PÂMELA DE OLIVEIRA PENA

**Estudos estruturais e funcionais da proteína repressora PhoU na
sinalização de transporte de fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Andrea Balan

Versão Corrigida

São Paulo
2017

RESUMO

PENA, P. O. **Estudos estruturais e funcionais da proteína repressora PhoU na sinalização de transporte de fosfato em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A habilidade de sensoriar o ambiente extracelular e responder às suas mudanças é inerente para a maioria das bactérias. As concentrações de nutrientes direcionam os processos metabólicos relacionados à sobrevivência e proliferação. O fosfato inorgânico (Pi) é um dos nutrientes cuja regulação, sensoriamento e sinalização são bastante conservados em bactéria. Um dos mecanismos de captação do íon fosfato com alta afinidade é o sistema Pst, um transportador do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*), localizado na membrana interna das células. Este transportador, juntamente com as proteínas PhoR/PhoB que formam um sistema de dois componentes (*Two-Component Regulatory System*), são capazes de sensoriar e monitorar os níveis deste íon nas células. Ambos os sistemas pertencem ao chamado regulon Pho, conjunto de genes envolvidos no transporte, captação e metabolização do fosfato. Estudos tem mostrado que a interação entre os sistema Pst e o sistema dois-componentes PhoR/PhoB é mediada pela proteína PhoU, um regulador negativo cujo gene encontra-se no mesmo operon do transportador. Apesar de muito estudados em *Escherichia coli*, poucas informações existem sobre as características destes sistemas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, bactéria responsável pelo cancro cítrico e de grande importância econômica para o país. Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que *X. citri* conserva a maioria dos genes descritos como pertencentes ao regulon Pho, incluindo o sistema Pst, as proteínas PhoR/PhoB e PhoU. Este trabalho, portanto, tem como objetivos, a caracterização funcional e estrutural da proteína PhoU de *X. citri* e a análise da possível interação de PhoU com a proteína PhoR, a histidina quinase do sistema dois componentes. Para tal, as proteínas foram expressas em linhagens de *E. coli* Tuner e purificadas por cromatografia de afinidade a metal, seguida de exclusão molecular. Visando a caracterização biofísica e estrutural da proteína PhoU, foram realizados ensaios de dicroísmo circular, cristalização, análises de bioinformática e modelagem molecular. Os resultados de bioinformática mostraram que PhoU conserva características estruturais e funcionais quando comparada com ortólogos. Após sua purificação, a proteína foi produzida na sua forma enovelada e mostrou interação com ligantes, conforme descrito na literatura para ortólogos. A expressão da proteína PhoR também foi obtida e ensaios de *pull-down* foram realizados para a caracterização da interação entre PhoU-PhoR. Adicionalmente, foram realizados estudos de expressão das proteínas em diferentes condições de cultivo, utilizando-se anticorpos policlonais anti-PhoU e anti-PhoR. Os resultados apresentados neste projeto são de grande importância uma vez que se obteve a padronização dos processos de produção de ambas as proteínas e ensaios biofísicos e estruturais para a futura caracterização do complexo, o que será de grande relevância para a compreensão do papel destes sistemas na fisiologia da bactéria.

Palavras chave: Sistema de Dois Componentes. Pho Regulon. Sistema Pst. *Xanthomonas citri*. PhoU.

ABSTRACT

PENA, P. O. **Structural and functional studies of the repressor protein PhoU in phosphate signalling and uptake in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*** 2018. 75 f. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The ability to sensor the extracellular environment and respond to its changes is inherent to most bacteria. Nutrient concentrations direct metabolic processes related to survival and proliferation. Inorganic phosphate (Pi) is one of the nutrients whose regulation, sensing and signalling are quite preserved in bacteria. One of the mechanisms for phosphate ion uptake with high affinity is the Pst system, composed by an ABC transporter (ATP-Binding Cassette), located on the inner membrane of the cells. This transporter, along with the PhoR/PhoB proteins, which form a Two Component Regulatory System, are capable of sensing and monitoring the levels of phosphate in cells. Both systems belong to the called regulon Pho, set of genes involved in phosphate transport, uptake and metabolism. Studies have shown that the interaction between the Pst system and the two component PhoR/PhoB system is mediated by the PhoU protein, a negative regulator, whose gene is located in the same operon of Pst system. Although much studied in *Escherichia coli*, there are few information about of these systems in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the major causative of citric canker. Studies conducted by our group showed that *X. citri* conserves most of the genes described as belonging to regulon Pho, including the Pst system, the proteins PhoR/PhoB and PhoU. This work, therefore, aimed at performing functional and structural characterization of the *X. citri* PhoU protein and analyzing the possible interaction of PhoU with the PhoR protein, the histidine kinase of the Two Component System. For this, the proteins were expressed in *E. coli* Tuner strains and purified by metal affinity chromatography, followed by size exclusion chromatography. Aiming at the biophysical and structural characterization of the PhoU protein, we performed circular dichroism, crystallization, bioinformatics and molecular modeling. The results of bioinformatics showed that PhoU retains structural and functional characteristics when compared with orthologs. After purification, the protein was produced in its folded form and showed interaction with ligands, as described in the literature for orthologs. Expression of the PhoR protein was also obtained and Pull Down assays were performed for the characterization of the interaction between PhoU-PhoR. In addition, protein expression studies were carried out under different culture conditions using polyclonal anti-PhoU and anti-PhoR antibodies. The results presented in this project are of great importance, once the standardization of the production processes of both proteins has been obtained, as well as biophysical and structural information. These information will be important for future characterization of the complex, which will be of great relevance for the understanding of the role of these systems in the physiology of bacteria.

