

Análise *in planta* da expressão de genes potencialmente envolvidos na resposta a stress oxidativo em *Xylella fastidiosa*

Deibs Barbosa¹; Regina Costa de Oliveira²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: ertablo@hotmail.com¹
Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br²

Área do Conhecimento: Genômica Funcional

Palavras-chaves: qPCR; *Xylella fastidiosa*; estresse oxidativo

INTRODUÇÃO

Entre as ferramentas destinadas à análise genômica após o seqüenciamento em larga escala pode-se destacar o microarranjo de DNA, que carrega seqüências representativas de genes (COSTA DE OLIVEIRA *et al*, 2002). Esta ferramenta vem sendo utilizada para realizar comparações entre o perfil transcricional de um organismo em diferentes situações, entre diferentes linhagens de uma mesma espécie ou ainda entre espécies diferentes. Apesar de sua confiabilidade e de seu alto poder de processamento, experimentos de hibridação em microarranjos de DNA não são quantitativos e a grande quantidade de RNA necessária para as hibridações competitivas torna-se um obstáculo. Nesse sentido, a tendência observada na literatura especializada é a utilização da técnica de qPCR para a quantificação precisa das variações no número de cópias de diferentes seqüências de DNA ou RNA presentes em diferentes amostras. Entre os organismos dos quais o genoma é extensivamente estudado, pode-se destacar a *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram-negativa de crescimento lento e associada a várias doenças em organismos vegetais de grande importância econômica. O seqüenciamento genômico da linhagem responsável pelo desenvolvimento da Clorose Variegada dos Citros (CVC), *Xylella fastidiosa* (Xf) 9a5c, abriu caminho para o surgimento de novas abordagens de análise funcional de genomas bacterianos por alguns laboratórios brasileiros. A análise funcional do genoma da Xf 9a5c é de especial interesse, pois pode contribuir para o entendimento dos aspectos fisiológicos que possibilitam a interação patógeno-hospedeiro. Hibridações em microarranjos mostraram que células de Xf 9a5c recentemente isoladas da planta apresentavam expressão elevada de alguns genes supostamente envolvidos com patogenicidade e/ou adaptação às condições nutricionais do xilema, um ambiente extremamente inóspito contendo basicamente água, sais minerais e alguns poucos nutrientes. Destacamos nesse estudo duas ORFs possivelmente relacionadas à resposta ao *burst* oxidativo, um importante mecanismo de defesa de organismos vegetais: o gene *araL* (ORF Xf1254) e o gene *oxyR* (ORF Xf1532). O primeiro, por demonstrar uma grande similaridade estrutural com o gene *soxR* (ainda não caracterizado em *Xylella fastidiosa*), encontrado em *Escherichia coli*, com atuação direta na resposta ao estresse oxidativo. O segundo gene, *oxyR* em vários sistemas bacterianos induz o regulon de genes indutíveis por peróxido de hidrogênio, além disso, está envolvido no controle de síntese de proteínas da superfície celular. Experimentos de hibridação com amostras de RNA obtidas de bactérias isoladas diretamente do interior dos vasos xilemáticos, sem nenhum tipo de cultivo laboratorial, constituiriam uma maneira mais adequada para averiguar diretamente a correlação entre a expressão de diferentes genes e o desenvolvimento de doenças. No entanto, os experimentos de hibridação em microarranjos necessitam de uma quantidade muito

grande de RNA para a realização das hibridações (50 µg, para cada marcação), o que inviabiliza a adoção deste tipo de abordagem, uma vez que, em termos práticos, não é viável isolar diretamente do xilema a massa de bactérias necessária para extrair esta quantidade de RNA.

OBJETIVOS

O projeto se propôs a quantificar, através de qPCR, variações na expressão de genes identificados como diferencialmente expressos em experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. Estes experimentos serão destinados, primeiramente, ao estudo funcional de *Xylella fastidiosa* cultivada em um meio artificial (3G10-R) que apresenta características químicas encontradas no xilema de algumas plantas tipicamente infectadas por esta bactéria. É nosso interesse, não apenas quantificar a modulação da expressão gênica em amostras de RNA provenientes de células em cultura, confirmando de maneira mais precisa os resultados das hibridações em microarranjos, mas verificar se esta modulação acontece também em bactérias obtidas do interior de plantas infectadas (sintomáticas ou não).

