

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

JÉSSICA BEATRIZ CARDOSO OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA LesA DE *Xylella*
fastidiosa 9a5c**

UBERLÂNDIA – MG
JULHO – 2017

JÉSSICA BEATRIZ CARDOSO OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA *LesA* DE *Xylella*
fastidiosa 9a5c**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Engenheira
Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Nascimento

Co-orientador (a): Dra. Hebréia Oliveira
Almeida Souza

UBERLÂNDIA – MG
JULHO – 2017

JÉSSICA BEATRIZ CARDOSO OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA LesA DE *Xylella*
fastidiosa 9a5c**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Engenheira
Agrônoma.

Aprovado pela Banca Examinadora em 28 de julho de 2017

Prof. Dr. Rafael Nascimento
Orientador

Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza
Membro da Banca

Dra. Tâmara Prado de Moraes
Membro da Banca

Aos meus avós, Pedro e Aparecida, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rafael Nascimento pela oportunidade, confiança e orientação durante a iniciação científica e o trabalho de conclusão de curso.

À Hebréia, agradeço os ensinamentos e a paciência em todos os experimentos, a disposição em sempre esclarecer minhas dúvidas e a orientação ao longo de todo o processo. Agradeço também pela amizade e gentileza de todos os dias.

À Tâmara e ao Flávio pelas orientações de carreira, conversas e ensinamentos.

Aos companheiros do *Plant Team* pelo dia-a-dia no laboratório e pelo auxílio nos experimentos.

Ao grupo do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo espaço concedido para realização desse trabalho e pela gentil convivência.

A todos os professores do curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, em especial o professor Dr. Alison Talis que sempre esclareceu prontamente minhas dúvidas sobre a biotecnologia.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante minha iniciação científica.

À CAPES e ao Programa Ciência sem Fronteiras pela oportunidade ímpar durante o curso de graduação.

Agradecimentos especiais:

Aos meus avós, Pedro e Aparecida, que sempre me apoiaram e me deram força para continuar nos momentos de fraqueza. Vocês são a minha fortaleza.

À minha mãe, Juciete, que esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida incondicionalmente. Obrigada pelo cuidado, amor e carinho de sempre.

À minha tia e madrinha, Jucyene, que esteve comigo durante toda minha vida! Agradeço os conselhos dados e o apoio em todos os momentos decisivos.

Aos meus irmãos, Thalita e Pedro Neto!

Ao meu primo, Neto, pelas conversas de estrada, pela boa vontade e disposição em me ouvir e me orientar.

À toda minha família pelo carinho e apoio.

Às minhas amigas, Rebecca e Camila, que foram força, sorriso e companheirismo nessa fase. Obrigada pelas conversas e pelos encontros!

Aos meus colegas de graduação que, direta ou indiretamente, fizeram meus dias mais leves e estiveram presentes durante todos esses anos.

Agradeço a cada cidadão brasileiro que, por intermédio da Universidade Federal de Uberlândia, possibilitou a conclusão do curso de Agronomia. Retribuirei os investimentos feitos em minha formação.

A Deus pelas graças concedidas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO	i
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Clorose Variegada dos Citros (CVC)	14
2.2. Patogenicidade e/ou virulência de bactérias	15
2.3. O papel de lipases/esterases na patogenicidade de <i>X. fastidiosa</i>	17
2.2 Tecnologia de Phage Display	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Expressão da proteína LesA em sistema heterólogo	20
3.2 Purificação da proteína LesA por imunoprecipitação	21
3.3 Análise das proteínas por SDS-PAGE e verificação da proteína LesA purificada por Western-Blot utilizando anticorpo anti-LesA	21
3.4 Seleção (<i>biopanning</i>) dos peptídeos que interagem com a esterase LesA pela tecnologia de <i>Phage Display</i>	22
3.5 Análise da integridade do DNA por eletroforese	23
3.6 Sequenciamento dos fagos ligantes	23
3.7 Avaliação dos peptídeos capazes de inibir a atividade esterásica de LesA por Ensaio Fluorimétrico	24
3.8 Curva Padrão de 4-MU	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Análise das proteínas por SDS-PAGE e verificação da integridade da proteína LesA purificada por Western-Blot utilizando-se anticorpo anti-LesA	25
4.2 Purificação da proteína LesA por imunoprecipitação	26

4.3 Seleção (<i>biopanning</i>) dos peptídeos que interagem com a esterase LesA pela tecnologia de <i>Phage Display</i>	27
4.4 Análise da integridade do DNA por eletroforese.....	27
4.5 Avaliação dos peptídeos capazes de inibir a atividade esterásica de LesA por Ensaio Fluorimétrico.....	28
5 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H₂O – Água

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

4- MUB – 4-Metilumberiferil Butirato

4-MU – 4-Metilumberiferil

A.U. – *Fluorescence Arbitrary Units*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CVC – Clorose Variegada dos Citros

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura

h – Horas

HCl – Ácido clorídrico

IPTG – *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

kDa – Quilodalton

M – Molar

m/v – massa/volume

mA – Microamper

MAMPs – *Microbe-associated Molecular Pattern*

min – Minutos

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NaH₂PO₄ – Dihidrogeno Fosfato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

O.D. – *Optical Density*

°C – Grau Celsius

OMVs – *Outer Membrane Vesicles*

PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PEG – Polietilenoglicol

pH - Potencial Hidrogeniônico

Ph.D – *Phage Display*

pv. - Patovar

rpm – Rotações por Minuto

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS- PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

spp. - Espécie

T – Tween

TBS – *Tris-buffered Saline*

Tris – 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

V – Volts

Xf – *Xylella fastidiosa*

RESUMO

Xylella fastidiosa (*Xf*) é uma bactéria Gram-negativa, restrita aos vasos do xilema dos hospedeiros e agente causal de doenças em diversas espécies de plantas cultivadas, sendo duas importantes: a Clorose Variegada dos Citros (CVC) causada pela estirpe 9a5c e a Doença de Pierce (PD), causada pela estirpe Temecula 1, no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente. *Xf* Temecula 1 apresenta como principal fator de virulência uma fitotoxina com atividade lipásica/esterásica, denominada LesA. Análises genômicas comparativas entre as estirpes Temecula 1 e 9a5c indicam a presença de genes homólogos ao gene codificador de LesA de *Xf* Temecula 1 em *Xf* 9a5c. Este fato sugere a expressão de tal proteína em estirpes 9a5c e seu papel na patogênese desta bactéria, assim como em Temecula 1. O objetivo desse trabalho foi selecionar peptídeos inibidores da enzima LesA possivelmente aplicáveis como ferramenta biotecnológica no controle da CVC. Para tal, submeteu-se a enzima LesA, anteriormente expressa em sistema heterólogo e purificada, a uma biblioteca de peptídeos PhD-7 pela tecnologia de *Phage Display*. Os resultados indicaram três peptídeos com boa porcentagem de inibição da atividade esterásica da LesA quando comparados à LesA ligada a fago selvagem.

Palavras-chave: lipase/esterase, Clorose Variegada dos Citros, Phage Display

1 INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa (*Xf*) é uma bactéria fitopatogênica, Gram-negativa, estritamente aeróbica e limitada aos vasos do xilema do hospedeiro. Está associada a doenças de plantas cultivadas de diversas espécies e tem uma gama de hospedeiros que inclui plantas como a amendoeira, cafeeiro, pessegueiro, citros, videira, carvalho, amoeira, amexeira, alfafa, plantas ornamentais e outras. (COSTA et al., 2004; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2007; HOPKINS; PURCELL, 2002; HOPKINS, 1989; HUANG; SHERALD, 2004; MONTERO-ASTUA et al., 2008; PURCELL; HOPKINS, 1996; SCHUENZEL et al., 2005).