Keywords: Two component system. Pho Regulon. Pst System. *Xanthomonas citri*. PhoU.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sensoriamento do ambiente: resposta bacteriana às condições adversas de fosfato, através da transdução de sinais.

A habilidade de sensoriar o ambiente extracelular e responder às suas mudanças é inerente para a maioria das bactérias. As concentrações de nutrientes direcionam os processos metabólicos relacionados à sobrevivência e proliferação (LUBIN, et al., 2016). A capacidade das células de adquirirem à adaptação frente às condições externas é uma ferramenta evolutiva, capaz de submeter uma população inteira à seleção natural, de maneira a manter características essenciais, como a correta percepção do ambiente, e consequentemente, a geração de uma resposta eficaz para momentos necessários (MARQUES, 2012).

As células possuem diversos sistemas diferenciados para lidar com cada tipo de circunstância que as ameaça. Em primeiro lugar, existe o sinal originado a partir de um estímulo, que pode ser físico ou químico, seguido do mecanismo de transdução e por fim, uma resposta é gerada a partir dessas circunstâncias (MARQUES, 2012).

Dentre os sistemas capazes de sensoriar o ambiente, é comum encontrar um sistema do qual chamamos de dois componentes, ou TCRS (*Two Component Regulatory System*) que é bastante conservado em bactéria. O TRCS é constituído basicamente de uma proteína capaz de se auto-fosforilar em resíduos de histidina (Histidinas quinases, ou *Histidine Kinase*, em inglês - HK) e de sua parceira, proteína capaz de retirar o fosfato da HK e transferir para grupos aspárticos em sua própria molécula, sendo considerada a proteína reguladora de resposta (RR). Esse sistema traz muitos benefícios para as bactérias, visto que estes são capazes de mediar as mais distintas respostas, desde osmolaridade, estado de óxidorredução, densidade populacional e nutrientes (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; LUBIN et al., 2016; MARQUES, 2012).

Dentre os sistemas bacterianos de dois componentes, alguns são específicos na sinalização frente à presença/ausência de nutrientes. Um dos nutrientes cuja regulação é altamente controlada em bactéria é o fosfato

inorgânico (Pi). Seja nas membranas, ácidos desoxirribonucleicos, em lipídeos, proteínas, ou nas reservas energéticas da célula, o Pi é essencial para a sobrevivência e manutenção bacteriana e, portanto, a resposta para a limitação de fosfato é altamente conservada em bactéria. O TCRS responsável por sinalizar a limitação de fosfato é denominado PhoR-PhoB, em que PhoR é a proteína HK e PhoB, a RR (Figura 1). Entretanto, alguns dos mecanismos relacionados à transdução de sinal em condições de escassez de fosfato ainda não foram totalmente elucidados (CRÉPIN et al., 2011; LUBIN et al., 2016; PEGOS et al., 2014).

Figura 1 - Processo de transdução de sinal do sistema de dois componentes (TCRS). PhoR, a histidina quinase recebe um estímulo e se auto-fosforila em resíduos de histidina. Em seguida, PhoR transfere os grupos fosforis para sua parceira, a proteína reguladora de resposta (PhoB), que fosforilada, se torna ativada e disponível para se ligar às regiões específicas do DNA, dando início ao processo de transcrição de genes necessários para o momento, o que caracteriza a resposta perante o estímulo. Elaborado pelo próprio autor.

A transdução de sinal, por sua vez, não tem outro intuito senão o de modificar o padrão de expressão gênica frente à ausência do nutriente - nesse caso, o Pi - de maneira que, através da sinalização, ocorra a metabolização de fontes de fosfato dentro da bactéria, para que o déficit seja diminuído e a célula bacteriana volte para seu equilíbrio (CRÉPIN et al., 2011; WANNER, 1990; WANNER, 1996)

A modificação do padrão de expressão gênica é tão importante para a célula, quanto a própria sinalização. O princípio que gere esse tipo de organização celular é o princípio da economia de energia. Nas células bacterianas, genes são transcritos somente quando necessários e são organizados em operons (genes cuja transcrição estão sob o comando de um

mesmo promotor), regulons (genes cuja transcrição estão sob o efeito de um mesmo fator de transcrição) e estimulons (genes cuja transcrição estão sob o comando de um mesmo estímulo) (MARQUES, 2012). Dessa forma, a célula consegue de uma só vez, ativar genes relacionados à vias inteiras, suprimindo carências nutricionais, como por exemplo, a de Pi. Os genes relacionados ao metabolismo e captação de Pi na célula, na carência do mesmo, são aqueles que estão sob o comando do mesmo fator de transcrição, a proteína reguladora de resposta do TCRS, PhoB. Todo o conjunto de genes regulados por PhoB caracteriza um regulon, conhecido como “regulon Pho” (CRÉPIN et al., 2011; GARDNER et al., 2014; LEE et al., 2014; LUBIN et al., 2016; WANNER, 1990; WANNER, 1996).

