

PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS NO ESTUDO DA BACTÉRIA CAUSADORA DO CANCRO CÍTRICO: GENÔMICA, TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA

ALEXANDRE MORAIS DO AMARAL^{1,2}, JULIANA CRISTINA BAPTISTA^{2,3}, FLÁVIA VISCHI WINCK^{2,3}, RAFAEL AUGUSTO HOMEM^{2,3} e MARCOS ANTONIO MACHADO²

RESUMO

No presente artigo, são descritos aspectos da utilização de ferramentas da genômica funcional e abordagens úteis na análise da bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, responsável por danos econômicos consideráveis para a citricultura brasileira. Com a disponibilização dos dados do genoma completo da bactéria, uma série de recursos de análise tem sido proposta para investigar fatores de sua patogenicidade e virulência, através de estratégias que englobam o estudo da expressão de seus genes e proteínas. As principais ferramentas utilizadas para o estudo dos genes da bactéria têm sido a mutagênese, a análise de expressão em tempo real (RT-qPCR), os arranjos de cDNA e a eletroforese bidimensional (2-D), algumas delas, muitas vezes, usadas em conjunto. Com isso, vários aspectos ligados à capacidade de a bactéria causar o cancro têm sido identificados, permitindo conhecer melhor como o seu material genético orienta a sua habilidade em infectar os tecidos de citros.

Termos de indexação: *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, genoma, proteoma, transcriptoma

¹ EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, 70770-900 Brasília (DF). E-mail: amaral@cenargen.embrapa.br

² Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP).

³ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP).

SUMMARY

TECHNOLOGICAL PLATFORMS FOR THE STUDY OF THE CAUSAL AGENT OF CITRUS CANCKER: GENOMICS, TRANSCRIPTOMICS, AND PROTEOMICS

This report describes aspects of using a number of tools from the functional genomics as well as approaches useful for the analysis of the causal agent of the citrus canker, the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, responsible for severe economical damages against the Brazilian citrus industry. As genomic data of this bacterium become available, various resources to analyze its biology have been used to investigate aspects of its pathogenicity and virulence, by using strategies regarding the study of gene expression and the resulting proteins themselves. The main resources used to study its genes are the mutagenesis, real-time quantitative PCR (RT-qPCR), cDNA arrays and bidimensional electrophoresis (2-D), which can be used simultaneously. Thus, a number of aspects related to its capacity to cause the disease have been identified and allowed to better characterize the ability of the bacterium to use its genes during the infection of citrus tissues.

Index terms: *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, genome, proteome, transcriptome

1. INTRODUÇÃO

O aumento considerável do volume de informações relativas aos genes e proteínas de bactérias, nos últimos anos, tem permitido a investigação global do efeito de vários fatores no comportamento do organismo causador do cancro cítrico: a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Além disso, em 2002, a própria bactéria teve o conjunto de seus genes (i.e., genoma) completamente identificado (DA SILVA et al., 2002), formando um catálogo de todo o seu material genético e tornando a informação disponível para que cientistas de todo o mundo pudessem investigá-lo. O principal objetivo de tal estudo foi determinar que genes são responsáveis pela capacidade de a bactéria causar a doença em citros; afinal estima-se que essa moléstia no

Brasil seja responsável pelo investimento anual de cerca de 50 milhões de reais em medidas de controle, inclusive na prevenção.

Com base nesse conjunto de genes, pode-se inferir, teoricamente, os recursos que a bactéria tem utilizado durante a infecção dos tecidos de citros. Tais informações poderiam revelar que toxinas a bactéria produz, a que tipo de antibióticos ela é suscetível ou resistente, entre outras. Enfim, dados que podem melhorar o entendimento da biologia do patógeno e, com isso, orientar a formulação de estratégias de controle. No entanto, a simples determinação das seqüências dos genes, embora de extremo valor científico, não é suficiente para afirmar-se que há a real contribuição dos mesmos genes no comportamento da bactéria. É necessário haver a comprovação experimental da sua função, enfim, como e quando a expressão dessas seqüências se manifesta.

Para que tais características possam ser investigadas, vários métodos de estudo da informação genômica são utilizados, os quais têm como base as três principais moléculas dos organismos vivos: o DNA, o RNA e a proteína, e que, por sua vez, apresentam as respectivas áreas de estudo denominadas genômica, transcriptômica e proteômica. Em verdade, estes termos recentes representam neologismos com o emprego do sufixo "oma" ou "ômica", que vêm do grego e significam "todo", "completo" ou "inteiro". Basicamente, essas áreas de estudo verificam o perfil global de expressão dos genes, combinado com o auxílio da bioinformática, para entender como "funciona" a célula viva, em suas diferentes condições. Enquanto a genômica visa estabelecer que genes estão presentes no repertório de recursos que o organismo possui, a transcriptômica estuda a atividade dos mesmos genes em determinado tempo ou local ou condição ambiental. Já a proteômica avalia a estrutura e a função das proteínas resultantes da expressão gênica. De fato, todas as especialidades surgidas a partir da determinação da seqüência de nucleotídeos têm sido consideradas como pertencentes à "era pós-genômica".

