



ANÁLISE DE CHAPERONES HIPOTÉTICAS DA *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI*

Priscila Suemi Aoki (IC), Profa. Dra. Ljubica Tasic (Orientadora)

INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP

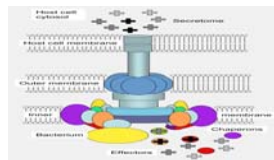
Palavras-chave: Chaperones – Eletroforese – Espectrometria de Massas

INTRODUÇÃO

O cancro cítrico é uma das mais graves doenças para a citricultura brasileira, que ataca todas as variedades e espécies de citros. Seu agente causador é o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), bactéria Gram-negativa, aeróbica e de fácil disseminação. Acredita-se que após de adentrar na folha ou fruto, a *Xac* utiliza sistemas secretórios, principalmente, sistemas III e IV¹ que diferem entre si pela injeção não só de proteínas, mas, também de DNA, para a célula hospedeira. Esses sistemas secretórios requerem o contato célula a célula e a presença de chaperones secretórias (CS), auxiliares de secreção. As CS têm capacidade de reconhecer proteínas alvo, interagir e dar a elas uma conformação competente à secreção. A existência dessas chaperones foi comprovada pelo estudo do genoma da *Xac*, que localizou um total de 40 genes potenciais com características de CS, i.e, tamanho de 8-23kDa, pI de 4,5-12,10 e estrutura secundária helicoidal com presença de α -hélice anfipática.²



Lesões provocadas pelo cancro cítrico



Sistema secretório (TTSS)

OBJETIVOS

Verificar a expressão de possíveis chaperones envolvidas no processo de translocação de proteínas de patogenicidade pelos sistemas de secreção III e IV da *Xac*.

Análise de extrato de casca por CG-EM antes e após inoculação para revelar dados sobre o consumo de moléculas nutrientes durante o crescimento da *Xac*.

METODOLOGIA

Crescimento de *Xac* a 37°C durante 24 horas em meio *Luria Broth* (LB) enriquecido com extrato diclorometânico de casca de laranja em comparação ao controle (somente meio LB). Lise das bactérias e verificação da expressão das proteínas-alvo pela eletroforese SDS-page em 1D e 2D. Aplicação de digestão enzimática com tripsina e posterior análise por MALDI-Q-TOF³ comprovando suas massas e seqüências primárias.

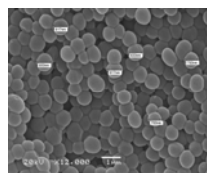
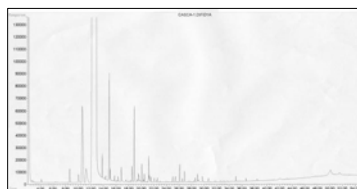


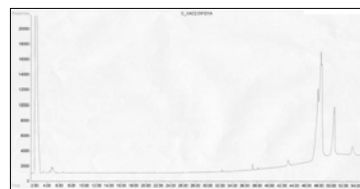
Foto da *Xac* em MEV

RESULTADOS

Análise de consumo de nutrientes por CG-EM

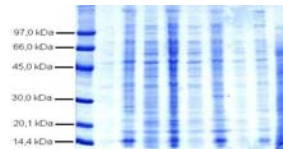


Espectro de CG-EM de casca de laranja antes da inoculação

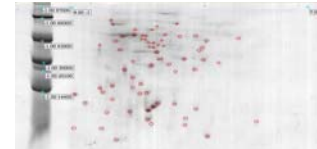


Espectro de CG-EM de casca de laranja após inoculação

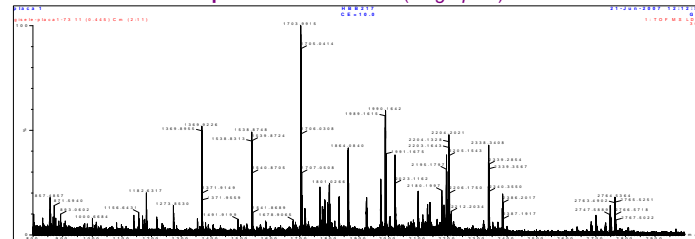
Eletroforese SDS-PAGE 1D



Eletroforese SDS-PAGE 2D



Espectro MALDI-Q-TOF (Fingerprint)



Q2EDT0_BACCE (Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen.- *Bacillus cereus* subsp. *cytotoxis* NVH 391-98). Nominal mass (Mr): 20855; Calculated pI value: 4.91 NCB/BLAST search. Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) Variable modifications: Oxidation (M) Cleavage by Trypsin; cuts C-term side of KR unless next residue is P Sequence Coverage: 25% Matched peptides shown in Bold

1 MLLIGTEVKP FK**ANAYHNGE FIVQVDES**LK GKWSVVCYFP ADFTFVCPTE
51 LEDLNQYAA LK**ELGVEVYS VSTDTHFTHK** AWHDSSETIG **KIEYIMIGDP**
101 **TR**TITSNFDV LVEEGLAAR ATFIDPDGI IQSVEINADG IGRDASILIN
151 KIKAAQYVRN NPGEVCPAKW KEGAKTLKPS LDLVGGI

Tabela obtida a partir de fingerprint com peso e seqüência dos peptídeos de uma proteína a ser comparada com genoma de *Xac*

Massa observada	Massa esperada	Massa calculada	Seqüência
1307,6703	1306,6630	1306,6591	K.IEYIMIGDPTR.T
1323,6621	1322,6548	1322,6540	K.IEYIMIGDPTR.T + Oxidation (M)
2035,9833	2034,9760	2034,9760	K.ANAYHNGE FIVQVDES LK.G
1259,6558	1258,6485	1258,6485	LELRLYVTPR
2049,0060	2047,0060	2047,9987	HTSAILEKGFMTMEANR

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os espectros de CG-EM, no tempo de retenção até 30 minutos, demonstra que o extrato diclorometânico de casca de laranja teve o consumo de moléculas de monoterpenos pela *Xac*, comprovando ser substratos deste fitopatógeno. Providenciamos os primeiros passos em comprovar a expectativa de que as chaperones-alvo, atualmente hipotéticas, sejam realmente chaperones de sistemas secretórios III e IV envolvidas no processo de infecção da planta. Após as análises de espectrometria de massas, em andamento, será possível comparar a seqüência de aminoácidos e concluir a expressão delas, o que auxiliará em definir as bases moleculares do cancro cítrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Galán, J.E.; Watz, H.W., *Nature*, 444, 567 (2006)
- Khater, L. et al., *Genetics and Molecular Biology*, 28, 321 (2005)
- Thiede, B. et al., *Methods*, 35, 237 (2005)

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, Alessandra Susselini e colaboradores
- Priscyla D. M. Gaspari (Prof. Dr. Nelson Duran)
- José Luis Paz Jara do Laboratório CROM_MASS, IQ-UNICAMP
- Laboratório de MAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)
- Gisele Denoni (Profa. Dra. Ljubica Tasic)
- Colaboradores do Laboratório de Química Biológica, IQ-UNICAMP.