1.2 O regulon Pho

Dentre os elementos indispensáveis para o desenvolvimento celular, o fósforo é um dos mais abundantes nos organismos vivos. O fósforo representa 3% da massa celular e está envolvido em diversas reações celulares importantes, desde a fosforilação de proteínas, biossíntese de ácidos fosfolipídicos e ácidos nucleicos, até ao processo de produção de energia (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; WANNER, 1996), sendo o fosfato inorgânico (PO_4^{3-} ou Pi) a fonte de fósforo mais assimilada pela célula (ALVAREZ-MARTINS et al., 2012; PEGOS et al., 2014). Estudos realizados em *Escherichia coli* demonstraram que a sinalização e a regulação do regulon Pho, iniciam-se em condições nas quais os níveis de Pi encontram-se abaixo de 4 μM . Por consequência, respostas adaptativas de sobrevivência e patogenicidade são desencadeadas na ausência de fosfato como, por exemplo, diminuição da motilidade (RASHID; RAO; KORNBERG, 2000), super expressão de genes de virulência, acúmulo de polifosfato intracelular, diminuição da capacidade de colonização, diminuição de formação de biofilme, dentre outras características (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; LUBIN et al., 2016; PEGOS et al., 2014; SANTOS-BENEIT et al., 2015).

Os genes envolvidos com a assimilação e regulação dos níveis de fosfato em *E. coli* foram primeiramente descritos por Wanner (1993 e 1996) como parte do denominado regulon Pho (BAEK; LEE, 2006; HAN et al., 1999; HARRIS et

al., 2001). A conservação e importância deste sistema, portanto, tem sido demonstrada desde então, em diversos microrganismos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (BRAIBANT et al., 1996; LEE et al, 2014; LUZ et al., 2012).

A partir da ativação de PhoB, por meio de fosforilação efetuada por PhoR, uma série de genes relacionados à assimilação e metabolismo de fosfato são induzidos. Tais genes apresentam em sua região promotora uma sequência conservada denominada de *Pho boxes*, altamente reconhecida por PhoB. Em *E. coli*, PhoB regula diretamente a transcrição de 31 genes, incluindo *phoA*, *phoBR*, *phoE*, *phoH*, *psiE*, *phnC-P*, *ugpB-Q*, (todos relacionados à metabolização de fosfato) e, em especial, os genes *pstSCAB* que codificam o transportador de alta afinidade de fosfato do tipo ABC (do inglês *ATP Binding Cassette*), também chamado de sistema Pst (*Phosphate Specific Transporter*). Este sistema, além de internalizar fosfato para o ambiente citoplasmático, também é descrito como um transportador que possui participação na regulação da sinalização juntamente com o sistema de dois componentes PhoR-PhoB. (CRÉPIN et al., 2011; GARDNER et al., 2014; LEE et al., 2014; LUBIN et al., 2016).

O sistema Pst é constituído de duas proteínas integrais de membrana, PstA e PstC (heterodímero), também identificadas como domínios TMD ou *Transmembrane Domains* (domínios transmembranares), e outra molécula do tipo ATPase, PstB, ou NBD *Nucleotide-Binding Domain* (domínio de ligação a nucleotídeos) que neste caso, apresenta-se como dímero e localiza-se no lado citoplasmático do complexo. Adicionalmente, como qualquer sistema transportador ABC do tipo importador, existe uma proteína ligadora periplasmática (*Periplasmatic-Binding protein*) (WANNER, 1996), responsável pela afinidade e especificidade do transporte e que pode ser denominada PstS, PhoS, ou PBP (Figura 2). Em condições nas quais a disponibilidade de fosfato é baixa, as proteínas periplasmáticas devem capturá-lo com alta eficiência e disponibilizá-los às proteínas de membrana. Após a interação da proteína periplasmática com o fosfato e, conseqüentemente, com as proteínas de membrana no sistema Pst, ocorre uma série de mudanças conformacionais que engatilham a hidrólise do ATP pelas ATPases (CRÉPIN et al., 2011; LAMARCHE et al., 2008; PEGOS et al., 2014).

Figura 2 - Ilustração de um transportador ABC do tipo II, característico para o Sistema Pst. Imagem ilustra a topologia do transportador ABC do tipo II baseado no transportador de Vitamina B12, BtuCD-F. Binding Protein, é a proteína periplasmática capaz de se ligar ao nutriente com alta afinidade. TMD é o domínio integral, transmembranar, responsável por formar um poro de passagem para o transporte e internalização do alvo. NBD é o domínio cuja hidrólise de ATP ocorre, mediada por mudanças conformacionais do transportador. Retirado e modificado de Locher (2016).

Além da função de transporte propriamente dita, a proteína PstS, também atua como coadjuvante na sinalização celular quando o sistema de transporte está ativo ou mesmo quando o transporte e sinalização são inativos (HSIEH et al., 2010; WANNER, 1996). O transporte e captação de fosfato, por sua vez, nada mais é do que uma das respostas secundárias, promovidas através da sinalização na limitação de Pi, no sentido de restabelecer o equilíbrio do nutriente no ambiente intracelular.