A partir dessas três abordagens, diversos campos de estudo têm sido formados, como a metabolômica (análise global de todos os metabólitos celulares), nutrigenômica (uso da informação gerada por todas as plataformas citadas para o entendimento da nutrição humana), fisioma (interação de todos os processos fisiológicos), neurogenômica (estudo dos genes associados ao sistema nervoso central), farmacogenômica (estudo de como os genes respondem às drogas), metagenômica (estudo dos genes de organismos não

cultiváveis), entre outros. A investigação dos fatores que atuam na biologia do organismo causador do cancro cítrico pode ser auxiliada por tais especificidades, sobretudo no que se refere às ferramentas da genômica, da transcriptômica e da proteômica, e serão discutidas neste artigo com ênfase na aplicabilidade da informação gerada para o entendimento da patogenicidade e virulência da bactéria *X. axonopodis* pv. citri.

2. GENÔMICA

É um desenvolvimento recente da genética que estuda os padrões genéticos de larga escala que possam existir no genoma (e em todo o DNA) de uma espécie em particular. Esse ramo da genética depende da existência de genomas completamente seqüenciados e de ferramentas computacionais desenvolvidas pela bioinformática que permitam a análise de grande quantidade de dados.

De forma geral, a genômica pode ser dividida em diferentes abordagens, a saber, genômica estrutural, funcional e comparativa. Essa última estuda a relação entre os genomas de diferentes espécies, patovares, linhagens etc., e sua função é permitir inferências quanto à função de genes ou origem de determinadas características a partir de similaridades ou diferenças entre organismos e suas seqüências genéticas. A expressão "genômica estrutural" apresenta diferentes conceitos: enquanto alguns a definem como a técnica de determinação da seqüência de nucleotídeos de determinado organismo (o que seria o "seqüenciamento" propriamente dito), outros a definem como o estudo da estrutura tridimensional de proteínas a partir de dados do genoma. Por sua vez, a genômica "funcional" é um termo ainda mais amplo e que muitos qualificam como aqueles estudos (e que incluem a transcriptômica e a proteômica) que se utilizam da informação genômica para analisar a função gênica, independente da abordagem.

A pesquisa em genômica no País teve incentivo marcante em maio de 1997, quando a Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado de São Paulo (Fapesp) organizou a rede ONSA, sigla em inglês para o Instituto Virtual de Genômica, formada inicialmente por 30 laboratórios ligados a instituições de pesquisa do Estado de São Paulo. Em parceria com o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), o primeiro projeto brasileiro decifrou o material genético da bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da clorose variegada dos citros, que causa prejuízos da ordem de 150 milhões de reais por ano aos

produtores de laranja no Estado. A escolha do organismo se deu não só por sua importância socioeconômica, mas pelo tamanho de seu genoma, pequeno o bastante para viabilizar um primeiro projeto e suficientemente grande para envolver e formar muitos pesquisadores numa área situada na fronteira do conhecimento. O projeto foi concluído em novembro de 1999, e o País entrou para a história pelo primeiro seqüenciamento de um fitopatógeno de importância econômica. Com isso, vários grupos de pesquisa se formaram pelo País e hoje existem equipes em todas as regiões aptas a fazer seqüenciamento e analisar seqüências genéticas.

Dessa forma, o seqüenciamento completo de várias bactérias fitopatogênicas, incluindo *X. axonopodis* pv. citri, tem ampliado as possibilidades de estudos sobre genoma funcional. Já a grande diversidade de bactérias que causam doenças em plantas, incluindo espécies Gram-positivas e negativas e o elevado número de patovares e raças, tornam árdua a tarefa de descrever os mecanismos de patogenicidade e virulência nas bactérias fitopatogênicas. A identificação de genes direta ou indiretamente relacionados com o processo de patogênese é de suma importância para o entendimento de uma doença. Com o uso de recursos da genômica, tais genes têm sido caracterizados e auxiliado no estudo da colonização do hospedeiro (BRUMBLEY et al., 2002 e 2004; CHO et al., 2006). No caso de bactérias fitopatogênicas, genes que de alguma forma auxiliam na interação da bactéria com a planta estão fortemente relacionados com o sucesso da infecção (DEBROY et al., 2004; MINSAVAGE et al., 2004).

A análise genômica associada à análise da repercussão no comportamento do organismo de potenciais genes envolvidos com a infecção bacteriana, como aqueles que provocam a adaptação da bactéria na superfície foliar e a secreção de proteínas que causam diretamente a lesão, têm auxiliado o entendimento da virulência de vários fitopatógenos (GAURIVAUD et al., 2002; OKINAKA et al., 2002). Sem dúvida, uma das principais ferramentas úteis na análise de dados genômicos é a mutação genética através da transformação genética, o que é possível também em *X. axonopodis* pv. citri (AMARAL et al., 2005), e que visa “anular” a atividade de determinado gene e avaliar esse efeito no organismo, enfim, é a análise pela “perda de função” (THANASSI et al., 2002; YOUNG & DONG, 2003).

