maior compreensão do processo infeccioso em seus diferentes estágios, além de identificar possíveis alvos para o controle da doença.

2.4 – Mutantes de *Xac* com patogenicidade alterada.

Para a realização de estudos de genômica funcional nas interações *Xac*::citros, foi construída em nosso laboratório (LBM do Departamento de Tecnologia), uma biblioteca de mutantes de *Xac* por inserção aleatória de transposon, utilizando o kit EZ:TN (Epicentre). Os mutantes foram analisados por inoculação individual em mudas de limoeiro cravo, e aqueles apresentando patogenicidade alterada, quando comparados ao fenótipo padrão do cancro gerado pela *Xac* selvagem (controle positivo), foram selecionados para serem investigados em maior detalhe. Dentre cerca de 2.000 mutantes analisados individualmente por inoculação em citros hospedeiro, foram selecionados 96 mutantes de interesse, e após duas repetições independentes de inoculações em plantas cítricas hospedeiras foram retidos aproximadamente 50 mutantes com patogenicidade alterada. Dentre os 50 mutantes, 44 foram identificados por seqüenciamento como tendo sido nocauteados pela inserção do transposon nos mutantes respectivos. Os genes nocauteados correspondem às diversas categorias de genes anotados no genoma *Xac*, indicando que a estratégia tem alcançado seu objetivo de identificar não somente genes

sabidamente implicados na patogenicidade da *Xac* em planta hospedeira segundo a literatura, mas também genes codificando elementos ainda não relacionados ao complexo fenômeno que é a patogenicidade e virulência em patógenos bacterianos e, ainda, genes com funções não atribuídas até o momento (codificando proteínas de funções hipotéticas ou desconhecidas).

Dentre 44 mutantes com patogenicidade alterada, três que codificam diferentes proteínas foram os selecionados para estudo: ORF (XAC0789), que codifica uma Tiamina Sintase pirofosfato, em animais sua forma ativa a tiamina pirofosfato TPP, utilizada como cofator para as reações catalisadas pela piruvato descarboxilase e pela piruvato acetoglutarato desidrogenase, bem como para as reações catalisadas pela transcetolase da via das pentoses fosfato. A deficiência de tiamina leva a uma diminuição drástica na capacidade das células em gerar energia, como resultado do seu papel importante nessas reações. ORF (XAC1201), que codifica uma proteína hipotética. ORF (XAC2047), que codifica a subunidade E da PHA sintase (PhaE). Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros produzidos por inúmeras bactérias, sob condições apropriadas de cultivo (Piemolini *et al.*, 2004). Fisiologicamente, são macromoléculas de reserva energética, geralmente acumulados intracelularmente, na forma de grânulos localizados no interior das células, os quais podem representar até 80% da massa seca total das células (Rodrigues, 2005). Sob limitação de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fosfato, enxofre ou oxigênio e na presença de suficiente fonte de carbono (Piemolini *et al.*, 2004) bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas facilmente encontrados na natureza, efluentes, solo, água de mar, são capazes de acumular PHAs (Byron, 1987). Na biossíntese de PHAs, a principal enzima controladora é a PHA sintase (PhaC), a qual usa o substrato β -hidroxiacil Coenzima A para polimerização (Sheu *et al.*, 2000). Todas as bactérias estudadas até o momento apresentam pelo menos uma PHA sintase, alguns gêneros apresentam duas sintases, ambas capazes de catalizar a formação de uma ligação éster entre os grupos hidroxila e carbonila dos substratos hidroxiacil-coenzima A (HA-CoA) (Piemolini *et al.*, 2004).

A PHA sintase pode ser classificada em 4 tipos. O tipo I e o tipo II de PHA sintases compreendem enzimas que consistem em somente um tipo de subunidade (PhaC) com massa molecular entre 61 e 68 kDa (Rehm & Steinbüchel, 1999). A PHA do tipo III

que é formada pelas subunidades PhaC e PhaE (Sheu *et al.*, 2000), com massa molecular em torno de 40kDa (Rehm, 2003). E a PHA do tipo IV (e.g. *Bacillus megaterium*), que é semelhante a da classe III, porém a subunidade PhaE é substituída pela PhaR, com massa molecular em torno de 20 kDa (McCool & Cannon, 2001).

2.5 – Análise cristalográfica.

O desenvolvimento da biologia molecular e as técnicas de DNA recombinante tornaram possível descobrir e compreender muitos fenômenos biológicos em maiores detalhes, permitindo confirmar teorias propostas, que até então permaneciam no terreno das hipóteses. Entre tantos avanços, existe uma área, pouco conhecida do público geral, que deve se tornar uma das mais importantes para a biotecnologia: a cristalografia de proteínas, um ramo tradicional da ciência cujo caráter abrange um conteúdo extenso e diverso (Giacovazzo *et al.*, 2002). Entre os métodos atuais, a cristalografia é o mais poderoso para descrever a estrutura tridimensional de uma proteína, de uma enzima ligada ao seu substrato ou inibidor específico, através do preciso posicionamento de cada um dos seus átomos num arranjo cristalino. Isso permite determinar a relação entre a estrutura da proteína e sua função (Hwa & Polikarpov, 1999), visando desenho de drogas específicas capazes de interagir com proteínas alvo para, por exemplo, impedir o desenvolvimento de um patógeno no organismo hospedeiro.

A produção de proteínas recombinantes em condições suficientemente boas para a obtenção de cristais de proteínas é um desafio a ser enfrentado. Muitos são os casos em que em anos de pesquisa as tentativas de cristalização de uma proteína de interesse tenham resultado em falta de sucesso na obtenção de cristais da proteína. No entanto, o desenvolvimento da Biologia Estrutural na era Pós-Genômica tem privilegiado estratégias que compreendem tentativas de cristalização de um grande número de proteínas, em paralelo (média ou larga escala), levando a um aumento de chances em se chegar a obtenção de cristais para as proteínas que apresentem menos dificuldades em ser cristalizadas (Dove, 2004).

Experimentos de triagem de cristalização empregam tipicamente uma busca convencional de múltiplos parâmetros de protocolos nas técnicas de gota suspensa (difusão de vapor), com otimização via utilização de aditivos, semeadura etc, que são rotineiramente realizados em uma câmara termoestável a 4 ou 18°C. Medidas de espalhamento de luz dinâmica são extensivamente utilizadas, assim como banco de dados são gerados para direcionar os procedimentos de triagem (<http://cbme.if.sc.usp.br/metodos/pc.html>).

Dentro do projeto de genômica funcional do cancro cítrico, estudar a estrutura de proteínas da *Xac* implicadas no desenvolvimento de sintomas de cancro em plantas cítricas, corresponde à busca por alvos com possibilidade de levar a estratégias de controle e combate a esta doença.

3 - Objetivos

Este trabalho de mestrado teve por objetivo a expressão de proteínas recombinantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) em *E.coli*, na forma solúvel, em quantidade e homogeneidade molecular suficientes para a sua cristalização.

Foram escolhidas 3 proteínas deduzidas a partir de genes que, uma vez mutados, levam a alterações dos sintomas de cancro usualmente observados para a *Xac* selvagem infectando plantas hospedeiras.

4 - Materiais e métodos

4.1 Manutenção e Cultivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) e dos mutantes de *Xac*.

A partir de estoques da bactéria a -80°C , em meio TSA contendo glicerol a 15%, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, isolado 306, foi cultivada em meio de cultura TSA (10 g de triptona, 10 g de sacarose, 1 g de Na^+ glutamato, 15 g de agar e água destilada suficiente para 1L). O agar, somente, foi utilizado em meio de cultura sólido. As células foram multiplicadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura, sob uma agitação de 200 rpm ou placas de Petri, em estufa a 28°C . Quando se fez necessário, no caso dos mutantes, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina foram adicionados ao meio de cultura.

4.2 Obtenção e Inoculação dos Mutantes.

Os mutantes dos genes XAC0789 (6H10), XAC1201 (11D3) e XAC2047 (11A4) de *Xac* foram obtidos por inserção aleatória do transposon Tn5, a partir do kit EZ::Tn

(Epicentre®) (Levano-Garcia *et al.*, 2005) e a identificação dos genes nocauteados foi realizada por seqüenciamento das bordas de inserção do transposon no DNA genômico da *Xac* mutante (Laia *et al.*, resultados não publicados). Os mutantes, 6H10, 11D3 e 11A4 foram inoculados a 10^8 ufc/mL, nos espaços intercelulares de um dos lados das folhas de mudas de limoeiro cravo, por pressão com o auxílio de uma seringa sem agulha e o desenvolvimento dos sintomas foram acompanhados por 3 semanas e registrado em fotografias digitais. Como controle foram inoculadas bactérias *Xac* selvagem no lado oposto das mesmas folhas inoculadas com os respectivos mutantes.

4.3 Caracterização molecular dos mutantes.

Para a caracterização molecular dos locus mutados, das construções (pBS6H10, pBS11D3 e pBS11A4) do fragmento genômico contendo os genes respectivos de cada locus interrompidos pelo transposon, clonado no sítio *Sac* II do “polilinker” do vetor pBSKII, foram digeridos com as seguintes combinações de enzimas de restrição: *EcoRI/SacI*, *BamHI* ou *HindIII*. Para cada mutante procedeu a seguinte reação: 10µg de DNA (10µL), 3µL do tampão específico da enzima, 1 µL de enzima nos casos *BamHI* e *HindIII* e 0,5µL de cada enzima na combinação *EcoRI/SacI*, 16 µL de H₂O para um volume final de 30µL, esta digestões foram incubadas em “banho maria” a 37°C por 3 horas. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, tampão 1X TAE (Sambrook *et al.*, 1989), por 2 horas, a 120 volts. O DNA foi corado com 3µL de Brometo de Etídeo 10mg/mL adicionado no preparo do gel e no tampão de eletroforese. Foi realizada uma análise *in silico* a partir do locus dos mutantes de *Xac* no programa Sequencher 4.5 foi comparada com o padrão de digestão da construção seqüenciada na identificação do gene nocauteado.