Neste contexto, onde o equilíbrio é restabelecido pela sinalização, associada às mudanças conformacionais das proteínas, e também pelo transporte do nutriente, destaca-se o papel de mais uma proteína, denominada PhoU, cujo gene em *E. coli* e em muitas outras bactérias, é localizado no mesmo operon que codifica o sistema Pst (*pstSCABphoU*). A função de PhoU ainda é amplamente discutida e não completamente elucidada (GARDNER et al., 2014, 2015; ZHENG et al, 2016).

1.3 PhoU, a proteína que conecta o sistema Pst e o sistema de dois componentes PhoR-PhoB

A revisão da literatura mostra que apesar de PhoU pertencer ao mesmo operon que codifica o sistema Pst, sua função não é de captação como a das

outras proteínas do operon (STEED; WANNER, 1993). Por outro lado, PhoU, apresenta uma função moduladora tanto das vias de sinalização de Pi (TCRS PhoR-PhoB), quanto sobre as proteínas do sistema Pst (LAMARCHE et al., 2008; LEE et al., 2014; LUBIN et al., 2016; SANTOS-BENEIT, 2015).

Estudos realizados por Wanner e colaboradores (1991) já relatavam a importância de PhoU e a dinâmica dessa proteína na modulação do regulon Pho. Em um primeiro momento, foi observado que a deleção do gene *phoU* não interferia no transporte de fosfato pelo sistema Pst, mas levava à diminuição drástica do crescimento celular. Posteriormente, PhoU foi associada à uma função específica no processo de sinalização, uma vez que sua ausência levava à constitutividade da expressão de PhoR, tanto na presença quanto na carência de fosfato, fato que causava um grave desequilíbrio à célula (WANNER, 1996).

Estudos recentes têm mostrado que, na abundância de fosfato, ocorre a formação de um complexo repressor entre os sistemas Pst e PhoRB, mediado concomitantemente pela interação de PhoU com PstB e PhoR (GARDNER et al., 2014; GARDNER et al., 2015; LEE et al., 2014; GIBSON et al., 2015). O mecanismo pelo qual PhoU liga-se às proteínas do complexo ainda não foi totalmente elucidado, porém Gardner e colaboradores demonstraram que PhoR possui um domínio denominado *PAS* (do inglês *Per-ARNT-Sim*), pelo qual PhoU poderia interagir. Da mesma maneira, PhoU também se ligaria a PstB, bloqueando a hidrólise de ATP (GARDNER et al., 2014, 2015). Mais recentemente, Vuppada e colaboradores (2018) passaram a sugerir que PhoU seria a intermediadora das mudanças conformacionais promovidas pelo sistema Pst, através de seus estados *outward facing* (conformação aberta para o periplasma) e *inward facing* (conformação aberta para o citoplasma) o que levaria ao estado de quinase e fosfatase de PhoR.

Nesse contexto, a desativação do complexo repressor envolveria uma cascata de reações desencadeadas pelo sistema de dois componentes e pode ser gerada tanto por mudanças conformacionais no sistema Pst, devido à baixa ocupação de fosfato no transportador, como também por sinais no domínio regulatório de PhoR. Dessa forma, quando PhoU é liberada do complexo, PhoR pode novamente se autofosforilar em resíduos de histidina e passa a exercer a função de quinase, rapidamente transferindo o grupo fosforil para PhoB, que os recebe em resíduos de aspartato (VUPPADA et al, 2018). A fosforilação de PhoB

facilita sua ligação com o DNA nas regiões promotoras *Pho boxes*, de forma que PhoB recrute a RNA polimerase (subunidade sigma 70), o que facilita o início da transcrição dos genes. A desativação de PhoB e a desfosforilação mediada por PhoR seria estimulada de alguma forma ainda não elucidada. Estudos relatam, porém, que quando a concentração de fosfato no ambiente intracelular volta ao equilíbrio necessário, PhoR recebe este sinal e desfosforila PhoB, o que leva ao término da transcrição e consequentemente, ao retorno do complexo repressor (GARDNER et al., 2014).

O retorno à conformação inicial do complexo repressor ocorreria lentamente, de uma condição de escassez para um ambiente em crescente disponibilidade de fosfato. Lamarche e colaboradores (2008) relatam que PhoU e PstB são requeridas para a desfosforilação de PhoB (também chamada de phospho-PhoB, quando ativada). Adicionalmente, Wanner (1996) sugere que PhoU é essencial para a repressão do Regulon Pho, sob condições das quais o fosfato esteja abundante, observação essa, que se mantém até os dias de hoje. (Figura 3).

Figura 3 - Esquema de sinalização do sistema Pst na captação e transporte de fosfato em *E. coli*, em diferentes condições nutricionais. A ativação do regulon ocorre em condições de carência de fosfato ($P_i < 4 \mu M$), a qual induz a ação das proteínas de membrana, PstS, PstA, PstB, PstC e PhoU a captarem o P_i . O P_i por sua vez, é utilizado para fosforilação de PhoB e posterior ativação dos genes. Quando o fosfato

está em excesso, PhoR se desfosforila e um complexo repressor é formado com a participação das proteínas PhoR, PhoU e PstB. Retirado de Lamarche et al. (2008).