Diferentes estirpes de *Xf* estão relacionadas a doenças em várias espécies de plantas cultivadas, como a Escaldadura da Folha em amexeira, a Requeima do Café, *Phony Peach* em pessegueiro, Alfafa Anã, Doença de Pierce em videira e Clorose Variegada dos Citros. Tais doenças foram relatadas em países como Peru, Argentina, Estados Unidos, Brasil, Taiwan e Paraguai (HOPKINS; PURCELL, 2002). Dentre as citadas, a Doença de Pierce (PD, do inglês, *Pierce Disease*) e a Clorose Variegada dos Citros (CVC) são doenças epidêmicas importantes nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (SIMPSON et al., 2000).

A primeira identificação de *Xf* ocorreu em 1884, nos Estados Unidos, associada a PD em videira (*Vitis vinifera* L.). Trata-se de uma doença que representa grande ameaça para viticultura do referido país, por se tratar de uma doença altamente destrutiva e de difícil controle (EMBRAPA, 2006). Os sintomas são áreas cloróticas nas folhas que vão passando à cor amarelada em uvas brancas e ao roxo escuro em uvas tintas, porém podem ocorrer variações no padrão, conforme a cultivar da videira (FREITAG, 1951). Outro sintoma comum é a escaldadura nos bordos foliares, com amarelecimento das áreas adjacentes, resultando na abscisão das folhas afetadas (LOPEZ GONZALEZ, 1998).

Xf (estirpe 9a5c) é o agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC) e foi inicialmente encontrada em pomares comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) em 1987, no Triângulo Mineiro e Norte e Noroeste do estado de São Paulo, no Brasil. Desde seu primeiro relato, a doença foi responsável pela erradicação de 100 milhões de laranjeiras, perdas de produção de mais de 20% e ocasionou prejuízos de 1 bilhão de reais para citricultura brasileira (FUNDECITRUS, 2017).

Xf foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado (SIMPSON et al., 2000) devido aos impactos econômicos da CVC brasileira. No entanto,

apesar do sequenciamento, os mecanismos de ação da bactéria, assim como do ciclo da doença, não foram completamente entendidos. Desta forma, não há medidas de controle efetivas à doença, sendo seu manejo feito através da adoção de mudas sadias, controle dos vetores e eliminação das plantas com sintomas. Contudo, mesmo em baixa incidência nas regiões produtoras de laranja brasileiras no último ano, estudos ainda são necessários para a elucidação do patógeno em diversos países (FUNDECITRUS, 2017).

Algumas hipóteses quanto ao desenvolvimento de sintomas em plantas infectadas por *Xf* são consideradas. Pesquisadores sugerem a existência de três diferentes hipóteses para tal, sendo elas: a proliferação bacteriana sistêmica e o bloqueio do xilema pelo biofilme (McELRONE et al., 2001), a reação do hospedeiro à infecção causada pela bactéria e a produção de fitotoxinas produzidas e secretadas pela bactéria (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008).

Segundo Nascimento et al. (2016), a patogênese bacteriana na Doença de Pierce está relacionada à uma fitotoxina produzida por *X. fastidiosa*, sendo primeiro indicativo de que *X. fastidiosa* secrete tal fator obtido pela análise das proteínas secretadas durante o crescimento bacteriano em cultura. Ainda, a análise das proteínas secretadas por *Xf* em cultura revelou a presença abundante de três lipases hipotéticas (PD1703, PD1702 e PD1211) e análises *in silico* revelaram que o gene PD1703 codifica uma lipase/esterase ortóloga à enzima LipA presente em diversas espécies do grupo das *Xanthomonas*. Em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), LipA foi caracterizada como uma proteína degradante da parede celular e como fator de virulência importante na patogênese bacteriana. LipA é uma α/β hidrolase de 42-kDa com função de lipase/esterase e está presente em todas as bactérias do grupo das *Xanthomonas* que possuem genomas sequenciados, além de outras bactérias Gram-negativas diversas (APARNA et al., 2009).

Nascimento et al. (2016) ainda relataram a presença de genes homólogos ao gene de LesA de *Xf* Temecula 1 em *Xf* 9a5c, indicando a expressão da enzima LesA também nesta bactéria e sua importância na virulência de *Xf* 9a5c em plantas de citros no Brasil. Segundo Alves (2016), análises das proteínas solúveis do sobrenadante e das OMVs de *Xf* 9a5c indicaram a presença da enzima LesA em abundância, além de comprovar a atividade lipásica através da degradação de compostos de tributirina.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar peptídeos inibidores da proteína LesA de *X. fastidiosa* 9a5c possivelmente aplicáveis como ferramenta biotecnológica no desenvolvimento de plantas resistentes à Doença de Pierce e à CVC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Clorose Variegada dos Citros (CVC)

Em 1987 a CVC foi descrita pela primeira vez em Macaúbal no Estado de São Paulo (ROSSETI et al., 1990) e já se encontrava distribuída nas regiões citrícolas do Brasil e da Argentina (TUBELIS et al., 1993), sendo rapidamente considerada como uma das doenças mais importantes presentes nos pomares cítricos brasileiros (LIMA, 1998). Atualmente, está presente em todas as áreas citrícolas do país, em diferentes intensidades, afetando cerca de 3% das laranjeiras das regiões de São Paulo e Minas Gerais, segundo levantamento do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) em 2016 (FUNDECITRUS, 2017).

Os sintomas da CVC incluem pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha, que correspondem a manchas de tonalidade marrom avermelhada na face inferior. Em níveis avançados da doença, as plantas apresentam ramos com encurtamento de entrenó, aumento de brotações nas gemas, morte dos ponteiros e queda das folhas. Os frutos são reduzidos em até 75% do peso, apresentam aspecto queimado, alta concentração de açúcares e amadurecimento precoce (Figura 1). A longo prazo, os sintomas incluem diminuição da copa, declínio do sistema radicular, atrofia e, posteriormente, morte da planta (FUNDECITRUS, 2017; JANSE; OBRADOVIC, 2010).



Figura 1 – Sintomas de CVC em folhas e frutos de laranjeira. Folhas e frutos sintomáticos à esquerda e frutos normais à direita (HOPKINS E PURCELL, 2002)

A transmissão do patógeno para as plantas é mediada por algumas espécies de insetos-sugadores de seiva conhecidos como cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae), sendo *Acrogonia citrina*, *Bucephalogonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Macugonalia leucomelas* e *Oncometopia fascialis* as espécies de maior importância no Brasil (JANSE; OBRADOVIC, 2010).

Atualmente o seu manejo baseia-se no plantio de mudas sadias, na poda dos ramos afetados, eliminação de plantas severamente afetadas e no controle dos insetos vetores e, Assim, a convivência com essa doença no sistema produtivo citrícola tem demandado um frequente uso de inseticidas para controle dos vetores da bactéria que causa a CVC, o que, além de aumentar os custos de produção, tem impacto negativo no ecossistema local (FUNDECITRUS, 2017).

