



Investigação de XAC3021 de *Xanthomonas citri*: uma possível toxina da família CDI (Sistema de Inibição de Crescimento Dependente de Contato) associada a R-bodies

Julia Lopes Barboza

Shaker Chuck Farah

Instituto de Química / Universidade de São Paulo

julia.barboza@ifsp.aluno.edu.br

Objetivos

R-bodies, ou corpos refráteis, são proteínas insolúveis caracterizadas inicialmente na α -proteobactéria *Caedibacter taeniospiralis*. Quando a sua bactéria de origem é predada por um protista, os corpos refráteis se estendem no vacúolo digestivo alheio – consequência da mudança de pH – que ao ser rompido, libera conjuntamente uma toxina produzida pela bactéria. Esse conjunto de fatores é responsável por matar a predadora através de uma tática interna.

Os genes que codificam homólogos dessas proteínas também estão presentes de maneira adjacente em um mesmo *locus* na bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*xac3014-3019*), uma γ -proteobactéria de grande interesse econômico no Brasil por ser uma fitopatógena responsável pelo cancro cítrico. No mesmo *locus* gênico, há a presença do *xac3021*, que codifica possivelmente uma toxina da família CDI (Contact-Dependent growth Inhibition) e objeto de estudo deste trabalho.

Considerando o impacto que essa bactéria gera em um importante produto econômico nacional, a laranja, seria de interesse entender suas ferramentas de defesa contra predação e posteriormente conquistar soluções para diminuir seus impactos sobre nossa sociedade.

Portanto, esse projeto visa descobrir o alvo da atividade enzimática da XAC3021, determinar sua estrutura 3D e definir sua relação com os corpos refráteis, para obter uma maior compreensão sobre os mecanismos de defesa que são ativados em ambiente hostil em que a bactéria esteja inserida.

Materiais e Métodos

O gene *xac3021* foi clonado no plasmídeo pET28-a, escolhido por possuir um sítio múltiplo de clonagem à frente do promotor T7, com operador lac e RBS, favorecendo a alta expressão da proteína recombinante em *E. coli*. As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) (53–68 °C) foram otimizadas utilizando DNA polimerase Pfu. Posteriormente, os fragmentos de DNA amplificados foram purificados pelo Kit de Extração de Gel (Thermo Scientific K0692), tiveram suas concentrações verificadas no Nanodrop e, inseridas no vetor através de Gibson Assembly para expressar a proteína com um tag 6xHis no C-terminal.

Para a transformação bacteriana, foram utilizadas cepas de *E. coli* DH5 α sensibilizadas por choque térmico e incubadas por 1 hora. Placas contendo meio ágar LB suplementado com o antibiótico canamicina (50 μ g/ml) foram preparadas para análise e seleção das

colônias. O DNA plasmidial foi purificado com um kit específico para Mini Prep (Thermo Scientific K0503) e, a verificação da construção do plasmídeo foi confirmada por sequenciamento (Plasmidsaurus). Para expressão da proteína recombinante, a cepa *E. coli* BL21(DE3) foi transformada e cultivada em meio 2xTY com canamicina. A indução de expressão foi realizada no mesmo meio, com adição de 0,5 mM de IPTG após atingir uma densidade ótica (OD_{600nm}) de 0.8. O lisado celular total antes e depois da indução foi analisado por géis de SDS-PAGE.

A purificação da proteína recombinante foi conduzida por cromatografia líquida de alta performance no sistema ÄKTA (Cytiva), utilizando coluna de afinidade HisTrap™ carregada com resina de níquel (Ni²⁺-NTA), específica para proteínas com cauda 6xHis-tag.

Resultados

A Figura 1 mostra a indução e expressão da proteína XAC3021 (43,6 kDa), seguida da etapa inicial de purificação, na qual ainda é possível observar a presença de contaminantes. Já a Figura 2 apresenta a estrutura predita da proteína de interesse obtida por meio do software AlphaFold.



Figura 1: SDS-PAGE demonstrando indução com o IPTG e expressão da XAC3021 (NI¹ e 1B) e frações da purificação por afinidade usando a coluna Ni²⁺-NTA (A8-A12).

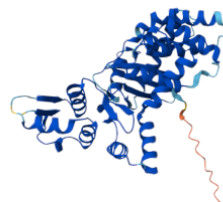


Figura 2: Estrutura predita da proteína XAC3021 pelo AlphaFold

Conclusões e Perspectivas Futuras

Pretendemos aprimorar a cromatografia de afinidade da proteína XAC3021 combinando a com cromatografia por exclusão de tamanho. A proteína purificada será avaliada por ensaios *in vitro* (atividade nuclease) e *in vivo* (toxicidade em *E. coli* e/ou *X. citri*), além de testes de fluorescência e dicroísmo circular para análise de estabilidade térmica. Em seguida, será realizada triagem de cristalização por matriz esparsa (gota sentada), com posterior otimização das condições para obtenção de cristais de qualidade. Estes serão analisados por difração de raios X, para determinar a estrutura tridimensional.

Referências

- HAYES, C. S. et al. Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4, n. 2, p. a010025, 2014. DOI: <10.1101/cshperspect.a010025>.
- POLKA, J. K.; SILVER, P. A. A tunable protein piston that breaks membranes to release encapsulated cargo. *ACS Synthetic Biology*, v. 5, n. 4, p. 303–311, 2016.
- RAYMANN, K. et al. A genomic survey of Reb homologs suggests widespread occurrence of R-bodies in proteobacteria. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 3, n. 3, p. 505–516, 2013. DOI: <10.1534/g3.112.005231>.