Apesar do mecanismo de repressão dos complexos ser largamente caracterizado em *E. coli*, ainda há muitas questões a serem respondidas, especialmente em outros organismos. Lubin e colaboradores (2016), por exemplo, relataram em *Caulobacter crescentus*, que PhoU não possui influência sobre a proteína PhoB ou PhoR, mas estaria relacionada à metabolização de fosfato inorgânico na célula, logo após o transporte (Figura 4). Esta hipótese foi corroborada pela presença de grânulos de polifosfato em células portadoras de deleção no gene *phoU*. Os autores sugerem duas alternativas: (I) PhoU regularia a importação de Pi pelo sistema Pst; ou (II) PhoU regularia o metabolismo de fosfato intracelular. Tais resultados indicam que há variações nos mecanismos do Regulon Pho em diferentes microrganismos.

Figura 4 - Modelo para regulação de PhoU em relação à limitação extracelular de fosfato em *Caulobacter crescentus*. O sistema de alta afinidade Pst importa fosfato inorgânico (em vermelho) para o citoplasma. Quando o fluxo de transporte decai, a proteína PhoR, é ativada e se autofosforila, consequentemente fosforilando PhoB, sua parceira. PhoB fosforilada, se liga às regiões *pho* boxes (azul) dos genes alvos, incluindo os genes do transportador *pst*. PhoU, não conecta o transportador Pst a PhoR, ao invés disso, PhoU supostamente inibe a captação de fofato pelo sistema Pst ou possivelmente regula o metabolismo interno de Pi. Retirado de Lubin et al. (2016).

Uma vez que em comum, tais mecanismos significam sobrevivência, manutenção e aumento de virulência e patogenicidade de microrganismos

(LAMARCHE et al, 2008), é de suma importância que estudos adicionais sejam realizados nos mais diversos tipos de microrganismos para caracterização das proteínas envolvidas nessas vias essenciais.

1.4 O regulon Pho, o sistema PhoR-PhoB, e o sistema Pst em *Xanthomonas citri*

Diante da diversidade entre as bactérias, é de relevância que estudos das vias de sinalização e captação de fosfato sejam realizados para diferentes organismos que não somente *E. coli*, incluindo aqueles de relevância médica ou econômica, como os fitopatógenos (PEGOS, 2015). Um dos gêneros mais relevantes para a agricultura brasileira é o gênero *Xanthomonas*, da Família Xanthomonadaceae, Ordem Xanthomonadales, Classe Gammaproteobacteria, Filo Proteobacteria. As espécies deste gênero podem atacar arroz, tomate, banana, feijão, todas as espécies de citros e algodão (KNAAK; BERLITZ; FIUZA, 2014).

Xanthomonas citri subsp. *citri* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica estrita, com crescimento ótimo entre 28° C a 30° C e com flagelo polar, que utiliza açúcares como glicose, sacarose, frutose, xilose e galactose como fontes de carbono (KIM et al., 2004; TUNG; KUO, 1999). Uma característica importante desta bactéria é a produção de um polissacarídeo denso e amarelo (devido ao pigmento xantomadina) conhecido como goma xantana, que tem muitas funções, mas, principalmente, é relacionado à maior capacidade de infecção e patogenicidade (Figura 5A). *X. citri*, por sua vez, possui capacidade de infectar várias espécies de citrus, especialmente laranjas, através de veiculação hídrica, o que pode acarretar em perdas econômicas significativas. Os impactos relacionados à presença de *X. citri* na plantação incluem desfolha de plantas, depreciação da qualidade da produção, presença de lesão em frutos, queda prematura de frutos e restrição da comercialização (FUNDECITRUS, 2017) (Figura 5B). (Fundecitrus, 2017).

O primeiro surto envolvendo infecção por *X. citri* foi primeiramente reportado no século XIX na China e Índia e, a partir de 1820, foram registrados os primeiros relatos de seu aparecimento no continente americano (PEGOS, 2015). Uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de laranja e seu suco, estados como São Paulo, o maior representante do segmento, é um dos mais

afetados pelo microrganismo, que atualmente, possui estratégias específicas para evitar a contaminação, através de medidas práticas como barreiras vivas, e inspeção rotineira. (FUNDECITRUS, 2017).

Em relação à patogenicidade das espécies do gênero *Xanthomonas*, alguns dados vêm sendo levantados para caracterização de genes que potencializem a virulência da bactéria. Resultados obtidos em diversos estudos têm revelado que aproximadamente 50 a 100 genes estão direta ou indiretamente relacionados com a capacidade das bactérias causarem doenças em plantas. Esses genes codificam, em sua maioria, proteínas que se localizam no envoltório celular, como proteínas transportadoras, ou proteínas que são secretadas para o meio extracelular. O envoltório representa, portanto, um dos componentes celulares mais importantes envolvidos na patogenicidade e na evasão de sistemas de defesa do hospedeiro (DA SILVA, 2002).