2.2. Patogenicidade e/ou virulência de bactérias

A interação entre as células bacterianas, assim como outros organismos, e o ambiente externo é realizada através de moléculas secretadas em mecanismos de secreção de proteínas. As bactérias Gram-negativas, diferentemente de Gram-positivas, possuem duas membranas lipídicas (membrana interna e membrana externa) que podem ser uma barreira entre o citoplasma e o meio extracelular para tais células, dificultando a internalização e secreção de solutos e polipeptídeos (NASCIMENTO, 2016).

Preston e colaboradores (2005) relataram que a virulência de algumas bactérias fitopatogênicas Gram-negativas está diretamente relacionada aos sistemas de secreção de proteínas dessas bactérias. Cada tipo de sistema de secreção, tipo I, II, III, IV e V, tem um papel importante na interação patógeno-hospedeiro em funções como a adesão bacteriana ao tecido, degradação da parede celular, aquisição de nutrientes e supressão de mecanismos de defesa do hospedeiro.

Os sistemas tipos II e V são compostos por mecanismos de dois passos, onde as proteínas são, primeiramente, transportadas ao espaço periplasmático através da membrana interna e, posteriormente, para o meio extracelular pela membrana externa (ENDERSON et al., 2004; KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012). Nos sistemas dos tipos I, III e IV, as

proteínas são transportadas diretamente ao espaço extracelular ou diretamente no citoplasma da célula vegetal, sendo o sistema tipo III o principal tipo utilizado na secreção de proteínas relacionadas à virulência por células fitopatogênicas e na supressão de resposta imune do hospedeiro através da detecção de PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e de MAMPs (do inglês, *Microbe-Associated Molecular Patterns*) (NASCIMENTO, 2016).

O sistema de secreção tipo III tem importante papel na interação patógeno-hospedeiro de bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* spp. e *Erwinia carotovora* (PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005). No entanto, análises genômicas de bactérias como *Rhizobium radiobacter* e *Xf* indicam a ausência desse mecanismo de secreção em tais bactérias (MARIE; BROUGHTON; DEAKIN, 2001).

Diversos estudos suportam a importância do sistema de secreção tipo II para a patogenicidade bacteriana, além de relacionar o mesmo à secreção de enzimas necessárias para a degradação de diferentes componentes da parede celular vegetal, como endoglucanases, proteases, α -amilases e lipase/esterases em bactérias como *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (DOW, 1987; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005).

Segundo Chatterjee et al. (2008), estirpes de *Xf* são mais facilmente comparadas a várias espécies de *Xanthomonas*, já que ambos grupos são capazes de colonizar o xilema das plantas e, assim, as semelhanças e diferenças são analisadas. O que tornou-se possível através do sequenciamento de várias estirpes de *Xf*, assim como de espécies de *Xanthomonas*.

A análise comparativa entre os genomas de *Xf* e genomas de patovares de *Xanthomonas* revelam a presença de genes necessários para o sistema de secreção do tipo II em *Xf* (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; SIMPSON, 2000; VAN SLUYS et al., 2003).

O sistema tipo IV é importante na secreção de fatores de virulência em bactérias Gram-negativas, uma vez que a secreção de compostos é dificultada pela dupla membrana lipídica de tais bactérias (BOS; ROBERT; TOMMASSEN, 2007). Neste caso, as proteínas serão liberadas através de vesículas de membrana externa (OMV, do inglês *Outer Membrane Vesicles*), nas quais as moléculas são envoltas por uma membrana externa bacteriana (ENDERSON et al., 2004). As OMVs apresentam funções como disseminação de substâncias a longa distância das células bacterianas, comunicação célula-célula, aquisição de

nutrientes e transferência horizontal de genes (KOLLING; MATTHEWS, 1999; MASHBURN; WHITELEY, 2005).

2.3. O papel de lipases/esterases na patogenicidade de *X. fastidiosa*

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas lipolíticas encontradas em animais, plantas e micro-organismos, incluindo fungos e bactérias. São capazes de produzir compostos como ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol através da quebra de triglicerídeos. Ainda, são importantes na transferência de lípidos entre organismos e na deposição e mobilização de ácidos graxos como reserva energética (VILLENEUVE et al., 2000).

Em *Xoo*, agente causal do Crestamento Bacteriano em arroz (*Oriza sativa* L.), uma série de enzimas como lipase/esterase (LipA), celulase (CIsA), xilanase (XynB) são secretadas pelo sistema de secreção tipo II (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005). Dentre tais enzimas, a LipA foi descrita recentemente como importante fator de virulência para patogênese de *Xoo*, sendo relacionada à degradação da parede celular e a respostas imunes do hospedeiro como a deposição de calose e morte celular programada (APARNA et al., 2009; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005).

A análise funcional da proteína LesA de *X. fastidiosa*, semelhante à proteína LipA de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, mostrou que a LesA foi capaz de degradar um substrato éster e lípidos de cadeia curta, porém, não foi capaz de clivar triacilglicerídeos de cadeia longa, indicando que a enzima de *X. fastidiosa* é uma lipase/esterase como a enzima de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Recentemente, a enzima LipA foi caracterizada como sendo necessária para a manutenção do estado patogênico de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) em tomate, onde ela é expressa nos estágios iniciais da infecção foliar (TAMIR-ARIEL et al., 2012).

Nascimento et al. (2016) relataram a presença de um gene (PD1703) como o principal fator de virulência de *Xf* Temecula 1. Em análise genômica comparativa, os autores verificaram que tal gene é codificador de uma lipase/esterase ortóloga a LipA de *Xoo*, denominada LesA. A LesA foi encontrada nas folhas infectadas de maneira abundante, indicando, assim, a associação dessa enzima a patogênese bacteriana.

Posteriormente, os autores demonstraram que LesA acumula-se abundantemente nas margens foliares e que a sua distribuição correlaciona-se positivamente com as necroses foliares características da Doença de Pierce. Adicionalmente, demonstraram que a proteína LesA recombinante induz sintomas de hipersensibilidade em folhas de videira e que a mesma é transportada por vesículas de membrana externa (OMVs) e, portanto, sistema de secreção do tipo II, assim como em *Xoo*.

Os autores ainda relataram que os genes que codificam as lipases/esterases foram também encontrados no genoma da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*, cepa que causa a CVC. Os genes XF0357, XF0358 e XF2151 são homólogos, respectivamente, aos genes PD1703 (LesA), PD1702 e PD1211 da cepa Temecula 1, causadora da Doença de Pierce.

2.2 Tecnologia de *Phage Display*

Desde a criação da tecnologia por George Smith em 1985, a técnica de *Phage Display* (Ph.D.) tem sido uma importante ferramenta nos estudos de proteínas em áreas como imunologia, biologia celular e farmacologia (KUSHWAHA; PAYNE; DOWNIE, 2013). Trata-se de uma técnica molecular na qual proteínas são expressas na superfície proteica de um bacteriófago e tem sido utilizada para identificar a afinidade de proteínas e peptídeos a partir de uma biblioteca com mais de 10^{10} variantes (SCOTT; SMITH, 1990).