4.4 Curvas de crescimento *in planta*.

Culturas da bactéria *Xac* selvagem e dos mutantes 6H10 da ORF XAC0789, 11D3 da ORF XAC1201 e 11A4 da ORF XAC2047 estocados em meio TSA contendo 15%

glicerol, foram plaqueadas em meio TSA sólido (adicionado de canamicina, no caso dos mutantes) foram incubadas a 28°C por dois a três dias. Após o desenvolvimento de massa bacteriana, uma boa porção de bactérias foi transferida para tubos de 50 mL contendo 10 mL de água milli-Q autoclavada, dentro de um fluxo laminar e com a ajuda de palitos autoclavados, seguido de agitação em vortex até obtenção de uma suspensão homogênea de bactérias.

Cada um dos inóculos foi padronizado para D.O._{600nm} 0,3 com a utilização do aparelho Biofotômetro (Eppendorf) e, em seguida, inoculados no hospedeiro, *Citrus limonia* (limão cravo) de modo a preencher toda a área foliar e cada muda foi etiquetada com seu respectivo inóculo. Em cada um dos tempos da curva (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias após a inoculação) foram retirados discos de folhas inoculadas das plantas representando cada inóculo com 1 cm de diâmetro. Após a retirada dos discos, estes foram tratados em álcool 70% por 30 segundos (s) e, em seguida, mergulhados em água, durante o mesmo tempo, para a retirada do excesso do álcool. Então, cada disco foi transferido para um tubo de 1500 µL contendo 1 ml de água estéril para a maceração. Utilizando uma furadeira elétrica contendo bastão macerador plástico com ponta no formato do fundo do tubo, os discos de folhas foram respectivamente macerados. Em seguida procedeu-se uma diluição seriada para cada condição experimental, 10⁻¹ a 10⁻⁹. De cada uma das diluições foram plaqueados 10 µL em meio TSA sólido de forma a obter 9 microgotas enfileiradas (método de microcolônia de Romeiro (2001)). Numa mesma placa foram aplicadas todas as diluições da triplicata de um experimento, que foram incubadas a 28°C por um tempo suficiente (2 a 3 dias) para se visualizar as colônias de bactérias viáveis, e então, contá-las. A partir destes dados foram obtidos gráficos de Curva de crescimento *in vivo*, onde a Log ufc/cm² compõe o eixo Y (ordenada) e os dias após inoculação representam a abscissa (X). As curvas de crescimento *in planta* foram realizadas a partir de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

A partir das médias das 9 repetições obtidas de cada ponto, foi obtido o Desvio Padrão utilizando a função DESVPAD do Excel da Microsoft. O Erro Padrão que expressa graficamente os erros potenciais relativos a cada marcador de dados em uma

seqüência de dados foi encontrado, dividindo o Desvio Padrão pela raiz do número de repetições de cada ponto.

4.5 Isolamento e Clonagem dos Genes em vetor de expressão.

Os oligonucleotídeos *forward0789* 5' ATgCCTgATTCTCTTCgACCCg 3' e *reverse0789* 5' CTgCggTgAATTCATTgCggC 3', *forward1201* 5' ATggAggCgTTgTTCgACCAg 3', *reverse1201* 5' CCTgCCCAAgCTTAgtgCAgC 3' e *forward2047* 5' ATggCAAgCagCggTTCggAC 3', e *reverse2047* 5' AACggAgAATTCATgCCTgCg 3', foram constituídos usando o programa Gene Runner V. 3.00 (Hastings software), sintetizados e utilizados para a amplificação e isolamento dos 3 genes, desde a metionina inicial até o códon de terminação. As reações de PCR foram realizadas com 100ng de DNA de cosmídeo, para cada ORF foi selecionado o cosmídeo correspondente do locus gênico, para ORF XAC0789 (OCF11), XAC1201 (1TA02) e XAC2047 (0DH11), 10 pmoles de cada oligo, 1U de Taq DNA Polimerase Hi fidelity (Invitrogen), 200µm de dNTPs, 1 mM de MgSO₄ e 1X tampão de Taq, para uma reação com volume final de 50µL, num termociclador Perkin Elmer Applied Biosystems (PCR System 9700 Gene Amp®) e um programa com desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e 30 segundos. Para confirmar o isolamento do gene por produto de PCR, os mesmos foram aplicados em gel de agarose 1% corado com 3µL de Brometode etídeo 10mg/mL no gel e 3µL no tampão de corrida TAE 1X.

4.6 Clonagem e Transformação bacteriana

Os produtos de PCR correspondente as ORFs específicas, XAC0789, XAC1201 e XAC2047, foram clonados no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen), gerando as construções resultantes, pET-SUMO0789 (figura 1), pET-SUMO1201 (figura 2) e pET-SUMO2047 (figura 3), para a produção da proteína fusionada a uma etiqueta de HIS-6-SUMO na porção N-terminal da proteína. Cada ligação continha 1µL de PCR (~100ng),

1uL de tampão Ligantion Buffer 10X (Invitrogen), 2 uL de vetor pET SUMO a 25ng/uL (Invitrogen) 5uL de H₂O estéril (Invitrogen). As ligações foram incubadas por 16 horas a 15 °C. Células de *E. coli* linhagem One Shot® Mach1™-T1R, quimicamente competentes (Invitrogen), foram utilizadas para transformação, seguindo as indicações do fabricante: 2uL da ligação de cada gene foram separadas e adicionadas nos tubos que continham as células competentes, foram incubadas 30 minutos no gelo, posteriormente 30 segundos em “banho maria” a 42°C voltando rapidamente para o gelo, posteriormente foi adicionado 250 uL de meio SOC (Invitrogen) e mantido sob agitação de 200rpm por 1 hora, foram espalhada na placa de petri com meio de cultura LB adicionado de 50 ug/mL de canamicina 100 e 200 uL colônias isoladas foram separadas para mini preparação de DNA.

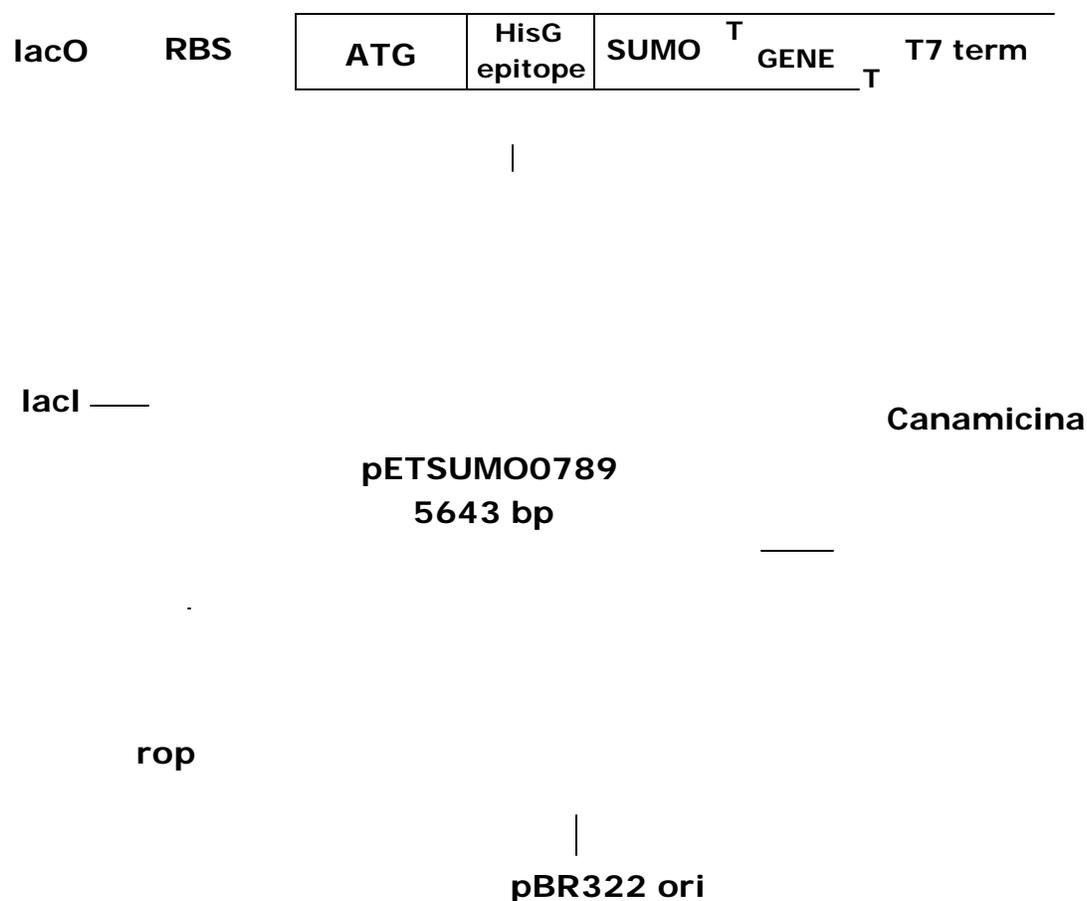


Figura 1. Gene da Tiamina sintase clonada no vetor pETSUMO, formando pETSUMO0789.