Figura 5 – Características de *Xanthomonas citri* e consequências da infecção em citrus. A. *X. citri* crescida em meio Lúria Bertani. A colônias apresentam coloração amarelada devido à produção da goma xantana e o pigmento xanthomonadina. Retirado de Sampaio, 2014. p20. **B.** Foto de cancro cítrico provocado pela Xac em *Citrus sinenses*. Fonte: Fundecitrus,2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em: 23/11/2017.

Uma vez que o sistema Pst e componentes do regulon Pho têm sido relacionados à respostas biológicas secundárias envolvendo os mecanismos de virulência e patogenicidade de microrganismos (LAMARCHE, et al., 2008; PEGOS et al., 2014; PEGOS, 2015; SANTOS-BENEIT, 2015; WANNER, 1990; WANNER, 1996), o estudo destes componentes é de grande interesse, especialmente, em bactérias patogênicas como *X. citri*.

Experimentos realizados pelo nosso grupo, sobre o sistema de transporte Pst de *X. citri*, mostraram similaridades e também diferenças significativas quando comparado com o sistema Pst de *E. coli*. As análises iniciais mostraram que o operon codificador do sistema Pst e PhoU é similar ao de *E. coli*, mas que *X. citri* tem um gene de uma segunda proteína ligadora de Pi, codificada pelo gene *phoX*, pertencente ao operon *pstSCAB – phoU/oprOphoX* (Pegos et al, 2014), (Figura 6A). A proteína PhoX foi então, caracterizada estruturalmente, o que revelou sua importância para o sistema, pela primeira vez. Análises filogenéticas ainda revelam que PstS e PhoX foram originadas a partir de uma duplicação gênica e possuem ancestral comum, *Desulfatibacterium alkenivorans*, uma bactéria que possui duplicação do gene *pstS* (Figura 6B). Em concordância com estes resultados, análises de bioinformática, mostraram que PhoX conserva todos os resíduos da interação com fosfato, em relação à PstS, porém, PhoX apresenta-se pouco mais estável sob altas temperaturas e pode possuir uma afinidade diferente por Pi. Contudo, mutantes *pstS* demonstram constitutivação do sistema e consequente super expressão de PhoX, evidenciando seu caráter compensatório (Pegos, 2015), (Figura 6C).

Adicionalmente, estudos realizados em meio A, (meio mínimo, padrão para caracterização de fosfatase alcalina, descrito por Levinthal; Signer; Fetherolf, em 1962) e meio A+Pi mostraram, através de espectrometria de massas, as diferenças relacionadas à presença e ausência das proteínas nessas condições, especialmente àquelas pertencentes ou relacionadas ao regulon Pho. As análises identificaram 232 proteínas, divididas em 19 categorias. Essas análises mostraram a expressão de algumas proteínas do Pho Regulon tanto na ausência quanto na presença de fosfato em *X. citri*. Na presença de fosfato, as proteínas PstS, PhoX, que são proteínas ligadoras de fosfato, foram ativamente mais expressas, assim como proteínas receptoras como OprO. Em contrapartida, todas as proteínas envolvidas no transporte e sinalização de Pi apresentaram aumento na expressão em mais de 30% na ausência de fosfato, indicando a relevância do sistema e um mecanismo similar ao que ocorre em *E. coli*, como mostra a figura 6D (Pegos, 2014). Esses resultados indicam que *X. citri*, apesar de ter uma proteína periplasmática a mais que *E. coli*, ainda assim, conserva o mesmo mecanismo de transporte e sinalização, descritos desde a década de 1990 (Lamarche et al., 2008; Wanner, 1990).

Figura 6 – Resultados dos estudos realizados em *X. citri* evidenciam diferenças e similaridades em relação à *E. coli*. A. Operons ilustrados dos sistemas TCRS e Pst. Em ambos os operons, é possível observar genes adicionais para *X. citri*, como *ppX* e *ppK* para o operon do TCRS e *phoX* e *oprO* para o sistema Pst. B. Árvore filogenética é dividida em 5 grupos e mostra ancestral comum entre PstS e PhoX. Setas e o círculo ilustram, respectivamente, duplicação gênica e transferência horizontal de genes. C. Esquema de sinalização do sistema Pst na captação e transporte de fosfato em *Xanthomonas citri*. Proteínas são mostradas em cartoon e a membrana é mostrada em cinza. PhoX está destacada em círculo vermelho e apresenta efeito compensatório na ausência de PstS. D. Análises de proteômica mostram as diferenças entre os cultivos de *X. citri* na presença e ausência de fosfato e consequentemente, evidenciam aumento da expressão de genes relacionados a transporte e sinalização quando fosfato é ausente. Retirado e modificado de Pegos et al, 2014; Pegos, 2015.

Portanto, caracterizar as vias de sinalização e captação de fosfato em *X. citri* torna-se importante para abranger os resultados sobre o regulon Pho e sobre como a regulação ocorre nesse microrganismo. Neste projeto, com a finalidade de compreender a regulação e sinalização do TCRS e também do sistema Pst, visamos caracterizar estruturalmente a proteína repressora PhoU de *X. citri* e entender como poderia acontecer sua interação com a proteína PhoR. Uma vez que o Pho Regulon não é somente um sistema regulatório para homeostase celular, mas também, uma complexa conexão para virulência bacteriana e resposta a estresse, este trabalho torna-se uma importante

ferramenta para posteriores estudos sobre virulência bacteriana e seu envolvimento no desenvolvimento da patogênese em *Xanthomonas citri*.