Quanto maior a variabilidade da biblioteca, maior será a possibilidade de selecionar fagos que interajam com o alvo exposto (POSNER et al., 1994; AZZAZY; HIGHSMITH, 2002). A grande vantagem dessa tecnologia está na ligação direta existente entre o genótipo e o fenótipo experimental, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Ph.D baseia-se na utilização de bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, fl) (SIDHU, 2001), vírus bacteriófagos filamentosos que parasitam bactérias Gram-negativas que possuem o pílus F. Os vírus apresentam material genético (DNA) de fita simples, pequeno e circular. A partícula do fago é composta por proteínas estruturais (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX), sendo aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa proteica do fago. Deste modo, o peptídeo, em geral, é expresso

na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. No entanto, a pIII apresenta baixa representatividade em relação a pVIII. Assim, as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicados na seleção de ligantes de alta afinidade, quando comparados as bibliotecas de peptídeos na pVIII (PHIZICKY; FIELDS, 1995; BRIGIDO; MARANHÃO, 2002).

A seleção de peptídeos por Ph.D tem se mostrado uma importante técnica para a descoberta de novos ligantes enzimáticos, onde um número considerável de proteínas são selecionadas e separadas. Para tal, o processo consiste em dois passos, *biopanning* e *screening*. No *biopanning*, a biblioteca de fagos é incubada com o antígeno alvo, seguido de lavagens para remoção dos fagos não ligantes, ou seja, sem interação fago-antígeno. Os fagos ligantes são, então, eluídos através da incubação dos mesmos em soluções de pH extremamente altos ou baixos e amplificados por infecções sequenciais em bactérias, sendo feitas repetições da etapa de *biopanning*. O *screening* é realizado pela infecção da bactéria alvo em meios seletivos e seleção de colônias únicas, posteriormente (BENHAR, 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Os peptídeos ligantes atuam como ligantes “substitutos” e possuem como alvo somente um restrito número de sítios de ligação na enzima. Esses sítios são geralmente sítios funcionais da enzima, ou seja, podem ser os sítios ativos (local de interação enzima-substrato) ou sítios de regulação alostérica. Os inibidores enzimáticos, ao se ligarem a esses sítios, diminuem a atividade biológica da enzima. Peptídeos identificados por Ph.D. vem se mostrando potentes inibidores enzimáticos por se ligarem a esses sítios (HYDE-DERUYSCHE et al., 2000).

Há um grande interesse na identificação de inibidores enzimáticos e a técnica de Ph.D. tem sido amplamente utilizada com esse intuito. Existem relatos de buscas por inibidores de enzimas que catalisam a formação de moléculas estruturais de bactérias patogênicas, como peptideoglicanos, para que esses peptídeos sejam utilizados como drogas antibacterianas (EL ZOEIBY; SANSCHAGRIN; LEVESQUE, 2003), inibidores de enzimas envolvidas no aumento no número de células cancerígenas (WANG et al., 2009) e inibidores de proteases de micro-organismos fitopatogênicos (KUSHWAHA; PAYNE; DOWNIE, 2013).

Dessa maneira, considerando o envolvimento da enzima LesA na virulência da bactéria *X. fastidiosa* na Doença de Pierce descritos por Nascimento (2016), assim como as similaridades entre as estirpes de *Xf* que causam a doença de Pierce e a CVC, torna-se

necessário ferramentas para o desenvolvimento de alternativas de controle para tais doenças, sendo uma dessas ferramentas a seleção de peptídeos inibidores da atividade enzimática da proteína LesA por *Phage Display*. Os peptídeos ligantes da tríade catalítica dessa enzima, que sejam capazes de inibir a sua atividade lipásica/esterásica, poderão ser utilizados futuramente no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas que sejam mais resistentes à CVC e à Doença de Pierce.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão da proteína LesA em sistema heterólogo

A sequência codificadora da enzima LesA foi previamente clonada no vetor de expressão pJexpress 401 (DNA2.0) sob o controle do promotor T5. Essa construção foi utilizada para a transformação de células competentes ElectroMAX™ DH5α-E™ (Life Technologies, USA).

As células transformadas cresceram em meio Luria-Bertani (LB) contendo canamicina (50 µg/mL), à temperatura de 37 °C, sob agitação de 120 rpm até atingir valor de O.D_{600nm} de 0,8. Para a indução da expressão, foi adicionado à cultura 1 mM de IPTG e essa foi incubada a 30 °C, 120 rpm por 3 horas.

A extração das proteínas foi feita com tampão de lise (Tris-HCl pH 7,5 150mM; NaCl 225mM, lisozima 0,15 mg/mL, inibidor de protease 3%, glicerol 3%, EDTA 6mM). Foram adicionados 2 mL do tampão aos *pellets* para ressuspensão e as células lisadas por ultrassom através de aparelho sonicador com 6 pulsos de 30 segundos cada e intervalos de 1 min no gelo entre os pulsos. A amostra, então, foi centrifugada por 30 minutos, a 8000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração das proteínas determinada pelo método de Bradford utilizando-se BSA como padrão.

3.2 Purificação da proteína LesA por imunoprecipitação

A imunoprecipitação da proteína LesA foi realizada utilizando o kit Anti-FLAG[®] M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich). Frações do sobrenadante coletado no item 3.1 foram adicionadas a 250 µL de *beads* magnéticos. Os tubos permaneceram no agitador na câmara fria *overnight*.

A fração não ligada foi coletada para análise em SDS-PAGE 12,5% e as *beads* magnéticas foram lavadas com TBS 1x. A eluição da proteína foi feita com 200 µL de tampão de eluição (1M glicina, pH 3,0) e neutralizadas com 15 µL de tampão neutralizante (1M Tris-HCl, pH 8,0), realizando eluições sucessivas. As alíquotas referentes a cada eluição foram aplicadas em SDS-PAGE 12,5%.

3.3 Análise das proteínas por SDS-PAGE e verificação da proteína LesA purificada por western-blot utilizando anticorpo anti-LesA

A qualidade da expressão e integridade da proteína foram avaliadas por meio de SDS-PAGE, géis bifásicos com uma fase de separação (12,5%) e uma fase de empacotamento (3%).

As amostras foram preparadas com duas amostras do extrato de proteínas obtido com a lise celular (14 e 21 µL) e 7 µL de tampão de amostra na concentração final de 1X (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,2%; β-mercaptoetanol 4%). A incubação foi realizada a 100°C por 10 minutos precedendo a aplicação no gel. O marcador utilizado foi o *Thermo Scientific Pageruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

A eletroforese ocorreu em duas fases. A fase inicial, de empacotamento, de aproximadamente 30 minutos a 80V, seguida da fase de separação por aproximadamente 2,5 horas a 100V.

O gel foi corado com solução Coomassie Blue coloidal G-250. Mantido em solução fixadora (metanol 40%, ácido acético 2%) por 30 minutos e, posteriormente, solução corante (metanol 30%, sulfato de amônio 8% e ácido fosfórico 0,8%) e Coomassie Blue G-250

(0,08%), *overnight*. Após corado, o gel foi incubado em solução descorante (etanol 30%; ácido acético 50%) para remoção do excesso de corante.

A verificação da correta expressão da proteína foi realizada seguindo protocolo de Western-blot utilizando anticorpo policlonal anti-LesA. Assim, as proteínas foram transferidas *overnight* para membrana de nitrocelulose a 50mA em sistema de transferência úmida.