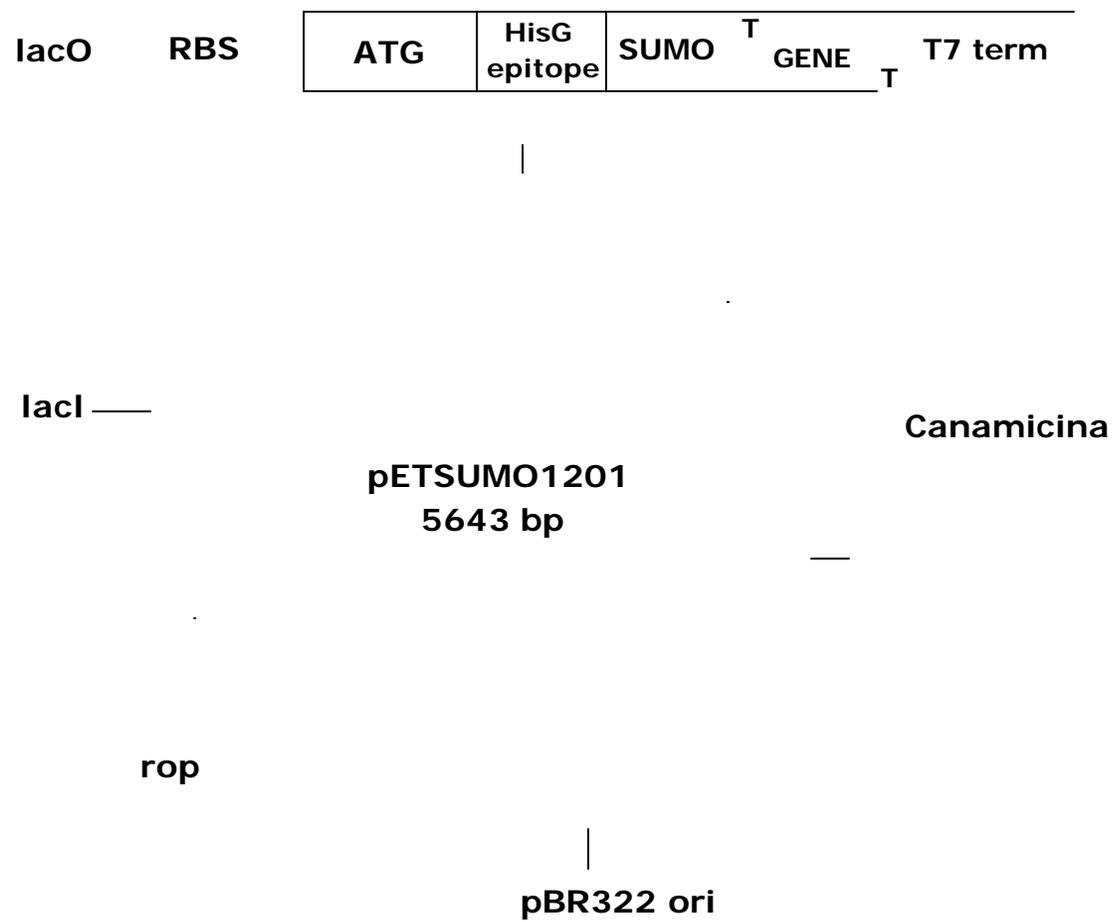


Figura 2. Gene Hipotético clonado no vetor pETSUMO, formando pETSUMO1201.

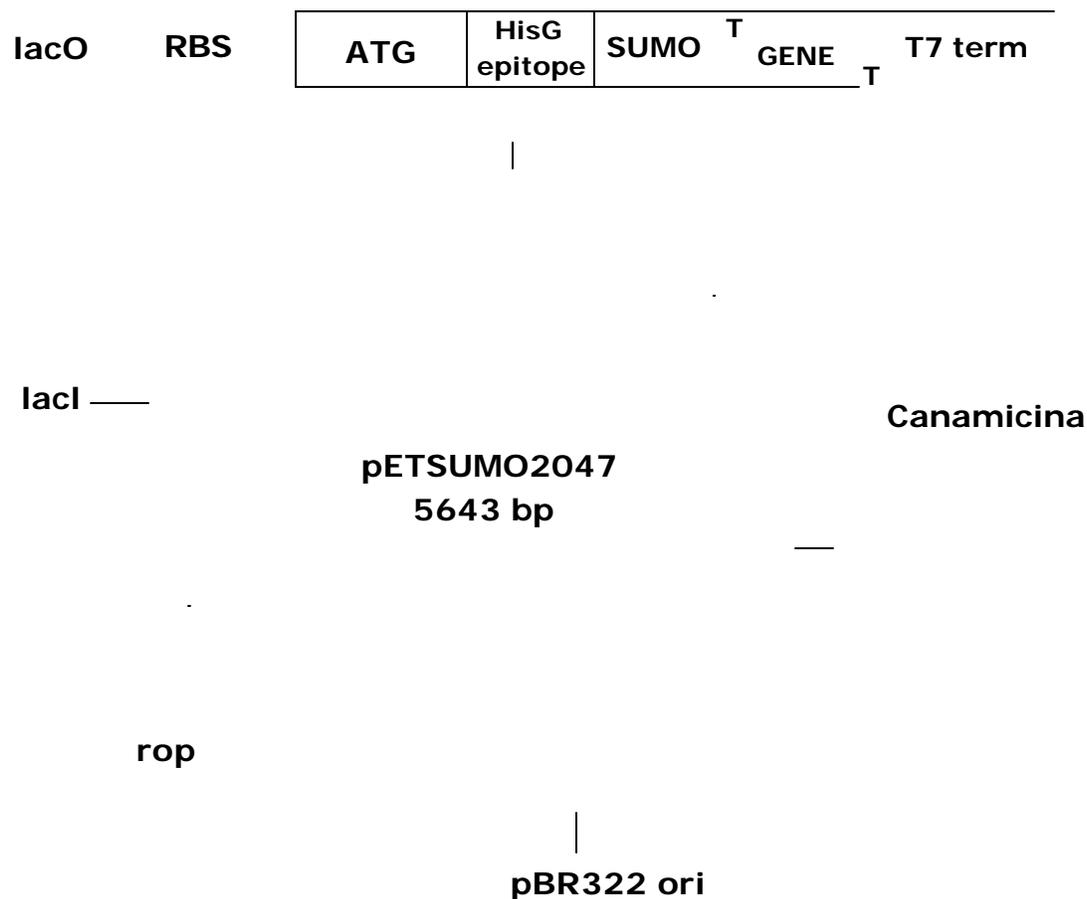


Figura 3. Gene da PHA sintase subunidade E (PhaE), clonada no vetor pETSUMO, formando pETSUMO2047.

4.7 Mini-preparação de DNA plasmidial

Colônias isoladas obtidas da transformação foram utilizadas para verificação da clonagem. Uma colônia foi replicada, com auxílio de palito estéril, em nova placa com canamicina (50 µg/mL) e, em seguida, a mesma colônia foi inoculada em 3,0 mL de meio líquido 2xTY contendo (50 µg/mL), incubando-se por 16 horas a 37°C, sob agitação a 250 rpm. As culturas foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos a temperatura de 22 °C, o sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial

foi isolado pelo método de lise alcalina, como descrito por (Sambrook *et al.*,1989). , após o isolamento do DNA as amostras foram seqüenciadas.

4.8 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento constaram de 4,0 µL de água bi-destilada estéril, 3,0 µL de tampão de sequenciamento, 1,0 µL de BigDye v3, 1,0 L de DNA plasmidial(~100ng) e 1,0 µL do oligonucleotídeo iniciador SUMO forward (5'-AgATTCTTgTACGACggTATTAg-3') (Invitrogen) ou do oligonucleotídeo iniciador T7 reverse (5-TAgTTATTgCTCAGCggTgg-3') (Invitrogen).

As reações seguiram os seguintes ciclos de amplificação, 96 °C por 10 segundos desnaturação, 52 °C por 5 segundos anelamento e, uma etapa de polimerização 60 °C por 4 minutos (min), repetindo esses ciclos por 35 vezes, ao termino dos ciclos, as amostras foram mantidas a 4 °C até o uso. A lavagem da reação dos terminadores, deu-se em seguida, adicionando 80 µL de isopropanol a cada amostra. Após 15 min. a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), por 30 min. a 22 °C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 15 min. a 20 °C. As amostras foram secas em bomba vacuo por 5 min. e submetidas ao sequenciamento em um seqüenciador automático ABI 3700 conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems). Os cromatogramas foram analisados no programa BioEdit, e aqueles que apresentaram bom rendimento foi submetido a análise de montagem para verificação das ORFs no programa Sequencher 4.5, os clones que entrou na direção correta e não sofreu nenhuma mutação foram utilizados para transformação em células de *E. coli* linhagem BL21(DE3) (Invitrogen).

4.9 Transformação em célula competente para indução de proteína recombinante.

As amostras de DNA isolados dos genes e confirmados pelo seqüenciamento, foram utilizados para transformação em célula competente de *E. coli* linhagem BL21(DE3) (Invitrogen), seguindo a recomendação do fabricante: 2uL da ligação de cada gene foram separadas e adicionados nos tubos que continham as células competentes, foram incubadas 30 minutos no gelo, posteriormente 30 segundos em “banho maria” a 42°C voltando rapidamente para o gelo, posteriormente foi adicionado 250 uL de meio SOC (Invitrogen) e mantido sob agitação de 200rpm por 1 hora, foram espalhada na placa de petri com meio de cultura LB adicionado de 50 ug/mL de canamicina após incubação a 37°C por uma noite entre 100 e 200 colônias isoladas foram separadas para mini preparação de DNA. Colônias isoladas foram utilizadas para análise de expressão das proteínas heterólogas em pequena escala.