No caso de *X. axonopodis* pv. citri, embora durante a anotação do genoma (i.e., atribuição de função à uma seqüência genética, sem informação

experimental) tenham sido encontradas várias seqüências homólogas a genes envolvidos no processo de patogenicidade, o que sugere alguma função na bactéria, há poucas informações da relevância ou funcionalidade de tais proteínas na colonização, embora cada vez mais seja indicada a possibilidade de tais enzimas funcionarem no processo de virulência (JHA et al., 2005; LIU et al., 2005).

Entre as seqüências identificadas no genoma da bactéria causadora do cancro cítrico, cerca de 1/3 não apresenta função determinada, o que pode também significar novas perspectivas de maior número de genes relacionados a tal função. Adicionalmente, localizaram-se seqüências que codificariam para proteínas envolvidas no transporte de macromoléculas em várias bactérias Gram-negativas e que são classificadas com base em sua função e homologia, o que inclui os sistemas de secreção do tipo I, II, III e IV. O sistema de secreção do tipo III é responsável, entre outros mecanismos, pela “injeção” no hospedeiro de grande parte das proteínas associadas ao processo de infecção, incluindo proteínas de avirulência e, por isso, está intimamente ligado à doença em plantas suscetíveis ou ao “disparo” do mecanismo de resistência em plantas resistentes, normalmente denominado de “hipersensibilidade” (LIM & KUNKEL, 2004; MINSAVAGE et al., 2004). Em recente estudo em *X. oryzae* pv. *oryzae* sobre o papel de um regulador gênico (HrpXo) no sistema de secreção do tipo III, detectou-se também a regulação, pelo mesmo fator, da secreção da enzima cisteína de protease, que é secretada pelo sistema de secreção do tipo II, o que indica uma interação entre ambos os sistemas (FURUTANI et al., 2004).

Embora a patogenicidade e virulência de *X. axonopodis* pv. *citri* estejam altamente associadas com a atividade de um simples gene de avirulência (*pthA*), que codifica para proteína inserida no interior da célula da planta de citros através do sistema de secreção do tipo III e que induz hipertrofia, hiperplasia e necrose (SWARUP et al., 1991; 1992; DE FEYTER et al., 1993; YANG & GABRIEL, 1995a; KANAMORI & TSUYUMU, 1998; DUAN et al., 1999), pouco se sabe a respeito dos demais produtos gênicos envolvidos nesse processo. O estudo da transcrição desses genes sob condições naturais seria boa alternativa para identificar todos os elementos envolvidos na patogenicidade e virulência desse patógeno.

Estudos recentes para caracterizar funcionalmente genes de *X. axonopodis* pv. *citri*, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, realizaram-se com

a produção de mutantes a partir de inserções aleatórias de *transposon* e sítio-dirigidas (BAPTISTA, 2006). Identificaram-se genes envolvidos no transporte (como o sistema de secreção do tipo II) e produção de proteínas relacionadas à degradação de celulose e possível papel na capacidade infectiva e adaptativa da bactéria. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que células de *X. axonopodis* pv. citri são capazes de hidrolisar compostos celulósicos, ou seja, apresentam a capacidade de degradar celulose do hospedeiro, propriedade que pode atuar, de alguma forma, na adaptação do fitopatógeno à planta de citros. Estudos realizados com outros microrganismos (CHATERJEE et al., 1995, 2002; SPRIRIDONOV & WILSON, 2000; ZHOU & INGRAM, 2000; ZORREGUIETA et al., 2000; MURASHIMA et al., 2003) mostram que essa descoberta em *X. axonopodis* pv. citri é compatível com a função que o sistema de secreção tipo II exerce, ou seja, a secreção extracelular de enzimas hidrolíticas (BALL et al., 1999; HU et al., 2002).

Dessa forma, embora o genoma completo de *X. axonopodis* pv. citri tenha permitido a identificação de informações genéticas para a exploração de suas características biológicas, funções de seqüências importantes que codificam para proteínas precisam ser designadas, assim como grande número de genes, incluindo determinantes de virulência, até então não definidos experimentalmente.

3. TRANSCRIPTÔMICA

Enquanto transcriptoma é o conjunto de RNA mensageiros (mRNA) produzidos por um organismo, ou seja, é o resultado da expressão gênica, a transcriptômica é o estudo desse montante de moléculas. O princípio desse tipo de estudo é a associação que se faz entre a condição em que o organismo se encontra e o seu padrão de expressão de genes na mesma condição: genes que se comportam similarmente podem ser controlados da mesma forma. Em outras palavras, os organismos respondem às mudanças do meio modulando a expressão de seus genes. Esse processo permite a adaptação e sobrevivência em diferentes condições ambientais. Todos os transcritos gênicos (RNAs) de uma determinada célula ou tecido, em uma determinada condição, constituem o transcriptoma.