A membrana foi bloqueada por 1h à temperatura ambiente e lavada com PBS em leite em pó desnatado 5% (m/v) e com PBS-T 0,1% (Tween 20), respectivamente. O anticorpo anti-LesA foi diluído (1:1000) em PBS-M 1% (PBS suplementado com 1% de leite em pó desnatado) e mantido em contato com a membrana à temperatura ambiente por 2h. Após a lavagem da membrana, foi feita a incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase(HRP) (1:2500) produzido em cabra por 1h à temperatura ambiente (Life Technologies, USA). Após a lavagem, a revelação foi feita com o kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Life Sciences).

Um gel com as frações da purificação foi corado por Coomassie Blue coloidal G-250 e outro gel, com os mesmos padrões, transferido para membrana de nitrocelulose e revelado com anticorpo anti-LesA.

3.4 Seleção (*biopanning*) dos peptídeos que interagem com a esterase LesA pela tecnologia de *Phage Display*.

Para o ensaio utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos (PhD-7, *New England Biolabs*, USA), seguindo os protocolos de acordo com Barba et al. (2001).

Uma amostra contendo 2×10^{11} partículas de fagos infecciosos foi submetida a três ciclos de seleção e amplificação. A seleção foi feita através de 50 μ L de *beads* magnéticas contendo anticorpo anti-Flag (FLAG[®] M2 Magnetic Beads - Sigma-Aldrich) anteriormente lavadas com 1mL de tampão TBS-T (0,1% Tween-20).

As *beads* foram bloqueadas utilizando tampão TBS com BSA 3% por 1h, a 37°C seguido da lavagem com TBS- T (0,1% Tween-20). Uma seleção negativa foi realizada de modo que as *beads* foram incubadas com 2×10^{11} partículas de fagos da biblioteca PhD-7 a 37

°C por 1h. O sobrenadante contendo as proteínas que não interagiram com as *beads* e/ou anticorpo foi adicionado às *beads* acopladas com LesA purificada anteriormente. A incubação foi feita por 1h a 37°C. A resina foi lavada com TBS-T (0,1% Tween) e as partículas não ligadas foram descartadas. Os fagos ligantes foram eluídos com 200 µL de tampão de eluição (Glicina-HCl 0,2 M pH 2,2 e BSA 1 mg/mL) à temperatura ambiente por 10min.

Os fagos foram transferidos para um novo tubo contendo 40 µL de Tris-HCl 1M (pH 9,1) para neutralização, posteriormente amplificados em *E. coli* (ER2738) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), purificados por PEG-NaCl. Após três ciclos de seleção, as colônias individuais foram crescidas em placas de microtitulação e tituladas como descrito por Barbas et al. (2001).

3.5 Análise da integridade do DNA por eletroforese

Para analisar a integridade do DNA extraído dos fagos selecionados no *biopanning* foi feita a eletroforese em gel de agarose. As amostras foram preparadas com 2 µL do DNA extraído de 15 fagos aleatoriamente e 2 µL de *loading buffer*. Padrão molecular o marcador M13. A eletroforese correu a 110V por cerca de 1h30 min.

3.6 Sequenciamento dos fagos ligantes

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit DYEnamic™ ET *dye termination* (GE Healthcare, USA). Foi utilizado o *primer* 296 M13 (5' CCCTCATTAGTTAGCGCGTAA- CG-3').

A detecção foi feita no sequenciador automático MegaBace 1000 Genetic Analyzer (Amersham Biosciences) e as sequências de aminoácidos foram deduzidas com base nas sequências nucleotídicas e analisadas usando o software *ExPASy Bioinformatics Resource Portal*, através do link: <http://web.expasy.org/translate/>

3.7 Avaliação dos peptídeos capazes de inibir a atividade esterásica de LesA por Ensaio Fluorimétrico

O ensaio da atividade esterásica foi feito utilizando como substrato 4-MUB (4-metilumbeliferil butirato). Os 95 clones selecionados no biopanning foram utilizados para testar a capacidade inibitória da atividade esterásica da proteína LesA. Para tal, 10 µL de fagos com concentração na ordem de $2,8 \times 10^{13}$ foram incubados com 3,5 µg do lisado de *E. coli* (expressando a enzima LesA). O volume foi padronizado para 20 µL com PBS 1x. Ao abrigo de luz, foram adicionados 80 µL de 5mM de 4-MUB (1,25 mg 4-MUB; 125 µL DMSO; 1,25 µL de triton x -100) em tampão citrato (0,1M ácido cítrico, 0,05M NaH_2PO_4 , pH 5).

Os materiais utilizados para controle foram o lisado da bactéria DH5α, fago selvagem, LesA+fago selvagem e LesA, todos na concentração de 3,5 µg e volume ajustado para 20 µL com PBS e em três repetições para cada tratamento. O substrato foi adicionado anteriormente à leitura, realizada a 10 minutos, a 30 °C com comprimento de onda de excitação fixado em 365 nm e de emissão em 455nm, no fluorímetro leitor de placas Multimode (EnSpire).

Os resultados de fluorescência foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de agrupamentos de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.8 Curva Padrão de 4-MU

A curva padrão de 4-MU (*4-Methylumbelliferone*) foi feita por solução de 4-MU (1mM) e sucessivas diluições (300; 150; 75; 37,5; 18,75; 9,375 e 4,68 µM) em tampão citrato (0,1 M Ácido Cítrico, 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 5,0) a partir da solução de 1mM .

As leituras foram feitas após 10 min, a 30°C com comprimento de onda de excitação fixado em 365 nm e de emissão em 455nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise das proteínas por SDS-PAGE e verificação da integridade da proteína LesA purificada por western-blot utilizando-se anticorpo anti-LesA

A expressão de LesA em sistema heterólogo (cepa de expressão *E. coli* DH5 α) foi analisada em gel SDS-PAGE 12,5% (Figura 2), sendo possível visualizar a presença de grande quantidade de proteína no lisado da bactéria.

A transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose e marcação com anticorpo policlonal anti-LesA possibilitou a visualização da banda correspondente à proteína LesA, peso molecular esperado de 42kDa, conforme Figura 3. A espessura da banda observada após a revelação do western-blot é diretamente proporcional à quantidade de proteína utilizada na amostra, resultado que indica que o protocolo de expressão da proteína foi efetuado com êxito.

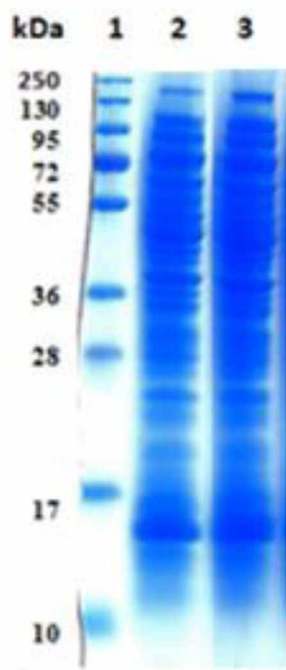


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. 1: padrão de massa molecular; 2: 14 μ L de extrato bacteriano expressando LesA; 3: 21 μ L de extrato bacteriano expressando LesA.

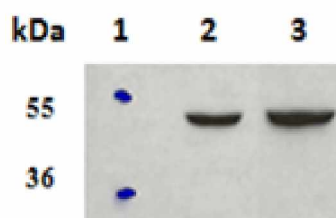


Figura 3 – Detecção da LesA por *Western-Blot*. 1: padrão de Massa Molecular; 2: 14 μ L de extrato bacteriano expressando LesA, 3: 21 μ L de extrato bacteriano expressando LesA.