4.10 Mini indução das Proteínas.

Colônias isoladas obtidas após a transformação foram incubadas 5,0 mL de meio 2xTY contendo 50 µg/mL e incubadas a 37 °C, sob agitação a 250 rpm, até uma densidade óptica (D.O._{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Uma alíquota de 1,0 mL foi retirada de cada proteína produzida e adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,4mM, incubando por mais 4 horas nas mesmas condições. Ao término do período de incubação, nova alíquota de 1,0 mL foi retirada de cada tubo induzido, as amostras foram centrifugadas 14000 rpm, 5 minutos a 22 °C e ressuspendidas em 50µL (amostras não induzidas) e 200 µL (amostras não induzidas) de H₂O estéril. Em seguida adicionou-se igual volume de 2x tampão de amostra (125mM Tris-HCl pH 6,8, 4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 0,01% p/v azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol para concentração final de 0,1% (v/v). As amostras foram aquecidas a 100 oC por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 14000 rpm, 22 °C, sendo estocadas a -20oC quando necessário. Um volume de 10 µL das amostras foi aplicado em gel SDS-PAGE (gel de concentração 4,3%, gel de

separação 12%), juntamente com 5 μ L do padrão de massa molecular, com a corrida sendo realizada a uma constante de 100mA.

4.11 Ensaio de Expressão e Solubilidade das Proteínas.

A partir das construções pET-SUMO0789, pET-SUMO1201 e pET-SUMO2047, dois clones de *E.coli* produtor das respectivas proteínas recombinantes da *Xac* foram utilizados para se analisar a solubilidade das proteínas, 30 mL de meio 2xTY foi utilizado para cultivo das bactérias e quando atingiram a D.O.₆₀₀ nm entre 0,6 e 0,8 adicionou-se IPTG a uma concentração final de 0,4mM, após 4 horas de indução as amostras foram centrifugadas 14000 rpm 20 minutos 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1 mM de solução tampão (50mM de Tris-HCl pH 8,0 e 100mM de NaCl), a lise celular foi realizada através de congelamento e descongelamento das amostras em nitrogênio líquido e “banho maria” a 37 °C por 4 vezes. O lisado das amostras foi centrifugado a 14000 rpm, 30 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi separado do precipitado e ao precipitado adicionou-se 1,0 mL de solução tampão. Tanto a fase solúvel de cada amostra quanto a fase precipitada foi adicionada igual volume de tampão de corrida 2x, seguindo conforme o passo anterior para aplicação. Através da análise em SDS-PAGE foi demonstrado que as proteínas HIS6-SUMO-PHA sintase (XAC 2047), HIS-SUMO-Tiamina Sintase (XAC 0789) e HIS-SUMO-Hipotética (XAC 1201) foram produzidas em grande quantidade e na forma solúvel.

4.12 Expressão e Purificação de Proteína Recombinante.

Para a subunidade E da Pha, e somente para ela, um clone produtor foi utilizado para a produção em larga escala da proteína PHA sintase fusionada à etiqueta HIS-6/SUMO. Para isto, células recombinantes isoladas foram inoculadas em 50 mL de meio LB (1% de NaCl, 1% de triptona e 0,5% de extrato de levedo) contendo 30 μ g/mL de canamicina, e incubadas durante 8h a 37°C com agitação de 250 rpm. Posteriormente, 10 mL foram transferidos para 4 frascos contendo 500mL de meio LB (4 x 500mL) e

incubadas nas mesmas condições até atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,8, quando o indutor IPTG foi adicionado a uma concentração final de 0,4 mM e as culturas foram incubadas nas mesmas condições por mais 4 h. As células induzidas foram coletadas, resuspensas em 40 mL/L de tampão de lise (500 mM NaCl, 30 mM imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, contendo 5 mM de benzamidina e 1 mM de PMSF) e lisadas através de sonicação (5 minutos, ciclos alternados de 9 segundos de lise e espera, durante 5 minutos). Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 30.000 x g durante 30 min a 4 °C, o sobrenadante filtrado em membrana Millipore 0,45 µm e amostras foram aplicadas em uma coluna de cromatografia de afinidade HisTrap Chelating de 5mL (Amersham), acoplada ao sistema de purificação de proteínas Akta Prime (Amersham). Como a amostra estava contaminada e para aumentar a pureza da proteína, as frações contendo a proteína HIS6-SUMO-PHA sintase foram dialisadas contra 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, contendo 500 mM NaCl e 30 mM imidazol, e repurificada na mesma coluna, o que permitiu obter a proteína com maior pureza. Foi obtida uma grande quantidade de proteína no final das duas cromatografias. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas a 25 °C contra 20 mM de Tris-HCl, pH 9,0 contendo 150 mM de NaCl, três trocas. Em seguida, o dialisado foi concentrado com Polietileno Glicol (PEG) 400 reduzindo 5X o volume, o concentrado de proteína foi centrifugado a 10.000 rpm para remover o precipitado da solução e, posteriormente, dialisado quatro vezes contra 10 mM de Tris-HCl, pH 9,0 contendo 25 mM de Glicina NaOH pH = 10,5, até a concentração de 5 mg/mL.

4.13 Ensaio de Cristalização Gene PHA sintase PhaE.

Os ensaios cristalográficos foram conduzidos pelo método de difusão de vapor com gota suspensa a 18° C, em solução ante as condições propostas nos fatoriais da Hampton Reserch Corp. (*Crystal Screen 1* anexado no fim da dissertação), Jancarik & Kim 1991, citado por (Shin et al. 2003). Na montagem desses experimentos de cristalização, foi adicionado no poço 500µL de uma das soluções fatoriais. Da solução do poço foi retirado 2µL e da proteína 2 µL na concentração de 5mg/mL. Com a nova

solução obtida foi montada a gota suspensa na parte superior do poço. Os experimentos de cristalização foram realizados em caixas contendo, cada uma, 24 câmaras de troca de vapor. A análise visual é realizada de 15 em 15 dias.

5 Resultados.

5.1 Fenótipo dos Mutante.

Para confirmação dos fenótipos dos mutantes 6H10, 11D3 e 11A4, em comparação com o fenótipo de sintomas de cancro induzidos pela *Xac* 306 selvagem, culturas das bactérias selvagem e de mutantes foram inoculados em planta cítrica hospedeira, cada mutante em dois pontos do lado inferior direito da folha e a bactéria selvagem em dois pontos do lado esquerdo da mesma folha. Os sintomas foram acompanhados e as Figuras 4, 5 e 6, respectivamente, mostram que o mutante de DGTP Pirofosforilase Tiamina sintase (6H10), não induz sintomas de cancro nos 5 dias após a inoculação quando comparado com o fenótipo induzido pela *Xac* selvagem (padrão). O mutante da ORF hipotética (11D3) como também o da PHA sintase (11A4) de *Xac* induziram menos hiperplasia e mais necrose quando comparado com o fenótipo induzido pela *Xac* selvagem a 5 dias após inoculação.



Figura 4. Ausência de sintomas pelo mutante 6H10 (DGTP Pirofosforilase Tiamina sintase) e a *Xac* 306 selvagem induzidos no hospedeiro *Citrus limonia*. Aos cinco dias após inoculação pode-se observar a diferença entre sintomas induzidos pela estirpe selvagem e o mutante no hospedeiro cítrico, com o mutante 6H10 inoculado do lado esquerdo da folha e a *Xac* 306 selvagem do lado direito.



Figura 5. Sintomas induzidos pelo mutante 11A4 (PHA sintase subunidade E) e a *Xac 306* selvagem induzidos no hospedeiro *Citrus limonia*. Aos cinco dias após inoculação pode-se observar a diferença entre sintomas induzidos pelo mutante ou pelo selvagem no hospedeiro cítrico, com o mutante 11A4 inoculado do lado esquerdo da folha e a *Xac 306* selvagem do lado direito.



Figura 6. Sintomas induzidos pelo mutante 11D3 (proteína hipotética) e a *Xac* 306 selvagem induzidos no hospedeiro *Citrus limonia*. Aos cinco dias após inoculação pode-se observar a diferença entre sintomas induzidos pelo mutante ou pelo selvagem no hospedeiro cítrico, com o mutante 11D3 inoculado do lado esquerdo da folha e a *Xac* 306 selvagem do lado direito.

5.2 Caracterização molecular dos mutantes.

A confirmação dos genes nocauteados nos mutantes 6H10, 11A4 e 11D3 foi realizada por digestão da construção sequenciada com enzimas de restrição, e comparação do perfil da digestão *in silico* dos respectivos loci mutados. A figura 7 mostra o perfil da eletroforese em gel de agarose das digestões das construções, pBS6H10, pBS11A4 e pBS11D3 com as seguintes enzimas *EcoRI/SacI*, *BamHI* ou *HindIII*. Como observado, para todas as digestões dos 3 mutantes analisados, ocorreu a liberação do vetor pBSKII de 2,9 kb e do inserto genômico correspondente ao locus do gene mais o transposon, que para o mutante 6H10 é de 3,5 kb, para o mutante 11A4 é de

4,3 kb e para o mutante 11D3 é de 3,5 kb. Na digestão *Bam*HI podemos verificar que para o mutante 6H10 os insertos liberados são de 2,8 kb e de 3,6 kb, para o mutante 11A4 os insertos liberados são de 3,8 kb e de 3,4 kb e para o mutante 11D3 a construção apenas linearizou com 6,4 kb, para as digestões com *Hind*III, o mutante 6H10 liberou 2 insertos, um com 1,9 kb e outro com 5,6 kb, o mutante 11A4 liberou 2 insertos um com 3,8 kb e outro com 3,4 kb e o mutante 11D3 apenas lineariza a construção de aproximadamente 6,4 kb. O perfil das digestões verificado para as construções pBS6H10, pBS11A4 e pBS11D3 concordam com o padrão predito a partir do genoma sequenciado para digestões *in silico* com as mesmas enzimas, dos respectivos loci contendo os genes em questão.