2 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a proteína PhoU de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* apresenta homologia com as proteínas PhoU de outros microrganismos, como *Xylella fastidiosa* e *Agrobacterium* sp., o que indica que sua presença seja importante para estes fitopatógenos. Além disso, mediante alinhamento de sequências e através da análise das estruturas já depositada no *Protein Data Bank*, foi possível observar que PhoU possui conservação estrutural entre as espécies, e, portanto, apresenta conservação de todos os motivos e resíduos funcionais, de acordo com a comparação com os seus respectivos ortólogos.

Ainda conseguimos mostrar que a proteína recombinante PhoU, apresentou enovelamento esperado e sofreu alterações conformacionais na presença de ao menos um dos seus possíveis ligantes, manganês. Estes dados corroboram as discussões da literatura, das quais relatam que a presença dos cátions ajudaria a localização da proteína próxima à membrana plasmática e, também, na interação com PhoR. Adicionalmente, ressaltamos que PhoU também pode interagir com PstB, a ATPase do sistema Pst, e que a presença destes elementos também seria um mecanismo para aumentar ou diminuir a interação entre as mesmas. Além disso, esses dados são importantes para estudos futuros, relacionando a importância de manganês aos mecanismos de fosforilação e desfosforilação proteica.

Também foi possível produzir e purificar a proteína PhoR, porém, não foi possível obter dados da interação entre ambas através de ensaios de *Pull Down*. Entretanto, os protocolos aqui gerados podem contribuir para a elucidação de aspectos importantes na sinalização do transporte de fosfato, futuramente.

Apesar de não terem sido obtidos os resultados de interação desejados, os ensaios de bioinformática, podem futuramente, facilitar a obtenção de informações do complexo inteiro de sinalização, por meio do direcionamento fornecido a partir do estudo dos resíduos específicos de interação.

Finalmente, este trabalho abriu uma série de perspectivas para o estudo sobre a regulação dos sistemas de captação e sensoriamento de fosfato em *X. citri*, o que ainda é pouco estudado. Uma vez que, desde a década de 80, quando

a proteína PhoU foi primeiramente descrita, até o atual momento, os mecanismos pelo qual a proteína interage ainda permanecem não elucidados, este trabalho representa importantes avanços na caracterização de PhoU em *X. citri*. Sua continuação será realizada por dois projetos de mestrado no grupo, e sua finalização será relevante para os sistemas aqui descritos e relatados.

REFERÊNCIAS*

- ALVAREZ-MARTIN, P. et al. A conserved two-component signal transduction system controls the response to phosphate starvation in *Bifidobacterium breve* UCC2003. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5258-5269, 2012.
- ARAWAKA, T; KITA, Y. Multi-Faceted Arginine: Mechanism of the Effects of Arginine on Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v.15, n.6, 2014.
- ASHKENAZY H. et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v.44, Volume 44, n. W1, p. W344–W350, 2016.
- BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis, **FEMS Microbiology**, v.24, p.449-467, 2000.
- BAEK, J, H., LEE, S.Y. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology**. Lett, v.264, p.104-109, 2006.
- CRÉPIN, S. et al. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.153, p. 82–88. 2011.
- DAS, A.K. Citrus canker – a review. **Journal of Applied. Horticulture**. v.5, n.1, p.52-60, 2003.
- DAVIDSON, A.L., CHEN, J. ATP binding cassette transporters in bacteria. **Annual Review in Biochemistry**, v. 73, p 241-268, 2004.
- DAVIDSON, A.L. et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and molecular biology**. v.72, n.2, p. 317-364, 2008.
- DA SILVA, A.C.R et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.
- DROZDETSKIY, A. et al. Pred4: A Protein Secondary Structure Prediction server. **Nucleic Acids Research**. Web Server issue, v.43, p. 389-394, 2015.
- EMBL-EBI, Clustal Omega. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: Dezembro de 2015.
- GARDNER, S.G. et al. The PhoU Protein from *Escherichia coli* Interacts with PhoR, PstB, and Metals to Form a Phosphate-Signaling Complex at the Membrane. **Journal of Bacteriology**, v.196, n. 9, p. 1741–1752, 2014.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GARDNER, S.G. et al. Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in *Escherichia coli*. **BMC Genetics**, v.16, n. 2, 2015.

GIBSON, J.L. et al. Atypical Role for PhoU in Mutagenic Break Repair under Stress in *Escherichia coli*. **Plos One**, v.10, n.5, p.1-20, 2015.

HAN, J.S., et al. PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.262, p.448-452, 1999.

HARRIS, R.M., et al. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.17, p.5008-5014.

HONG, T. et al. Arginine prevents thermal aggregation of hen egg white proteins. **Food Research International**, v.97, p. 272-279, 2017.

HSIEH, Y.J., WANNER, B.L. Global regulation by the seven-component P_i signaling system. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, n.2, p.198-203, 2010.