4.2 Purificação da proteína LesA por imunoprecipitação

As bandas (3 a 9) referentes às frações obtidas na purificação da LesA foram avaliadas em SDS-PAGE (12,5%). As bandas são referentes a cada eluição das *beads* magnéticas, sendo que maior quantidade

de proteína é observada nas bandas referentes às primeiras eluições feitas (Figura 4-A). A purificação da proteína de interesse foi confirmada através de Western-Blot com anticorpo anti-LesA com diluição 1:1000. Foi possível observar a presença das bandas de 3 a 6, condizentes à purificação pelas *beads* magnéticas, conforme Figura 4-B.

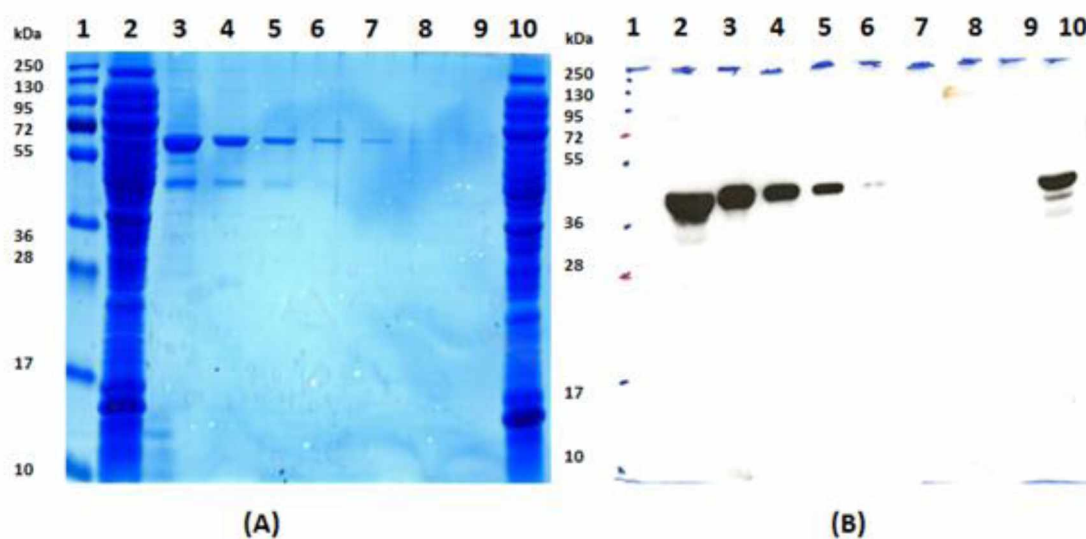


Figura 4 – A: SDS-PAGE 12,5% da purificação da proteína LesA. B: Western-blot das eluições após a imunoprecipitação da proteína LesA. 1: Padrão de Massa Molecular; 2: Lisado de DH5 α - LesA; 3-9: Eluições sucessivas da proteína LesA; 10: Fração não ligada.

4.3 Seleção (biopanning) dos peptídeos que interagem com a esterase LesA pela tecnologia de Phage Display

No processo de seleção dos peptídeos, as titulações foram eficientes nos três ciclos de seleção (Tabela 1). Os fagos não específicos ao alvo foram eliminados através de lavagem, demonstrado pela redução na concentração dos fagos após amplificação, e os fagos ligantes à proteína foram eluídos para posterior sequenciamento e identificação dos fagos inibidores.

Tabela 1 – Títulos obtidos nos 3 rounds de seleção expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

Round	Não Amplificado	Amplificado
1º	$2,7 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-11}$
2º	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-11}$
3º	$1,0 \times 10^{-5}$	-

4.4 Análise da integridade do DNA por eletroforese

Foi possível visualizar, no perfil eletroforético, as bandas referentes ao DNA de todas as 15 amostras analisadas (Figura 5), verificando-se que o material encontrava-se íntegro, demonstrando de que o processo de extração de DNA foi eficiente.

Foi realizado o sequenciamento das amostras de DNA correspondentes a 95 fagos selecionados pelo *biopanning*. Dessas amostras analisadas foi possível obter o sequenciamento de quatro amostras com alta qualidade.

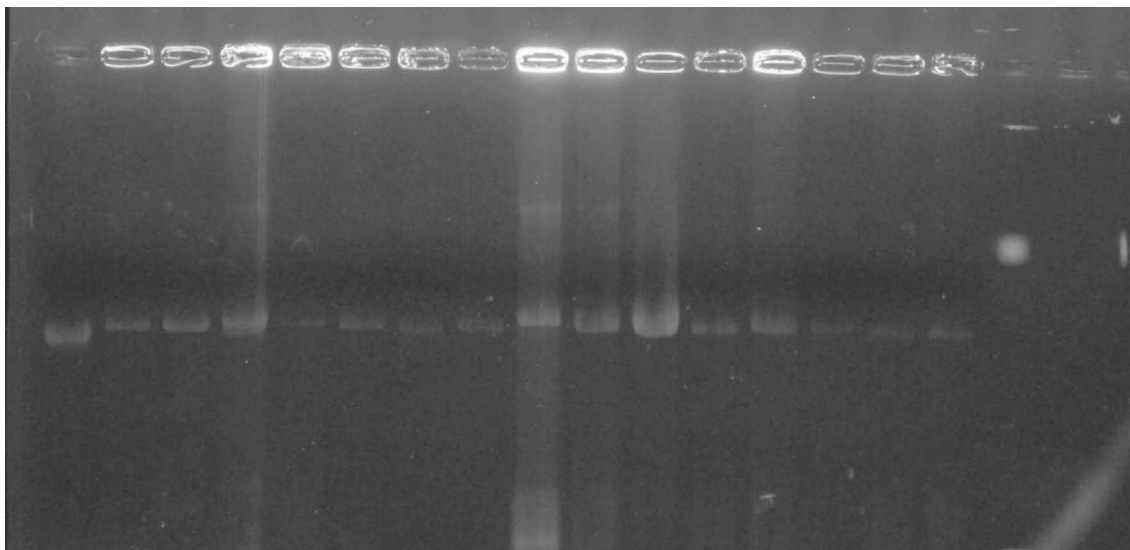


Figura 5 – Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas dos 15 fagos aleatórios

4.5 Avaliação dos peptídeos capazes de inibir a atividade esterásica de LesA por Ensaio Fluorimétrico

Com base na atividade esterásica e na capacidade de clivar lipídeos de cadeia curta e de menor hidrofobicidade da proteína LesA, foi realizado um ensaio fluorimétrico utilizando como substrato o 4-MUB (4-metilumbeliferil butirato) para avaliar o potencial de inibição da atividade da enzima dos peptídeos anteriormente selecionados. As esterases são capazes de hidrolisar o composto 4-MUB a ácido butírico e 4-MU (4-metilumbeliferil), uma molécula altamente fluorescente (ROBERTS, 1985; VANECHOUTTE *et al.*, 1988). Desta forma, concentração de 4-MU foi medida indiretamente pela intensidade fluorimétrica (A.U) após a degradação do substrato 4-MUB e dos valores de intensidade fluorimétrica/concentração obtidos na curva padrão de 4-MU.

Foram utilizados 95 clones, analisados e comparados ao controle (LesA+Fago Selvagem) quanto aos valores de intensidade fluorimétrica em 10 minutos após exposição. Com base na curva padrão de 4-MU, foi possível determinar que os valores de concentração de 4-MU são proporcionais à atividade enzimática da LesA, de forma que quanto maior o valor de 4-MU maior a atividade esterásica da enzima.