Entre as principais formas de estudo da expressão gênica estão os arranjos de cDNA e análise de expressão por tempo real (“PCR quantitativo em tempo real” ou RT-qPCR) e *Northern Blot*. O conceito dos arranjos de

cDNA baseia-se na habilidade de uma molécula, geralmente de mRNA, pa-
rear-se (hibridar-se) com a molécula de DNA que lhe deu origem (codante),
permitindo a marcação em forma de arranjo e conseqüente identificação.

O fato de a concentração relativa dos transcritos de um gene ser di-
retamente proporcional ao seu nível de expressão permite, através da quan-
tificação dos transcritos, inferir sobre os níveis de expressão desse gene em
condições específicas.

Muitos métodos foram desenvolvidos com o objetivo de medir a con-
centração relativa dos transcritos gênicos. Estudos capazes de quantificar a
expressão de genes são extremamente importantes no estudo de patógenos,
pois permitem identificar com precisão o efeito do seu funcionamento em
diferentes situações, tais como no processo de instalação no hospedeiro e
na resposta a tratamentos químicos, entre outros (OKINAKA et al., 2002;
VOLOUDAKIS et al., 2005).

Até pouco tempo, a análise da expressão gênica era feita com méto-
dos que avaliavam poucos genes de cada vez, tais como: *Northern Blotting*
(WOUTERS et al., 2003), hibridização *in situ* (AMANNET et al., 2001),
“RNase protection assays” (WILDERMAN et al., 2001) e a transcrição re-
versa da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) (PIRNAY et al., 2002).

Com o advento do RT-qPCR, técnica que permite quantificar o núme-
ro de cópias (cDNA) da seqüência alvo, é possível a análise comparativa
entre o número de cópias desse molde de DNA e a quantidade de mRNA que
o gerou. Com isso, há uma relação direta entre o número de cópias avaliado
e os níveis de expressão de determinado gene. Tal estratégia tem permitido
análises globais da expressão de genes de interesse patológico (BENDERS
et al., 2005; SCHMID et al., 2005).

A técnica *Northern Blot* é um método que fornece informações sobre
o tamanho do mRNA e integridade da amostra, enquanto o “RNase pro-
tection assays” é mais usado para mapear sítios de iniciação e terminação
dos transcritos e discriminar mRNAs relacionados de tamanhos similares, os
quais migrariam em posições similares em um *Northern Blot*. Hibridização
in situ é o método mais complexo, porém é o único que permite a localização
dos transcritos de células específicas em seus tecidos. A principal limitação
desses três métodos é a baixa sensibilidade comparativa; já existem métodos
que, embora ainda não empregados em *X. axonopodis* pv. *citri*, são capazes
de identificar alterações de expressão em células individualizadas, como a

amplificação *in situ* (ou “*in situ* RT-PCR”) (BREHM-STECHER & JOHNSON, 2004; SHARKEY et al., 2004).

O grande número de novos genes descobertos nos projetos genomas e o desenvolvimento dos arranjos de DNA favoreceram nova abordagem no estudo da regulação gênica, possibilitando o estudo da expressão gênica em larga escala. A análise em escala genômica da expressão de genes em tempos específicos ou sob determinadas circunstâncias ambientais e fisiológicas constitui uma abordagem de alta performance para a investigação do comportamento de milhares de genes ao mesmo tempo, em condições que possam permitir inferências sobre a função de grupos de genes co-regulados.

A técnica de arranjos de DNA (*DNA-array*) é uma potente ferramenta para a análise da expressão gênica em larga escala, utilizando-se de dados da anotação do genoma para subsidiar a identificação de fatores de virulência microbianos, bem como os seus co-reguladores.

Bactérias fitopatogênicas modulam a expressão de seu arsenal de infecção, driblam os mecanismos de defesa da planta e propiciam um meio adequado para sua sobrevivência e multiplicação. Por sua vez, as plantas controlam a expressão de proteínas que procuram reconhecer os patógenos e restringi-los ao sítio de infecção, não permitindo a sua multiplicação e conseqüente manifestação da doença.

No gênero *Xanthomonas* e em muitos outros gêneros de bactérias fitopatogênicas Gram-negativas, esse arsenal de infecção é constituído principalmente pela expressão dos genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*), *avr* (*avirulence*) e *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*). Em um estudo comparativo de genes expressos em *X. axonopodis* pv. citri crescida em meio rico e meio XVM2 (que mimetiza o espaço intercelular vegetal), por meio da técnica de microarranjo de DNA, analisou-se o perfil de expressão de 279 genes provavelmente envolvidos com virulência e patogenicidade, constatando-se a expressão diferencial de 37 genes, sendo 30 regulados positivamente e 7 negativamente, quando a bactéria cresceu em meio XVM2 (ASTUA-MONGE et al., 2005).

