

Análise da expressão das chaperones secretórias em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* por espectrometria de massas

Martins, Adriana Martini* (PG), Arruda, Marco Aurélio Zezzi (PQ), Tasic, Ljubica* (PQ)

amartins@iqm.unicamp.br; ljubica@iqm.unicamp.br

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac), chaperones secretórias, espectrometria de massas (MALDI-Tof; MS/MS)

Introdução

A *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) causa o cancro cítrico que como uma das mais graves doenças da citricultura brasileira traz grandes prejuízos econômicos. Apesar de seus mecanismos de ação ainda serem pouco compreendidos, acredita-se que as chaperones secretórias (CS)¹ auxiliam na iniciação da infecção das plantas alvo atuando nos sistemas de secreção do tipo III ou IV² em reconhecimento e encaminhamento de fatores de virulência. Nosso objetivo é determinar a expressão destas 40 proteínas hipotéticas (CS) na bactéria Xac e comparar a sua expressão em meios enriquecidos em nutrientes, aplicando separação por eletroforese bidimensional e análise por espectrometria de massas (EM; MALDI-Tof).

Resultados e Discussão

A Xac (cepa 306) foi cultivada em meio LB, na ausência (1) e presença de extrato de folhas de laranja (2) e em suco de laranja pêra (3). Foi possível observar nos casos (2) e (3) o maior crescimento celular, e no caso (2), pela cromatografia gasosa acoplada a EM (CG-EM), o consumo preferencial de terpenos e a produção de metabólitos, principalmente, derivados do fenol e de cetonas. As proteínas da Xac foram separadas pela eletroforese bidimensional (SDS-Page, 18 %), recortadas do gel, clivadas com a tripsina e analisadas por MALDI-Tof (MS/MS). Até o momento, dois spots do pellet (1), foram identificados, como uma proteína da membrana externa da Xac (Q8PHV8_XANAC) e outra hipotética (Q8PMD7_XANAC, XAC1492).

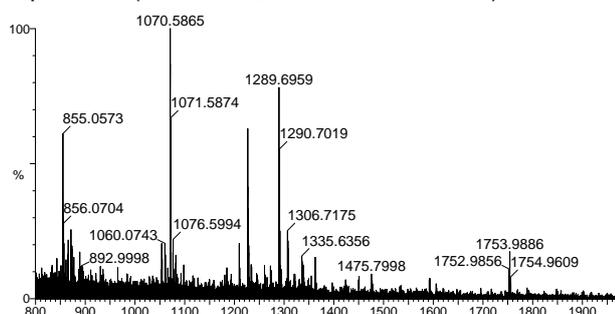


Figura 1: Espectro de massas para uma das proteínas analisadas (XAC1492) obtido pela técnica de ionização mole (MALDI-Tof, Micromass Q-Tof).



Figura 2: Espectro de EM/EM de um dos cinco mais intensos sinais ($m/z=1289.68$) da amostra da Fig.1. A identificação da XAC1492 foi executada por busca comparativa no banco de dados (MASCOT DEAMON³, probabilidade de 73%).

XAC1492 - 22% da sequência identificada:

```
1 MAVYVVTWNLNKNERSNYDAARRQFIQHLER  
31 HPNVQDRGLESVRWVESTGSALALRDDLRQ  
61 KLDDNDRIFVSKLNASQNDGWLNNENVVDWI  
91 KRRQ
```

Conclusões

Os resultados obtidos indicam a eficiência do método proposto, uma vez que duas proteínas, uma delas hipotética, foram identificadas em Xac. Além disso, a identificação dos nutrientes consumidos pela Xac e os metabólitos gerados podem auxiliar na elucidação do mecanismo de virulência desta bactéria e como vários organismos patogênicos e Gram-negativos compartilham grandes semelhanças em mecanismos de ação, a sua compreensão poderá indicar novos rumos de prevenção e/ou extermínio de inúmeras doenças.

Agradecimentos

CAPES; IQ-UNICAMP; Laboratório de Química Biológica; Laboratório do Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos; GEPAM (Marcelo, Herbert e Adilson); Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do LNLS

¹ Young, J. C.; Agashe, V. R.; Siegers, K.; Hartl, F. U.; 'Pathways of Chaperone-Mediated Protein Folding in The Cytosol'; *Nature* **2004**, (5), 781-791.

² Khater, L.; Santos, T. M.; Alegria, M. C. *et al.*; 'In silico identification of potential chaperone genes that belong to type III and type IV secretion systems in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*'; *Genet. Mol. Biol.* **2005** 28, (2), 321-327.

³ <http://mas8.lnls.br/mascot>