Dentre os 95 fagos analisados e sequenciados, três foram selecionados devido à baixa concentração de 4-MU (Figura 6), identificada pela baixa intensidade fluorimétrica expressa em A.U. O que indica a inibição da atividade da LesA pelo fago ligante quando comparado ao controle (LesA+fago selvagem) (Tabela 2).

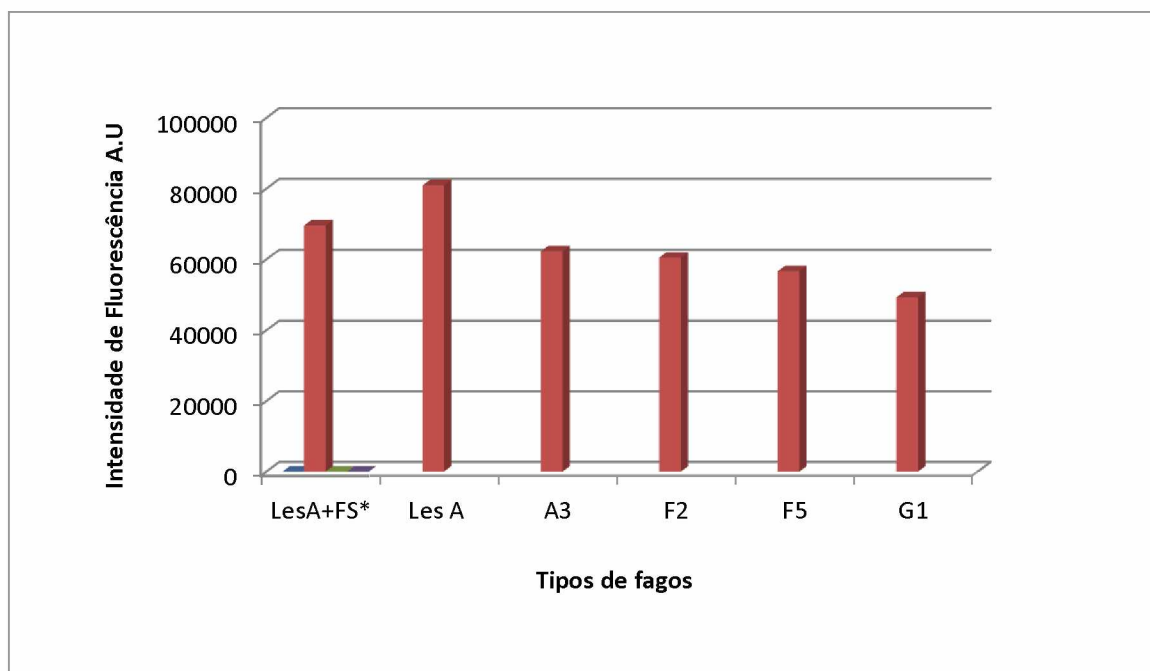


Figura 6 – Gráfico com os valores de fluorescência a 10 minutos e tipos de fagos inibidores
*LesA + Fago Selvagem

Tabela 2 – Porcentagem de inibição da enzima LesA dos fagos selecionados

FAGOS	% DE INIBIÇÃO*
F2	13,1
F5	18,6
G1	29,2

* Porcentagem de inibição de Les+Fago quando comparada à LesA+ Fago Selvagem

Na comparação dos valores de influorescência de todos os fagos, os fagos referentes às menores concentrações de 4-MU foram estatisticamente analisados. Assim, observa-se que os F2, F5 e G1 são significativa superior aos demais fagos avaliados, porém estatisticamente não

diferem entre si (Tabela 3). No entanto, o fago G1 teve maior taxa de inibição numérica, apresentando 29,2% de inibição no tempo de leitura determinado.

Tabela 3 – Médias de valores de intensidade fluorimétrica (A.U) de fagos ligantes¹

TRATAMENTOS	MÉDIAS
Fago Selvagem	12510.000000 a
DH5α	17704.000000 a
G1	49311.000000 b
F5	56675.333333 b
F2	60510.333333 b
F11	69640.333333 c
G9	72405.000000 c
F6	73893.000000 c
F8	74455.666667 c
F4	74583.666667 c
F12	75288.333333 c
E12	75337.666667 c
G4	75465.333333 c
F9	76146.000000 c
G2	77074.666667 c
E9	78436.000000 c
G3	81898.000000 c
G12	85826.333333 c
LesA	88223.666667 c
G7	88740.666667 c
E11	89640.333333 c
F7	91417.666667 c
G8	91606.000000 c
LesA + Fago Selvagem	92499.333333 c
E10	94681.000000 c
G11	97143.333333 c
F3	100373.333333 c

F1	101101.000000 c
G10	104810.333333 c
F10	119608.333333 d
G6	135676.000000 d
G5	142728.000000 d

¹Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As baixas taxas de inibição são explicadas devido à presença de outras lipases secretadas pela bactéria *E. coli*, já que foi utilizado as proteínas totais de bactéria expressando a proteína LesA. Nesse contexto, os peptídeos não são capazes de inibir tais lipases devido à ausência de especificidade peptídeo-proteína, tendo elas, portanto, ação sobre o substrato utilizado. Dentre os fagos ligantes, o sequenciamento foi de baixa qualidade e não foi possível identificar a sequência de aminoácidos.

5 CONCLUSÕES

A expressão da proteínas LesA em sistema heterólogo, assim como a purificação por imunoprecipitação mostraram-se eficientes.

A submissão da proteína LesA à biblioteca de fagos possibilitou a identificação, dentre os fagos ligantes, de três possíveis fagos com boa porcentagem de inibição da atividade esterásica da LesA quando comparados à LesA ligada ao fago selvagem, porém as sequências nucleotídicas dos mesmos apresentavam baixa qualidade e o sequenciamento do DNA dos fagos de interesse deverá ser repetido.

Ainda, devido à hipótese de que as lipases de *E. coli* possam ter mascarado o potencial de inibição dos peptídeos ligantes, os ensaios de inibição deverão ser repetidos com a enzima LesA purificada.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M.N. **Caracterização das proteínas secretadas e de vesículas de membrana externa de *Xylella fastidiosa* 9a5c**. 2016. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- APARNA, G.; CHATTERJEE, A.; SONTI, R. V; SANKARANARAYANAN, R. A Cell Wall-Degrading Esterase of *Xanthomonas oryzae* Requires a Unique Substrate Recognition Module for Pathogenesis on Rice. **Plant Cell**, v. 21, n. 6, p. 1860–1873, 2009
- AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. **Phage display technology: Clinical applications and recent innovations** *Clinical Biochemistry*, 2002.
- BARBAS, C. F.; DENNIS, R. B.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. **Phage Display, A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1 ed. NY, 2001.
- BENHAR, I. **Biotechnological applications of phage and cell display**. *Biotechnology Advances*, 2001.
- BOS, M. P.; ROBERT, V.; TOMMASSEN, J. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annual review of microbiology*, v. 61, p. 191–214, 2007.
- BRIGIDO, M. M; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.26, p. 44–51, 2002.
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 243–271, 2008.
- COSTA, H. S.; RAETZ, E.; PINCKARD, T. R.; GISPert, C.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; DUMENYO, C. K.; COOKSEY, D. A. Plant hosts of *Xylella fastidiosa* in and near southern California vineyards. **Plant Disease**, v. 88, n. 11, p. 1255–1261, 2004.
- DOW, J. M.; SCOFIELD, G.; TRAFFORD, K.; TURNER, P. C.; DANIELS, M. J. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the

excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 31, n. 2, p. 261–271, 1987.