4. PROTEÔMICA

Nos últimos anos, tem-se ampliado cada vez mais a idéia de que o conhecimento do genoma de um organismo representa apenas um primeiro passo para a compreensão dos complexos sistemas biológicos. As fun-

ções biológicas não são executadas por um genoma estático, mas, sim, pelo conjunto de proteínas sintetizadas em resposta a influências extracelulares, influências essas que determinam a regulação da expressão dos genes e das proteínas (DE KEERSMAECKER et al., 2006).

As potencialidades do estudo de proteínas são diversas e, talvez por isso, exista um aumento gradativo do interesse no estudo de proteomas. Inicialmente, usou-se o termo proteoma na designação do conjunto de proteínas expressas em um organismo ou tecido; entretanto, diversas novas qualificações para o termo têm sido mencionadas.

Por se tratar de um elemento altamente dinâmico, que varia de acordo com o estado celular e em resposta às condições externas ao organismo, o conjunto de proteínas sintetizadas não somente retrata as respostas moleculares em determinado momento biológico, mas, também, mostra as sutis variações em seu próprio conjunto de proteínas, seja pela presença de isoformas ou, mesmo, de modificações pós-traducionais das proteínas (HOOG & MANN, 2004). Esses fatores tornam o estudo do proteoma relevante, visto sua forma complementar a genômica e a genômica funcional, e suas potencialidades no reconhecimento dos principais executores de atividade biológica.

Considerando aqui o desenvolvimento das doenças causadas por bactérias, acredita-se que grande número de moléculas sinalizadoras externas e internas a própria célula e processos de transdução de sinais estejam presentes nas bactérias para ajustar sua composição protéica diante de alterações ambientais. Mesmo que diferentes espécies de bactérias possam utilizar mecanismos moleculares semelhantes e de alguma maneira conservados, a maioria das reações que ocorrem são específicas e dependentes das preferências ambientais de cada espécie bacteriana (BRÖTZ-OESTERHELT et al., 2005).

As tecnologias proteômicas atualmente englobam técnicas visando ao estudo em larga escala de proteínas e complexos protéicos. Diversos estudos sobre proteoma baseiam-se em métodos de separação e detecção simultânea de proteínas utilizando técnicas como a eletroforese bidimensional ou cromatografias, acoplados a métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação e quantificação de níveis de expressão de proteínas por espectrometria de massas (WITTMANN-LIEBOLD et al., 2006).

A eletroforese bidimensional consiste em uma técnica ainda muito utilizada nas análises de proteomas que permite a separação, de acordo com o

ponto isoelétrico e massa molecular, de centenas a milhares de proteínas simultaneamente em um mesmo gel de poliacrilamida (O' FARRELL, 1975), permitindo, ainda, uma quantificação relativa da expressão das proteínas. As separadas no gel podem ser retiradas e analisadas por diversos métodos de espectrometria de massas, possibilitando sua identificação.

Entretanto, contrariamente ao que ocorre com o estudo de DNA e RNA, em que mesmo quantidades mínimas dessas moléculas podem ser multiplicadas (PCR) e analisadas, até o momento não existe nenhuma plataforma tecnológica aplicável para o estudo de proteomas que se equipare às técnicas usadas nos estudos de ácidos nucléicos. Uma das mais severas limitações dos estudos de proteoma utilizando a eletroforese bidimensional é a dificuldade de detecção de proteínas de baixa abundância, o que pode reduzir a chance da identificação de proteínas regulatórias, geralmente pouco expressas, que, em muitos casos, são consideradas como a parte mais interessante do estudo de um proteoma (HAMDAN & RIGHETTI, 2003).

Em *X. axonopodis* pv. citri, ferramentas da proteômica são particularmente úteis na investigação de interações existentes entre as suas proteínas que formam complexos sistemas de sinalização e secreção, pois tais associações são críticas na capacidade da bactéria em promover a colonização do hospedeiro através da secreção de componentes da patogenicidade (ANDRADE et al., 2006).

Outras tecnologias aplicadas para os estudos em larga escala envolvem o uso de microarranjos contendo anticorpos ou proteínas recombinantes, e existem ainda as análises estruturais, permitindo o reconhecimento de estrutura e localização celular das proteínas e análises dos complexos protéicos. Concomitantemente ao avanço das novas tecnologias para o estudo de proteomas, outras formas de quantificação relativa da expressão de proteínas estão sendo desenvolvidas e aplicadas, acoplando-se métodos cromatográficos e marcações isotópicas de peptídeos que podem então ser identificados em espectrômetros de massa capazes de reconhecer as diferentes marcações isotópicas, sem que haja necessidade do uso da eletroforese bidimensional. Dessa forma, realiza-se a quantificação relativa das proteínas de acordo com a intensidade dos sinais gerados por cada peptídeo analisado (HOOG & MANN, 2004).

Mesmo essas técnicas robustas possuem suas limitações, como as relacionadas à sensibilidade para a detecção de proteínas de baixa abundância

celular, à correta interpretação dos dados gerados e à necessidade de programas computacionais capazes de processar o grande número de informações geradas (BRÖTZ-OESTERHELT et al., 2005).