KIM, J. G.; PARK, B. K.; YOO, C. H.; JEO, E.; OH, J.; HWANG, I. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* HRP pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 3155-3166, 2003.

KNAACK, N. *Xanthomonas* sp: Phytosanitary Threat to Brazil. **Rice Research Journal**, v.3, p.109.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy** 2nd Ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

LAMARCHE, M.G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology**, v. 32, p. 461–473, 2008.

LEE, S.J. et al. Crystal structure of PhoU from *Pseudomonas aeruginosa*, a negative regulator of the Pho regulon. **Journal of Structural Biology**, v.188, p.22-29, 2014.

LEVINTHAL, C., SIGNER, E., FETHEROLF, K. Reactivation and Hybridization of reduced alkaline phosphatase. **PNAS**, v.48, 1962.

LIU, J., et al. Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.15960–15966, 2005.

LOCHER, K. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.23, n.6., p.487-493, 2016.

LUBIN, E.A. et al. Identification of the PhoB Regulon and Role of PhoU in the Phosphate Starvation Response of *Caulobacter crescentus*, **Journal of Bacteriology**, v.198, p.187–200, 2016.

LUZ, D.E. et al. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. **Molecular Oral Microbiology**, v.27, n.3, p.172-181, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Education Inc. 2004.

MARQUES, M.V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

MAYROSE, I. et al. Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: empirical Bayesian methods are superior. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.1781-1791, 2004.

MOITRA, K.; LOU H.; DEAN M. Multidrug efflux pumps and câncer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 4, p. 491-502, 2011.

OGANESYAN, V., et al. Crystal structure of the “PhoU-like” phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.4238–4244, 2005.

PAPP-WALLACE, K.M; MAGUIRE, M.E. Manganese Transport and the Role of Manganese in Virulence. **Annual Review of Microbiology**, v.60, p.187-209, 2006.

PEGOS, V. R. et al. Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 108, p. 78-88, 2014.

PEGOS, V.R. **Caracterização estrutural e funcional do sistema de captação de fosfato da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2015. 238f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular de Microrganismos) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

PODGORNAIA, A.I. et al. Structural basis of a rationally rewired protein-protein interface critical to bacterial signaling. **National Institute of Health**, v. 21, n.9, 2013.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**. v.42, n.W1, p.W320-W324, 2014.

ROST, B., YACHDAV, G., LIU, J. The Predict Protein server. **Nucleic Acids Research**, v.32, n. Web Server issue, p. W321–W326, 2004.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS-BENEIT, F. The Pho Regulon: a huge regulatory network in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.402, p.1-13, 2015.

SHARPE, T. Circular Dichroism Unit Conversion. **Biozentrum Biophysics Facility**, p.única, 2012.

SCHRÖDINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.7

STEED, P.M.; WANNER B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the pstSCAB-phoU operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.21, p.6797-6.09, 1993.

TAM, R. SAIER, M.H. Pbp. Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **American Society for Microbiology**, v57, n.2, p.320-346, 1993.

TUNG, S. Y.; KUO, T. T. Requirement for phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus canker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5564-5570, 1999.

VANBOGELEN, R.A., et al. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.15, p. 4344-4366, 1996.

VUPPADA, R.K., et al. Phosphate signaling through alternate conformations of the PstSCAB phosphate transporter. **BMC Microbiology**, v.18, n.8, p. 1-9, 2018.

WANNER, B.L., BOLINE, J.A. Mapping and molecular cloning of the phn (psiD) locus for phosphonate utilization in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.3, p.1186-1196, 1990.

WANNER, B.L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.51, n1, p. 47-54, 1993.

WANNER, B.L. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. **Kidney International**, v.49, p.964-967, 1996.

WANNER, B. L. **Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon**. Em: Neidhardt, R.C.I., Ingraham, J.L., Lin, E.E.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbrager, H.E. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington: American Society for Microbiology, p. 1357–1381, 1996.

WANG, C. et al. Mechanistic Insights Revealed by the Crystal Structure of a Histidine Kinase with Signal Transducer and Sensor Domains. **Plos Biology**, v.11, n. 2, p.1-14, 2013.

WÄRDELL, K.; JAKOBSSON, A.; NILSSON, G. E. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. **Biomedical Engineering**, v. 40, p. 309-316, 1993.

WEBB, B., SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v.5, n.6, p.1-5, 2014.

WHITMORE L., WALLACE, B.A. Dichroweb, an online server for protein secondary structure analysis from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.668–673, 2004.

YANG, N.M. Magnesium as a natural substitute for manganese in concanavalin A and other lectins. **FEBS Letters**, v . 161 n. 2, p. 247-250, 1983.

YOSHIDA, Y. et al. Novel members of the phosphate regulon in Escherichia coli O157:H7 identified using a whole-genome shotgun approach. **Gene**, v. 512, p. 27-35, 2012.

ZHENG, J.J. et al. Physiological Roles of the Dual Phosphate Transporter Systems in Low and High Phosphate Conditions and in Capsule Maintenance of *Streptococcus pneumoniae* D39. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.6, n.63, p.1-17, 2016.