

Caracterização do Papel Funcional das Proteínas Periplasmáticas do Sistema de Captação de Fosfato e *Xanthomonas citri* in vivo para Desenvolvimento de inibidores

Supervisora: Dra. Andrea Balan (Laboratório Nacional de Biociências)

Colaboradora: Vanessa Pegos

1. Introdução

Xanthomonas citri (*X. citri*) é uma bactéria fitopatogênica capaz de colonizar árvores frutíferas como laranja doce, limão, entre outras, causando a doença chamada cancro cítrico. Não existem drogas para a inibição do crescimento desta bactéria e a única forma de controle é a poda das árvores contaminadas e de milhares adjacentes à estas, o que causa grandes perdas econômicas ao Brasil, o segundo maior exportador de laranja e suco no mundo. O estudo sobre a fisiologia e metabolismo desta bactéria é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias de contenção que possam minimizar tais perdas e serem mais efetivas no tratamento. Neste sentido, nosso grupo tem trabalhado na caracterização de transportadores do tipo ABC desta bactéria envolvidos no transporte de íons como sulfato, nitrato e fosfato. Tais elementos são de fundamental importância para o crescimento de qualquer organismo e a deleção de componentes destas vias de transporte em *X. citri* tem mostrado uma associação direta com o desenvolvimento do cancro. Dentro do mecanismo de captação de fosfato, duas proteínas, PhoX e PstS, mostraram relevância em situações de carência deste íon, com níveis de expressão extremamente aumentados. Apesar das proteínas PhoX e PstS apresentarem alta identidade de sequência de aminoácidos (60%), PhoX foi produzida 16,4 vezes mais do que a proteína PstS nestes experimentos, sugerindo diferenças no perfil de atividade das mesmas. Para estudar o papel de ambas as proteínas na fisiologia da *X. citri* e desenvolvimento do cancro, utilizamos uma abordagem funcional baseada em experimentos de proteômica, expressão e purificação e construção de mutantes, e uma abordagem estrutural baseada em análises de bioinformática e modelagem molecular.

O presente projeto tem como objetivo completar a caracterização e comparação destas proteínas para finalização de um artigo científico, com foco em ensaios in vivo, a partir da infecção da bactéria em plantas de laranja-doce *Citrus sinensis*. Devem ser realizados dois tipos de experimentos: (i) análise da expressão de ambas as proteínas monitorada através de ensaios de Western blot utilizando anticorpos específicos e (ii) realização de ensaios de complementação da função da PstS em *Citrus sinensis* utilizando linhagens mutantes transformadas com o plasmídeo portador do gene pstS.

2. Objetivos

- a.** realizar experimentos de complementação da função da PstS de *X. citri* durante a infecção de folhas de *Citrus sinensis*;
- b.** monitorar a expressão das proteínas PhoX e PstS em ensaios in vitro e in vivo;

- c. expressar e purificar a proteína PstS de *X. citri* para realização de ensaios espectroscópicos e comparação com os ensaios já realizados de PhoX.

3. Metodologia empregada

a. Complementação de *X. citri* com o gene *pstS*

Os experimentos de complementação serão realizados com a linhagem de *X. citri* portadora de deleção no gene *pstS* transformada com o plasmídeo *pstSpkX33_pstS*. Infiltrações 10^3 UFC/mL serão realizadas nas folhas de *Citrus sinensis* para avaliação e acompanhamento visual do fenótipo durante 14 dias. Além disso, regiões de 1 cm² serão excisadas das folhas contendo cancro, submetidas a diluição seriada para o acompanhamento do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) também durante 14 dias. Isso permitirá acompanhar a progressão do cancro e averiguar a magnitude do crescimento bacteriano. Experimentos serão realizados em triplicatas em dias diferentes e receberão tratamento estatístico pertinente.

b. Testes de expressão da proteína PstS e PhoX in vitro e in vivo por western blotting

Folhas de *Citrus sinensis* serão infectadas com as linhagens selvagem e mutante de *X. citri* e monitoradas para a expressão das proteínas durante 14 dias, em intervalos de 24 horas. A cada 24 horas, as folhas serão retiradas, processadas e usadas para a detecção das proteínas de interesse por Western Blot utilizando-se os anticorpos específicos contra PstS e PhoX.

c. Análise funcional da proteína PstS e comparação com PhoX

Após a expressão da proteína PstS em células de *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade, a proteína será submetida aos ensaios espectroscópicos de CD e fluorescência para monitoramento do conteúdo de estrutura secundária e estabilidade térmica. Os dados serão comparados com os já obtidos para a proteína PhoX.

d. Finalização do artigo científico

Os resultados serão utilizados para a finalização de um artigo científico no qual o aluno participante do projeto será um dos autores.