METODOLOGIA

Células de *Xf 9a5c* foram cultivadas em meio PW até atingir uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0.2 (final da fase exponencial de crescimento). Estas células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBS e esta suspensão final foi utilizada para infectar plantas de *Citrus sinensis*. Alíquotas foram injetadas através de uma seringa de insulina na base do pecíolo de 100 folhas jovens. A base do pecíolo inoculado foi então protegida com a aplicação de uma fina camada de parafina (Parafilme) e as plantas foram incubadas por variados períodos com fotoperíodo natural. Inicialmente, após o período de 6 horas, 10 horas e 24 horas, 25 folhas foram coletadas para o isolamento das células bacterianas e extração de RNA. As folhas inoculadas correspondentes a esses períodos tiveram a extremidade do pecíolo selada com parafina quente e a assepsia externa foi feita mergulhando as folhas em etanol 70% durante 30 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio 2,5% durante 2 minutos, e novamente etanol 70% durante 30 segundos e finalmente lavadas com água bidestilada e ultra-filtrada. As folhas tiveram a nervura central e pecíolo extraídos e a extremidade selada foi descartada. O conjunto nervura central e pecíolo foram cortados em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento e esses fragmentos foram centrifugados a uma rotação máxima de 14000 rpm durante 20 minutos em microtubos para coleta do líquido do interior dessas partes foliares. O RNA das células bacterianas contidas no líquido coletado no processo descrito acima, foi extraído através do Kit comercial RNeasy® da Qiagen segundo o protocolo do fabricante. Toda a massa de RNA obtida através do processo acima descrito foi convertida em cDNA (*single strand* DNA – ssDNA) através de uma reação de transcrição reversa. O cDNA foi purificado e concentrado através da coluna comercial Microcon® YM-30 e quantificado através do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. As reações de qPCR foram realizadas em um sistema ABI 7500 da Applied Biosystems, utilizando um kit SYBR GREEN®. As ORFs analisadas foram *Xf1254* e *Xf1532*, ambas codificantes de fatores transcricionais possivelmente envolvidos na resposta do microrganismo ao estresse oxidativo.

RESULTADOS

Após o isolamento da bactéria dos vasos xilemáticos, o RNA foi extraído com o auxílio do kit comercial RNeasy® da Qiagen. A quantidade de RNA obtida foi inferior à quantidade recomendável para a realização de experimentos de qPCR e isso

provavelmente se deve ao baixo índice de sobrevivência, uma vez que o cultivo *in vitro* da bactéria por um tempo prolongado pode causar a perda parcial de sua capacidade infectiva. Nos experimentos de microarranjo realizados por nosso grupo, o gene *araL*, ORF *Xf1254*, é um dos genes cuja expressão se mostrou sub-regulada em células cultivadas em 3G10-R em relação à sua expressão em células cultivadas em PW. Muito embora a expressão desse gene também tenha se mostrado sub-regulada nos experimentos de qPCR, os valores obtidos em microarranjo e qPCR não são coincidentes (-0,3182 e -1,0770 respectivamente). Uma possível explicação para a discrepância entre os valores médios dos experimentos de microarranjo e qPCR é o fato de os experimentos em microarranjo terem sido realizados em 8 réplicas e o desvio padrão dos resultados ser relativamente alto. Além disso, vários fatores podem influenciar diretamente o procedimento de validação de resultados de microarranjo por qPCR como a qualidade do RNA utilizado nos experimentos e fatores contaminantes como sais, álcoois e fenóis que podem comprometer a transcrição reversa. Se tratando de qPCR, outras possibilidades podem contribuir para esta discrepância como *amplification biases*, amplificação exponencial de erros, problemas na especificidade de *primers* (MOREY *et al.*, 2006). O gene *araL*, ORF *Xf1254* da *X. fastidiosa*, é possivelmente homólogo ao gene *soxR* caracterizado em *Escherichia coli* e que possui homólogos em diferentes espécies como *Pseudomonas aeruginosa* e *Arthrobacter aurescens* (GAUDU & WEISS, 1996). SoxR é um fator transcricional de 17 kDa pertencente à família MerR de proteínas e está diretamente ligado à resposta a estresse oxidativo. No modelo clássico do regulon *soxRS* da *Escherichia coli*, a presença da espécie reativa $O_2^{\cdot-}$, ânion superóxido, ativa a proteína SoxR através da oxidação de um núcleo [2Fe-2S]. Após 6 horas do momento da inoculação, o nível de expressão da ORF *Xf1254* aumentou 2,6 vezes e após 10 horas o nível de expressão dessa ORF *Xf1254* estava 3,6 vezes maior que seu nível de expressão no momento da inoculação (figura 1A), mantendo esse perfil de expressão após 24 horas.