EL ZOEIBY, A.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C. **Structure and function of the Mur enzymes: Development of novel inhibitors. Molecular Microbiology**, 2003.

FREITAG, J. H. Host range of Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology** v. 41, n. 10, p. 920-934, 1951.

FUNDECITRUS. Levantamento Fundecitrus. Disponível em:
<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/cvc-atinge- apenas-3-da-citricultura/418> Acesso em: 14 jun 2017

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 4, p. 692–744, 2004.

HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; DE LA CERDA, K. A; COSTA, H. S.; COOKSEY, D. A; WONG, F. P. Phylogenetic Relationships of *Xylella fastidiosa* Strains Isolated from Landscape Ornamentals in Southern California. **Phytopathology**, v. 97, n. 7, p. 857–864, 2007.

HOPKINS, D. L. *Xylella Fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, n. 1, p. 271–290, 1989.

HOPKINS, D.L.; PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, n. 10, p. 1056-1066, 2002.

HUANG, Q.; SHERALD, J. L. Isolation and Phylogenetic Analysis of *Xylella fastidiosa* from Its Invasive Alternative Host, Porcelain Berry. **Current Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 73–76, 2004.

HYDE-DERUYSCHER, R.; PAIGE, L. A.; CHRISTENSEN, D. J.; HYDE-DERUYSCHER, N.; LIM, A.; FREDERICKS, Z. L.; KRANZ, J.; GALLANT, P.; ZHANG, J.; ROCKLAGE, S. M.; FOWLKES, D. M.; WENDLER, P. A.; HAMILTON, P. T. Detection of small-

molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 1, p. 17–25, 2000.

JANSE, J. D.; OBRADOVIC, A. *Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control and risks. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 1 SUPPL., 2010.

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.

KOLLING, G. L.; MATTHEWS, K. R. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 1843–1848, 1999.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 336–51, 2012.

KUSHWAHA, R.; PAYNE, C. M.; DOWNIE, A. B. **Uses of phage display in agriculture: A review of food-related protein-protein interactions discovered by biopanning over diverse baits. Computational and Mathematical Methods in Medicine**, 2013.

LOPEZ, GONZALEZ, M. M. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*), p. 228-229. In Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Los parásitos de la vid (Estrategias de protección razonada). Ministerio de agricultura, Pesca y Alimentación, España, 1998.

MARIE, C.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. **Rhizobium type III secretion systems: Legume charmers or alarmers? Current Opinion in Plant Biology**, 2001.

MASHBURN, L. M.; WHITELEY, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 422–425, 2005.

MCELDRONE, A. J.; SHERALD, J. L.; FORSETH, I. N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 381, p. 419–430, 2003.

- MONTERO-ASTÚA, M.; CHACÓN-DÍAZ, C.; AGUILAR, E.; RODRÍGUEZ, C. M.; GARITA, L.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L.; HARTUNG, J. S.; RIVERA, C. Isolation and molecular characterization of *Xylella fastidiosa* from coffee plants in Costa Rica. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 482–490, 2008.
- NASCIMENTO, R. *et al* . The type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. **Scientific reports**, p.1-16, 2016.
- PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 94–123, 1995.
- POSNER, B.; SMILEY, J.; LEE, I. E.; BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 19, n. 4, p. 145-150, 1994.
- PRESTON, G. M.; STUDHOLME, D. J.; CALDELARI, I. **Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. FEMS Microbiology Reviews**, 2005.
- PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, p. 131–151, 1996.
- ROBERTS, I. M. Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: a convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. **Lipids**, v. 20, n. 4, p. 243-247, 1985.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVE, J. M.; BERETA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R. R.; QUAGGIO, J. A.; DENEGRI, J. D. Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 310, n. 8, p. 345-349, 1990.
- SCHUENZEL, E. L.; SCALLY, M.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3832–3839, 2005.
- SCOTT, J.; SMITH, G. **Searching for peptide ligands with an epitope library. Science**, 1990.

SIDHU, S. S. Engineering M13 for phage display. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 2, p. 57-63, 2001.

SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.;
ALVARENGA, R.; ALVES, L. M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.;
BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVE, J. M.; BRIONES, M. R.;
BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.;
COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.;
COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.;
FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.;
FRANCA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.;
GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.;
HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J.
E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.;
LEMONS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.;
MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E.
A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI,
C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO,
A. L.; NETTO, L. E.; NHANI JR., A.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M.
A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.;
PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA JR., H. A.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO,
R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE, M. R. A. J.; DE ROSA JR., V. E.; DE SA,
R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DA
SILVA, F. R.; DA SILVA JR., W. A.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.;
SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCE, M. F.; TRUFFI, D.;
TSAL, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-
ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.
C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa*
Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature**, v. 406, n.
6792, p. 151–159, 2000.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned
antigens on the virion surface. **Science (New York, N.Y.)**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317,
1985.

TAMIR-ARIEL, D.; ROSENBERG, T.; NAVON, N.; BURDMAN, S. A secreted lipolytic enzyme from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is expressed in planta and contributes to its virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 6, p. 556–567, 2012.

TUBELIS, A.; BARROS, J. C.; LEITE, R. M. V. B.. Difusão de clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranjas no Brasil. **Laranja**, v. 14, p. 239-254, 1993.

VAN SLUYS, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MIYAKI, C. Y.; FURLAN, L. R.; CAMARGO, L. E. A.; DA SILVA, A. C. R.; MOON, D. H.; TAKITA, M. A.; LEMOS, E. G. M.; MACHADO, M. A.; FERRO, M. I. T.; DA SILVA, F. R.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H.; LEMOS, M. V. F.; EL-DORRY, H.; TSAI, S. M.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; SIQUEIRA, W. J.; COUTINHO, L. L.; KIMURA, E. T.; FERRO, E. S.; HARAKAVA, R.; KURAMAE, E. E.; MARINO, C. L.; GIGLIOTI, E.; ABREU, I. L.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BAIA, G. S.; BLANCO, S. R.; BRITO, M. S.; CANNAVAN, F. S.; CELESTINO, A. V.; DA CUNHA, A. F.; FENILLE, R. C.; FERRO, J. A.; FORMIGHIERI, E. F.; KISHI, L. T.; LEONI, S. G.; OLIVEIRA, A. R.; ROSA, V. E.; SASSAKI, F. T.; SENA, J. A. D.; DE SOUZA, A. A.; TRUFFI, D.; TSUKUMO, F.; YANAI, G. M.; ZAROS, L. G.; CIVEROLO, E. L.; SIMPSON, A. J. G.; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.

Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1018–1026, 2003.

VANEECHOUTTE, M.; VERSCHRAEGEN, G.; CLAEYS, G.; FLAMEN, P. Rapid identification of *Branhamella catarrhalis* with 4-methylumbelliferyl butyrate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 1227–1228, 1988.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v.9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, G.; WEGRZYN, A. A novel method for screening the glutathione transferase inhibitors. **BMC biochemistry**, v. 10, p. 6, 2009.