Além da identificação das proteínas como unidades biologicamente ativas, o reconhecimento das interações entre elas tem-se tornado alvo de estudos em larga escala na tentativa de identificar as vias metabólicas utilizadas pelos microrganismos, bem como proteínas que, possivelmente, atuam conjuntamente durante a patogênese. Para isto, técnicas envolvendo sistemas de purificação de afinidade e espectrometria de massas estão sendo utilizadas para a identificação dessas proteínas. O aumento da geração de dados provenientes desses trabalhos em larga escala contribuem para a crescente necessidade do desenvolvimento de ferramentas ou plataformas computacionais capazes de integrar as informações obtidas e extrair informações biologicamente relevantes (SMITH & FIGEYS, 2006).

O estudo da interação entre proteínas presentes em *X. axonopodis* pv. citri pode-se realizar também com o auxílio da técnica de duplo-híbrido de levedura, que tem permitido identificar a associação entre proteínas com função até então desconhecida e outras associadas à capacidade da bactéria em causar a doença, como *rpf* e aquelas dos sistemas de secreção do tipo III e IV (ALEGRIA et al., 2004, 2005; ANDRADE et al., 2006).

Os resultados obtidos em estudos sobre proteoma de bactérias fitopatogênicas têm aumentado gradativamente a compreensão dos possíveis mecanismos biológicos envolvidos com o processo de patogenicidade.

Efetuar-se poucas análises da alteração da expressão de proteínas de alguns fitopatógenos. Estudaram-se os perfis proteômicos resultantes de variações da expressão de proteínas em resposta a diversos fatores, como a composição do meio de cultivo das bactérias ou a presença de extratos proteômicos do hospedeiro. Outras abordagens extraíram o próprio patógeno diretamente do hospedeiro infectado na busca por proteínas diferencialmente expressas.

Estudos comparativos do proteoma da bactéria causadora da bacteriose em maracujazeiros, *X. axonopodis* pv. passiflorae, mostraram a expressão diferencial de proteínas quando o patógeno é submetido a crescimento em meio de cultivo contendo extrato de folhas da planta hospedeira. Entre as proteínas superexpressas nessas condições, encontraram-se a proteína de membrana externa XadA e duas proteínas hipotéticas com funções ainda não

conhecidas (gb_AAM38569.1 e gb_AAM42952.1) (TAHARA et al., 2003). O produto do gene *xada* de *X. oryzae* pv. *oryzae* parece atuar como uma proteína de adesão não-fimbrial potencialmente envolvida com a virulência (RAY et al., 2002).

Nos estudos de proteoma comparativo do agente causador do cancro cítrico, *X. axonopodis* pv. *citri*, cultivada em meio contendo extrato de folhas de citros, houve a demonstração de alteração da expressão de 12 proteínas das quais cinco foram identificadas como sendo superexpressas, revelando a presença de enzimas, proteínas relacionadas às condições de estresse e uma proteína de membrana, denominada MrkE, possivelmente envolvida na regulação da formação de fimbria tipo III (ALLEN et al., 1991; MEHTA & ROSATO, 2001, 2003).

Análises do proteoma extracelular de *X. campestris* pv. *campestris* identificaram 68 proteínas, destacando-se enzimas de degradação de parede celular, enzimas proteolíticas e proteínas de membrana. De acordo com as análises computacionais das proteínas identificadas, mais da metade (53%) das proteínas apresentaram possibilidade de possuir um peptídeo sinal. Aproximadamente 22% das proteínas identificadas na fração extracelular são hipotéticas, com funções ainda não descritas (WATT et al., 2005). Informações obtidas com bactérias do mesmo gênero de *X. axonopodis* pv. *citri* podem auxiliar, consideravelmente, o seu entendimento, uma vez que apresentam alta semelhança ao nível genético, sobretudo no caso de *X. campestris* pv. *campestris*, pois embora infecte outro hospedeiro, apresenta acima de 80% de similaridade genética com a bactéria causadora do cancro cítrico (DA SILVA et al., 2002).

Nos estudos de proteoma, é possível verificar a identificação de dezenas de proteínas ditas “hipotéticas”, que não apresentam ainda nenhuma função descrita. Isso mostra a necessidade de avanço nas análises para caracterização funcional de tais moléculas, na busca da elucidação da participação de tais proteínas nos fenômenos biológicos.

Visto a grande diversidade de patógenos bacterianos de interesse e o rápido desenvolvimento das tecnologias para o estudo de proteomas, é possível que muitos outros trabalhos de proteômica venham a ser realizados na tentativa de encontrar proteínas que possam ser elementos-chave no processo de patogenicidade. A integração das informações geradas pelas diferentes abordagens metodológicas pode certamente auxiliar nessa busca.