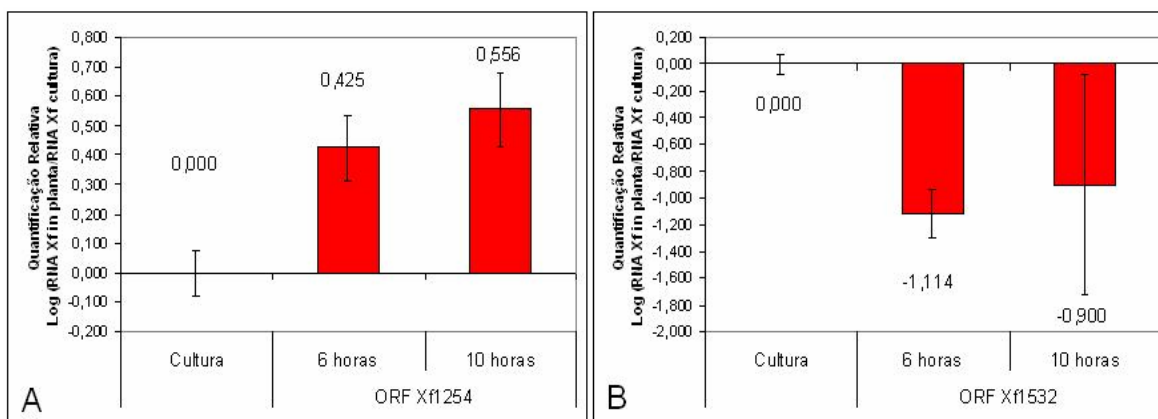


Figura 1: Análise da expressão das ORFs *Xf1254* e *Xf1532* *in planta* através de qPCR. O painel A mostra um aumento de 2,6 e 3,6 vezes na expressão da ORF *Xf1254* em 6 horas e 10 horas respectivamente. O painel B mostra o nível de sub-regulação da ORF *Xf1532*. O nível de expressão *in vitro* foi considerado calibrador em relação ao nível de expressão depois de 6 e 10 horas. O nível de expressão das ORFs nos diferentes períodos está representado pelo Log (RNA *Xf* planta/RNA *Xf* cultura).

Outro gene cuja expressão foi analisada por qPCR foi o *oxyR*, ORF *Xf1532*. Encontrado no genoma de diversos microrganismos, esse gene codifica um ativador transcricional sensível a peróxido de hidrogênio, H_2O_2 (POMPOSIELLO & DEMPLE, 2001). O

produto OxyR possui uma massa de 34 kDa e dois resíduos de cisteína responsáveis pela detecção de H₂O₂, Cys199 e Cys208. 6 e 10 horas após o momento de inoculação, o nível de expressão gênica se mostrou sub-regulado, um resultado que não condiz com o possível estresse oxidativo ao qual o microrganismo estava sujeito. Esse resultado possivelmente se deve à má qualidade do RNA obtido pela metodologia acima descrita (figura1B). O “burst” oxidativo resultante da produção de espécies reativas de oxigênio constitui um dos eventos de defesa mais prematuros do organismo vegetal. Esse fato explica o aumento significativo na expressão do gene *araL*, ORF *Xf1254*. Embora experimentos de qPCR possam fornecer alguns resultados satisfatórios mesmo a partir de RNA parcialmente degradado ou impuro, muitas vezes a sensibilidade da técnica produz resultados inverossímeis e que requerem confirmação.

CONCLUSÕES

O meio PW (“Periwinkle Wilt”) descrito por Davis *et al* (1981), apesar de ser um meio complexo, garante um crescimento vigoroso *in vitro* de *X. fastidiosa*. A utilização do meio de cultura 3G10-R descrito por Leite *et al* (2004), promove o crescimento de linhagens de *Xylella fastidiosa* mais lentamente comparado com o crescimento em PW, mas traz a proposta de obtenção de células em condições fisiológicas que se assemelham àquelas condições características do microrganismo em seu habitat já que a composição desse meio de cultura mimetiza alguns aspectos do xilema. Dessa forma é possível analisar *in vitro* o comportamento de *X. fastidiosa* que supostamente ocorreria durante a infecção e a colonização do hospedeiro. O processo de isolamento da *X. fastidiosa* a partir de folhas inoculadas se mostrou eficiente muito embora a quantidade de células viáveis fosse muito pequena para a extração de RNA para experimentos de qPCR. Uma vez aplicada e padronizada, a amplificação de RNA pode ser uma alternativa viável que vem ao encontro de nossas necessidades atuais. O nível de expressão do gene *araL*, ORF *Xf1254*, se mostrou aumentado *in planta* indicando sua sensibilidade aos mecanismos de defesa da planta e sua possível homologia baseada não somente na similaridade da seqüência de DNA mas também em sua funcionalidade. Embora o gene *oxyR* esteja bem caracterizado em outros microrganismos, o nível de expressão de seu homólogo em *X. fastidiosa*, ORF *Xf1532*, não pôde ser determinado uma vez que os resultados obtidos não estão coerentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA DE OLIVEIRA, R.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; LEITE, D.B.; DE SOUZA, A.A.; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A; NUNES, L.R. Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 216(1):15-21.2002.

GAUDU, P.; WEISS, B. SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proceedures of National Academy of Science*. 93:10094-10098. 1996.

MOREY, J.S.; RYAN, J.C.; DOLAH, F.M.V. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures*. 8:175-193. 2006.

POMPOSIELLO, P.J.; DEMPLE, B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology*. 19:109-114. 2001.