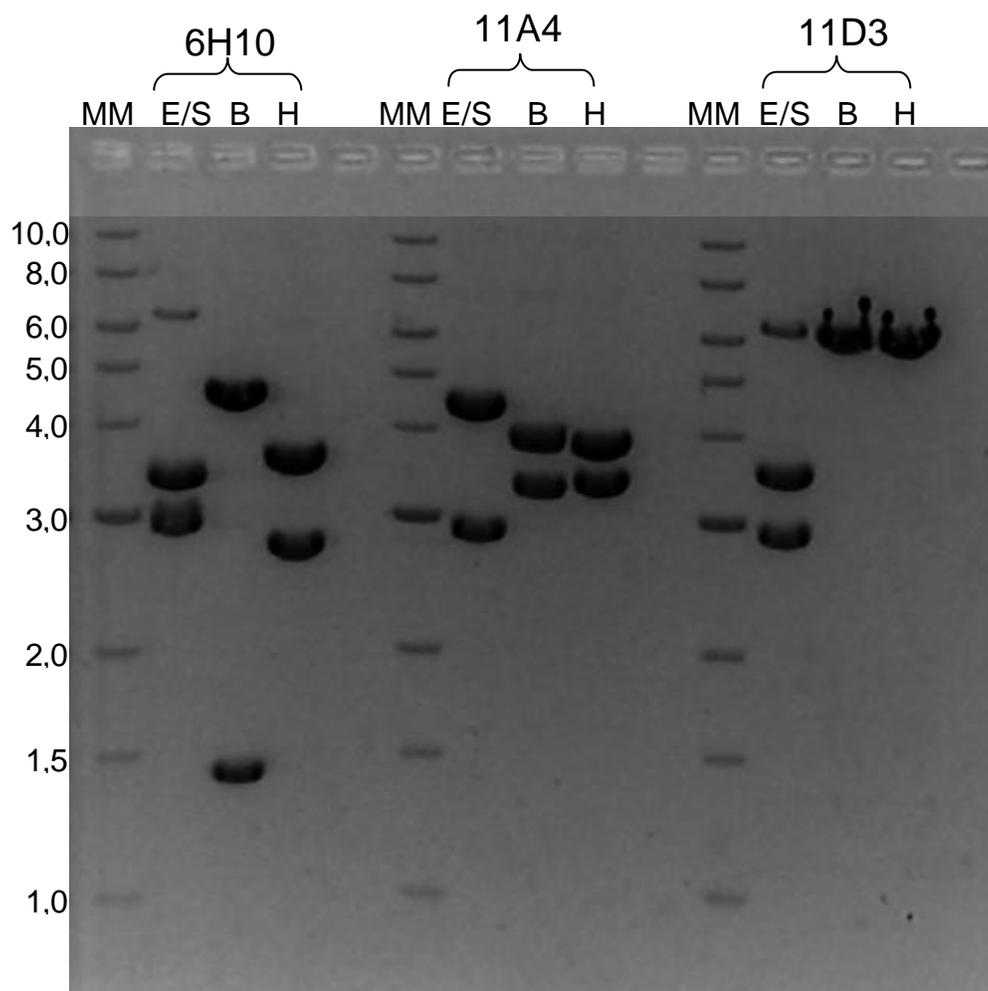


Figura 7. Perfil de eletroforese de digestão dos mutantes. MM (marcador molecular 1kb Biolabs), E/S (*Eco*RI/*Sac*I), B (*Bam*HI) e H (*Hind*III).

5.3 Curvas de crescimento *in planta*

Procurando verificar se as alterações dos fenótipos de sintomas do cancro induzidos em plantas cítricas hospedeiras refletiriam diferenças no perfil de desenvolvimento do patógeno dentro do hospedeiro, curvas de crescimento *in vivo* (*in planta*) foram realizadas para as bactérias *Xac* 306 selvagem e *Xac* mutantes 6H10, 11A4 e 11D3 (Figuras 8, 9 e 10 respectivamente). Para o mutante 6H10 (DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase), as diferenças de crescimento são nítidas, desde o segundo dia de crescimento onde o mutante cresce cerca de 80 vezes menos do que quando comparado com a *Xac* selvagem e assim continua progressivamente, no oitavo dia de infecção a diferença já é de ~ 12.000 vezes e no décimo quarto e último dia diferença atinge 16.000 vezes menos indução da doença pelo mutante do que quando comparado com a *Xac* selvagem, além disso o mutante se mantém estável levando em consideração o desvio padrão. Para o mutante 11A4 (PHA sintase subunidade E) as diferenças de crescimento entre selvagem e mutante só são observadas nos dois primeiros dias de infecção, quando o mutante desenvolve cerca de 10 vezes menos que a *Xac* selvagem, nos outros 12 dias de avaliação tanto o mutante quanto a *Xac* selvagem se desenvolvem na mesma proporção. No caso do mutante 11D3 (Proteína hipotética) o mutante até o segundo dia de infecção tem o mesmo desenvolvimento da *Xac* selvagem, mas depois começa a reduzir o crescimento e no quarto dia de infecção já está 10 vezes menos desenvolvida do que a *Xac* selvagem e assim continua progressivamente sendo que no décimo dia de infecção a diferença entre já atinge 100 vezes e, no décimo quarto dia atinge 1.000 vezes menos infecção causada pelo mutante do que quando comparada com a *Xac* selvagem.

A partir das repetições obtidas de cada ponto, foi obtido o Desvio Padrão utilizando a função DESVPAD do Excel da Microsoft. O Erro Padrão que expressa graficamente os erros potenciais relativos a cada marcador de dados em uma sequência de dados foi encontrado, basicamente dividindo o Desvio Padrão pela raiz do número de repetições de cada ponto. O tratamento estatístico para a determinação do desvio padrão foi realizado para cada um dos 8 pontos (T0, T2, T4, T6, T8, T10, T12 e T14) de cada uma das curvas de crescimento.

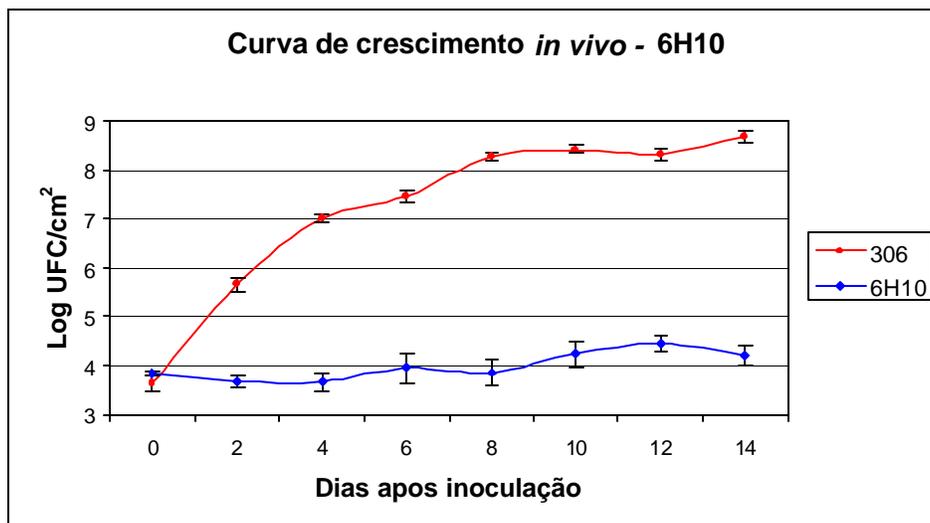


Figura 8: Curva de crescimento *in vivo* (*in planta*). Curva de crescimento *in planta* foram realizadas com inóculo de 10^3 ufc/mL durante 14 dias, respectivamente.

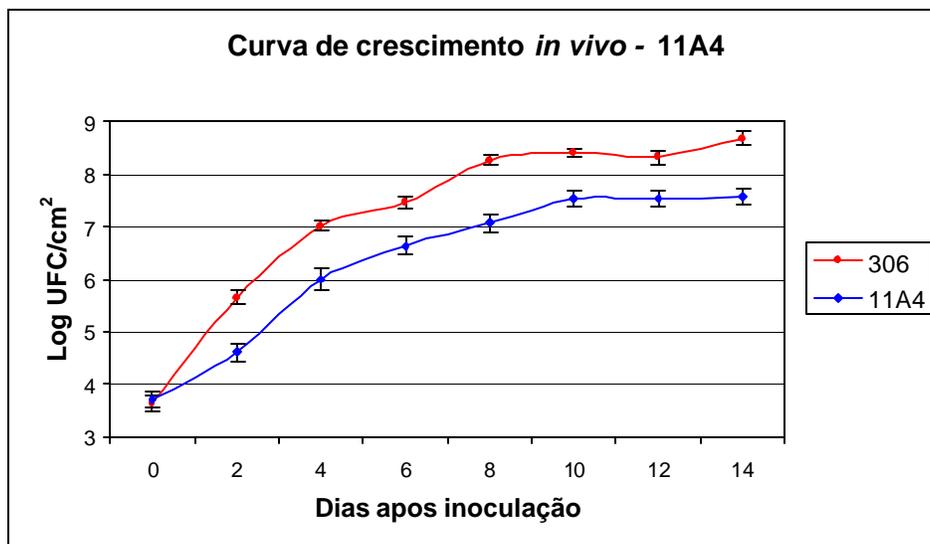


Figura 9: Curva de crescimento *in vivo* (*in planta*). Curva de crescimento *in planta* foram realizadas com inóculo de 10^3 ufc/mL durante 14 dias, respectivamente.