Com base no exposto, percebe-se que plataformas biotecnológicas utilizadas para investigar a genética da bactéria *X. axonopodis* pv. citri, a partir das diferentes áreas do conhecimento e, sobretudo, pela análise global de seus genes, transcritos e proteínas, compreendem uma estratégia de considerável importância no entendimento do comportamento desse organismo e têm permitido à ciência elucidar vários aspectos relacionados a como ela causa a doença e indicar alvos que podem ser eleitos para orientar alternativas de manejo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIA, M.C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.; DA SILVA, A.C. & FARAH, C.S. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.18, p.6186-6197, 2004.
- ALEGRIA, M.C.; SOUZA, D.P.; ANDRADE, M.O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.; DA SILVA, A.C. & 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. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.7, p.2315-2325, 2005.
- ALLEN, B. L.; GERLACH, G. F. & CLEGG, S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.916-920, 1991.
- AMANN, R.; FUCHS, B. M. & BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.12, p.231-236, 2001.
- AMARAL, A. M. DO; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J. C. & MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by eletroporation. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p.292-294, 2005.
- ANDRADE, M. O.; ALEGRIA, M.C.; GUZZO, C. R.; DOCENA, C.; ROSA, M. C.; RAMOS, C.H. & FARAH, C.S. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Molecular Microbiology**, v.62, n.2, p.537-551, 2006.
- ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S.A. & MACHADO, M. A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.3, p.1201-1205, 2005.

- BALL, G.; CHAPON-HERVÉ, V.; BLEVES, S.; MICHEL, G. & BALLY, M. Assembly of XepR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.382-388, 1999.
- BAPTISTA, J.C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. 2006. 110p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Unicamp, Campinas, 2006.
- BENDERS, G. A.; POWELL, B. C. & HUTCHISON, C. A. III. Transcriptional analysis of the conserved *ftsZ* gene cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.4542-4551, 2005.
- BREHM-STECHER, B. F. & JOHNSON, E. A. Single-Cell Microbiology: tools, technologies, and applications. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.68, p.538-559, 2004.
- BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BADOW, J.E. & LABISCHINSKI, H. Bacterial proteomics and its role in antibacterial drug discovery. **Mass Spectrom. Rev.**, v.24, n.4, p.549-565, 2005.
- BRUMBLEY, S. M.; PETRASOVITS, L. A.; BIRCH, R. G. & TAYLOR, P. W. J. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.15, n.3, p.262-268, 2002.
- BRUMBLEY, S. M.; PETRASOVITS, L. A.; MURPHY, R. M.; NAGEL, R. J.; CANDY, J. M. & HERMANN, S. R. Establishment of a functional genomics platform for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.175-183, 2004.
- CHATTERJEE, A.; CUI, Y. & CHATTERJEE, A. K. RsmA and the quorum-sensing signal, N-[3-Oxohexanoyl] - L-Homoserine Lactone, control the levels of *rsmB* RNA in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by affecting its stability. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.15, p.4089-4095, 2002.
- CHATTERJEE, A.; CUI, Y.; LIU, Y.; DUMENYO, C. K. & CHATTERJEE, A. K. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.1959-1967, 1995.
- CHO, Y.; DAVIS, J. W.; KIM, K.-H.; WANG, J.; SUN, Q.-H.; CRAMER JR., R. A. & LAWRENCE, C. B. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.19, n.1, p.7-15, 2006.
- 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**, v.417, n.6887, p.459-463, 2002.
- DEBROY, S.; THILMONY, R.; KWACK, Y.-B.; NOMURA, K. & HE, S. Y. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.101, n.26, p.9927-9932, 2004.

- DE FEYTER, R.; YANG, Y. & GABRIEL, D. W. Gene-for-gene interactions between cotton R genes *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum *avr* genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.225-237, 1993.
- DE KEERSMAECKER, S.C.J.; THIJS, I.M.V.; VANDERLEYDEN, J. & MARCHAL, K. Integration of omics data: how well does it work for bacteria? **Molecular Microbiology**, v.62, n.5, p.1239-1250, 2006.
- DUAN, Y. P.; CASTANEDA, A. L.; ZHAO, G.; ERDOS, G. & GABRIEL, D. W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n.6, p.556-560, 1999.
- FURUTANI, A.; TSUGE, S.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; INOUE, Y.; OCHIAI, H.; KAKU, H. & KUBO, Y. Evidence for HrpXo-dependent expression of type II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.5, p.1374-1380, 2004.
- GAURIVAUD, P.; SOUZA, L. C. A.; VIRGÍLIO, A. C. D.; MARIANO, A. G.; PALMA, R. R. & MONTEIRO, P. B. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p.4658-4665, 2002.
- HAMDAN, M. & RIGHETTI, P. G. Assessment of protein expression by means of 2-D gel electrophoresis with and without mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p.272-284, 2003.
- HOOG, C.L. & MANN, M. Proteomics. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v.5, p.267-293, 2004.
- HU, N. T.; LEU, W.M.; LEE, M.S.; CHEN, A.; CHEN, S.C.; SONG, Y.L. & CHEN, L.Y. XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and other membranes. **Biochemical Journal**, v.365, p.205-211, 2002.
- JHA, G.; RAJESHWARI, R. & SONTI, R. V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, n.9, p.891-898, 2005.
- KANAMORI, H. & TSUYUMU, S. Comparison of nucleotide sequence of canker-forming and non-canker-forming *pthA* homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Annual Review of the Phytopathology Society of Japan**, n.64, p.462-470, 1998.
- LIM, M.T.S. & KUNKEL, B.N. Mutations in the *Pseudomonas syringae* *avrRpt2* gene that dissociate its virulence and avirulence activities lead to decreased efficiency in *AvrRpt2*-induced disappearance of RIN4. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.3, p.313-321, 2004.
- LIU, H.; ZHANG, S.; SCHELL, M. A. & DENNY, T. P. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, n.12, p.1296-1305, 2005.