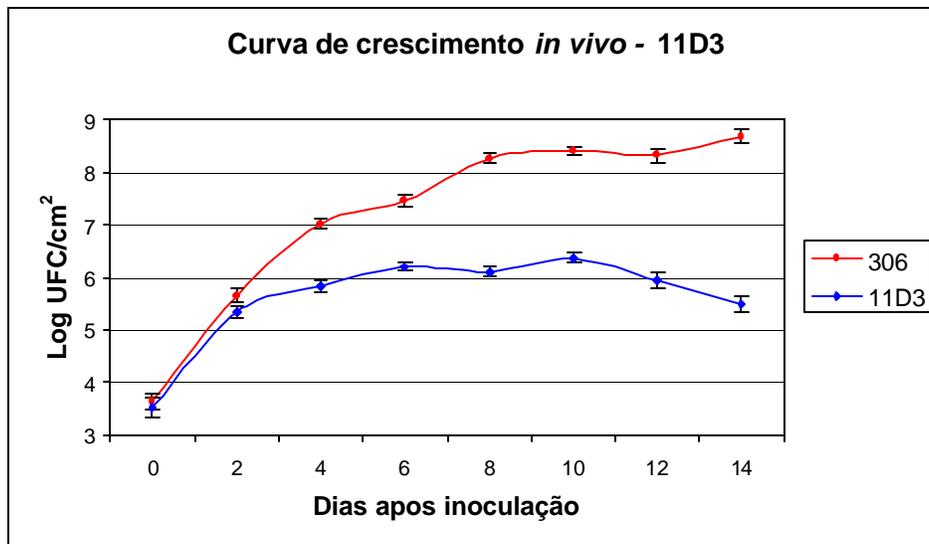


Figura 10: Curva de crescimento *in vivo* (*in planta*). Curva de crescimento *in planta* foram realizadas com inóculo de 10^3 ufc/mL durante 14 dias, respectivamente.

5.4 Produção das proteínas recombinantes.

Em análise de SDS-PAGE foi demonstrado que as proteínas HIS6-SUMO-DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase, HIS6-SUMO-PHA sintase e são produzidas em grande quantidade e na forma solúvel, já a HIS6-SUMO-Hipotética é pouco solúvel conforme as figuras 11, 12 e 13 respectivamente. Mas somente a proteína recombinante HIS6-SUMO-PHA sintase foi utilizada para produção e purificação em larga escala, purificada em coluna de Níquel, e o perfil eletroforético é mostrado na figura 14

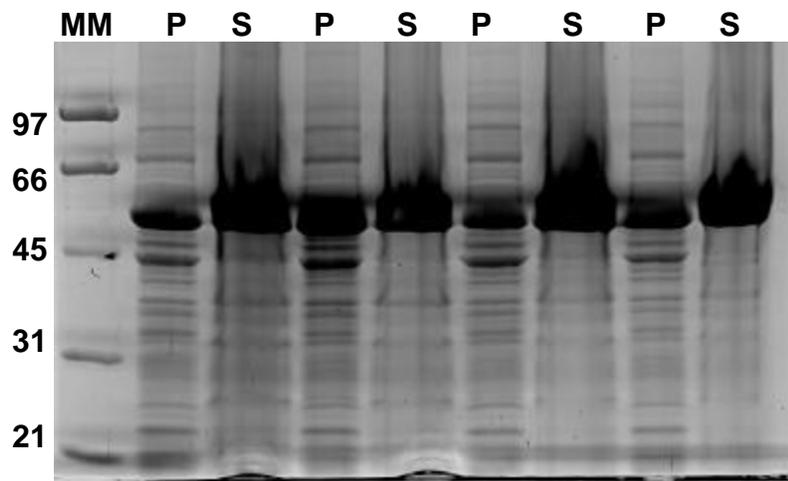


Figura 11. Eletroforese SDS-PAGE. Proteína DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase recombinante em gel de poliacrilamida (12%), visualizada por Coomassie Blue. A Proteína foi produzida com Tag de His6/SUMO no N-terminal. Marcador Molecular (MM), Precipitado (P) e Sobrenadante (S).

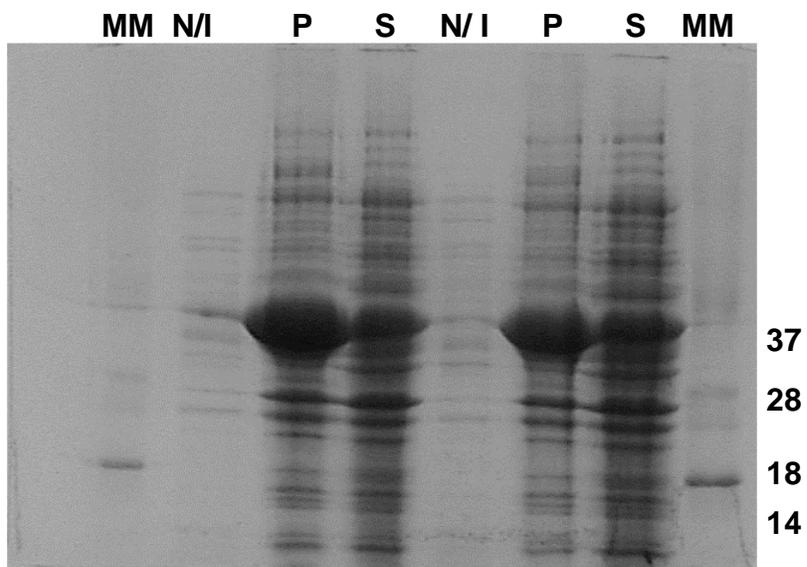


Figura 12. Eletroforese SDS-PAGE. Proteína hipotética recombinante em gel de poliacrilamida (12%), visualizada por Coomassie Blue. A Proteína foi produzida com Tag de His6/SUMO no N-terminal. Marcador Molecular (MM), Não Induzido (N/I), Precipitado (P) e Sobrenadante (S).

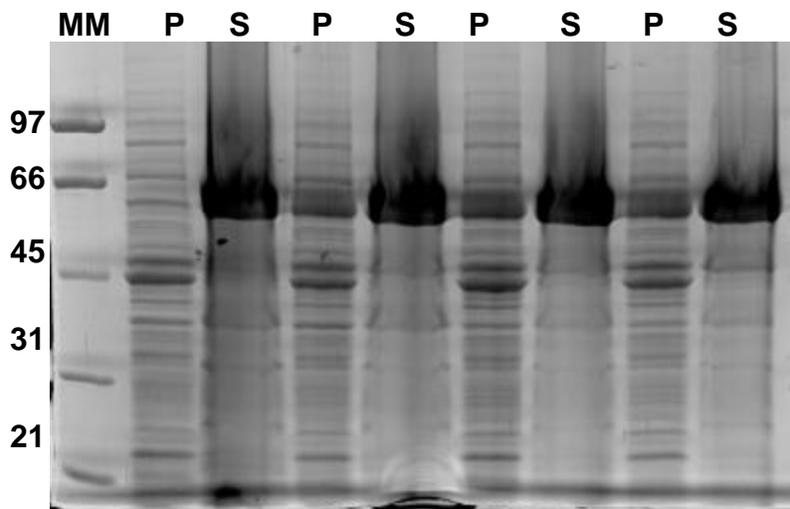


Figura 13. Eletroforese SDS-PAGE. Proteína DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase recombinante em gel de poliacrilamida (12%), visualizada por Coomassie Blue. A Proteína foi produzida com Tag de His6/SUMO no N-terminal. Marcador Molecular (MM), Precipitado (P) e Sobrenadante (S).

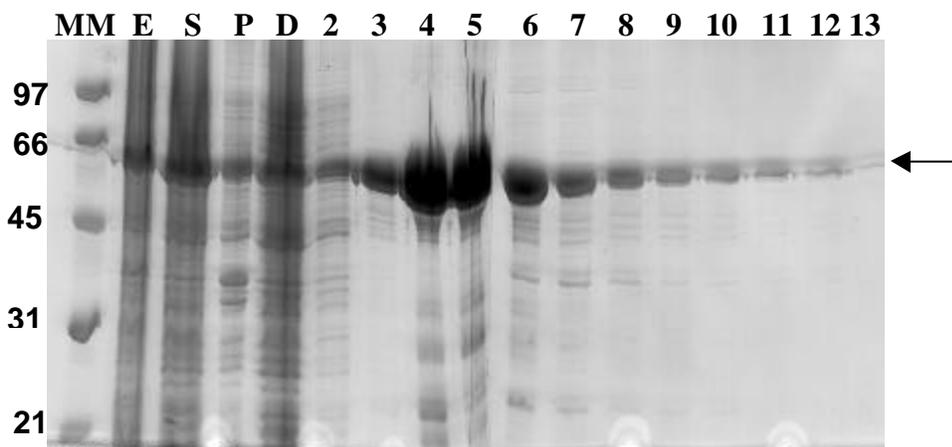


Figura 14- Eletroforese SDS-PAGE. Proteína PHA sintase (subunidade E) recombinante em gel de poliacrilamida (12%), visualizada por Coomassie Blue. A Proteína foi produzida com Tag de His6/SUMO no N-terminal. MM (Marcador Molecular em KDa); E (Extrato Bruto); S (sobrenadante); P (precipitado); D (Descarte coluna); 2 to 13 (tubos de cromatografia). A seta indica a proteína recombinante (~57kDa).