- MEHTA, A. & ROSATO, Y. B. A simple method for *in vivo* expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Current Microbiology**, v.47, p.400-403, 2003.
- MEHTA, A. & ROSATO, Y. B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri with leas extract of host plant. **Proteomics**, v.1, p.1111-1118, 2001.
- MINSAVAGE, G. V.; MUDGETT, M. B.; STALL, R. E. & JONES, J. B. Importance of *opgH* (*Xcv*) of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in host-parasite interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.2, p.152-161, 2004.
- MURASHIMA, K.; KOSUGI, A. & DOI, R. H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.5, p.1518-1524, 2003.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, n.10, p.4007-4021, 1975.
- OKINAKA, Y.; YANG, C. H.; PERNA, N. T. & KEEN, T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, n.7, p.619-629, 2002.
- PIRNAY, J. P.; DE VOS, D.; MOSSIALOS, D.; VANDERKELEN, A.; CORNELIS, P. & ZIZI, M. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. **Environ. Microbiol.**, v.4, p.872-882, 2002.
- RAY, S.K.; RAJESHWARI, R.; SHARMA, Y. & SONTI, R. V. A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and required for optimum virulence. **Molecular Microbiology**, v.46, n.3, p.637-647, 2002.
- SCHMID, A.K.; HOWELL, H.A.; BATTISTA, J.R.; PETERSON, S.N. & LIDSTROM, M.E. Global transcriptional and proteomic analysis of the Sig1 heat shock regulon of *Deinococcus radiodurans*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.3339-3351, 2005.
- SHARKEY, F.H.; BANAT, I.M. & MARCHANT, R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.3795-3806, 2004.
- SMITH, J.C. & FIGEYS, D. Proteomics technology in systems biology. **Molecular Biosystems**, v.2, p.364-370, 2006.
- SPIRIDONOV, N. A. & WILSON, D. B. A *celR* mutation affecting transcription of cellulase genes in *Thermobifida fusca*. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.1, p.252-255, 2000.
- SWARUP, S.; DE FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H. & GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars to elicit canker-like lesions on citrus. **Phytopathology**, v.81, p.802-809, 1991.
- SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M. T. & GABRIEL, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, p.204-213, 1992.

- TAHARA, S.T.; MEHTA, A. & ROSATO, Y. B. Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* with leaf extract of the host plant (*Passiflorae edulis*). **Proteomics**, v.3, p.95-102, 2003.
- THANASSI, J. A.; HARTMAN-NEUMANN, S. L.; DOUGHERTY, T. J.; DOUGHERTY, B. A. & PUCCI, M. J. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.14, p.3152-3162, 2002.
- VOLOUDAKIS, A.E.; REIGNIER, T. M. & COOKSEY, D. A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.782-789, 2005.
- WATT, S. A.; WIKE, A.; PATSCHKOWSKI, T. & NIEHAUS, K. Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. **Proteomics**, v.5, p.153-167, 2005.
- WILDERMAN, P. J.; VASIL, A. I.; JOHNSON, Z.; WILSON, M.J.; CUNLIFFE, H. E.; LAMONT, L.L. & VASIL, M. L. Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.**, v.69, p.5385-5394, 2001.
- WITTMAN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H.R. & POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v.6, p.4688-4703, 2006.
- WOUTERS, J.; BERGMAN, B. & JANSON, S. Cloning and expression of a putative cyclodextrin glucosyltransferase from the symbiotically competent cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 9229. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.219, p.181-185, 2003.
- YANG, Y. & GABRIEL, D. W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p.627-631, 1995a.
- YANG, Y. & GABRIEL, D. W. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.4963-4968, 1995b.
- YOUNG, L. & DONG, Q. TAMS technology for simple and efficient in vitro site-directed mutagenesis and mutant screening. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.3, p.11-13, 2003.
- ZHOU, S. & INGRAM, L. O. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.20, p.5676-5682, 2000.
- ZORREGUIETA, A.; FINNIE, C. & DOWNIE, J. A. Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.5, p.1304-1312, 2000.