5.5 Análise dos ensaios cristalográficos.

A proteína subunidade E da Pha sintase (XAC2047), foi produzida em condições de ensaio cristalográfico a 5mg/mL. Para os ensaios foi utilizado o kit da Hampton

Reserch Corp. (*Crystal Screen 1*). Na condição 15 há alguns pequenos cristais em forma de agulhas, provavelmente são de sal, pois nesta condição há sulfato de amônio (como a placa já está sendo analisada desde 26/06/06, tais cristais são comuns depois de algum tempo). Em algumas situações como as condições 30, 31, 49 e 50 há bastante precipitado, talvez as amostras proteica estivessem muito concentrada, porém em outras condições nada apareceu ainda.

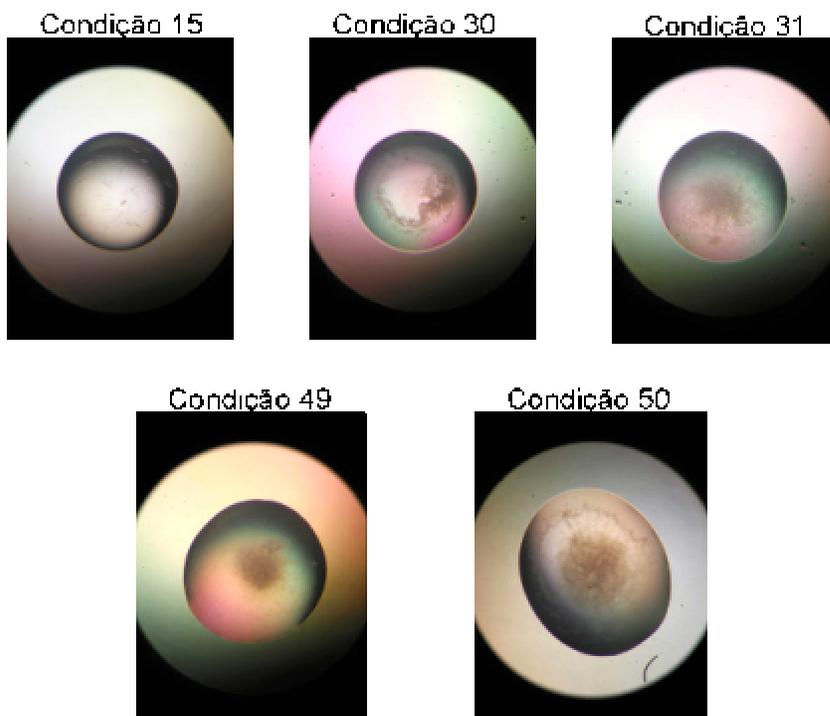


Figura 15 PHA sintase subunidade E de Xac em ensaio para condições de cristalização. As condições de cristalização cada poço, esta anexado no apêndice 1

6 - Discussão

Uma biblioteca de mutantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* - *Xac* (Levano-Garcia *et al* 2005) foi analisada por inoculação em plantas cítricas hospedeiras e três mutantes (6H10, 11A4 e 11D3) com alterações nos sintomas de cancro induzidos em plantas hospedeiras foram isolados e identificados por sequenciamento, estes três genes codificam diferentes proteínas de interesse da estirpe selvagem, trantando-se de uma DGTP, pirofosfohidrolase tiamina sintase, uma subunidade E da PHA sintase de tipo III e uma proteínas hipotética de *Xac* (Laia *et al.* resultados não publicados).

O fenótipo dos sintomas induzidos pelos mutantes 6H10, 11A4 e 11D3, foram confirmados por inoculação em plantas de *Citrus limonia*, em comparação com os sintomas induzidos pela *Xac* selvagem. O fenótipo de sintomas de cancro induzidos pelos mutantes 6H10, 11A4 e 11D3, foi igual aos anteriormente observados durante a análise do banco de mutantes, confirmando a estabilidade dos sintomas verificados, em comparação com os sintomas da selvagem. O mutante 6H10 da ORF XAC0789 que teve uma DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase mutada não induziu cancro nas inoculações em hospedeiro suscetível, quando comparado com a *Xac* selvagem nos primeiros 5 dias de infecção da doença. O mutante 11A4 da ORF XAC 2047 que teve a subunidade E da Pha sintase mutada induziu menos hiperplasia que a bactéria selvagem nos primeiros 5 dias da infecção, além de induzir uma clorose pronunciada em 5 dias de infecção, que

para a bactéria selvagem é visualizada em geral a partir do sétimo dia de infecção, dando início à fase necrótica da doença (Bergamin Filho & Amorim, 1999). O mutante 11D3 da proteína hipotética codificada pelo gene XAC1201 induziu menos sintomas e apresentou também menos hiperplasia, quando comparado com a *Xac* selvagem.

Com o intuito de validarmos o resultado de sequenciamento do gene mutado (Laia *et al.*, resultados não publicados), foi realizada uma confirmação molecular digerindo com enzimas de restrição as construções que foram seqüenciadas, contendo o fragmento genômico dos mutantes 6H10, 11A4 e 11D3 interrompidos pelo transposon utilizado na mutagênese, comparando-se o perfil destas digestões com os perfis de digestões *in silico* com as mesmas enzimas, a partir de seqüências destes loci na *Xac* estirpe 306 que teve o genoma totalmente seqüenciado. Desta forma foram validados o mapeamento da inserção do transposon nos genes que codificam as proteínas DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase, subunidade E da PHA sintase e proteína hipotética de *Xac*, procedemos então uma análise quantitativa do desenvolvimento de *Xac* selvagem e dos mutantes *in vivo*.

Como a análise de sintomas e registro fotográfico dos mesmos correspondem a uma análise qualitativa, foram realizadas curvas de crescimento *in vivo* (*in planta*) para os mutantes de *Xac* 6H10, 11A4, 11D3 e para a *Xac* 306 selvagem. No caso do mutante 6H10 as diferenças de crescimento já eram esperadas, dado que este mutante não induz cancro em plantas hospedeiras até o 5 dia de infecção, logo na primeira análise no segundo dia de infecção a diferença entre o mutante e o selvagem é de aproximadamente 20 vezes mais desenvolvido a *Xac* selvagem do que o mutante, por se tratar de uma enzima que participa na via de biossíntese de tiamina ou vitamina B1, é um constituinte essencial de todas as células, pois atua como cofator em dois complexos enzimáticos envolvendo o ciclo do ácido cítrico, piruvato desidrogenase e a-cetogluturato desidrogenase (de Almeida, 2004). A diferença continua a aumentar o decorrer dos dias de experimento, no sexto dia de infecção a diferença é de 35 vezes mais desenvolvido a doença *Xac* selvagem do que o mutante, no décimo dia a diferença é de ~ 45 vezes mais infecção da doença, mantendo esta diferença até o décimo quarto dia de infecção e último dia de experimento. A tiamina está envolvida na hidrogenação do piruvato a aCetil-CoA por ação do complexo piruvato desidrogenases (compostos por 3 enzimas e 5 grupos prostéticos compostos por FAD, C_ôa, NAD e lipoato) (Rossi, 2001), portanto o que pode

ter ocorrido com este mutante é que ele pode não conseguir mais ativar sua maquinaria enzimática para gerar energia rápida para a célula.

No caso do mutante 11A4 desde o segundo dia de análise e primeiro dia realizado após a tempo zero, a diferença entre mutante e selvagem é de ~ 10 vezes mais desenvolvido o selvagem do que o mutante, como a PHA sintase atua na síntese de grânulos de PHA que podem ser mobilizados como fonte de reserva da célula (Pötter *et al.*, 2005), podemos sugerir um papel para a PHA sintase de *Xac* é ativada somente quando o patógeno necessita de fonte direta de energia, por isso ela se desenvolve, mas não consegue acompanhar o desenvolvimento da estipe selvagem e onde podemos supor que reservas de energia na forma de grânulos de polihidroxialcanoato (PHA) possam contribuir para a sobrevivência do patógeno até o encontro com um novo hospedeiro cítrico.

A atividade da PHA sintase tipo III requer a expressão de ambas as subunidades PhaE e PhaC, a proteína PhaE sozinha mostrou-se completamente inativa e a PhaC isolada teve uma atividade insignificante (Liebergesell *et al.*, 1994, Müh *et al.*, 1999; Jia *et al.*, 2000 citados por Hai *et al.*, 2001). Até onde sabemos, esta é a primeira descrição de uma correlação entre a atividade da PHA sintase e a capacidade de desenvolvimento da *Xac* em plantas hospedeiras, e ainda, por se tratar de uma proteína de interesse para a produção de biopolímeros (Piemolini *et al.*, 2004), a subunidade E de PHA sintase de *Xac* foi expressa em *E. coli*, em fusão com os domínios HIS-6/SUMO, na forma solúvel, visando obtenção de cristais para estudos estruturais futuros.

Na curva do mutante 11D3, ficou evidente que nos primeiros dois dias de infecção o mutante cresce na mesma proporção que a *Xac* selvagem, entretanto no decorrer dos dias de experimento o mutante começa a diminuir o crescimento e no décimo quarto e último dia o mutante apresenta uma queda bastante significativa de crescimento em relação a *Xac* selvagem, cerca de 30 vezes menos. Em se tratando de um mutante em que a ORF codifica uma proteína hipotética, não podemos ainda correlacionar os resultados obtidos com a função desta proteína, ainda desconhecida. Entretanto recentemente (03/01/07) em uma busca realizada SWISS PROT (<http://ca.expasy.org/sprot/>), revelou que esta proteína pode estar relacionada com uma fosfohidratase dependente de Ferro, estas enzimas parecem estar envolvidas no

metabolismo de ácidos nucléicos, não transdução de sinal e possivelmente em outras funções nas bactérias, archaea e nos eucariotos.

7 Conclusão

Concluimos que a proteína da DGTP pirofosfohidrolase tiamina sintase ORF XAC0789, desempenha papel fundamental para que a *Xac* possa se multiplicar no hospedeiro cítrico e induzir sintomas de cancro, pois na análise do mutante deste gene (6H10) nenhum sintoma foi detectado aos cinco dias de inoculação e a curva de crescimento deste mutante não apresentou crescimento, em relação à curva padrão de *Xac*.

Sugerimos que o gene da subunidade E da PHA sintase ORF XAC2047, desempenha um papel importante na segunda fase de infecção da *Xac*, o mutante deste gene (11A4) quando analisado induz menos necrose, mas apresenta uma clorose pronunciada nos 5 primeiros dias de inoculação e este mutante apresenta um diferença de desenvolvimento de cerca de 10 vezes menos que a *Xac* selvagem nos dois primeiros dias de infecção da doença.

No caso do gene hipotético ORF XAC1201, que desempenha papel importante do décimo dia em diante, já que, a partir deste dia o mutante (11D3) apresentou um declínio considerado em relação a curva padrão da estirpe selvagem. Em nova análise realizada no SWISS PROT no dia 03/01/2007, há evidências que esta proteína tem relação com uma fosfohidratase dependente de ferro. Esta enzima está envolvida no metabolismo de ácidos nucleicos, na transdução de sinal e, possivelmente, desempenha outras funções em bactérias, entretanto são necessários outros experimentos para

validação destas informações obtidas através de análise por similaridade em banco de dados.

A análise qualitativa de sintomas alterados de cancro nos mutantes de *Xac* estudados, aliado à análise quantitativa evidenciando crescimento in planta menor que o observado para a *Xac* selvagem, torna estas proteínas boas candidatas para estudos estruturais.

8 Referências Bibliográficas.

- BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Manejo integrado de pragas (IPM): problemas conceituais para sua aplicação em fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília v. 24 (3), p. 385-390, 1999.
- BJORKHOLM, B. M.; OH, J. D.; FALK, P. G.; ENGSTRAND, L. G.; GORDON, J. I. Genomics and proteomics converge on *Helicobacter pylori*. **Current Opinion in Microbiol**. v. 4 p. 237-245, 2001.
- BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**. v. 292 p. 2275-2278, 2001.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends Biotechnol**. V. 5, p. 246-250, 1987.
- DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, et al.. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**. v. 417, p. 459-463, 2002.
- DE ALMEIDA, J. D. Origem, evolução e direcionamento da proteínas THI1 em plantas. 107p. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo (Piracicaba), Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, 2004.
- DOMENECH, P.; BARRY, C.E.; COLE, S. T. Mycobacterium tuberculosis in the post-genome age. **Current Opinion in Microbiology**. v. 4, p. 28-34, 2001.
- DONADIO, L.C. Produtividade dos citros em Israel. In: L.C. Donadio (Editor), Produtividade de citros. **FUNEP**, Jaboticabal, p. 47-62, 1988.

DOVE, A. Seeking purity in the proteomic era. **Genomics & Proteomics**. v.4, p.20-24, 2004.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: Kimati H, Amorim L, Bergamim Filho A, Carmargo LEA & Rezende, JAM **Manual de Fitopatologia**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 257-296, 1997.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. (<http://www.fundecitrus.com.br>).

GRAHAM, M. R.; SMOOT, L. M.; LEI, B.F.; MUSSER, J. M. Toward a genome-scale understanding of group A Streptococcus pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**. v 4, p. 65-70, 2001.

GIACOVAZZO, C. The diffraction of X-ray by crystals. In: Fundamentals of Crystallography. Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford **Science Publication**, New York, 2002.

HAI, T.; HEIN, S. AND STEINBÜCHEL, A. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19 **Microbiology**. v. 147, p. 3047–3060, 2001.

HASSE, G. A. Laranja no Brasil 1500 **Duprat & Iobe Propaganda**. São Paulo, 1987.

HWA, L. W.; POLIKARPOV, I. Biologia Estrutural, **Ciência Hoje**. v 25 nº 149, 1999.

JIA, J.; KAPPOCK, J.; FRICK, T.; SINSKEY, A. J. & STUBBE, J. Lipase provides a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate synthases: Characterization of the

functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. **Biochemistry**. v. 39, p. 3927-3936, 2000.

KEEN, N.T. Gene-for-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. **Annual Review of Genetics**. v. 24, p. 447-463, 1990.

LARANJEIRA, F. F.; PALAZZO, D. A. Danos qualitativos a produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**. v. 20(1), p. 77-91, 1999.

LEVANO-GARCIA, J.; VERJOVSKI-ALMEDIA, S. AND DA SILVA, A. C. R. Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers **BioTechniques**. v. 38 (2), p. 225-229, 2005.

LIEBERGESELL, M.; SONOMOTO, K.; MADKOUR, M.; MAYER, F. & STEINBÜCHEL, A. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. **Eur J Biochem**. v. 226, p. 71-80, 1994.

NAMEKATA, T.; ROSSI, A.C.; CERAVOLO, L.C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**. v. 17(1), p. 67-78, 1996.

MCCOOL, G. J. AND CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal Bacteriological**. v. 183, p. 4235-4243, 2001.

MÜH, U.; SINSKEY, A. J.; KIRBY, D. P.; LANE, W. S. & STUBBE, J. A. PHA synthase from *Chromatium vinosum*: Cysteine 149 is involved in covalent catalysis. **Biochemistry**. v. 38, p. 826-837, 1999.

- PIEMOLINI, L. T.; RÖSSLE, S. C.; BISCH, P. M.; , ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Mutação sítio específica de PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* a partir da modelagem estrutural da proteína. **XV COBEQ**. 26 - 29 setembro, 2004.
- PÖTTER, M.; MÜLLER, H. AND STEINBÜCHEL, A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16 **Microbiology**. v. 151, p. 825–833, 2005.
- REHM, B. H. A. AND STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.25, p. 3-19, 1999.
- REHM, B. H. A. Polyester synthses: natural ccatalysts for plastics. **Journal Biochemical**. v. 376, p. 15-33, 2003.
- ROMEIRO, S. R. In : Métodos de Bacteriologia de Plantas. Reginaldo Romeiro da Silva, editor. Editora da **Universidade Federal de Viçosa**. 2001.
- RODRIGUES, R. C. Condições de cultura para a produção de poli(3-Hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de industrias de alimento. 90p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina Centro Tecnológico Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, 2005.
- ROSSI, M. Desenvolvimento do processo de cultivo de Escherichia coli RR1. 139p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo (São Paulo), Pós Graduação em Engenharia. 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory Guide, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SHEU, D. S.; WANG, Y. T. AND LEE, C. Y. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**. v. 146, p. 2019–2025, 2000.

SHIN, D. H., ROBERTS A., JANCARIK J., YOKOTA H., KIM R., WEMMER D. E.; KIM, S. H. Crystal structure of a phosphatase with a unique substrate binding domain from *Thermotoga maritime*. **Protein Science**. v 12, p 1464–1472, 2003.

SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**. v. 406(6792), p. 151-157, 2000.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G; JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**. v. 268, p. 661-667, 1995.

SWISS PROT (<http://ca.expasy.org/sprot/>).

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Pathology**. v. 3, p. 291-298, 2000.

Apêndice 1

Crystal Screen™ - HR2-110 Scoring Sheet	Date:	Date:	Date:
1. 0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
2. 0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate			
3. 0.4 M Ammonium phosphate monobasic			
4. 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate			
5. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
6. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
7. 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 1.4 M Sodium acetate trihydrate			
8. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% v/v 2-Propanol			
9. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
10. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
11. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 1.0 M Ammonium phosphate monobasic			
12. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v 2-Propanol			
13. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400			
14. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 28% v/v Polyethylene glycol 400			
15. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000			
16. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.5 M Lithium sulfate monohydrate			
17. 0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
18. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000			
19. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% v/v 2-Propanol			
20. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 25% w/v Polyethylene glycol 4,000			
21. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
22. 0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
23. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400			
24. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 20% v/v 2-Propanol			
25. 0.1 M Imidazole pH 6.5, 1.0 M Sodium acetate trihydrate			
26. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
27. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 20% v/v 2-Propanol			
28. 0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000			
29. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate			
30. 0.2 M Ammonium sulfate, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000			
31. 0.2 M Ammonium sulfate, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
32. 2.0 M Ammonium sulfate			
33. 4.0 M Sodium formate			
34. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Sodium formate			
35. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.8 M Potassium phosphate monobasic			
36. 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 8% w/v Polyethylene glycol 8,000			
37. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 8% w/v Polyethylene glycol 4,000			
38. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate			
39. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 2% v/v Polyethylene glycol 400, 2.0 M Ammonium sulfate			
40. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 20% v/v 2-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000			
41. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 10% v/v 2-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000			
42. 0.05 M Potassium phosphate monobasic, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000			
43. 30% w/v Polyethylene glycol 1,500			
44. 0.2 M Magnesium formate dihydrate			
45. 0.2 M Zinc acetate dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000			
46. 0.2 M Calcium acetate hydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000			
47. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Ammonium sulfate			
48. 0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium phosphate monobasic			
49. 1.0 M Lithium sulfate monohydrate, 2% w/v Polyethylene glycol 8,000			
50. 0.5 M Lithium sulfate monohydrate, 15% w/v Polyethylene glycol 8,000			

HAMPTON
RESEARCH
Solutions for Crystal Growth

341 James
Also Viejo, CA 92586-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hmrail.com
Website: www.hamptonresearch.com